



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Metabolitos Secundarios de *Lippia graveolens*
(orégano mexicano).”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

SONIA AMADOR MOLINA.



MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Dr.	Manuel Jiménez Estrada.
Vocal	Dr.	José Federico del Río Portilla.
Secretario	M. en C.	Emma Maldonado Jiménez.
1er. Suplente	Dr.	José Fausto Rivero Cruz.
2do. Suplente	M. en C.	Martha Ivonne Berros Espino.

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 2-7, Departamento de Productos Naturales
Instituto de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

Asesora

M. en C. Emma Maldonado Jiménez

Sustentante

Sonia Amador Molina.

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Emma Maldonado Jiménez, por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis, por sus consejos y por todas cosas que he aprendido al trabajar con ella.

A los técnicos del Instituto de Química, que realizaron todos los espectros empleados en este trabajo y al departamento de Pruebas Biológicas, especialmente a Toño por haberme ayudado en la realización de las pruebas biológicas.

A las personas con las que pase tantas cosas a lo largo de la carrera, con las que se siempre he contado y a las cuales quiero mucho mis amigas Angélica, Sandra Luz (Chispa), Silvia, Bety, Sandra, Claudia y Margarita.

A todos mis amigos de “la jardinera”: Toño, Oliver, Daniel, Chava, Lorenzo, Pawuas, Brenda, Said, Abigail, Salomón, Pliego, etc.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 2-7, Luís, Eliu, Rodrigo, Yunue, Jon, Humberto, Gaby, Luis Angel y EriK.

A mi jurado por haber revisado y corregido mi trabajo.

DEDICATORIAS

Este trabajo se lo dedico a mis padres Clementina y Francisco, por que gracias a su cariño, guía y apoyo, he podido concluir una etapa más de mi vida, mi carrera profesional y por lo cual les estaré eternamente agradecida.

A mis hermanos Olivia, Miriam, Juan y José, que aunque pocas veces se los digo los quiero mucho.

A la persona que tengo tantas cosas que agradecerle, que me apoya siempre que lo necesito, que esta con migo en todo momento, que significa mucho para mí y al cual quiero mucho: Alejandro.

ÍNDICE

Índice.....	1
Abreviaturas.....	3
1. Introducción	5
2. Antecedentes	7
2.1 Medicina tradicional	7
2.2 Familia Verbenaceae	7
2.3 El género <i>Lippia</i>	8
2.4 Composición química del genero <i>Lippia</i>	8
2.5 Especie <i>Lippia graveolens</i> H. B. K.	9
2.6 Usos de <i>Lippia graveolens</i> H. B. K.	11
2.7 Flavonoides	11
2.8 Biosíntesis de flavonoides	13
2.9 Clases de flavonoides.....	16
2.9.1 Flavanonas y Dihidroflavonoles.....	16
2.9.2 Flavonas y Flavonoles	17
2.9.3 Isoflavonas.....	18
2.9.4 Chalconas y Catequinas.....	19
2.9.5 Antocianidinas.....	20
2.10 Propiedades biológicas de flavonoides.....	21
3. Objetivo.....	27

4. Parte experimental.....	28
4.1 Material y equipo.....	28
4.2 Material vegetal.....	28
4.3 Extracción del material vegetal.....	29
4.4 Aislamiento y purificación.....	30
4.5 Reacciones.....	41
4.6 Pruebas biológicas.....	42
4.6.1 Actividad antiinflamatoria.....	42
4.6.2 Actividad antioxidante.....	43
5. Resultados y Discusión.....	48
5.1 Elucidación estructural de los compuestos aislados.....	48
5.2 Pruebas biológicas.....	73
5.2.1 Actividad antiinflamatoia.....	73
5.2.2 Actividad antioxidante.....	78
6. Conclusiones.....	86
7. Bibliografía.....	88
Anexo I	
Espectroscopia.....	92

Abreviaturas

CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
COSY	Espectroscopía de correlación homonuclear (Correlated Spectroscopy)
δ	desplazamiento químico
d	doblete
dd	doble de doble
ddd	doble de doble de doble
DC	Dicroísmo circular
DEPT	Aumento sin distorsión de la transferencia de polarización (Distortionless Enhancement of Polarization Transfer)
DO	Densidad óptica
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
ELISA	Ensayo con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
EM-FAB	Espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos
EM-IE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
HMBC	Correlación heteronuclear de enlaces múltiples ($^2\text{JC-H}$, $^3\text{JC-H}$) (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)
HSQC	Correlación heteronuclear cuántica simple ($^1\text{JC-H}$) (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria cincuenta
IR	Espectroscopía de Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
m	multiplete
m/z	relación masa carga
M ⁺	Ión molecular
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
s	singulete
t	triplete

td	tripleto de doblete
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TBA	ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
TNF- ∞	Factor de necrosis tumoral alfa
TPA	acetato 12-O-tetradecanoilforbol

1. INTRODUCCIÓN

El estudio de la medicina tradicional ha sido y seguirá siendo una herramienta muy útil e importante en la búsqueda de compuestos activos presentes en la naturaleza, ya que estos estudios asociados con técnicas de separación, purificación y elucidación estructural, así como con ensayos de actividad biológica y rigurosos estudios tanto farmacológicos como clínicos, han permitido descubrir nuevos metabolitos con potencial terapéutico.

Por otro lado, el conocimiento empírico desarrollado por el hombre a través de los siglos le ha servido para seleccionar plantas que le resultan útiles por el tipo de metabolitos que poseen, tal es el caso del orégano, nombre con el que en México se conoce a *Lippia graveolens* (familia Verbenaceae). Esta planta, cuyo uso principal es el de condimento debido a su extraordinario poder saborizante, se usa en la preparación de diversos alimentos. El orégano también es empleado en la medicina tradicional para el tratamiento de diferentes padecimientos, principalmente gastrointestinales y respiratorios.

Aunque con anterioridad se han realizado algunos estudios tendientes a establecer la composición química de *Lippia graveolens*, dichos estudios son parciales. En la mayoría de ellos se describe la composición de los aceites esenciales de la especie, así como las propiedades biológicas que éstos poseen. Sin embargo, aún falta analizar otros extractos de la planta para con ello ampliar el conocimiento que

se tiene de la composición química de esta especie que es consumida cotidianamente.

Así dentro del contexto antes mencionado se decidió realizar el análisis de la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico de partes aéreas de *Lippia graveolens*. Los resultados de este análisis se describen en el presente trabajo.

2. ANTECEDENTES

2.1 MEDICINA TRADICIONAL EN MÉXICO

Si se trata de especies medicinales o presuntamente medicinales, México es poseedor de la segunda o tercera flora medicinal del mundo. Esta flora en la actualidad incluye no sólo plantas nativas tales como aguacate, flor de manita, cempoalxochilt ó cempasúchil, zoapatle y yolloxóchitl, sino también plantas introducidas entre las que podemos mencionar ruda, hierbabuena, sábila, manzanilla y romero, las cuales desde hace siglos son amalgamadas y distribuidas por redes de mercados y tianguis en todo el territorio. ¹

Actualmente en nuestro país la medicina tradicional emplea una gran variedad de plantas para el tratamiento de diversas enfermedades. En México cerca de 20 millones de personas utilizan este tipo de medicina para el tratamiento de diferentes padecimientos. Esto debido a su disponibilidad y a que muchos de los medicamentos son caros o no se encuentran disponibles en las localidades. ^{2,3}

2.2 FAMILIA VERBENACEAE

Las especies de esta familia se distribuyen de manera universal, pero preferentemente en zonas tropicales y subtropicales; en América existen algunos géneros nativos de zonas templadas. En México se han registrado 26 géneros y 286 especies de Verbenáceas. Una de las especies más valiosas de esta familia es la teca (*Tectona grandis*), por ser fuente de madera resistente al agua. Existen

otras especies utilizadas como ornamentales, frutales y algunas que son empleadas como medicinas.⁴

2.3 GENERO *Lippia*

El género *Lippia* pertenece a la familia Verbenaceae; agrupa aproximadamente a 200 especies de hierbas, matorrales y pequeños árboles, distribuidas principalmente en Centro y Sudamérica y territorios tropicales de África. A este género pertenecen un gran número de especies importantes tanto económicamente como en medicina.^{5,6,7}

Debido a las diversas actividades biológicas que presentan muchas de las especies de *Lippia*, éstas son empleadas en la medicina tradicional, principalmente para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y respiratorias. En estudios realizados, estas especies han presentado diversos efectos tales como antimalárico, antiviral, sedativo, hipotensivo y antiinflamatorio. Además, las hojas de muchas de estas especies son empleadas como sazonador en la preparación de alimentos.^{7,8}

2.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GÉNERO *Lippia*

Las especies de *Lippia* contienen metabolitos de diferentes tipos. Se han aislado con una alta frecuencia los aceites esenciales, entre cuyos componentes se encuentran limoneno, β -cariofileno, *p*-cimeno, carvacrol, linalool, *p*-cimen-3-ol (timol) y humuleno, entre otros. En la especie *Lippia dulcis* se ha encontrado el

monoterpeno tóxico alcanfor. El alcanfor y el *p*-cimeno presentan una dosis oral letal para los humanos de 50 y 86 mg/Kg respectivamente. El alcanfor además está asociado a muerte neonatal debido a que puede cruzar la placenta. Otro tipo de compuestos aislados de las diferentes especies de *Lippia*, han sido triterpenos, iridoides, flavonoides y sesquiterpenos como la (+)-hernandulcina, compuesto más dulce que la sacarosa, y que ha sido aislado de la especie *Lippia dulcis*.^{5,7,9,10.}

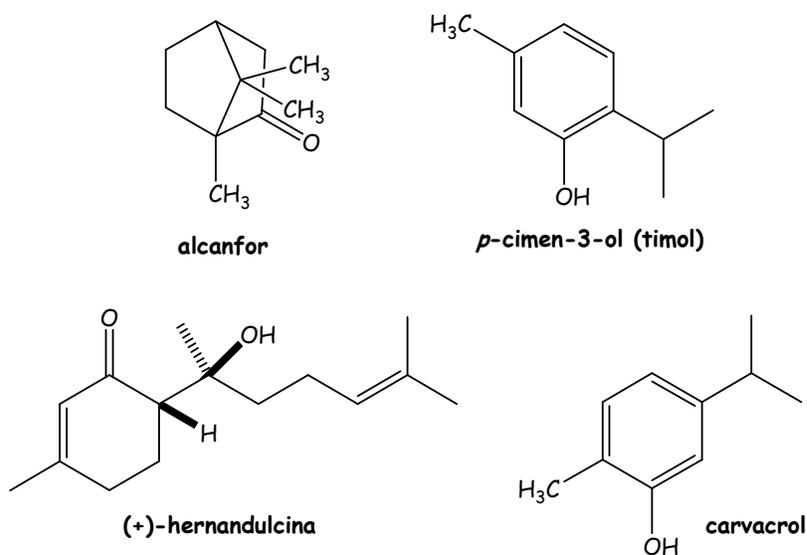


Figura 1. Compuestos aislados de algunas especies de *Lippia*.

2.5 ESPECIE *Lippia graveolens* H. B. K.

Conocida con el nombre común de orégano, su habitat se extiende desde el Sur de Estados Unidos hasta Colombia. En México se encuentra distribuida principalmente en los estados de Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guerrero, Hidalgo, México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luís Potosí, Sinaloa, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Zacatecas.^{11,12}

Lippia graveolens es un arbusto caducifolio que generalmente alcanza hasta 2.5 m de altura y 1.20 m de diámetro, sin embargo esto depende de las condiciones y edad de la planta. Sus tallos son ramificados y presentan una gran cantidad de hojas las cuales son la materia prima que se cosecha. Las flores que presenta son pequeñas, de color blanco. Su fruto es una cápsula y contiene las semillas que son del tamaño de la cabeza de un alfiler, de color café y de forma ovoide.¹³

Como resultado de estudios químicos previos de la especie se ha reportado la composición química y la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. Así se ha encontrado que los constituyentes volátiles mas abundantes en la especie son carvacrol, p-cimeno, timol y 1,8-cineol y los que se encuentran presentes en menor cantidad son el eugenol, limoneno y linalool, por mencionar algunos.^{9,14} Otro tipo de compuestos que han sido aislados de la planta son los flavonoides pinocembrina y naringenina, algunos iridoides y el carcinógeno lapachenol, el cual se asocia a la capacidad abortiva de la planta.^{11,15}

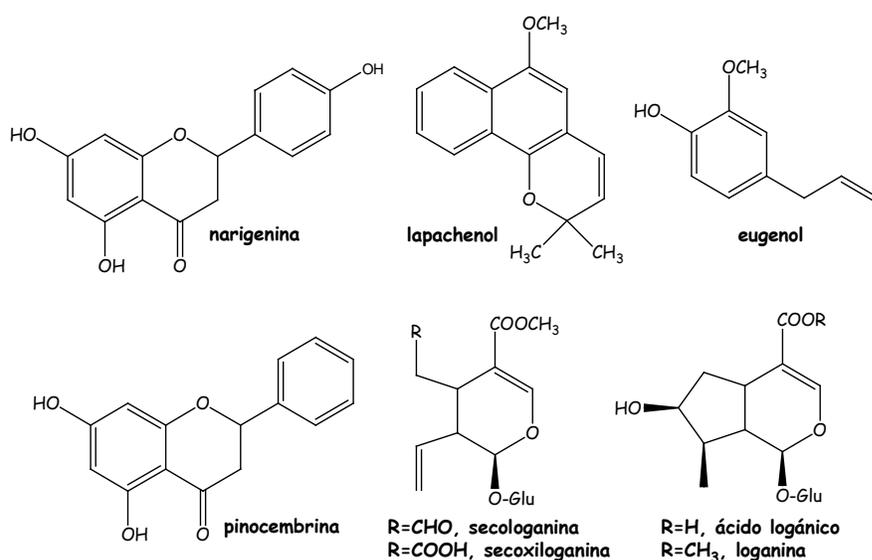


Figura 2. Algunos metabolitos aislados de *Lippia graveolens* HBK.

2.6 USOS DE *Lippia graveolens* H. B. K.

Por su intenso aroma y su sabor característicos, *L. graveolens* (orégano mexicano) es empleada como condimento en la preparación de alimentos tales como adobo y platillos típicos (pozole y barbacoa). En la industria alimentaria se añade a alimentos enlatados tales como atún, sardina, frijoles, aceitunas y aderezos, entre otros. En la medicina tradicional, las infusiones de *Lippia graveolens* son utilizadas particularmente para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales y respiratorios, aunque también se emplea como antiespasmódico (alivio de cólicos), antihelmítico (contra lombrices en mezclas con hierbabuena y tomillo), fungicida (acción contra *Candida albicans*), antiinflamatorio y abortivo.^{13,15} Estas actividades se asocian a los metabolitos secundarios presentes en la planta.

2.7 FLAVONOIDES

Este tipo de compuestos constituyen un amplio grupo de metabolitos secundarios derivados de subunidades provenientes de las rutas del ácido shikímico y del acetato malonato. Son compuestos distribuidos ampliamente en el reino vegetal encontrándose presentes en varios vegetales y frutas, así como en semillas, cereales y plantas medicinales. Más de 4000 flavonoides naturales han sido descubiertos e inevitablemente éstos son parte de nuestra dieta debido a que constituyen arriba del 2% del carbono fotosintetizado.¹⁶

En muchos casos los flavonoides son responsables de la coloración de las flores, frutos y a veces de las hojas, tal como ocurre con los flavonoides amarillos

(chalconas, auronas y flavonoles amarillos) y antocianósidos rojos, azules y violetas. Actúan como copigmentos cuando no son directamente visibles, como ocurre con las flavonas y flavonoles incoloros. Hay casos en los cuales los flavonoides absorben energía en el ultravioleta cercano y esta coloración sólo es percibida por los insectos que son atraídos hacia el néctar, de esta forma debido a los atractivos colores de estos compuestos actúan como signos visuales para la polinización, condición necesaria para la supervivencia de la planta.¹⁷

Otro tipo de roles que juegan los flavonoides en las plantas es el ser un sistema de defensa contra insectos perjudiciales, como ocurre con las catequinas y otros flavonoles, también actúan como catalizadores en la fase de luz de la fotosíntesis, atrapan ROS (especies reactivas de oxígeno) producidas por el sistema de transporte de electrones y protegen a la planta de la radiación UV del sol debido a que tienen la propiedad de absorber este tipo de radiación.¹⁸

Los flavonoides presentan además diversas actividades biológicas que incluyen actividad antiinflamatoria y antiviral, inhibición de la agregación plaquetaria en humanos, así como actividad anticancerígena y antioxidante.

Los flavonoides se caracterizan por poseer un esqueleto de 3 unidades $C_6-C_3-C_6$ que forman estructuras cíclicas. En muchos casos, este esqueleto presenta dos anillos aromáticos representados como A y B en chalconas y dihidrochalconas, y en el resto de los flavonoides se presenta un tercer anillo C. Este anillo surge como resultado de una ciclación de la chalcona con un hidroxilo en la posición 6'.¹⁶

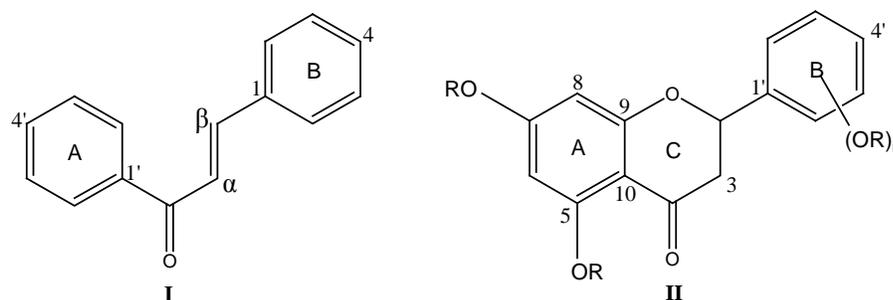


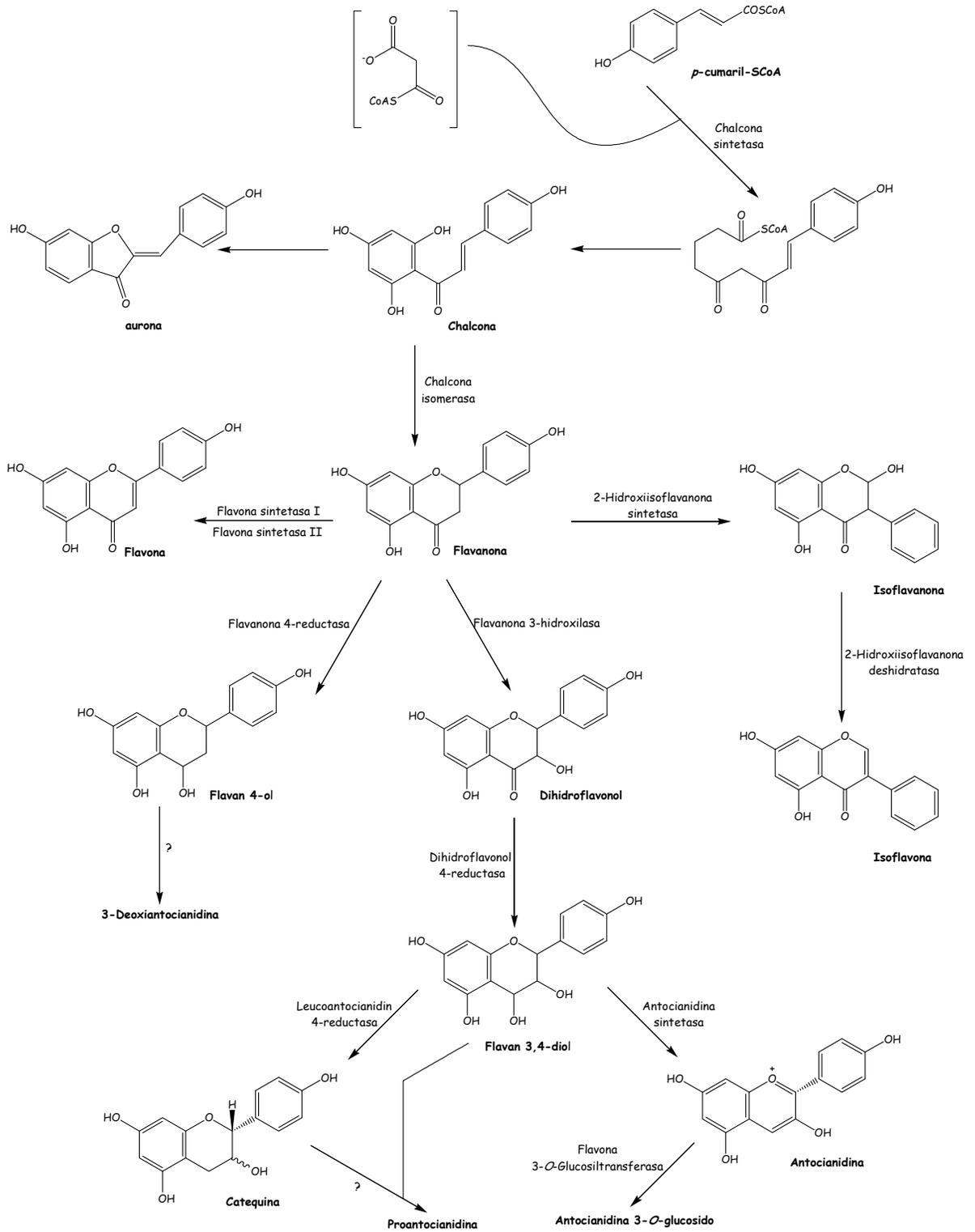
Figura 3. Esqueleto básico de los flavonoides, (I) Chalconas (II) Núcleo flavano.

El patrón de oxigenación más común del anillo A es el que se muestra en la Figura 3(II), mientras que en el anillo B la oxidación ocurre más frecuentemente en 4', en 3', 4' o en 3', 4', 5'. Aunque tanto A como B pueden presentar otros patrones de sustitución.¹⁹

2.8 BIOSÍNTESIS DE LOS FLAVONOIDES

Los flavonoides tienen un origen biosintético mixto, como se mencionó antes éstos provienen de dos rutas metabólicas. La primera de ellas, la ruta del ácido shikímico que emplea como metabolitos primarios, precursores el ácido pirúvico (bajo la forma de ácido fosfoenol pirúvico) y la eritrosa-4-fosfato, y que como primer paso involucra la síntesis del aminoácido esencial fenilalanina, precursor de la p-cumaril-SCoA originando así la subunidad ArC₃ (anillos C y B) del esqueleto de los flavonoides (Esquema 1). Posteriormente converge la ruta del acetato-malonato que proporciona las tres unidades de acetato que por condensación con la p-cumaril-SCoA, originan el esqueleto del flavonoide (formación del anillo A). Por tal motivo los flavonoides presentan como estructura básica el núcleo de flavano con 15 carbonos (Esquema 2).^{18,19,20}

ANTECEDENTES



Esquema 2. Biosíntesis de flavonoides.

2.9 CLASES DE FLAVONOIDES

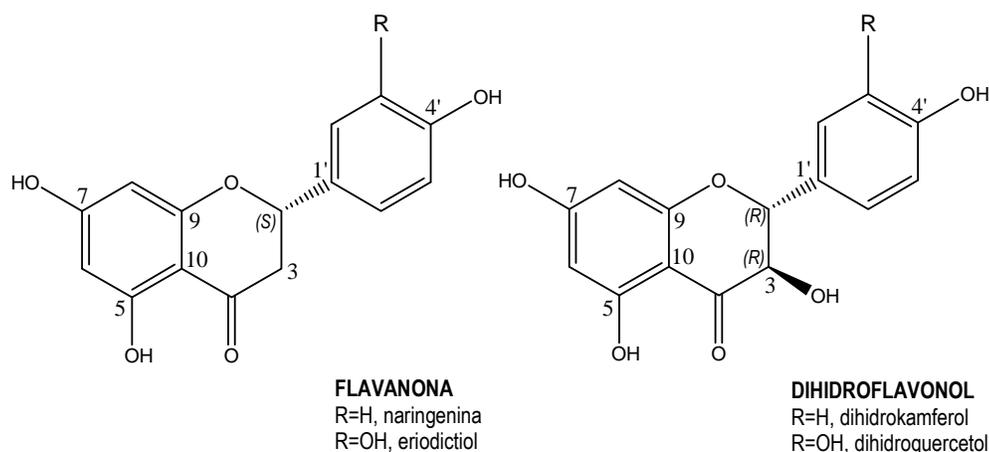
Dentro de este amplio grupo, los compuestos están clasificados con base en la presencia o ausencia del anillo C, así como en el grado de oxidación de los carbonos de este anillo. De esta manera se clasifica a los flavonoides en catequinas, chalconas, flavanonas, isoflavonas, flavan 3,4-dioles, flavonas, auronas, flavonoles y antocianinas. Los sustituyentes más frecuentes en los flavonoides son grupos hidroxilo, metoxilo y azúcares. Raramente se encuentran como sustituyentes grupos metilendioxi o aciloxi. Existen también pirano y furano flavonoides.^{17,20}

2.9.1 FLAVANONAS Y DIHIDROFLAVONOLES

La estructura básica de las flavanonas es el esqueleto 2-fenilbenzopiran-4-ona, mientras que los dihidroflavonoles poseen además un hidroxilo en C3. Ambos se caracterizan por la ausencia del doble enlace entre los carbonos 2 y 3 y la consecuente presencia de centros estereogénicos. En las flavanonas naturales el carbono 2 presenta normalmente una configuración 2S y en el caso de los dihidroflavonoles, a pesar de que teóricamente son posibles cuatro isómeros, la casi totalidad de ellos posee una configuración 2R, 3R, con los grupos fenilo e hidroxilo en relación *trans*.¹⁶

Las flavanonas pertenecen a un grupo de compuestos de gran interés debido a que son un paso importante en el metabolismo de otros flavonoides. Su precursor metabólico son las chalconas, en tanto que las flavonas, dihidroflavonoles e isoflavonas son biosintetizados a partir de ellas.

Las flavanonas se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas comestibles que expresan el metabolismo de los flavonoides, se han observado con mayor frecuencia en cítricos y frutas.¹⁵

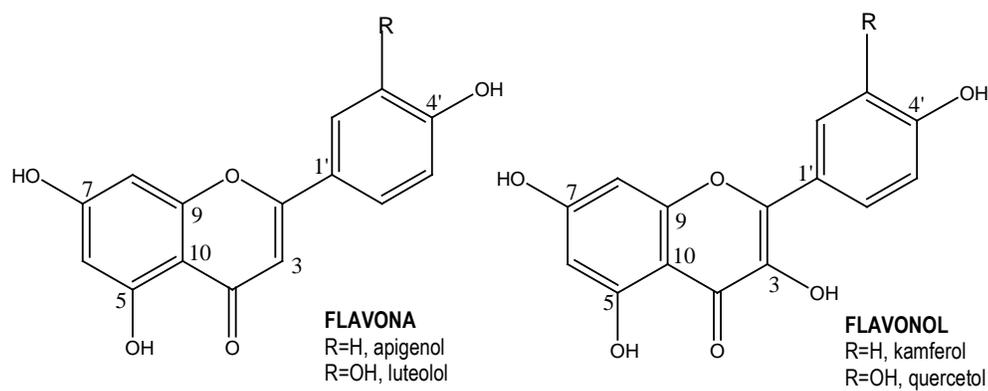


2.9.2 FLAVONAS Y FLAVONOLES

Las flavonas y los flavonoles presentan un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo central. Los flavonoles además de presentar este enlace tienen un grupo hidroxilo en el carbono 3. Tanto flavonas como flavonoles son constituyentes de plantas, particularmente de las hojas, pero también se llegan a encontrar en las cáscaras de frutas, cortezas y polen de las flores.¹⁸

En más del 90% de flavonas y flavonoles, el anillo A se encuentra sustituido por hidroxilos en C5 y C7, estos hidroxilos se pueden encontrar libres, eterificados, o pueden participar en un enlace heterosídico. Sin embargo, se pueden presentar otras sustituciones con hidroxilos libres o eterificados, metilación en los C6 y C8, y en algunas ocasiones implicación del C6 y/o del C8 en un

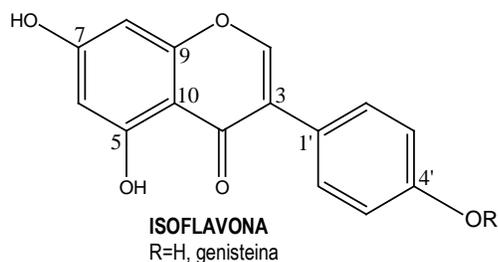
enlace carbono-carbono con un azúcar, como en la orientina, saponarina y saftósido. El anillo B en la mayoría de los casos presenta sustitución en C4', aunque también son comunes los casos en los que se encuentra sustituido en los carbonos 3' y 4' y con menor frecuencia los sustituidos en C3', C4' y C5'. Las posiciones 2'y 6' sólo se llegan a sustituir de forma excepcional. La distribución de flavonas y flavonoles así como de sus heterósidos es universal. Sin embargo, se ha observado que algunos esquemas de sustitución se encuentran restringidos a familias o grupos de familias, como es el caso de los flavonoides 6-O-sustituidos que frecuentemente se encuentran en las familias Lamiaceae, Rutaceae y Asteraceae.¹⁷



2.9.3 ISOFLAVONAS

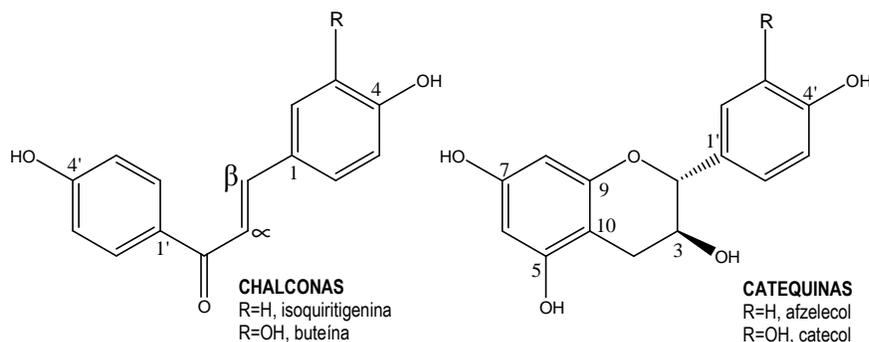
Su estructura base es el esqueleto 3-fenilcromano. Su distribución en el reino vegetal es limitada. Se encuentran más comúnmente en plantas de la familia Leguminosae. Metabólicamente provienen de las flavanonas, las que como primer paso se oxidan y se reagrupan, etapa que es catalizada por la 2-hidroxiisoflavanona sintetasa (IFS) en presencia de NADPH y de oxígeno

molecular, lo que conduce a la 2-hidroxiisoflavanona. Posteriormente se elimina una molécula de agua, mediante la acción de la 2-hidroxiisoflavanona deshidratasa, originando así la isoflavona.^{17,22,23}



2.9.4 CHALCONAS Y CATEQUINAS

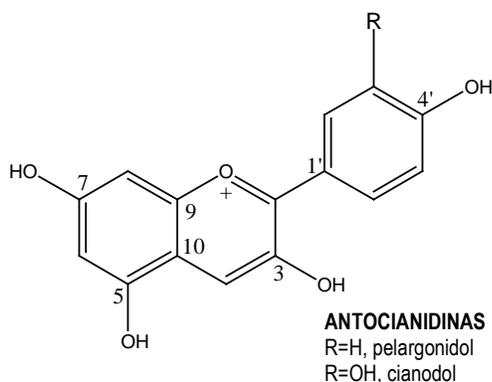
Las chalconas son un grupo poco común que no presentan el heterociclo central, sino una cadena de 3 carbonos en la que se inscribe una cetona α , β -insaturada. La pérdida de esta insaturación origina las dihidrochalconas. Las catequinas, también conocidas como flavan-3-oles, se forman por reducción del hidroxilo en el C4 de los flavan 3,4-dioles, reacción que es catalizada por la leucoantocianidina (flavan 3,4-*cis*-diol) reductasa (LAR) en presencia de NADPH. Las catequinas se encuentran principalmente en frutas como manzanas, peras, cerezas y té verde.^{19,23}



2.9.5 ANTOCIANIDINAS

Principales responsables de los colores rojo, azul y violeta de flores y frutas, la estructura básica de este tipo de compuestos es la catequin flavilio. El precursor directo de las antocianidinas son los flavan 3,4-dioles en una reacción catalizada por la enzima antocianidina sintetasa (ANS). Las antocianidinas presentan un grupo hidroxilo libre en C3, el cual no suele ser muy estable en condiciones inferiores al pH fisiológico, por lo que en muchos casos se llega a glicosilar por acción de una flavonoide 3-O-glucosiltransferasa (FGT) para formar el 3-O-glucósido de antocianidina, el cual es más estable.^{16,23}

Las antocianinas son de gran interés en la industria alimenticia como aditivos de alimentos y los atractivos colores que originan en los pétalos de las flores actúan como atractivos estimulantes para insectos polinizadores.¹⁶



2.10 PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE FLAVONOIDES

Durante algún tiempo los flavonoides recibieron el nombre de vitamina P, pero al no ser vitamínicos se les llamó entonces “factores vitamínicos P” ó “factores P”, esto debido a que pueden reducir la sintomatología de una hipovitaminosis C experimental en animales. Sin embargo, la utilidad de los flavonoides es muy controvertida; aunque la FDA (Food and Drug Administration) no les reconoce ninguna actividad,¹⁷ este tipo de compuestos presentan varias propiedades biológicas.

