

10561
1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

ESTUDIO FISIQUÍMICO
Y
EVALUACIONES DE LAS ACTIVIDADES
ANTINEOPLÁSICA Y ANTIINFLAMATORIA
DE LA *Hippocratea excelsa*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN FÍSICOQUÍMICA
(MÉTODOS Y METROLOGÍA)

PRESENTA LA

Q. MARÍA CRISTINA MAYELA GARCÍA RUIZ

DIRECTOR

DR. MARIANO MARTÍNEZ VAZQUEZ



CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2003

TESIS CON
FECHA DE ORIGEN

A



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.

**PAGINACION
DISCONTINUA**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN UNAM
DIRECCIÓN**

OFICIO/FES-C/D/1380/IX/2001.

ASUNTO: Designación de Jurado.

BIOL. FRANCISCO J. INCERA UGALDE
JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN DE POSGRADO
DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
Presente.

La Dirección de esta Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, autoriza a la alumna **GARCIA RUIZ MARIA CRISTINA MAYELA**, con número de expediente **100961046** y número de cuenta **79529873**, para presentar su examen de grado de la **Maestría de Físicoquímica (Métodos y Metrología)**, con la tesis titulada **"Estudio fitoquímico y evaluaciones de las actividades antineoplásica y antiinflamatoria de la Hippocratea excelsa"** a quien se le ha designado el siguiente jurado:

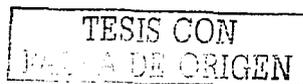
Presidente:	DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
Vocal:	DR. RENÉ MIRANDA RUVALCABA
Secretario:	DR. JOSÉ GUILLERMO PENIERES CARRILLO
Primer Suplente:	DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
Segundo Suplente:	M.C. GEORGINA ESPINOSA PÉREZ

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
" POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU "
Cuautitlán Izcalli, Méx., a 11 de septiembre del 2001.


DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR

c.c.p. Exp. Alumno
c.c.p. Archivo
JAMC/SRR/PBN/sgu





UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

Coordinación General de Estudios de Posgrado
FES-Cuautitlán
Presente.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARTA DE VOTOS APROBATORIOS

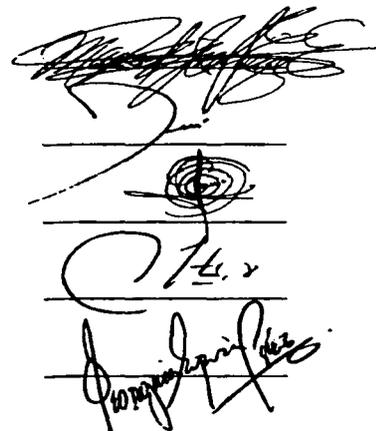
Por medio de este conducto nos permitimos comunicar a usted que revisamos la tesis titulada "Estudio fitoquímico y evaluaciones de las actividades antineoplásica y antiinflamatoria de la *Hippocratea excelsa*" que presenta la alumna MARIA CRISTINA MAYELA GARCÍA RUIZ con número de cuenta 7952987-3 y número de expediente 100961046 para obtener el grado de Maestra en Físicoquímica. Consideramos que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el Examen de Grado correspondiente, otorgamos el voto aprobatorio.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán, Izcalli a 8 de octubre del 2002

NOMBRE DE LOS SINODALES

Presidente:	DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
Vocal:	DR. RENÉ MIRANDA RUVALCABA
Secretario:	DR. J. GUILLERMO PENIERES CARRILLO
Primer Suplente:	DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
Segundo Suplente:	M.C. GEORGINA ESPINOSA PÉREZ



TESIS CON
BASTANTE ORIGEN

C

JURADO

PRESIDENTE *DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA.*

VOCAL *DR. RENÉ MIRANDA RUVALCABA.*

SECRETARIO *DR. JOSÉ GUILLERMO PENIERES CARRILLO.*

PRIMER SUPLENTE *DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ.*

SEGUNDO SUPLENTE *M.C. GEORGINA ESPINOSA PÉREZ.*

E l presente trabajo se realizó en el Laboratorio 1-4 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Mariano Martínez Vázquez, con el apoyo económico de la DGAPA mediante el proyecto PAPIIT IN-203198.

TESIS CON
FOLIO DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

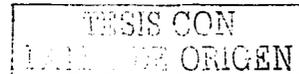
Al hombre que con su amor, dedicación y paciencia, me enseñó lo importante que es superarse día a día, y que me apoyó incondicionalmente en todo lo que hacía.

Con ese mismo amor cuido de mis hijas, que eran su tesoro más grande, para que yo pudiera realizar un sueño más, que no logró ver culminado.

Papá, a ti dedico este trabajo con todo mi amor, siempre estarás conmigo.

Mamá no tengo palabras para expresarte todo mi agradecimiento por la formación que me diste, por tu constancia y esfuerzo para que llegara a ser una profesionalista. Ahora comparto contigo la realización de un sueño más.

¡Que Dios te bendiga! Por el apoyo incondicional, como mi brazo derecho en la educación y cuidado de mis hijas. Tu eres una parte importante en la realización de este trabajo.



Luis, mi compañero en todo, gracias por tu apoyo, constancia y paciencia en lo que realizo día a día, sobre todo por ser mi guía.

Gracias por ayudarme en la realización de este trabajo que es tan tuyo como mío, un sueño más que compartimos.

Te amo

Mayela y Diana, mis dos amores, espero ser un ejemplo a seguir para ustedes, nunca dejen de realizar sus sueños e ilusiones. Sean constantes y llegarán muy alto, no importa cuanto tiempo se tarden, lo importante es llegar a la meta. Gracias por cederme parte de su tiempo para la realización de este trabajo.

Las adoro

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Rafael, comparto contigo este trabajo, que sé. va a ser orgullo para ti, como en todo lo que logró alcanzar.

Te quiero mucho

Tía Alicia y Paz muchas gracias por siempre encomendarme a Dios en sus oraciones para que salga con bien en todo lo que hago.

Las quiero mucho

MC Teresa O. Ramírez Apan muchas gracias por su colaboración en las pruebas de evaluación farmacológica para la realización de este trabajo.

Al H. Jurado por sus comentarios, sus consejos y apoyo en la revisión de este trabajo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Pilares en mi formación académica

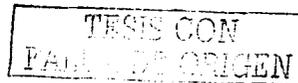
Dr. José Guillermo Penieres Carrillo, por brindarme el apoyo y la confianza al abrirme las puertas de la FESCuautitlán, además de sus comentarios para la realización de este trabajo.

Dr. René Miranda Ruvalcaba, por estar siempre presente en mi formación profesional y académica con su apoyo incondicional, hasta la realización de este trabajo.

Dr. Mariano Martínez Vázquez, por permitirme realizar este trabajo bajo su dirección, sin lo cual no hubiera podido llegar hasta aquí.

Por su apoyo, sus enseñanzas, consejos y una gran paciencia.

Mil gracias, los admiro y respeto



ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
GLOSARIO	xi
TABLAS	xiii
DIAGRAMAS	xv
FIGURAS	xvi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
A. Antecedentes botánicos	3
B. Antecedentes etnobotánicos	5
C. Antecedentes fitoquímicos	5
D. Antecedentes farmacológicos	8
III. OBJETIVOS	9
A. General	9
B. Particulares	9
IV. HIPÓTESIS	10

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

	PÁGINA
V. PARTE EXPERIMENTAL	11
A. Material y métodos	11
1. Condiciones generales	11
2. Material vegetal	12
3. Preparación del material vegetal	12
4. Extracción del material vegetal	13
5. Evaluación antiinflamatoria del extracto hexánico	15
B. Aislamiento de compuestos presentes en el extracto hexánico de la corteza de la raíz	17
1. Obtención del derivado metilado del ácido 3-oxocanofilico	22
C. Evaluación de la actividad biológica de los compuestos purificados	24
1. Evaluación de la actividad antiinflamatoria	24
2. Evaluación de la actividad citotóxica	24
3. Evaluación de la actividad antioxidante	26
VI. RESULTADOS	
A. Aislamiento del ácido 3-oxocanofilico	28
B. Evaluación de la actividad biológica	33
1. Determinación de la actividad antiinflamatoria de canofilol, canofilal, ácido 3-oxocanofilico y pristimerina	33

	PÁGINA
2. Evaluación de la actividad citotóxica del canofilol, canofilal, ácido 3-oxocanofilico y pristimerina	34
3. Evaluación de la actividad antioxidante de canofilol y pristimerina	36
VII. DISCUSIÓN	36
A. Actividad antiinflamatoria	36
B. Actividad citotóxica	49
VIII. CONCLUSIONES	50
IX. REFERENCIAS	52
APÉNDICE	55
<i>Datos Espectrales y Espectroscopia</i>	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN.

La *Hippocratea excelsa*, comúnmente conocida dentro de la medicina tradicional mexicana como "cancerina" o "mata piojos", goza de gran popularidad, razón por lo cual, se han realizado con ella numerosas investigaciones químicas y farmacológicas.

Al respecto, en este trabajo de investigación, se presentan y discuten los estudios fitoquímico y farmacológicos tanto del extracto hexánico de la corteza de la raíz de esta planta como de algunos componentes presentes éste.

Así, mediante métodos cromatográficos, se logró la separación de β -amirina, β -sitosterol, pristimerina, canofilol, canofilal y ácido 3-oxocanofilico un compuesto nuevo.

Por otro lado, la evaluación antiinflamatoria, del extracto y de los compuestos obtenidos se realizó a partir del ensayo del edema inducido con 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) en oreja del ratón; los resultados son indicativos de que el canofilol y la pristimerina tienen actividad antiedematosa.

A su vez, cuando la evaluación citotóxica se realizó siguiendo el modelo de la sulforodamina B, los resultados obtenidos mostraron que el canofilol y la pristimerina tienen actividad citotóxica.

Finalmente en cuanto a la actividad antioxidante de las moléculas estudiadas, solo la pristimerina tuvo efecto positivo durante la prueba de reducción del radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidracilo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT.

Hippocratea excelsa is commonly known in Mexican folk medicine as "cancerina" or "louse killer", it has great popularity between Mexican people; consequently, the reddish-brown root barks of the target vegetable are widely investigated.

Thus, this paper describes a chemical and pharmacological study for some of the isolated products, as well as for the *n*-hexane extract of the named root barks, The obtained molecules were: β -amyrin, β -sitosterol, pristimerin, canophyllol, canophylal and 3-oxocanophylic acid a new compound.

In addition, the *n*-hexane extract of roots and its isolated compounds, were evaluated in order to know their anti-inflammatory effects, by using TPA-induced inflammation test in mice; it is worth mentioning that canophyllol and pristimerin demonstrate such activity.

Moreover, when cytotoxic properties were assayed, using the sulphorhodamine B, test on the *n*-hexane extract and its isolated products, it was observed that canophyllol and pristimerin showed positive results.

Finally the anti-oxidant activity of the natural molecules was tested by analysing its effect on DPPH; only pristimerin caused a reduction of the studied free radical.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GLOSARIO.

AcOEt	Acetato de etilo
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
-CH ₃	Metilo
-CH ₂ -	Metileno
-CH-	Metino
COSY	Correlación espectroscópica homonuclear (¹ H - ¹ H)
CH ₂ Cl ₂	Cloruro de metileno
δ	Desplazamiento químico.
d	Doblete
DE ₅₀	Dosis efectiva 50
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	Radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidracilo
EM IE	Espectrometría de masas por impacto electrónico.
ES	Error estándar
g	Gramos
HETCOR	Correlación heteronuclear (¹³ C - ¹ H)
ip	Intraperitoneal
m	Multiplete
μg	Microgramos

μl	Microlitros
μM	Micromolar
mg	Miligramos
ml	Mililitros
m/z	Relación masa-carga
M^+	Ion molecular
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
nm	Nanómetros
pf	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
RMN ^{13}C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN ^1H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno.
s	Singulete
t	Triplete
TPA	13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol.
UV	Espectrofotometría de absorción en el ultravioleta.
ν_{max}	Frecuencia máxima

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLAS.

Tabla 1. Especies del género *Hippocratea*.

Tabla 2. Efecto inhibitorio de indometacina y extracto hexánico en inflamación inducida por TPA en oreja de ratón.

Tabla 3. Fracciones reunidas de la cromatografía en columna del extracto Hexánico.

Tabla 4. Purificación de las fracciones provenientes de la cromatografía en columna del extracto hexánico de la corteza de la raíz de la *Hippocratea excelsa*.

Tabla 5 . Fracciones recuperadas de la cromatografía en columna del compuesto E_{H5}.

Tabla 6. Datos de RMN ¹H del canofilol, canofilal, ácido 3-oxocanofilico y su éster metílico.

Tabla 7. Efecto inhibitorio de indometacina, extracto hexánico, canofilol y pristimerina en inflamación inducida por TPA en oreja de ratón.



Tabla 8. Actividad citotóxica IC_{50} de canofilol y pristimerina en prueba de sulforodamina B, en líneas celulares cancerígenas.

Tabla 9. Determinación de la actividad antioxidante de pristimerina por medio de la reducción del radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

Tabla 10. Principales ángulo dihedros del canofilol.

Tabla 11. Principales ángulo dihedros del canofilal.

Tabla 12. Principales ángulo dihedros del ácido 3-oxocanofilico.

Tabla 13. Principales distancias entre átomos de carbono e hidrógeno en el canofilol.

Tabla 14. Principales distancias entre átomos de carbono e hidrógeno en el canofilal.

Tabla 15. Principales distancias entre átomos de carbono e hidrógeno en el ácido 3-oxocanofilico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DIAGRAMAS.

Diagrama 1. Diagrama de flujo que indica la metodología seguida para la separación, purificación y caracterización de compuestos obtenidos a partir del extracto hexánico de la corteza de la raíz de *Hippocratea excelsa*.

Diagrama 2. Metodología del ensayo del edema inducido por TPA en oreja de ratón.

Diagrama 3. Metodología para la evaluación de la citotoxicidad en el ensayo de sulforodamina B.

Diagrama 4. Metodología para la evaluación de la actividad antioxidante por medio de la reducción del radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURAS.

Figura 1. Interacciones entre las diferentes enzimas y mediadores involucrados en la activación de la cascada del ácido araquidónico en la inflamación.

Figura 2. Confórmero más estable del canofilol.

Figura 3. Confórmero más estable del canofilal.

Figura 4. Confórmero más estable del ácido 3-oxocanofilico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I. INTRODUCCIÓN.

Desde su aparición en la tierra, el hombre inició lo que sería con los años una gran aventura. Su relación con la naturaleza se fue estrechando y pronto descubrió los caminos para vincularse con su entorno, y las plantas y los animales empezaron a formar parte de su mundo. En ellos encontró la base de su alimentación y la principal fuente de los remedios para sus males. Esta experiencia empírica formada a través del tiempo, le permitió comprobar las propiedades curativas de las plantas, conformando así, lo que hoy se conoce como herbolaria o medicina tradicional.

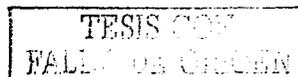
En México existe información registrada en documentos del Siglo XVI, como en el Códice De la Cruz-Badiano y La Historia General de las Cosas Nuevas de la Nueva España de fray Bernardino de Sahugún, documentos que dan cuenta de la gran variedad de especies de plantas que eran utilizadas por los habitantes del México prehispánico, para el tratamiento de las más diversas enfermedades. Estos documentos prueban que la medicina indígena era un recurso para enfrentar varios de sus padecimientos. Hoy en día, sin importar de qué región se trate, la medicina tradicional mantiene su vigencia, y son muchas las familias mexicanas que, para curar sus males, siguen acudiendo a los remedios llamados caseros, que han sido transmitidos de generación en generación (1, 15, 17, 31). La gran variedad de climas y una orografía accidentada, hacen de México un país rico en recursos herbolarios, de tal forma que prácticamente no hay padecimiento que no tenga planta para curarlo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Sin embargo, de 1900 a 1970 se produjo una drástica disminución en el uso de sustancias naturales con propiedades medicinales. Esto fue provocado por la producción, a gran escala, de productos sintéticos con características similares o aparentemente de mayor eficacia curativa. Pero al presentarse un resurgimiento de enfermedades que se creían erradicadas (malaria, parasitosis, tuberculosis, etc), así como la creciente incidencia del Cáncer y la aparición del mortal SIDA, se ha considerado necesario y urgente intensificar la búsqueda de nuevas sustancias, particularmente en las especies con antecedentes etnobotánicos (15, 17).

México, cuenta con aproximadamente 4500 especies con atributos medicinales. Sin embargo, los estudios químicos de la flora mexicana son escasos en comparación con la gran variedad de plantas existentes, de ahí la importancia de llevar a cabo proyectos en donde se asumen los efectos curativos de las plantas, su clasificación botánica, familias, géneros y especies, así como la identificación de sus metabolitos activos, de tal forma que se amplíe el conocimiento existente de las plantas medicinales.

El presente trabajo coloca sus objetivos en este esfuerzo, por lo que se plantea validar el uso de la corteza de la raíz de la *Hippocrateae excelsa*, como un remedio antiinflamatorio y anticancerígeno. Para tal efecto, se propusó realizar el estudio fitoquímico y la evaluación de las actividades citotóxicas y antiedematosas del extracto hexánico de la corteza de la raíz de esta especie.



II. ANTECEDENTES.

A. Antecedentes botánicos de *Hippocratea excelsa* HBK.

La *Hippocratea excelsa* HBK (Sin: *Hemiangium excelsum* HBK) pertenece a la familia **Hippocrateacea** , está constituida por cerca de 115 especies que se encuentran distribuidas en el Sureste de Estados Unidos de Norteamérica y México, además dentro de la zona tropical de Sudamérica (33).

En la **Tabla 1** se citan las 12 especies del género *Hippocratea* que se conocen en nuestro país, dentro de las cuales la más comercializada es la *Hippocratea excelsa* (33).

Esta especie suele recibir diversos nombres vulgares, de acuerdo a su uso y a la zona geográfica en la que se localiza. Así, en Oaxaca recibe los nombres de barajilla, fruta de rosa, aguatcui, mata piojo. En Chiapas se le conoce como palo de piojo, piojo, palo de reguilete, y atzultó, mientras que en Yucatán recibe el nombre de chumloop y salbeets (26, 33).

La *Hippocratea excelsa* es un bejuco leñoso delgado que llega a medir hasta 7 m de largo. El tallo es de 10 cm de diámetro, con ramas pecioladas. Las hojas miden de 6 a 12 cm, de forma oblongoelípticas, pecioladas, redondeadas en el ápice, con inflorescencias que miden de 1.5 a 6 cm de largo. Sus flores son de color blanco y de 6-10 mm de ancho, y presentan sépalos regularmente abovado-dentados. Los frutos son de forma elíptica capsulares que miden aproximadamente 6 cm. La corteza de la raíz es de color café rojizo (33, 34, 37).

En nuestro país, se encuentra distribuida en los estados de Chiapas, México, Durango, Guerrero, Oaxaca, Puebla y Yucatán (33, 34).



Tabla 1. Especies del género *Hippocratea*.

Nombre científico	Distribución	Nombre común
<i>Hippocratea excelsa</i> HBK	Oaxaca, Guerrero, Puebla, Durango	Cancerina, matapijos.
<i>Hippocratea utilis</i> Rose	Sinaloa	Bejuco corolado.
<i>Hippocratea meizantha</i> Blake	Veracruz, Morelos.	---
<i>Hippocratea elliptica</i> HBK	Guerrero.	---
<i>Hippocratea rovirosaes</i> Standl	Tabasco	---
<i>Hippocratea pauciflora</i> Rose	Tamaulipas, Sinaloa.	Matapijos, hierba del piojo.
<i>Hippocratea acapulcensis</i> HBK	Guerrero.	Bejuco de piojo, pepitas de piojo.
<i>Hippocratea tabascensis</i> Lundell	Tabasco.	Barajilla.
<i>Hippocratea mexicana</i> Miers	Guerrero, Sinaloa, Oaxaca.	Matapijos.
<i>Hippocratea seleariana</i> Loes	Morelos.	Matapijos.
<i>Hippocratea chiapanensis</i> Standl	Chiapas.	Matapijos.
<i>Hippocratea yucatanensis</i> Standl	Yucatán.	Matapijos.

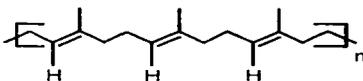
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B. Antecedentes etnobotánicos.

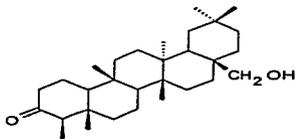
Dentro de la herbolaria o medicina tradicional mexicana, se utiliza la corteza de la raíz de la *Hippocratea excelsa* preparada en cocimiento, administrada por vía oral para tratar diversas enfermedades, como las úlceras gástricas, afecciones de la piel, padecimientos de los riñones, amenorrea e infecciones uterinas y por vía local para lavar heridas, para matar piojos y para combatir el mal olor de los pies. Además, en el medio rural recibe el nombre de "mata piojos" debido a sus propiedades como pesticida, las cuales son aprovechadas por granjeros y rancheros (26, 33, 37).

C. Antecedentes fitoquímicos.

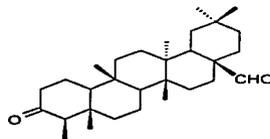
Estudios químicos sobre esta planta han demostrado la presencia de *trans* – poliisopreno, triterpenos del tipo frideano, como: canofilol, canofolal, ácido canofílico y frideína. Quino-triterpenos como: celastrol, excelsina, pristimerina y tinginona. Esteroles como: β -sitosterol y β -amirina. Y alcaloides terpénicos del tipo piridínico, como la hippocrateína I (3, 4, 19, 23, 26, 37).



