



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

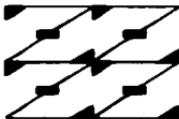
**"ESTUDIO QUÍMICO DE MACHAERANTHERA
TENACETIFOLIA -ARNICA MORADA-".**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

SUSTENTA:

ENRIQUE SERRANO SALDAÑA

DIRECTOR: Q. ARTURO E. CANO FLORES



LO HUMANO
ES
DE NUESTRA REFLEXION

MÉXICO D.F., OCT. DE 1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

**Esta tesis se desarrolló en el
Laboratorio de Química de Productos Naturales
L-314, de la Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza C-II, bajo la asesoría del
Químico Arturo E. Cano Flores.**

**El presente trabajo fue presentado
en el X Simposio de Estudiantes de Posgrado
"Fernando Romo", México D.F., Diciembre de 1996.**

*Dedico el presente trabajo
a la memoria de un gran amigo
M. en C. Alejandro Ruiz-Cascino.
Jamás olvidaré las personas excepcionales.
A la memoria de mi hermano
Fernando Soriano Saldívar.*

*Con infinito cariño, respeto y admiración
a mis padres Juan Soriano y María Saldívar
quienes a base grandes esfuerzos y sacrificios
me brindaron el legado más preciado, educación.*

*A mis hermanos Miguel, Carmen, Juana, Manuel,
Roberto, Leticia, Teobal y Gabriela, por su apoyo
fraternal en todo momento.*

*A mi esposa Claudia por su enorme cariño,
dedicación, compañía y apoyo incondicional en
todo momento.*

*A Manuel Alejandro, ese loco hijo que hizo
feliz mi vida desde que nació.*

*A todas aquellas amigas que han estado conmigo
en todos los momentos.*

Fraternamente a la FES ZARAGOZA...

*Mi agradecimiento al personal técnico-académico
del Instituto de Zoológicos de la UNAM, a la carrera
de Biología de la FES Zaragoza de la UNAM,
de manera especial al Sr. Arturo E. Cano Flores y
a todas aquellas personas que a bien, hicieron posible
la realización del presente trabajo.*

El que sabe más, vale más.

Saber es tener.

La moneda se fonde, y el saber no.

*Los libros o papel moneda, valen más, o menos, o nada,
el saber siempre vale lo mismo, y siempre mucho.*

Un hombre instruido es un hombre libre.

*vive de su ciencia, y como la lluvia en sí,
jamás se pierde, y su existencia es fácil y segura.*

José Martí (La Habana, 1976).

**“ESTUDIO QUÍMICO DE MACHAERANTHERA
TENACETIFOLIA -ARNICA MORADA-”.**

INDICE

Notaciones empleadas.	i
Resumen.	ii
Introducción.	1
Fundamentación Teórica.	4
A. Farmacognosia.	
B. Fitoquímica.	
C. Productos naturales.	5
Esquema 1. Diversidad de compuestos de origen vegetal.	7
D. Generalidades de la familia <i>Compositae</i> .	8
Tabla I. Ejemplos de metabolitos secundarios aislados de la familia <i>Compositae</i> .	10
E. Generalidades del género <i>Arnica</i> .	17
E.1 Botánica.	17
Esquema 2. División botánica del género <i>Arnica</i> propuesta por Maguire.	17
Tabla II. Principales localidades de México en las que se han colectado diferentes poblaciones de <i>Arnica morada</i> .	19
E.2. Química.	20
Tabla III. Metabolitos secundarios caracterizados en el género <i>Arnica</i> .	20

Tabla IV. Ejemplo de metabolitos secundarios aislados de diferentes especies del género <i>Arnica</i> .	21
E.3. Farmacología.	29
Tabla V. Ejemplo de Actividades biológicas de los metabolitos secundarios aislados del género <i>Arnica</i> .	32
F. Actividad biológica de productos naturales.	33
Planteamiento del Problema.	35
Objetivos.	36
Hipótesis de Trabajo.	37
Metodología.	38
1. Materiales.	38
2. Procedimientos.	42
2.1. Estudio químico del extracto acetónico.	42
Esquema 3. Diagrama de flujo seguido en el estudio químico de las partes aereas de <i>Machaeranthera tenacetifolia</i> .	47
2.2. Bioensayo de Toxicidad en <i>Artemia salina</i> .	48
Esquema 4. Diagrama de flujo seguido en el ensayo de toxicidad en <i>Artemia salina</i> .	49
Resultados.	50
Tabla VI. Descripción química de la sustancia I (S-I).	50
Tabla VII. Datos de espectroscopia de infrarrojo de los compuestos aislados.	51

Tabla VIII. Datos de espectroscopia de infrarrojo de los compuestos obtenidos como producto de reacción.	51
Tabla IX. Datos de índice de refracción de las sustancias obtenidas como producto de reacción.	52
Tabla X. Valores de concentración letal media de los bioensayos realizados en <i>Artemia salina</i> .	52
Discusión de Resultados.	53
Esquema 5. Formación del quelato con $FeCl_3$ y los grupos C_3-OH y $C=O$.	54
Esquema 6. Patrón de acoplamiento de los hidrógenos H-2', H-6' y H-5' del anillo B.	58
Esquema 7. Efecto de un grupo electrotractor sobre las posiciones C-2' y C-6'.	59
Tabla XI. Datos de índice de refracción (n_D), de algunas sustancias obtenidas como producto de reacción.	64
Tabla XII. Datos de infrarrojo de las sustancias de baja, mediana y alta polaridad, de la diferenciación cromatográfica del extracto acetónico del <i>Arnica montana</i> .	65
Conclusiones.	67
Sugerencias.	68

Glosario	69
Espectros.	70
• Espectro 1. RMN- ¹ H (200 MHz, CDCl ₃ , TMS), de la 5-hidroxi-7, 8, 3', 4'-tetrametoxiflavona (S-I)	70
• Espectro 2. IR (CHCl ₃), de la 5-hidroxi-7,8,3',4'-tetrametoxiflavona (S-I)	71
• Espectro 3. IR (CHCl ₃), de la sustancia II. (S-II)	72
• Espectro 4. IR (KBr), de la sustancia III. (S-III)	73
• Espectro 5. IR (KBr), derivado acetilado de la sustancia III. (S-III)	74
• Espectro 6. IR (KBr), derivado mesilado de la sustancia III. (S-III)	75
• Espectro 7. IR (CHCl ₃), de la fracción EC(68)	76
• Espectro 8. IR (KBr), de la fracción EC(103-119)	77
• Espectro 9. IR (KBr), de la fracción EC(267-280)	78
• Espectro 10. IR (KBr), de la fracción EC(281-296)	79
• Espectro 11. IR (CHCl ₃), de la fracción EC(406-416)	80
Bibliografía.	81

NOTACIONES EMPLEADAS

AcOEt	Acetato de Etilo.
CDCl ₃	Cloroformo deuterado.
CL ₅₀	Concentración Letal Media.
CCL ₄	Tetracloruro de Carbono.
COSY	Correlación Espectroscópica (RMN- ¹ H) Homonuclear.
CCF	Cromatografía en Capa Fina.
CCP	Cromatografía en Capa Preparativa.
CCV	Cromatografía en Columna a Vacío.
δ	Desplazamiento químico.
d	Doblete.
EM (IE)	Espectrometría de Masas por impacto electrónico.
UV	Ultravioleta.
IR	Infrarrojo.
Hex	Hexano.
λ	Longitud de onda.
m	Multiplete.
v	Número de Onda.
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno.
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13.
s	Singlete.
TMS	Tetrametilsilano.
O- <i>i</i> BUT	Grupo isobutiriloxilo.
O- <i>i</i> VAL	Grupo isovaleriloxilo.
MEXU	Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM, México D.F.
CHAPA	Herbario de la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma de Chapingo.
CIIDIRD	Herbario del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, IPN, Durango, Durango.
TEXASH	Herbario de la Universidad de Texas.
AUAH	Herbario de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.
AUSLPH	Herbario de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
o-	orto.
m-	meta.
p-	para.

RESUMEN

En el presente trabajo se describe el análisis químico preliminar de *Machaeranthera tenacetifolia* -arnica morada-, especie vegetal usada en la medicina tradicional mexicana.

Del estudio químico del extracto acetónico de las partes aéreas, se aisló y caracterizó a la 5-hidroxi-7, 8, 3', 4'-tetrametoxiflavona y dos sustancias adicionales, las cuales continúan en proceso de caracterización.

Por otro lado, se evaluaron los extractos crudos -hexánico, acetónico y etanólico- de las partes aéreas de dicha especie vegetal frente *Artemia salina*, resultando no ser activos ninguno de los extractos para este organismo.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento y la utilización de las plantas por las sociedades humanas tiene una larga e interesante historia, reconociéndose que desde siempre los vegetales satisfacen muy diversas necesidades y una de ellas es la recuperación y el mantenimiento de la salud.

En México, esta historia es milenaria y se remonta a los tiempos en que organizados en bandas nómadas o seminómadas, los grupos humanos recorrían el territorio buscando cobijo temporal en cuevas, y sustento en la práctica de la caza, la pesca y la recolección de plantas silvestres. Estos grupos, grandes conocedores de las posibilidades alimenticias y propiedades curativas de la flora silvestre, heredaron toda su sabiduría a los pueblos agrícolas, origen de las culturas del México antiguo. Las sociedades prehispánicas creadoras de las grandes ciudades y centros ceremoniales, contaban con un sistema de producción complejo, además de su organización social, donde la religión jugaba un papel predominante. Por otro lado, consiguieron desarrollar una tecnología capaz de alcanzar la superación y el mejor desarrollo de la población. El aprovechamiento de los recursos naturales en beneficio de la salud -vegetales, animales y minerales-, incluía tratamientos curativos, prácticas de higiene, cuidado y embellecimiento del cuerpo humano, entre otros. A pesar de tanto tiempo, la herbolaria mexicana permanece como parte integral de nuestra herencia cultural.

Los primeros testimonios que se tienen sobre el uso de las plantas medicinales mexicanas se remontan a épocas prehispánicas, teniendo como testimonio los códices y los murales de Tepantitla, donde quedaron plasmadas las pinturas de especies medicinales autóctonas. Es en el siglo XVI, cuando aparecen formalmente los primeros documentos que relatan el conocimiento médico herbolario que poseían las diferentes culturas mexicanas.

Entre las obras que destacan de ésta época, se encuentra el Códice Florentino escrito por Fray Bernardino de Sahagún, dedicando el libro XI al tema de "Hierbas Medicinales", la obra de Martín de la Cruz traducida al latín por Juan Badiano denominada "*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*", que viene siendo el primer herbario de la flora medicinal mexicana y por último, "Historia Natural de la Nueva España" del médico naturista Francisco Hernández, esta última obra contiene información acerca de tres mil setenta plantas, donde destacan la zarzaparrilla, la raíz de jalapa y la raíz de michoacán.

Al surgimiento del mestizaje como raza entre los pobladores de la Nueva España, la herbolaria experimentó un proceso de unión con los médicos europeos. De esta manera, la herbolaria mexicana actual es un híbrido, ya que por un lado se utilizan las plantas nativas y por otro lado, las plantas extranjeras -manzanilla, albahaca, hierbabuena, entre otras-, vemos a la herbolaria mestiza unida a medicamentos de patente o a escritos mágicos religiosos.¹

Por otro lado, en cuanto a su diversidad biológica, México cuenta con aproximadamente veinti seis mil especies vegetales, lo cual lo sitúa como el cuarto país con mayor riqueza en el mundo, en su inventario están representadas prácticamente todos los tipos de vegetación conocidos y su aporte a la herbolaria mundial se calcula aproximadamente en más de cinco mil especies vegetales con uso medicinal.

A la abundancia mencionada se agrega la incorporación permanente de nuevas plantas medicinales nativas o introducidas, tanto silvestres como cultivadas; de modo que al incrementarse el acervo de la herbolaria mexicana se observa un fortalecimiento de la medicina tradicional que además de contener en su esquema cognoscitivo a la herbolaria, sigue incluyendo a los animales y a los minerales medicinales en sus prácticas terapéuticas¹⁻³.

¹ Investigación hemerográfica personal realizada en el Centro de Investigación Documental en Salud del IMSS, Centro Médico Siglo XXI.

Por otra parte, dado que la mayoría de los medicamentos que se conocen en la actualidad fueron sintetizados a partir de prototipos de metabolitos secundarios aislados de plantas medicinales, resulta de suma importancia el estudio fitoquímico y la evaluación biológica preliminar de la especies vegetales de nuestro país que son empleadas en la medicina tradicional.

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se dan a conocer los resultados preliminares obtenidos del estudio químico y la determinación de la toxicidad de los extractos crudos en *Artemia salina* de *Machaeranthera tenacetifolia*, conocida popularmente como *Arnica morada* (*Compositae*), la cual es empleada en la medicina tradicional como antiinflamatoria, cicatrizante y para problemas relacionados con el aparato digestivo⁽⁴⁾.

FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA

A. FARMACOGNOSIA

La farmacognosia -el conocimiento de los remedios-, se define como el estudio de las materias primas naturales de uso medicinal. En un inicio abarcaba el estudio en conjunto de las drogas minerales, animales y vegetales utilizadas en Farmacia⁵¹.

Inicialmente empírico, este conocimiento de origen natural se ha convertido en el fruto de una endidura rigurosamente científica y necesariamente multidisciplinaria. El campo que abarca la farmacognosia es muy amplio: recursos vegetales (plantas o partes de plantas, secreciones vegetales, entre otros), recursos animales (hormonas, enzimas, entre otros), compuestos elaborados por microorganismos (antibióticos, vitaminas, entre otros), y continua acrecentando su radio de acción con la ayuda de la biotecnología y los avances técnico-científicos.

B. FITOQUIMICA

El término fitoquímica o química de las plantas, ha sido considerado en los últimos años como una disciplina distinta, algunas veces entre química orgánica de los productos naturales y bioquímica de las plantas y otras como un término único englobando ambas⁶¹.

El campo de acción de la fitoquímica involucra una gran cantidad de sustancias que se elaboran y se acumulan en plantas medicinales, su distribución, biosíntesis, acción metabólica, distribución natural y función biológica. En todos estos rangos de acción son necesarios los métodos de separación, purificación e identificación.