En plantas actúan como antimicrobianos, atrayentes visuales, fotorreceptores (protegiendo a las plantas de la nociva radiación UV) y como antialimentarios (presentan sabores desagradables por lo cual los animales los rechazan como alimento). Por otra parte, en ensayos de laboratorio se ha encontrado que poseen múltiples propiedades biológicas tales como antiinflamatoria, antioxidante, citotóxica, antimutagénica, antiviral, hepatoprotectora, antitrombótica, anticancerígena y antialérgica.^{18,24,25,26}

Actividad antioxidante

El flujo de electrones de un átomo a otro representa parte esencial de la vida aeróbica y de nuestro metabolismo, aunque el oxígeno es el último aceptor de electrones en este proceso para producir energía en forma de ATP. Sin embargo, el flujo de electrones se puede alterar, generándose un incremento de radicales libres conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS). En nuestro organismo las ROS juegan papeles tanto positivos como negativos. Entre los positivos, las

ROS están relacionadas con la regulación del crecimiento celular, la señalización intracelular, la síntesis de compuestos biológicamente importantes y con la producción de energía. Por otra parte entre las negativas está su capacidad de atacar a lípidos de la membrana celular, proteínas, enzimas, carbohidratos y DNA, en los que inducen oxidaciones que causan daños y modificaciones. Este daño oxidativo se asocia al envejecimiento así como a enfermedades degenerativas cardiovasculares, neurológicas y cáncer.^{18,26,27}

Los flavonoides pueden secuestrar estas ROS entre las que se encuentran superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), peróxilos (ROO^{\bullet}), alcoxilos (RO^{\bullet}), hidroxilos (HO^{\bullet}) y óxido nítrico (NO^{\bullet}), y también ROS que no son radicales tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ácido hipocloroso ($HOCl$).^{18,27}

Los mecanismos por los cuales los flavonoides actúan como antioxidantes incluyen: a) la inhibición de las enzimas involucradas en la formación de especies reactivas de oxígeno (xantina oxidasa, proteína kinasa C, lipoxigenasa, ciclooxigenasa, NADH oxidasa); b) la quelatación de elementos (figura 4(I)) como hierro o cobre libre, que tienen el potencial de aumentar la generación de radicales libres por medio de la reducción de peróxido de hidrógeno [$H_2O_2 + Fe^{2+}(Cu^+) \rightarrow HO^{\bullet} + OH^- + Fe^{3+}(Cu^{2+})$]; c) estabilización de ROS involucradas en procesos oxidativos al acomplejarse con ellas y d) estabilización de ROS por donación de un átomo de hidrógeno del flavonoide, lo que genera un radical fenoxi flavonoide

menos reactivo, el cual al volver a reaccionar con otro radical origina una quinona (Figura 4(II)).^{15,17,27}

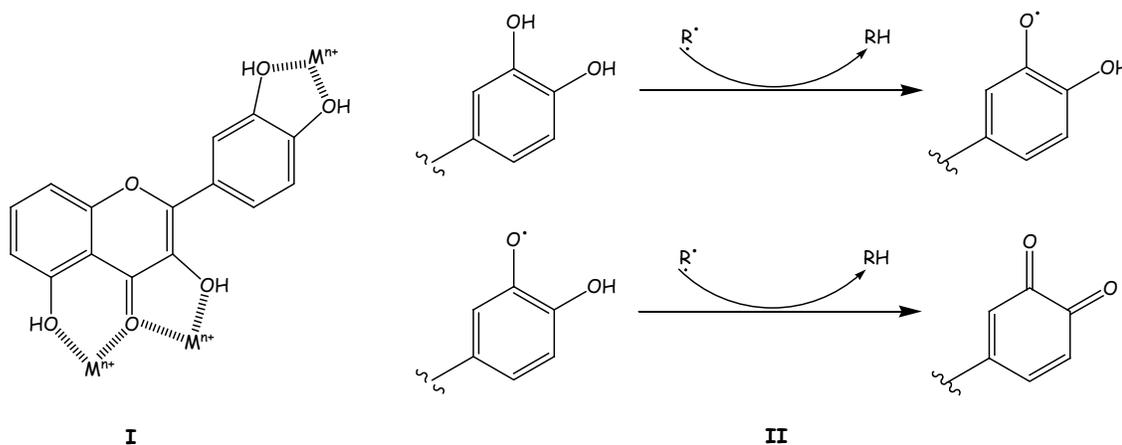


Figura 4: I) Quelatación con trazas de metales. II) Estabilización de radicales libres por flavonoides.

Existen varios estudios enfocados a establecer una relación estructura-actividad antioxidante de los flavonoides. En todos ellos se atribuye un papel preponderante a los grupos hidroxilo (OH) y se ha llegado a sugerir que la actividad antioxidante correlaciona con el número de grupos hidroxilo que contiene el flavonoide.²⁸ Sin embargo, otros estudios han demostrado que la actividad no depende tanto del número sino de la posición de esos grupos en el flavonoide.²⁹

Así, parece haber acuerdo en que grupos hidroxilo en las posiciones 3' y 4' del anillo B (catecol) son importantes para la actividad, lo mismo que un hidroxilo en el carbono 3 del anillo C. La existencia de 3 grupos hidroxilo en 3', 4' y 5' del anillo B (pirogallol) aumenta la actividad del flavonoide, mientras que la presencia de un

solo grupo hidroxilo la disminuye, esto tomando como referencia al catecol (Figura 5).^{17,29,30}

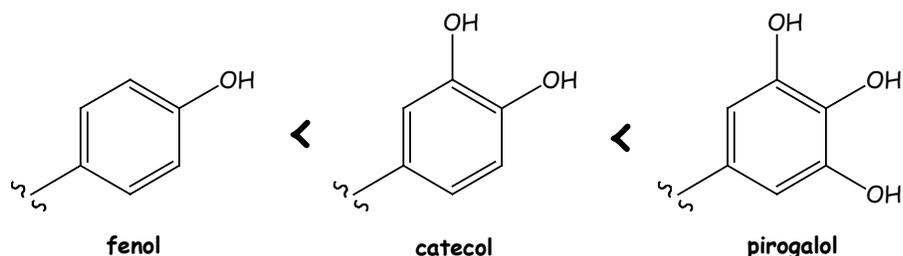


Figura 5: Capacidad antioxidante de los flavonoides con respecto al número de hidroxilos presentes en el anillo B.

La presencia de grupos hidroxilo en C5 y C7 del anillo A no es muy relevante, aunque en algunos casos benefician esta actividad. La alquilación o glicosilación de los grupos hidroxilo disminuye la actividad. Por otra parte, el doble enlace 2,3 incrementa la actividad, ya que confiere estabilidad al formarse el radical fenoxi flavonoide, este doble enlace se puede conjugar con la cetona en C4 contribuyendo así a la actividad, al ser responsable de la deslocalización electrónica del anillo B.^{17,30}

Actividad antiinflamatoria

La inflamación es una respuesta fisiológica que se desencadena por diversos estímulos (agentes infecciosos, interacciones antígeno-anticuerpo, lesiones térmicas o físicas). A nivel macroscópico, la respuesta se acompaña de signos clínicos como eritema, edema y dolor. El proceso de inflamación se divide en tres fases: inflamación aguda, una fase subaguda o tardía (respuesta inmunitaria) y una

inflamación crónica. Estas fases involucran varios metabolitos del ácido araquidónico, acciones enzimáticas de las ciclooxygenasas, acción de fagocitosis y liberación de diversos mediadores como interleucinas 1, 2 y 3, GM-CSF (factor estimulante de las colonias de granulocitos-macrófagos), TNF- ∞ (factor de necrosis tumoral alfa), interferones y PDGF (factor de crecimiento derivado de plaqueta). El proceso de inflamación también implica un aumento en el consumo de oxígeno y la liberación de radicales libres los cuales pueden llegar a ser tóxicos para las células vecinas, haciendo que la lesión tisular se extienda más, lo que conlleva a la degeneración y fibrosis tisular, asociada a la generación de cáncer.^{32,33,34}

Los flavonoides tienen la capacidad de disminuir la respuesta inflamatoria debido a que pueden actuar en las diferentes etapas involucradas en este proceso. Estudios en laboratorio relacionados con esta actividad, revelan que estos compuestos pueden inhibir la producción de TNF- ∞ *in vitro* e *in vivo*, y que la inhibición de este mediador se ve afectada por la posición de los grupos hidroxilo, ya que *in vitro* esta actividad se ve favorecida por flavonas con grupos hidroxilo en C5, C7 y C4' mientras que los grupos hidroxilo en C3, C3' y C5' no afectan esta actividad. *In vivo* la actividad de inhibición de TNF- ∞ se favorece al presentar el flavonoide hidroxilos en C5, C7 y C4', habiendo un incremento si la posición C3' está hidroxilada. *In vivo* el metabolismo de absorción de los flavonoides se ve afectado si existe el grupo OH en C3 y por la ausencia de la sustitución en 4'-OH, lo que trae como consecuencia la desaparición de la inhibición en la producción de TNF- ∞ .²⁵

Los flavonoides también manifiestan su actividad antiinflamatoria por la capacidad que tienen de actuar como antioxidantes, propiedad importante ya que inhiben la lipoxigenasa, afectando así el metabolismo del ácido araquidónico, lo que da como resultado la disminución en la biosíntesis de tromboxano A₂, inhibiendo así la movilización del Ca²⁺ intracelular. Otras enzimas que participan en el proceso de inflamación y que son inhibidas por los flavonoides son la fosfodiesterasa que tiene efecto sobre el AMPc (Adenosina Monofosfato cíclico), el GMPc (Guanosina Monofosfato cíclico) y la ciclooxigenasa, afectando también el metabolismo del ácido araquidónico.^{16,31}

3. OBJETIVO

El presente trabajo tiene como objetivo determinar en la medida de lo posible, la composición química de la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico de partes aéreas de *Lippia graveolens* H. B. K. (orégano mexicano), y determinar si los compuestos aislados poseen actividad antiinflamatoria, antioxidante y/o inhibitoria de la peroxidación de lípidos de cerebro de rata, para de esta forma contribuir al conocimiento químico y farmacológico de la especie.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Material y equipo

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no fueron corregidos. En las cromatografías en columna se utilizó como fase estacionaria sílica gel (Merck 60 G). Para las cromatografías en capa fina se usaron cromatofolios Alugram Sil G/UV₂₅₄ de 0.25 mm. Para las cromatografías en placa preparativa se emplearon placas Sil G-100 UV₂₅₄ de 1.0 mm. Se utilizó como revelador sulfato cérico al 3% en ácido sulfúrico 2N y/o lámpara de UV Spectroline modelo CX-20 a 254 y 366 nm. Los espectros de IR se determinaron en un espectrómetro Nicolet FTIR-Magna 750, mediante la técnica de pastilla. Las curvas de Dicroísmo Circular se obtuvieron en un espectropolarímetro Jasco Modelo J720. Los espectros de masas se obtuvieron utilizando las técnicas IE y FAB en los espectrómetros JEOL JMS-AX505HA y JEOL JMS-SX102A. Los espectros de RMN fueron determinados en los espectrómetros Varian XR-300 (300 MHz ¹H, 75 MHz ¹³C) y Varian Unity Plus 500 (500 MHz ¹H, 125 MHz ¹³C). Los desplazamientos químicos (δ) están dados en ppm respecto al tetrametilsilano (TMS) que se usó como referencia interna.

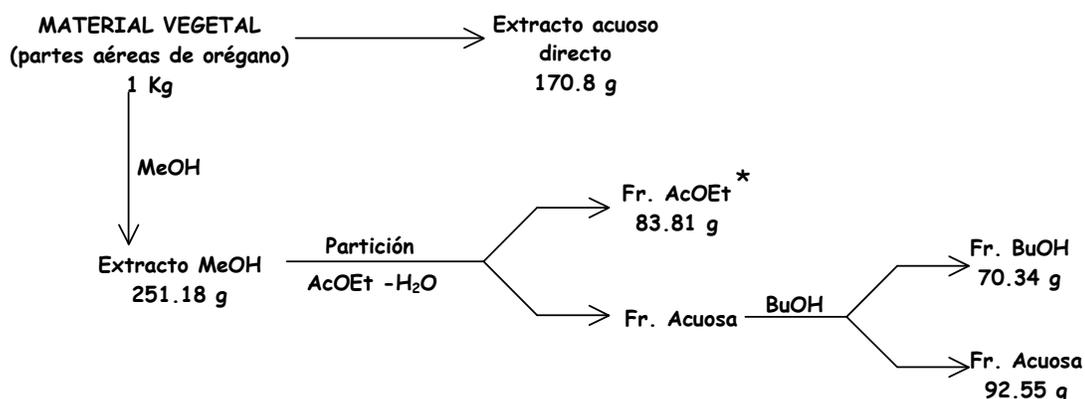
4.2 Material Vegetal

Las partes aéreas (hojas, flores y ramas pequeñas) de *Lippia graveolens* H. B. K. se adquirieron en un mercado de la Ciudad de México y fueron identificadas por la

Dra. Mahinda Martínez. Parte de este material se depositó en el Herbario de la Universidad Autónoma de Querétaro (QMEX, EMJ-12).

4.3 Extracción del material vegetal

1 kg de *L. graveolens* se extrajo sucesivamente con metanol y agua. Se obtuvieron 251.18 g de extracto metanólico y 170.80 g de extracto acuoso. Posteriormente se realizó una partición (AcOEt-H₂O) al extracto metanólico, obteniendo 83.81 g de extracto de AcOEt. La fracción acuosa se extrajo con BuOH con lo cual se obtuvieron 70.34 g de fracción de BuOH y 92.55 g de residuo acuoso.



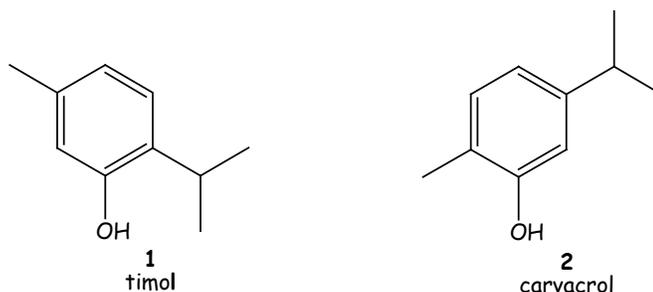
* Fracción que se trabajó.

Esquema 3. Extracción del Material Vegetal.

4.4 Aislamiento y purificación.

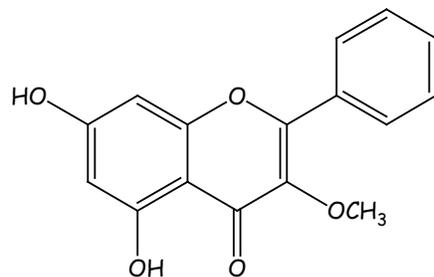
La fracción de acetato de etilo se adsorbió en celita y posteriormente se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente, colocándose luego en la parte superior de una columna de sílica gel G (columna A). La elusión se inició con hexano y posteriormente se aumentó la polaridad gradualmente con AcOEt hasta llegar a 100% de éste. Se recolectaron 132 fracciones, de acuerdo al siguiente orden: frs A1-A6 100:0; frs A7-A14 95:5; frs A15-A33 90:10; frs A34-A61 85:15; frs A62-A70 80:20; frs A71-A76 75:25; frs A77-A80 70:30; frs A81-A87 60:40; frs A88-A93 50:50; A94-A106 40:60; frs A107-A122 20:80; frs A123-A132 0:100. El desarrollo de la columna se siguió por cromatografía en capa fina (ccf), posteriormente fueron reunidas las fracciones que presentaban composición semejante.

Las fracciones A2-A7 se reunieron y se fraccionaron mediante CC, ésta se eluyó con mezclas de hexano-acetona de polaridad creciente. Se obtuvieron 41 fracciones (B1-B41). De las fracciones B1-B13 eluidas con hexano se obtuvo la mezcla de los compuestos **1** y **2** (43.4148 g). Mediante cromatografía de gases se cuantificó la proporción de cada uno de estos compuestos. El rendimiento del compuesto **1** fue de 4.7107 g (0.4711% del peso de la planta seca) mientras que del compuesto **2** fue de 38.7041 g (3.8704% del peso de la planta seca).



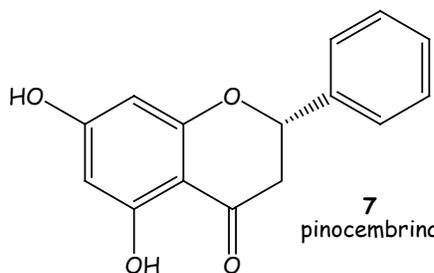
Las fracciones A16-A21 fueron adsorbidas en celita y una vez evaporado el disolvente, se realizó una CC (sílica gel Merk G) de estas fracciones. La columna se eluyó con mezclas de hexano-acetona de polaridad creciente. Se obtuvieron 121 fracciones de 125 ml (C1-C125). De las fracciones C23-C78 eluidas con hexano-acetona 95:5, se aislaron mediante cristalización 2.2693 g (0.2269% respecto al peso de la planta seca) del compuesto **7**. Además, de estas mismas fracciones también se aislaron 78.6 mg del compuesto **3** (0.0079% respecto al peso de la planta seca).

3-O-Metilgalangina (3): cristales amarillos; pf 286-287°C; IR (pastilla) $\nu_{\text{máx}}$: 3145, 1648, 1608, 1574, 1496, 1471 cm^{-1} ; RMN ^1H y ^{13}C tabla 2; EM-IE 70 eV, m/z : 284 $[\text{M}]^+$ (98), 283 $[\text{M}-\text{H}]^+$ (100), 266 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (15), 253 $[\text{M}-\text{OCH}_3]^+$ (16), 241 $[\text{C}_{14}\text{H}_9\text{O}_4]^+$ (11), 152 $[\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_4]^+$ (12), 124 $[\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_3]^+$ (12), 105 $[\text{C}_7\text{H}_5\text{O}]^+$ (9).



3
3-*O*-metilgalangina

Pinocembrina (7): cristales blanco-verdosos; pf 191-193°C; $[\alpha]_D^{20}$ -42.08° ((CH₃)₂CO, c 0.24); IR (pastilla) $\nu_{\text{máx}}$: 3093, 1633, 1603, 1583 cm⁻¹; RMN ¹H tabla 4 y RMN ¹³C tabla 5; EM-IE 70 eV, *m/z*: 256 [M]⁺ (100), 238 [M-H₂O]⁺ (7), 228 [M-CO]⁺, 213 [M-C₂H₃O]⁺ (3), 179 [M-C₆H₅]⁺ (57), 152 [C₇H₄O]⁺ (46), 124 [C₆H₄O₃]⁺, 104 [C₈H₈]⁺ (8), 103 [C₈H₇]⁺ (6), 91 [C₇H₇]⁺, 77 [C₆O₅]⁺.

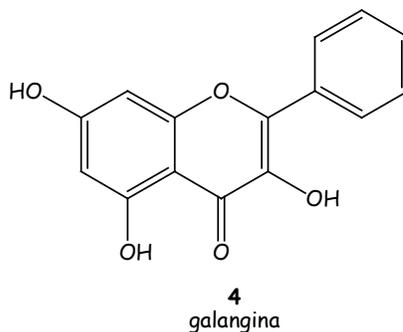


7
pinocembrina

De las fracciones C80-C112 eluidas con hexano-acetona 90:10, se aisló el compuesto **4** por medio de cristalización. Se obtuvieron 54.1 mg (0.0054% respecto al peso de la planta seca).

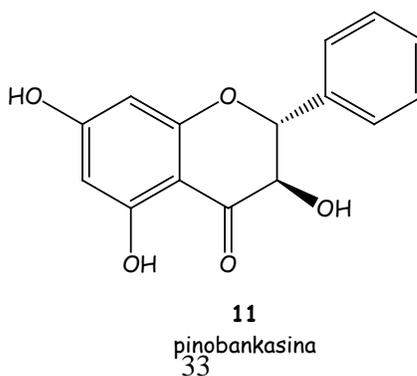
Galangina (4): cristales amarillos; pf 217-219°C; IR (pastilla) $\nu_{\text{máx}}$: 3556, 3506, 3312, 3163, 1660, 1633, 1609, 1565 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C tabla 2; EM-IE 70 eV, *m/z*:

270 $[M]^+$ (100), 242 $[M-CO]^+$ (9), 213 $[242-CHO]^+$ (7), 153 $[M-C_8H_5O]^+$ (6), 105 $[C_7H_5O]^+$ (7).



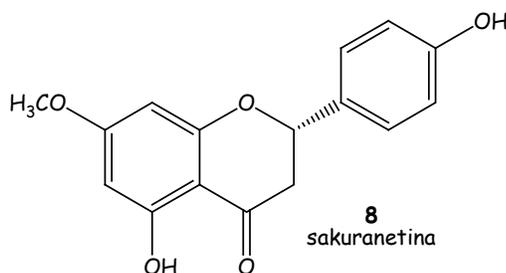
Mediante ccf de las fracciones A22-A31 se observó que éstas presentaban componentes en común, por ello se reunieron y se realizó una CC de la cual se obtuvieron 49 fracciones (D1-D49) de 125 ml cada una, éstas fueron eluidas con mezclas de hexano-acetona de polaridad creciente. De las fracciones D10-D25 eluidas con hexano-acetona 90:10 se aislaron 77.2 mg del compuesto **11** (0.0077% con respecto al peso seco de la planta).

Pinobankasina ó dihidrogalangina (11): cristales beige; pf 171-173°C; $[\alpha]_D^{20} +9.54^\circ$ (CH₃OH, c 0.22); IR (pastilla) $\nu_{m\acute{a}x}$: 3568, 3479, 3430, 1639, 1616, 1506, 1470 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C tabla 6; DC (CH₃OH, c 4.044x10⁻⁵ M) ΔE : 2.947 (206 nm), 13.155 (222 nm), -6.345 (290nm), 2.514 (326nm); EM-IE 70 eV, *m/z*: 272 $[M]^+$ (55), 243 $[M-COH]^+$ (69), 215 $[C_{13}H_{11}O_3]^+$ (5), 165 $[C_8H_5O_4]^+$, 153 $[C_7H_5O_4]^+$ (100), 120 $[C_8H_8O]^+$ (19).



Las aguas madres de las fracciones D10-D25 fueron sometidas a una nueva CC en las mismas condiciones que la columna anterior (columna D), obteniéndose 33 fracciones (D'1-D'33). De las fracciones D'7-D'19 eluidas con hexano-acetona 90:10, se aisló el compuesto **8**. El rendimiento que se obtuvo de éste fue de 335.9 mg (0.0336% del peso de la planta seca).

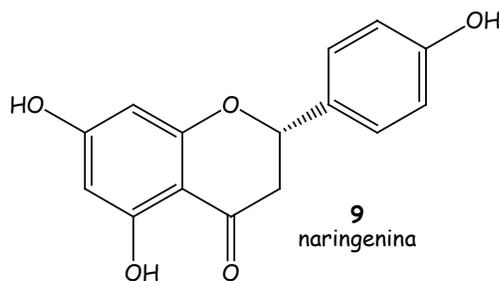
Sakuranetina (8): cristales blanco-amarillos; pf 145-147°C; $[\alpha]_D^{20}$ -19.83° (CH₃OH, c 0.116); IR (pastilla) $\nu_{\text{máx}}$: 3530, 3455, 3354, 3147, 1618, 1573, 1519 cm⁻¹; RMN ¹H tabla 4 y RMN ¹³C tabla 5; EM-IE 70 eV, *m/z*: 286 [M]⁺ (100), 269 [C₁₆H₁₃O₄]⁺ (7), 243 [C₁₄H₁₁O₄]⁺ (9), 193 [C₁₀H₉O₄]⁺ (29), 180 [C₉H₈O₄]⁺ (31), 167 [C₈H₇O₄]⁺ (83), 138 [C₇H₆O₃]⁺ (14), 120 [C₈H₈O]⁺ (29), 107 [C₇H₇O]⁺ (8).



De la columna principal (columna A), se reunieron las fracciones A32-A57 que fueron sometidas a CC de sílica gel G, la cual se eluyó con mezclas de hexano-acetona cuya polaridad fue incrementándose. De esta columna se obtuvieron 22 fracciones (E1-E22) de 250 ml. De las fracciones E6-E10 que se eluyeron con hexano-acetona 75:25, se obtuvo el compuesto **9** por medio de cristalización.

Posteriormente de las fracciones E11-E18 eluidas con la misma polaridad que las fracciones antes mencionadas, se obtuvo el compuesto **10**. Las aguas madres de las fracciones E6-E18 se reunieron y se sometieron a una nueva columna la cual se eluyó con mezclas de hexano-acetona, obteniéndose 42 fracciones (E'1-E'42), cada una de 125 ml. A partir de las fracciones E'6-E'19 eluidas con hexano-acetona 80:20 se obtuvo de nuevo el compuesto **9**, para dar un total de 2.0816 g (0.2082% del peso de la planta seca).

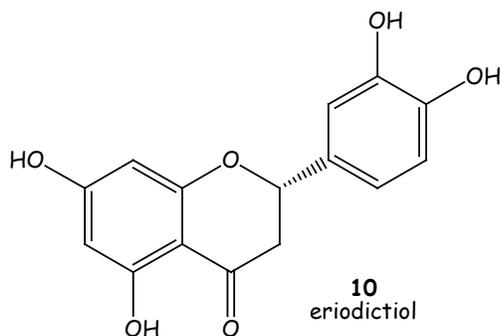
Naringenina (9): cristales blanco-verdosos; pf 256-258°C; $[\alpha]_D^{20}$ -27.78° (CH₃CH₂OH, c 0.162); IR (pastilla) $\nu_{\text{máx}}$: 3248, 3133, 1636, 1604, 1519, 1498 cm⁻¹; RMN ¹H tabla 4 y RMN ¹³C tabla 5; EM-IE 70 eV, *m/z*: 272 [M]⁺ (100), 255 [M-OH]⁺ (9), 229 [C₁₃H₉O₄]⁺ (4), 179 [C₉H₇O₄]⁺ (24), 166 [C₈H₆O₄]⁺ (25), 153 [C₇H₅O₄]⁺ (74), 124 [153-CHO]⁺ (9), 120 [C₈H₈O]⁺ (38), 107 [C₇H₇O]⁺ (12).



Se reunieron las fracciones A58-A72 y se preparó una CC. Esta nueva columna fue eluída con una mezcla de hexano-acetona 75:25. Se obtuvieron 51 fracciones (F1-F51) de 50 ml cada una. Se reunieron F16-F41 y de ellas se aisló por medio de cristalización el compuesto **5**. Las aguas madres de estas fracciones se sometieron a otra CC empleando como eluyente mezclas de CHCl₃-MeOH de polaridad

creciente. De esta columna se obtuvieron 55 fracciones (F'1-F'55) de 50 ml. De la fracción F'29 se aislaron 153 mg más del compuesto **5**, mientras que de las fracciones F'48-F'55 se obtuvo nuevamente el compuesto **10**, obteniendo de éste un total de 68.4 mg (0.0068% del peso de la planta seca).

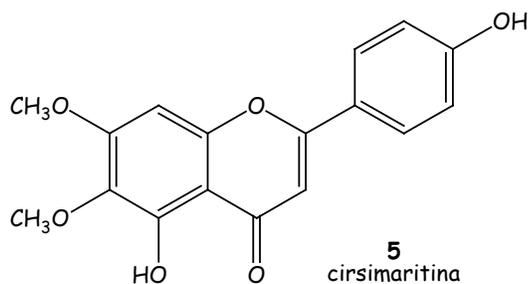
Eriodictiol (10): cristales beige; pf 265-267°C; $[\alpha]_D^{20} -25^\circ$ (CH₃OH, c 0.116); IR (pastilla) $\nu_{\text{máx}}$: 3363, 1637, 1605, 1452, 1475 cm⁻¹; RMN ¹H tabla 4 y RMN ¹³C tabla 5; EM-IE 70 eV, *m/z*: 288 [M]⁺ (6), 271 [C₁₅H₁₁O₅]⁺ (1), 179 [M-C₆H₅O₂]⁺ (2), 166 [C₈H₆O₄]⁺ (3), 153 [C₇H₅O₄]⁺ (5), 136 [C₈H₈O₂]⁺ (3), 123 [C₇H₇O₂]⁺ (2).



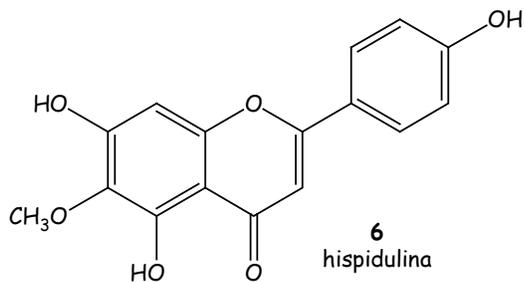
Las fracciones F'30-F'42 contenían un compuesto diferente a los aislados con anterioridad, éste fue purificado mediante cromatografía en placa preparativa de silica gel de 1.0 mm, eluida 3 veces con una mezcla de CHCl₃-MeOH 95:5. De la placa preparativa se aislaron mediante extracción con metanol, 15.9 mg (0.0016% del peso de la planta seca) del compuesto más polar **6** y 47 mg del compuesto **5**.

Así, la cantidad total obtenida del compuesto **5** fue de 190 mg (0.019% del peso de la planta seca).

Cirsimaritina (5): cristales amarillos; pf 270-272°C; IR (pastilla) $\nu_{\text{máx}}$: 3279, 1657, 1601, 1571 cm^{-1} ; RMN ^1H y ^{13}C tabla 3; EM-IE 70 eV, m/z : 314 $[\text{M}]^+$ (100), 299 $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ (77), 271 $[\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_5]^+$ (20), 181 $[\text{C}_8\text{H}_5\text{O}_5]^+$ (12), 153 $[\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_4]^+$ (20), 121 $[\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2]^+$ (2) .

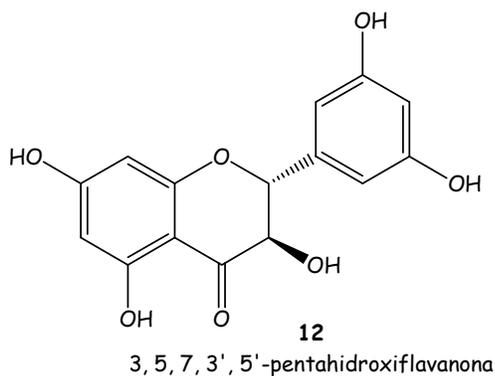


Hispidulina (6): cristales amarillos; pf 278-280°C; IR (pastilla) $\nu_{\text{máx}}$: 3071, 2818, 1656, 1603, 1575, 1489, 1455 cm^{-1} ; RMN ^1H y ^{13}C tabla 3; EM-IE 70 eV, m/z : 300 $[\text{M}]^+$ (100), 285 $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ (60), 282 $[\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{O}_5]^+$ (40), 257 $[\text{C}_{14}\text{H}_9\text{O}_5]^+$ (42), 167 $[\text{C}_7\text{H}_3\text{O}_5]^+$ (10), 139 $[\text{C}_6\text{H}_3\text{O}_4]^+$ (10).