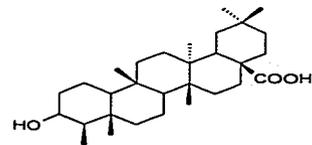
Transpoliisopreno



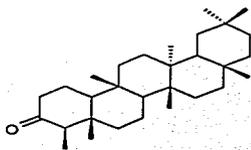
Canofilol



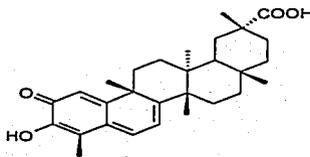
Canofilal



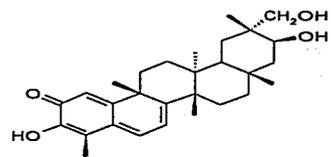
Acido canofilico



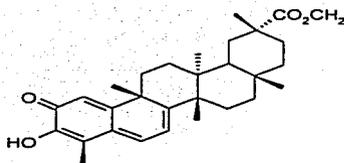
Fridelina



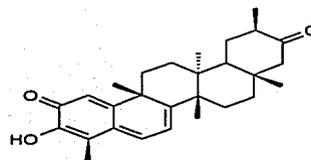
Celastrol



Excelsina

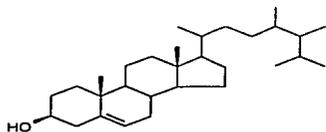


Pristimerina

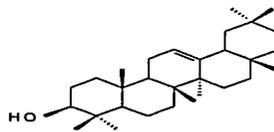


Tinginona

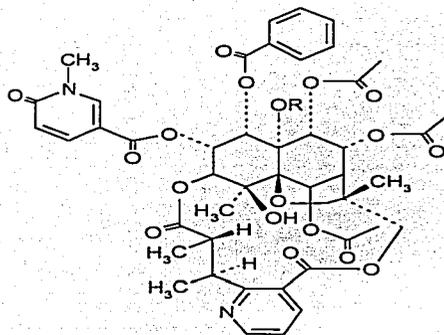
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



β -Sitosterol



β -Amirina



Hippocrateina I

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

D. Antecedentes farmacológicos.

Mediante estudios farmacológicos previos, se ha demostrado que el canofilal presente en el extracto hexánico posee una moderada actividad sobre *Pseudomonas aeruginosa* (30). Por otro lado, el alcaloide emarginatina A demostró tener significativa actividad citotóxica contra células KB, mientras que la hipocrateína I mostró actividad en el ensayo de artemia salina, así como en la prueba de citotoxicidad contra células de leucemia de ratón *in vitro* (9 PS) (19).

También se determinó la actividad antiinflamatoria, en varios modelos *in vivo*, de un extracto etanólico de esta especie (28).

Como lo demuestran estos estudios, se ha determinado la actividad antimicrobiana de un extracto hexánico y la actividad antiinflamatoria de un extracto metanólico de la corteza de la raíz de la *Hippocratea excelsa*. Sin embargo, no se ha evaluado la actividad antiinflamatoria del extracto hexánico de esta especie, a pesar de que contiene varios triterpenos del tipo fridelano, esqueleto que ha sido encontrado en varios compuestos con significativa actividad antiedematosa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. OBJETIVOS.

A. GENERAL.

Evaluar las actividades citotóxicas y antiinflamatorias de un extracto hexánico de la corteza de la raíz de la *Hippocratea excelsa*, y de algunos de sus componentes presentes en él.

B. PARTICULARES.

1. Evaluar las actividades citotóxicas y antiinflamatorias del extracto hexánico de la corteza de la raíz de la *Hippocratea excelsa*.
2. Purificar y elucidar la estructura de los compuestos aislados a partir del extracto hexánico de la corteza de la raíz de la *Hippocratea excelsa*.
3. Evaluar la actividad antiinflamatoria de los compuestos separados mediante el ensayo del edema inducido con TPA en oreja de ratón.
4. Determinar la actividad citotóxica del extracto de los compuestos obtenidos del extracto hexánico, empleando para ello diferentes líneas celulares cancerígenas.
5. Evaluar la actividad antioxidante de los compuestos purificados del extracto hexánico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IV. HIPÓTESIS.

El uso popular de la *Hippocratea excelsa*, como remedio antineoplásico y/o antiinflamatorio, es ampliamente reconocido; por lo tanto, se espera que algunos de los compuestos presentes en el extracto hexánico de la corteza de la raíz, manifiesten actividad citotóxica y/o antiinflamatoria.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. PARTE EXPERIMENTAL.

A. Material y métodos.

1.- Condiciones generales.

El aislamiento de los compuestos presentes en el extracto hexánico de *Hippocratea excelsa* se realizó utilizando cromatografía abierta empacada con gel de sílice Merck 60 F₂₅₄ (gránulos de 0.2-0.5 mm de espesor, malla 3.5 a 7.0 ASTM). Los análisis cromatográficos cualitativos y de control se realizaron por medio de cromatografía de capa fina (aluminofolios de gel de sílice Merck 60 F₂₅₄ de 0.25 mm de espesor), los análisis preparativos se hicieron con placas de vidrio de 20 X 20 cm., recubiertas de gel de sílice Merck 60 F₂₅₄ de 0.2 mm. de espesor. Se utilizaron diferentes sistemas de elusión mediante la siguiente serie de disolventes: Hexano, AcOEt, CH₂Cl₂ y MeOH.

El revelado de placas se hizo utilizando luz ultravioleta de onda corta y como agente cromógeno sulfato cérico en ácido sulfúrico (16).

La determinación de las propiedades físicas y espectroscópicas permitió la caracterización de los compuestos aislados. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fischer Johns y se informan los valores sin corrección.

La espectrofotometría de infrarrojo (IR) se realizó en un espectrofotómetro de transformada de Fourier modelo Nicolet FT – 5SX, en cloroformo.

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) tanto protónica (RMN ¹H) como de carbono trece (RMN ¹³C) se obtuvieron en un espectrómetro Varian modelo Gemini 200 ó en un espectrómetro Varian modelo VRX – 3005 a 300 MHz, utilizando CDCl₃, los desplazamientos químicos se asignaron en unidades de δ



(ppm), referidos al tetrametilsilano (TMS), como referencia interna.

Los espectros de masas fueron determinados en un espectrofotómetro Jeol JMS – AX505HA, mediante la técnica de impacto electrónico a 70 eV.

En la evaluación de la actividad antiinflamatoria se usaron ratones macho con un peso promedio entre 25 y 30 g. El TPA, fue grado analítico.

Para la evaluación de la actividad citotóxica se utilizaron líneas celulares cancerígenas de Colón, Mama, Leucemia, Próstata y Sistema Nervioso Central.

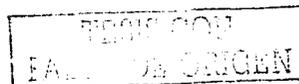
Con lo que respecta a la determinación de la actividad antioxidante se realizó por medio de la prueba de la reducción del radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

2. Material vegetal.

El material vegetal estudiado fue la corteza de la raíz de la *Hippocratea excelsa*, proporcionado por el Colegio de Posgraduados en Montecillos, Estado de México y clasificada por el Dr. Marcos Soto Hernández, existiendo una muestra de referencia en el Herbario Efraín Hernández X. , con número de registro 199141.

3. Preparación del material vegetal.

La corteza de la raíz de la *Hippocratea excelsa* se desecó a temperatura ambiente, para después proceder a fragmentarla por medio de un molino de manivela. La cantidad de corteza de la raíz molida fue de 1.0505 Kg.



4. Extracción del material vegetal.

El material vegetal molido se somete a un proceso de maceración, con 5 litros de hexano durante 48 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se filtra, obteniéndose el residuo vegetal y una solución amarilla. El residuo vegetal se extrae una vez más con hexano durante 4 días a temperatura ambiente.

Los extractos hexánicos así obtenidos, se reúnen y se elimina el disolvente mediante una destilación a presión reducida usando rotavapor, obteniéndose 6.4095 g de extracto hexánico. La adición de una mezcla de AcOEt-CH₂Cl₂ a este extracto, no proporcionó residuo de poliisopreno. Esta metodología se puede apreciar en el Diagrama 1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

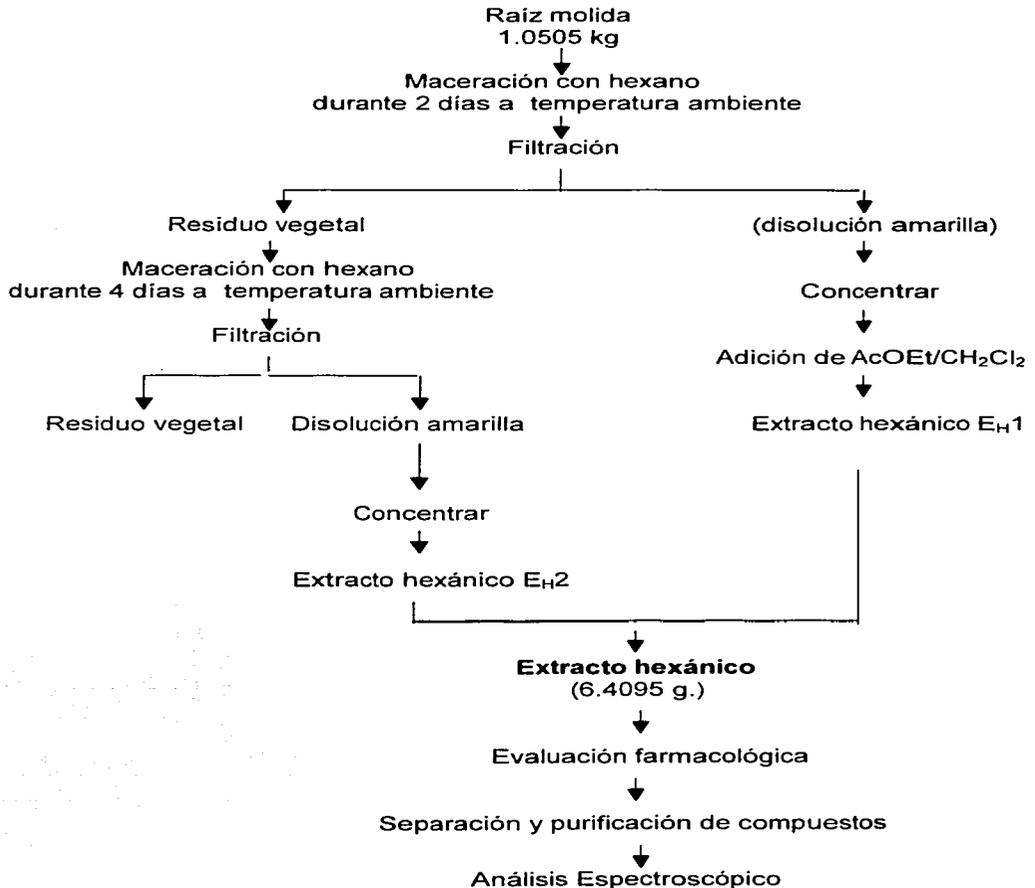


Diagrama 1. Diagrama de flujo que indica la metodología seguida para la separación, purificación y caracterización de compuestos obtenidos a partir del extracto hexánico de la corteza de la raíz de *Hippocratea excelsa*.



5. Evaluación antiinflamatoria del extracto hexánico.

La evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto hexánico se realizó utilizando el método de inducción de edema por el 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA), siguiendo la metodología propuesta en 1994 por Della (5), la cual se describe en el Diagrama 2.

La disolución de TPA, se preparó disolviendo 2.5 µg de 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol en 10 µl de etanol.

El compuesto a evaluar se aplicó 10 minutos después de la inducción de la inflamación por TPA.

Las dosis evaluadas fueron las siguientes: 0.05, 0.10, 0.50, 1.0 mg/oreja.

Se empleó indometacina como fármaco de referencia. La diferencia en peso entre ambas muestras se consideró como medida de edema. Se calculó el porcentaje de inhibición del edema, el cual está definido por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = (C_r - C_t) / (C_r) \times 100$$

en donde C_r y C_t corresponden respectivamente al peso de la muestra tratada con TPA y la tratada con TPA más el compuesto a evaluar (27).

Los datos fueron analizados por un análisis de varianza de una vía, seguida de una prueba de Dunnet. Se calculó para cada compuesto el valor de la dosis efectiva 50 (ED_{50}), mediante un análisis de regresión lineal construido al menos por tres puntos significativos, siendo cada punto el promedio del porcentaje de inhibición correspondiente a cada dosis (34), Tabla 2.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

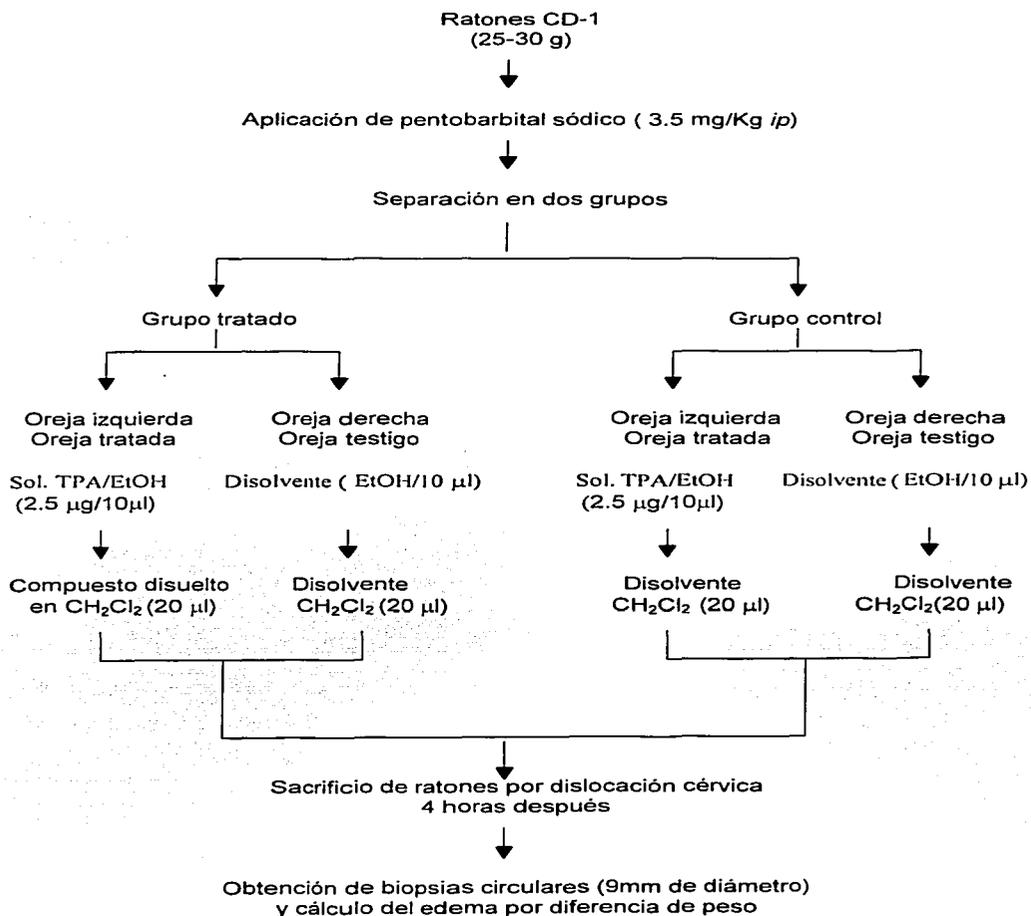


Diagrama 2. Metodología del ensayo del edema inducido por TPA en oreja de ratón.

Tabla 2. Efecto inhibitorio de indometacina y extracto hexánico en inflamación inducida por TPA en oreja de ratón.

COMPUESTO	DOSIS (mg / oreja)	EDEMA (mg) ± E.S.	INHIBICIÓN DE EDEMA (%)	DOSIS EFECTIVA 50
INDOMETACINA	0.05	12.36 ± 1.1	19.58	0.22 (0.8 , 0.61)
	0.10	10.82 ± 0.4	29.60	
	0.50	6.56 ± 0.46	57.30	
	1.0	0.92 ± 0.25	94.01	
EXTRACTO HEXÁNICO	0.50	11.34 ± 0.770	---	0.96 (0.42 , 2.18)
	1.0	6.92 ± 0.669	38.98	
	1.5	6.70 ± 0.90	40.92	
	2.0	5.03 ± 0.31	55.64	
		4.24 ± 1.19	62.60	

Como se puede apreciar en la Tabla 2, el extracto hexánico presenta actividad antiedematosa. Por lo que, mediante procedimientos cromatográficos, se logró la separación de algunos compuestos de este extracto.

B. Aislamiento de compuestos presentes en el extracto hexánico de la corteza de la raíz.

El extracto hexánico se separó mediante cromatografía en columna, utilizando como adsorbente gel de sílice y como sistema de elusión diversos disolventes iniciando con hexano y aumentando la polaridad con CH₂Cl₂, AcOEt y MeOH. Se produjo un total de 652 fracciones de 100 ml., las cuales se reunieron aquellas que presentaban perfiles similares en cromatografía de placa fina. Lo anterior se muestra en la Tabla 3.

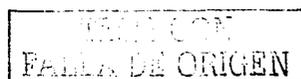


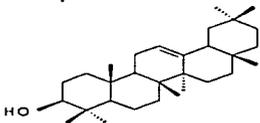
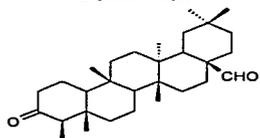
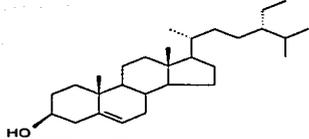
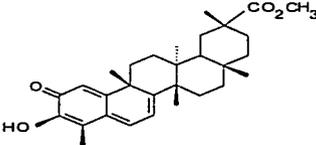
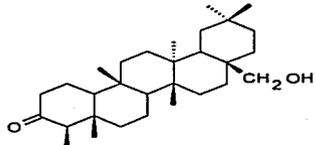
Tabla 3. Fracciones reunidas de la cromatografía en columna del extracto hexánico.

Disolvente	Proporción (%)	Fracción
Hexano	100	1 - 46
Hexano-CH ₂ Cl ₂	90 : 10	47 - 279
Hexano-CH ₂ Cl ₂	80 : 20	280 - 356
Hexano-CH ₂ Cl ₂	70 : 30	357 - 419
CH ₂ Cl ₂	100	420 - 467
CH ₂ Cl ₂ - AcOEt	100 : 100	468 - 549
AcOEt	100	550 - 606
MeOH	100	607 - 652

En la Tabla 4 se muestran los diferentes triterpenos separados de esta cromatografía, indicando las fracciones donde se obtuvieron y la cantidad aislada.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 4 . Purificación de las fracciones provenientes de la cromatografía en columna del extracto hexánico de la corteza de la raíz de la *Hippocratea excelsa*.

Fracción	Técnica de purificación	Compuesto aislado	Cantidad
100-126	Cristalización CH ₂ Cl ₂ -Hexano	β - Amirina. 	0.0375 g
146-174 176-180	Cristalización CH ₂ Cl ₂ -Hexano	Canofital 	0.0471 g
175 181-234	Cristalización Hexano: MeOH	β - Sitosterol 	0.2551 g
280-360	Cristalización Hexano	Pristimerina 	0.2053 g
397-431	Cristalización CH ₂ Cl ₂ -Hexano	Canofilol 	0.0375 g

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La identificación de estos compuestos se logró por la comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con aquellas publicadas (3, 19). (ver apéndice)

Por otra parte, de las fracciones 470-473, se obtuvo un compuesto llamado E_{H5}, el cual se purificó mediante cromatografía en columna utilizando como adsorbente gel de sílice y como sistema de elución una mezcla de disolventes de polaridad ascendente, iniciando con hexano y aumentando la polaridad con AcOEt y MeOH, dando un total de 77 fracciones de 50 ml cada una, las cuales se reunieron de acuerdo con su perfil cromatografico. Tabla 5 .

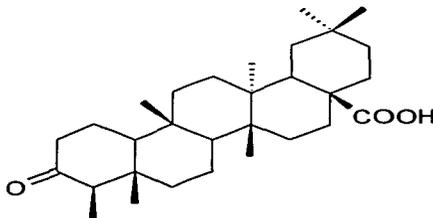
Tabla 5. Fracciones recuperadas de la cromatografía en columna del compuesto E_{H5}.

Disolvente	Proporción (%)	Fracción
Hexano	100	1-27
Hexano- AcOEt	80 : 10	28-48
Hexano- AcOEt	100 : 100	49-52
AcOEt- MeOH	90:10	53-59
MeOH	100	60-77

De las fracciones 1-27, se aisló el ácido 3-oxocanofilico cuya estructura fue elucidada de acuerdo con los siguientes datos espectroscópicos:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÁCIDO 3-OXOCANOFÍLICO.



pf = 240 ° C

I.R. ν máx CDCl_3 (cm^{-1})

3693.1 (-COOH), 2948.6 (-CH₂), 1702.2 (-CO), 1456.5 (-CH₂), 1390.1 (-CH₃), 118.5.

RMN ¹H 300 MHz CDCl_3 δ (ppm):

0.72 (s H-24), 0.81 (s H-25), 0.86 (d H-23), 0.86 (s H-27), 0.88 (s H-26), 0.94 (s H-29), 1.04 (s H-30)

RMN ¹³C 75 MHz CDCl_3 δ (ppm):

22.3 (C-1), 41.5 (C-2), 212.9 (C-3), 58.25 (C-4), 42.07 (C-5), 41.15 (C-6), 18.11 (C-7), 53.04, (C-8), 37.73 (C-9), 59.342 (C-10), 35.51 (C-11), 29.76 (C-12), 38.94 C-13), 37.86 (C-14), 31.07 (C-15), 29.45 (C-16), 34.86 (C-17), 34.50 (C-19), 28.45 (C-20), 31.07, (C-21), 32.70 (C-22), 6.80 (C-23), 14.67 (C-24), 18.11 (C-25), 18.53 (C-26), 20.61 (C-27), 184.07 (C-28), 34.50 (C-29), 32.702 (C-30).