Actualmente las líneas de investigación en fitoquímica son más integrales, ya que no solo involucran el aislamiento, purificación e identificación de los metabolitos secundarios, sino que ahora, al incorporar técnicas de ensayos biológicos es posible determinar su actividad biológica y farmacológica¹⁷¹.

C. PRODUCTOS NATURALES

Los productos naturales -metabolitos secundarios-, son sustancias que comúnmente son parte de la química orgánica. Como tal son reconocidos como sustancias de peso molecular limitado con una amplia variedad estructural; sin embargo, la definición real de un producto natural o metabolito secundario aún no es muy precisa.

Se han propuesto varias hipótesis¹⁸¹ que intentan aclarar y especificar la función de los metabolitos secundarios, algunas lo relacionan con la economía metabólica de la planta y otras con su grado de acondicionamiento para sobrevivir.

* Son producto de mutaciones que permiten persistir a una especie por muchas generaciones.

* Representan un ejemplo de evolución de la especie, basado en la idea general de que un metabolito secundario aporta un reservorio de variedades no funcionales de un nuevo proceso que puede emerger.

* Los metabolitos secundarios son producto de desecho o de desintoxicación de la especie vegetal.

* La síntesis de enzimas que son designadas para elaborar un metabolito secundario permiten la operación de otras enzimas del metabolito primario.

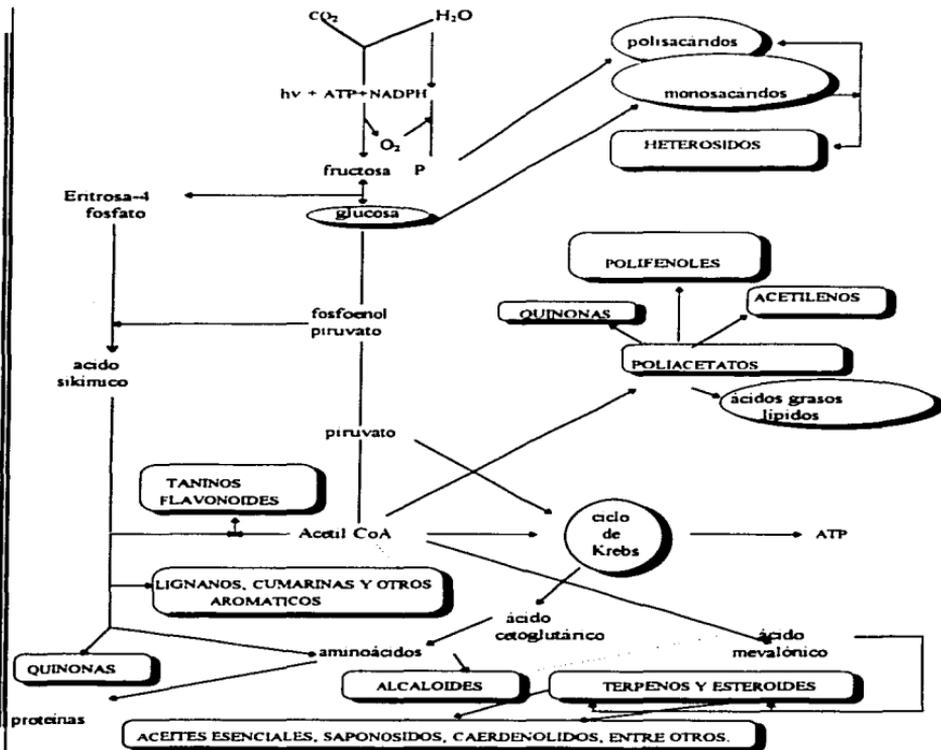
* En algún punto de la vida de un organismo, los metabolitos secundarios tienen un papel especial.

* Los metabolitos secundarios son una medida de la capacidad de un organismo para sobrevivir a medios adversos.

Resulta difícil proponer una definición única, ya que todas las hipótesis que se manejan tienen cierto grado de aceptación y funcionan en un momento dado.

La gran diversidad de compuestos de origen natural pueden agruparse en taninos, flavonoides, cumarinas, entre otros (Esquema 1).

Esquema 1: Diversidad de Compuestos de Origen Vegetal⁽¹⁾



D. GENERALIDADES DE LA FAMILIA COMPOSITAE

En nuestro país sobresalen alrededor de dos mil plantas medicinales, de las más conocidas el 78% se emplea para la atención de problemas digestivos, respiratorios y de la piel⁹¹; de ahí la necesidad de formar un cuadro básico de plantas a las que se les comprueben sus propiedades medicinales para que se conviertan en un recurso médico de validez.

Generalmente cuando comienza el estudio químico de alguna planta medicinal gran parte de la información científica que se obtiene, es resultado de la clasificación taxonómica y del estudio ecológico de la especie en cuestión.

La gran amplitud altitudinal de México, su ubicación a ambos lados del Trópico de Cáncer y la influencia oceánica debida a la estrechez de la masa continental, son quizá los factores determinantes más significativos del clima que prevalece en el país y de su diversidad. Como factores de segundo orden, y particularmente a nivel regional, pueden considerarse: la forma misma del territorio de la República, su complicada y variada topografía, la situación de sus principales cordilleras, así como la ubicación de una gran parte de México en la porción occidental de Norteamérica.

Son bien conocidas las correlaciones que lleva la altitud con la presión atmosférica, con la cantidad de oxígeno disponible y con las temperaturas, todos estos elementos son de suma importancia para la vida de los organismos. La complicada topografía, unida a las diferencias determinadas por la latitud y la altitud, dan como resultado un mosaico climático con un número muy grande de variantes.

Por otra parte, las temperaturas medias anuales más elevadas (28-30°C), son las que se registran en la parte baja de la Depresión del Balsas y en algunas zonas costeras adyacentes, y las más bajas (-6°C) son las calculadas por la cima del Pico de Orizaba, haciendo abstracción de estas condiciones "casi excepcionales", cabe observar que los valores más frecuentemente registrados en el país varían entre 10 y 28°C.

Bajo estas condiciones templadas, cálidas y tropicales de montaña, se favorece el crecimiento de matorrales xerófilos, pastizales y bosques de pino y encino que son los lugares donde se registra el crecimiento de las Compuestas (*Asteraceae*)^[10].

De la gran variedad de plantas que conforman el hábitat natural, la familia *Compositae* es la más vasta dentro de las fanerógamas y la que cuenta con una mayor distribución en el mundo. La familia *Compositae* está constituida por hierbas, arbustos y árboles con hojas alternadas y opuestas, las flores son hermafroditas, unisexuales o estériles, actinomorfas o cigomorfas, con cáliz ausente o sustituido por pappus o vilano el cual sirve para la diseminación de los frutos, las flores se encuentran agrupadas en cabezuelas o capitulos^[11].

Se conocen 316 géneros de esta familia distribuidos en 13 tribus^[9], las cuales son: *Heliantheae*, *Helenieae*, *Astereae*, *Eupatorieae*, *Inuleae*, *Anthemideae*, *Calenduleae*, *Cardueae*, *Mutisieae*, *Cichorieae*, *Senecioneae*, *Vernonieae* y *Arctoteae*.

El género *Arnica* se encuentra aparentemente dentro de la tribu *Heliantheae*, la cual constituye el grupo dominante de la familia *Asteraceae*; alcanza una mayor diversificación y abundancia en las partes montañosas entre 1000 y 2000 m snm, escasa a más de 3000 m snm, e inexistente en el Norte de Alaska^[12].

Químicamente la familia *Compositae* está constituida por una gran cantidad de metabolitos secundarios, los cuales se han clasificado en los siguientes grupos:

- ✓ Aceites esenciales
- ✓ Diterpenos
- ✓ Triterpenos
- ✓ Flavonoides
- ✓ Alcaloides

- ✓ Fructanos de tipo inulina
- ✓ Ciclitolos
- ✓ Compuestos acetilénicos
- ✓ Lactonas sesquiterpénicas
- ✓ Cumarinas

Los aceites esenciales y los diterpenos estan ampliamente distribuidos a diferencia de los alcaloides, glucósidos cianogénicos, amidas, cumarinas, y diversos constituyentes fenólicos, que tienen una distribución limitada; algunos de ellos se enlistan en la Tabla I.

Tabla I. Ejemplos de metabolitos secundarios aislados de la familia *Compositae*.

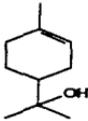
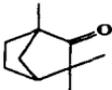
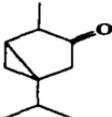
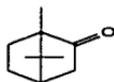
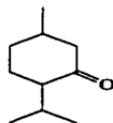
ACEITES ESENCIALES		
		
terpinol	fenchona	tujona

Tabla I (continuación).



alcanfor

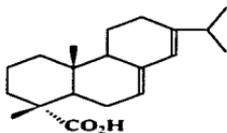


mentona

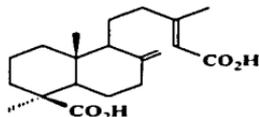


α -pineno

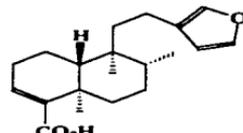
DITERPENOS



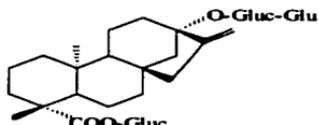
Acido abiético



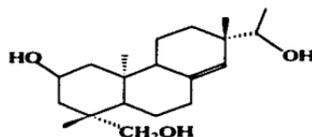
Acido agático



Acido hardwickico



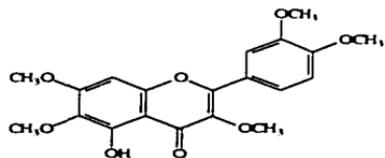
Esteviósido



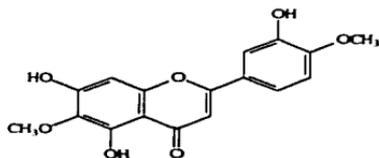
Kireanol

Tabla I (continuación).

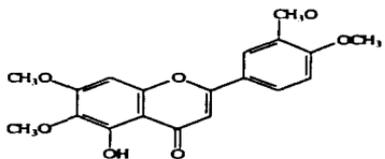
FLAVONOIDES



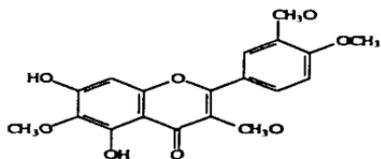
artemetina



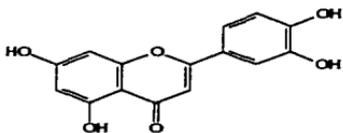
cupaterina



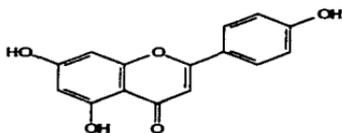
tetrametoxi flavona



contaureidina



luteolina



apigenina

Tabla I.(continuación).

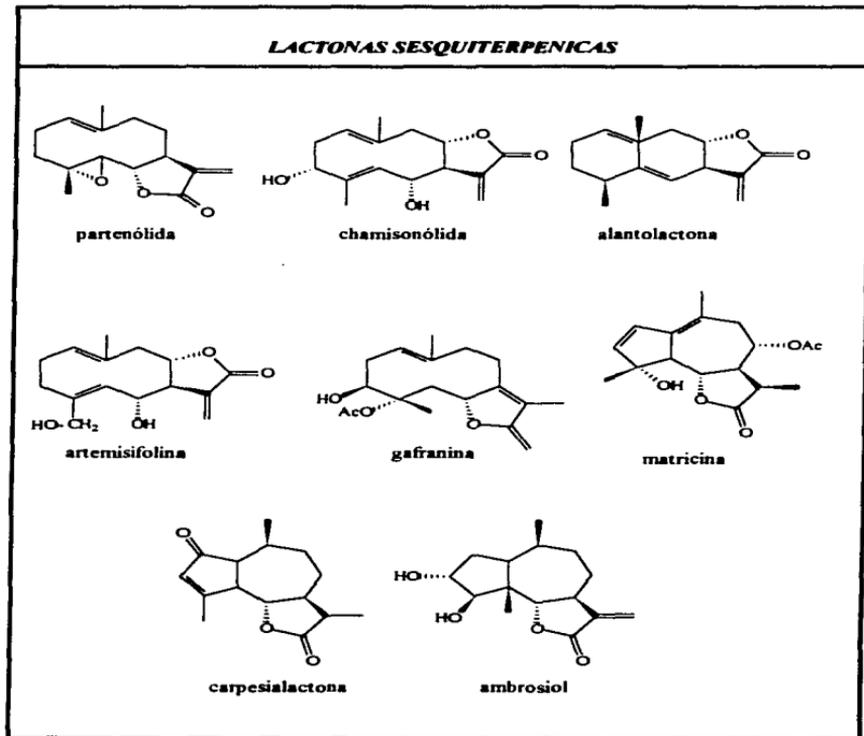
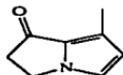
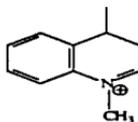


Tabla I (continuación).

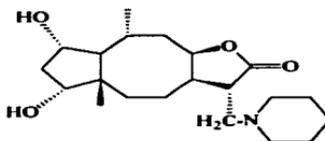
ALCALOIDES



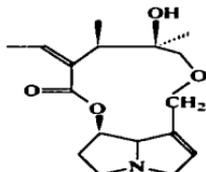
Fereomona



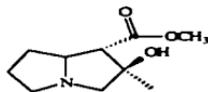
Echinorina



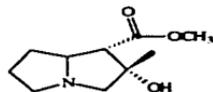
Pulchelinina



Senecionina



Tusilagina



Isotusilagina

Tabla I.(continuación).

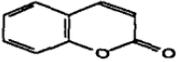
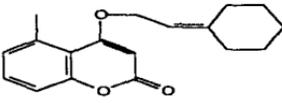
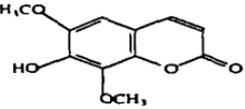
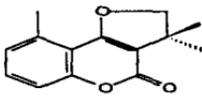
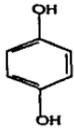
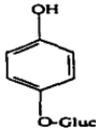
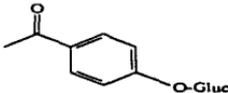
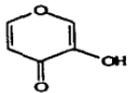
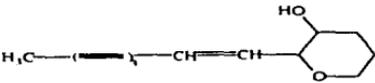
CUMARINAS			
 <p>Cumarina</p>	 <p>Gerberacumarina</p>	 <p>Isofraxidina</p>	
	 <p>Isogerbera cumarina</p>		
COMPUESTOS FENOLICOS			
 <p><i>p</i>-hidroxifenol</p>	 <p>Arbutina</p>	 <p>Piceina</p>	 <p>Ac. piromecónico</p>

Tabla I.(continuación).