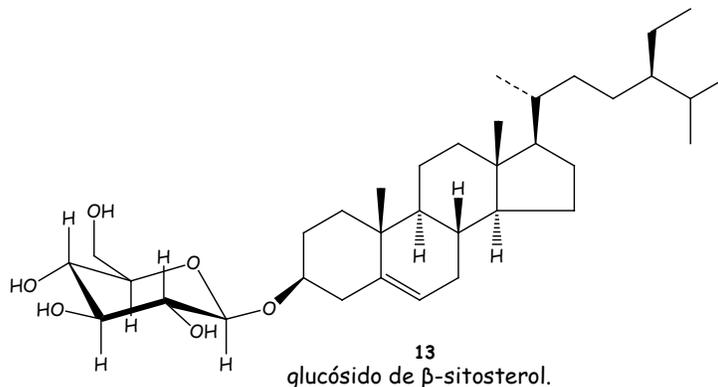
Las fracciones A73-A87 fueron reunidas y sometidas a CC, ésta fue eluida con mezclas de polaridad creciente de hexano-acetona. Se obtuvieron 57 fracciones (G1-G59) de 25 ml. Las fracciones G9-G57 eluidas con hexano-acetona (75:25→60:40) fueron reunidas, de éstas se obtuvieron 72.4 mg del compuesto **12** (0.0072% del peso de la planta seca).

3,5,7,3',5'-pentahidroxi flavanona (12): cristales beige; pf 235-239°C; $[\alpha]_D^{20} +8.13^\circ$ (CH₃OH, c 0.16); IR (pastilla) $\nu_{\text{máx}}$: 3548, 3395, 1642, 1588, 1518, 1453 cm⁻¹; RMN ¹H tabla y RMN ¹³C tabla 6; DC (CH₃OH, c 2.47x10⁻⁵ M) $\Delta\epsilon$: 1.617 (203 nm), -7.785 (208 nm), 9.02 (223 nm), -9.324 (296 nm), 2.375 (331 nm); EM-IE 70 eV, *m/z*: 304 [M]⁺ (51), 286 [M-H₂O]⁺, 275 [M-29]⁺ (68), 247 [C₁₃H₁₁O₅]⁺ (4), 165 [C₈H₅O₄]⁺ (21), 153 [C₇H₅O₄]⁺ (100), 152 [C₈H₈O₃]⁺ (28), 137 [C₇H₅O₃]⁺ (4), 123 [C₇H₇O₂]⁺ (30).



Al realizar una ccf de las fracciones A88-A105 se observó que tenían un compuesto en común. Dichas fracciones se decoloraron con carbón activado y

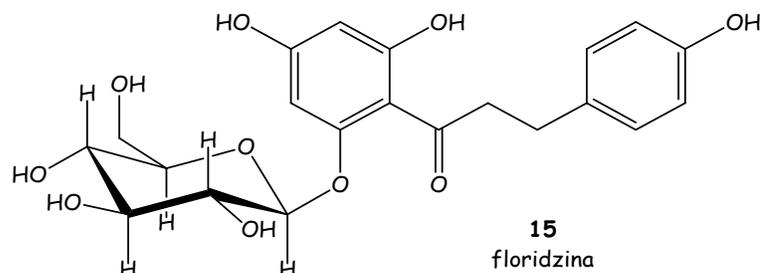
posteriormente se realizó una CC que se eluyó con $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ 95:5. Se obtuvieron 34 fracciones de 100 ml (H1-H34). De las fracciones H8-H17 se obtuvo el compuesto **13** que fue identificado como el glucósido de β -sitosterol.



Posteriormente se reunieron las fracciones A106-A109 para realizar una CC (sílica gel Merk G). De esta columna, eluida con mezclas de hexano-AcOEt de polaridad creciente, se obtuvieron 68 fracciones (I1-I68). De las fracciones I14-I20, eluidas con hexano-AcOEt 40:60, se obtuvo nuevamente el compuesto **13**, mientras que las fracciones I21- I43 fueron sometidas a otra CC empleando esta vez como mezcla eluyente $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ 92.5:7.5. De esta CC se obtuvieron 34 fracciones (I'1- I'34). Fueron reunidas las fracciones I'9- I'34 ya que presentaban un compuesto en común (**15**), que se aisló por medio de cristalización. Se obtuvieron 555.99 mg de **15** (0.0556 % del peso de la planta seca)

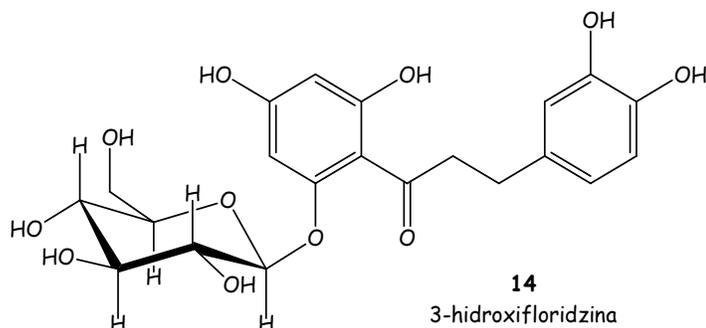
Floridzina (15): cristales verde claro; pf 128-131°C; $[\alpha]_D^{20}$ -49.00° (CH_3OH , c 0.202); IR (pastilla) $\nu_{\text{máx}}$: 3458, 1629, 1597, 1514, 1453 cm^{-1} ; RMN ^1H tabla 7 y RMN ^{13}C tabla 8; EM-FAB m/z : 437 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 329 $[\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{O}_9]$; EM-IE 70 eV, m/z : 328

$[C_{14}H_{16}O_9]^+$, 274 $[C_{15}H_{14}O_5]^+$ (24), 168 $[C_8H_8O_4]^+$ (4), 163 $[C_6H_{11}O_5]^+$ (2), 153 $[C_7H_5O_4]^+$ (44), 120 $[C_8H_8O]^+$ (23), 107 $[C_7H_7O]^+$ (29).



Se realizó una ccf de las fracciones más polares de la columna A, y se reunieron las fracciones A110-A124 para ser sometidas a CC, la cual se eluyó con $CHCl_3$ -MeOH 87.5:12.5. Se obtuvieron 43 fracciones de 250 ml cada una (J1-J43). De las fracciones menos polares, J1-J6, se aisló nuevamente el compuesto **13** con lo que se llegó a un total de 137.2 mg de este compuesto (0.0137% del peso de la planta seca). De las fracciones J14-J21 se aislaron 2.3507 g (0.2351% del peso de la planta seca) del compuesto **14**.

3-Hidroxyfloridzina (14): cristales café claro; pf 171-173°C; $[\alpha]_D^{20}$ -45.31° (CH_3OH , c 0.128); IR (pastilla) $\nu_{máx}$: 3376, 3278, 1626, 1608, 1521, 1460 cm^{-1} ; RMN 1H tabla 7 y RMN ^{13}C tabla 8; EM-FAB m/z : 453 $[M+H]^+$, 329 $[C_{14}H_{17}O_9]$; EM-IE 70 eV, m/z : 290 $[C_{15}H_{14}O_6]^+$ (65), 168 $[C_8H_8O_4]^+$ (27), 163 $[C_6H_{11}O_5]^+$ (4), 153 $[C_7H_5O_4]^+$ (100), 136 $[C_8H_8O_2]^+$ (39), 123 $[C_7H_7O_2]^+$ (33).



4.5 REACCIONES.

Acetilación del compuesto **14**. A 62 mg del compuesto **14** se agregaron 0.5 ml de piridina y 0.5 ml de anhídrido acético. La solución se dejó reaccionar durante 4 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó hielo y la mezcla se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se acidificó hasta pH 5-6 con solución de 5% HCl, se lavó con agua, y se llevó hasta pH 8-9 con solución saturada de NaHCO₃ y se lavó con agua. La fase orgánica se seco con Na₂SO₄ anhídrido y se concentró. Se obtuvo el compuesto **14a**. Este se purificó por medio de dos cromatografías en columna, la primera de ellas eluida con hexano-acetona 70:30 y la segunda eluida con CH₂Cl₂-MeOH 90:10. Al final se obtuvieron 16.3 mg de **14a**.

Acetilación del compuesto **15**. A 64 mg del compuesto **15** se agregaron 0.5 ml de piridina y 0.5 ml de anhídrido acético. La solución se dejó reaccionar durante 3 horas a temperatura ambiente. Para extraer el producto de la reacción se realizó el mismo procedimiento que en el caso anterior. Se obtuvo el producto **15a**, que se purificó mediante cromatografía en columna eluida con hexano-acetona 80:20, obteniéndose 20.2 mg del compuesto acetilado.

4.6. PRUEBAS BIOLÓGICAS

4.6.1 Actividad Antiinflamatoria. Modelo de edema inducido con TPA (acetato 12-O-tetradecanoilforbol) en oreja de ratón.^{35,36}

Para la realización de la prueba se emplearon ratones macho (n=5) de la cepa CD1 con un peso entre 25-30 g. Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico transparente a temperatura constante de 24°C, con fotoperiodos de 12/12 horas luz/oscuridad y con alimento y agua *ad libitum*. El tratamiento al que fueron sometidos los animales fue el siguiente:

Tratamiento de la oreja derecha: A los animales anestesiados por administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (3.5 mg/Kg), se les administró vía tópica 10 µl de solución etanólica de TPA (0.25 mg/Kg). Diez minutos después se aplicaron 0.1, 0.32, 1, 1.78 y 3.1 µmol de cada uno de los compuestos disueltos en 20 µl del vehículo (metanol). Al grupo control (C) sólo se le administró la solución etanólica de TPA (0.25 mg/Kg).

Tratamiento de la oreja izquierda (oreja control): mediante la misma vía de administración se aplican 10 µl de etanol y 10 minutos después, 20 µl de metanol.

Cuatro horas después de la aplicación del TPA, los animales fueron anestesiados con éter y sacrificados por dislocación cervical. Se tomó una muestra de 7 mm de

diámetro de ambas orejas. El incremento del peso de la muestra derecha con respecto a la muestra izquierda representa el edema.

La inhibición del edema se calcula con la formula:

$$\% \text{ de inhibición} = [(C-E) / C] 100$$

En donde:

C = Edema del grupo control (tratado con TPA).

E = Edema del grupo experimental (TPA más el compuesto).

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Dunnet de comparación múltiple para aislar los grupos con diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$).³⁷

4.6.2 Actividad antioxidante.

4.6.2.1 Reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).^{38,39,40}

Para la realización de esta prueba se emplearon placas de ELISA de 96 pozos. De cada uno de los compuestos a evaluar se prepararon soluciones de concentraciones 10 y 100 μM . Se tomaron 50 μl de cada una de las soluciones

preparadas y se depositaron por triplicado en los pozos de las placas de ELISA. Posteriormente se adicionaron 150 µl de una solución etanólica de DPPH 100 µM. Se preparó un control (C) el cual sólo contenía la solución etanólica de DPPH.

Las mezclas se protegieron de la luz y se agitaron durante 30 minutos a una temperatura de 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de agitación se leyó la densidad óptica (DO) de cada una de las mezclas a 515 nm, para lo cual se empleo el lector de ELISA (ELx808). La actividad de cada uno de los compuestos evaluados sobre la reducción del DPPH, se expresó como el porcentaje de reducción del radical libre, esta determinación se realizó empleando la siguiente formula:

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

En donde:

C = DO del control (DPPH 100 µM).

E = DO del experimento (mezcla: DPPH 100 µM + compuesto a evaluar).

4.6.2.2 Inhibición de la peroxidación de lípidos de cerebro de rata, inducida con FeSO₄. (TBARS)

Diseción y homogenizado del cerebro: Para extraer el cerebro, la rata fue anestesiada con éter y posteriormente se sacrificó por dislocación cervical. Una vez extraído el cerebro se colocó en solución salina fría al 0.9%. Posteriormente el cerebro se lavó con agua destilada para quitar los restos de sangre y se pesó. Se

le adicionaron 10 ml de buffer de fosfato (9.5 mM, pH=7.4) por cada gramo de cerebro (10 ml/g). La muestra se homogenizó durante 60 segundos y luego se

centrifugó a 3000 rpm por un periodo de 10 minutos, de este centrifugado se recuperó el sobrenadante.

Cuenta de proteínas empleando el método de Lowry y ajuste a la concentración deseada: Para la realización de la cuenta de proteínas se tomaron por duplicado 5 μ l del sobrenadante, colocándolos en placas de ELISA de 96 pozos se adicionaron 20 μ l de H₂O destilada y posteriormente 50 μ l de la siguiente mezcla.

49 mL de Na₂CO₃ 2% en NaOH 0.1 N

0.5 mL de tartrato de Na/K 2%

0.5 mL de CuSO₄ 1%

Una vez preparadas las muestras anteriores, éstas fueron incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se les adicionaron 25 μ l de reactivo de Folin disuelto en agua en una proporción (1:1). Las mezclas se incubaron nuevamente durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al término del periodo de incubación se midió la absorbancia a 540 nm. Para obtener el contenido de proteínas presentes en el homogenizado los valores de

absorbancia obtenidos fueron sustituidos en la fórmula que se muestra a continuación:

$$\text{Proteína } (\mu\text{g/mL}) = [(A_{540\text{nm}} - 0.05012) / 0.0028]40$$

Para ajustar el contenido de proteínas a 2.3529 mg/ml con PBS (9.5 mM, pH=7.4), se empleó la siguiente fórmula.

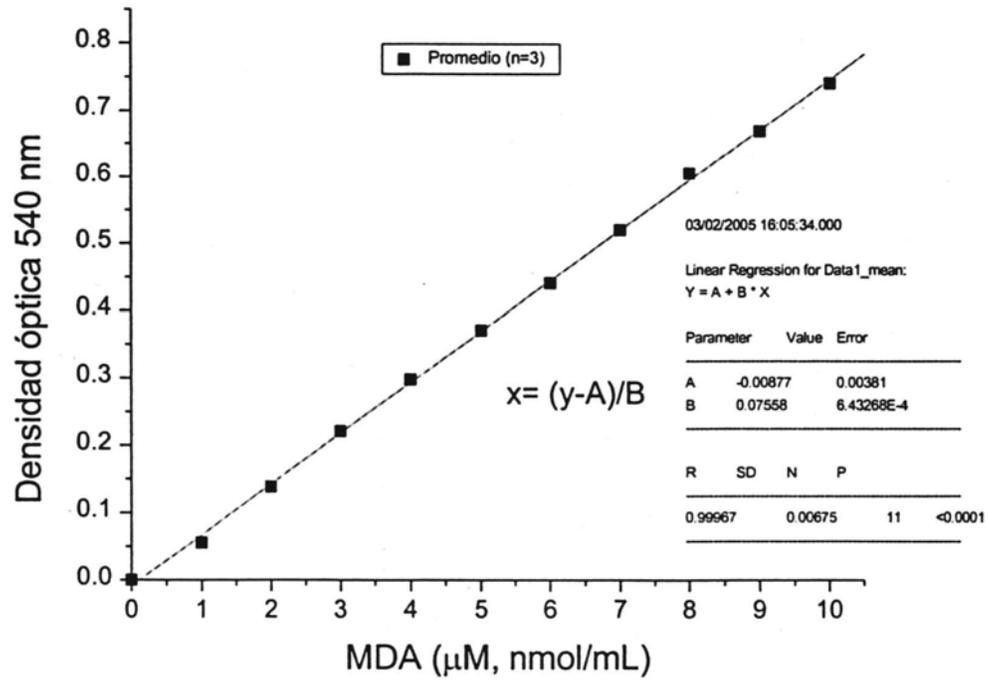
$$V_2 = (C_1V_1) / C_2$$

Inducción del estrés oxidativo con FeSO₄: Se colocaron 425 μL del sobrenadante (2.3529 mg/mL) en tubos eppendorf de 1.5 mL a los que se adicionaron 25 μL de cada una de las soluciones de los compuestos a evaluar a diferentes concentraciones (10 y 100 μM). Las muestras fueron incubadas 30 minutos a una temperatura de 37°C con agitación. Al término de este tiempo se agregaron 50 μL de FeSO₄ 100 μM (concentración final 10 μM). Las muestras se incubaron durante 60 minutos a 37°C con agitación. Una vez transcurrido el tiempo de incubación fueron adicionados 500 μL de reactivo TBA y nuevamente las muestras fueron incubadas, esta vez en baño de hielo durante 10 minutos. Después se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 minutos, a temperatura ambiente y se incubaron nuevamente 30 minutos en baño de agua a 90°C. Posteriormente se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente. Se tomaron por duplicado 200 μL de cada uno de los tubos, que se colocaron en placas de ELISA. Para obtener la concentración de TBARS se midió la absorbancia a 540 nm de cada una de las soluciones y los valores se interpolaron en la curva estándar de Malondialdehído.

$$\text{TBARS } (\mu\text{M}) = (A_{540\text{nm}} + 0.00877) / 0.07558$$

Reactivo TBA: mezcla 1:1 de TBA (ácido tiobarbitúrico) 1% en NaOH 0.05 N y TCA (ácido tricloroacético) 30%.

Curva estándar de malondialdehido (MDA)



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

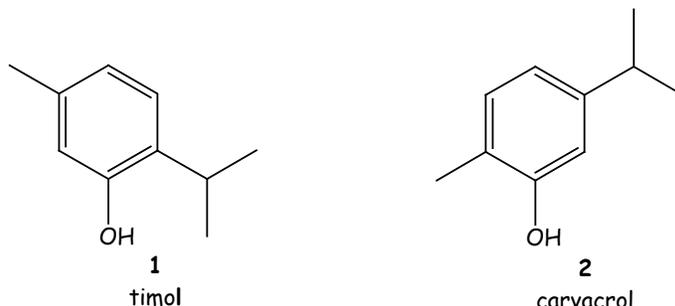
5.1 Elucidación estructural de los compuestos aislados.

Como resultado del estudio químico realizado a la fracción de AcOEt de partes aéreas de *Lippia graveolens* HBK, se aislaron 12 flavonoides. Entre estos se cuentan dos flavonoles, dos flavonas, cuatro flavanonas, dos dihidroflavonoles y dos dihidrochalconas. Se aisló también la mezcla de los monoterpenos carvacrol y timol y el glucósido de β -sitosterol. De los 12 flavonoides aislados sólo 2 han sido descritos con anterioridad como componentes de esta especie (pinocembrina y naringenina).¹⁴ En la tabla 1 se presentan los rendimientos de cada uno de los compuestos aislados.

Tabla 1. Rendimiento de los compuestos aislados.

	Compuesto	Rendimiento
1	Timol	4.7107 g
2	Carvacrol	38.7041 g
3	3-O-Metilgalangina	0.0786 g
4	Galangina	0.0541 g
5	Cirsimaritina	0.1900 g
6	Hispidulina	0.0159 g
7	Pinocembrina	2.2693 g
8	Sakuranetina	0.3359 g
9	Naringenina	2.0816 g
10	Eriodictiol	0.0684 g
11	Pinobankasina	0.0772 g
12	3,5,7,3',5'- Pentahidroxiflavanona	0.0724 g
13	Glucósido de β - sitosterol	0.1372 g
14	3-Hidroxifloridzina	2.3507 g
15	Floridzina	0.5599 g

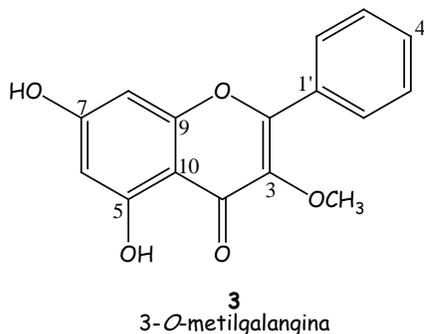
La mezcla de timol (**1**) y carvacrol (**2**) se aisló de las fracciones menos polares del extracto analizado. Los compuestos fueron identificados mediante el análisis de sus datos de RMN ^1H y ^{13}C . El carvacrol (**2**) fue el compuesto más abundante de los aislados en este estudio.



Flavonoles.

El compuesto **3**, se aisló en forma de cristales de color amarillo. Su espectro masas presento un ión molecular m/z 284, el cual es congruente con la fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$. Su espectro de RMN ^1H (espectro 1) muestra 2 dobletes en δ 6.21 y 6.45 cuya constante de acoplamiento (1.6 Hz) indica una conectividad meta, por lo que se atribuye respectivamente a los protones 6 y 8 del anillo A de un flavonoide sustituido en 5 y 7 por grupos hidroxilo (δ 12.56, 5-OH, δ 10.91, 7-OH). La existencia de un anillo B no sustituido se dedujo de las señales en δ 7.57 (m, 3H) y δ 8.00 (m, 2H). La primera asignada a los protones 3', 4' y 5' y la segunda a H2' y H6'. El desplazamiento químico de la señal de H2' y H6', así como la señal para un grupo metoxilo (δ 3.80 s, 3H) y el desplazamiento de la señal de C2 (δ 155.2) en el espectro de RMN ^{13}C son consistentes con la existencia de un grupo metoxilo en

C3. De este modo se determinó que la estructura del compuesto **3** corresponde a la 5,7-dihidroxi-3-metoxiflavona ó 3-O-metilgalangina, compuesto ya descrito en la literatura.⁴¹ La comparación de los datos espectroscópicos de **3** (tabla 2) con los reportados,⁴² confirman la estructura propuesta. La 3-O-metilgalangina mostró una potente actividad hipolipidémica y antihiperlipidémica en ratones.⁴¹



El espectro de masas del compuesto **4** presenta un ión molecular m/z 270, del que deriva la fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_5$. Al analizar su espectro de RMN 1H (espectro 2), se encontró que es muy parecido al del compuesto **3**. En él se observan dos multipletes en la región de los aromáticos correspondientes a los 5 hidrógenos del anillo B (Tabla 2), así como los dobletes de H6 (δ 6.31, $J=2$ Hz) y de H8 (δ 6.46, $J=2$ Hz). No presenta señal para metoxilo y la señal de C2 en su espectro de ^{13}C , aparece en δ 144.6, lo que indica que hay un alcohol en C3. De acuerdo al análisis anterior el compuesto **4** fue identificado como el flavonol galangina (3,5,7-trihidroxi-3-metoxiflavona). Sus constantes físicas y espectroscópicas fueron consistentes con las descritas para galangina.⁴³ Este compuesto sólo difiere del compuesto anterior (**3**) por tener libre el hidroxilo en el carbono 3.

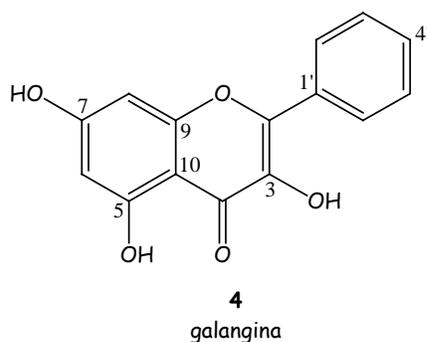


Tabla 2. Datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C de los compuestos 3 y 4.

^1H	3 ^a	4 ^b	^{13}C	3 ^c	4 ^d
2	-----	-----	2 C	155.2	144.6
3	-----	-----	3 C	138.8	136.3
6	6.21 d (1.6)	6.31 d (2)	4 C	178.1	175.3
8	6.45 d (1.6)	6.46 d (2)	5 C	161.3	160.6
2'	8.00 m	8.20 d (7)	6 CH	98.7	98.5
3'	7.57 m	7.35-7.55 m	7 C	164.4	164.1
4'	7.57 m	7.35-7.55 m	8 CH	93.8	93.5
5'	7.57 m	7.35-7.55 m	9 C	156.6	156.5
6'	8.00 m	8.20 d (7)	10 C	104.4	102.9
3-OH	-----	No observada	1' CH	131.0	130.6
3-OCH₃	3.80 s	-----	2' CH	128.7	127.1
5-OH	12.56 s	11.95 s	3' CH	128.2	127.9
7-OH	10.91 s	No observada	4' CH	130.0	129.3
			5' CH	128.2	127.9
			6' CH	128.7	127.1

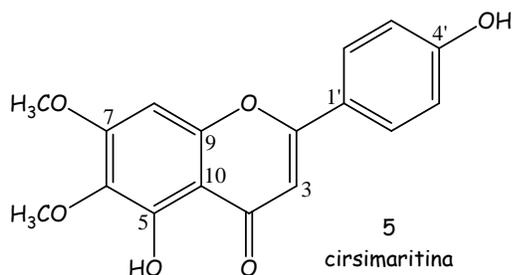
^aDeterminado en DMSO- d_6 a 300 MHz. ^bDeterminado en $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$ a 300 MHz.
^cDeterminado DMSO- d_6 a 75 MHz. ^dDeterminado en $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$ a 75 MHz.

Flavonas

Como ya se mencionó, dos de los compuestos aislados de *L. graveolens* H. B. K. son flavonas, éstas a diferencia de los flavonoles no presentan sustituyente oxigenado en el carbono 3.

La primer flavona (**5**) fue aislada como cristales de color amarillo con pf 270-272°C. Este compuesto presentó en su espectro de masas un ión molecular m/z 314, el cual es congruente con la fórmula molecular $C_{17}H_{14}O_6$. Su espectro de RMN 1H (espectro 3) muestra dos dobletes en δ 7.95 J=8.8 Hz (H2' y H6') y δ 6.92 J=7.8 (H3' y H5') característicos de un anillo B sustituido en C4'. Se observan también dos singuletes en δ 6.83 y δ 6.92 que se asignaron a los protones 3 y 8, respectivamente y dos señales para protones fenólicos en δ 12.91 y δ 10.35. La primera de estas señales se atribuye a un grupo hidroxilo en C5. Las señales en δ 3.91 y δ 3.72 indican que la molécula posee dos grupos metoxilo. En su espectro de RMN ^{13}C estas dos señales para metoxilos se observan en δ 56.3 y δ 59.9. De lo anterior se deduce que el compuesto **5** es una 5-hidroxiavona sustituida en 6, 7 y 4' con un hidroxilo y dos metoxilos. La posición de estos grupos se determinó al observar en el espectro NOESY la interacción entre el hidrógeno del carbono 8 con los hidrógenos del metoxilo en δ 3.91 lo que lo ubica en la posición 7. La abundancia relativa (77%) del fragmento $[M-CH_3]^+$ en el espectro de masas, permite proponer que el segundo grupo metoxilo está en el carbono 6, esto a pesar de que la interacción entre los hidrógenos de los metoxilos en el espectro NOESY no es clara. Con lo anterior la estructura de **5** se formuló como la de cirsimarina,

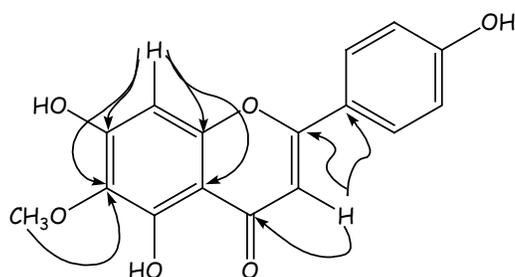
compuesto ya conocido, y cuyos datos físicos y espectroscópicos⁴⁴ son prácticamente idénticos a los del compuesto **5**.



El compuesto **6** sólo difiere del anterior (compuesto **5**) por poseer en C7 un grupo hidroxilo, por lo que se trata de la flavona hispidulina. Esto se dedujo de lo siguiente: en su espectro de masas presentó un ión molecular m/z 300, congruente con la fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_6$. En el espectro de RMN 1H (espectro 4) se observa un singlete a campo alto (δ 3.73) para el grupo metoxilo y un singlete en δ 13.05 atribuido al alcohol en C5, debido a que su desplazamiento indica que se encuentra quelatado con el carbonilo de C4. En el espectro de RMN 1H del compuesto **6**, se observa también en δ 6.92 (d, $J=9$ Hz, 2H) la señal correspondiente a los hidrógenos 3' y 5' que por estar orto al hidroxilo presente en 4' se desplazan a campo alto, mientras que la señal para H2' y H6' se encuentra a campo más bajo (δ 7.90, d, $J=9$ Hz, 2H).

En el espectro de RMN ^{13}C se observan catorce señales, nueve de las cuales corresponden a los carbonos no protonados. La señal del carbonilo de la cetona aparece en δ 181.9 y las de los carbonos 2', 6' y 3', 5' son dos señales intensas en

δ 128.3 y δ 115.9 respectivamente. La señal del grupo metoxilo se observa en δ 59.8. En el espectro HMBC (espectro 5) se observan las correlaciones de H3 con las señales correspondientes a los carbonos C4, C2 y C1'; así como las correlaciones de H8 con los carbonos C10, C9, C7 y C6, lo que permitió su asignación. Los protones del metoxilo correlacionan con C6 con lo que se establece la posición de este grupo.



Algunas correlaciones observadas en el espectro HMBC de la hispidulina (**6**).

Por otro lado, se hizo la comparación de los datos físicos y espectroscópicos reportados en la literatura para el compuestos **6** (hispidulina)⁴⁵ con los obtenidos en este estudio y se observó una estrecha similitud entre ellos.

TABLA 3. Datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C de los compuestos 5 y 6.

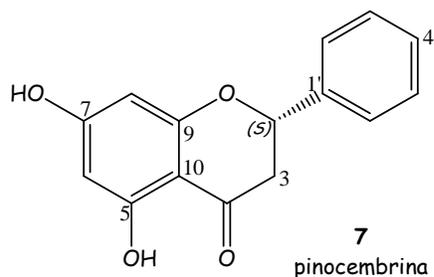
^1H	5 ^a	6 ^b	^{13}C	5 ^c	6 ^d
2	-----	-----	2 C	163.9	163.6
3	6.83 s	6.74 s	3 CH	102.6	102.3
6	-----	-----	4 C	182.1	181.9
8	6.92 s	6.55 s	5 C	152.5	152.7
2', 6'	7.95 d (8.8)	7.90 d (9)	6 C	131.8	131.5
3', 5'	6.92 d (7.8)	6.92 d (9)	7 C	158.5	158.1
5-OH	12.91 s	13.05 s	8 CH	91.4	94.3
6-OCH ₃	3.72 s	3.73 s	9 C	151.9	152.5
7-OCH ₃	3.91 s	-----	10 C	104.9	103.7
7-OH	-----	No observada	1' CH	121.0	121.2
4'-OH	10.35 s	No observada	2' CH	128.4	128.3
			3' CH	115.9	115.9
			4' C	161.2	161.2
			5' CH	115.9	115.9
			6' CH	128.4	128.3
			6-OCH ₃	56.3	59.8
			7-OCH ₃	59.9	-----

^aDeterminado en DMSO-d₆ a 300 MHz. ^bDeterminado DMSO-d₆ a 500 MHz. ^cDeterminado en DMSO-d₆ a 75 MHz. ^dDeterminado DMSO-d₆ a 125 MHz.

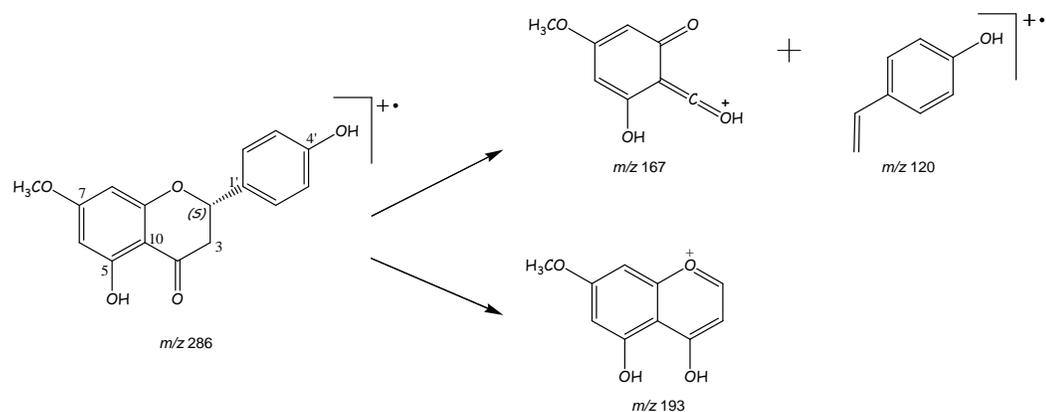
Flavanonas

Este estudio condujo al aislamiento de cuatro flavanonas. Este tipo de flavonoides se caracteriza por no presentar el doble enlace entre los carbonos 2 y 3.