EM IE m/z (% ar) :

456 (80) M⁺ (C₃₀H₄₈O₃)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. Obtención del derivado metilado del ácido 3-oxocanofílico.

a) Preparación de diazometano.

Se disuelven 0.5 g de hidróxido potasio en 7.5 ml de agua y se adicionan 25 ml de metanol. Por otro lado, se disuelven 21.9 g de N-metil-N-nitroso-*p*-toluensulfonamida (Diazald, Aldrich) en 45 ml de éter etílico.

La disolución éterea de Diazald se adiciona gota a gota a la solución de hidróxido de potasio. El diazometano así formado, se recibe en una solución éterea en frío (0°C).

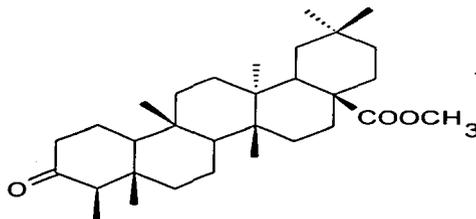
b) Obtención del éster metílico.

Se disuelven 100 mg del ácido 3-oxocanofílico en diclorometano y se le adiciona lentamente y en frío (0°C) una solución éterea de diazometano. La adición continúa hasta que permanezca el color verde amarillento, lo cual indica el exceso de diazometano. Posteriormente, se trabaja la reacción de manera usual (27).

De esta reacción se obtiene 0.016 g del éster metílico del ácido 3-oxocanofílico, cuyos datos físicos y espectrales son:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DERIVADO METILADO



pf = 241°C

I.R. ν máx CDCl₃ (cm⁻¹):

2948.65 (-CH₂), 1707.9 (-COCH₃), 1602.5, (-CO), 1456.0 (-CH₂), 1390.4 (-CH₃), 1191.8.

RMN ¹H 300 MHz CDCl₃ δ (ppm):

0.72 (s H-24), 0.85 (s H-25), 0.86 (d H-23), 0.88 (s H-27), 0.93 (s H-26), 1.03 (s H-29), 1.05 (s H-30), 3.658 1.04 (s H-31),

EM IE m/z (% ar):

470 (10) M⁺ (C₃₁H₅₀O₃)

Masas Alta Resolución:

m/z = 470.3760 (C₃₁H₅₀O₃)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

C. Evaluación de la Actividad Biológica de los compuestos purificados.

1. Evaluación de la actividad antiinflamatoria.

La evaluación de la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados se realizó siguiendo la metodología utilizada en el extracto hexánico del ensayo del edema inducido por TPA en oreja de ratón, la cual se describe en el Diagrama 2.

2. Evaluación de la actividad citotóxica de los compuestos aislados.

Para la determinación de la actividad citotóxica, se emplearon cinco diferentes líneas celulares cancerígenas: colón (HCT-15), mama (MCF-7), leucemia (K-562 CML), sistema nervioso central (U-251 Glio), próstata (PC-3); las cuales fueron proporcionadas por el National Cancer Institute (EUA). La citotoxicidad de las células tumorales y de los compuestos a prueba, fueron determinados usando el colorante de proteínas sulfurodamina B en ensayos de microcultivos, para medir viabilidad y el crecimiento celular (22). La metodología a seguir se presenta en el Diagrama 3.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

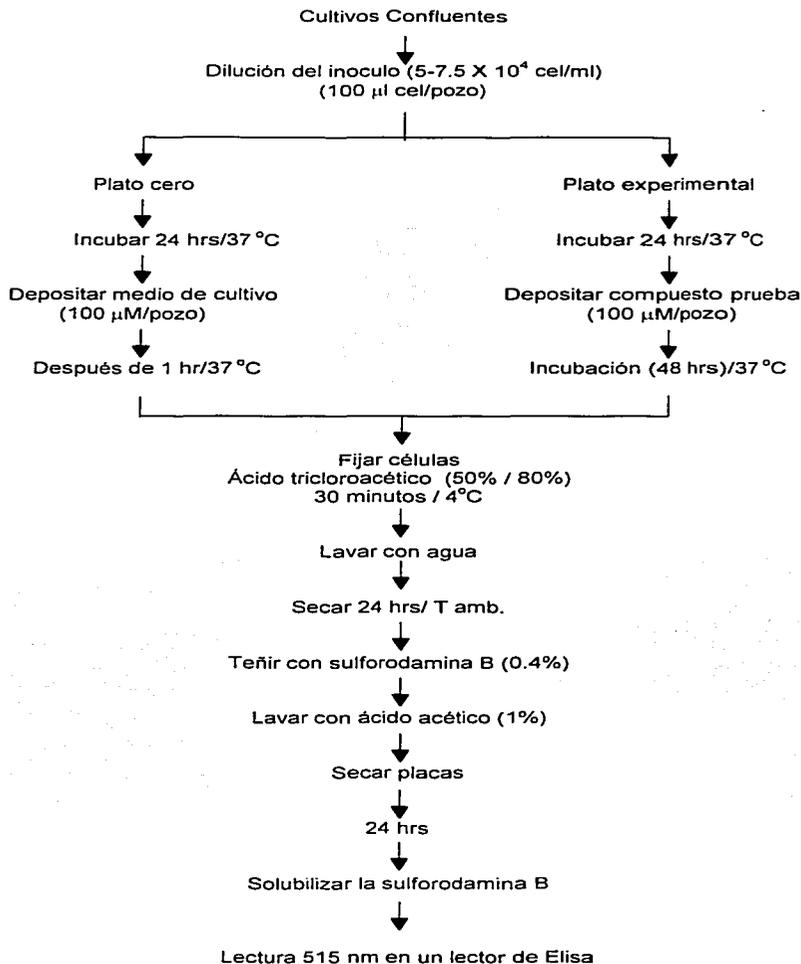


Diagrama 3. Metodología para la evaluación de la citotoxicidad en el ensayo de sulforodamina B.



3. Evaluación de la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante de los compuestos purificados, se obtuvo siguiendo la metodología descrita por Blois (2) con algunas modificaciones, midiendo de manera indirecta la reducción del radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), mediante una técnica colorimétrica, la cual se puede apreciar en el Diagrama 4.

Finalmente, se lee la absorbancia a 515 nm en un lector de ELISA modelo EL 340, BIOTEK INSTRUMENTS:

El porcentaje de reducción del DPPH se calcula mediante la siguiente fórmula

$$\% \text{ de reducción} = (C - E / C) 100$$

en donde:

C = absorbancia de la solución de DPPH 100 μM .

E = absorbancia de la mezcla DPPH 100 μM / compuesto problema.

La IC_{50} del α -tocoferol es de 17.07 μM usado como estándar.

TESIS CON
FALLE DE ORIGEN

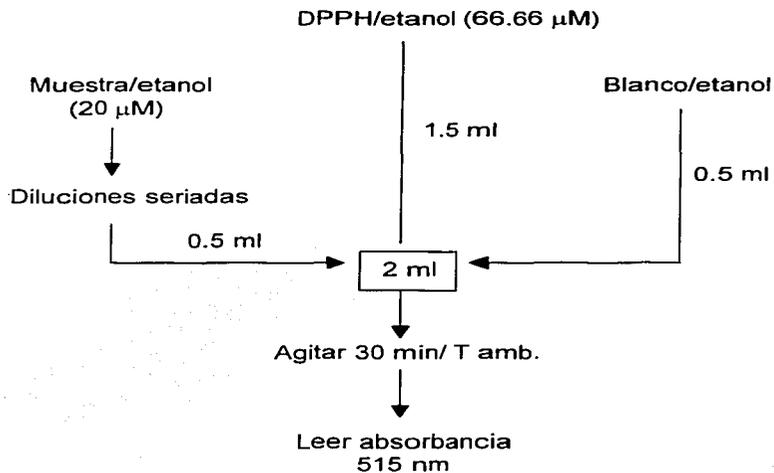


Diagrama 4. Metodología para la evaluación de la actividad antioxidante por medio de la reducción del radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).



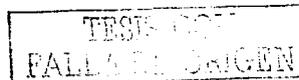
VI. RESULTADOS.

A. Aislamiento del ácido 3-oxocanofílico.

Las fracciones 470-473 se reunieron y se sometieron a cromatografía en columna, de la cual se obtuvo en las fracciones 1-27, un producto E_H5, sustancia que en el espectro de masas reveló un ión molecular a m/z 456, que está de acuerdo para una fórmula molecular de C₃₀H₄₈O₃, lo cual indica que este producto posiblemente sea un triterpeno pentacíclico de estructura similar a los previamente aislados de esta especie.

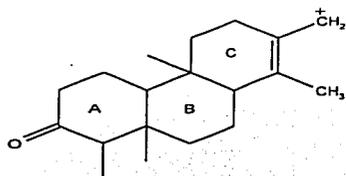
Propuesta estructural que se confirma por las señales mostradas en el espectro de RMN ¹H donde se observaron los siete grupos metilo (-CH₃) esperados a : 0.720 (s), 0.817 (s), 0.862 (d), 0.865 (s), 0.883 (s), 0.944 (s) y 1.043 (s) ppm., Estas señales fueron correlacionadas mediante un experimento HECTOR (*espectro 17*) con las correspondientes a grupos metilo (-CH₃) en el espectro de RMN ¹³C: 14.62, 18.11, 6.80, 20.61, 18.53, 34.50 y 32.70 ppm., respectivamente.

También, en el espectro de RMN ¹³C, mediante un experimento DEPT (*espectro 16*) se observaron once metilenos (-CH₂) a: 18.10, 22.25, 29.43, 31.05, 32.48, 32.68, 34.95, 35.49, 35.92, 41.14 y 41.49 ppm., y cuatro metinos (-CH) a: 37.85, 53.03, 58.23 y 59.32 ppm., datos que muestran la naturaleza triterpénica pentacíclica de este compuesto.

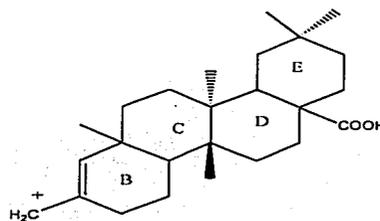


El espectro de I.R. mostró bandas características para un ácido carboxílico y un carbonilo a 3693 y 1702 cm^{-1} que fueron corroboradas con el espectro de ^{13}C con las señales a 212.97 (C-3) y 184.075 (C-18) ppm.

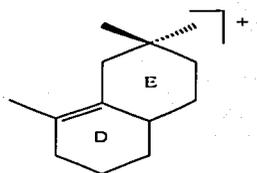
Además en el espectro de masas se observa la fragmentación característica de triterpenos pentacíclicos del tipo fridelano, como m/z 273, 372 y 177, que se asocian a los siguientes iones:



m/z 273



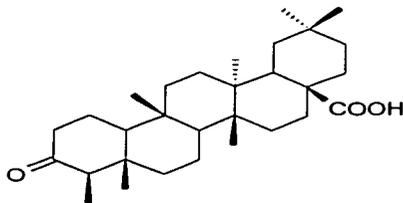
m/z 372



m/z 177

Lo que permite sugerir la estructura pentacíclica del tipo fridelano con sustituciones de un grupo carbonilo en C-3 y un grupo carboxílico en C-17 (9, 24).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Ácido 3-oxocanofílico.

Una extensa revisión bibliográfica reveló que este compuesto es nuevo.

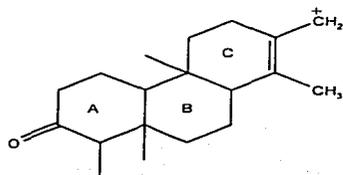
El tratamiento del ácido-3-oxocanofílico con diazometano produjo el éster metílico esperado. El cual en masas de alta resolución presenta un peso molecular de 470.3754, que corresponde para una fórmula $C_{31}H_{50}O_3$.

Asimismo, para el éster metílico correspondiente, en el espectro de RMN 1H se observaron los ocho metilos esperados a : 0.720 (s), 0.854 (s), 0.862 (d), 0.884 (s), 0.938 (s), 1.039 (s), 1.051 (s) y 3.658 (s) ppm.

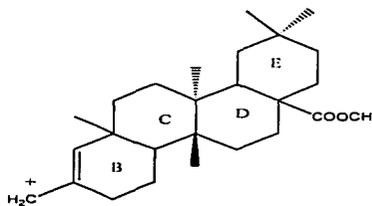
El espectro de I.R. mostró bandas características para un éster aislado a 1707.93 cm^{-1} (apéndice)

Comparando los datos del ácido 3-oxocanofílico con su derivado metilado, se aprecia en el espectro de masas la fragmentación característica de los triterpenos pentacíclicos del tipo fridelano. Estos fragmentos son a m/z 273, 386, y 177 que se asocian a los siguientes fragmentos:

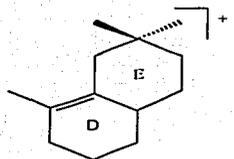
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



m/z 273

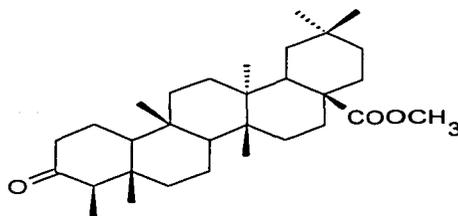


m/z 386



m/z 177

Lo que confirma la estructura pentacíclica del tipo fridelano con sustituciones de un grupo carbonilo en C-3 y un grupo éster en C-17.



Éster metílico del ácido 3-oxocanofílico

TRABAJO CON
FARMACIA DE BARRAN

En la **Tabla 6** se muestran algunos datos de RMN ^1H del canofilol, canofilal, el ácido 3-oxocanofilico y el correspondiente éster metílico de este último.

Tabla 6. Datos de RMN ^1H del canofilol, canofilal, ácido 3-oxocanofilico y su éster metílico. (CHCl_3 , δ ppm)

Protón	Canofilol	Canofilal	Acido 3-oxo-canofilico	Éster metílico
23	0.889	0.860	0.862	0.862
24	0.721	0.716	0.720	0.720
25	0.867	0.845	0.817	0.854
26	0.977	0.955	0.883	0.938
27	0.911	0.882	0.865	0.884
28	3.634	9.47	---	3.658
29	0.991	0.980	0.944	1.039
30	1.128	1.074	1.043	1.051

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B. Evaluación de la Actividad Biológica.

1. Determinación de la actividad antiinflamatoria de canofilol, canofilal, ácido 3-oxocanofilico y pristimerina.

La actividad antiinflamatoria se evaluó a partir del ensayo del edema inducido con TPA (13-acetato de 12-O-tetradecanoilfobol) en oreja de ratón. (*ver Parte Experimental*)

En este trabajo se evaluaron el extracto hexánico, canofilol, canofilal, ácido 3-oxo canofilico y pristimerina. Sin embargo, solo el extracto hexánico, el canofilol y la pristimerina mostraron cierta actividad antiedematosa (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto inhibitorio de indometacina, extracto hexánico, canofilol y pristimerina en inflamación inducida por TPA en oreja de ratón.

COMPUESTO	DOSIS (mg / oreja)	EDEMA (mg) ± E.S.	INHIBICIÓN DE EDEMA (%)	DOSIS EFECTIVA 50
INDOMETACINA	0.05	12.36 ± 1.1	19.58	0.22 (0.8 ; 0.61)
	0.10	10.82 ± 0.4	29.60	
	0.50	6.56 ± 0.46	57.30	
	1.0	0.92 ± 0.25	94.01	
CANOFILOL	0.01	9.06 ± 0.80	36.37	0.026 (0.016 ; 0.11)
	0.05	7.70 ± 0.16	45.92	
	0.10	1.82 ± 1.40	86.93	
	0.50	0.72 ± 0.31	94.94	
PRISTIMERINA	0.05	7.72 ± 0.63	41.23	0.056 (0.009 ; 0.33)
	0.10	4.36 ± 0.96	66.84	
	0.50	2.62 ± 0.77	80.07	
	1.0	1.32 ± 0.34	89.96	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Como se puede apreciar en la Tabla 7, el canofilol resultó ser el más activo debido a que presenta una DE_{50} menor que los demás compuestos.

2. Evaluación de la actividad citotóxica del canofilol, canofilal, ácido 3-oxocanofílico y pristimerina.

Se probaron canofilol, canofilal, ácido 3-oxocanofílico y pristimerina en cinco líneas celulares cancerígenas: sistema nervioso central (U-251), próstata (PC-3), leucemia (K-562), colón (HCT-15), mama (MCF-7). Sin embargo, los compuestos que manifestaron tener actividad citotóxica fueron el canofilol y la pristimerina. (Tabla 8).

Tabla 8. Actividad citotóxica IC_{50} de canofilol y pristimerina en prueba de sulforodamina B, en líneas celulares cancerígenas.

COMPUESTO	U - 251	PC - 3	K - 562	HCT-15	MCF - 7
CANOFILOL	> 100	66.41	51.28	> 100	32.45
PRISTIMERINA	0.39	0.93	1.28	0.51	0.11

En esta Tabla 8, se puede observar que la pristimerina presenta actividad citotóxica en las cinco líneas celulares cancerígenas, mientras que el canofilol solo en tres: próstata, leucemia y mama.

TESIS CON
FALLA DE JURGEN

3. Evaluación de la actividad antioxidante de canofilol y pristimerina.

La evaluación de la actividad antioxidante se realizó por el método del DPPH (*ver Parte Experimental*). De los compuestos evaluados, sólo la pristimerina resultó ser activa (Tabla 9).

Tabla 9. Determinación de la actividad antioxidante de Pristimerina por medio de la reducción del radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidracilo. (DPPH)

Concentración (μM)	Densidad óptica			Reducción %
	Pristimerina	Pristimerina + DPPH	DPPH	
0.31	0.001	0.55	0.549	4.18
1.00	0.033	0.547	0.544	5.06
3.10	0.008	0.535	0.527	8.028
10.0	0.021	0.507	0.486	15.18
31.0	0.041	0.445	0.404	29.49
100	0.141	0.348	0.207	63.87
316	0.42	0.509	0.089	84.47

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VII. DISCUSIÓN.

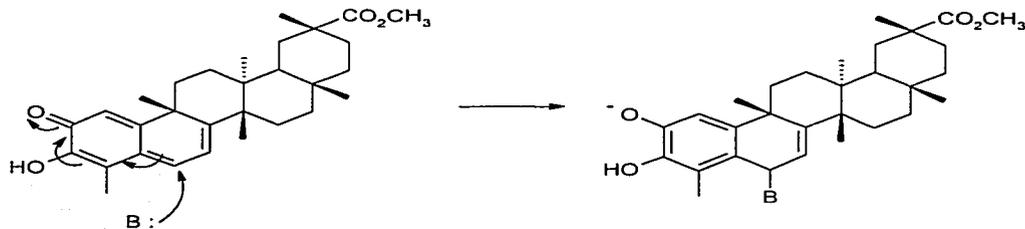
A. Actividad Antiinflamatoria.

El extracto hexánico de la corteza de la raíz de la *Hippocratea excelsa* mostró tener actividad antiinflamatoria moderada (Tabla 2), por lo que se decidió purificar los componentes mayoritarios de este extracto. De esta manera, se obtienen los esteroides β -sitosterol y β -amirina, triterpenos con conocida actividad antiinflamatoria (20). También se logró purificar tres triterpenos con un esqueleto tipo fridelano canofilol, canofilal y ácido 3-oxocanofilico. Siendo este último un compuesto nuevo. Asimismo, se aisló la pristimerina, que tiene un esqueleto quinoide, con un alto grado de instauración, la cual se menciona en la literatura con actividad antiinflamatoria en el modelo de la carragenina (20).

También se ha dado a conocer la actividad antiedematosa de β -sitosterol y β -amirina, la cual ha sido evaluada por el método de edema inducido por TPA. Tomando, en cuenta estos antecedentes, se decidió evaluar solamente los fridelanos canofilol, canofilal y ácido 3-oxocanofilico, así como la pristimerina en este modelo. Los resultados se muestran en la Tabla 7, donde se puede apreciar que el canofilol y la pristimerina resultaron activos.

De acuerdo con la literatura, se ha propuesto que la actividad antiinflamatoria de la pristimerina se debe a la inhibición que hace sobre la enzima NO-sintetasa. (7) Esta inhibición enzimática, se propone que es debida al alto grado de instauración que posee esta molécula, favoreciendo así adiciones nucleofílicas tipo Michael (32).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Adición nucleofílica a la pristerina

En los sistemas biológicos, algunos de los nucleófilos posibles son HS-R, HN-R y HO-R, los cuales están presentes en enzimas, proteínas o ácidos nucleicos, entre otros.

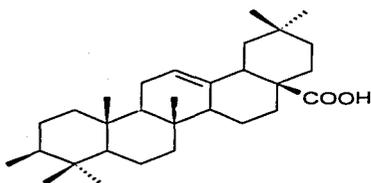
El concepto de que la inflamación y la carcinogénesis son fenómenos relacionados ha sido objeto de numerosos estudios, los que han intentado unir estos procesos en mecanismos similares (25).

Las enzimas que median la síntesis constitutiva (proceso normal) de óxido nítrico (NO) y prostaglandinas (PGS) a partir de arginina y araquidonato, respectivamente, tienen relativamente poca importancia para los procesos de inflamación o carcinogénesis. En contraste, las enzimas inducibles óxido nítrico sintetasa (iNOs) y la ciclooxigenasa (COX-2) tienen roles críticos en la respuesta de los tejidos a agentes infecciosos o procesos malignos.