COMPUESTOS ACETILENICOS	
 <p style="text-align: center;">Capilleno</p>	 <p style="text-align: center;">Ichtioterol</p>
AMIDAS	
 <p style="text-align: center;">Echinaccina</p>	
 <p style="text-align: center;">Anaciclina</p>	

Por último, la familia *Compositae* cuenta con marcadores quimiotaconómicos de tipo benzopirano (cromonas) y benzofuranos^[13-14], sin descartar a las tiarubinas^[15], tertiofenos y polienos por sus interesantes propiedades biológicas^[16], entre las cuales se pueden citar: antimicrobiana, antiviral y citotóxica.

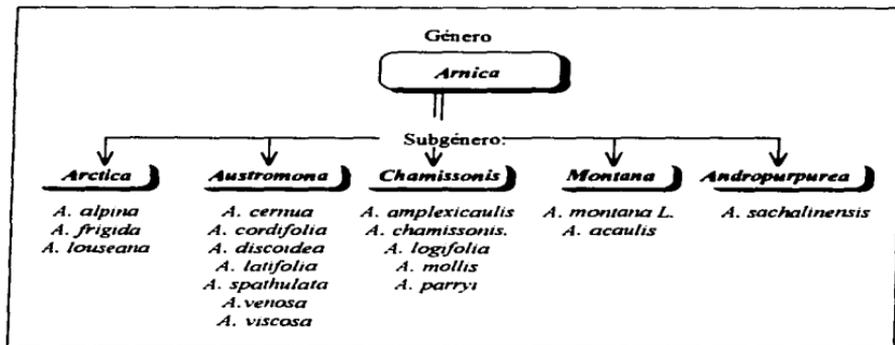
E. GENERALIDADES DEL GENERO ARNICA

E.1. BOTANICA

El género *Arnica* se clasifica en la tribu *Senecioneae*^[17-18]; sin embargo, por medio de perfiles químicos algunos autores la han asociado con la tribu *Heliantheae*^[13], *Chaenactidinae*^[17], y *Gaillardinae*^[19]. Otros autores prefieren establecer provisionalmente la tribu *Arniceae*^[15, 17].

La complejidad de su clasificación esta dada por el polimorfismo que presentan las diversas especies de éste género, la cual se acentúa por la diversidad de metabolitos secundarios que presentan dichas especies; sin embargo, en un intento por ordenar la información existente, Maguire^[17] en el verano de 1943, dividió el género en 32 especies englobadas en 5 subgéneros. (Esquema 2)

Esquema 2: División botánica del género *Arnica* propuesta por Maguire.



Las plantas del género *Arnica* son herbáceas de 10 a 90 cm de altura, vellosas, flores en cabezuelas amarillas, de olor débil y sabor amargo. Generalmente florecen en agosto o septiembre^{14,17}.

Particularmente el *Arnica morada* es una planta bianual que mide de 20 a 50 cm de altura. Las hojas están al ras del suelo, son angostas y terminan en forma de espina en la punta, y cinco dientes en cada borde de las hojas con espinas. Las flores están agrupadas en cabezuelas que tienen unas lengüetas de color rosa o débilmente púrpuras.

Es originaria de Texas y México y habita en áreas con clima seco, semiseco y templado entre los 1890 a los 2700 m snm. Crece asociada a matorral xerófilo y bosques de pino y de encino¹³⁵. Los lugares donde se han colectado especímenes clasificados dentro de éste género se ilustran en la Tabla II.

En México, se conocen por lo menos cinco plantas que reciben el nombre de arnica diferenciadas en función del color de sus ligulas, de acuerdo al Instituto Nacional Indigenista¹³⁵.

- * *Heterotheca inuloides* (Falsa arnica)
- * *Tithonia diversifolia* (Arnica)
- * *Trixis inula* (Arnica)
- * *Machaeranthera tenacetifolia* (Arnica morada) y
- * *Galphimia glauca* (Arnica roja)

Tabla II. Principales localidades en las que se han colectado diferentes poblaciones de *Aruca morada*².

DESCRIPCIÓN BOTANICA	HABITAT	HERBARIO	LOCALIDAD
Herbácea perenne de 20 cm de altura. Flores moradas en abundancia	Orilla de la carretera	MEXU, UANLPH	8 Km de la Cd. de SLP, carretera SLP-Río Verde Alt. 1880 m snm
Herbácea perenne de 30 cm de altura, ligulas moradas con centro amarillo	Suelo café arcilloso, abundante en cultivos de maíz	MEXU, CHAPA	Km 49.5 de la carretera Zacatecas-Aguascalientes
Herbácea perenne de 20 cm de altura, flores moradas	Matorral espinoso, acacia y opuntia en abundancia	MEXU, ATAH	Mpio de Cosío, 5 Km al N de Zacatequillas. Alt. 1960 m snm
Hierba anual de 20 a 30 cm de altura, flores radiadas muy abundantes con ligulas moradas	Suelo pedregoso, matorral xerofilo con acacia y opuntia	MEXU, CHAPA	3 Km al SE de Guadalupe rumbo a SLP. Alt. 1140 m snm
Herbácea anual de 40 cm de altura, ligulas moradas, centro amarillo	Matorral de acacia y opuntia	MEXU, TEXASH	Pitiquito Desierto del Altar, Sonora. Alt. 300 m snm
Herbácea perenne de 30 cm de altura, flores radiadas color azul-morado	Comun en llanos, a la orilla de caminos. Es abundante en cultivos de maíz	MEXU	Km 25 de la carretera SLP-Zacatecas. Alt. aproximada 2000 m snm.
Herbácea perenne anual de 30 cm de altura, flores amarillas con ligulas moradas	Matorral de acacia y opuntia.	CHAPA, TEXASH, MEXU	Mpio del Carmen, Coahuila, México.
Herbácea de 60 cm de altura, flores violetas y amarillas.	Suelo profundo y arcilloso, matorral de acacia.	CHIDRU, MEXU	Km 3 de la carretera Santiago Papasquiaro, Los Altos, Durango. Alt. 1810 m snm.

² Investigación hemerográfica personal realizada en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM, MEXU.

E.2. QUÍMICA

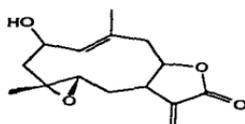
Los estudios químicos realizados a diversas especies del género *Arnica*¹⁷¹, han permitido caracterizar una gran variedad de metabolitos secundarios (Tabla III). Algunas estructuras químicas de éstos metabolitos secundarios se presentan en la Tabla IV.

Tabla III. Variedad de metabolitos secundarios caracterizados en el género *Arnica*.

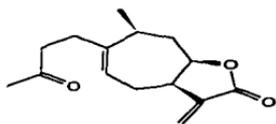
GRUPO	NOMBRE
I	Aceites esenciales
II	Polisacáridos
III	Derivados nitrogenados
IV	Esteroles y triterpenos
V	Carotenoides
VI	Ácidos fenólicos
VII	Flavonoides
VIII	Cumarinas
IX	Cromenos y derivados
X	Lactonas sesquiterpénicas

Tabla IV. Ejemplo de metabolitos secundarios aislados de diferentes especies del género *Arnica*.

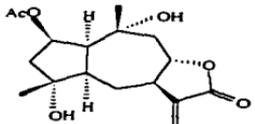
LACTONAS SESQUITERPÉNICAS			
Fuente Natural	Metabolito secundario	Estructura	Referencia
<i>Arnica mollis</i>	bailevina	1	[19]
	xantolongina	2	
<i>Arnica mollis</i>	arnirulina	3	[18]
<i>Arnica acaulis</i>	helenalina	4	
<i>Arnica austromona</i>	mexicanina	5	[20]
	carabróna	6	
	aromaticina	7	
<i>A. chamissonis</i> Less	chamisonolida	8	[21]
	deriv. arnifolina	9	
	flexuosina B	10	
	arnifolina	11	
	arnifolina B	12	
	6-O-tigloyl-dihydrohelenalina	13	



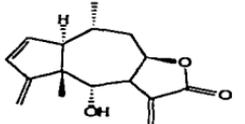
1



2



3



4

Tabla IV. (continuación).

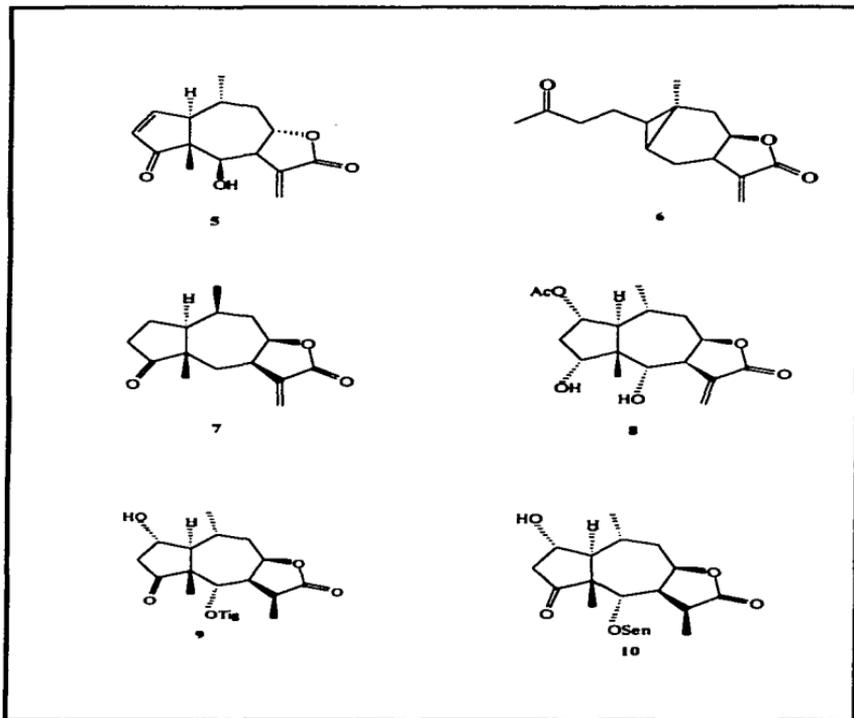


Tabla IV. (continuación).

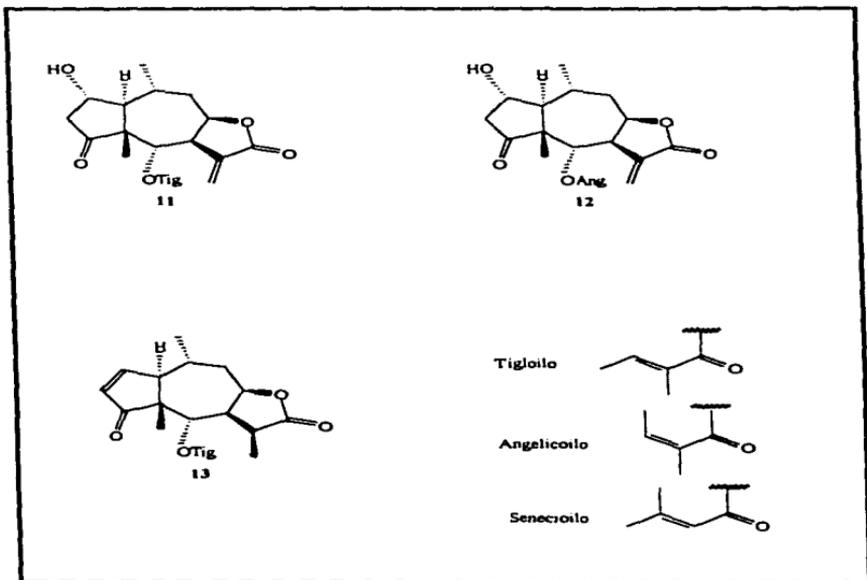


Tabla IV. (continuación).

FLAVONOIDES						
<i>Arnica montana</i>	quercetina	14				[22]
<i>Arnica viscosa</i>	kaempferol	15				[24]
<i>Arnica montana</i>	isorhamnetina	16				[25]
<i>Arnica austromontana</i>	hispidulina	17				[26]
<i>Arnica frigida</i>	luteolina	18				[27]
<i>Arnica acaulis</i>	cupafolina	19				[28]
<i>Arnica chamissonis</i>	jaceocidina	20				[29]
	petuletina	21				[29]
<i>A. chamissonis</i>	spinacetina	22				[25]
<i>Arnica montana</i>	apigenina	23				[25], [30]

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
14	OH	H	OH	OH	OH	OH
15	OH	H	OH	OH	H	OH
16	OH	H	OH	OGluc	CH ₃	OH
17	OGluc	CH ₃	OH	H	H	OH
18	OH	H	OH	H	H	OH
19	OGluc	OMe	OH	H	OH	OH
20	OGluc	OMe	OH	H	OMe	OMe
21	OH	OMe	OH	OGluc	OH	OH
22	OH	OMe	OH	OGluc	OMe	OMe
23	OH	H	OH	H	H	OH

Tabla IV. (continuación).

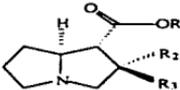
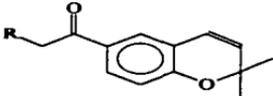
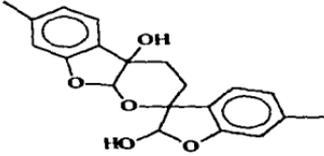
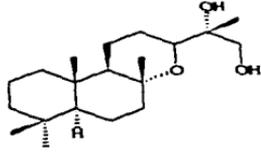
ALCALOIDES			
<i>Arnica chamissonis</i>	tusilagina	25	[31-31]
<i>Arnica amplexicaulis</i>	isotusilagina	26	
			
	R ₁	R ₂	R ₃
24	Me	α-OH	Me
25	Me	β-OH	Me
CROMENOS			
<i>Arnica sachalinensis</i>	acetovanilcromano	26	[31]
	dihidromtilencecalina	27	
<i>Arnica amplexicaulis</i>	dimetoxiencecalina	28	
	derivado de la encecalina	29	
			
	R		
26	H		
27	OAc		
28	O-iBut		
29	O-iVal o MeBut		

Tabla IV.(continuación).