La primera flavanona aislada fue el compuesto **7** (pinocembrina), que presentó en su espectro de masas el ión molecular m/z 256, consistente con la fórmula molecular $C_{15}H_{12}O_4$. Presenta, en su espectro de RMN ^{13}C , 15 señales que corresponden a metinos, carbonos no protonados y un metileno. La señal del metileno se encuentra a campo alto (δ 42.5), y es, junto con la señal de un metino base de oxígeno en δ 78.4 (C2), indicativa de una flavanona (Tabla 5). Por otra parte en el espectro RMN 1H (espectro 6) se observa un sistema ABX formado por las señales δ 3.05 (dd, $J=17.1, 12.8$ Hz), δ 2.79 (dd, $J=17.1, 3$ Hz) y δ 5.41 (dd, $J=12.8, 3$ Hz). La primera señal se atribuye a $H_{3\alpha}$, el cual muestra una constante de acoplamiento de 12.8 Hz que indica que esta en relación *trans* a H_2 , el cual origina la señal en δ 5.41. La señal en δ 2.79 se asigna a $H_{3\beta}$ porque su constante de acoplamiento con H_2 ($J=3$ Hz) indica una relación *cis*. La presencia de un singulete en δ 6.02 que integra para 2 protones se atribuye a los protones H_6 y H_8 de un anillo A 5, 7 disustituido y el multiplete entre δ 7.35 y 7.50 a los 5 protones del anillo B no sustituido. La configuración en C2 se determinó como *S* ya que **7** mostró una $[\alpha]_D^{20} -42.08^\circ$ y se ha establecido que las flavanonas levorrotatorias poseen esa configuración.⁴⁶ Tanto los datos espectroscópicos como los físicos obtenidos para este compuesto fueron comparados con los reportados en la literatura para pinocembrina, observándose una estrecha semejanza entre ellos.^{42,47,48}

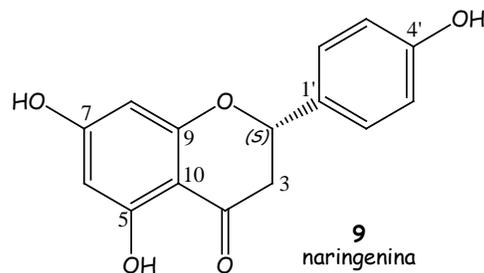


El compuesto **8** presentó un ión molecular de m/z 286 del que deriva la fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_5$. En el espectro RMN 1H (espectro 7) se observan el sistema ABX característico de las flavanonas δ 5.48 (dd, $J=13, 3$ Hz, H2), δ 3.33 (señal sobrepuesta $H_{3\infty}$); δ 2.71 (dd $J=17.3, 3$ Hz, $H_{3\beta}$). Los dobletes ($J = 2.3$ Hz) en δ 6.07 y δ 6.09 se atribuyen a los protones 6 y 8 de un anillo A 5, 7 disustituido. Se observa también la presencia de un metoxilo por el singulete en δ 3.77. En el espectro COSY (espectro 8), se ven las correlaciones entre H2 y $H_{3\beta}$ y entre H2 y $H_{3\infty}$; así como entre los dobletes (2H cada uno) en δ 7.31 y δ 6.78 que se atribuyen a los protones 2',6' y 3',5' respectivamente y que indican que el anillo B tiene un sustituyente en C4'. Los fragmentos m/z 193, 167 y 120 (esquema 4), observados en el espectro de masas (espectro 9), establecen que el metoxilo se encuentra en el anillo A. Éste se situó en C7 ya que en C5 existe un fenol cuya señal aparece en δ 12.11 (s). El análisis del espectro de RMN ^{13}C (tabla 5) confirma lo propuesto. Así esta flavanona se identificó como sakuranetina, la cual fue aislada como cristales de color blanco-amarillo con pf 145-147°C. La prueba final de su identidad se obtuvo por comparación de los datos espectroscópicos y físicos del compuesto **8** con los reportados en la literatura, que resultaron ser bastante similares.^{49,50,51}



Esquema 4. Fragmentación de la sakuranetina (**8**).

El compuesto **9** presentó en su espectro de masas el ión molecular m/z 272 correspondiente a la fórmula molecular $C_{15}H_{12}O_5$. Su espectro de RMN 1H (espectro 10) presenta los mismos sistemas que el compuesto anterior (**8**) esto es un sistema ABX por los protones del anillo C; un sistema AB para los protones de un anillo A 5, 7 disustituido y un sistema AA', BB' para el anillo B. Sin embargo no presenta señales para grupos metoxilo por lo que se identificó como naringenina. La configuración se determinó como S por la rotación óptica observada. Tanto los datos espectroscópicos como los físicos obtenidos para este compuesto fueron comparados con los reportados en la literatura, observándose gran semejanza entre ellos.^{49,52}



Con base en el análisis realizado al compuesto **10**, quedó establecido que se trataba de la flavanona eriodictiol, la cual fue aislada como cristales color beige con un *pf* 265-267°C. Su fórmula molecular, C₁₅H₁₂O₆ es consistente con el ión molecular *m/z* 288 observado en su espectro de masas. El espectro de RMN ¹H (espectro 11) muestra el sistema ABX de los protones del anillo C que presentan las flavanonas. En este caso el anillo B está sustituido en 3' y 4', lo que se deduce de las señales de H2' (δ 6.97, d, J=2 Hz), H5' (δ 6.88, d, J=8 Hz) y H6' (δ 6.79, dd, J=8, 2 Hz). El anillo A es 5, 7 disustituido como en **7**, **8** y **9**. Los cuatro sustituyentes en la molécula son grupos hidroxilo, ya que se observan señales para protones fenólicos en δ 12.06 (5-OH), δ 10.07 (7-OH) y δ 7.98 (3'-OH y 4'-OH). Al igual que en los casos anteriores los datos de RMN ¹H y ¹³C y las constantes físicas determinadas fueron comparados con los reportados en la literatura, siendo muy similares.^{42,53}

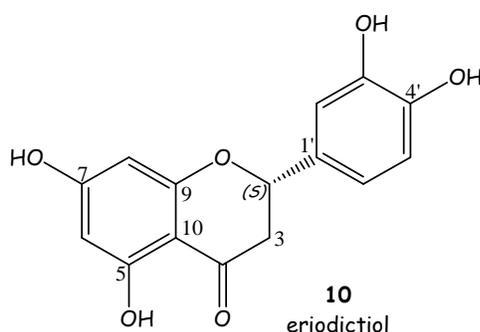


TABLA 4: Datos espectroscópicos de RMN ^1H de los compuestos 7, 8, 9 y 10.

^1H	7 ^a	8 ^b	9 ^b	10 ^c
2	5.41 dd (12.8, 3)	5.48 dd (13, 3)	5.42 dd (12.8, 3)	5.26 dd (13, 3)
3 α	3.05 dd (17.1, 12.8)	3.33 ^d	3.24 dd (17.3, 12.8)	3.05 dd (17, 13)
3 β	2.79 dd (17.1, 3)	2.71 dd (17.3, 3)	2.68 dd (17.3, 3)	2.72 (17, 3)
6	6.02 s	6.07 d (2.3)	5.87 s	5.98 d (2.5)
8	6.02 s	6.09 d (2.3)	5.87 s	5.99 d (2.5)
2'	7.35-7.50 m	7.31 d (8.5)	7.30 d (8.7)	6.97 d (2)
3'	7.35-7.50 m	6.78 d (8.5)	6.78 d (8.7)	-----
4'	7.35-7.50 m	-----	-----	-----
5'	7.35-7.50 m	6.78 d (8.5)	6.78 d (8.7)	6.88 d (8)
6'	7.35-7.50 m	7.31 d (8.5)	7.30 d (8.7)	6.79 dd (8, 2)
3'-OH	-----	-----	-----	7.98 s
4'-OH	-----	9.60 s	9.5 s	7.98 s
5-OH	12.04 s	12.11 s	12.1 s	12.06 s
7-OH	No observada	-----	10.75 s	10.07 s
7-OCH ₃	-----	3.77 s	-----	-----

^aDeterminado en CDCl₃/DMSO-d₆ a 300 MHz. ^bDeterminado DMSO-d₆ a 300 MHz.

^cDeterminado en CDCl₃/DMSO-d₆ a 500 MHz. ^dSeñal sobrepuesta.

TABLA 5. Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C de los compuestos 7, 8, 9 y 10.

^{13}C		7 ^a	8 ^b	9 ^b	10 ^c
2	CH	78.4	78.1	78.4	78.4
3	CH ₂	42.8	41.5	41.9	42.5
4	C	194.8	196.5	196.3	195.2
5	C	163.7	162.7	163.4	163.6
6	CH	96.3	94.1	95.7	96.0
7	C	166.6	166.9	166.6	166.4
8	CH	95.2	93.3	94.9	95.0
9	C	162.4	162.4	162.9	162.6
10	C	101.9	102.1	101.7	101.8
1'	C	138.1	128.2	128.8	129.6
2'	C	125.6	127.9	128.2	113.1
3'		128.2 (CH)	114.7 (CH)	115.1(CH)	144.4 (C)
4'		128.3 (CH)	157.3 (C)	157.7 (C)	144.8 (C)
5'	CH	128.3	114.7	115.1	114.9
6'	CH	125.6	127.9	128.2	117.6
7-OCH ₃		-----	55.4	-----	-----

^aDeterminado en CDCl₃/DMSO-d₆ a 75 MHz. ^bDeterminado DMSO-d₆ a 75 MHz.

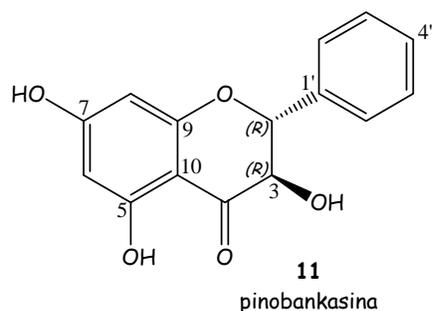
^cDeterminado en CDCl₃/DMSO-d₆ a 125 MHz.

DIHIDROFLAVONOLES

Del estudio químico de la especie *L. graveolens* se aislaron dos dihidroflavonoles. Este tipo de compuestos no presenta el doble enlace C2-C3 y posee un grupo hidroxilo en C3, con lo que se generan dos centros estereogénicos en la molécula, por lo que son posibles cuatro estereoisómeros.

El primer dihidroflavonol (compuesto **11**) se aisló como un sólido cristalino de color beige. En el espectro de masas presenta un ión molecular m/z 272 del cual deriva la fórmula molecular $C_{15}H_{12}O_5$. Su espectro de RMN ^{13}C presenta 15 señales de las cuales, una corresponde al carbono de una cetona, 12 a carbonos aromáticos y 2 a metinos base de oxígeno (δ 82.9 y δ 71.5). El anillo A en el compuesto **11** es 5,7-disustituido lo que se deduce de la presencia de dos dobletes ($J=2$ Hz) en δ 5.88 (H6) y δ 5.92 (H8) en el espectro de RMN 1H (espectro 12). Las señales que aparecen en δ 7.51 (m, 2H) y δ 7.40 (m, 3H), indican que el anillo B carece de sustituyentes. El espectro muestra un doblete en δ 5.17 ($J=11.3$ Hz) el cual, en el espectro COSY (espectro13), correlaciona con la señal doble de doble que aparece en δ 4.61 ($J=11.3, 6.2$ Hz), la que a su vez correlaciona con un doblete en δ 5.86 ($J=6.2$ Hz) que se atribuyó al protón de un alcohol. Estas señales se asignan en el orden que fueron citadas, a los protones H2, H3 y C3-OH de un dihidroflavonol. La configuración absoluta de C2 fue establecida como *R* por el efecto Cotton positivo de la transición $n \rightarrow \pi^*$ a 326 nm.^{46,54}

La configuración de C3 se propone como *R* por el valor de la constante de acoplamiento ($J_{2-3}=11.3$ Hz) que indica una relación *trans* entre H2 y H3, y en consecuencia una orientación β del hidroxilo en C3. Con lo anterior, al compuesto **11** se le identificó como pinobankasina, compuesto que ya ha sido descrito con anterioridad. Las asignaciones de carbono e hidrógeno mostradas en la tabla 6 se hicieron mediante el análisis de los espectros DEPT, COSY, HETCOR y FLOCK, los datos de RMN ^1H y ^{13}C fueron comparados con los reportados en la literatura para la pinobankasina.⁴²



El segundo dihidroflavonol aislado (**12**) presentó en su espectro de masas el ión molecular m/z 304, que resultó ser congruente con la fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_7$. El compuesto **12** se aisló en forma de cristales de color beige y presentó un pf 235-239°C. Tanto los datos de RMN ^1H (espectro 14) como de ^{13}C muestran que el compuesto **12** tiene la misma sustitución y los mismos grupos funcionales en los anillos A y C que la pinobankasina (**11**), (Tabla 6). La diferencia entre ellos reside en el anillo B, que en el caso del compuesto **12**, está sustituido en 3' y 5' como lo indican las señales en δ 6.73 (s, 2H) y δ 6.86 (s, 1H); la primera atribuida a H2' y H6' y la segunda a H4'.^{55,56,57}

La presencia de cuatro señales para protones fenólicos (Tabla 6) revela que los cuatro sustituyentes de los anillos aromáticos son hidroxilos. En la tabla 6 se muestran las señales de carbono e hidrógeno del compuesto **12**, mismas que fueron asignadas mediante el análisis de los espectros DEPT, COSY (espectro 15) y HSQC. En cuanto a la estereoquímica, al igual que en el caso anterior la $J_{2-3}=11$ Hz indica que H2 y H3 están en relación *trans*. Lo anterior y el efecto Cotton positivo para la transición $n \rightarrow \pi^*$ a 331 nm observada en la curva de dicroísmo circular (DC), establece una configuración *2R*, *3R* para **12**, compuesto ya conocido, pero del que no se han descrito sus datos espectroscópicos.

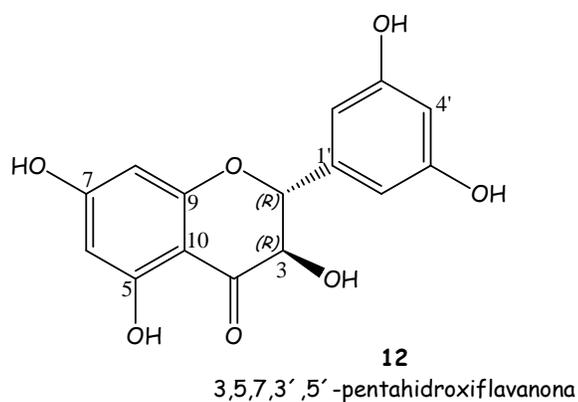


TABLA 6: Datos espectroscópicos de RMN ^1H de los compuestos 11 y 12.

^1H	11 ^a	12 ^b	^{13}C	11 ^a	12 ^b
2	5.17 d (11.3)	4-96 d (11)	2 CH	82.9	82.9
3	4.61 dd (11.3, 6.2)	4.49 dd (11, 6)	3 CH	71.5	71.5
6	5.88 d (2)	4.84 d (1.8)	4 C	197.6	197.6
8	5.92 d (2)	4.89 d (1.8)	5 C	163.3	162.5
2'	7.51 m	6.73 s	6 CH	96.1	94.9
3'	7.40 m	-----	7 C	166.8	166.7
4'	7.40 m	6.86 s	8 CH	95.1	95.9
5'	7.40 m	-----	9 C	162.4	163.2
6'	7.51m	6.73 s	10 C	100.5	100.4
3-OH	5.86 d (6.2)	5.75 d (6)	1' C	137.3	127.9
5-OH	11.89 s	11.89 s	2' CH	128.1	119.3 ^c
7-OH	10.87 s	10.81 s*	3'	128.2 (CH)	145.7 ^d (C)
3'-OH	-----	9.03 s*	4' CH	128.6	115.3
5'-OH	-----	8.97 s*	5'	128.2 (CH)	144.9 ^d (C)
			6' CH	128.1	115.0 ^c

^aDeterminado en DMSO-d₆ a 300 MHz. ^bDeterminado en DMSO-d₆ a 75 Mhz. ^{c, d} Dentro de la columna las señales con la misma letra pueden estar intercambiadas. *Señales intercambiables

DIHIDROCHALCONAS

De las fracciones más polares de la cromatografía, se aislaron 2 sólidos cristalinos identificados como glucósidos de dihidrochalconas. Su elucidación estructural se describe a continuación.

El compuesto **14**, se aisló como cristales color café claro, con p.f. 171-173°C. Presentó en su espectro de masas (EM-FAB) el ión cuasi molecular m/z 453 $[M+H]^+$ que es congruente con la fórmula molecular $C_{21}H_{24}O_{11}$. En el espectro de masas por impacto electrónico no se observa el ión molecular, pero si el fragmento m/z 290 $[C_{15}H_{14}O_6]^+$ que corresponde a la pérdida del fragmento $C_6H_{10}O_5$ proveniente de la glucopiranososa. Se observa también el fragmento m/z 163 $[C_6H_{11}O_5]^+$ correspondiente a la fragmentación de la glucopiranososa.

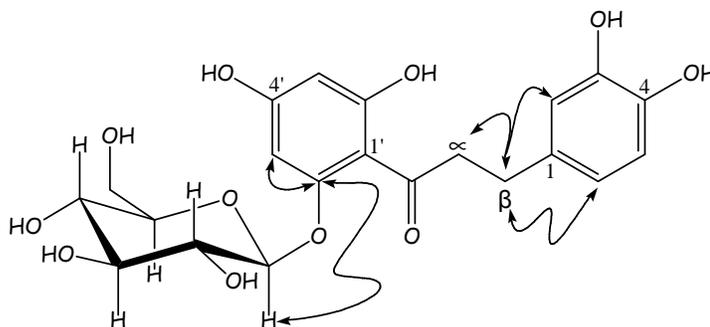
Su espectro de RMN 1H (espectro 16) muestra señales para dos anillos aromáticos y una cadena alifática de tres carbonos. Esto último se dedujo por la presencia de los multipletes para metilenos a campo alto en δ 3.29 ($1H_\infty$), 3.25 ($1H'_\infty$) y δ 2.71 ($2H_\beta$), y se corroboró en el espectro de RMN ^{13}C en el que se observan dos señales para metilenos; una en δ 44.8 asignado al C_∞ al carbonilo de cetona cuya señal aparece en δ 205.6; y otro en δ 29.1 atribuido al C_β a la cetona. Las señales observadas en el espectro RMN 1H , para H2 (δ 6.59, d, $J=2$ Hz), H5 (δ 6.58, d, $J=8$ Hz) y H6 (δ 6.47, dd, $J=8, 2$ Hz), permiten proponer que el anillo B se encuentra sustituido en C3 y C4, y dado que en el espectro se observan 8 señales para

protones de hidroxilo, 4 de ellos fenólicos (tabla 7), se propone que los sustituyentes en C3 y C4 son este tipo de grupos. El anillo B se encuentra unido a la cadena tricarbonada por el carbono β , ya que en el espectro HMBC (espectro 18), se observan correlaciones C-H a 3 enlaces de los hidrógenos 2 y 6 del anillo B con el C β . Por otro lado el carbono de la cetona se une al anillo A, el cual en el espectro de RMN ^1H muestra un sistema AB generado por los protones H3' y H5'. Presenta tres sustituyentes oxigenados, dos de ellos hidroxilos por las señales observadas en δ 10.55 para el hidroxilo en el C4' y δ 13.49 para el de C6'. El tercer sustituyente se identificó como un grupo glucopiranosilo debido a que en el espectro RMN ^{13}C se observan 6 señales que son características⁵⁸ de dicho grupo en δ 100.8 (C1''), 73.1 (C2''), δ 76.7 (C3''), δ 69.4 (C4''), δ 77.2 (C5'') y δ 60.5 (C6''). En el espectro HSQC (espectro 19) la señal del carbono anomérico (C1''), correlaciona con el doblete en δ 4.91, atribuido al protón anomérico (H1''), cuya constante de acoplamiento ($J=7.5$ Hz) indica una relación axial-axial entre los protones 1'' y 2'' de la glucopiranososa, por lo que se propone que se trata del anómero β . En el espectro COSY (espectro 20) se observa la interacción del protón anomérico y H2'', así como las interacciones entre los demás protones de este grupo.

Las asignaciones que se muestran en la tabla 7 para los protones de los hidroxilos de la β -glucopiranososa se dedujeron del análisis de los espectros tanto mono como bidimensionales. Estas señales al igual que las señales de los hidroxilos de los anillos A y B, desaparecen al adicionar D_2O a la muestra (espectro 17). La posición

de la β -glucopiranososa quedó establecida en el carbono 2' del anillo A, por las correlaciones del C2' con el protón anomérico y con H3', observadas en el espectro HMBC.

De esta forma quedó establecido que el compuesto **14** es la dihidrochalcona 3-hidroxisfloridzina. Sin embargo, para poder observar más claramente las señales del azúcar y con ello confirmar su naturaleza, el compuesto **14** fue acetilado. En el espectro de RMN ^1H (espectro 21) del octacetato obtenido (**14a**) se observa el desplazamiento a campo bajo de las señales de los protones 2'' a 6'' del azúcar, lo que permitió calcular sus constantes de acoplamiento y con ello establecer que el azúcar es efectivamente la β -glucopiranososa. Aunque cabe mencionar que en las señales de H1'', H2'', H3'' y H4'' de la β -glucopiranososa aparecen sobrepuestos multipletes de menor intensidad, los cuales se atribuyen a cambios conformacionales, ya que cuando el espectro se determinó en C_6D_6 (espectro 22), ya no se observan dichos multipletes.

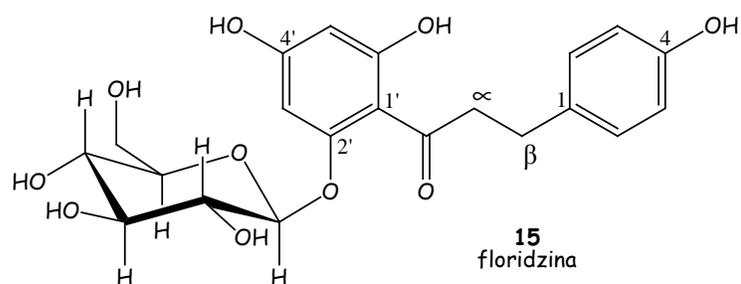


Algunas correlaciones observadas en el espectro HMBC de la 3-hidroxisfloridzina (**14**).

Finalmente, las similitudes de los datos físicos y espectroscópicos del compuesto **14** y los descritos para la 3-hidroxi-floridzina^{59,60} confirmaron su identidad.

El compuesto **15**, mostró en su espectro de masas EM-FAB el ión cuasimolecular m/z 437 $[M+H]^+$ consistente con la fórmula molecular $C_{21}H_{24}O_{10}$. En el espectro de masas EM IE el ión molecular no se observó, pero al igual que en **14**, aparece un pico m/z 274 $[C_{15}H_{14}O_5]^+$ correspondiente a la pérdida del fragmento $C_6H_{10}O_5$, que proviene de la glucopiranososa, y el fragmento m/z 163 $[C_6H_{11}O_5]^+$ también derivado de la glucopiranososa.

Los espectros de RMN 1H , ^{13}C , COSY Y HETCOR (espectros 23 - 26) muestran que el compuesto **15** sólo difiere del **14**, porque el anillo B muestra un sistema AA', BB' que indica un anillo aromático para-sustituido. El sustituyente en C4 es un grupo hidroxilo por la señal en δ 11.08 (s). Las asignaciones que se presentan en las tablas 7 y 8 para el compuesto **15** se obtuvieron del análisis de los espectros de RMN antes mencionados, con lo que se determinó que la estructura de **15** corresponde a la de un flavonoide previamente descrito (floridzina), cuyos datos físicos y espectroscópicos^{59,61} son muy similares a los de **15**, hecho que confirma la estructura propuesta.



Por otro lado, se obtuvo también el derivado acetilado de **15**. Este derivado (**15a**) cuyos datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C se muestran en las tablas 7 y 8, respectivamente, permiten corroborar la estructura propuesta para **15**. Al igual que en el compuesto **14a**, en el espectro de RMN ^1H (espectro 27) de **15a**, se observan multipletes de menor intensidad sobrepuestos con las señales de los hidrógenos 1'', 2'', 3'' y 4'' de la glucopiranosas.

Además de los monoterpenos y flavonoides ya descritos se aisló un compuesto (**13**) que mediante ccf con una muestra auténtica y por medio del análisis de sus datos de RMN ^1H y ^{13}C , fue identificado como el glucósido de β -sitosterol.

TABLA 7: Datos espectroscópicos de RMN ¹H de los compuestos 14, 15, 14a y 15a.

¹ H	14 ^a	15 ^b	14a ^c	15a ^d	14a ^e
∞	3.25 m	3.92 m	3.14 m	3.14 m	2.82-3.11 m
	3.29 m		3.00 m	3.00 m	
β	2.71 m	3.11 m	2.87 m	2.85-3.00 m	2.82-3.11 m
2	6.59 d (2)	7.32 d (8.3)	7.02 d (2)	7.25 d (8.5)	7.18 da (1.8)
3	-----	7.03 d (8.3)	-----	6.99 d (8.5)	-----
5	6.58 d (8)	7.03 d (8.3)	7.08 d (8.5)	6.99 d (8.5)	7.02 dd (8.4, 0.5)
6	6.47 dd (8, 2)	7.32 d (8.3)	7.14 dd (8.5, 2)	7.25 d (8.5)	6.94 dd (8.4, 1.8)
3'	6.11 d (2)	6.86 d (2)	6.80 d (2)	6.80 d (2)	6.96 d ^f (2)
5'	5.91 d (2)	6.55 d (2)	6.71 d (2)	6.71 d (2)	6.81 d ^f (2)
1''	4.91 d (7.5)	5.69 d (7.4)	5.01 d (8)**	5.02 d (8)**	4.46 d (7.8)
2''	3.25 m	4.20-4.43 m	5.25 m**	5.26 m**	5.40 dd (9.6, 7.8)
3''	3.25 m	4.20-4.43 m	5.25 m**	5.26 m**	5.30 dd (9.6, 9)
4''	3.18 td (9, 5)	4.20-4.43 m	5.13 t (10)**	5.13 t (10)**	5.17 dd (9, 9.9)
5''	3.29 m	3.92 m	3.88 ddd (10, 6, 2.5)	3.88 ddd (10, 5.5, 2.5)	3.14 ddd (9.9, 5.4, 2.4)
6''a	3.70 ddd (12, 5.5, 2)	4.20-4.43 m	4.25 dd (12, 6)	4.25 dd (12, 5.5)	4.13 dd (12.3, 5.4)
6''b	3.45 ddd (12, 5.5)	4.20-4.43 m	4.18 dd (12, 2.5)	4.18 dd (12, 2.5)	4.04 dd (12.3, 2.4)
3-OH	8.62 s*	-----	-----	-----	-----
4-OH	8.55 s*	11.08 s*	-----	-----	-----
4'-OH	10.55 s*	12.97 s*	-----	-----	-----
6'-OH	13.49 s*	14.49 s*	-----	-----	-----
2''-OH	5.26 d (5.5) *	-----	-----	-----	-----
3''-OH	5.12 d (4) *	-----	-----	-----	-----
4''-OH	5.03 d (5) *	-----	-----	-----	-----
6''-OH	4.59 t (5.5) *	-----	-----	-----	-----
3-OAc	-----	-----	2.26 s	-----	1.90, 1.81, 1.77, 1.76, 1.75, 1.69, 1.66, 1.65
4-OAc	-----	-----	2.28 s	2.28 s	
4'-OAc	-----	-----	2.28 s	2.28 s	
6'-OAc	-----	-----	2.07 s	2.07 s	
2''-OAc	-----	-----	2.00 s	2.00 s	
3''-OAc	-----	-----	2.01 s	2.01 s	
4''-OAc	-----	-----	2.04 s	2.04 s	
6''-OAc	-----	-----	2.09 s	2.09 s	

^aDeterminado en DMSO-d₆ a 500 MHz. ^bDeterminado en Py-d₅ a 300 MHz. ^cDeterminado en CDCl₃ a 500 MHz. ^dDeterminado en CDCl₃ a 300 MHz. ^eDeterminado en C₆D₆ a 300 MHz. ^fDentro de la columna las señales pueden estar intercambiadas. *Señales que desaparecen al adicionar D₂O. **Se observan otros multipletes de menor intensidad sobrepuestos, cuando el espectro se determina en C₆D₆ esto no se observa.

TABLA 8: Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C de los compuestos 14, 15, 14a y 15a.

^{13}C		14 ^a	15 ^b	14a ^c	15a ^d
C=O	C	205.6	205.6	200.2	200.3
∞	CH ₂	44.8	45.9	45.5	45.8
β	CH ₂	29.1	30.3	28.7	28.8
1	C	132.3	132.8	139.9	138.6
2	CH	115.8	130.0	123.5	129.5
3		144.8 (C)	116.2 (CH)	140.3 (C)	121.4 (CH)
4	C	143.1	156.9	141.9	149.0
5	CH	115.3	116.2	123.2	121.4
6	CH	118.8	130.0	126.8	149.0
1'	C	105.1	106.6	123.1	123.3
2'	C	160.8	162.2	154.3	154.4
3'	CH	94.3	95.7	106.8	107.0
4'	C	164.4	166.4	151.9	152.0
5'	CH	96.8	98.5	111.7	111.7
6'	C	165.3	167.7	147.9	148.0
1''	CH	100.8	102.5	99.5	99.6
2''	CH	73.1	74.7	70.4	70.6
3''	CH	76.7	78.9	73.4	72.5
4''	CH	69.4	71.2	68.2	68.3
5''	CH	77.2	79.0	72.3	72.4
6''	CH ₂	60.5	62.5	61.9	62.0
3-OAc	C	-----	-----	168.3	-----
4-OAc	C	-----	-----	168.2	169.3
4'-OAc	C	-----	-----	168.2	168.1
6'-OAc	C	-----	-----	168.6	168.5
2''-OAc	C	-----	-----	169.3	167.3
3''-OAc	C	-----	-----	170.0	170.0
4''-OAc	C	-----	-----	169.3	169.3
6''-OAc	C	-----	-----	170.5	170.4
OAc	CH ₃	-----	-----	20.6, 21.1, 20.4, 20.56,20.48	21.1, 20.5, 20.4

^aDeterminado en DMSO-d₆ a 500 MHz. ^bDeterminado en Py-d₅ a 300 MHz. ^cDeterminado en CDCl₃ a 125 MHz. ^dDeterminado en CDCl₃ a 75 MHz.

5.2 Pruebas biológicas

5.2.1 Actividad Antiinflamatoria. Modelo de edema inducido con TPA.

El edema inducido con TPA fue reducido por todos los flavonoides que se evaluaron en esta prueba (tabla 9). Sin embargo, sólo se consideraron significativos los casos en los que el porcentaje de inhibición del edema fue mayor al 40%. Así, aunque el flavonol **4**, los dihidroflavonoles **11**, **12** y el glucósido de dihidrochalcona **15** presentaron efecto de inhibición, éste no fue significativo. Por el contrario las flavanonas **7**, **8**, **9**, **10** y la dihidrochalcona **14** fueron los compuestos que mejor porcentaje de inhibición presentaron (mayor al 40%), por lo cual se determinó su IC₅₀.

Tabla 9: Efecto antiinflamatorio de flavonoides. % de inhibición del edema en oreja de ratón inducido con TPA empleando como vehículo MeOH.