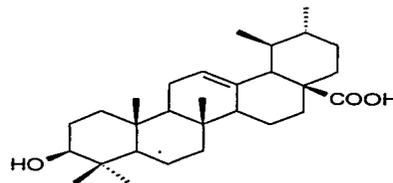
Estas enzimas inducibles son esenciales para la respuesta inflamatoria, en la reparación del daño y carcinogénesis. A pesar de que la actividad fisiológica de iNOs y COX-2 puede resultar beneficiosa al organismo, expresiones excesivas de cualquiera de estas enzimas puede implicar la patogénesis de varias enfermedades, tales como choque séptico, artritis reumatoide y carcinogénesis.



Los triterpenos ácido oleanólico y ácido ursólico, que son muy abundantes en la naturaleza, han mostrado inhibición moderada de la actividad de iNOs y COX-2.



Ácido oleanólico



Ácido ursólico

Estudios sobre el mecanismo de inhibición de iNOs por el ácido ursólico han demostrado que este triterpeno regula la expresión de la enzima iNOs por la activación del factor nuclear – KB que es el factor de transcripción que coordina la expresión de los genes que codifican para la iNOs (11).

Por otro lado, la forma en que actúan los triterpenos del tipo fridelano como antiinflamatorios no se ha determinado con exactitud. Sin embargo, existen fuertes evidencias de que pueden estar actuando como inhibidores de la fosfolipasa A₂ (PLA₂), enzima que juega un papel importante en la llamada cascada del ácido araquidónico, ruta metabólica que da origen a los compuestos proinflamatorios del tipo leucotrienos y prostaglandinas (Figura 1).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MÚLTIPLES CONTROLES EN LA INFLAMACIÓN

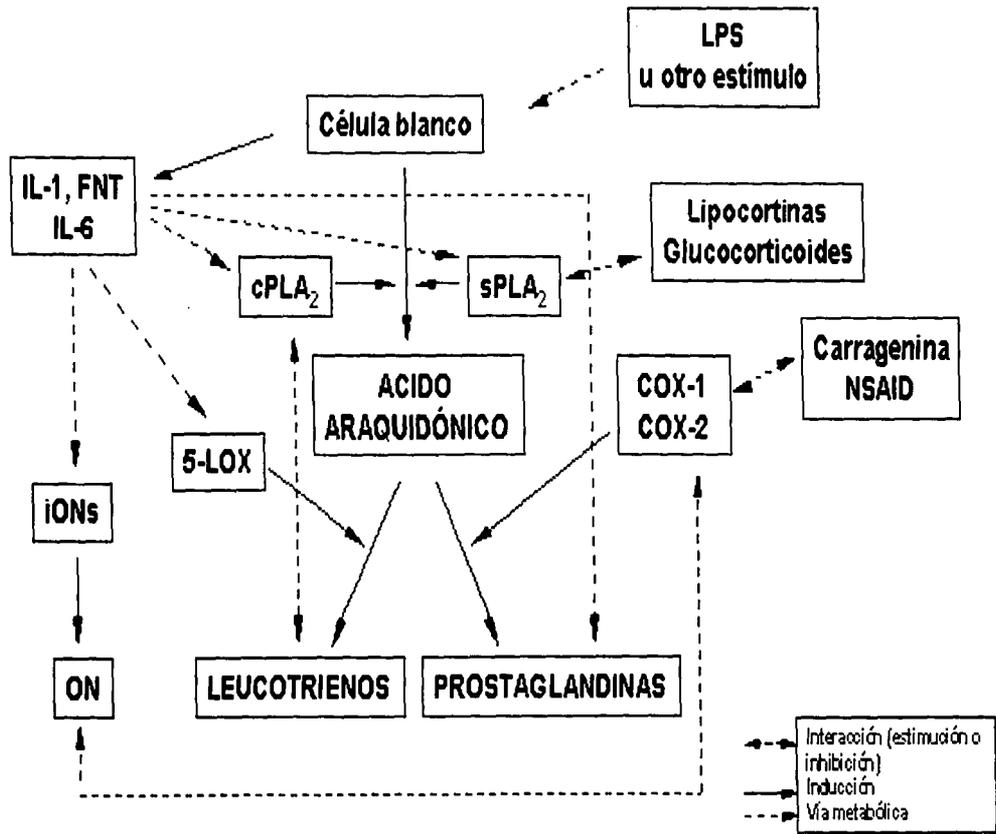


Figura 1. Interacciones entre las diferentes enzimas y mediadores involucrados en la activación de la cascada del ácido araquidónico en la inflamación (5)

FALLA DE CONTROL

En el ensayo del TPA, se conoce que este compuesto realiza su efecto inflamatorio por medio de la activación de la enzima proteínquinasa (PKC), la cual a su vez activa a la enzima PLA₂ de tal manera que los compuestos que presentan actividad antiinflamatoria en el ensayo del TPA posiblemente inhiben a las enzimas PKC y/o PLA₂ (8).

Para triterpenos del tipo tirucalano se ha demostrado que inhiben a PLA₂ mediante la unión del triterpeno con la región catalítica de la enzima (12).

Aun más, los triterpenos del tipo ursólico han sido utilizados como modelos y material de partida para sintetizar y/o modificar nuevos triterpenos, los cuales muestran actividades antiinflamatorias más potentes y selectivas (35).

Con todos estos antecedentes, es posible suponer que el canofilol deba su actividad a la posible inhibición de las enzimas PLA₂ y/o PKC.

De acuerdo con esta propuesta, la conformación de los triterpenos es importante. Por tal motivo se realizó por métodos teóricos (MOPAC) la determinación de la estereoestructura de energía mínima para canofilol, canofilal y ácido 3-oxocanofilico, estos se muestran en las Figuras 2, 3 y 4, respectivamente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

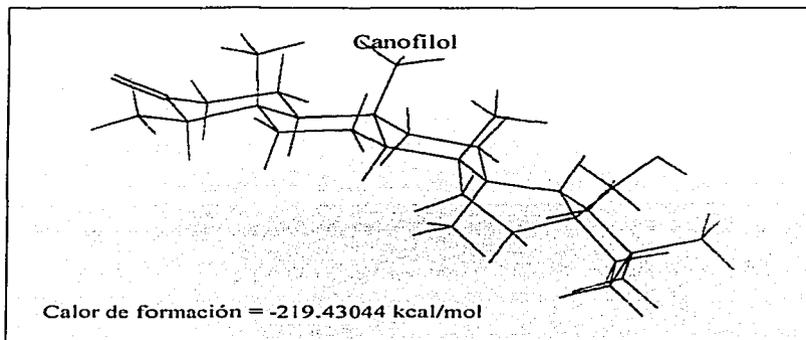


Figura 2. Conformero más estable del canofilol

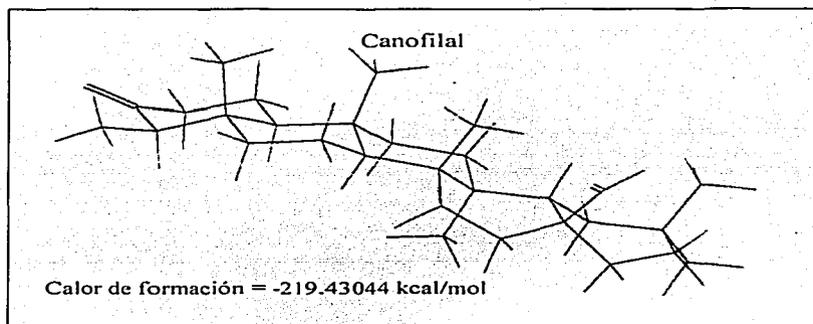


Figura 3. Conformero más estable del canofilol

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

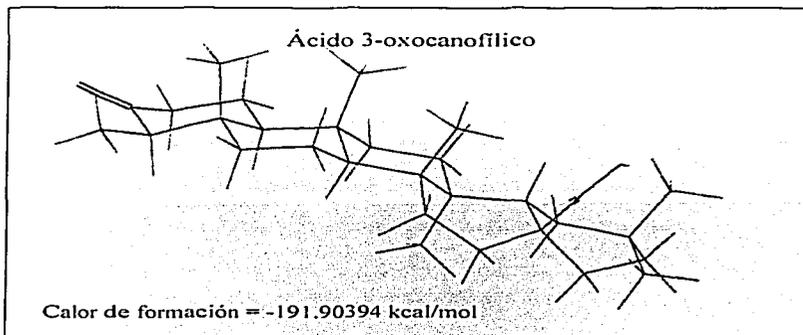


Figura 4. Confórmero más estable del ácido 3-oxocanofílico

El análisis de los ángulos dihedros de las tres moléculas se muestra en las Tablas 10, 11 y 12, en las cuales se puede apreciar que la conformación de estas moléculas es muy similar. Por ejemplo, el ángulo dihedro $C_{17}-C_{18}-C_{19}-C_{20}$ para el canofilol es de -44.8° , para el canofilal es de -49.7° , mientras que para el ácido 3-oxo canofílico es de -64.1° . Valores que indican que en términos generales estas moléculas tienen conformaciones similares.

Tabla 10. Principales ángulos dihedros en la molécula del canofilol.

Atomo	Número	Atomo	Número	Atomo	Número	Atomo	Número	Grados
C	17	C	18	C	19	C	20	- 44.8
C	17	C	18	C	19	H	19-β	-165.5
C	17	C	18	C	19	H	19-α	78.4
C	17	C	22	C	21	C	20	- 60.3
C	17	C	22	C	21	H	21-β	62.7
C	17	C	22	C	21	H	21-α	178.1
C	17	C	28	O	OH	H	OH	- 63.8
C	19	C	20	C	29	H	29-1	- 66.4
C	19	C	20	C	29	H	29-2	173.0
C	19	C	20	C	29	H	29-3	53.6
C	19	C	20	C	30	H	30-1	- 75.6
C	19	C	20	C	30	H	30-2	164.7
C	19	C	20	C	30	H	30-3	43.4
C	21	C	20	C	19	C	18	42.4
C	21	C	20	C	19	H	19-β	163.5
C	21	C	20	C	19	H	19-α	- 81.9
C	21	C	20	C	29	H	29-1	54.6
C	21	C	20	C	29	H	29-2	- 65.5
C	21	C	20	C	29	H	29-3	174.6
C	21	C	20	C	30	H	30-1	160.0
C	21	C	20	C	30	H	30-2	41.0
C	21	C	20	C	30	H	30-3	- 80.3
C	22	C	17	C	18	C	19	- 5.2
C	22	C	17	C	18	H	18-β	-122.3
C	22	C	17	C	28	O	OH	99.7
C	22	C	21	C	20	C	29	-109.4
C	22	C	21	C	20	C	30	132.1
C	28	C	17	C	22	C	21	- 67.0
C	28	C	17	C	22	H	22-β	171.5
C	28	C	17	C	22	H	22-α	54.6
C	29	C	20	C	19	C	18	161.7
C	29	C	20	C	19	H	19-β	- 77.1
C	29	C	20	C	19	H	19-α	37.5
C	29	C	20	C	30	H	30-1	41.6
C	29	C	20	C	30	H	30-2	- 78.0
C	29	C	20	C	30	H	30-3	160.0
C	30	C	20	C	19	C	18	- 81.0
C	30	C	20	C	19	H	19-β	40.1
C	30	C	20	C	19	H	19-α	154.7
C	30	C	20	C	22	H	29-1	175.0
C	30	C	20	C	22	H	29-2	55.0

Tabla 11. Principales ángulos dihedros en la molécula del canofilal

Átomo	Número	Átomo	Número	Átomo	Número	Átomo	Número	Grados
C	17	C	18	C	19	C	20	- 49.7
C	17	C	18	C	19	H	19-β	-172.4
C	17	C	18	C	19	H	19-α	71.8
C	17	C	22	C	21	C	20	- 55.0
C	17	C	22	C	21	H	21-β	68.7
C	17	C	22	C	21	H	21-α	-178.1
C	18	C	17	C	22	C	21	- 55.0
C	18	C	17	C	22	H	22-β	- 68.2
C	18	C	17	C	22	H	22-α	176.1
C	18	C	17	C	28	O	28	138.9
C	18	C	17	C	28	H	28	- 43.8
C	19	C	20	C	29	H	29-1	- 62.2
C	19	C	20	C	29	H	29-2	177.7
C	19	C	20	C	29	H	29-3	57.8
C	19	C	20	C	30	H	30-1	59.0
C	19	C	20	C	30	H	30-2	-178.6
C	19	C	20	C	29	H	30-3	61.2
C	21	C	20	C	19	C	18	48.9
C	21	C	20	C	19	H	19-β	173.3
C	21	C	20	C	19	H	19-α	- 73.5
C	21	C	20	C	29	H	29-1	58.5
C	21	C	20	C	29	H	29-2	- 61.6
C	21	C	20	C	30	H	30-1	177.9
C	21	C	20	C	30	H	30-2	58.3
C	21	C	20	C	30	H	30-3	- 61.9
C	22	C	17	C	18	C	19	- 2.2
C	22	C	17	C	18	H	18-β	-115.3
C	22	C	21	C	20	C	19	3.5
C	22	C	21	C	20	C	29	-115.6
C	28	C	17	C	22	C	21	- 66.2
C	28	C	17	C	22	H	22-β	171.9
C	28	C	17	C	22	H	22-α	56.3
C	29	C	20	C	19	C	18	168.7
C	29	C	20	C	19	H	19-β	- 66.9
C	29	C	20	C	19	H	19-α	46.4
C	29	C	20	C	30	H	30-1	58.7
C	30	C	20	C	19	C	18	- 74.2
C	30	C	20	C	19	H	19-β	50.2
C	30	C	20	C	19	H	19-α	163.5
C	30	C	20	C	29	H	29-1	178.5
C	30	C	20	C	29	H	29-2	58.4

Tabla 12. Principales ángulos dihedros en la molécula del ácido 3-oxocanoílico

Atomo	Número	Atomo	Número	Atomo	Número	Atomo	Número	Grados
C	17	C	18	C	19	C	20	- 64.1
C	17	C	18	C	19	H	19-β	174.4
C	17	C	18	C	19	H	19-α	56.7
C	17	C	22	C	21	C	20	- 59.6
C	17	C	22	C	21	H	22-β	61.9
C	17	C	22	C	21	H	22-α	178.6
C	17	C	28	O	OH	H	OH	6.8
C	18	C	17	C	22	C	21	25.1
C	18	C	17	C	22	H	22-β	- 95.5
C	18	C	17	C	22	H	22-α	147.0
C	18	C	17	C	28	O	28	-137.3
C	18	C	17	C	28	O	OH	-109.6
C	18	C	17	C	18	C	19	33.7
C	22	C	17	C	18	H	18-β	- 82.2
C	22	C	17	C	28	O	OH	- 14.4
C	22	C	17	C	28	O	28	13.3
C	22	C	21	C	20	C	29	- 90.6
C	22	C	21	C	20	C	30	150.5
C	21	C	20	C	19	C	18	30.5
C	21	C	20	C	19	H	19-β	152.5
C	21	C	20	C	19	H	19-α	- 90.3
C	20	C	21	C	29	H	29-1	55.1
C	20	C	21	C	29	H	29-2	- 64.9
C	20	C	21	C	29	H	29-3	175.2
C	20	C	21	C	30	H	30-1	173.5
C	20	C	21	C	30	H	30-2	53.6
C	28	C	17	C	22	C	21	- 97.7
C	28	C	17	C	22	H	22-β	141.5
C	28	C	17	C	22	H	22-α	24.2
C	29	C	20	C	19	C	18	151.2
C	29	C	20	C	19	H	19-β	- 86.8
C	29	C	20	C	19	H	19-α	30.4
C	29	C	20	C	30	H	30-1	54.1
C	29	C	20	C	30	H	30-2	- 65.7
C	29	C	20	C	30	H	30-3	174.2
C	30	C	20	C	19	C	18	- 90.0
C	30	C	20	C	19	H	19-β	32.0
C	30	C	20	C	19	H	19-α	149.1
C	30	C	20	C	29	H	29-1	174.1
C	30	C	20	C	29	H	29-2	54.1
O	OH	C	28	O	C-28	H	33	179

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

También las distancias entre los átomos que forman al alcohol, al aldehído y al ácido carboxílico con los átomos de hidrógeno y carbono vecinos, indican que no existe un gran impedimento estérico.

Tabla 13. Principales distancias entre átomos de carbono e hidrógeno en el canofilol.

Atomo	Número	Atomo	Número	Distancia Å
C	28	C	17	1.6
C	28	C	18	2.6
C	28	C	19	3.7
C	28	C	20	3.7
C	28	C	21	3.0
C	28	C	22	2.5
C	28	C	29	5.2
C	28	C	30	4.0
C	28	H	18-β	2.5
C	28	H	19-β	4.4
C	28	H	19-α	4.3
C	28	H	21-β	2.7
C	28	H	21-α	4.0
C	28	H	22-β	3.5
C	28	H	22-α	2.7
C	28	H	29-1	5.4
C	28	H	29-2	5.7
C	28	H	29-3	5.9
C	28	H	30-1	5.1
C	28	H	30-2	4.4
C	28	H	30-3	3.5
C	28	O	28	1.4

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 14. Principales distancias entre átomos de carbono e hidrógeno en el canofilal.

Átomo	Número	Átomo	Número	Distancia Å
C	28	C	17	1.5
C	28	C	18	2.6
C	28	C	19	3.6
C	28	C	20	3.6
C	28	C	21	3.0
C	28	C	22	2.4
C	28	C	29	5.2
C	28	C	30	3.9
C	28	H	18-β	2.5
C	28	H	19-β	4.4
C	28	H	19-α	4.2
C	28	H	21-β	2.6
C	28	H	21-α	2.7
C	28	H	22-β	3.4
C	28	H	22-α	2.6
C	28	H	29-1	5.5
C	28	H	29-2	5.6
C	28	H	29-3	5.4
C	28	H	30-1	4.8
C	28	H	30-2	4.5
C	28	H	30-3	3.2
C	28	O	28	1.2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 15. Principales distancias entre átomos de carbono e hidrógeno en el ácido 3-oxo canofílico.

Átomo	Número	Átomo	Número	Distancia Å
C	28	C	17	4.2
C	28	C	18	5.0
C	28	C	19	6.3
C	28	C	20	6.4
C	28	C	21	5.2
C	28	C	22	4.6
C	28	C	29	7.6
C	28	C	30	6.8
C	28	H	18-β	4.6
C	28	H	19-β	7.1
C	28	H	19-α	6.8
C	28	H	21-β	4.6
C	28	H	21-α	5.8
C	28	H	22-β	5.5
C	28	H	22-α	4.0
C	28	H	29-1	7.6
C	28	H	29-2	8.0
C	28	H	29-3	8.5
C	28	H	30-1	7.8
C	28	H	30-2	7.1
C	28	H	30-3	6.2
C	28	O	28	1.2
C	28	O	OH	1.4

De acuerdo con estos resultados no hay cambio apreciable en la conformación más estable entre estos tres compuestos. Todos ellos presentan la conformación de silla – silla – silla – bote – bote, de tal forma que la diferencia en actividad biológica posiblemente se debe al grado de oxidación en el átomo de carbono C-28, a diferencia de lo que ocurre con los esteroides β-amirina y β-sitosterol, donde aparentemente el esqueleto no influye en la acción antiinflamatoria.

B. Actividad Citotóxica.

Los resultados de la actividad citotóxica de los compuestos así como del extracto hexánico, demostraron que solamente la pristimerina resultó activa en las cinco líneas celulares cancerígenas probadas.

Este resultado indica la posible adición de la pristimerina vía adiciones tipo Michael al DNA o sitios similares, como se ha postulado para la tinginona, isómero de la pristimerina, lo cual se ha informado como ayuda para el tratamiento de cáncer de piel. Sin embargo, este mecanismo de acción no se puede aducir para explicar la actividad del canofilol. Aparentemente la acción citotóxica de este compuesto se debe a otros factores.

Recientemente se ha informado que triterpenos pentacíclicos del tipo bitulinico actúan como sustancias citotóxicas contra el melanoma humano (MEL-2), por medio de un mecanismo apoptótico o muerte celular programado.

Probablemente, el canofilol actúe de una manera similar; sin embargo, es necesario realizar estudios que demuestren esta hipótesis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

VIII. CONCLUSIONES.

A partir del extracto hexánico de la corteza de la raíz de la *Hippocratea excelsa*, se lograron aislar por primera vez tres triterpenos tipo canofílico con oxidación progresiva en el átomo de carbono **C-28**: **canofilol**, **canofilal** y **ácido 3-oxo canofílico**, siendo este último un nuevo compuesto. También se obtuvieron **β -amirina**, **β -sitosterol** y **pristimerina**.

Se obtuvo el **éster metílico del ácido 3-oxocanofílico**.

Los únicos compuestos que presentan actividad antiinflamatoria, aparte de la **β -amirina** y **β -sitosterol**, con conocida actividad antiedematosa, fueron el **canofilol** y la **pristimerina**.

La **pristimerina** es el compuesto que presenta actividad citotóxica frente a las cinco líneas celulares carcinógenas en las que se probó, mientras que el **canofilol** solo presenta actividad citotóxica frente a las líneas celulares carcinógenas de próstata (PC-3), leucemia (K-562), y mama (McF-7). Estos resultados indican la selectividad que tiene este último como agente citotóxico.