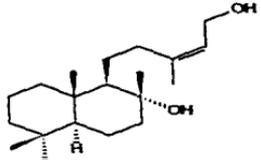
TERPENOIDES			
<i>Arnica sachalinensis</i>	derivado dimérico del timol ¹	30	(133)
<i>Arnica alpina</i> ssp. <i>atenuata</i>	derivado del labdano I	31	(134)
	derivado del labdano II	32	
<i>Arnica montana</i>	arnidiol	33	(171)
	faradiol	34	



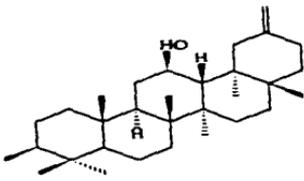
30



31



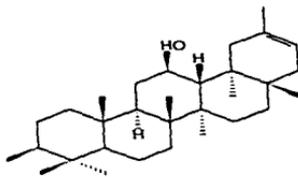
32



33

¹ El análisis de XMN^{-1}H de esta sustancia muestra claramente la presencia de un sistema $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}$ (δ 2.33, 2.18, 2.05 y 1.93 ppm, *ddt* cada uno), lo cual confirma la conjugación inusual C-C de las dos cadenas de isopropilo.

Tabla IV. (continuación).



34

ACEITES ESENCIALES

Arnica montana

lololido

35

[17]

mauroloido

36

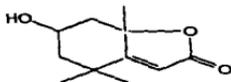
maurolool

37

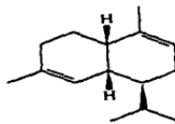
Arnica austromona

bisabolol

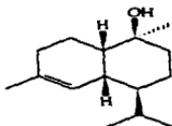
38



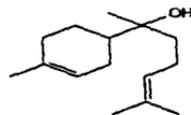
35



36



37



38

Tabla IV. (continuación).

DERIVADOS FENOLICOS			
<i>Arnica chamissonis</i>	derivado 1 del ácido cafeoilquímico	39	[40]
	derivado 2 del ácido cafeoilquímico	40	
	derivado 3 del ácido cafeoilquímico	41	

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
39	H	Caff	H	Caff
40	H	Caff	H	H
41	Me	H	Caff	Caff

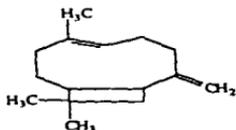
Caff = Cafeoilato

E.3. FARMACOLOGÍA

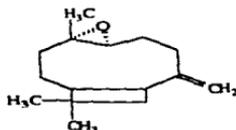
Como se mencionó anteriormente, en México se conocen varias especies vegetales con el nombre común de amica y se caracterizan por ser fuente de un gran número de sustancias químicas con actividad biológica. A continuación se describe el uso común de estas plantas en México y los estudios farmacológicos de que han sido objeto.

Heterotheca inuloides

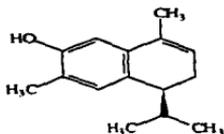
Su principal uso dentro de la medicina tradicional es como cicatrizante, desinfectante, desinflamante y analgésico. De las flores secas de *H. inuloides*, se aislaron 4 sesquiterpenos: β -cariofileno(42), 4,5- α -óxido del β -cariofileno(43), 7-hidroxi-3,4-dihidrodecalina(44) y la 7-hidroxi-3,4-dihidrodecalina(45), las cuales mostraron ser potentes agentes bactericidas. Específicamente la 7-hidroxi-3,4-dihidrodecalina mostró ser activo frente a *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina^[16].



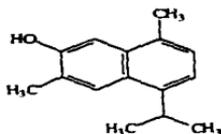
42



43



44



45

Tithonia diversifolia

Esta planta es frecuentemente utilizada para curar granos, llagas y heridas en los estados costeros de Chiapas, Guerrero y Veracruz. Además se le emplea en otras afecciones de la piel. Un extracto acuoso preparado de hojas y tallos y evaluado en ratas (3.30 ml/Kg via parenteral), mostró una baja actividad positiva en la estimulación uterina¹³¹.

Trixis inula

En Veracruz son diversos los padecimientos sobre los que se aplican, tales como reumatismo, mareos y "golpes de aire". Además se aplica también contra enfermedades venéreas e infecciones intestinales. Es una planta de origen americano que carece de estudios farmacológicos¹³¹.

Machaeranthera tenacetifolia

La principal aplicación de esta planta es para el tratamiento de las heridas, para eliminar erupciones en la piel y en los golpes. Si la cocción de ésta se hace combinada con tabardillo (*Piqueria trinervia*), entonces se utiliza en baños de asiento contra las almorranas. No cuenta con estudios experimentales ni reseña histórica¹³¹.

Galphimia glauca

En México es usada en la medicina tradicional para el tratamiento de padecimientos del sistema nervioso. El extracto metanólico de las partes aéreas de esta especie se evaluó en varios modelos biológicos con el fin de establecer su actividad neurofarmacológica.

Los modelos utilizados fueron: actividad hipotérmica, potencial barbitúrico, protección contra la estricnina, entre otros. Los datos obtenidos revelan la propiedad sedante de esta planta medicinal, estudios posteriores mostraron que la sustancia responsable de dicha actividad es la galpimina B^[18-19].

Finalmente, Woerdenbag y colaboradores demostraron que los principales metabolitos secundarios responsables de los efectos farmacológicos de las preparaciones de *Arnica* son lactonas sesquiterpénicas y flavonoides, al evaluar la citotoxicidad de 21 flavonoides y 5 lactonas sesquiterpénicas aisladas de diferentes especies de éste género, en líneas de células GLC₄ -líneas de células pulmonares con carcinoma-, y COLO₂₂₀-líneas de células colorrectales con carcinoma.^[37]

En la Tabla V, se indican otras actividades que presentan los metabolitos secundarios aislados de éste género.

Tabla V. Ejemplo de actividades biológicas de los metabolitos secundarios aislados del género *Arnica*¹⁷⁾.

Metabolito secundario	Actividad biológica
● Aceites esenciales	antiinflamatoria.
● Polisacáridos	antiespasmódica e inmunestimulante
● Ácidos fenólicos	antibacteriana y antifúngica.
● Flavonoides	citotóxica, antimicrobiana, antiinflamatoria, anestésico local e inhibición de la formación de tumores.
● Lactonas sesquiterpénicas	antibacteriana, antifúngica, disminución de los linfocitos T , efecto en sistema respiratorio y efecto en el sistema cardiovascular.
● Poliácetilenos	fungicida.

F. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PRODUCTOS NATURALES

Es un hecho que las plantas medicinales son fuente potencial de principios activos o bien que sus extractos pueden presentar una actividad farmacológica. En algunos casos, cuando el principio activo no se puede separar y para facilitar la localización de esa actividad, el estudio se hace biodirigido; es decir se va siguiendo la actividad biológica tanto de los extractos obtenidos como de los productos aislados de ellos.

Los métodos de seguimiento incluyen bioensayos que en esta etapa no son específicos, puesto que se busca solo una respuesta de toxicidad frente a diversos organismos de prueba, ya que pueden dar indicio de una actividad específica que se investigarán posteriormente. Por tal motivo resulta recomendable que estos métodos sean rápidos, seguros, baratos y convenientes con una herramienta general de bioensayos.

Un bioensayo general de toxicidad que detecta una posible actividad farmacológica de plantas o de productos naturales, que cumple con las características antes mencionadas, es el método basado en la utilización de la larva de *Artemia salina* L.

Artemia salina

Artemia es el nombre del *Anastrocan crustaceans* -su nombre común es camarón hada-, que pertenece a la subclase *Brachiopoda* -los filópodos-. Otro nombre con el cual se identifica a dicha especie es camarón salmuera.

Son de cuerpo ligero, con una característica que es la ausencia de un caparazón, desarrollan una clara segmentación y son evidentes 3 regiones: cabeza, tórax y abdomen.

El tórax contiene 11 segmentos, cada uno de los cuales le sirve de locomoción, alimentación y de respiración; 8 segmentos componen el abdomen, la transmisión entre el tórax y el abdomen es muy clara, los primeros dos segmentos abdominales contienen al útero en las hembras y en los machos la vesícula seminal y una pareja de penes. Las dimensiones de la *Artemia* dependen de la especie, del medio que las rodea y son afectadas en gran medida por la temperatura, en función de ésta, pueden medir de 10-12 mm. El color es usualmente rojo claro en agua con poco oxígeno, pero en un medio con alta oxigenación tienden a tener un color rojo pálido en las hembras y rosa pálido en los machos^[41].

El bioensayo en *Artemia salina*, es un método específico que determina la toxicidad -CL₅₀ en ppm- de productos naturales, tanto del extracto, como de las sustancias aisladas del mismo; sin embargo, es sólo uno de los bioensayos que integran la batería de pruebas. Para completar un estudio farmacológico preliminar es necesario realizar otros tipos de bioensayos más específicos, como las pruebas antimicrobianas, antivirales, antifúngicas, citotóxicas, entre otras; las cuales permiten determinar la actividad biológica que poseen las sustancias en prueba. Un ejemplo reciente en el cual se demuestra la aplicación de éste método es el siguiente: De las fracciones obtenidas del extracto diclorometánico de *Chromolaena odorata* y de las sustancias obtenidas de los mismos -5,7-dihidroxi-4'-metoxi, 6-hidroxi-5,7,4'-trimetoxi y 5,7,4'-trihidroxi-6-metoxi flavonas-, fue determinada su actividad biológica en bioensayos realizados con *Artemia salina* y pruebas de antibiosis^[64].

Un estudio completo de las plantas medicinales requiere de una investigación etnobotánica, taxonómica, química y finalmente la determinación de su actividad biológica. De esta manera, mediante una investigación multidisciplinaria, se pueden confirmar por métodos modernos, el conocimiento que nuestros antepasados dejaron sobre el uso de las plantas medicinales. Pudiendo encontrarse por otro lado, nuevas moléculas con actividades biológicas insospechadas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

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

A esta gran riqueza biológica que hace que México sea considerado entre los países llamados de megadiversidad, se añade otro de igual valor, que es producto de la interacción de las sociedades humanas que poblaron el territorio con su ambiente. Es bien conocido que las plantas medicinales representan un componente muy importante en la medicina tradicional en todo el mundo. Sin embargo, existe relativamente poca información científica acerca del empleo, composición química, ecología, etno-biodiversidad y evaluación biológica de la mayoría de las especies empleadas en la medicina tradicional en México.

Con base en lo anterior, el presente estudio fue encaminado al aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios presentes en el extracto acetónico de las partes aéreas de *Machaeranthera tenacetifolia*, con la finalidad de evaluar su toxicidad en *A. salina* (CL₅₀), de esta manera se contribuye al conocimiento de las especies vegetales empleadas en la medicina tradicional mexicana.

OBJETIVOS

A. GENERAL:

√ Realizar el estudio químico y determinar la toxicidad en *Artemia salina*, del extracto acetónico de las partes aéreas de *Machaeranthera tenacetifolia* -*Aster tenacetifolius*-.

B. ESPECÍFICOS:

√ Preparación de los diferentes extractos crudos (hexánico, acetónico, etanólico y la hidrólisis ácida del extracto acuoso), por medio de extracciones sólido-líquido.

√ Separación y purificación de los constituyentes mayoritarios presentes en el extracto acetónico de *Machaeranthera tenacetifolia*, empleando las técnicas de separación y purificación convencionales en la química orgánica de productos naturales^[42-44].

√ Identificación y caracterización de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el extracto acetónico de *Machaeranthera tenacetifolia*.

√ Evaluación de la toxicidad (CL₅₀) de los extractos crudos, utilizando como organismo de prueba las larvas de *Artemia salina*.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

El género *Arnica* está aparentemente clasificado en la tribu *Arniceae*, la complejidad de su clasificación está dada por el polimorfismo que presentan las diversas especies de éste género y se acentúa por la diversidad de metabolitos secundarios que presentan^[11,17].

Estudios químicos realizados a diversas especies de éste género indican que entre los principales constituyentes químicos que poseen, se encuentran los aceites esenciales, polisacáridos, derivados nitrogenados, esteroides y triterpenos, carotenoides, ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, cromenos y derivados, y lactonas sesquiterpénicas^[17]. Además en la literatura científica especializada, se informa que algunos de estos metabolitos secundarios poseen cierta actividad biológica o farmacológica.

Entonces al realizar el estudio químico del extracto acetónico de las partes aéreas de *Machaeranthera tenacetifolia* -*Aster tenacetifolius*-, mediante el empleo de técnicas convencionales de purificación y separación, se podrán aislar y caracterizar los diferentes metabolitos secundarios mayoritarios que constituyen dicho extracto, además de que se podrá determinar su toxicidad en *Artemia salina*.

METODOLOGÍA

I. MATERIALES

a) Material Vegetal:

- Partes aéreas -tallo y hojas-, secas de *Machaeranthera tenacetifolia*-*Arnica montana*.

b) Material para la extracción, aislamiento, purificación y elucidación estructural de los metabolitos secundarios:

● DISOLVENTES⁴

- Acetato de etilo (grado técnico).
- Acetona (grado técnico).
- Benceno (grado analítico).
- Cloroformo (grado técnico).
- Dimetilsulfóxido (grado analítico).
- Etanol (grado analítico).
- Eter etílico (grado analítico).
- Hexano (grado técnico).
- Heptano (grado analítico).
- Propanol (grado analítico).
- Metanol (grado analítico).

● REACTIVOS

- Acido clorhídrico (HCl solución al 10%).
- Acido sulfúrico (H₂SO₄).
- Anhídrido acético (Ac₂O).

⁴ Todos los disolventes grado técnico se destilaron en un equipo de destilación fraccionada.

- Bicarbonato de sodio (NaHCO_3 , solución saturada).
- Borohidruro de Sodio (NaBH_4).
- Carbón activado.
- Celita 545 (tamaño de partícula 0.001 a 0.004 mm).
- Cloruro férrico (FeCl_3 , al 1% en etanol).
- Cloruro de mesilo ($\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$).
- 2,6-Dibromoquinona-4-cloramida.
- Piridina (reactivo analítico).
- Reactivo de Marquis.
- Rodamina.
- Sal de Azul B.
- Sulfato cérico amónico [(NH_4) $_2\text{Ce}(\text{SO}_4)_6$].
- Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4).
- Sulfito de sodio (Na_2SO_3 , al 10%).
- Sílica gel para cromatografía en capa fina 60G.
- Cromatofolios de soporte de Aluminio de silicagel 60F $_{254}$ para cromatografía en capa fina, espesor de 0.02mm.