Compuesto	Dosis ($\mu\text{mol}/\text{oreja}$)	Edema (mg)	Inhibición (%)
Control	-----	14.93 \pm 0.92	-----
4	1	10.80 \pm 0.60*	27.68
7	1	4.87 \pm 1.52**	67.41
8	1	8.10 \pm 2.38	45.76
9	1	8.67 \pm 0.99**	41.96
10	1	6.87 \pm 3.74*	53.98
11	1	13.10 \pm 0.82	12.28
12	1	13.10 \pm 0.12	12.28
14	1	8.57 \pm 1.91*	42.63
15	1	10.37 \pm 1.56	30.58

Los datos representan el promedio de tres animales \pm el error estándar de la media ($x \pm EEM$). Los resultados se analizaron mediante una prueba de *t* de Student y los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideran como diferencia significativa con respecto al control.

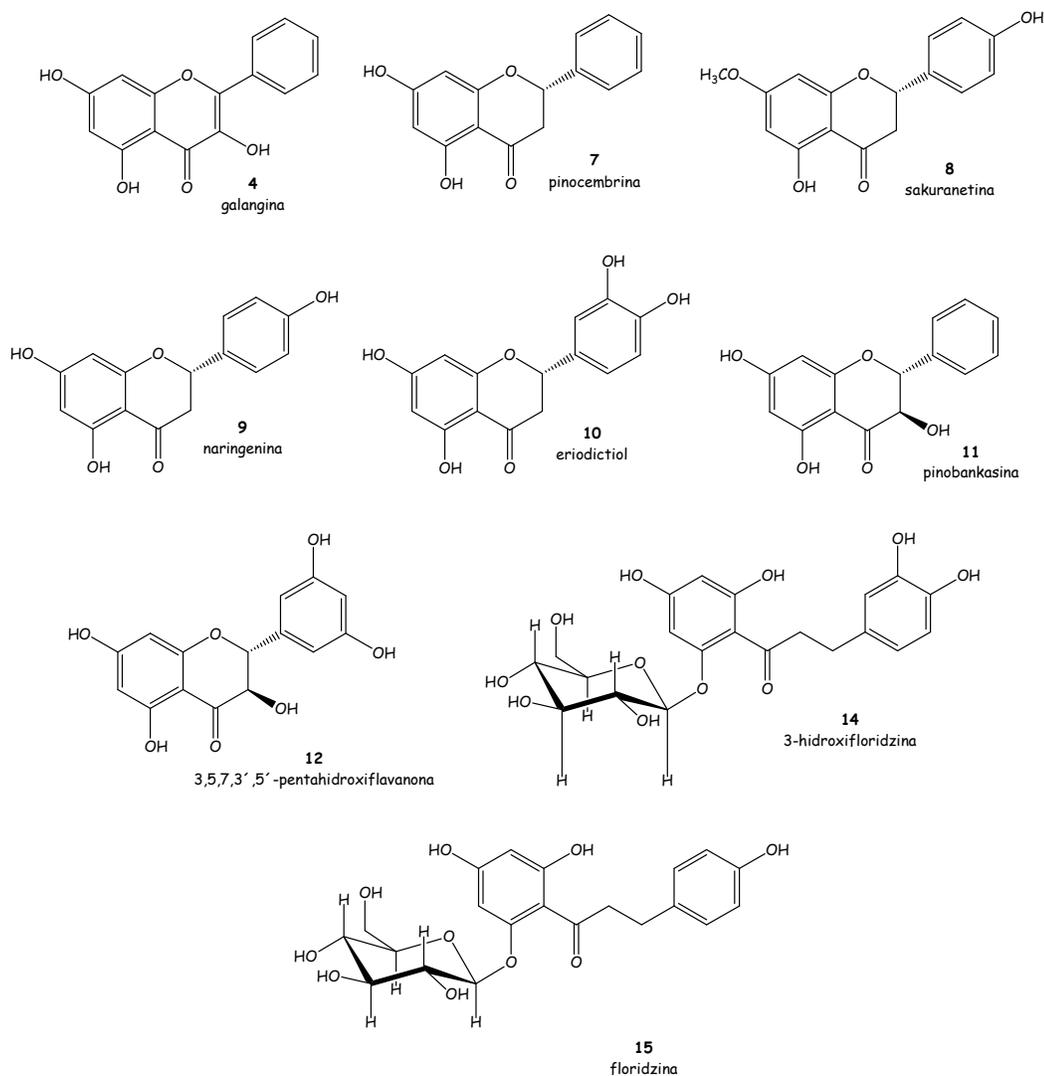


Figura 6: Compuestos evaluados en la prueba de inhibición de edema inducido con TPA en oreja de ratón.

Los resultados obtenidos en la determinación de la IC_{50} se muestran en la tabla 10. Tomando como referencia la indometacina fármaco indicado como antiinflamatorio,³² se observa que solo los compuestos **9**, **10** y **14** presentaron IC'_{50} cercanas a la de la indometacina. Así las IC'_{50} de **9**, **10** y **14** e indometacina fueron de 1.31, 0.717, 1.07 y 0.272 $\mu\text{mol/oreja}$ respectivamente.

Para los compuestos **7** y **8** no fue posible determinar la IC₅₀ debido a que se llegó a un punto en el cual al aumentar la dosis del compuesto se observó una disminución en el porcentaje de inhibición. Cabe señalar que para el compuesto **7** (pinocembrina) se reporta en la literatura una IC₅₀ de 0.061 mg/oreja²⁸ para esta misma prueba, con la variante de que en vez de metanol emplean etanol-agua 8:2 como vehículo. Por tal motivo se realizó el ensayo para el compuesto **7** empleando etanol-agua 8:2 como vehículo.

Los resultados se muestran en la tabla 11 y en ellos se observa que al cambiar el vehículo en el cual se disuelve el compuesto, la IC₅₀ de la pinocembrina disminuye considerablemente (de >3.16 a 0.488 µmol/oreja) lo cual puede deberse a que al ser una aplicación tópica, el vehículo puede afectar la absorción del compuesto y al menos en este caso, la mezcla etanol-agua parece ser más efectiva que el metanol. Para confirmar esto próximamente se repetirán los ensayos usando diferentes vehículos.

Tabla 10: Efecto antiinflamatorio. Determinación de la IC₅₀ en edema en oreja de ratón inducido con ATP empleando MeOH como vehículo.

Compuesto		Dosis ($\mu\text{mol}/\text{oreja}$)	Edema (mg)	Inhibición (%)	IC ₅₀
pinoembrina	7	C	17.54 \pm 0.54	----	>3.16 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$
		0.1	16.10 \pm 0.96	8.19	
		0.32	12.60 \pm 1.28*	28.15	
		1	10.30 \pm 1.35*	41.27	
		1.78	9.72 \pm 1.11*	44.59	
		3.16	10.46 \pm 1.35*	40.34	
sakuranetina	8	C	17.85 \pm 0.71	----	>3.16 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$
		0.1	16.35 \pm 0.68	8.4	
		0.32	14.93 \pm 0.81*	16.39	
		1	12.67 \pm 0.74*	29.04	
		3.16	12.28 \pm 0.59*	31.04	
naringenina	9	C	15.79 \pm 0.44	----	1.31 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$ r=0.98
		0.56	11.26 \pm 0.83*	28.71	
		1	9.62 \pm 1.34*	39.07	
		3.16	6.32 \pm 1.91*	59.97	
eriodictiol	10	C	14.64 \pm 0.22	----	0.717 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$ r=0.98
		0.1	11.28 \pm 1.37	22.95	
		0.31	8.98 \pm 1.89*	38.66	
		1	7.16 \pm 1.80**	51.09	
		3.1	3.58 \pm 0.88**	75.55	
3-hidroxfloridzin	15	C	16.35 \pm 0.19	----	1.07 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$ r=0.97
		0.56	11.45 \pm 1.52*	29.97	
		1	10.30 \pm 0.68*	37	
		1.78	4.03 \pm 1.12*	75.38	
Indometacina		C	16.26 \pm 0.86	----	0.272 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$ r=97
		0.13	10.53 \pm 0.04*	35.14	
		0.24	8.18 \pm 0.34*	48.18	
		0.42	7.10 \pm 1.34*	56.28	
		0.75	4.97 \pm 1.70*	69.42	
		1.3	1.57 \pm 0.33*	89.19	

Los datos representan el promedio de cuatro a nueve animales \pm el error estándar de la media ($x \pm EEM$). Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett, los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideran como diferencia significativa con respecto al control (C).

Tabla 11: Efecto anti-inflamatorio del compuesto 7 sobre el edema en oreja de ratón inducido con ATP, empleando como vehículo etanol-agua (8:2).

Compuesto	Dosis ($\mu\text{mol}/\text{oreja}$)	Edema (mg)	Inhibición (%)	IC ₅₀
pinocebrina 7	C	14.46 \pm 0.38	----	0.488 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$
	0.18	10.62 \pm 0.84*	26.56	
	0.32	9.06 \pm 1.23**	37.34	
	0.56	6.82 \pm 0.74**	52.84	
	1	4.48 \pm 1.15**	69.02	

Los datos representan el promedio de cuatro a nueve animales \pm el error estándar de la media ($x \pm EEM$). Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett, los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideran como diferencia significativa con respecto al control (C).

A pesar de que por las cantidades obtenidas sólo se pudo evaluar la actividad antiinflamatoria de 9 de los flavonoides aislados, se encontraron resultados interesantes. El grupo de las flavanonas resultó el más activo y dentro de éste la mejor actividad corresponde al compuesto con grupos hidroxilo en C3' y C4'. De los glucósidos de dihidrochalconas ensayados, también resultó más activo el C3, C4-dihidroxi que el C4-hidroxi. El flavonol **4** y los dihidroflavonoles **11** y **12** mostraron una actividad pobre, probablemente asociada a la presencia del hidroxilo en C3.

Sin embargo, el hecho de que la pinocebrina (**7**) presente un comportamiento diferente cuando se cambia el vehículo hace necesario llevar a cabo nuevos ensayos para obtener resultados más concluyentes.

5.2.2 Actividad antioxidante.

5.2.2.1 Reducción del radical libre (DPPH).

La capacidad antioxidante de los flavonoides se determinó mediante la medición indirecta del radical libre DPPH (2, 2-difenil-1-picrilhidracilo), ya que ésta radical presenta una coloración morada y absorbe a 515 nm y cuando el radical es reducido a DPPH-H por moléculas donadoras de átomos de hidrógeno la coloración se pierde.⁶² La actividad antioxidante (reductora) de los flavonoides sobre este radical fue medida empleando dos concentraciones distintas de cada uno de los compuestos (10 y 100µM) y se expresó como porcentaje de reducción del radical. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 12, en la que se observa que todos los flavonoides evaluados tienen la capacidad de reducir al radical 2,2-difenil-1-picril hidracilo. Sin embargo, sólo los compuestos **4**, **12** y **14** resultaron ser buenos antioxidantes en esta prueba, ya que el porcentaje de inhibición de éstos fue mayor al 50%; mientras que para los otros compuestos evaluados fue menor al 5%.

Tabla 12: Actividad antioxidante. % de inhibición del radical libre DPPH por flavonoides.

Compuesto		[μM]	D.O. 515 nm	% de reducción del DPPH
DPPH (Control)		100	0.652	----
3-O-Metilgalangina	3	10	0.641	1.02
		100	0.628	3.73
Galangina	4	10	0.571	12.47
		100	0.286	56.13
Cirsimaritina	5	10	0.648	0.56
		100	0.631	3.22
Pinocembrina	7	10	0.643	1.43
		100	0.636	2.40
Sakuranetina	8	10	0.636	2.51
		100	0.631	3.27
Naringenina	9	10	0.649	0.46
		100	0.636	2.45
Pinobankasina	11	10	0.623	4.50
		100	0.627	3.78
3,5,7,3',5'- Pentahidroxi-flavanona	12	10	0.393	39.72
		100	0.043	93.35
3-Hidroxi-floridzina	14	10	0.206	68.35
		100	0.030	95.45
Floridzina	15	10	0.650	0.36
		100	0.629	3.48

Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes.

La IC_{50} de los compuestos con mayor actividad antioxidante fue determinada, (Tabla 13). La 3-hidroxi-floridzina (**14**) y la 3,5,7,3',5'-pentahidroxi-flavanona (**12**) fueron las que presentaron mejor actividad con IC'_{50} de $12.55 \pm 0.42 \mu\text{M}$ y $13.21 \pm 0.82 \mu\text{M}$, las cuales están muy cercanas a la del compuesto de referencia quercetina, cuya IC_{50} fue $10.89 \pm 0.47 \mu\text{M}$. Además los compuestos **12** y **14** resultaron tener mejor capacidad antioxidante que el α -tocoferol que presentó una IC_{50} de $31.74 \pm 1.04 \mu\text{M}$.

El compuesto **4** (galangina) aunque presentó un porcentaje de inhibición del 52%, el valor de su IC_{50} fue de $73.86 \pm 3.74 \mu\text{M}$, el cual está muy por encima del de las referencias empleadas.

En cuanto a la relación estructura actividad, podemos observar que el compuesto con mayor capacidad para reducir el radical DPPH (compuesto **14**) presenta en su estructura grupos hidroxilo en C3 y C4 del anillo B (catecol), el compuesto **12** por ser un dihidroflavonol tiene un hidroxilo en C3, además está sustituido con grupos hidroxilo en C3' y C5', mientras que el flavonol galangina (**4**) carece de hidroxilos en el anillo B, pero presenta un grupo 3-OH y doble enlace entre C2-C3 (enol), al parecer este enol es responsable de su actividad, pues su dihidroderivado, la pinobankasina (**11**) no presenta una actividad significativa. Podemos observar que si cambia el grupo hidroxilo en C3 por un grupo metoxilo esta actividad disminuye considerablemente, tal como se observa en el compuesto **3** (3-O-metilgalangina) cuya actividad fue mucho menor que la de la galangina (**4**).

Tabla 13: Actividad antioxidante. IC₅₀ de los flavonoides en la inhibición del radical libre DPPH.

Compuesto	[μM]	D.O. 515 nm	% de reducción del DPPH	IC ₅₀ (μM)	
Galangina	4	C	0.600±0.02	-----	73.86±3.74
		17.78	0.489±0.04*	18.10±3.45	
		31.62	0.425±0.02*	29.35±2.40	
		56.23	0.344±0.02*	42.74±1.53	
		100	0.251±0.01*	58.28±1.48	
		177.83	0.173±0.01*	71.27±1.32	
		316.23	0.122±0.01*	79.73±1.02	
3,5,7,3',5'- Pentahidroxi-flavanona	12	C	0.588±0.01	-----	13.21±0.82
		3.16	0.516±0.01*	12.16±0.67	
		5.62	0.461±0.02*	21.70±1.36	
		10	0.317±0.02*	37.06±2.23	
		17.78	0.210±0.03*	64.45±3.97	
		31.62	0.069±0.01*	88.35±1.22	
		56.23	0.054±0.002*	90.83±0.55	
3-Hidroxifloridzina	15	C	0.670±0.005	-----	12.55±0.42
		1.78	0.641±0.002*	4.34±0.43	
		3.16	0.611±0.003**	8.72±0.60	
		5.62	0.536±0.006**	19.96±1.47	
		10	0.398±0.017**	40.56±3.01	
		17.78	0.244±0.001**	63.54±0.19	
		31.62	0.205±0.002**	69.41±0.45	
Quercetina		56.23	0.185±0.006**	72.35±1.08	10.89±0.47
		C	0.741±0.018	-----	
		2.37	0.665±0.017*	10.37±0.32	
		4.22	0.603±0.019**	18.80±0.69	
		7.50	0.509±0.016**	31.42±1.07	
		10	0.419±0.014**	43.49±1.54	
		13.34	0.313±0.018**	57.75±2.28	
α-tocoferol		17.78	0.181±0.024**	75.55±3.26	31.74±1.04
		23.71	0.107±0.003**	85.53±0.28	
		C	0.741±0.018	-----	
		13.34	0.609±0.026**	17.96±1.74	
		17.78	0.553±0.027**	25.51±2.02	
		23.71	0.488±0.02**	34.31±1.80	
		31.62	0.400±0.019**	46.13±1.98	
	42.17	0.284±0.017**	61.65±2.19		
	56.23	0.135±0.009**	81.76±1.11		
	74.13	0.106±0.007**	85.79±0.63		

Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes (n=3) ± el error estándar de la media (x±EEM). Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett, los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideran como diferencia significativa con respecto al control (C).

5.2.2.2 Inhibición de la Peroxidación de lípidos de cerebro de rata (TBARS).

Esta es otra prueba para determinar la actividad antioxidante de los compuestos e involucra un sistema biológico (cerebro de rata), en el que se induce la peroxidación de lípidos por el ataque de radicales libres que son generados en el medio por diferentes inductores (FeSO_4 , H_2O_2 , etc). Esta peroxidación termina con la formación de diversos compuestos como pentanal, hexanal, 4-hidroxinonanal y malonaldehído (MDA) que son los productos finales. El MDA es empleado como un índice de estrés oxidativo, ya que a pH ácido reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar un cromóforo cuya absorbancia es medida a 532-535 nm. El incremento en la peroxidación de lípidos, genera una mayor cantidad de MDA y por consiguiente hay mayor absorbancia. Sin embargo, el método TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) no es específico para el MDA ya que el TBA también puede reaccionar con otros aldehídos, algunos azúcares y aminoácidos.⁶³

Los resultados de la tabla 14 muestran el porcentaje de inhibición de la peroxidación de lípidos de cerebro de rata inducida con FeSO_4 , que presentó cada uno de los flavonoides evaluados. Se puede observar que aunque la mayoría de los compuestos presentó actividad, sólo la de los flavonoides **4**, **5**, **12** y **14** fue significativa, ya que fue mayor al 50%. Se realizó la determinación de la IC_{50} de estos compuestos la cual fue comparada con las de quercetina y α -tocoferol (Tabla 15). Los valores de IC_{50} de cada uno de los compuestos, muestran que éstos son mejores antioxidantes que el α -tocoferol cuya IC_{50} es de $569 \pm 24.64 \mu\text{M}$, esto debido a que la IC_{50} de los flavonoides (**4**, **5**, **12** y **14**) resultó ser mucho mas baja.

Tabla 14: Efecto inhibitorio de los flavonoides de *L. graveolens* sobre la peroxidación de lípidos de cerebro de rata.

Compuesto	[μ M]	D. O. 540 nm	TBARS [μ M]	nmol TBARS / mg Prot.	Inhibición %
Blanco		0.000	----	----	----
Basal		0.086	1.257	1.257	85.01
Fe SO ₄ (10 μ M)	----	0.71	9.914	9.914	-18.18
FeSO ₄ +Vehículo		0.625	8.389	8.389	0.000
3-O-Metilgalangina	3	10	0.657	8.766	-4.50
		100	0.640	8.577	-2.25
Galangina	4	10	0.048	0.754	91.01
		100	0.018	0.351	95.82
Cirsimaritina	5	10	0.642	8.614	-2.68
		100	0.294	3.999	52.32
Pinocembrina	7	10	0.612	8.217	2.05
		100	0.681	9.130	-8.83
Sakuranetina	8	10	0.641	8.591	-2.41
		100	0.582	7.816	6.82
Naringenina	9	10	0.619	8.309	0.95
		100	0.616	8.266	1.46
Pinobankasina	11	10	0.668	8.954	-6.74
		100	0.685	9.183	-9.46
3,5,7,3',5'- Pentahidroxi flavanona	12	10	0.567	7.621	9.15
		100	0.111	1.588	81.07
3-Hidroxi flordizina	14	10	0.412	5.571	3.60
		100	0.025	0.450	94.63
Floridzina	15	10	0.614	8.243	1.73
		100	0.577	7.744	7.69

Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes.

Tabla 15: Actividad Antioxidante. IC₅₀ de los flavonoides en la inhibición de la peroxidación de lípidos de cerebro de rata.

Compuesto	[μ M]	TBARS nmol/mg Prot.	Inhibición %	IC ₅₀ (μ M)	
Galangina	4	6	8.131	17.13	< 10 ^a
		6.5	7.383	24.75	
		7	7.049	28.15	
		7.5	6.814	30.55	
		8	1.161	88.16	
		8.5	1.102	88.77	
		9	0.887	91.06	
		9.5	0.817	91.67	
		10	0.778	92.07	
Circimaritina	5	0	8.07±0.20	-----	132.29±24.75
		31.62	6.57±0.15*	18.59±1.38	
		56.23	4.78±0.19*	40.67±2.79	
		100	4.29±0.06*	46.84±1.56	
		177.83	3.66±0.12*	54.55±2.44	
		316.23	3.31±0.17*	58.95±1.48	
3,5,7,3',5'- pentahidroxi flavanona	12	0	7.99±0.12	-----	58.72±1.63
		10	7.86±0.15	1.50±2.45	
		17.78	7.28±0.10*	8.77±2.09	
		31.62	6.23±0.18*	21.97±2.59	
		56.23	4.32±0.03*	45.88±0.61	
		100	1.92±0.06*	75.95±1.04	
3-hidroxi flori dzina	15	0	7.97±0.12	-----	16.82±0.59
		3.16	7.32±0.23	8.09±2.00	
		5.62	6.91±0.19*	13.25±2.65	
		10	6.04±0.35*	24.27±3.87	
		17.78	4.38±0.21*	45.12±1.87	
		31.62	0.84±0.06*	89.46±0.92	
		56.23	0.43±0.06*	94.55±0.84	
Quercetina		0	9.52±0.19	-----	4.11±0.26
		1	8.33±0.33	11.70±2.14	
		1.78	7.64±0.47*	19.29±3.32	
		3.16	6.21±0.24*	34.16±3.05	
		5.62	3.20±0.55*	66.05±5.62	
		10	1.27±0.29*	86.61±2.92	
α -tocoferol		0	9.48±0.23	-----	569.09±24.54
		100	8.43±0.45	11.25±2.71	
		177.83	8.01±0.35	15.65±2.07	
		316.23	7.49±0.16*	21.39±1.20	
		562.34	5.09±0.37*	46.36±3.38	
		1000	1.66±0.44*	82.28±4.80	

Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes (n=3) \pm el error estándar de la media ($x \pm EEM$). Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett. Los valores de $p \leq 0.05$ (*) se consideran como diferencia significativa con respecto al control (concentración 0). ^aLos datos no fueron reproducibles por lo que no fue posible determinar el valor exacto.

De estos cuatro flavonoides los compuestos **4** y **14** resultaron ser los mejores inhibidores de la peroxidación de lípidos de cerebro de rata con una IC_{50} $16.82 \pm 0.59 \mu\text{M}$ para la 3-hidroxi-floridzina (**14**) y aunque la IC_{50} de la galangina (**4**) no se pudo determinar exactamente debido a que los datos obtenidos no fueron reproducibles, su valor está por debajo de $10 \mu\text{M}$. Sin embargo, la capacidad antioxidante de la quercetina, con un valor de IC_{50} $4.11 \pm 0.26 \mu\text{M}$, sigue siendo mejor.

En cuanto a la relación estructura actividad podemos darnos cuenta que la mejor capacidad antioxidante la tuvo el flavonol (**4**) en cuya estructura esta presente el doble enlace C2-C3 y el grupo 3-OH, seguido de la dihidrochalcona (**14**) que presenta la sustitución 3'-OH, 4'-OH en el anillo B (catecol). El tercer compuesto activo **12**, presenta el grupo 3-OH, pero carece del doble enlace C2-C3 y presenta una sustitución 3'-OH, 5'-OH en el anillo B. La cirsimarina (**5**) con un grupo 4'-OH en el anillo B y que presenta el doble enlace entre C2-C3, pero carece del grupo 3-OH resultó el compuesto menos activo de estos cuatro.

6. CONCLUSIONES

La composición química de *Lippia graveolens* resultó ser muy compleja, ya que además de los compuestos presentes en los aceites esenciales que ya han sido descritos en la literatura, posee muchos más. Esto lo demuestra el presente estudio en el que se aislaron 12 flavonoides, de los cuales sólo dos (pinocembrina y naringenina) habían sido aislados con anterioridad de esta especie.

Lippia graveolens contiene casi todos los tipos de flavonoides, ya que entre los compuestos aislados existen flavonoles, flavonas, flavanonas, dihidroflavonoles y dihidrochalconas.

Los resultados obtenidos en las pruebas biológicas muestran que cada uno de los flavonoides evaluados presenta un efecto positivo en la mayoría de las actividades evaluadas, pero sólo en algunos casos esta actividad fue significativa. En el ensayo de actividad antiinflamatoria el compuesto **10** fue el que mejor actividad presentó. Sin embargo, su IC₅₀ resultó ser mayor que la de indometacina que se empleó como referencia. La importancia del vehículo en la evaluación de esta actividad se puso de manifiesto al determinar la actividad del compuesto **7** usando dos vehículos distintos.

En cuanto a la actividad antioxidante, en la prueba de DPPH los compuesto **12** y **14** fueron los que presentaron una mejor actividad, mientras que en TBARS los compuestos que mejor actividad presentaron fueron **4** y **14**. En ambas pruebas estos compuestos resultaron ser mejores antioxidantes que el α -tocoferol, uno de los compuestos de referencia empleado. Cabe mencionar que el otro compuesto de referencia, quercetina, presentó mejor actividad antioxidante que los flavonoides evaluados.

7. BIBLIOGRAFÍA

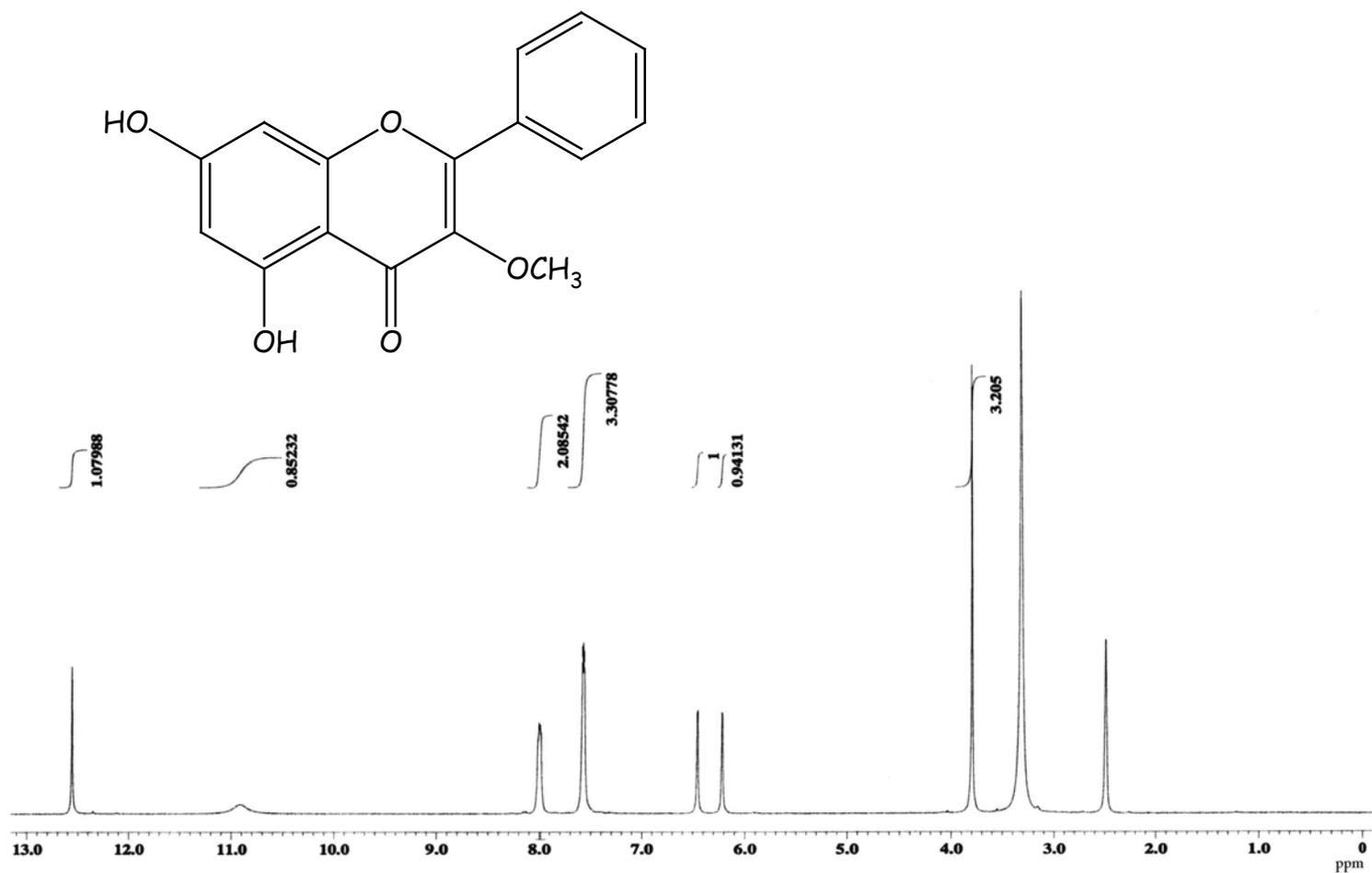
1. Torres Manriquez F., "Aislamiento y Caracterización de los constituyentes de *Physalis nicandroides* Schltdl. Var. *attenuata* Waterf", Tesis de Maestría, UAM, Unidad Xochimilco, México D.F., 2006.
2. Hernández, T., Canales, M., Avila, J. G., Duran, A., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Lira, R., *J. Ethnopharmacol.* **88**, 181-188, 2003.
3. Barbosa, E., Calzada, F., Campos, R., *J. Ethnopharmacol.* **19**, 552-554, 2007.
4. Monroy-Ortiz, C., Monroy, R., *Las Plantas, compañeras de siempre: la experiencia en Morelos*, 1a Edición, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, pp 504, México, 2006.
5. Fricke, C., Hardt, I. H., König, W. A., Joulain, D., Zygadlo, J. A., Guzmán, C. A., *J. Nat. Prod.* **62**, 694-696, 1999.
6. Costa, S. M. O., Lemos, T. L. G., Pessoa, O. D. L., Montenegro, R. C., Braz-Filho, R., *J. Nat. Prod.* **64**, 792-795, 2001.
7. Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Sanchez Mata, D., Villar, A., *J. Ethnopharmacol.* **76**, 201-204, 2001.
8. Barbosa, F. G., Lima, M. A. S., Braz-Filho, R., Silveira, E. R., *Biochem. Syst. Ecol.* **34**, 819-821, 2006.
9. Compadre, C. M., Hussain, R. A., Leon, I., Enríquez, R. G., *Planta Med.* **53**, 495-496, 1987.
10. Vasquez, E., Jakinovich, W. Jr., Nanayakkara, N. P. D., Hussain, R. A., Cheng, M. S., Kinghorn, A. D., *J. Agric. Food Chem.* **41**, 1305-1310, 1993.
11. Rastrelli, L., Cáceres, A. Morales, C., De Simone, F., Aquino, R., *Phytochemistry* **49**, 1829-1832, 1998.
12. Moldenke, H. N., "The known Geographic Distribution of the members of the Verbenaceae, Aviceniaceae, Stilbaceae, Symphoremaceae and Eriocaulaceae", New York, pag. 31, 1949.
13. Lara Ramirez, O., "Estudio técnico justificado para el aprovechamiento de orégano (*L. graveolens* H.K.B.) y Damiana (*Turnera difusa* Willd) en el ejido Mangas Cuatas municipio de Atarjeas en el estado de Guanajuato", Memoria Profesional, UNAM, FES Cuautitlan, Edo. de México, 2001.
14. Salgueiro, L. R., Cavaleiro, C., Goncalves, M. J., Proenca da Cunha, A., *Planta Med.* **69**, 80-83, 2003.