De los compuestos probados, solamente la **pristimerina** presenta actividad antioxidante en la prueba de DPPH.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El **canofilol**, **canofilal** y el **ácido 3-oxocanofilico** presentan, en el esqueleto hidrocarbonado la misma conformación (silla-silla-silla-bote-bote). Lo que indica que la conformación de estos triterpenos no influyen en sus actividades biológicas, por lo que el factor importante debe ser el grado de oxidación en el carbono **C-28**.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IX. REFERENCIAS.

1. Argueta Villamar, Arturo, *Atlas de las plantas medicinales tradicionales mexicanas*, Instituto Nacional Indigenista, México, (1994).
2. Blois, M.S. *Nature*, **181**, 119-120, (1958)
3. Calzada, F; Mata, R; López, R; Linares, E; Bye, R; Barreto, V. y Del Río, F., *Planta Med.*, **57**, 194 – 195, (1991).
4. Calzada, F, and Mata, R., *Phytochemistry*, **40**, (2) 2583-2585, (1995).
5. Cirino, G., *Biochem. Pharmacolo.*, **55**, 105-111, (1998).
6. Della L. R., Tubaro A., Sosa S., Becker H., Saar St. Isaac O., *Planta Medical*, **60**, 516, (1994).
7. Dirsch, V.M., Kiemer, A.K., Wagner, H. and Vollmar, A.M., *European Journal of Pharmacology*, **336**, 211-217, (1997).
8. Fischer, S:M:, Patrick. K.E., Lee, M.L. and Cameron G.S., *Cancer Research*, **51**, 850-856, (1991).
9. Govindachar, T.R. and Viswanathan., *Tetrahedrom.*, **23**, 1901-1910, (1967).
10. Heinrich, M; Kuhnt, M; Wright, C; Rimpler, H; Phillipson, J; Schandelmaier, A. and Warhurst, D., *Journal of Ethnopharmacology*, **36**, 81 – 85, (1992).
11. Ho Jin You, Chul Yung Choi, Ji Young Kim, Sung Jun Park, Kyung-Soo Hahm and Hye Gwang Leong, *FEBS Letters*, **509**, 156-160, (2001).
12. Jain, M.K., Yu Bao-Zhu, Rogers, J.R. Smith, A.E., Boger Eric T.A., Ostrander, R.L. and Rheingold A., *Phytochemistry*, **39**, 537-547, (1995).
13. Kuo, Yao-Haur, et al., *Heterocycles*, **29**, 1465, (1989).
14. Kutney, J; Beale, M; Salisbury, P; Stuart, K; Worth, B; Townsley, P; Chalmers, W; Nilsson, K. y Jacoli, G., *Phytochemistry*, **20**, 653 – 657, (1981).

15. Linares, Edelmira y Robert Bye, *Selección de plantas medicinales de México*, Limusa, México, (1990).
16. Lowery, C., Reagent Chemicals. *American Chemical Society Specification*, Editores, Washington, D.C. 90-91 (1993).
17. Lozaya Legorreta, Xavier. *Planta, Medicina y Poder, Breve Historia de la Herbolaria Mexicana*. México, D.F; Editorial Pax. México, (1994).
18. Marini-Betolo, G.B., *Rev. Latinoam. Quim.*, **10**, 97, (1979).
19. Mata, R. and Calzada, F., *Journal of Natural Products*, **53** (5), 1212 – 1219, (1990).
20. Martínez-Vázquez, Mariano., Ramírez Apan, Teresa O., Lazcano, Maria Eugenia and Bye Robert., *Revista de la Sociedad Química de México*, **43**, 103-105 (1999).
21. Meyer, B., Jerrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. and Mc Laighlin J.L., *Planta Medical*, **45**, 31, (1982).
22. Monks, A; Scudiero, D; Skehan, P; Shoemaker, P; Vistica, D; Hose, C; Langley, J, Cronise, P; Vaigro-Wolff, A; Gray-Goodrich, M; Capbell, H; Mayo, J; Boyd, M; *Journal of the National Cancer Institute*, **38** (11), 757-7666, (1991).
23. Navarrete, A; Trejo-Miranda, J.L and Reyes-Trejo, L., *Journal of Ethnopharmacology*, **79**, 383-388, (2002).
24. Nozoki, H., Suzuki, H., Hirayama, T., Kasai, R., Wu Rong-Yang and Lee Kuo-Hsiung., *Phytochemistry*, **25**, 479-485, (1986).
25. Oshima, H. and Bartsch, H., *Mutat. Res.*, **305**: 253-264, (1994).
26. Palacios, J. Mata, R. And López R.. *Economic Botany*, **43** (4), 508-510, (1989).

- 27.** Pavia, D., Lampman, G., Kriz, G., and Engel, R. *Organis Laboratory Techniques: A microcale approach*. Sandars Collage publishing, U.S.A., 345, (1995).
- 28.** Perez, R; Perez, S; Zavala, M. y Salazar, M., *Journal of Ethnopharmacology*, **47**, 85 – 90 (1995).
- 29.** Rao, T.S., Currie, J.L., Shaffer, A.F., and Isakson, P.C., *Inflamation* **10**, 723-741, (1993).
- 30.** Rojas, A; Hernández, L; Pereda-Miranda, R. y Mata, R., *Journal of Ethnopharmacology*, **35**, 275 – 283, (1992).
- 31.** Romo de Vivar, Alfonso, *Productos naturales de la flora mexicana*, Editorial Limusa, México, (1985).
- 32.** Setzer, W.N., Holland, M.T., Bozeman, C.A., Rozmus, G.F., Setzer, M.C., Moriarity, D.M., Reeb, S., Bates, R.B. and Haber, W.A., *Planta Medical*, **67**, 65-69, (2001).
- 33.** Smith, A.C., *Brittonia*, **3**, (3), 410-417, (1940).
- 34.** Standley, C.P. y Steyermark, A.J., *Botany*, **24**. Parte IV. Ed. Chicago Natural History Museum, 220-221 (1949).
- 35.** Suh, N., et al, *Cancer Research*, **59**, 336-341, (1995).
- 36.** Tallarida, R. J., Murray, R.B. *Manual of pharmacologic calculations with computer programs*, II Edition, pp. 145-148. SprinVerlag, New York-Berlin-Heidelberg-London-Paris-Tokio.
- 37.** Villar, A. *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. Instituto Nacional Indigenista editores. México, D.F. 583 (1994).

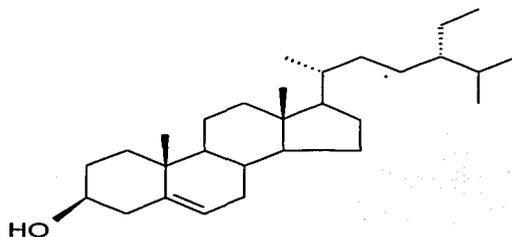


APÉNDICE

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DATOS ESPECTRALES
Y
ESPECTROSCOPIA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

β - Sitosterol

pf = 133°C

I.R. ν máx CDCl_3 (cm^{-1}): 3604.8 (-OH), 2958.7, 2869.9, 1465.8 ($-\text{CH}_2$), 1379 ($-\text{CH}_3$), 1039.6, 1022.2, 952.8.

RMN ^1H 300 MHz CDCl_3 δ (ppm): 0.60 ($-\text{CH}_3$), 3.52 (m H-3), 5.35 (m H-6)

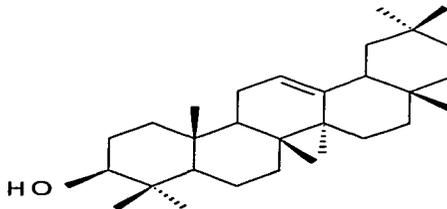
RMN ^{13}C 75 MHz CDCl_3 δ (ppm): 37.31 (C-1), 31.71 (C-2), 71.81 (C-3), 42.36 (C-4), 140.80 (C-5), 121.69 (C-6), 31.97 (C-7), 31.97 (C-8), 50.22 (C-9), 36.54 (C-10), 21.12 (C-11), 39.84 (C-12), 42.36 (C-13), 56.82 (C-14), 24.31 (C-15), 28.24 (C-16), 56.15 (C-17), 12.0 (C-18), 19.39 (C-19), 36.16 (C-20), 18.79 (C-21), 34.02 (C-22), 26.25 (C-23), 45.93 (C-24), 29.28 (C-25), 19.80 (C-26), 19.80 (C-27), 23.15 (C-28), 11.86 (C-29).

EM IE m/z:

414 M^+

($\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

β - Amirina.

pf = 140°C

I.R. ν máx CDCl_3 (cm^{-1}): 3696.92 (-OH), 3610.14, 2927.95, 2857.97
1602.58, 1462.22 ($-\text{CH}_2$), 1383.24 (CH_3),
1027.46, 994.75.

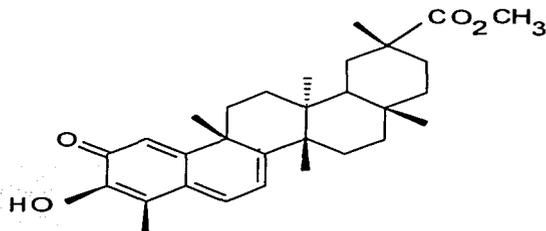
RMN ^1H 300 MHz CDCl_3 δ (ppm): 3.23 (dd H-3), 5.13 (t H-12), 5.18 (t H-12).

RMN ^{13}C 75 MHz CDCl_3 δ (ppm): 38.78 (C-1), 27.26 (C-2), 79.03 (C-3),
39.60 (C-4), 55.19 (C-5), 18.38 (C-6)
32.60 (C-7), 39.80 (C-8), 47.60 (C-9)
36.97 (C-10), 23.53 (C-11), 121.70 (C-12)
145.0 (C-13), 41.70 (C-14), 26.16 (C-15)
26.96 (C-16), 32.50 (C-17), 47.20 (C-18)
46.84 (C-19), 31.09 (C-20), 34.74 (C-21)
37.16 (C-22), 28.12 (C-23), 15.58 (C-24)
15.50 (C-25), 16.82 (C-26), 25.95 (C-27)
28.39 (C-28), 33-30 (C-29), 23.90 (C-30)

EM IE m/z : 426 M^+ (C₃₀H₅₀O)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PRISTIMERINA.



pf = 220°C

I.R. ν máx CDCl_3 (cm^{-1})

2951.0 (-OH), 1724.3 (-CO), 1550.7, (CO₂CH₃), 1444.6 (-CH₂), 1377.1 (-CH₃), 1268.4, 161.1.

RMN ¹H 300 MHz CDCl_3 δ (ppm):

6.53 (d H-1), 7.02 (dd H-6), 6.35 (d H-7)
 1.85 (td H-11 α), 2.17 (ddd H-11 β),
 1.85(ddd H-12 α), 1.67 (td H-12 β),
 1.65 (td H-15 α), 1.57 (ddd H-15 β),
 1.51(ddd H-16 α), 1.87(ddd H-16 β),
 1.57(d H-18), 2.45(d H-19 α),
 1.67 (dd H-19 β), 2.2 (ddd H-21 α),
 1.38 (td H-21 β), 2.04 (td H-22 α),
 0.99 ddd (H-22 β), 2.21 (s H-23, CH₃),
 1.45 (s H-25, CH₃), 1.26 (s H-28, CH₃),
 1.17 (s H-30, CH₃), 3.55 (s COCH₃),
 6.97 (s OH).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RMN ^{13}C 75 MHz CDCl_3 δ (ppm):

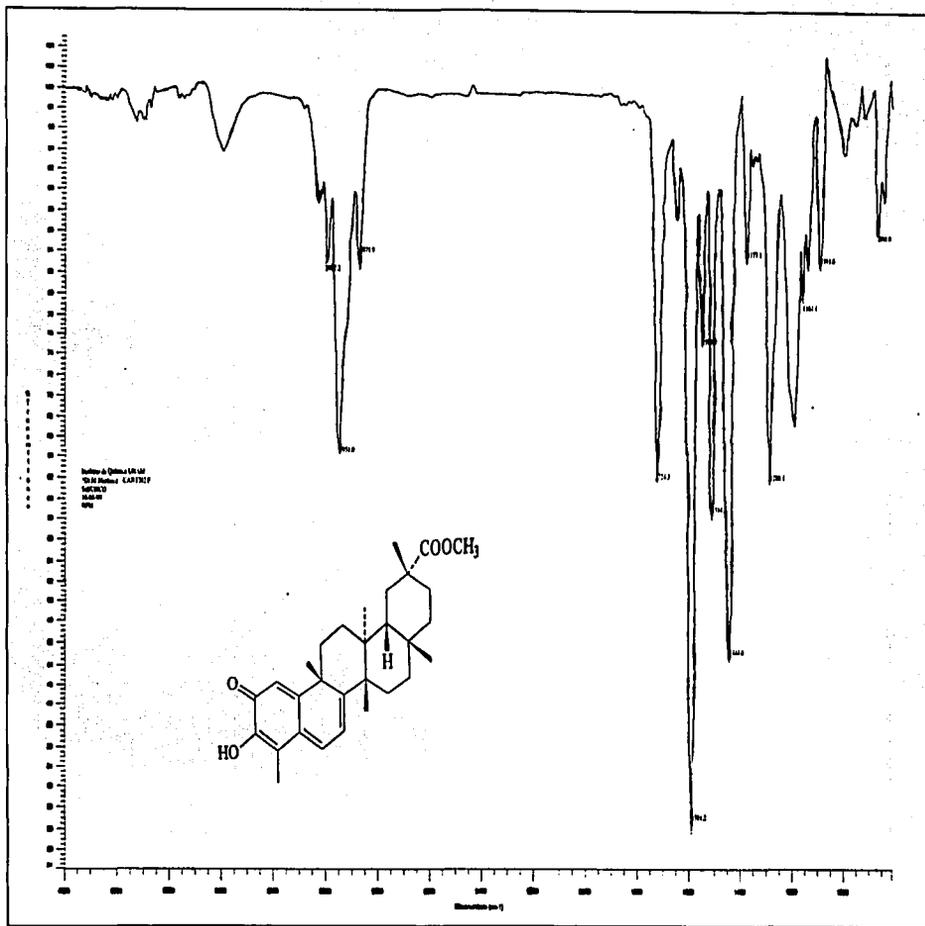
119.6 (C-1), 178.37 (C-2), 146.07 (C-3)
117.01 (C-4), 127.51 (C-5), 133.84 (C-6)
118.12 (C-7), 169.87 (C-8), 42.93 (C-9)
164.72 (C-10), 33.63 (C-11), 29.70 (C-12)
39.47 (C-13), 45.06 (C-14), 28.71 (C-15)
36.42 (C-16), 30.57 (C-17), 44.40 (C-18)
30.94 (C-19), 40.44 (C-20), 29.92 (C-21)
34.85 (C-22), 10.21 (C-23), 38.24 (C-25)
21.65 (C-26), 18.34 (C-27), 31.59 (C-28)
31.59 (C-28), 178.68 (C-29), 32.67 (C-30)

EM IE m/z (%ar):

464 (99) [M]⁺ (C₃₀H₄₀O₄)

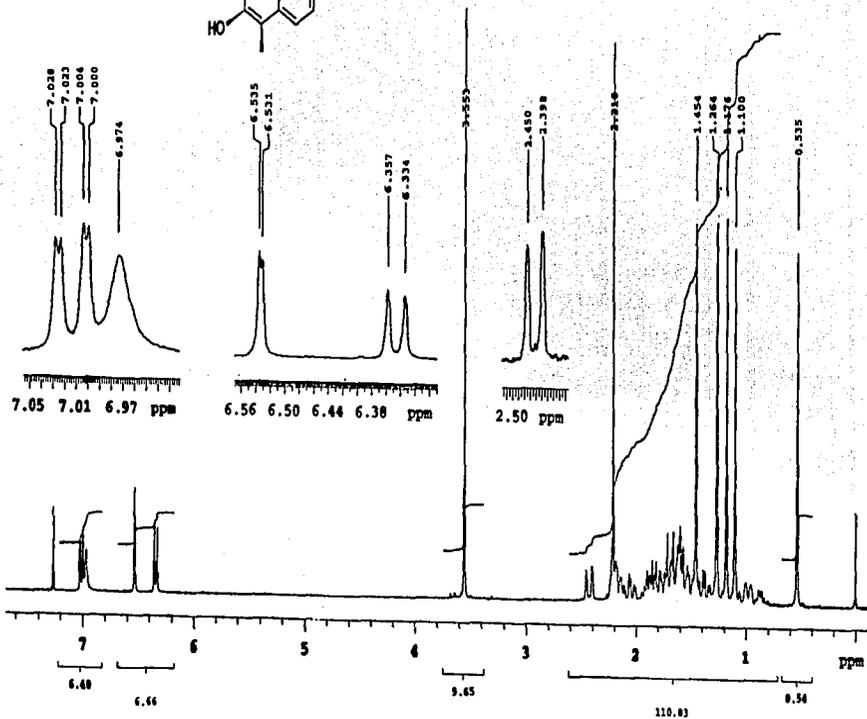
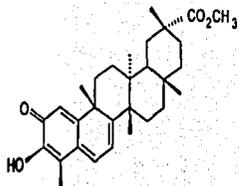
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURE 1
IR SPECTRUM
PRISTIMERIN



Espectro 1. Infrarojo de la Pristimerina.

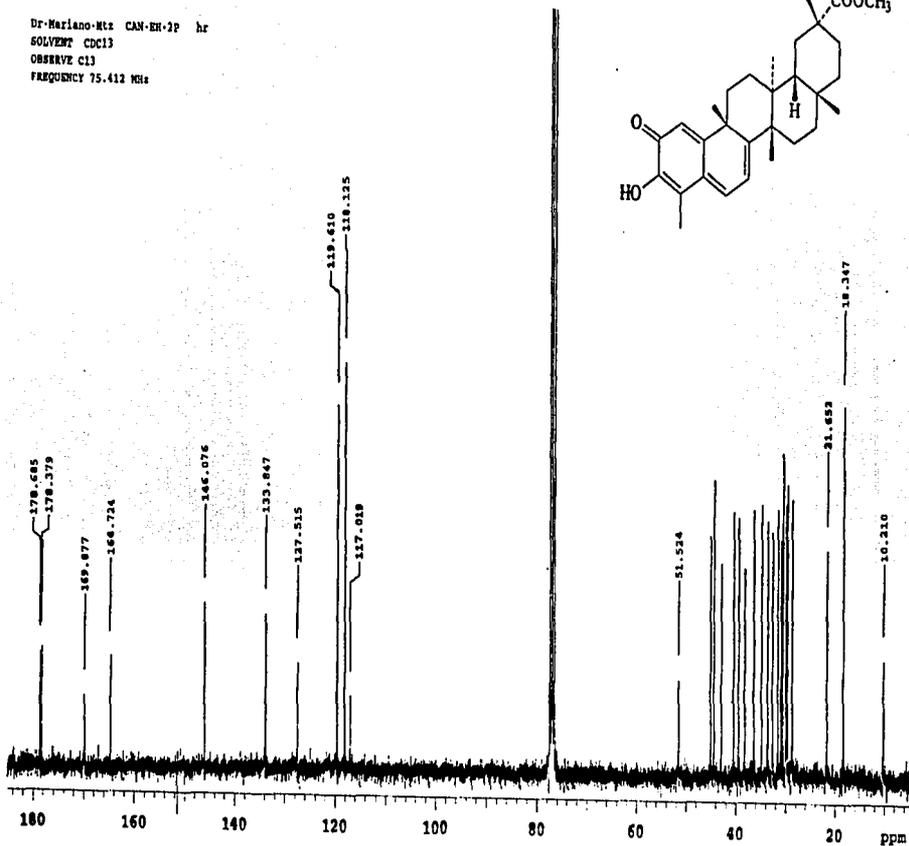
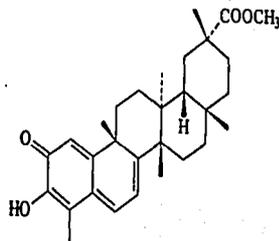
Dr. Mariano-Rtz CAN-EH-2P hr
 SOLVENT CDCl₃
 OBSERVE H1
 FREQUENCY 399.877 MHz



Espectro 2. Resonancia magnética nuclear ¹H de la Pristimerina.

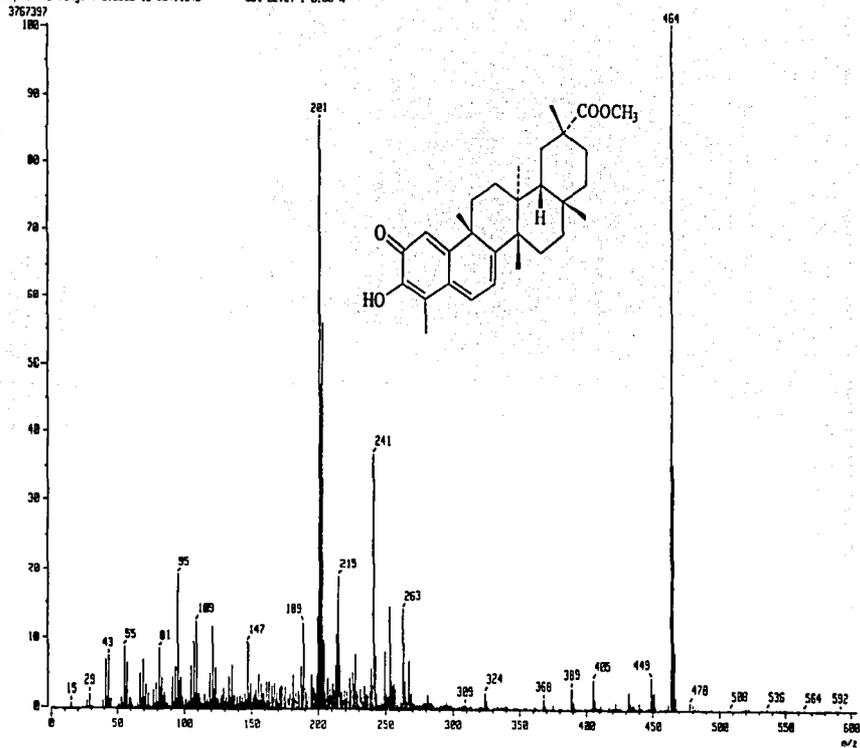
INSTITUTO
 FALTA DE ORIGEN

Dr-Mariano-Mtz CAN-EH-2P hr
SOLVENT CCl₃
OBSERVE C13
FREQUENCY 75.412 MHz



Espectro 3. Resonancia magnética nuclear ¹³C de la Pristimerina.