● EQUIPO

- Aparato para determinar el punto de fusión (Fisher Jonhs).
- Balanza analítica (100A, Ainswort).
- Balanza granataria (Ohaus, serie 700-800).
- Balanza semianalítica (Ohaus-E 400).

- Espectrofotómetro de IR Perkin Elmer, modelo A283 y 681.
- Espectrofotómetro Nicolet FT IR, modelo 5 Sx.
- Espectrómetro de Masas Hewlett Packard 5985 GC / Ms system 70 eV.
- Espectrofotómetro de RMN varian FT 80A y VXR-3005 (200 y 300MHz para ¹H y de 50 y 75 MHz para ¹³C).
- Lámpara de Ultravioleta listed INSA & MEAS 399-J.
- Rotavapor Büchi B-481.
- Refractómetro de Abbe modelo Atago 1T.

• MATERIAL DE VIDRIO

- Cámara de elución de 100 y 500 ml.
- Cámara de elución para placa preparativa.
- Capilares.
- Columnas de vidrio para cromatografía en columna de diferentes tamaños.
- Cromatoplasmas de sílica gel para cromatografía en capa preparativa espesor de 2 mm. (20x20, G-200 UV y 0.2 mm de 10x20).
- Embudo de separación de 125 ml.
- Matraces erlenmeyer de 25, 50 y 250 ml.
- Matraces de Kitazato de 125 y 500 ml.
- Matraces bola de 50, 100, 500 y 1000 ml.
- Pinzas de tres dedos con nuez.
- Probetas de 10, 100 y 500 ml.

c). Material para los Bioensayos en *Artemia salina*:

• **MATERIAL BIOLÓGICO:**

-Larvas de *Artemia Salina*.

• **SUSTANCIAS:**

-Sal marina.

-Agua purificada.

-Anticloro.

• **DISOLVENTES:**

-Acetato de etilo.

-Cloroformo.

-Etanol.

-Dimetilsulfóxido.

• **EQUIPO:**

-Aerador.

-Calentador.

-Balanza analítica (Ainswort, 100A).

-Balanza semianalítica (Ohaus-E 400).

-Lámpara eléctrica.

• **MATERIAL DE VIDRIO:**

-Jeringas de 500 µl, 50 µl y 10 µl.

-Pipetas Pasteur.

-Pipetas graduadas de 10 ml y 5 ml.

-Pecera de vidrio.

-Vasos de precipitado de 500 ml y 100 ml.

-Termómetro de -10 a 100°C.

2. PROCEDIMIENTOS

2.1. ESTUDIO QUÍMICO

2.1.1. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS⁽⁴²⁻⁴⁴⁾

Las partes aéreas secas de *Machaeranthera tenacetifolia* (480 g), fueron sometidas a un proceso de extracción sólido-líquido a temperatura ambiente con n-hexano (4 semanas), una vez terminada esta operación se eliminó el disolvente por concentración a presión reducida, obteniéndose 15.43 g del extracto hexánico. El residuo vegetal se secó a temperatura ambiente, utilizando la misma técnica, se extrajo con acetona y después con etanol, de dichas operaciones se obtuvieron 18.35 g de extracto acetónico y 12 18 g de extracto etanólico respectivamente

Una vez seco el residuo vegetal anterior -a temperatura ambiente-, se colocó en un equipo para reflujo simple con 1000 ml de una solución de HCl al 20% por un lapso de 12 h. Una vez finalizado este tiempo, se realizó una extracción líquido líquido del material hidrolizado con 500 ml de CHCl₃, de donde se obtuvo aproximadamente 6.5 g de extracto clorofórmico de la hidrólisis ácida.

2.1.2. ESTUDIO QUÍMICO DEL EXTRACTO ACETÓNICO

Se adsorbieron 18.35 g del extracto acetónico en 20.5 g de celita, posteriormente se adicionó a una columna cromatográfica de 8.5 cm de diámetro y 75 cm de altura, empacada por vía seca con 307.5 g de silicagel para capa fina, alcanzando una altura final de 15 cm. El desarrollo cromatográfico se realizó por elución a vacío⁽⁴⁵⁾, iniciando con n-hexano para continuar con mezclas de n-hexano acetato de etilo de polaridad creciente.

Se colectaron 416 eluatos de 250 ml cada uno, el desarrollo cromatográfico de dicho extracto fue seguido por CCF.

Las sustancias aisladas por la diferenciación cromatográfica mencionada anteriormente, se ilustran en la Figura 1

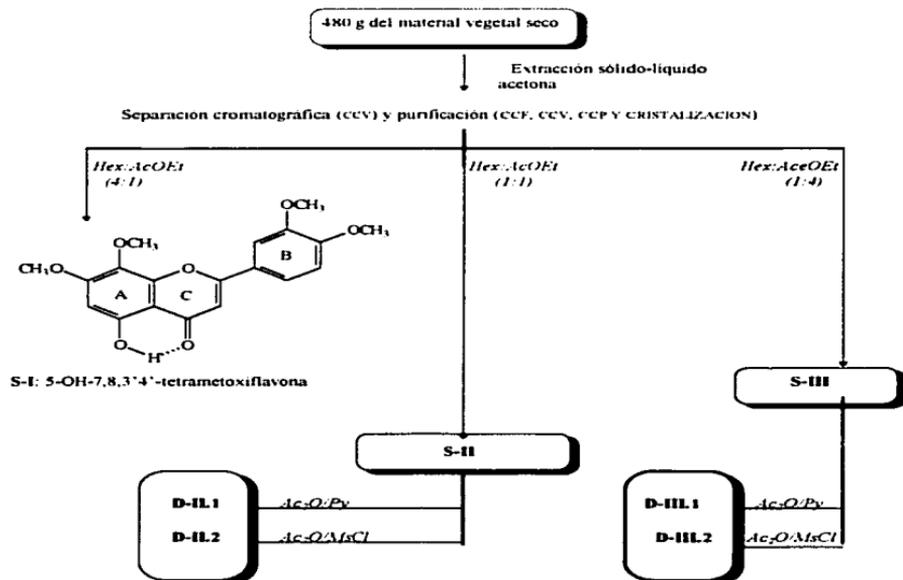


Figura 1. Sustancias aisladas del extracto acetónico de *Machaeranthera tenacetifolia*.

• Los eluatos (177-205) obtenidos de la columna con una mezcla de n-hexano:acetato de etilo (4:1), presentaron en CCF⁵ una señal bien definida, con ayuda de reveladores químicos específicos (FeCl₃ en etanol al 1%⁹, sal de Azul B⁷, vapores de amoníaco⁸ y 2,6-dibromoquinona-4-cloramida⁹)¹⁰, se determinó la presencia de un flavonoide. Una alícuota de 100 mg de esta fracción fue purificada por CCP¹⁰, empleando n-hexano:acetato de etilo (1:1) como mezcla de elución. Se obtuvieron por cristalización simple en n-hexano 6 mg (3.81X10⁻³%)¹¹, de un sólido de color amarillo de pf. 164-166°C¹² (S-II), el cual fue identificada en base a sus propiedades espectroscópicas de RMN-¹H, IR, y espectrométricas (EMIE), como 5-hidroxi-7, 8, 3', 4'-tetrametoxiflavona.

⁵ Para llevar a cabo la técnica CCF, se utilizaron cromatofolios de silicagel para capa fina 60F₂₅₄ con soporte de aluminio, con un espesor de 0.002 mm.

⁶ FeCl₃ en etanol al 1% Se disuelven 1.5 g del reactivo en 100 ml de una mezcla agua-etanol (1:1). La solución se aplica por aspersión y se calienta la cromatoplaça a 110°C por 2 min. Se observan tonos color verde-café indicando la presencia de flavonoides.

⁷ Sal de Azul B (Cloruro de Zinc doble para microscopia): Se disuelven 1.5 g del reactivo en agua. Se aplica la solución por aspersión y se calienta la cromatoplaça a 110°C. Se observan tonos rojizos para flavonoides.

⁸ Vapores de amoníaco: Se utiliza una solución al 25% de amoníaco. Después de sumergir la cromatoplaça en una cámara de elución que contenga la solución de amoníaco, se calienta en una campana de extracción. Se observa una fluorescencia característica de los flavonoides.

⁹ 2,6-dibromoquinona-4-cloramida: Se disuelven 0.4 mg del reactivo en 100 ml de metanol y se filtra si es necesario. Se aplica el procedimiento utilizado con los reactivos anteriores para revelar. Se observan zonas verdes para flavonoides.

¹⁰ Se utilizó un CCP de 20 x 20 cm de sílica gel con un espesor de 2 mm. Para el revelado de la placa se utilizó una solución de sulfato cérico amoniacal en ácido sulfúrico. La solución reveladora se preparó disolviendo 12 g de CeSO₄(NH₄) en 350 g de hielo bajo agitación continua y en una campana de extracción, posteriormente, se adicionaron 22 ml de H₂SO₄ hasta la disolución del reactivo.

¹¹ Rendimiento calculado en base a 18.35 g de extracto acetónico.

¹² Los valores de pf. no fueron corregidos.

• De la fracciones (316-335) obtenidas al eluir la columna con n-hexano:acetato de etilo (1:1), se aislaron por cristalización simple en acetato de etilo 66.4 mg (3.61×10^{-10} g), de un sólido amarillo pálido de pf. 146-150°C (S-II). Actualmente se encuentra en proceso de caracterización; sin embargo, por sus datos de infrarrojo se deduce que se trata de una sustancia polar ya que cuenta con grupos hidroxilo.

• De los eluatos (364-385) obtenidos al eluir la columna con la mezcla n-hexano:acetato de etilo (1:4), se aislaron por cristalización simple en acetato de etilo, 87.2 mg (4.75×10^{-10} g), de un sólido blanco de aspecto cristalino de pf. 249-252°C (S-III), el cual continua en proceso de caracterización por sus propiedades espectroscópicas -IR, RMN-¹H y ¹³C-, y espectrométricas-EMIE-.

• **D-II.1: Derivado acetilado de la S-II**

Se disolvieron 12.9 mg de S-II en la mínima cantidad de CHCl₃; posteriormente, se hicieron reaccionar con 1.5 ml de anhídrido acético y 0.5 ml de piridina seca. La reacción se llevo a cabo a temperatura ambiente por 2.5 h, siguiendo el curso de la reacción por CCF. Una vez finalizada la reacción, se adicionaron 5 ml de agua destilada, extrayendo el producto con CHCl₃ (4 x 5ml), a continuación se realizaron lavados con una solución de HCl al 10% (4x 5ml), seguido de un tratamiento con una solución saturada de NaHCO₃ (5x 5ml) y finalmente lavados con agua. La fase orgánica fue secada sobre Na₂SO₄ anhidro. Debido a la cantidad que se obtuvo, este derivado solo se sometió al análisis de IR y se determinó su η_D .¹³

¹³ Los índices de refracción se midieron en un refractómetro de ABBE modelo Atago IT, basado en el principio de medición del ángulo crítico¹³¹.

● **D-II.2: Producto mesilado de la S-II**⁽⁴⁸⁻⁴⁹⁾

Se disolvieron 23 mg de S-II en 2 ml de CHCl_3 ; posteriormente, se hicieron reaccionar con 0.5 ml de piridina seca bajo agitación constante, a la mezcla resultante se adicionaron, lentamente y por goteo 500 μl de MsCl a una temperatura de -10°C . El curso de la reacción fue seguido por CCF; después de un lapso de 2 h se detuvo la reacción adicionando 3 ml de HCl en hielo hasta que cesó el desprendimiento total de gases¹⁴. El producto se extrajo con CHCl_3 (3 x 5ml), posteriormente se efectuaron lavados con una solución saturada de NaHCO_3 (4 x 5ml) y finalmente se realizaron lavados con agua. La fase orgánica fue secada sobre Na_2SO_4 anhidro. Al producto se le determinó su η_D y sus constantes espectroscópicas de IR.

● **D-III.1: Productos acetilado de la S-III**

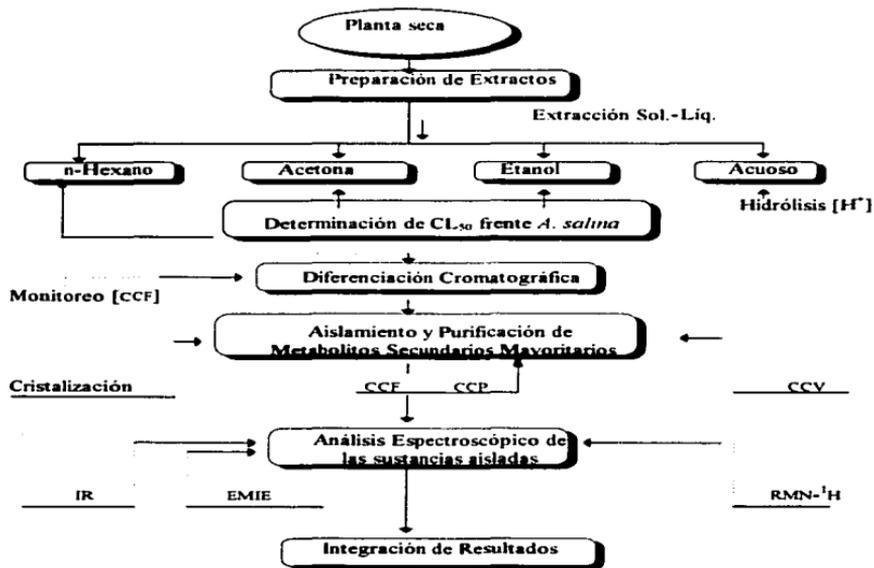
Se disolvieron 13.5 mg de S-III en CHCl_3 y fueron tratados por la técnica de acetilación descrita anteriormente, para obtener por cristalización por par de disolventes -acetona:acetato de etilo-, 5 mg de un sólido cristalino en forma de agujas blancas de pf. $163-165^\circ\text{C}$. Actualmente se encuentra en proceso de caracterización en base a sus propiedades espectroscópicas.