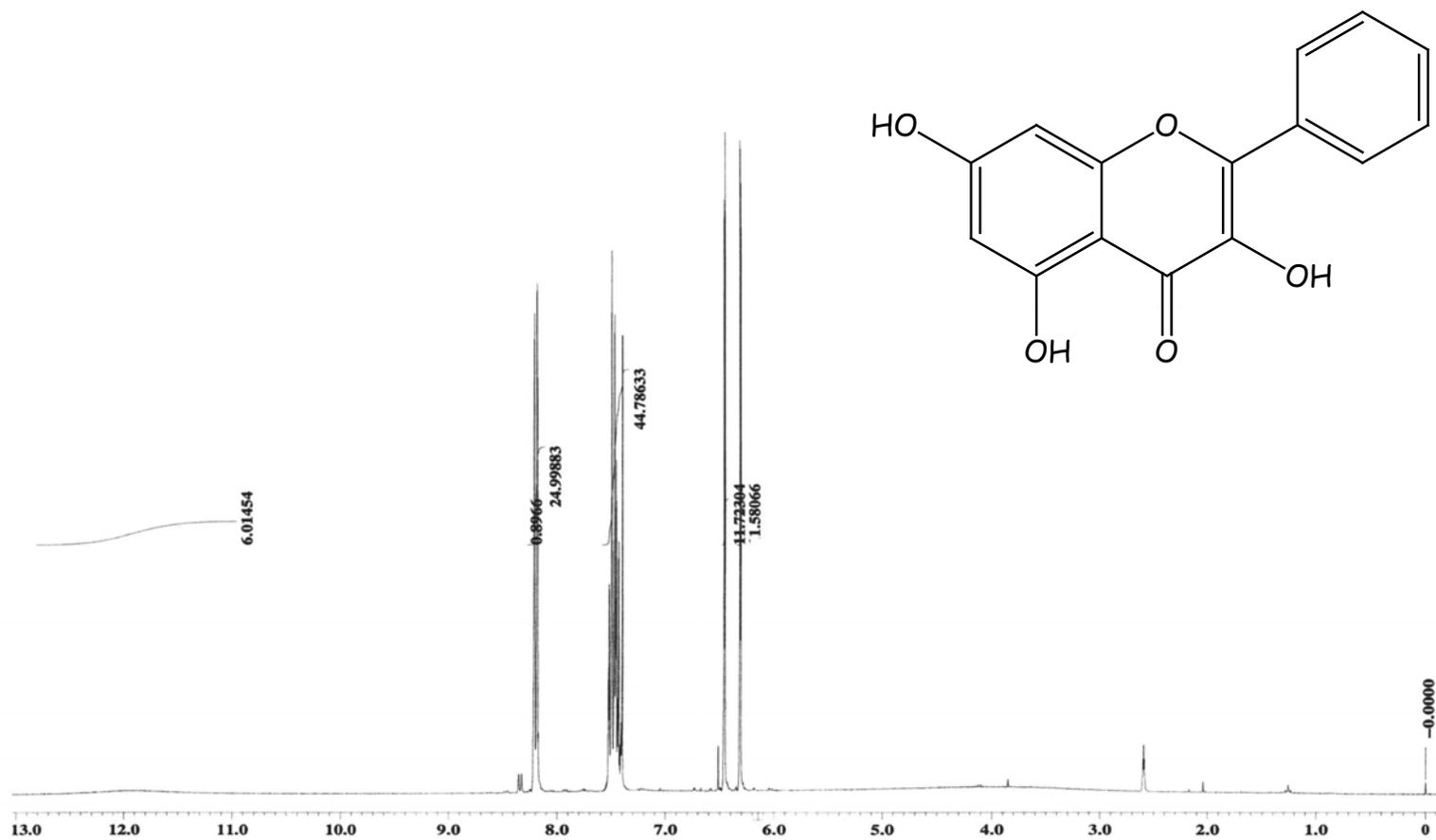
15. Domínguez, S. X. A., Sánchez, V. H., Suárez, M., Baldes, J. H., González, M. R., *Planta Med.* **55**, 208-209, 1989.
16. Marín, F. R., Frutos, M. J., Pérez-Álvarez, J. A., Martínez-Sánchez, F., Del Río, J. A., "Flavonoids as Nutraceutical: Structural Related Antioxidant Properties and Their Role on Ascorbic Acid Preservation", in *Studies in Natural Products Chemistry* Atta-ur-Rahman Ed., Spain, 2002, **26**, 741-778.
17. Bruneton, J, *Farmacognosia Fitoquímica de Plantas Medicinales*, 2ª Edición, Editorial ACRIBIAS S.A., Zaragoza (España), pp 305-349, 2001.
18. Pietta, P. G., *J. Nat. Prod.* **63**, 1035-1042, 2000.
19. Mann, J., *Secondary Metabolism*, 2nd, Ed. Oxford Press, USA, 1987.
20. Mata Essayag, Rachel, *Curso Teórico de Farmacognosia*, UNAM, Facultad de Química, México, D.F., 2000.
21. Pretorius, J. C., *Curr. Med. Chem.* **2**, 335-353, 2003.
22. Harborne, J.B., *The Flavonoids: Advances in research*, Chapman & Hall, London, pp 526-529, 1982.
23. Forkmann, G., Heller, W., *Biosynthesis of Flavonoids*. In *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Editors-in-chief, Barton, D., Nakanishi, K., Meth-Cohn, O., New York, 1998, **1**, 713-748.
24. Santos, A. C., Uyemura, S. A., Lopes, J. L., Bazon, J. N., Mingatto, F. E., Curti, C., *Free Radical Biol. Med.* **24**, 1455-1461, 1998.
25. Ueda, H., Yamazaki, C., Yamazaki, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 119-125, 2004.
26. Nakamura, Y., Watanabe, S., Miyake, N., Kohno, H., Osawa, T., *J. Nat. Food Chem.* **51**, 3309-3312, 2003.
27. Rezk, B. M., Haenen, G., Van der Vijgh, W. J. F., Bast, A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **29**, 9-13, 1998.
28. Salas, A., Recio, C., Schinella, G. R., Mañez, S., Giner, R. M., Cerdán-Nicolás, M., Ríos, J. L., *Eur. J. Pharm.* **461**, 53-61, 2003.
29. Cao, O., Sofic, E., Prior, R.L., *Free Radic. Biol. Med.* **22**, 749-760, 1997.
30. Heijnen, C. G. M., Haenen, G. R. M. M., Oostveen, R. M., Stalpers, E. M., Bast, A., *Free Radic. Res.* **36**, 575-581, 2002.
31. Middleton, E. Jr., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., *Pharmacol. Rev.* **52**, 673-751, 2002.

32. Goodman & Gilman, A., Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, Decima Edición, Vol. 1, Cap. 27, MacGraw Hill, 2003.
33. Katzung, B.G., Farmacología Básica y Clínica, 7ª Edición, Cap. 36, Editorial el Manual Moderno, México, 1999.
34. García, T. F., Fundamentos de Inmunología, 1 Edición, UNAM, pág.18-19, México, 1997.
35. Rao, T.S., Currie, J. L., Shaffer, A. F., Isakson, P., *Inflammation* **10**, 723-741, 1993.
36. Payá, M., Ferrádiz, M., Erradi, F., Terencio, M. C., Kijjoa, A., Pinto, M., Alcaraz, M. J., *Eur. J. Pharm.* **312**, 97-105, 1996.
37. Tallarida, R. J., Murria, R. B., Manual of pharmacologic calculation whit computer programs, 2^{da} Edition, Springer Verlag, New York, 145-148, 1987.
38. Colle, N., Bernier, J. L., Catteau, J. P., Pommery, J., Wallet, J. C., Gaydou, E., *Free Radic. Med.* **20**, 35-43, 1996.
39. Gámez, E. J., Luyengi, L., Lee, S. K., Zhu, L. F., Zhou, B. N., Fong, H. H. S., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D., *J. Nat. Prod.* **61**, 706-708, 1998.
40. Cavin, A., Hostettmann, K., Dyatmyko, W., Potterat, O., *Planta Med.* **64**, 393-396, 1998.
41. Shin, J.-E., Joo, H.M., Kim, D.-H., *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 854-857, 2003.
42. Agrawal, P. K., Carbon-13 NMR of flavonoids, in Studies in Organic Chemistry, Amsterdam, pág.100, 101, 103, 106, 118,119, 160, 161, 1989.
43. Shin, D., Kinoshita, K., Koyama, K., Takahashi, K., *J. Nat. Prod.* **65**, 1315-1318, 2002.
44. Wang, R. F., Yang, X. W., Ma, C. M., Liu, H. Y., Shang, M. Y., Zhang, Q. Y., Cai, S. Q., Park, J. H., *J. Asian Nat. Prod. Res.* **6**, 139-144, 2004.
45. Nagao, T., Abe, F., Kinjo, J., Okabe, H., *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 875-879, 2002.
46. Slade, D., Ferreira, D., Marais, J. P. J., *Phytochemistry* **66**, 2177-2215, 2005.
47. Kattaev, N. Sh., Nikonov, G. K., *Chem. Nat.l Compounds* **10**, 94-95, 1975.
48. Sirat, H., Rahman, A., Itokawa, H., Morita, H., *Planta Med.* **62**, 188-189, 1996.
49. Sayed, A. R., Mohamed, A., Shamim, M., Salem, G., *Chem. Pharm. Bull.* **51**, 203-206, 2003.

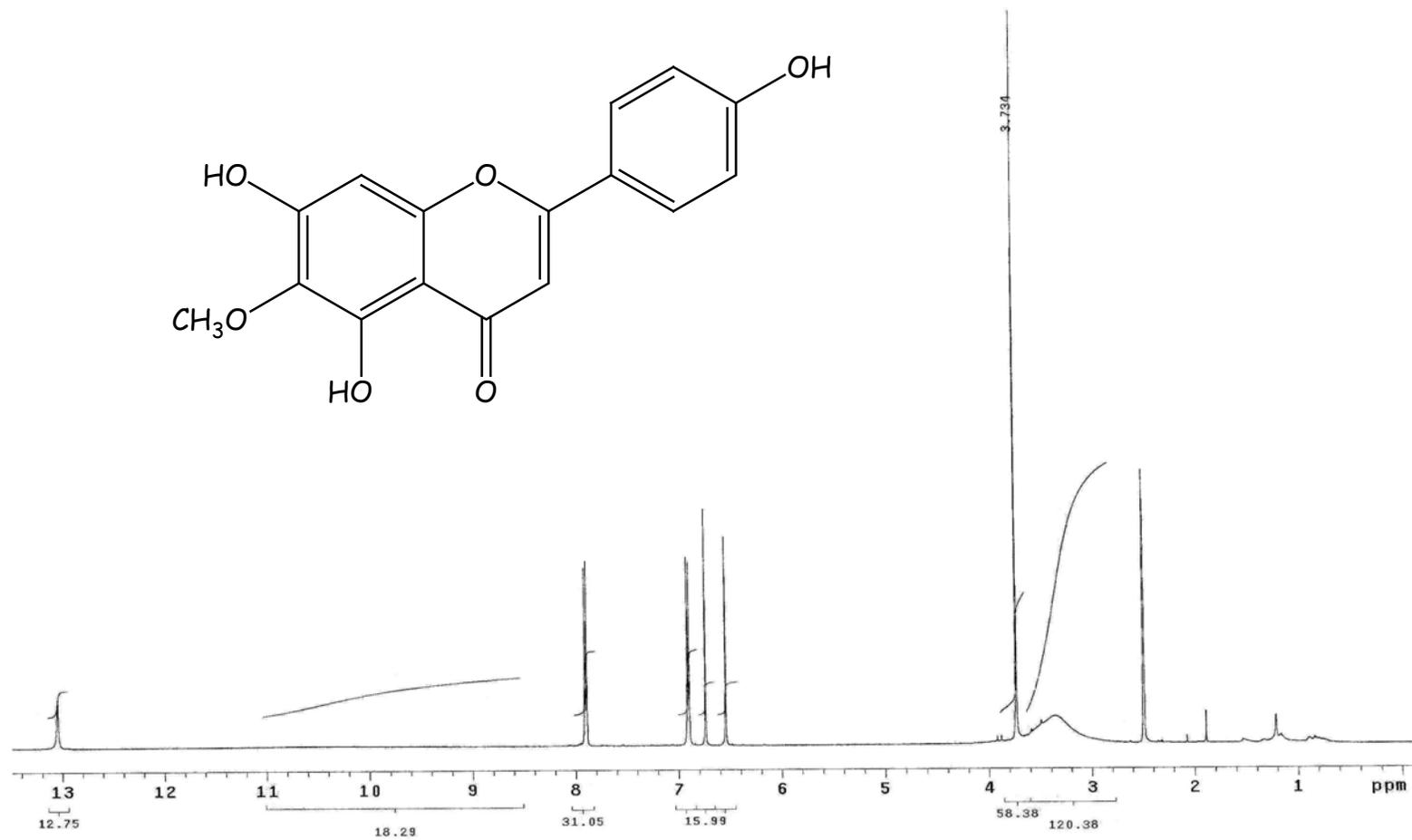
50. De Oliveira, W. G., Mesquita, A. A. L., Kubitzki, K., Gottlieb, O. R., *Phytochemistry* **29**, 1893-1894, 1990.
51. Ohtsuki, T., Koano, T., Kowithayakorn, T., Yamaguchi, N., Ishibashi, M., *Planta Med.* **70**, 1170-1173, 2004.
52. Dictionary of Organic Compounds. Fifth and Cumulative Supplement, Editorial Advisory Committee, London, 1965.
53. Du, Q., Jerz, G., Winterhalter, P., *J. Liquid. Chrom. Technol.* **27**, 3257-3264, 2004.
54. Wu, T. S., Hsu, M. Y., Kuo, P. C., Sreenivasulu, B., Damu, A. G., Su, C. R., Li, C. Y., Chang, H. C., *J. Nat. Prod.* **66**, 2003, 1207-1211.
55. Garo, E., Wolfender, J. L., Hostettmann, K., Hiller, W., Antus, S., Mavi, S., *Helv. Chimica Acta* **81**, 754-763, 1998.
56. Konishi, T., Yamazoe, K., Kanzato, M., Konoshima, T., Fujiwara, Y., *Chem. Pharm. Bull.* **51**, 1142-1146, 2003.
57. Su, B. N., Cuendet, M., Hawthorne, M. E., Kardono, L. B. S., Riswan, S., Fong, H. H. S., Mehta, R. G., Pezzuto, J. M., Kinghorn, D., *J. Nat. Prod.* **65**, 163-169, 2002.
58. Lide, D. R., Milne, G. W. A., Handbook of Data on Organic Compounds, Vol. 3, CRC Press, Florida, Pág. 2891, 1994.
59. Lu, Y., Yeap, F. L., *Food Chem.* **59**, 187-194, 1997.
60. El-Naggar, S. A. F., El-Ferally, F., Foos, J. S., Doskotch, R.W., *J. Nat. Prod.* **43**, 739-751, 1980.
61. Goodenouh, P. W., Kessell, S., Lea, A. G. H., Loeffler, T., *Phytochemistry* **22**, 359-363, 1983.
62. Prakash, A., *Analytical Progress* **19**, 1-6, 2001.
63. Fernández, J., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J. A., *Food Chem.* **59**, 345-353, 1997.

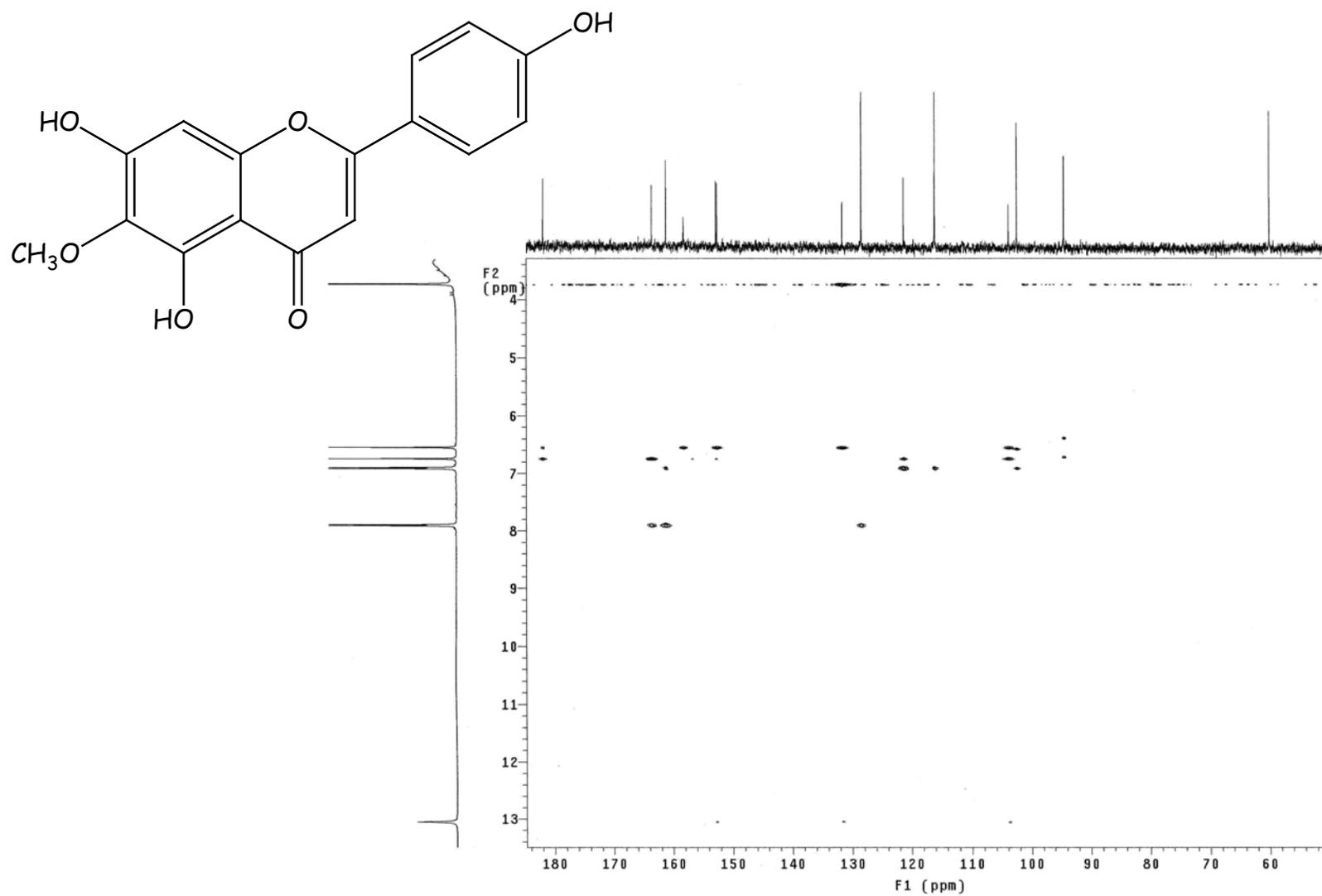
ANEXO 1

Espectro 1: RMN ^1H de la 3-O-metilgalangina (3).

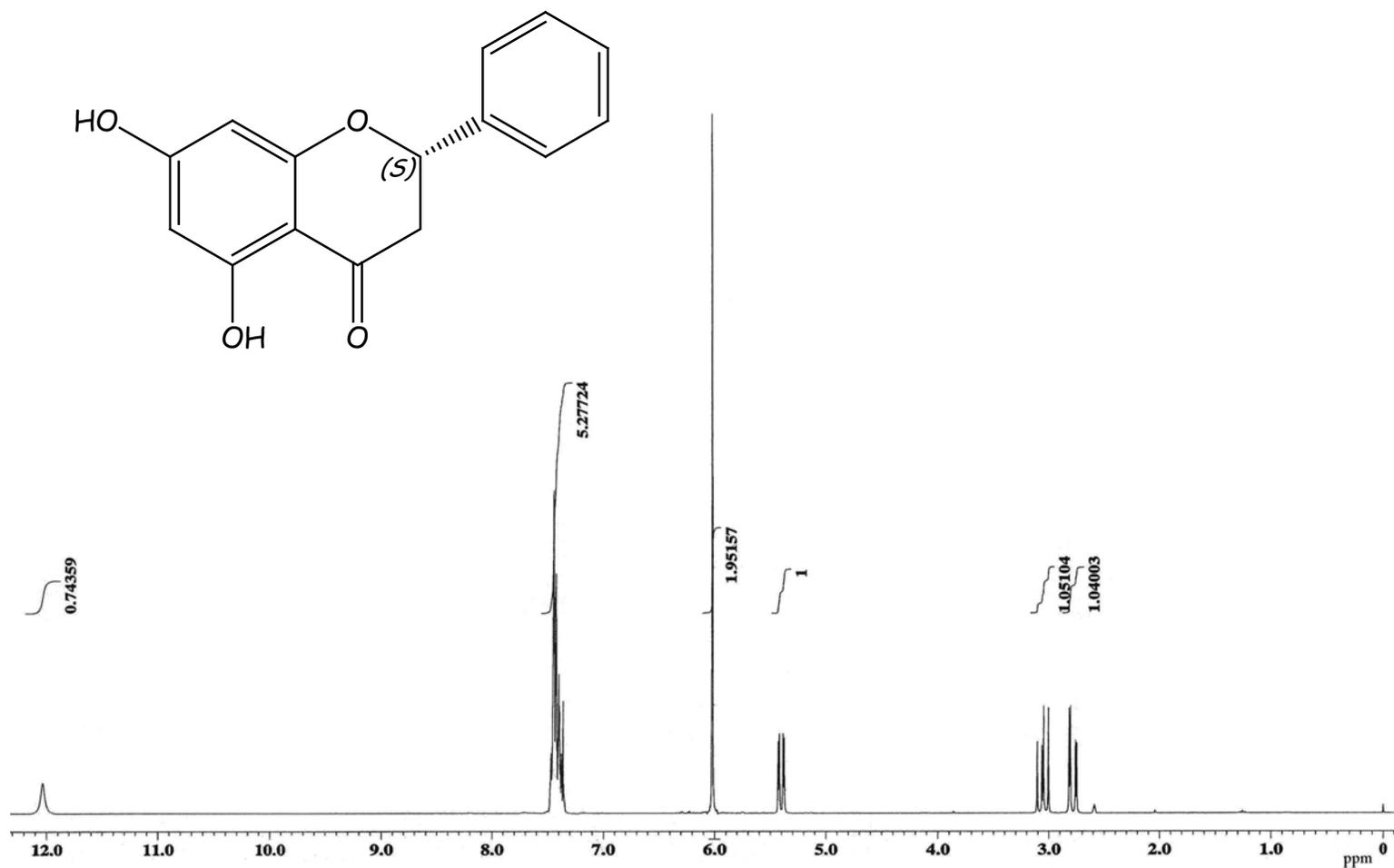
Espectro 2: RMN ^1H de la galangina (4).

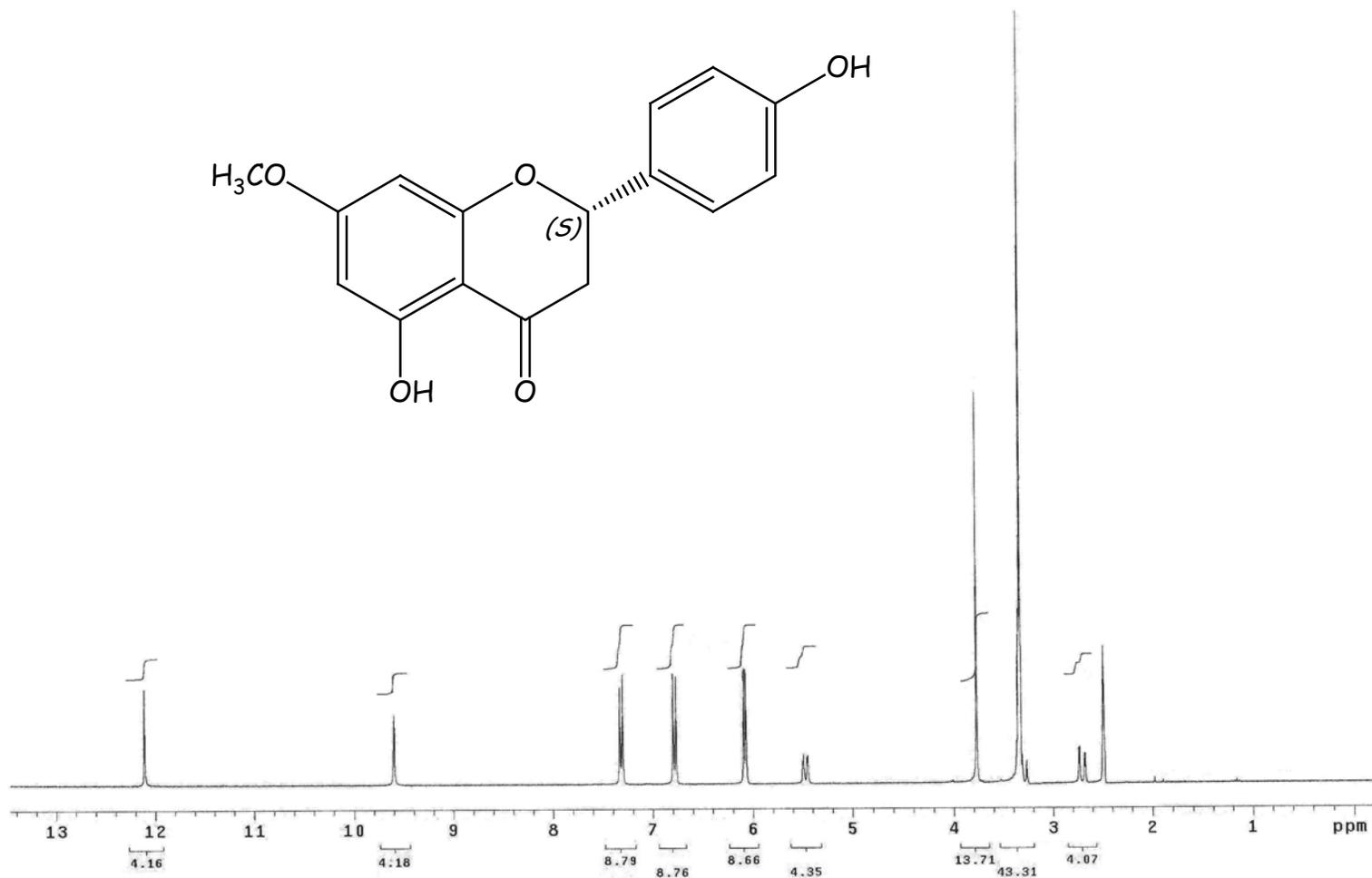
Espectro 3: RMN ^1H de la cirsimaritina (5).

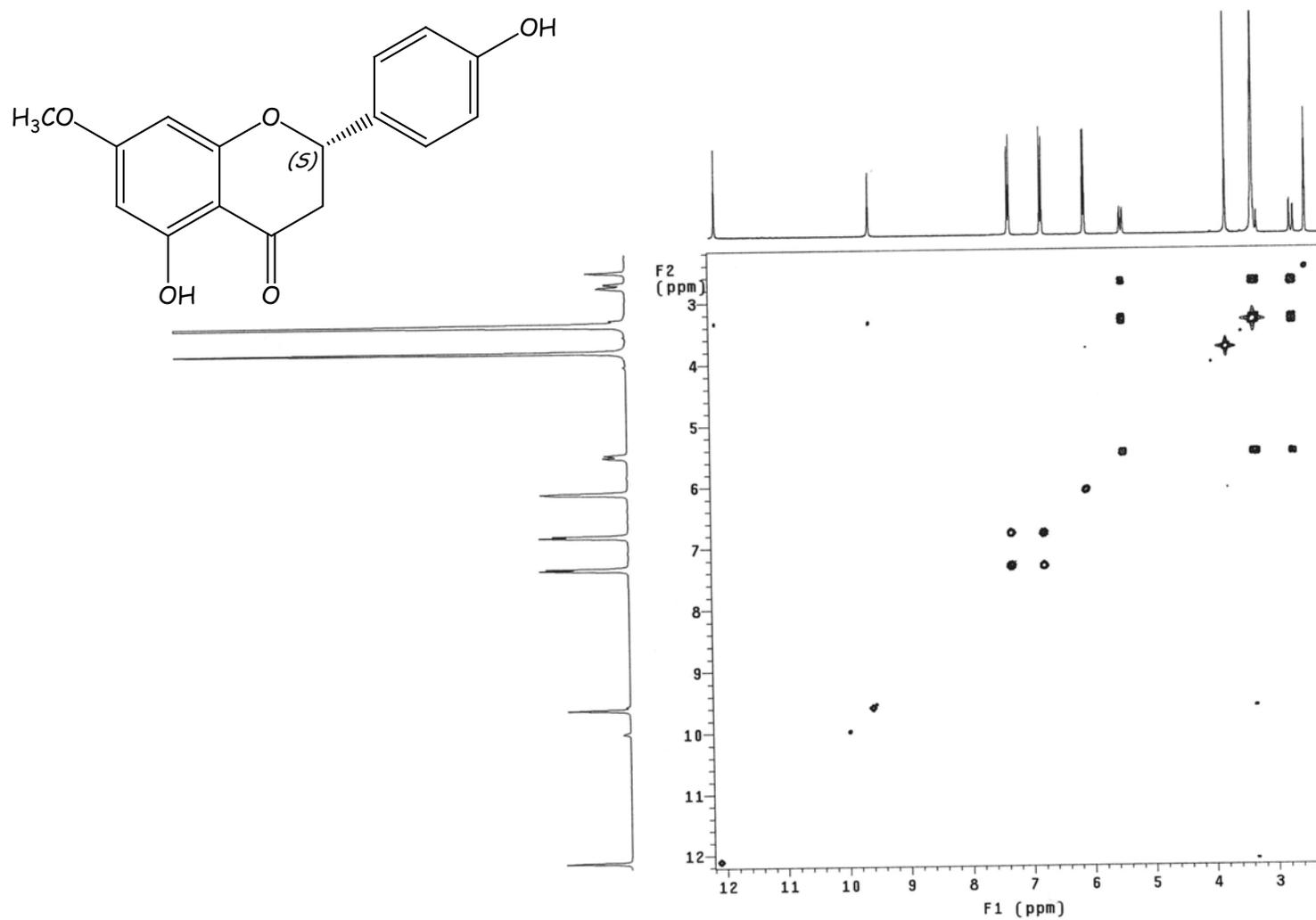
Espectro 4: RMN ^1H de la hispidulina (6).



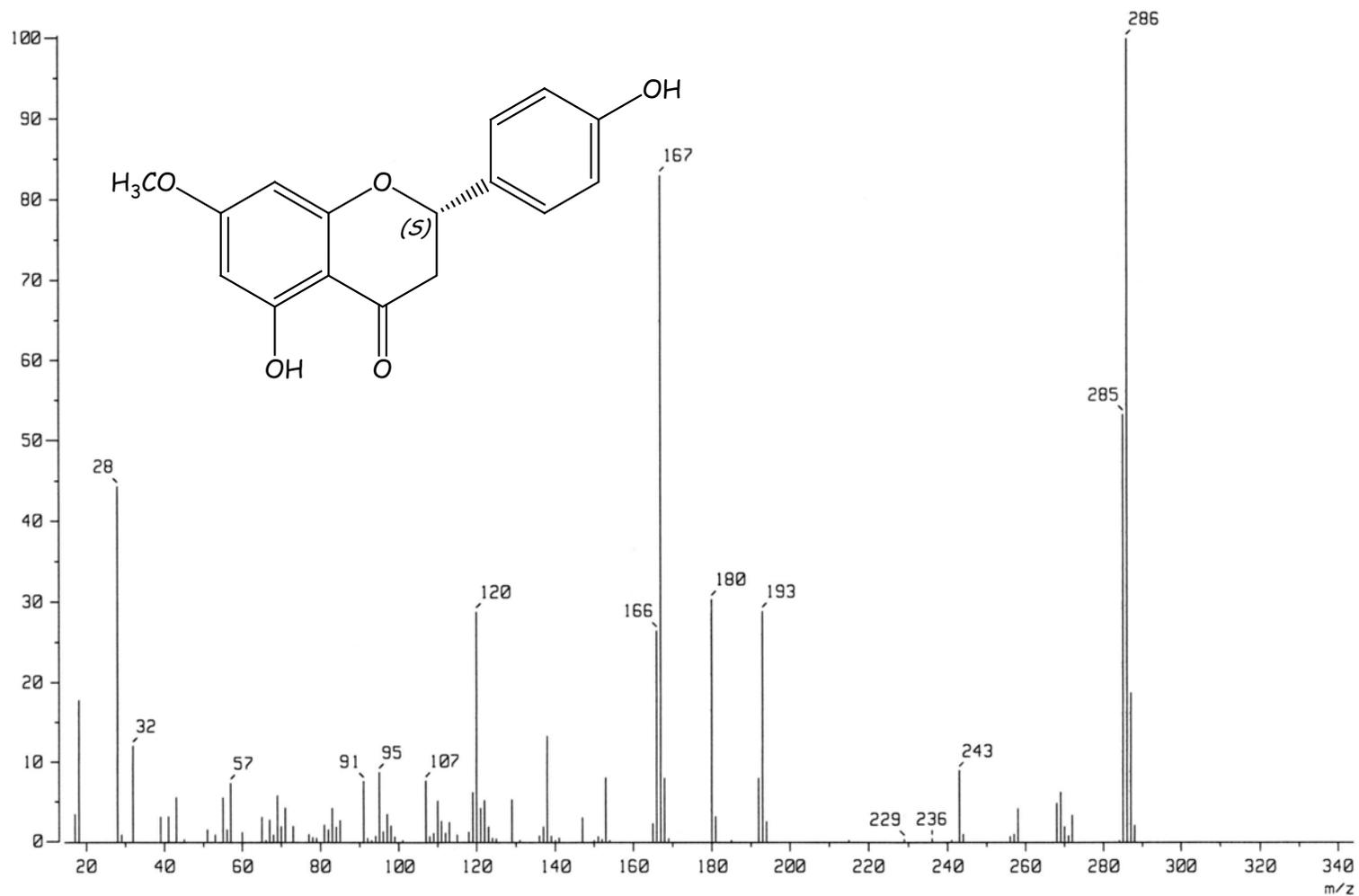
Espectro 5: HMBC de la hispidulina (6).