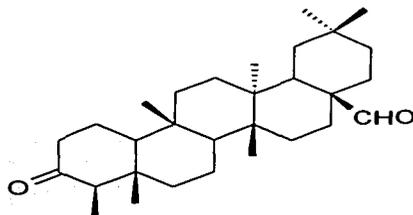
(Mass Spectrum)
 Data : Dr-Martinez-Mariano-021 Date : 12-Ago-99 02:25
 Sample: CVN-D2P
 Note : -
 Inlet : Direct Ion Mode : E[+]
 Spectrum Type : Normal Ion [M⁺-Linear]
 RT : 2.47 min Scan# : 167,100-196,100 Temp : 292.8 deg.C
 BP : m/z 454.0000 Int. : 350.25
 Output m/z range : 0.0000 to 604.1543 Cut Level : 0.00 %



Espectro 4. Espectrometría de masas de la Pristimerina.

64

CANOFILAL



pf = 264°C

I.R. ν máx CDCl_3 cm^{-1}

2925.091 (-CH₂), 1715 (-CO), 1459 (-CH₂),
1387 (-CH₃).

RMN ¹H 300 MHz CDCl_3 δ (ppm):

0.71 (sCH₃), 0.84 (sCH₃), 0.86 (s CH₃)
0.88 (sCH₃), 0.95 (sCH₃), 0.98 (s CH₃)
1.07 (sCH₃), 8.86 (d H-23), 9.4 (s H-28)

RMN ¹³C 75 MHz CDCl_3 δ (ppm):

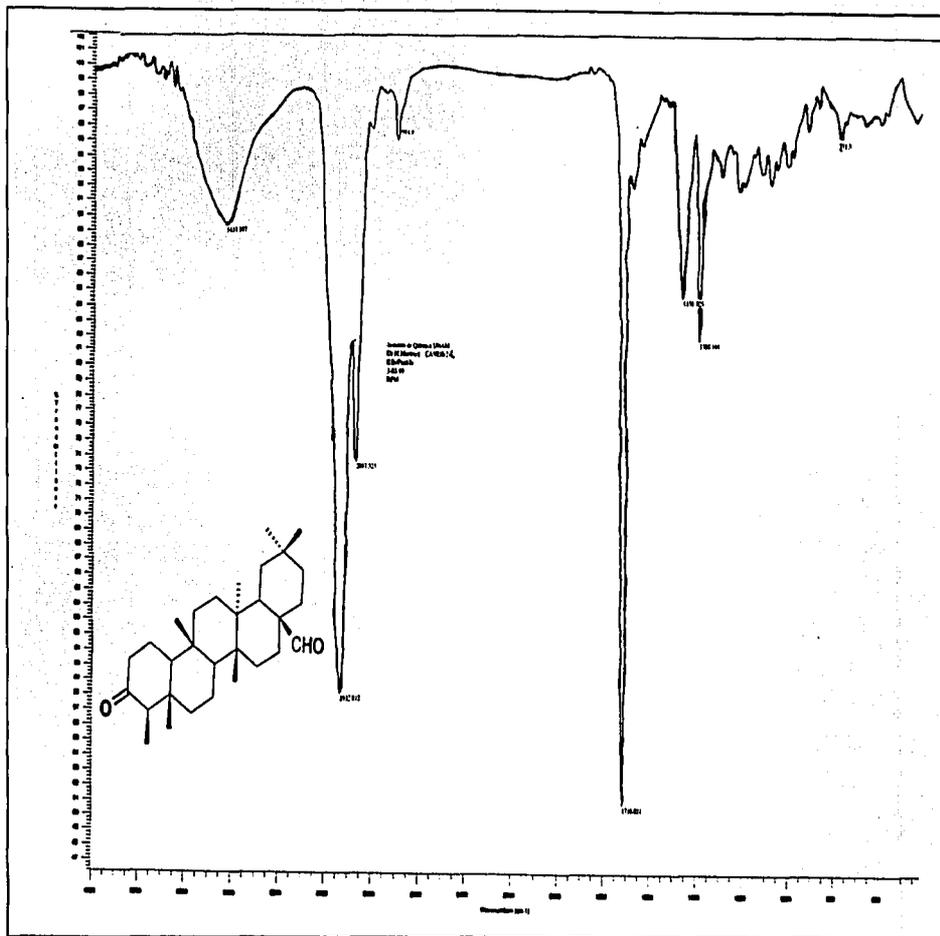
22.2 (C-1), 41.4 (C-2), 212.9 (C-3)
58.2 (C-4), 41.9 (C-5), 41.0 (C-6)
18.0 (C-7), 52.8 (C-8), 37.1 (C-9)
59.2 (C-10), 35.4 (C-11), 29.4 (C-12)
38.7 (C-13), 37.6 (C-14), 30.6 (C-15)
28.3 (C-16), 47.7 (C-17), 36.4 (C-18)
34.9 (C-19), 28.0 (C-20), 32.3 (C-21)
33.4 (C-22), 6.8 (C-23), 14.6 (C-24)
17.1 (C-25), 18.7 (C-26), 20.2 (C-27)
209.0 (C-28), 34.4 (C-29), 32.4 (C-30)

EM IE m/z (% ar) :

440 (10) M⁺

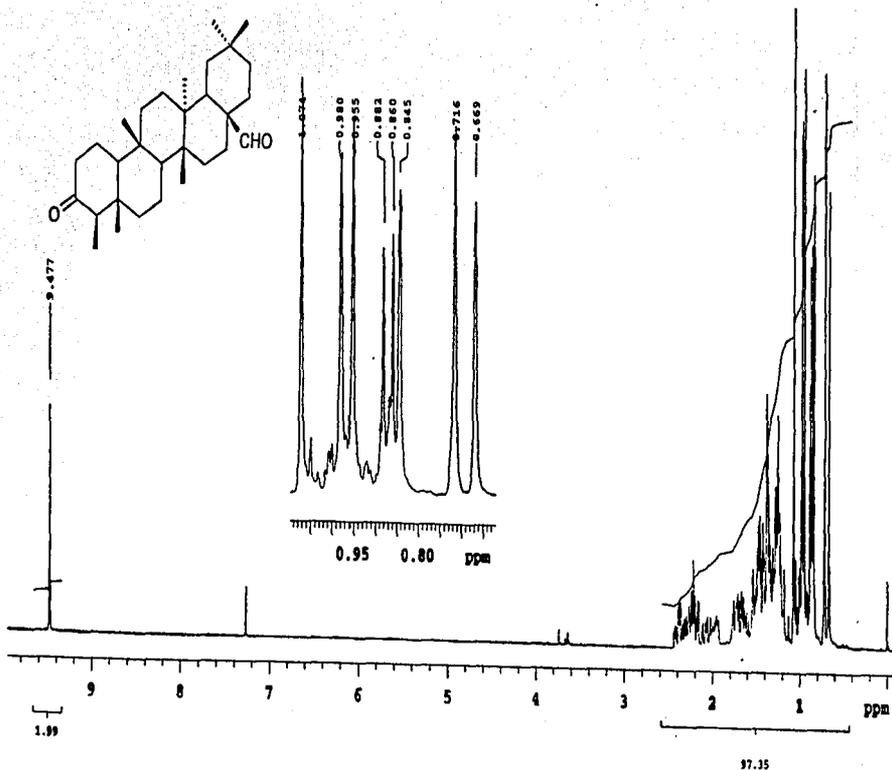
(C₃₀H₄₈O₂)

TESIS CON
FALTA DE CUBRIR



Espectro 5. Infrarrojo del Canofilal.

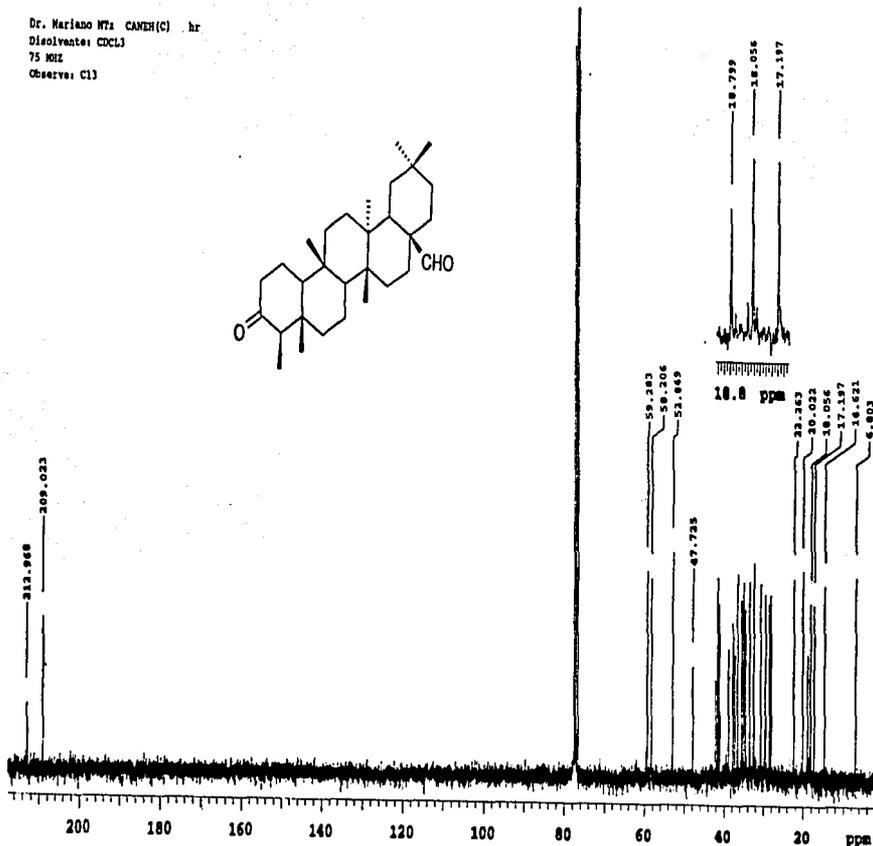
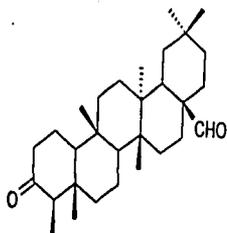
. Merlano HTz CAMER(c) hr
solvente: CDCl₃
J KHZ
serie: H1



Espectro 6. Resonancia magnética nuclear ¹H del Canofolal.

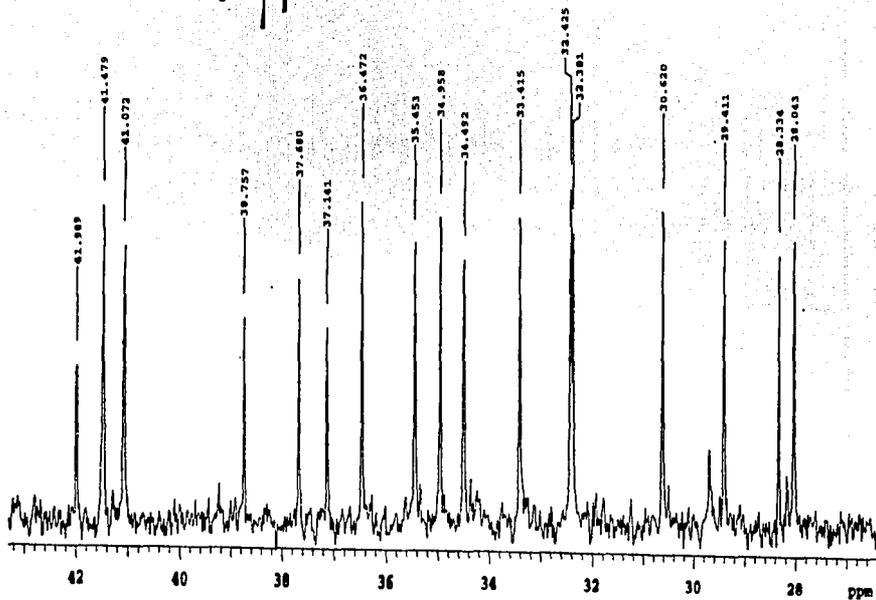
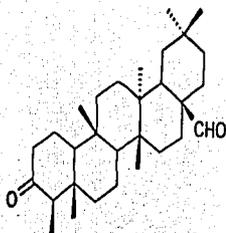
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dr. Mariano Wta CANZIN(C) hr
Disolvente: CDCl₃
75 MHz
Observa: C13



Espectro 7. Resonancia magnética nuclear ¹³C del Canofilal.

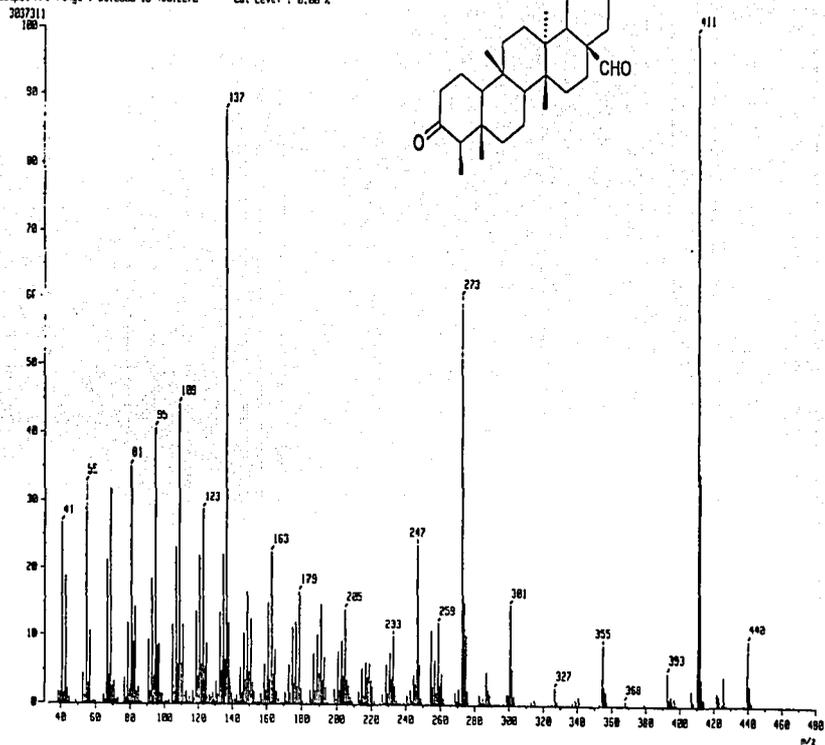
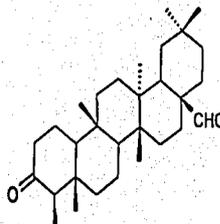
Dr. Mariano Htz. CAMER(C) hr
Disolvente: CDCl₃
75 MHz
Observa: C13



Espectro 7. (continuación) Resonancia magnética nuclear ¹³C del Canofilal.

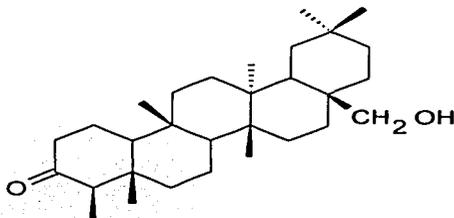
TESIS COMPLETA
FALLA DE ORIGEN

[Mass Spectrum]
 Date : 09-Jul-98 08:23
 Sample: CPN EH c
 Note : -
 Inlet : Direct Ion Mode : E+
 Spectrum Type : Normal Ion [Y*-Linear]
 RT : 4.85 min Scan# : 156, 373
 BP : m/z 378.0000 Int. : 289.66
 Output m/z range : 33.0000 to 498.2278 Cut Level : 0.00 %



Espectro 8. Espectrometría de masas por I.E. del Canofilal.

CANOFILOL



pf = 280°C

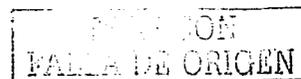
I.R. ν máx CDCl₃ (cm⁻¹): 3544.9 (-OH), 2932.1 (-CH₂), 1709.7 (-CO)
1463.1 (-CH₂), 1386.4 (-CH₃).

RMN ¹H 300 MHz CDCl₃ δ (ppm): 0.72 (s H-24), 0.86 (s H-25), 0.88
(d H-23), 0.09 (t H-27), 0.97 (t H-26),
0.99 (t H-29), 1.12 (t H-30), 3.63
(s H-28).

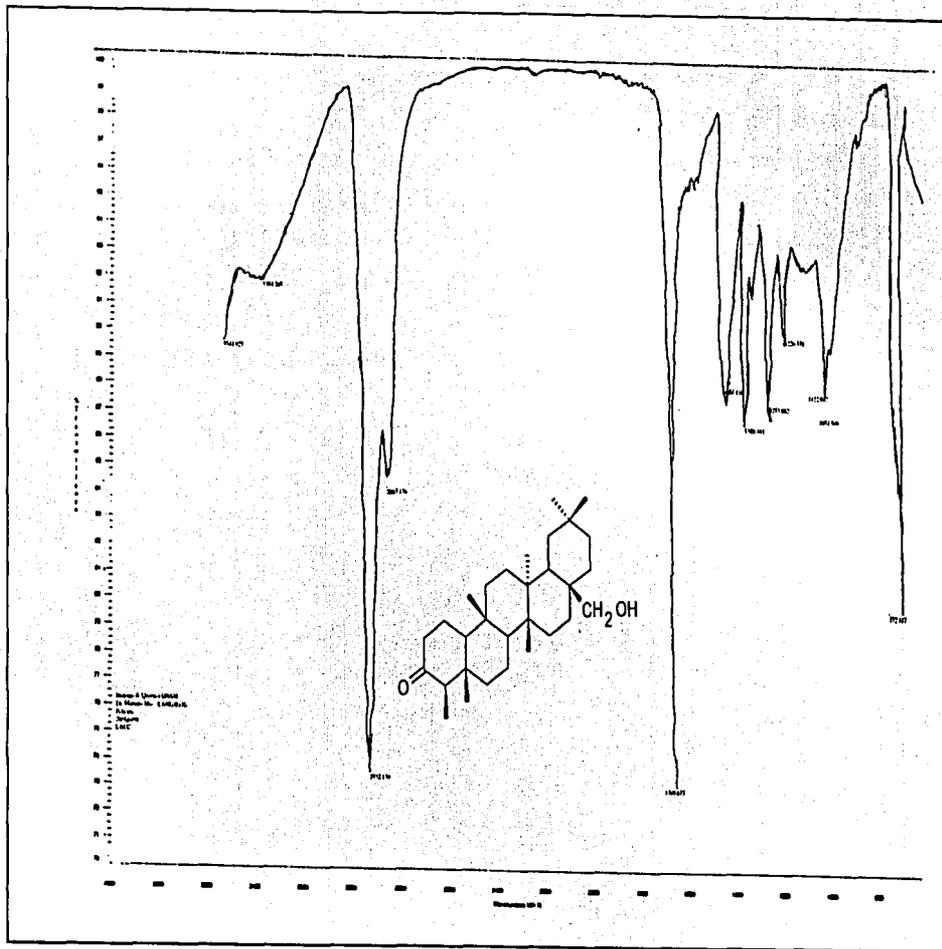
RMN ¹³C 75 MHz CDCl₃ δ (ppm): 22.2 (C-1), 41.4 (C-2), 213.1 (C-3)
58.2 (C-4), 42.0 (C-5), 41.2 (C-6)
18.2 (C-7), 52.4 (C-8), 37.4 (C-9)
59.4 (C-10), 35.4 (C-11), 30.0 (C-12)
39.3 (C-13), 38.1 (C-14), 31.2 (C-15)
29.1 (C-16), 35.1 (C-17), 39.4 (C-18)
34.4 (C-19), 28.1 (C-20), 31.3 (C-21)
33.3 (C-22), 6.8 (C-23), 14.6 (C-24)
18.0 (C-25), 9.0 (C-26), 19.1 (C-27)
68.0 (C-28), 34.2 (C-29), 32.8 (C-30)

EM IE m/z (% ar): 442 (25) M⁺ (C₃₀H₅₀O₂)

71

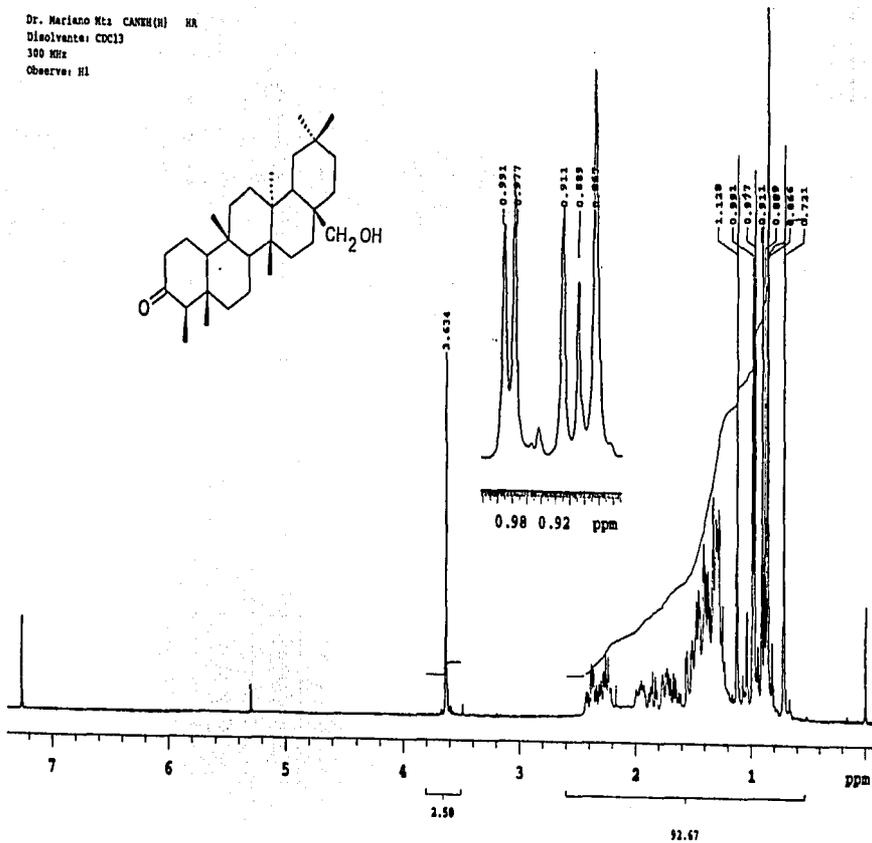
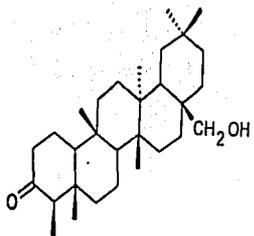


TRACIA
FALLA DE ORIGEN



Espectro 9. Infrarojo del Canofilol.