● **D-II.2. Producto mesilado de la S-III**

Se disolvieron 12.1 mg de S-III en CHCl_3 y se trataron por la técnica de mesilación anteriormente descrita, para obtener D-III.2. Debido a la cantidad de producto obtenido, al derivado se le determinó su η_D y sus constantes espectroscópicas de IR.

El procedimiento global seguido en el estudio químico, se ilustra en el Esquema 3.

¹⁴ Los gases liberados fueron colectados en una trampa para gases. La reacción se llevó a cabo en una campana de extracción.



Esquema 3. Diagrama de flujo seguido en el estudio químico de las partes aéreas de *Machaeranthera tenacetifolia*.

2.2. BIOENSAYO DE TOXICIDAD EN ARTEMIA SALINA^[56-57]

2.2.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras fueron preparadas disolviendo 20 mg del extracto en 2 ml de una mezcla DMSO:AcOEt (1:5). De esta última solución se transfirieron 5, 50 y 500 μ l a viales de 20 ml, utilizando tres viales por dilución. Además se agregaron 500 μ l del disolvente utilizado a un vial que funcionó como blanco. Las muestras se dejaron evaporar 48 h antes de iniciar el ensayo. Las concentraciones finales de cada dilución fueron 10, 100 y 1000 μ g/ml.

2.2.2. PREPARACIÓN DE LAS LARVAS DE ARTEMIA SALINA

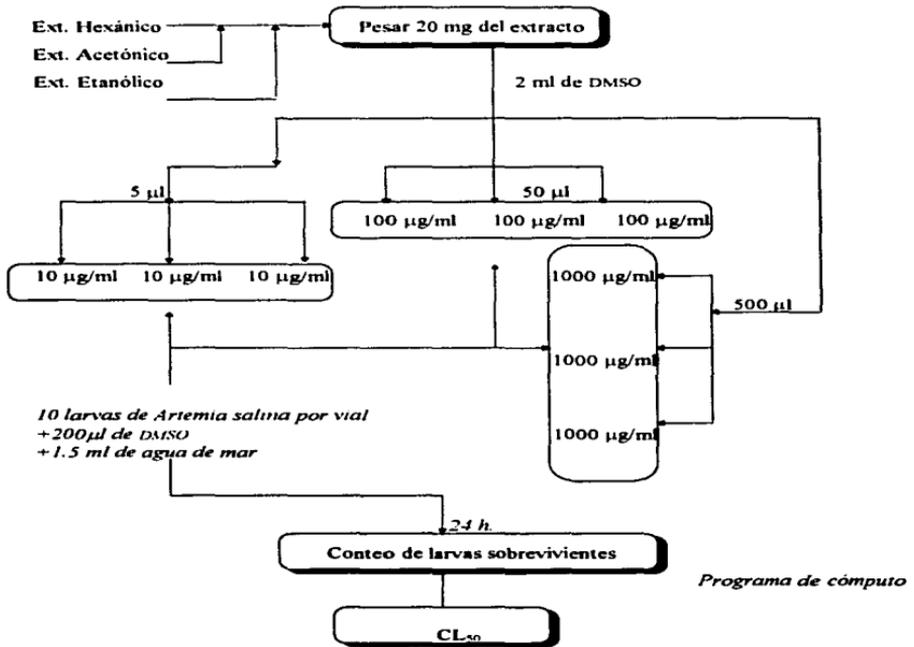
Se pesaron 60 mg de huevecillos de *Artemia salina* y se colocaron en la parte oscura de la pecera construida para tal propósito, la cual contenía 600 ml de agua de mar artificial con aeración ligera y continua. Después de 48 h las larvas fototrópicas fueron colectadas y empleadas para desarrollar el bioensayo.

2.2.3. BIOENSAYO

A los viales que contenían las muestras se les agregaron 200 μ l de DMSO y 1.5 ml de agua de mar artificial. Posteriormente se adicionaron 10 larvas a cada vial y se aforaron a volúmenes de 5 ml. El blanco fue tratado de igual manera. Los viales fueron mantenidos bajo iluminación y las larvas sobrevivientes fueron contadas después de 24 h. Se calcularon los porcentajes de larvas muertas para cada dosis y se calculó la CL_{50} mediante un programa de cómputo que utiliza el análisis de probitas de Finney^[52].

El diagrama de flujo que esquematiza el procedimiento seguido en el bioensayo se ilustra en el Esquema 4.

¹⁵ El programa de cómputo fue proporcionado por el Instituto de Química de la UNAM.

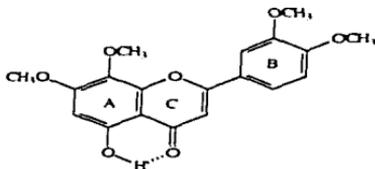


Esquema 4. Diagrama de flujo seguido en el ensayo de toxicidad en *Artemia salina*.

RESULTADOS

A. ESTUDIO QUÍMICO

En el estudio químico de *Machaeranthera tenacetifolia* -Amica morada-, se lograron aislar las sustancias que se describen a continuación.



• **Nombre químico:** 5-hidroxi-7, 8, 3', 4'-tetrametoxiflavona

• **Fórmula molecular:** C₁₉H₁₈O₇

• **Peso molecular:** 358 g mol⁻¹

• **pf.** 164-166°C

• **Propiedades espectroscópicas:**

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 1):

δ 4.01(s, 3H, CH₃O-C7), δ 3.98(s, 3H, CH₃O-C8), δ 3.97(s, 3H, CH₃O-C3'),

δ 3.88(s, 1H, CH₃O-C4'), δ 6.27(s, 1H, H-6), δ 6.43(s, 1H, H-3),

δ 7.76(d, 1H, 2.0 Hz, H-2'), δ 7.80(dd, 1H, 10.5, 2.1 Hz, H-6'),

δ 7.02 (d, 1H, 8.2 Hz, H-5') y δ 12.42 (s, 1H, C5-OH).

IR_{vmax} (CHCl₃, espectro 2) cm⁻¹: Tabla VII.

Tabla VI. Descripción química de S-I.

<i>Sustancia</i>	<i>Frecuencia (cm⁻¹)</i>	<i>Espectro</i>
S-I*	3420 3005 2939 2838 1660 1564	2
S-II*	3607 3430 2935 1713 1423 1034	3
S-III**	3391 2882 1520 1478 1423 920	4

*Solución / CHCl₃

**Pastilla / KBr

Tabla VII. Datos de espectroscopia de infrarrojo de los compuestos aislados de *Machaeranthera tenacetifolia*.

<i>Sustancia</i>	<i>Frecuencia (cm⁻¹)</i>	<i>Espectro</i>
D-III.1	2962 2915 2870 1752 1601 1069	5
D-III.2	2963 2874 2780 1676 1408 908	6

*Solución / CHCl₃

Tabla VIII. Datos de espectroscopia de IR de dos compuestos obtenidos como producto de reacción del estudio químico de *Machaeranthera tenacetifolia*.

<i>Sustancia</i>	<i>Reacción</i>	η_D
D-II.1	Acetilación	*
D-II.2	Mesilación	1.4920 a 20.9°C
D-III.1	Acetilación	1.4851 a 25.6°C
D-III.2	Mesilación	1.4910 a 21.9°C

* Sólido amorfo
 Tabla IX. Datos de índice de refracción (η_D) de las sustancias obtenidas como producto de reacción.

B. BIOENSAYO DE TOXICIDAD EN ARTEMIA SALINA

<i>Extracto</i>	<i>CL₅₀</i>	<i>LSC</i>	<i>LIC</i>
Hexánico	*	*	*
Acetónico	1294.66	1526.92	0.5014
Etanólico	1078.68	4611.09	413.38

* Valores significativamente superiores a 1000 ppm.
 LSC = Limite Superior Central
 LIC = Limite Inferior Central.

Tabla X. Valores de concentración letal media de los bioensayos realizados en *Artemia salina*.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A partir del análisis de las propiedades físicas y espectroscópicas se logró la elucidación estructural de una sustancia (S-I), dos compuestos de manera parcial (S-II y S-III), y cuatro compuestos adicionales como producto de reacción, aislados del extracto acetónico de las partes aéreas de *Machaeranthera tenacetifolia* -Arnica morada-.

De las fracciones (177-205) cluidas con n-hexano:acetato de etilo (8:2), se aisló una sustancia de color amarillo, la cual posteriormente se purificó utilizando CCP para obtener un sólido de color amarillo pálido de pf. 164-166°C. En su espectro de masas presenta un ión molecular de m/z 358, al que se le puede asociar una fórmula molecular $C_{19}H_{18}O_7$, con 11 grados de insaturación.

En su espectro de IR (Espectro 2), se observa la presencia de un grupo carbonilo de cetona a 1660 cm^{-1} , el desplazamiento de la banda de absorción hacia un número de onda más bajo, con respecto al desplazamiento informado en la literatura (1715 cm^{-1})³³, se debe a la formación de un puente de hidrógeno con un grupo hidroxilo existente en la molécula; lo que explica la coloración verde-café observada en CCF, cuando esta se revela con una solución de $FeCl_3$ en etanol al 1%. La $\nu(O-H)$ del grupo hidroxilo se visualiza a 3420 cm^{-1} . Además se observan señales de absorción a 3005 cm^{-1} que corresponde a la $\nu(C-H)$ con hibridación sp^2 . Así mismo, las señales a 3005 , 2939 y 1660 cm^{-1} sugieren la presencia de una cetona α , β -insaturada.

Según lo anterior, se propuso la fórmula parcial A (Figura 2), con la cual se explican 2 grados de insaturación.

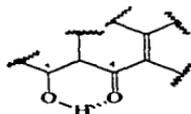
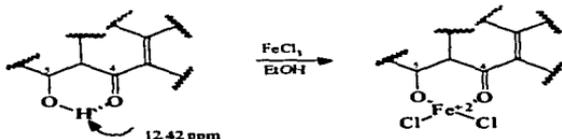


Figura 2. Fórmula parcial A.

Complementando lo anterior, la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares en una sustancia puede ser fácilmente confirmada, por medio de la sustitución del protón con algún agente quelante como es el caso del FeCl_3 en etanol al 1% y AlCl_3 en metanol al 5%, con los cuales se observan cambios de color específicos¹⁶ (54); en este caso se utilizó FeCl_3 en etanol al 1% para confirmar el puente de hidrógeno formado entre el grupo hidroxilo y la cetona α,β -insaturada. (Esquema 5).



Esquema 5. Formación del quelato con FeCl_3 y los grupos $\text{C}_5\text{-OH}$ y $\text{C}_4\text{=O}$.

¹⁶ El empleo de agentes quelantes modifica la longitud de onda a la cual absorbe un compuesto determinado. Como ejemplo, en la determinación por UV de flavonas, flavonoles, isoflavonas, auronas y chalconas, el empleo de AlCl_3 modifica la banda de absorción en +55, +20, +14, +64 y +40 nm respectivamente.

Adicionalmente, la formación del puente de hidrógeno fue corroborada al analizar el espectro de RMN-¹H (Espectro 1), donde se observa una señal simple (s) a campo bajo (δ 12.42) que corresponde al protón del grupo hidroxilo quelatado con el grupo carbonilo.

Las señales simples que aparecen entre δ 4.01 y 3.88 que integran para doce hidrógenos, corresponden a cuatro grupos metoxilo unidos a un anillo aromático -fórmula parcial B, Figura 3-, lo cual permite justificar 4 grados de insaturación más en la molécula.

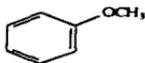
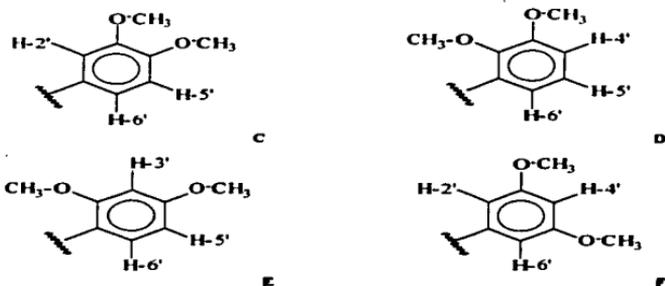


Figura 3. Fórmula parcial B.

La señal múltiple entre 7.82 - 7.77 ppm que integra para tres hidrógenos, corresponde a un anillo bencénico trisustituido, la ubicación de los grupos metoxilos se pudo determinar en función de sus constantes de acoplamiento (J). Para ello existen cuatro posibles posiciones en las que se pueden situar a los grupos metoxilo, - fórmulas parciales C, D, E y F (Figura 4)-.



Fórmula parcial C (3', 4'-dimetóxisfenilo): $J_{2'6'}$ = meta, $J_{2'5'}$ = para y $J_{5'6'}$ = orto.

Fórmula parcial D (2', 3'-dimetóxisfenilo): $J_{4'5'}$ = orto, $J_{4'6'}$ = meta y $J_{5'6'}$ = orto.

Fórmula parcial E (2', 4'-dimetóxisfenilo): $J_{3'5'}$ = meta, $J_{3'6'}$ = para y $J_{5'6'}$ = orto.

Fórmula parcial F (3', 5'-dimetóxisfenilo): $J_{2'4'}$, $2'6'$ y $4'6'$ = meta.

$$J_{\text{orto}} = 6-9 \text{ Hz} \quad J_{\text{meta}} = 1-3 \text{ Hz} \quad J_{\text{para}} = 0-1 \text{ Hz}$$

Figura 4. Fórmulas parciales C, D, E y F.

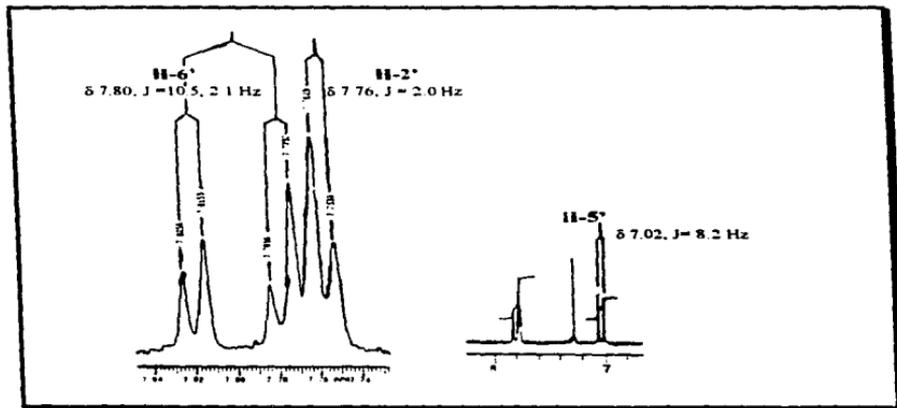
Dentro de las posibles asignaciones mencionadas, la estructura parcial D queda descartada, ya que con los grupos metoxilo en las posiciones 2' y 3' se observarían dos grupos de señales con multiplicidad doble de doble, resultando 11 señales (J_{meta} y J_{meta}), lo cual no está de acuerdo con lo observado en el espectro 1.