Espectro 6: RMN ^1H de la pinocembrina (7).

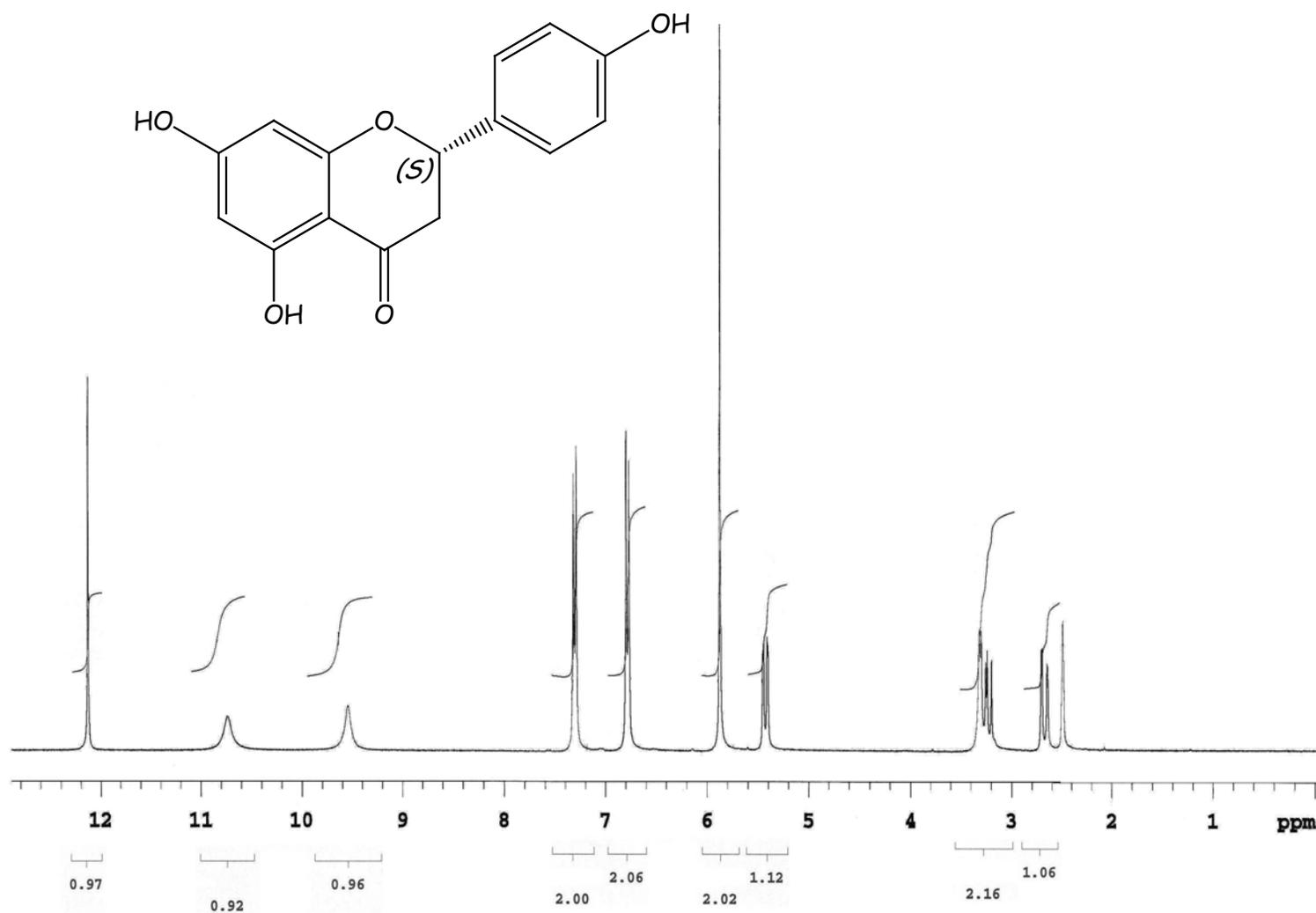
Espectro 7: RMN ^1H de la sakuranetina (**8**).

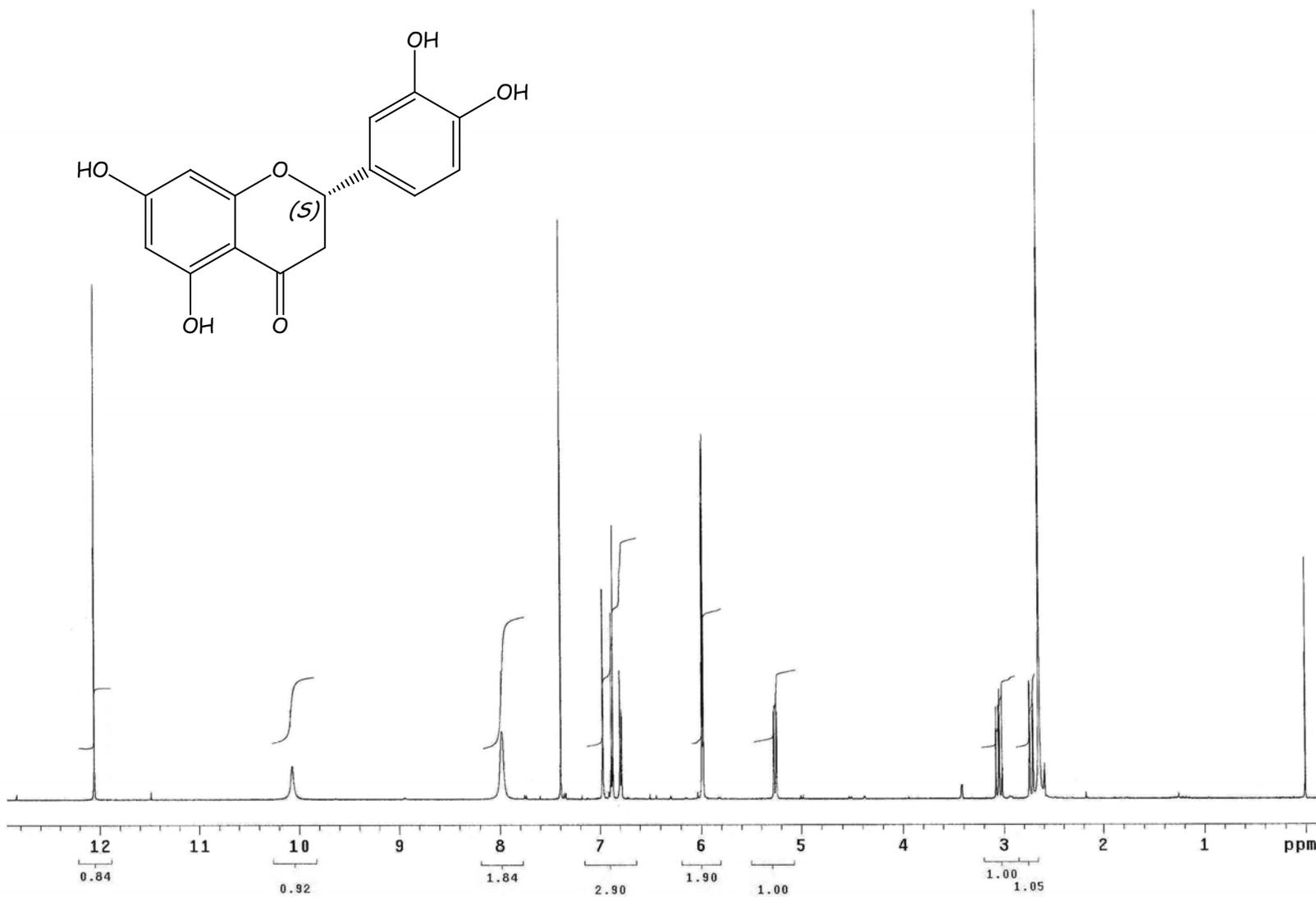


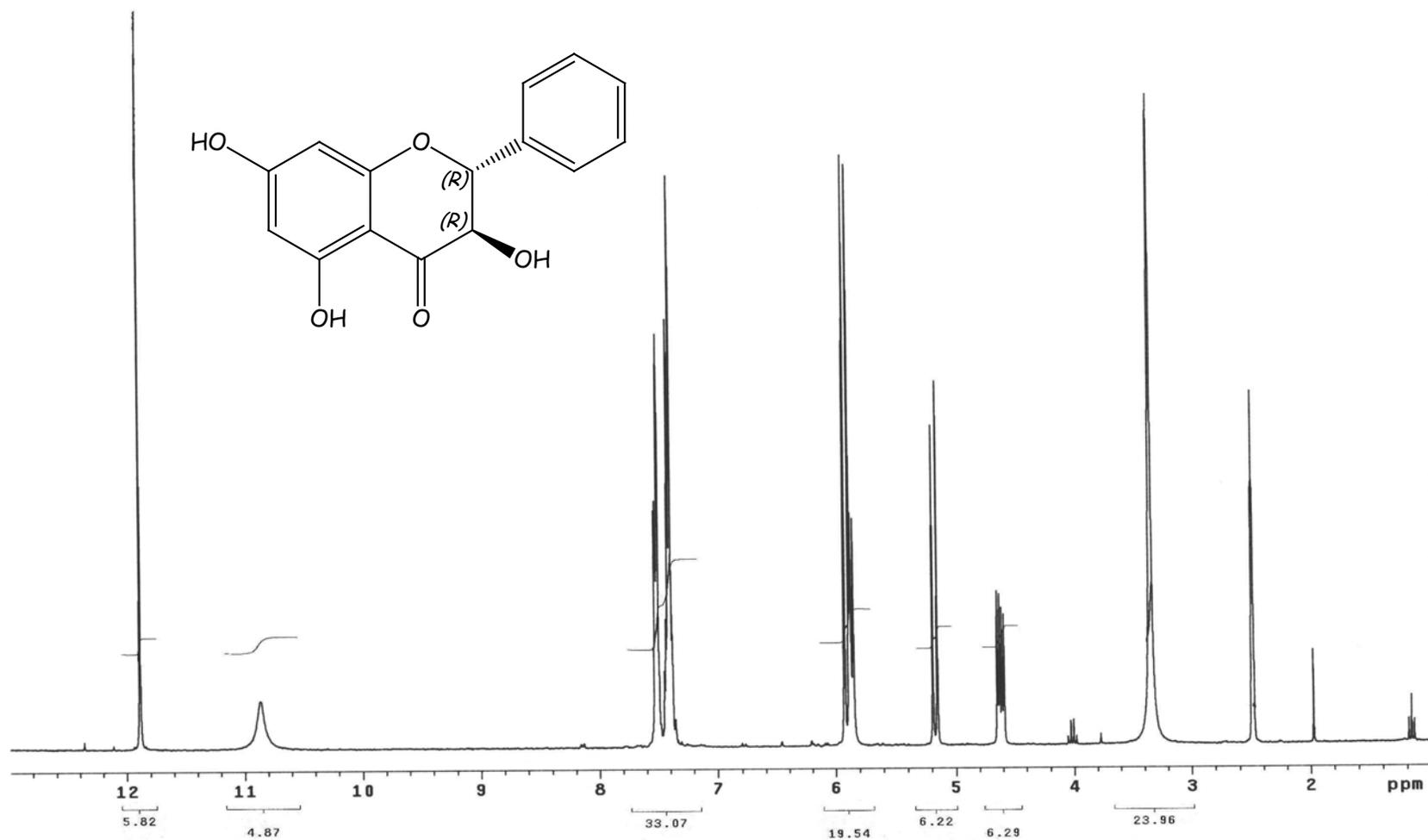
Espectro 8: COSY de la sakuranetina (8).

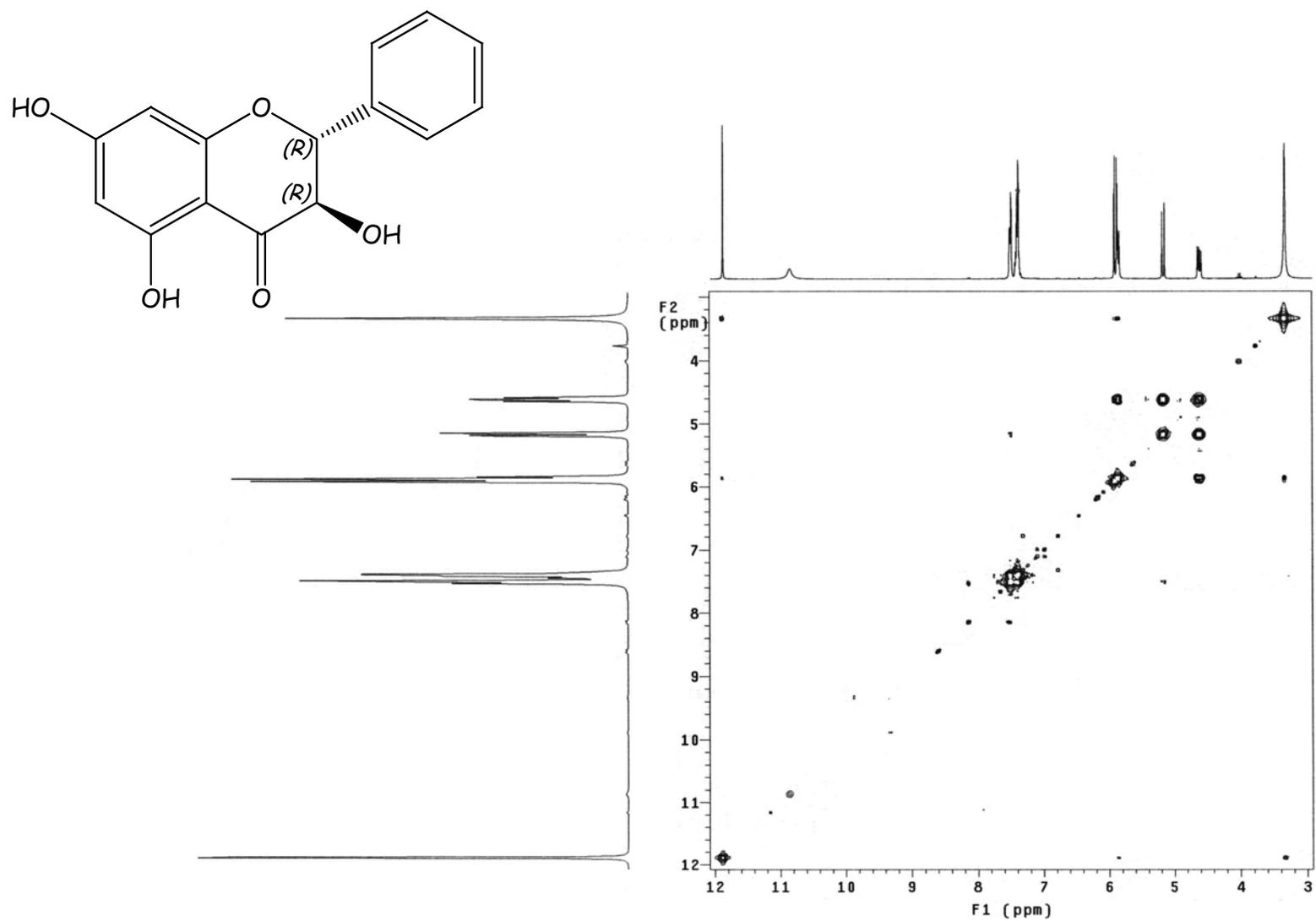


Espectro 9: EM IE de la sakuranetina (8).

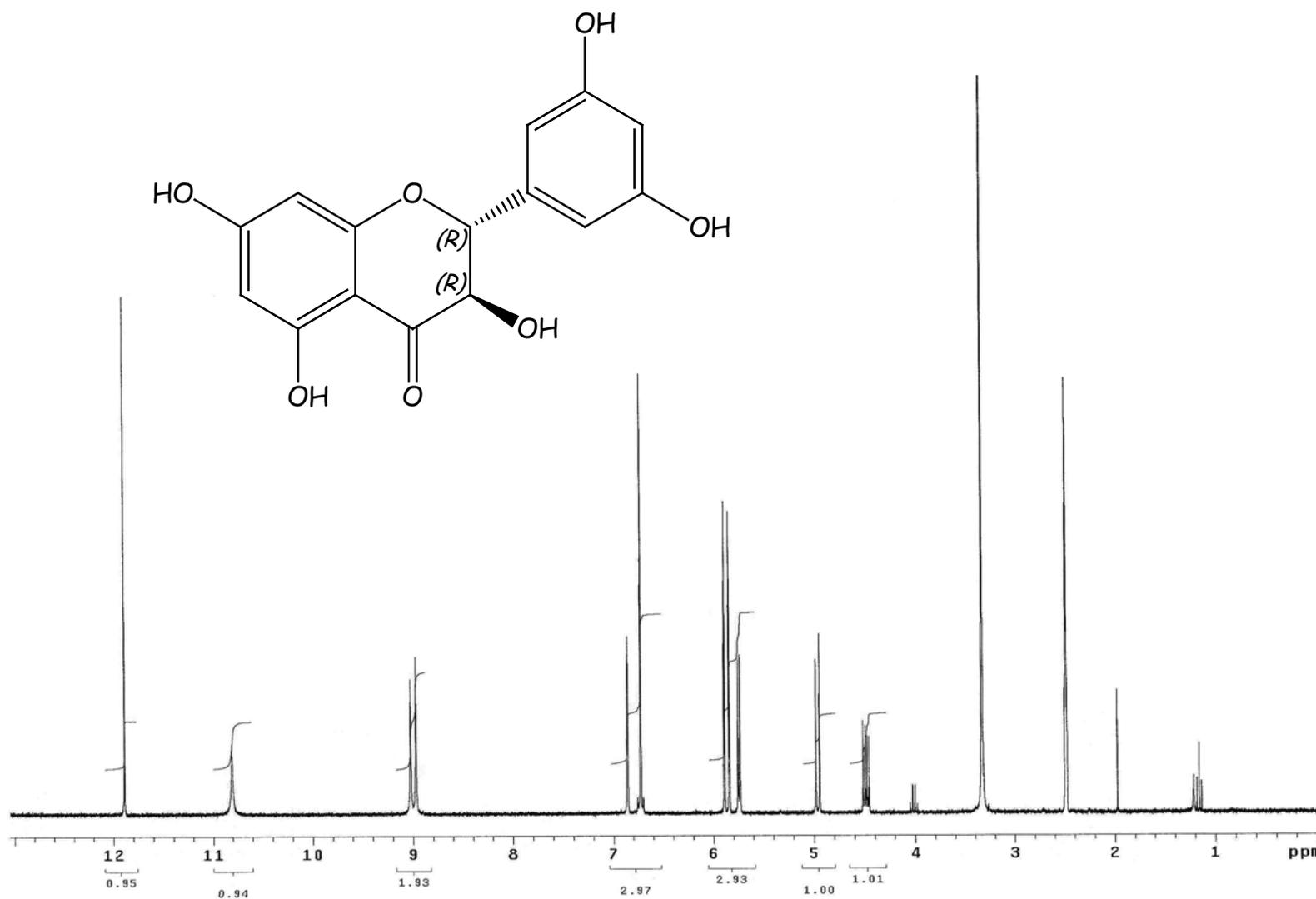
Espectro 10: RMN ^1H de la naringenina (9).

Espectro 11: RMN ^1H del eriodictiol (**10**).

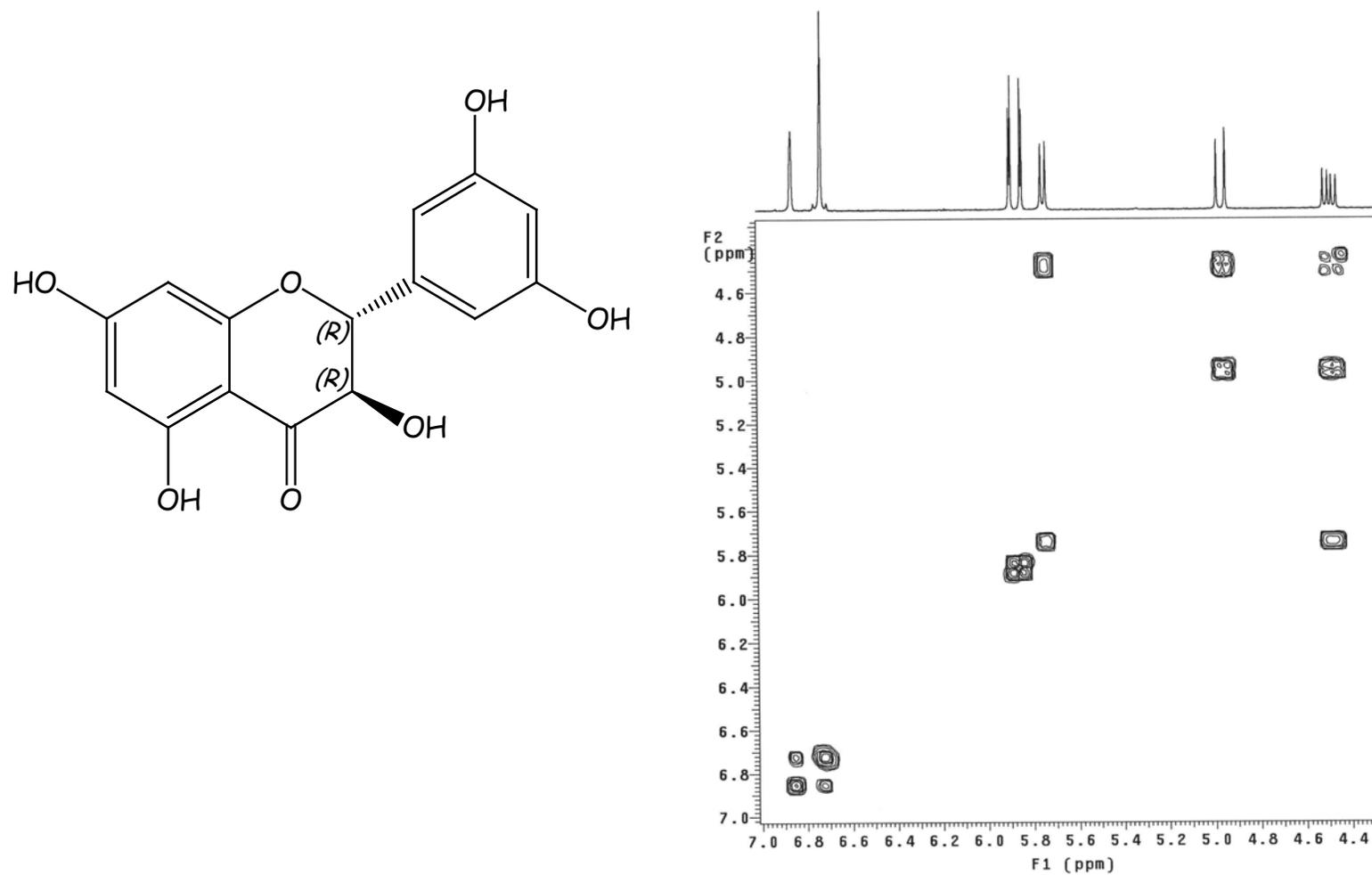
Espectro 12: RMN ^1H de la pinobankasina (11).

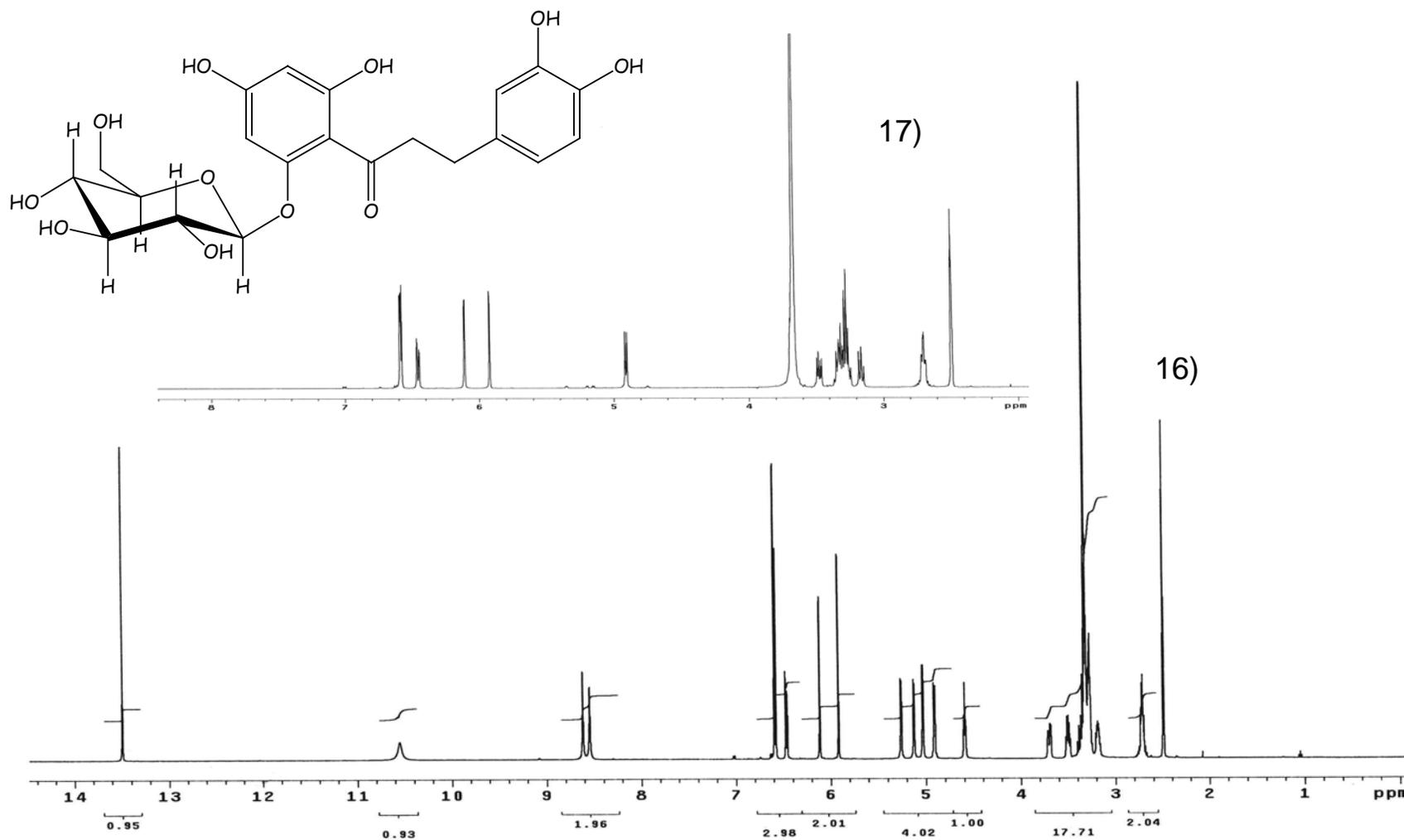


Espectro 13: COSY de la pinobankasina (11).

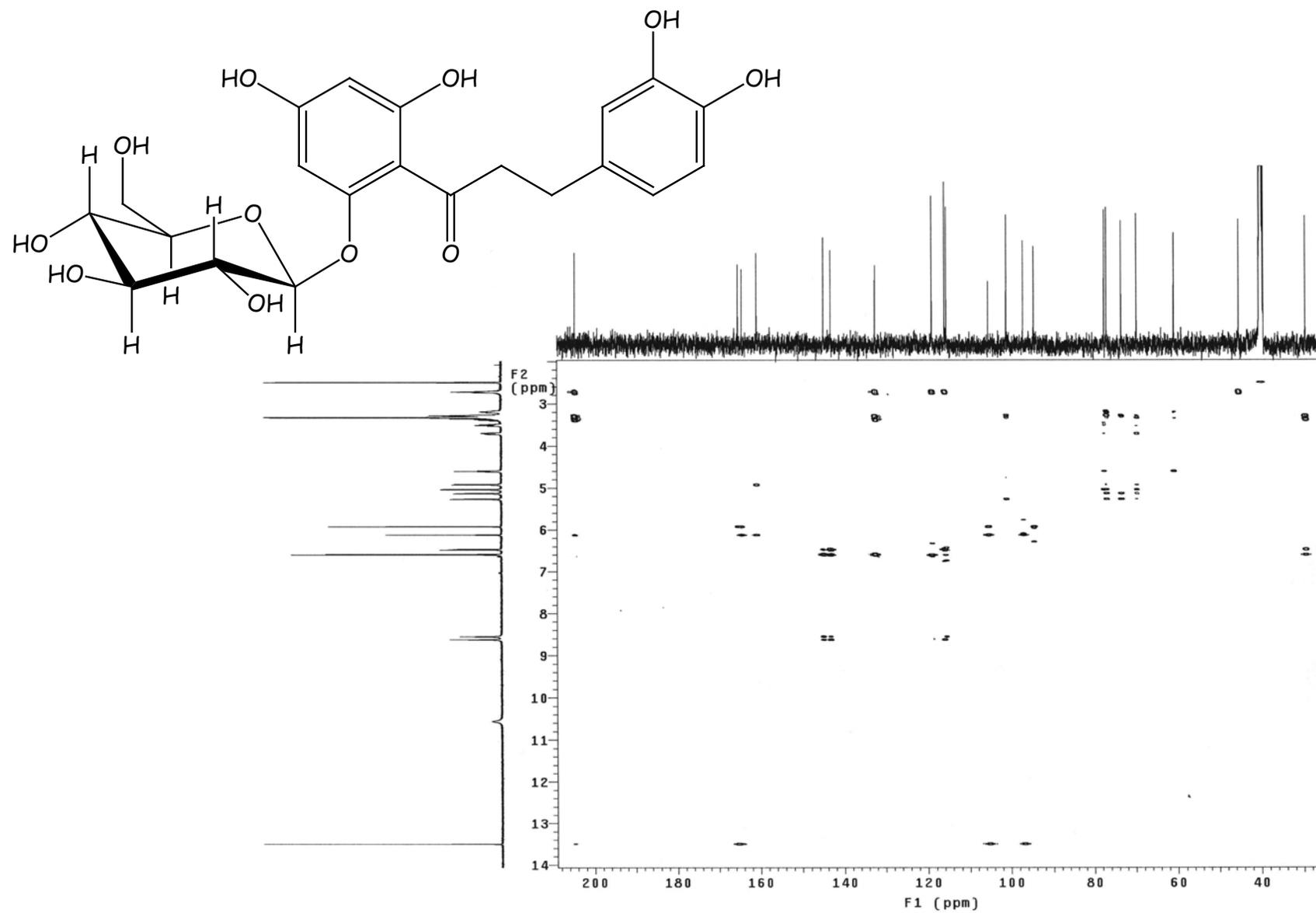


Espectro 14: RMN ¹H de la 3,5,7,3',5'-pentahidroflavanona (12).