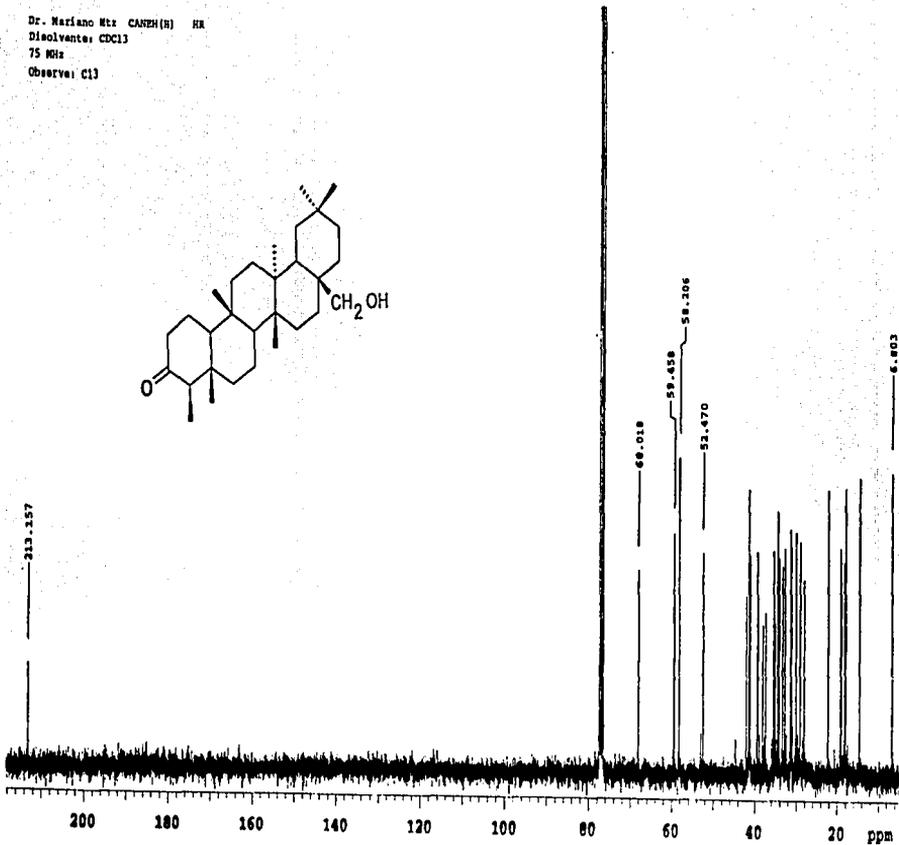
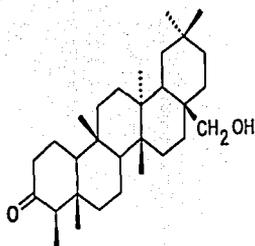
Dr. Mariano Mta CANEH(H) HR
Disolvente: CCl₄
300 MHz
Observa: H1



Espectro 10. Resonancia magnética nuclear ¹H del Canfolol.

TRIPS COE
FALTA DE ORIGEN

Dr. Mariano Rtz CANPH (R) HR
Disolvente: CDCl₃
75 MHz
Observa: C13

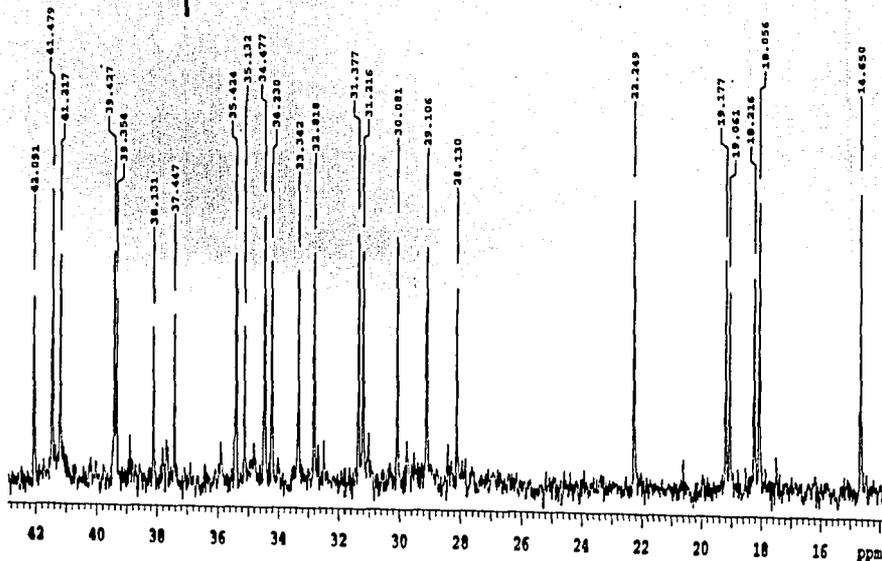
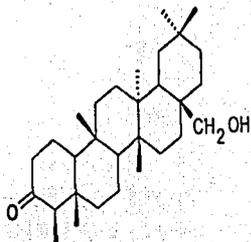


Espectro 11. Resonancia magnética nuclear ¹³C del Canofilol.

TESIS DOCTORAL
FALLA DE ORIGEN

H

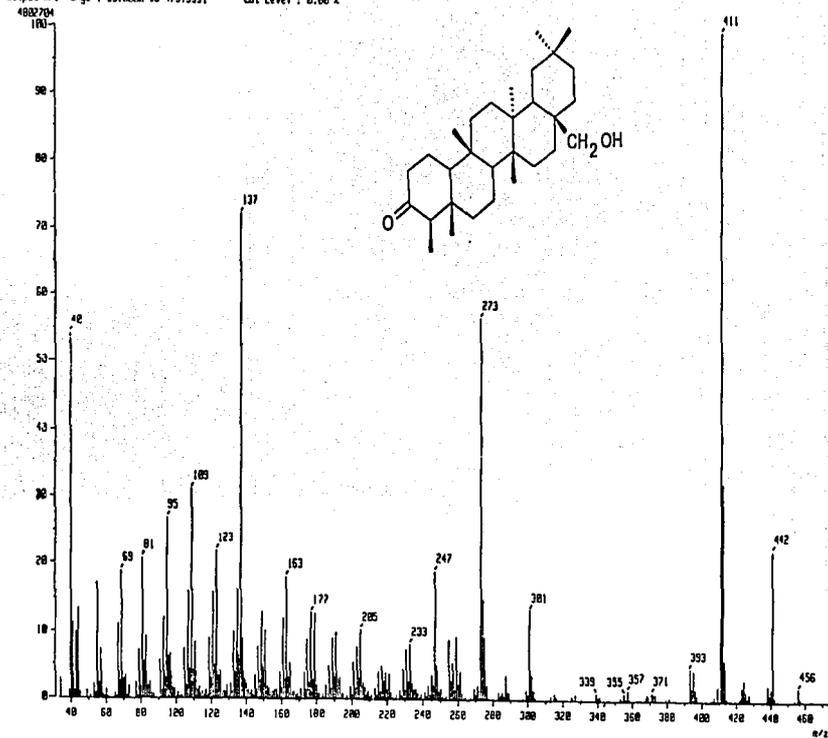
Dr. Mariano Rta CARER(H) HA
Disolvente: CDCl₃
75 MHz
Observa: C13



FALLA DE ORIGEN

Espectro 11. (continuación) Resonancia magnética nuclear ¹³C del Canofilol.

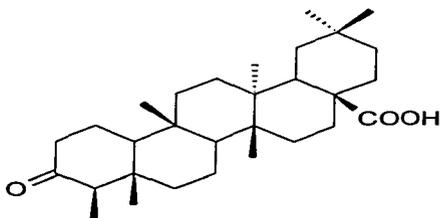
[Mass Spectrum]
 Date : D:\Marketing-Murimob17 Date : 18-Jul-98 02:39
 Sample: CFW E H H
 Note : -
 Inlet : Direct Ion Mode : E(+)
 Spectrum Type : Normal Ion (MF-Linear)
 RT : 2.03 min Scan# : 167, (181) Temp : 227.6 deg.C
 BP : m/z 411.0000 Inl. : 450.02
 Output m/z range : 33.0000 to 473.3991 Cut Level : 0.00 %



Espectro 12. Espectrometría de masas por I.E. del Canifilol.

INSTITUCION
 FARMACIA DE ORIGEN

ÁCIDO 3-OXOCANOFÍLICO.



pf = 240 ° C

I.R. ν máx CDCl_3 (cm^{-1})

3693.1 (-COOH), 2948.6 (-CH₂), 1702.2 (-CO), 1456.5 (-CH₂), 1390.1 (-CH₃), 118.5.

RMN ¹H 300 MHz CDCl_3 δ (ppm):

0.72 (s H-24), 0.81 (s H-25), 0.86 (d H-23), 0.86 (s H-27), 0.88 (s H-26), 0.94 (s H-29), 1.04 (s H-30)

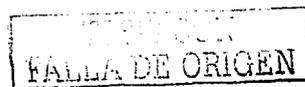
RMN ¹³C 75 MHz CDCl_3 δ (ppm):

22.3 (C-1), 41.5 (C-2), 212.9 (C-3), 58.250 (C-4), 42.077 (C-5), 41.15 (C-6), 18.11 (C-7), 53.04 (C-8), 37.73 (C-9), 59.34 (C-10), 35.51 (C-11), 29.76 (C-12), 8.94 (C-13), 37.86 (C-14), 31.07 (C-15), 29.45 (C-16), 34.86 (C-17), 34.50 (C-19), 28.45 (C-20), 31.07 (C-21), 32.70 (C-22), 6.80 (C-23), 14.67 (C-24), 18.11 (C-25), 18.53 (C-26), 20.61 (C-27), 184.07 (C-28), 34.50 (C-29), 32.70 (C-30).

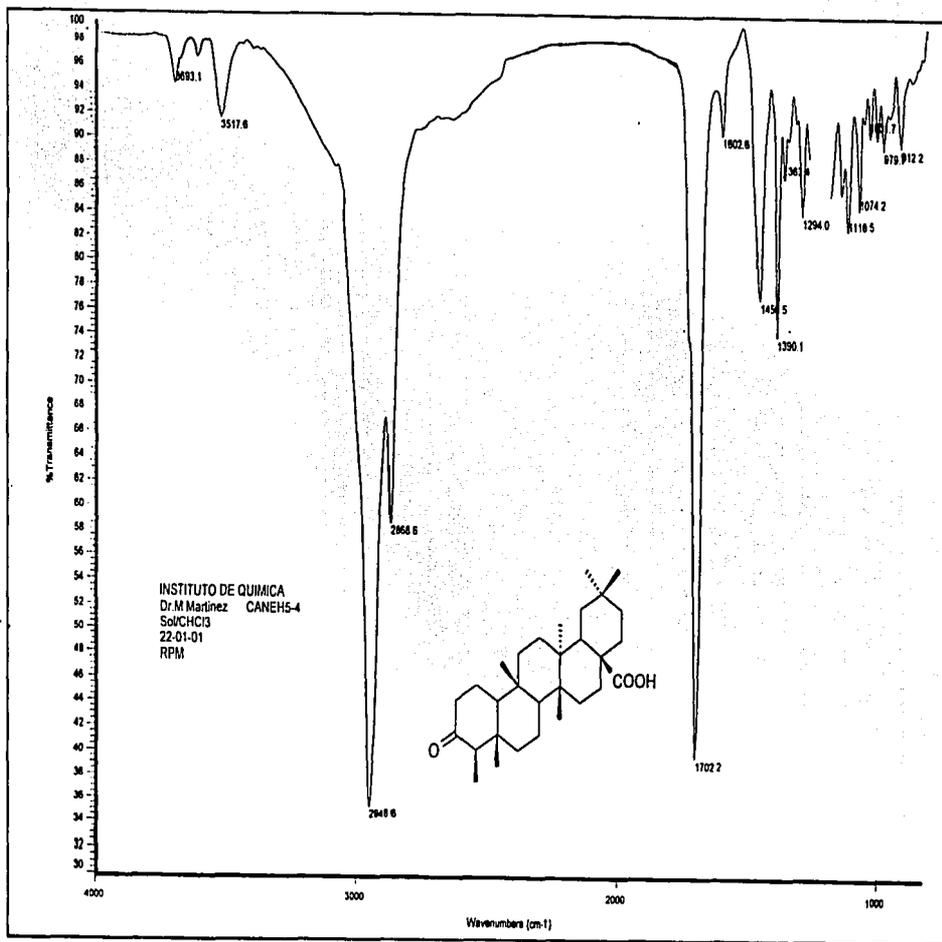
EM IE m/z (% ar) :

456 (80) M⁺ (C₃₀H₄₈O₃)

77

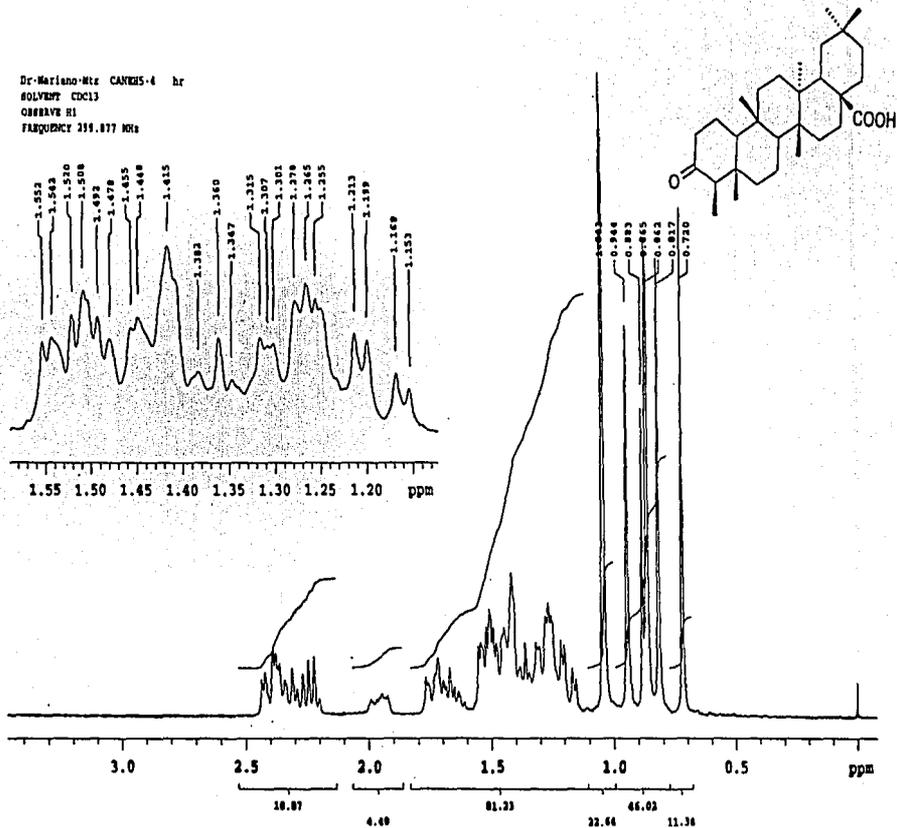


FALTA DE ORIGEN



Espectro 13. Infrarojo del Ácido 3-oxocanofílico.

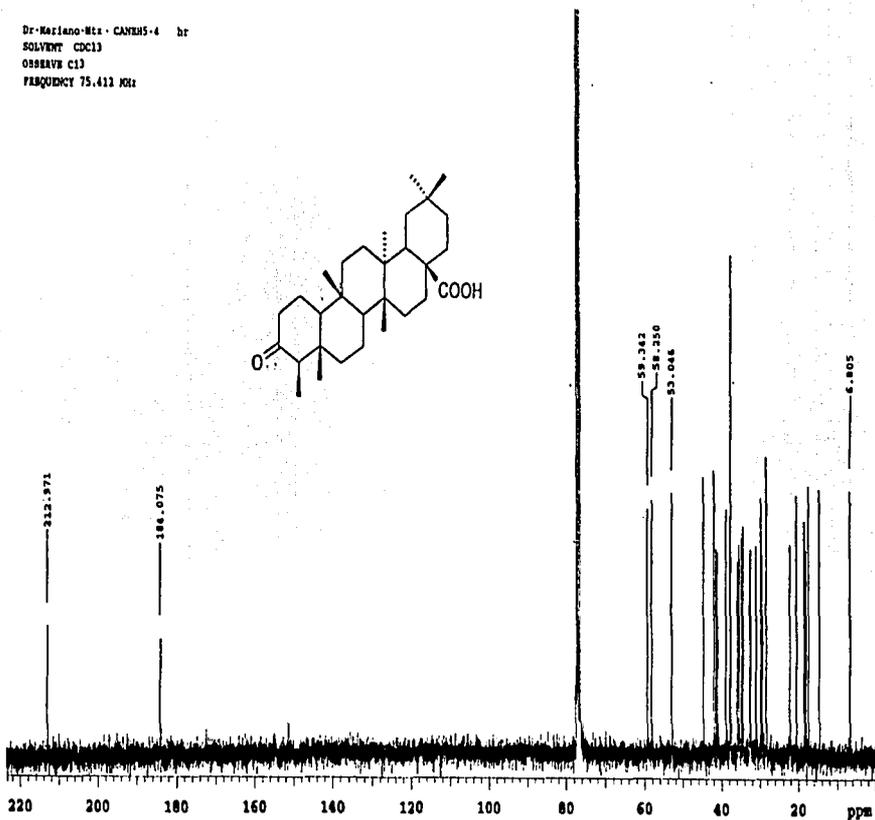
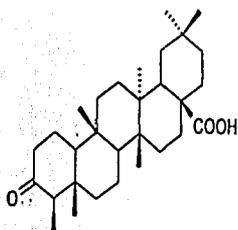
Dr-Mariano-Mtz CAMELS-4 hr
SOLVENT CDCl3
OBSERVE H1
FREQUENCY 250.877 MHz



Espectro 14. Resonancia magnética nuclear ^1H del Ácido 3-oxocanofílico.

TRIP
FALLA DE ORIGEN

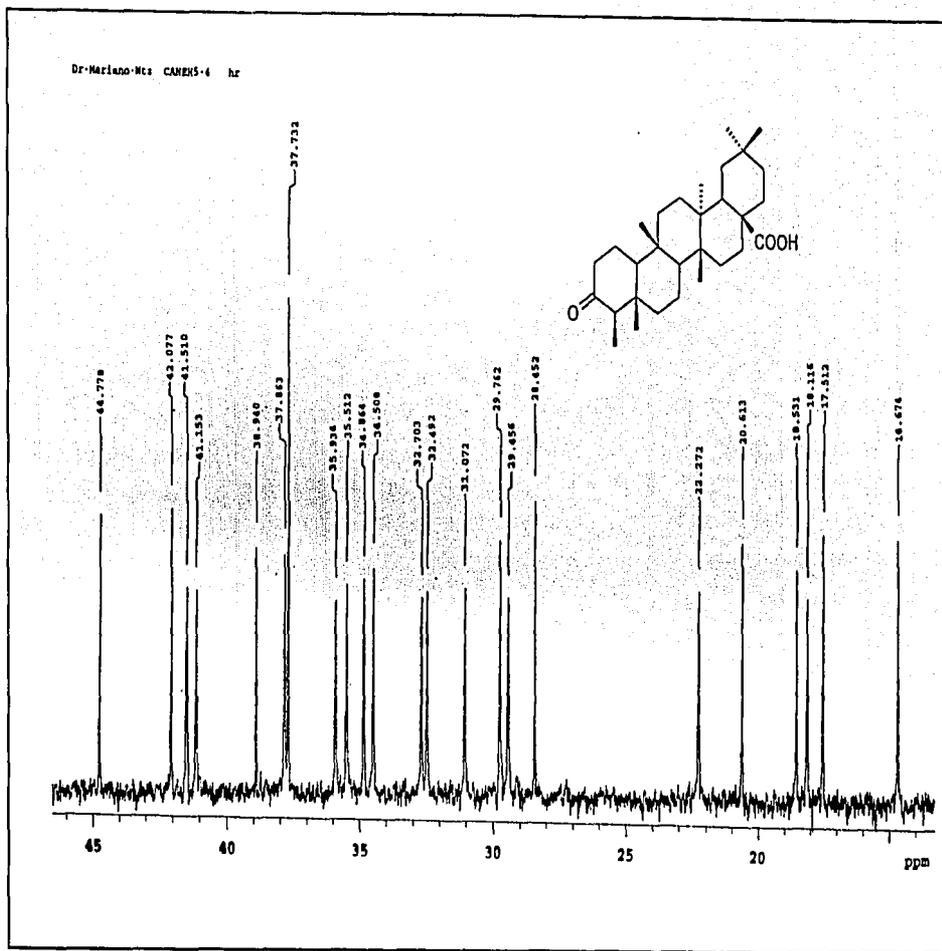
Dr-Mariano-Mta - CANEHS-4 hr
SOLVENT CDCl3
OBSERVE C13
FREQUENCY 75.412 MHz



Espectro 15. Resonancia magnética nuclear ^{13}C del Ácido 3-oxocanólico.