Por otra parte, la estructura parcial E no concuerda teóricamente con la multiplicidad observada en el espectro 1 para el anillo B; ya que al situar a los grupos metoxilo en las posiciones 2' y 4' en el espectro se esperarían observar 12 señales (J_{ortho} , J_{meta} y J_{para})¹⁷; cabe afirmar que dicha multiplicidad es consistente con el espectro antes mencionado; sin embargo, la diferencia estriba en el desplazamiento químico de los hidrógenos H-3' y H-5', las cuales por encontrarse en posición *-o*, *-p* con respecto a los grupos metoxilo sufren un efecto de protección, lo cual haría que su desplazamiento químico fuese menor a δ 7.26.

Con respecto a la fórmula parcial F se puede mencionar que en la zona del espectro correspondiente a un anillo aromático se esperarían observar 6 señales que se asignarían al acoplamiento de H-2' con H-4' y viceversa. La multiplicidad observada y el desplazamiento químico de H-6' deberá de ser igual al de H-2' por el plano de simetría existente en el anillo B; debido a la presencia de dicho elemento de simetría el patrón de acoplamiento para este anillo es del tipo A_2B , el cual según la literatura^[65], deberá mostrar una multiplicidad para H-2' y H-6' como un triplete y para H-4' como un doblete, todas las constantes de acoplamiento son del tipo *-m*, lo cual no es congruente con las J_{ortho} observadas en el espectro de la molécula.

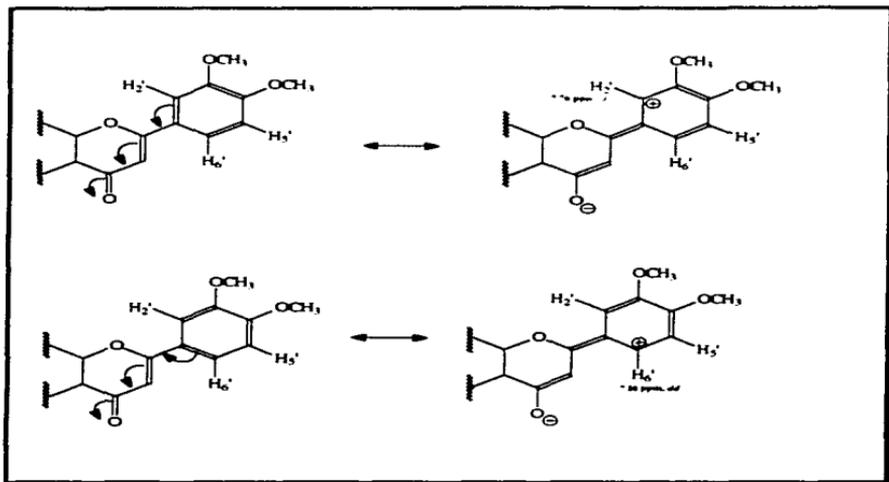
¹⁷ Considerando que la $J_{para} = 1$; si se toma el valor $J_{para} = 0$ entonces solo se observarían 8 señales.

Finalmente, la estructura parcial C es la más consistente con el patrón de acoplamiento observado para la sustancia en discusión (Esquema 6). Lo anterior se apoya al observar 8 señales como resultado del acoplamiento de tipo ABX. Por tal razón, se dedujo que los grupos metoxilo de la sustancia aislada de *Machaeranthera tenacetifolia*, se localizan en las posiciones 3' y 4' del anillo bencénico como se ilustra en la fórmula parcial C (Figura 4).



Esquema 6. Patrón de acoplamiento de los hidrógenos H-2', H-6' y H-5' del anillo B.

Con base en lo anterior, la señal en δ 7.76 d ($J = 2.0$ Hz), corresponde al protón H-2', mientras que al protón H-6' se le asignó la señal doble de doble ($J = 10.5, 2.1$ Hz), centrada en δ 7.80, ya que ambos experimentan un efecto de desprotección por la conjugación del anillo B con el grupo carbonilo α, β -insaturado (Esquema 7).



Esquema 7. Efecto de un grupo electroattractor sobre las posiciones C-2' y C-6'.

Finalmente, el protón H-5' experimenta un desplazamiento a campo alto, debido a que dicho carbono no presenta la carga positiva en ninguna de las formas resonantes inducidas por la cetona α , β -insaturada. dicho protón muestra una señal doble ($J = 8.2\text{Hz}$) en δ 7.02.

Por otro lado, se observa una señal simple en δ 6.3 que integra para un protón que corresponde a un hidrógeno aromático fuertemente protegido por la presencia de grupos electrodonadores, tal como se observa en la fórmula parcial G (Figura 5).

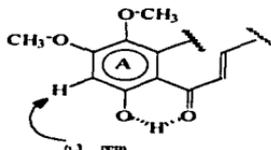


Figura 5. Fórmula parcial G.

Tomando como base la discusión anterior, se propuso como hipótesis estructural el esqueleto de un flavonoide¹⁸ hidroxilado en la posición C-5 y metoxilado en las posiciones 7, 8, 3', y 4' (Figura 6).

¹⁸ El término flavonoide engloba a un grupo de sustancias que se caracterizan por poseer 15 átomos de carbono distribuidos en un esqueleto C₆-C₁-C₈, de esta manera existen en la naturaleza flavanonas, flavonas, flavonoles, flavandioles, auronas, chalconas e isoflavonas^[54].

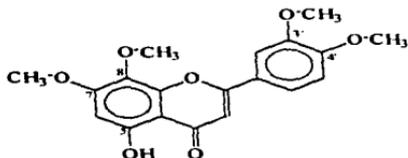


Figura 6. Hipótesis estructural de la sustancia obtenida del extracto acetónico de las partes aéreas del *Arnica morada*.

Finalmente, en δ 6.4 se observa una señal simple (s) que integra para un hidrógeno que corresponde por su desplazamiento químico a un protón vinílico, el cual se ve afectado por la presencia de un grupo carbonilo -efecto de anisotropia⁽⁵⁵⁾-, lo que hace que su desplazamiento químico se localice a campo más bajo que el informado en la literatura para este tipo de protón (4 - 5 ppm)⁽⁵⁶⁾ (Figura 7).

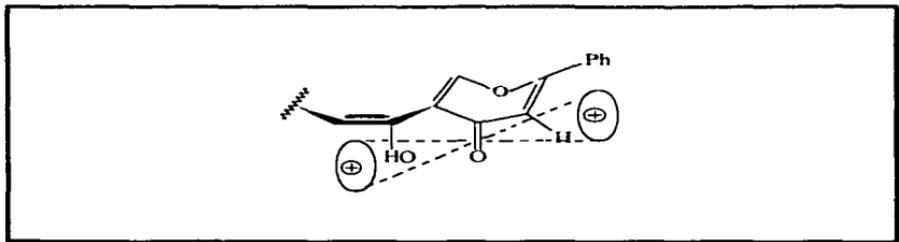
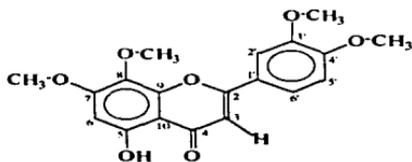


Figura 7. Efecto de anisotropía sobre H-3.

Esto último permite discernir entre los diferentes tipos de flavonoides, que la sustancia en discusión presenta como esqueleto base al de una flavona. Las flavonas son compuestos fenólicos que poseen 15 átomos de carbono, en las cuales 2 núcleos bencénicos se encuentran unidos por un eslabón de tres átomos de carbono^[54], al que se le pueden asociar 11 grados de insaturación.

Por lo tanto, la estructura final del compuesto aislado queda debidamente ilustrada en la Figura 8.



$C_{19}H_{18}O_7$

P.M. 358

$\Omega = 11$

Figura 8. Estructura de la 5-hidroxi-7, 8, 3', 4'-tetrametoxiflavona

En la literatura especializada se informa que se han aislado flavonas 6, 7, 3', 4'-metoxiladas^[57-58] y 7, 8, 3', 4'-metoxiladas^[59-60]; sin embargo, las propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas concuerdan con las de una flavona 7, 8, 3', 4'-metoxilada.

Cabe agregar que se han descrito diferentes técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear, tanto de H como de C^[61] y algunas basadas en reacciones químicas para designar correctamente la posición de grupos metoxilo en flavonas, flavonoles y algunos glucósidos.

Un experimento viable para la confirmación de la posición de los grupos metoxilos en el anillo A de la flavona aislada, es el COLOC -Correlación Espectroscópica (^1H - ^{13}C) Heteronuclear-, en el cual se muestran las interacciones C-H de la molécula de interés, ésta técnica ha sido muy utilizada en la asignación correcta de grupos prenilo en flavanonas preniladas^[41].

Para finalizar la discusión de esta sustancia, se debe puntualizar que el análisis espectroscópico (RMN- ^1H , IR) y espectrométrico (EM), permitió concluir que la 5-hidroxi-7, 8, 3', 4'-tetrametoxiflavona, ya había sido aislada previamente del aceite de *Bergamota*^[39], y de *Lychnophora affinis*^[40].

- En lo que respecta a S-II (316-335) y S-III (364-388), continúan en proceso de caracterización, la información con la que se cuenta no es suficiente como para poder proponer una hipótesis estructural para dichas sustancias.
- Los derivados acetilados y mesilados de S-I y S-II se aislaron en cantidades muy bajas, lo cual impidió que se sometieran al análisis espectroscópico correspondiente. Los datos de IR confirman el resultado de las reacciones al desaparecer las bandas de absorción de la $\nu(\text{O-H})$.
- De la diferenciación cromatográfica del extracto acetónico se aislaron otras sustancias de baja, mediana y alta polaridad, las cuales por la cantidad obtenida no fueron sometidas a métodos espectroscópicos de análisis. Sin embargo, se obtuvieron sus derivados acetilados y de reducción con el fin de purificarlos, de ésta manera sólo se tienen datos de η_D (Tabla XI) y sus constantes de IR (Tabla XII), los cuales revelan información interesante.

Fracción	Reacción	η_D
EC(267-280)	Acetilación	1.4742 a 20.7°C
EC(281-296)	Acetilación	1.4329 a 20.7°C
EC(396-416)	Reducción	1.4759 a 21.9°C

Tabla XI. Datos de índice de refracción (η_D) de algunas sustancias obtenidas como productos de reacción.

Fracción	$\nu_{max}(cm^{-1})$					Espectro	
EC(68)*	3608	3514	2928	2855	1714	7	
EC(103-119)**	3421	3285	2957	2918	2850	1547	8
EC(267-280)**	3421	2995	1641	1291	1050	930	9
EC(281-296)**	3427	2933	2854	1715	1610	791	10
EC(406-416)*	3594	3512	2933	1715	1516	1423	11

*Dilución/CHCl₃.

**Pastilla/KBr.

Tabla XII. Datos de infrarrojo de las sustancias de baja, mediana y alta polaridad, de la diferenciación cromatográfica del extracto acetónico del *Arnica montana*.

• En lo que respecta a la determinación de la concentración letal media frente *Artemia salina*, ninguno de los extractos resultó activo, como se indica en la Tabla X, lo que presumiblemente se deba a las siguientes causas:

- Escasa cantidad de metabolitos secundarios activos presentes en cada extracto.
- Sinergismo entre dos o más metabolitos secundarios activos

Sin embargo, debe recordarse que se trata de un bioensayo indicativo. Los ensayos biológicos viables para establecer la actividad biológica de esta especie vegetal son: pruebas antimicrobianas en bacterias resistentes a la meticilina -*Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, entre otros^[36], y pruebas de citotoxicidad en líneas de células intestinales y colorrectales de etiología cancerosa -COLO y GLC_{42r}^[37].

CONCLUSIONES

√ Se realizó el estudio químico del extracto acetónico de las partes aéreas de *Machaeranthera tenacetifolia* -*Aster tenacetifolius*, de la cual se aislaron tres sustancias como producto natural, sólo una de ellas se caracterizó como: 5-hidroxi-7, 8, 3', 4'-tetrametoxiflavona (S-I). Actualmente S-II y S-III se encuentran en proceso de caracterización e identificación.

√ Los derivados D-II.1, D-II.2, D-III.1 y D-III.2, fueron obtenidos como producto de reacciones de acetilación y mesilación, la comprobación de que dichas reacciones se llevaron a cabo se hicieron por medio de IR y CCF.

√ La obtención y purificación de las sustancias caracterizadas se realizó mediante técnicas de separación y purificación convencionales de química orgánica.

√ Se determinó la concentración letal media de los extractos crudos (hexánico, acetónico y etanólico) de las partes aéreas secas de *Machaeranthera tenacetifolia*. Como resultado se obtuvieron CL₅₀ superiores a 1000 ppm, lo que indica que ninguno de los extractos evaluados son activos frente *Artemia salina*.