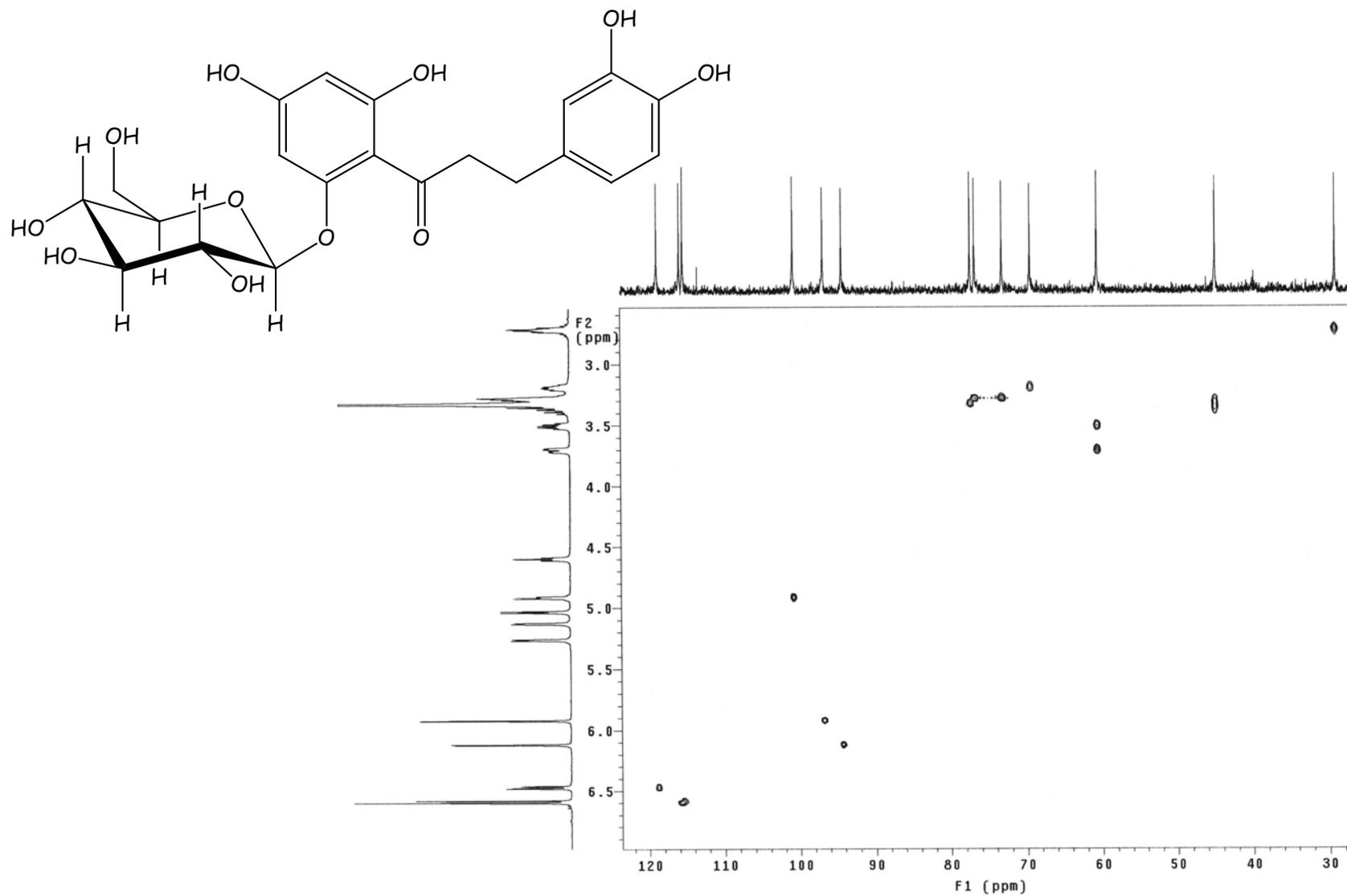
Espectro 15: COSY de la 3,5,7,3',5'-pentahidroxi-flavanona (**12**).



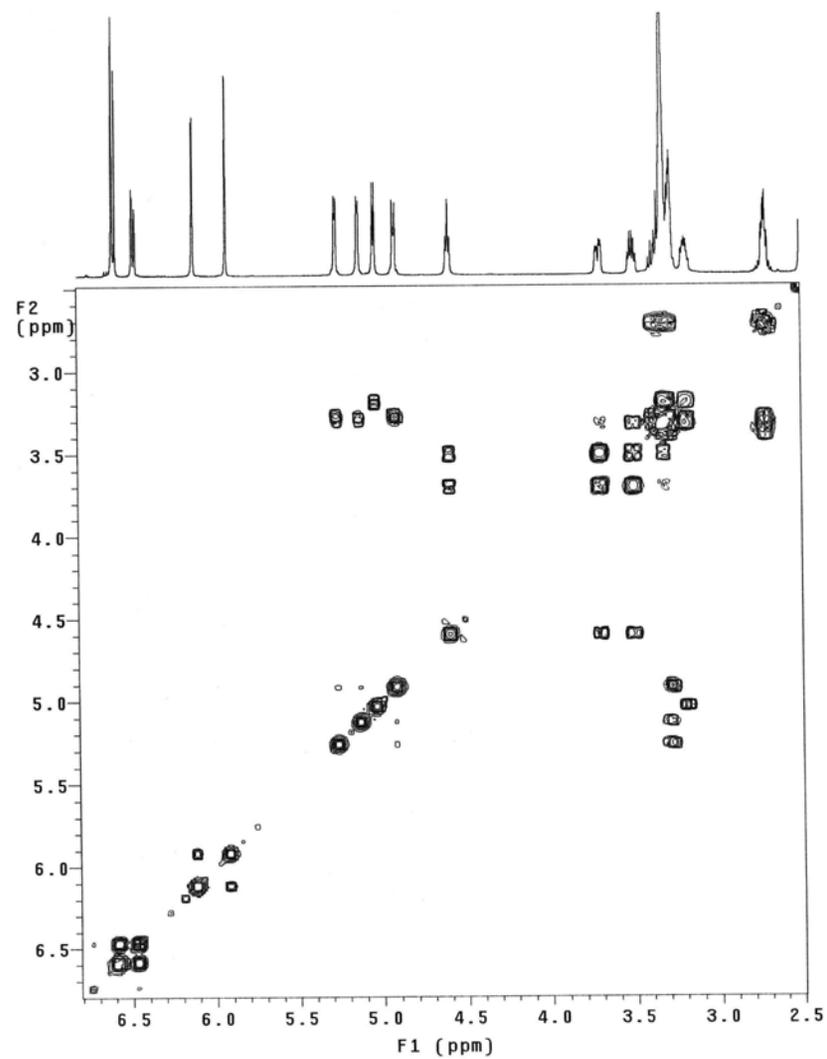
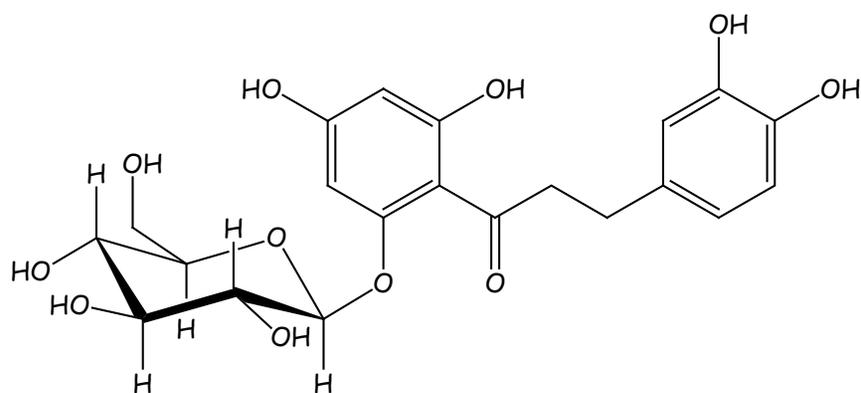
Espectro 16: RMN ^1H de la 3-hidroxi floridzina (**14**).
Espectro 17: RMN ^1H de la 3-hidroxi floridzina al adicionar D_2O .



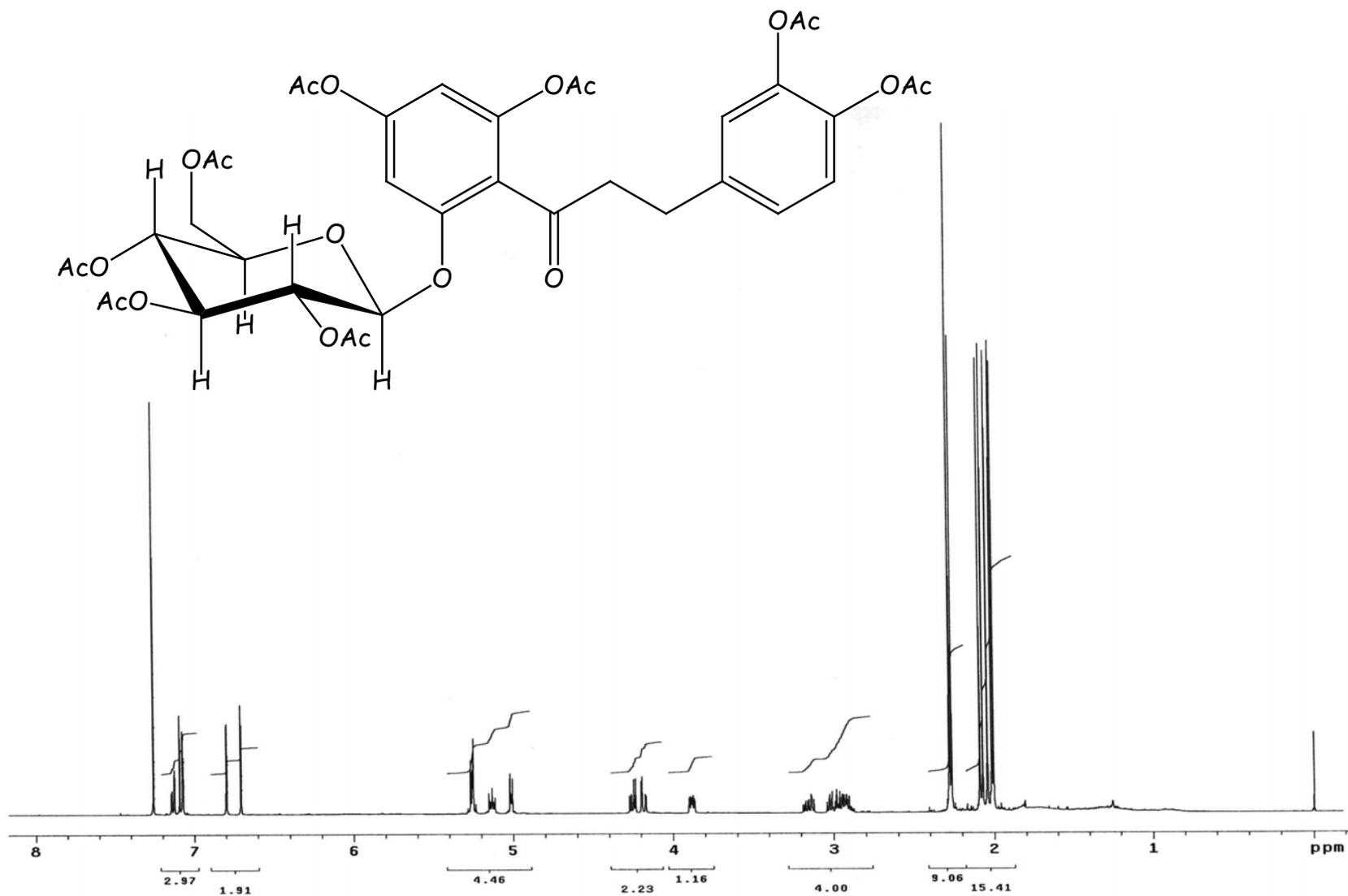
Espectro 18: HMBC de la 3-hidroxi floridzina (14).

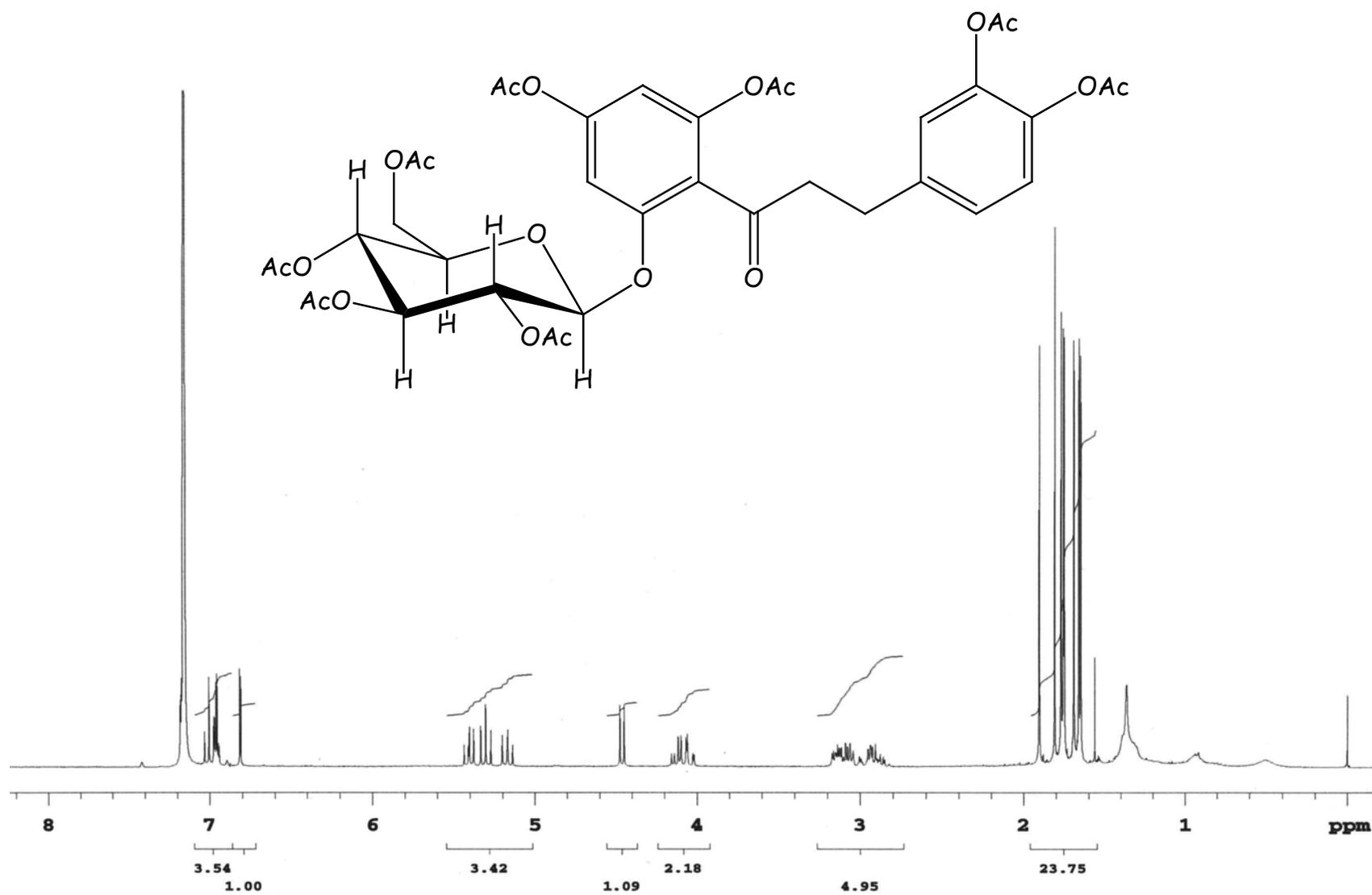


Espectro 19: HSQC de la 3-hidroxi floridzina (14).

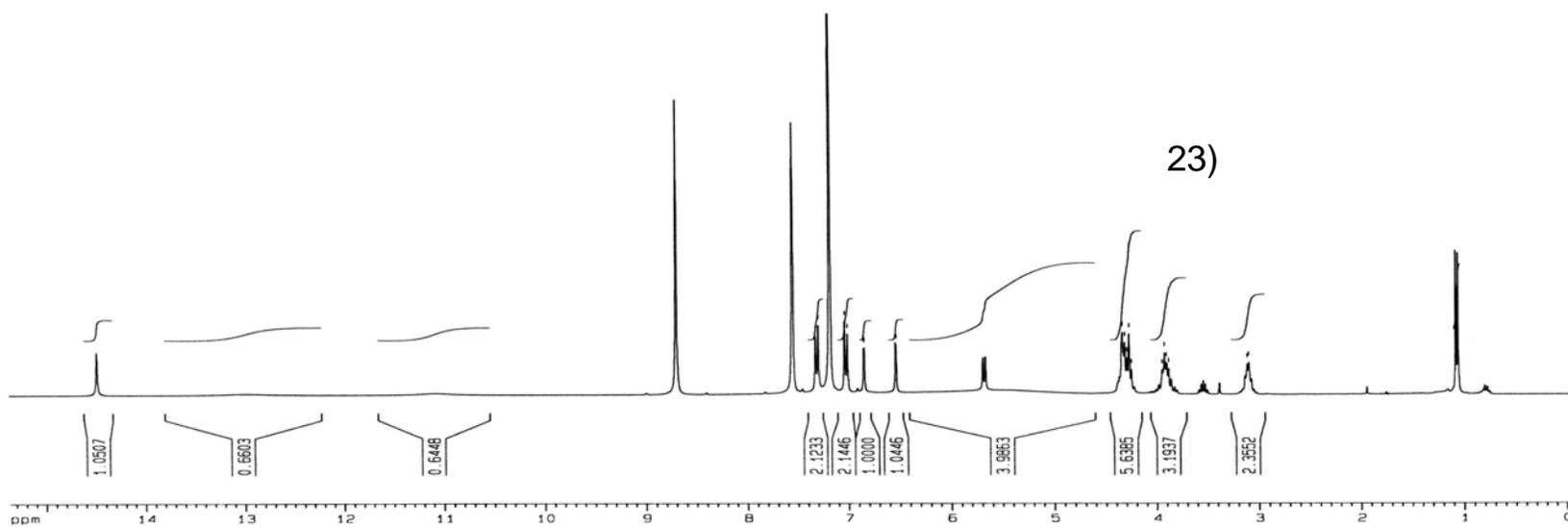
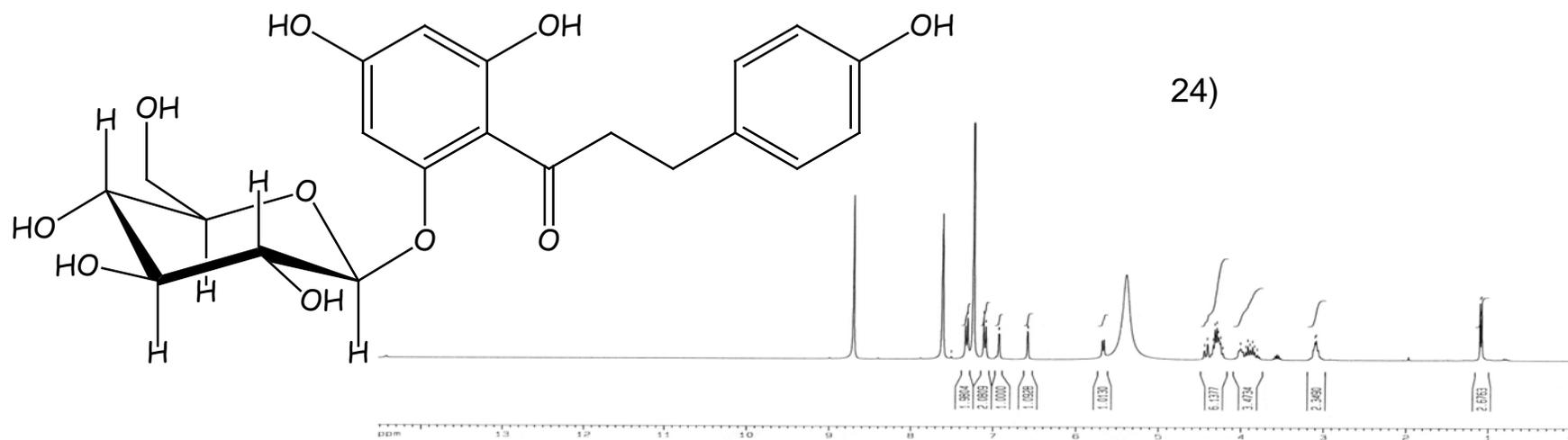


Espectro 20: COSY de la 3-hidroxi floridzina (**14**).

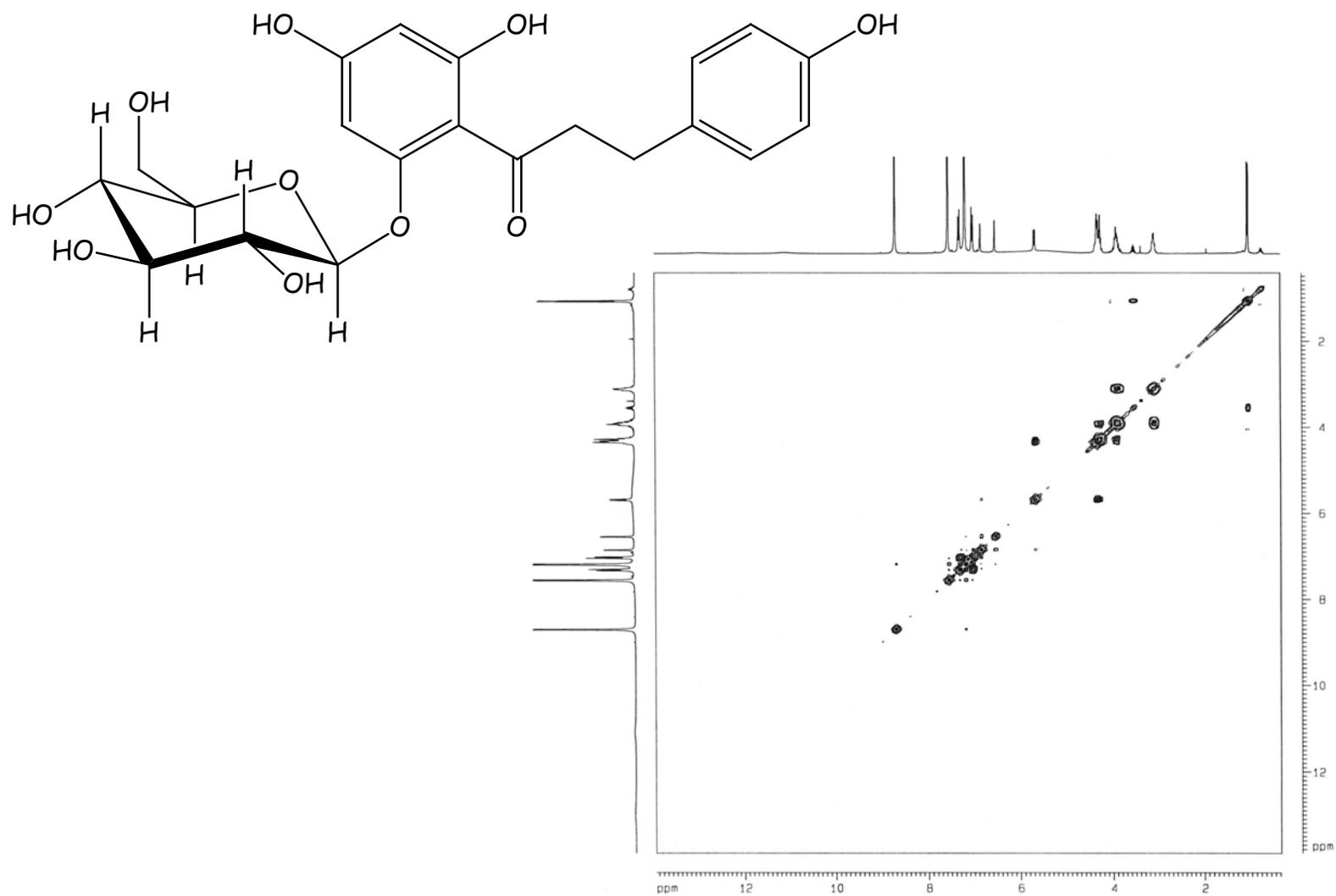
Espectro 21: RMN ^1H del octacetato-3-hidroxi floridzina (**14a**).



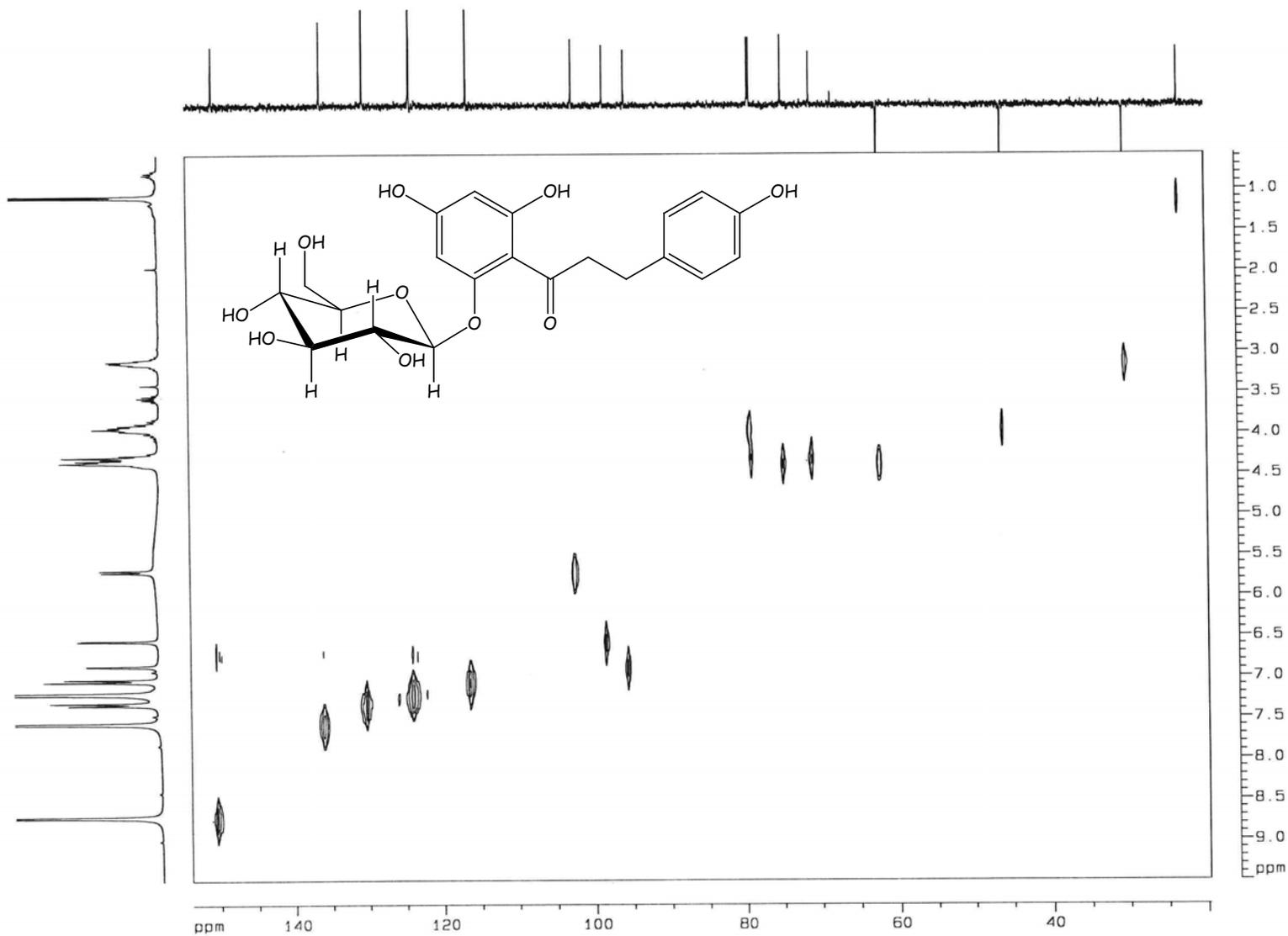
Espectro 22: RMN ^1H del octacetato-3-hidroxi florizina (**14a**) en C_6D_6 .



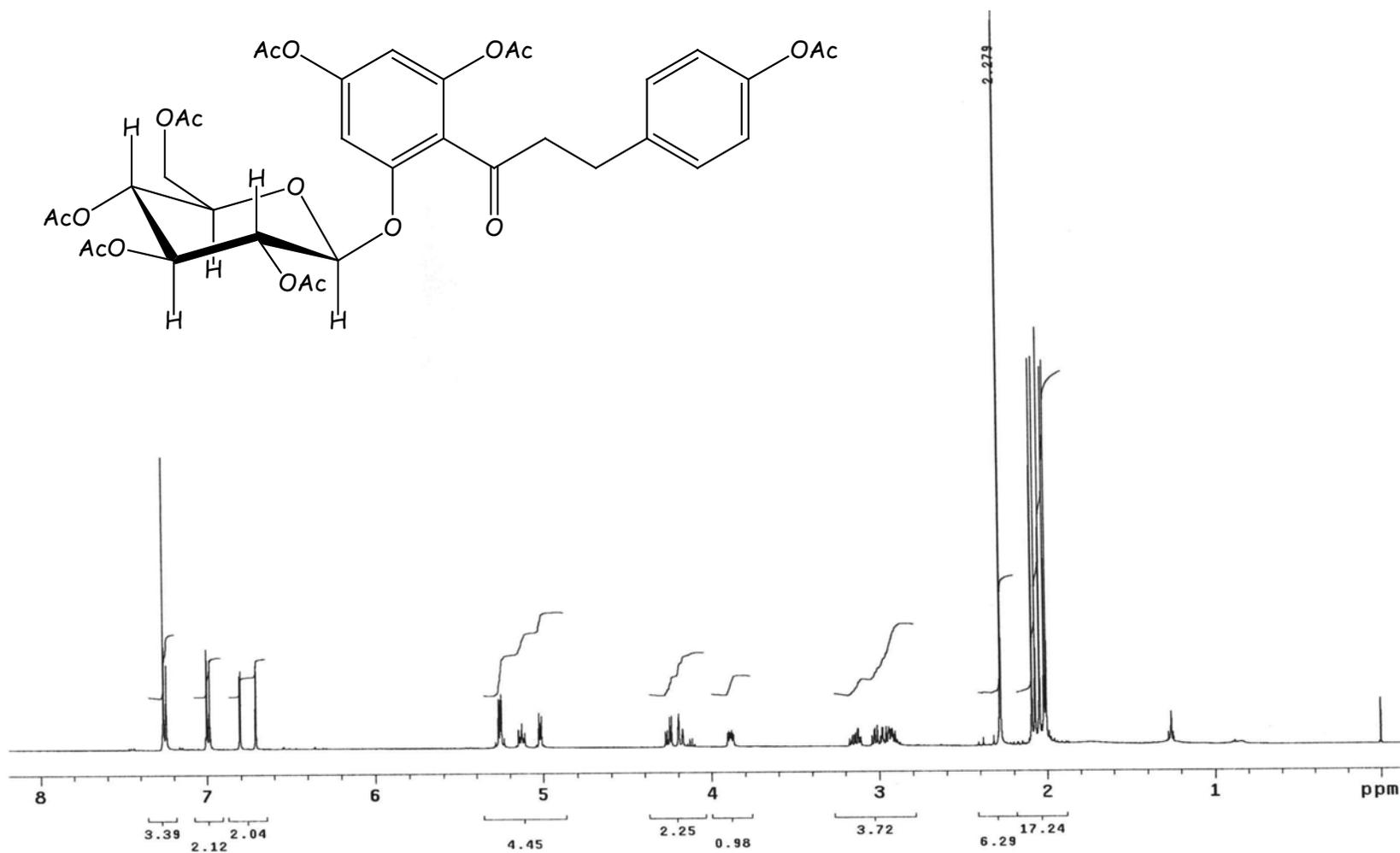
Espectro 23: RMN ^1H de la flordizina (**15**).
Espectro 24: RMN ^1H de la flordizina al adicionar D_2O .



Espectro 25: COSY de la flordizina (15).



Espectro 26: HETCOR de la flordizina (15).

Espectro 27: RMN ^1H del heptacetato de floridzina (15a).