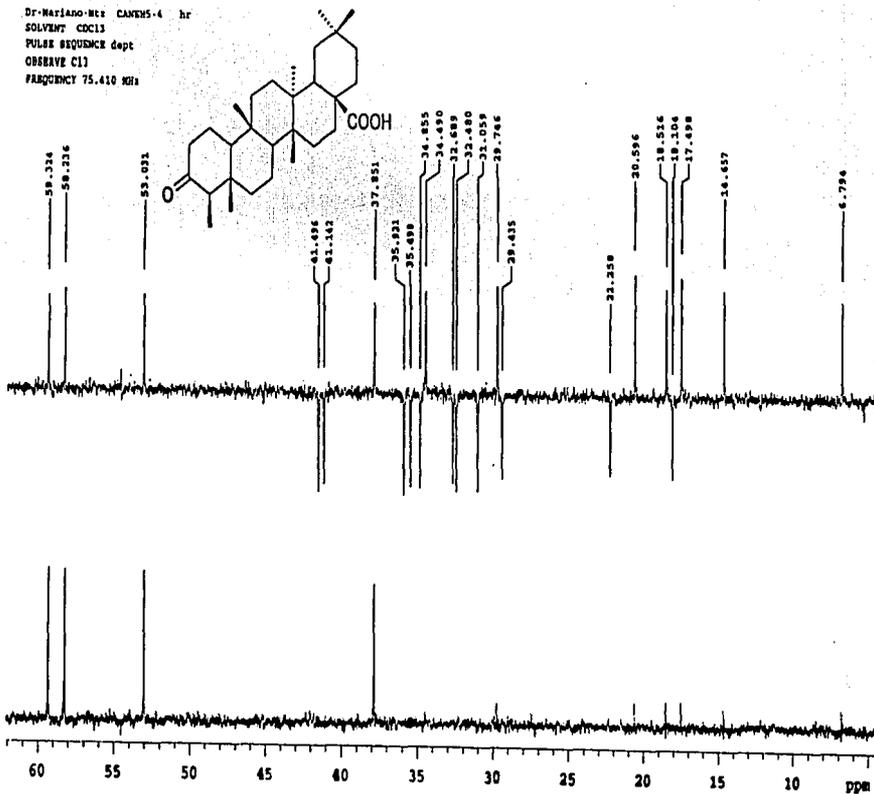
RECEIVED
FALL 1968
MICHIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



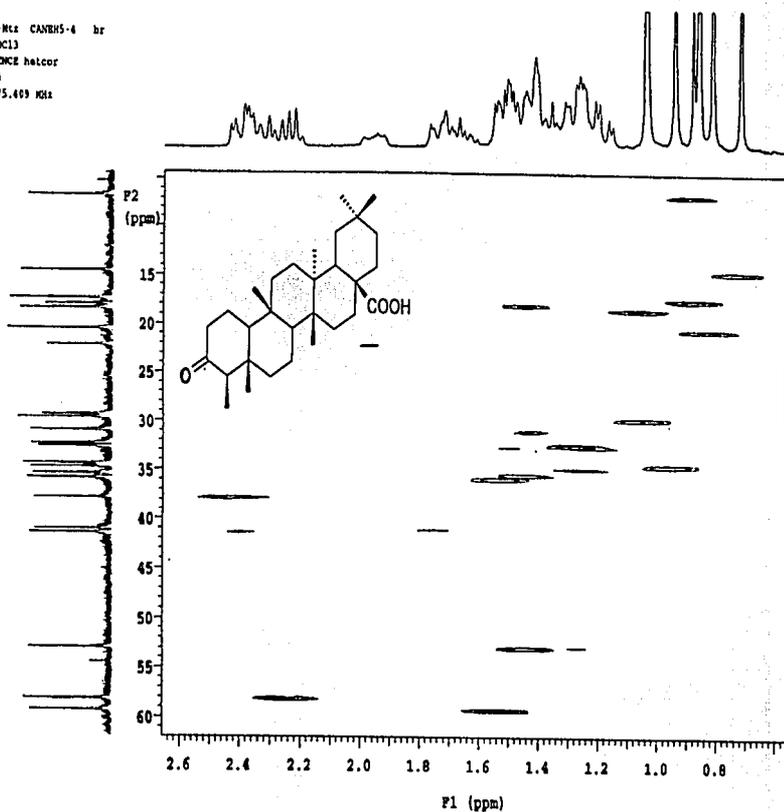
Espectro 15. (continuación) Resonancia magnética nuclear ^{13}C del Ácido 3-oxocanfollico.

Dr-Mariano-Mtz CANENS-4 hr
SOLVENT CDCl3
PULSER SEQUENCE dept
OBSERVE C13
FREQUENCY 75.410 MHz



Espectro 16. DEPT del Ácido 3-oxocanónico.

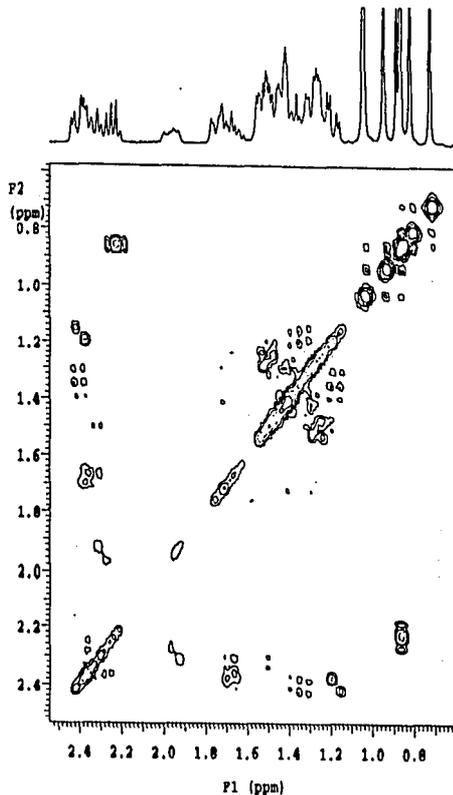
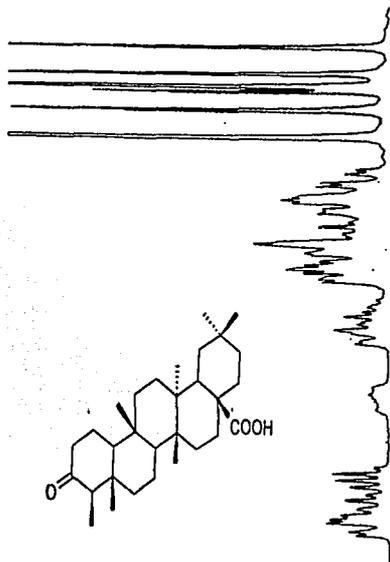
Dr-Mariano-Mtz CANEHS-4 hr
SOLVENT CDCl3
PULSE SEQUENCE hetcor
OBSERVE C13
FREQUENCY 75.409 MHz



Espectro 17. HETCOR del Ácido 3-oxocanónico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

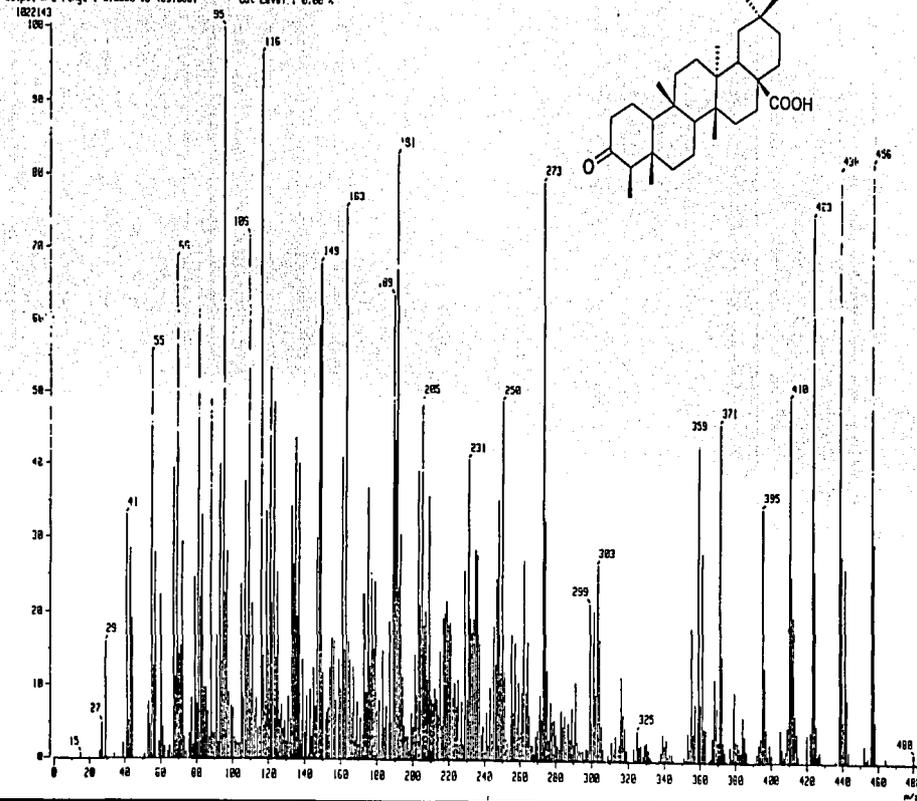
Dr-Mariano-Rtz CANHS-4 hr
SOLVENT CDCl3
PULSE SEQUENCE relayh
OBSERVE H1
FREQUENCY 259.876 MHz



Espectro 18. COSY del Ácido 3-oxocanfilico.

TIPO DE
VALOR DE CORRIENTE

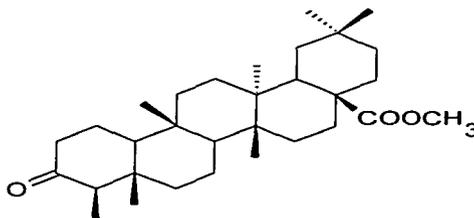
[Nitr Spectrum]
 Data : D-Martinez-Mariano-054 Date : 03-Mar-100 13:28
 Sample: UNDO-4
 Note :
 Inlet : Direct Ion Mode : E1+
 Spectrum Type : Normal Ion (F-Linear)
 RT : 1.43 min Scan# : (12,65)-(12,21) Temp : 65.9 deg.C
 BP : m/z 30000 Int. : 97,26
 Output m/z range : 0.0000 to 483.0001 Cut Level : 0.00 %



Espectro 19. Espectrometría de masas por I.E. del Ácido 3-oxocanónico.

TESIS CON
 FALTA DE CUBIERTA

DERIVADO METILADO



pf = 241°C

I.R. ν máx CDCl₃ (cm⁻¹): 2948.65 (-CH₂), 1707.9 (-COCH₃), 1602.5, (-CO), 1456.0 (-CH₂), 1390.4 (-CH₃), 1191.8.

RMN ¹H 300 MHz CDCl₃ δ (ppm): 0.72 (s H-24), 0.85 (s H-25), 0.86 (d H-23), 0.88 (s H-27), 0.93 (s H-26), 1.03 (s H-29), 1.05 (s H-30), 3.65 (s H-31),

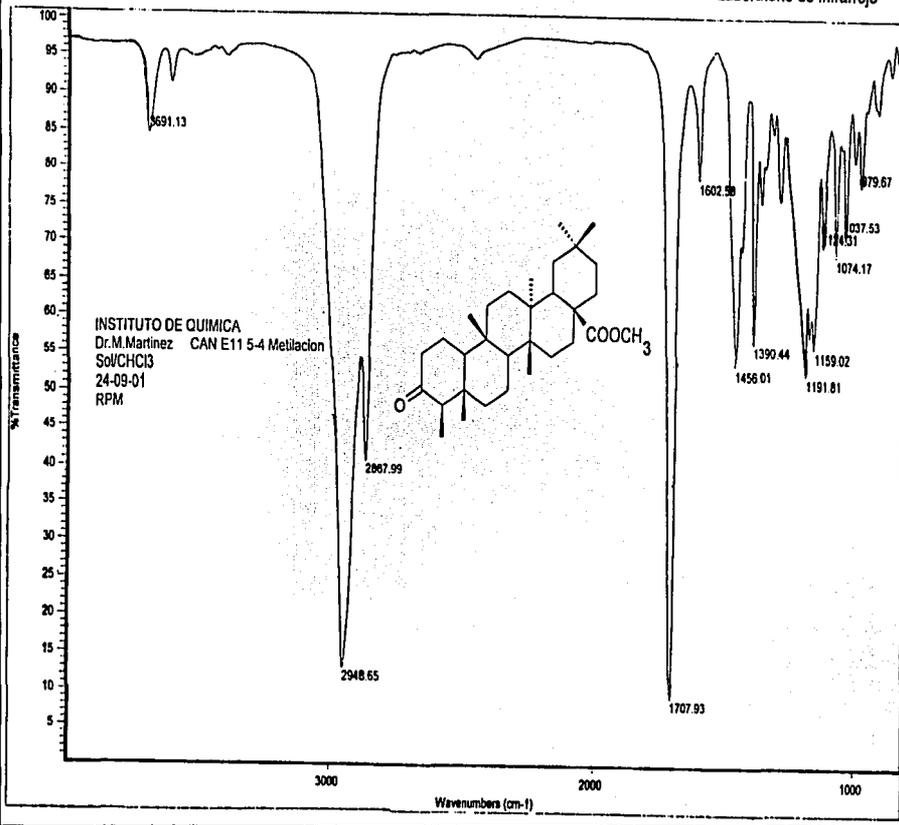
EM IE m/z (% ar): 470 (10) M⁺ (C₃₁H₅₀O₃)

Masas Alta Resolución: m/z = 470.3760 (C₃₁H₅₀O₃)



Instituto de Química, UNAM

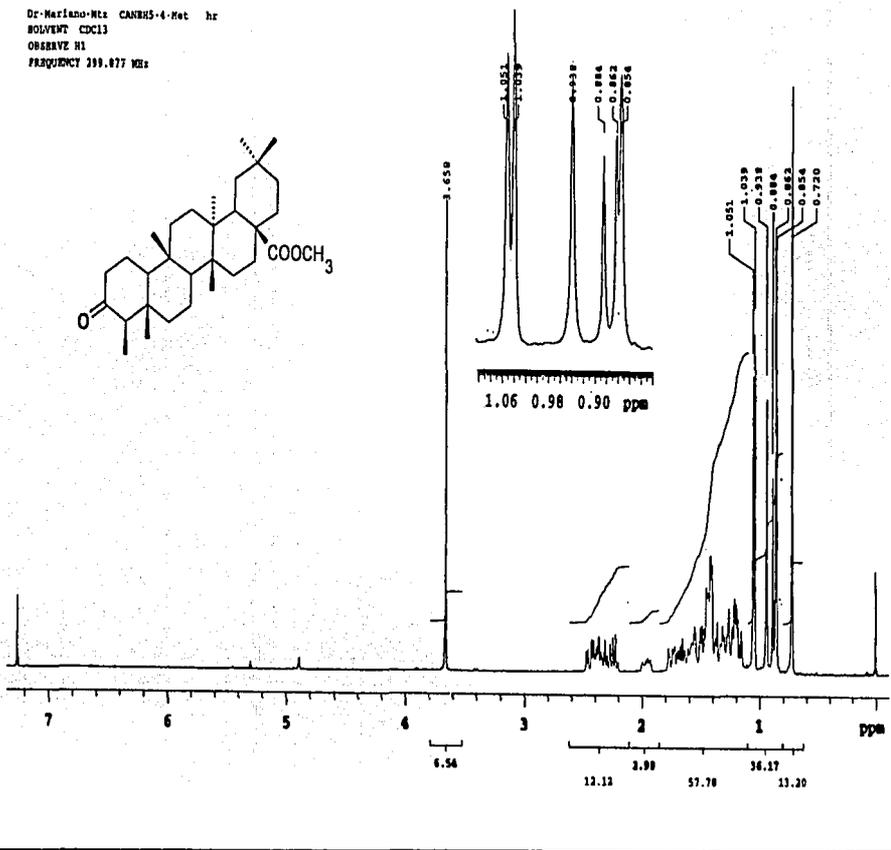
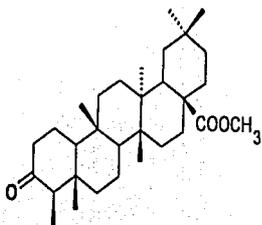
Laboratorio de Infrarrojo



Espectro 20. Infrarrojo del Éster metílico del ácido 3-oxocanalic.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

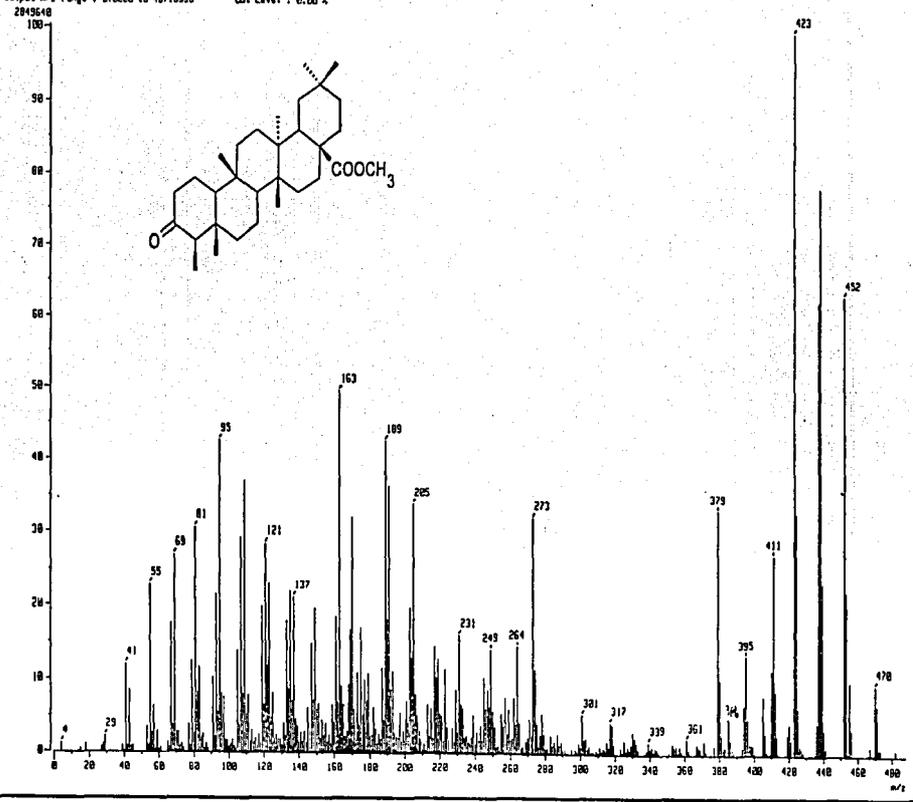
Dr. Mariano-Mtz CANH5-4-Met hr
SOLVENT CDCl3
OBSERVE H1
FRECUENCIA 259.877 MHz



Espectro 21. Resonancia magnética nuclear ¹H del Éster metílico del ácido 3-oxocanofílico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1 Mass Spectrum 1
 Date : Dr-Martinez-Herlano-085 Date : 11-Jun-1998 04:17
 Sample: CPKCH
 Note : -
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion (M⁺-linear)
 RT : 1.63 min Scan# : (33,771)-(29,49) Temp : 149.6 deg.C
 BP : m/z 423.0000 Int. : 278.98
 Output m/z range : 0.0000 to 497.8338 Cut Level : 0.00 %



Espectro 22. Espectrometría de masas por I.E. del Éster metílico del ácido 3-oxocanofílico.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

[Elemental Composition]

Data : Dr-Martinez-Mariano-144

Date : 18-Jun-100 00:29

Page: 1

Sample: CANEM

Note : -

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

RT : 2.83 min

Scan#: (10,31)

Elements : C 35/0, H 60/0, O 3/0

Mass Tolerance : 7mmu

Unsaturation (U.S.) : 0.0 - 15.0

Observed m/z Int%

470.3754 9.1

Estimated m/z Error [ppm]

470.3760 -1.2

U.S.

C

H

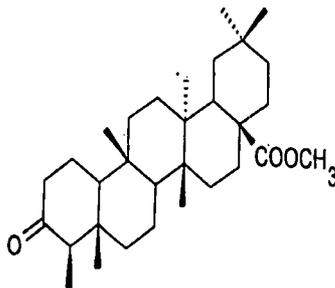
O

7.0

31

50

3



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectrometría de masas por I E A R del Éster metílico del ácido 3-oxocanofílico.

90