SUGERENCIAS

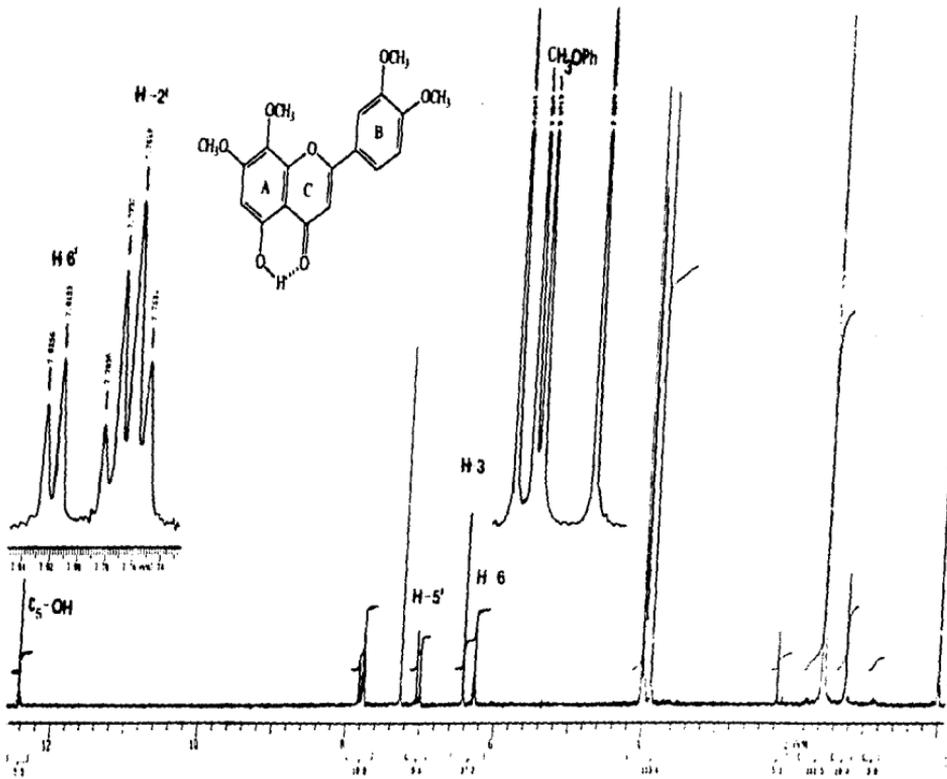
- *Machaeranthera tenacetifolia* -Arnica morada-, es una planta medicinal comúnmente utilizada en las heridas, para quitar los granos, en el tratamiento de golpes y contusiones; sin embargo, carece de un estudio etnobotánico completo. Por lo tanto, la primera sugerencia es que se realice un estudio etnobotánico de *Machaeranthera tenacetifolia*.
- El estudio químico realizado sólo fue de un extracto, por lo tanto se sugiere que se complete el estudio fitoquímico, analizando los extractos hexánico, etanólico y el obtenido al hidrolizar las partes aéreas con HCl al 20%.
- Con respecto a la actividad biológica de esta especie vegetal, resulta necesario realizar bioensayos más específicos como son las pruebas antimicrobianas -en cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, entre otros-, y citotóxicos -en líneas colorrectales infectadas con cáncer-, para conocer a fondo las propiedades farmacológicas que posee la especie vegetal en cuestión.
- De manera general, el estudio químico del extracto acetónico de las partes aéreas de *Machaeranthera tenacetifolia*, se vió muy limitado por la cantidad de planta con la que se inició el estudio, como consecuencia se obtuvo poca cantidad de extracto y por efecto poca cantidad de sustancias puras. Por lo tanto, se recomienda que se trabaje nuevamente con una cantidad mayor del material vegetal para caracterizar satisfactoriamente las sustancias aisladas en el presente estudio.

GLOSARIO

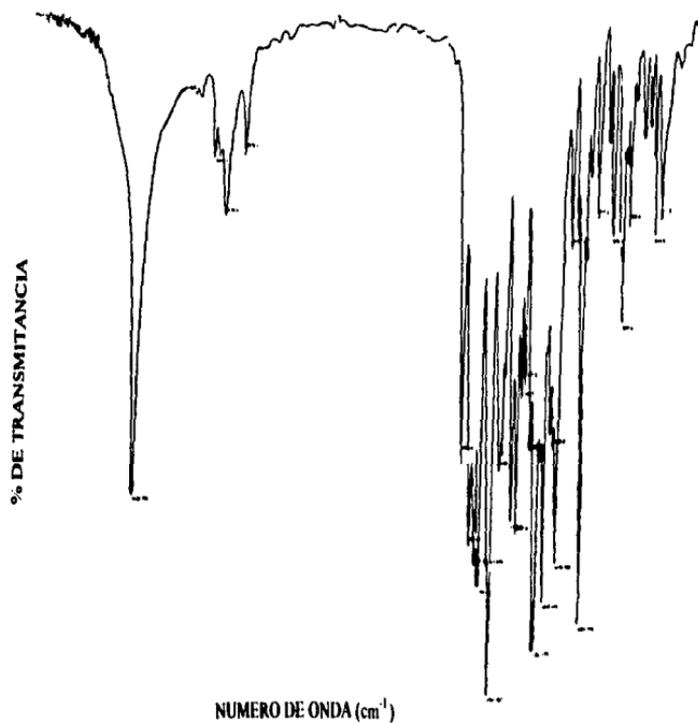
- **Arbustiva:** planta perenne, un tallo lignificado, el cual se ramifica a partir de la base, generalmente de menos de 3 m de altura¹⁹
- **Hojas alternadas:** hojas con una estructura por nudo, los márgenes exteriores colocados sobre los márgenes de los interiores.
- **Hojas opuestas:** hojas con los órganos colocados dos por nudos
- **Hermafroditas:** flores perfectas con androceo y gineceo
- **Unisexuales:** flor con solo el androceo o el gineceo
- **Androceo:** conjunto de los órganos masculinos de la flor, los estambres
- **Gineceo:** conjunto de los órganos femenino de la flor, los carpelos
- **Actinomorfas:** dice de cualquier vegetal o cualquier parte del vegetal, órgano etc., que tienen por lo menos dos planos de simetría
- **Zigomorfas:** flor en la que solamente uno de los planos que pasan por su eje las dividen en dos partes simétricas
- **Caliz:** verticilo externo del perianto, sépalos en su conjunto
- **Sépalo:** una unidad del caliz
- **Verticilo:** Cada grupo de unidades o piezas florales, por ejemplo el caliz, la corola. Se utiliza para describir una agrupación cíclica.
- **Pappus:** caliz cerdoso, plumoso, escamoso o coroniforme típico de la familia *Compositae*.
- **Capitulus o cabezuela:** grupo definido de flores densas, sesilos o subsesiles sobre un receptáculo compuesto
- **Ligula:** pequeña apéndice por arriba de la vaina de la hoja en ciertas gramíneas
- **Sésil:** cualquier órgano o parte orgánica que carece de pie o soporte. Una hoja sésil es la que está desprovista de peciolo. También es sésil cuando no tiene filamento o lo tiene muy corto.
- **Receptáculo:** Región apical del pedicelo donde se insertan las piezas florales.
- **Pedizelo:** soporte individual de una flor que forma parte de una inflorescencia.
- **Inflorescencia:** Sistema de ramificación que se resuelve en flores.
- **Peciolo:** sosten de la lámina de una hoja o el eje principal de una hoja compuesta.
- **Zigomorfía:** flor con simetría bilateral.

¹⁹ El significado de los términos botánicos se corroboró en bibliografía especializada^[62-63].

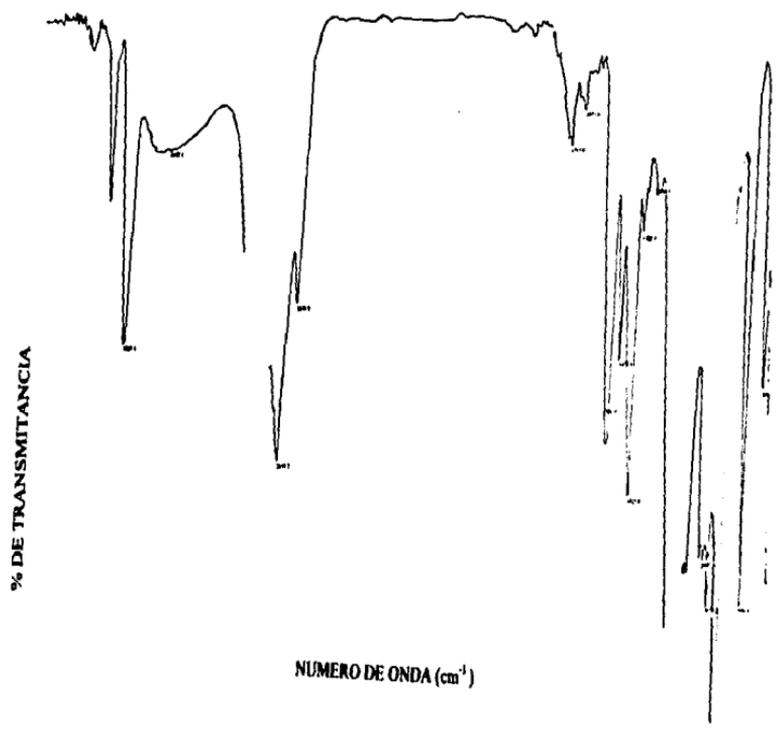
ESPECTROS



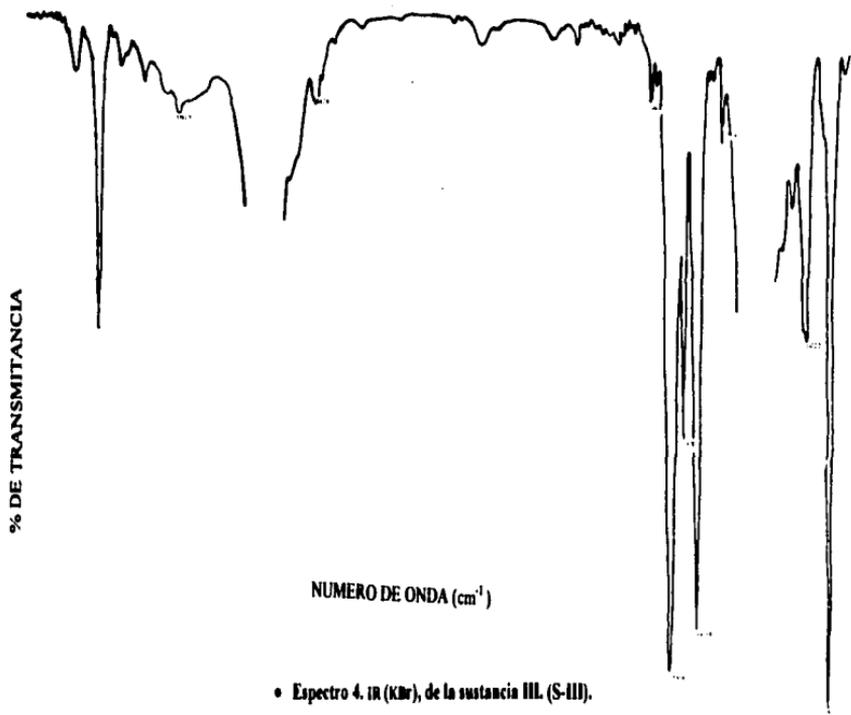
• Espectro I. RMN-¹H (200MHz, CDCl₃, TMS, r.l.), de la 5-hidroxi-7,8,3',4'-tetrametoxiflavona (S-I).



• Espectro 2. IR (CHCl₃), de la 5-hidroxi-7, 8, 3', 4'-tetrametoxiflavona (S-I).



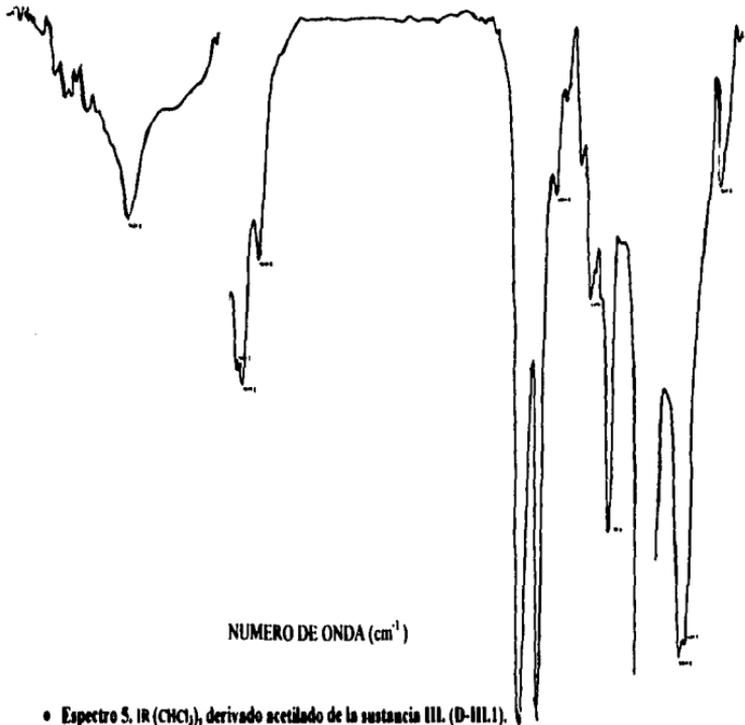
• Espectro J. (R. (CHCl₃), de la sustancia II. (S-II).



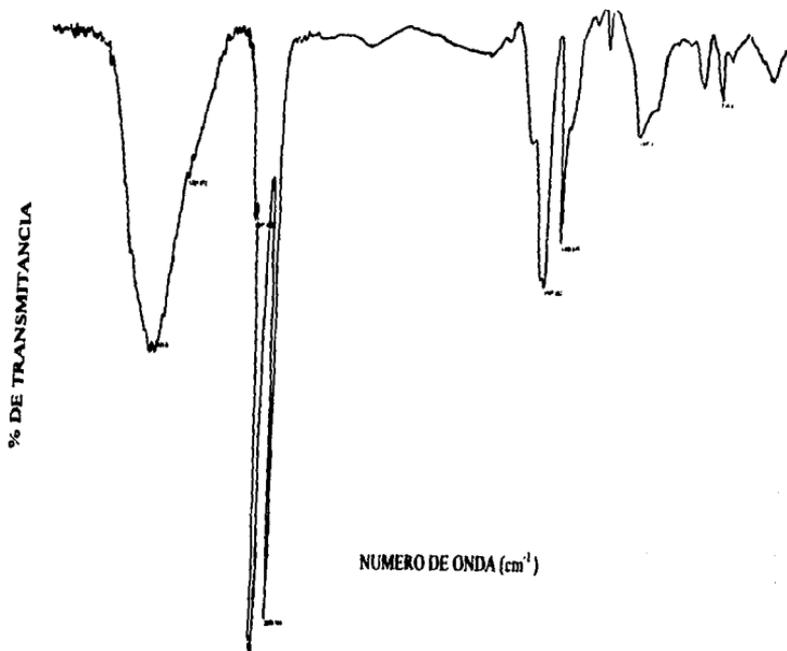
• Espectro 4. IR (KBr), de la sustancia III. (S-III).

% DE TRANSMITANCIA

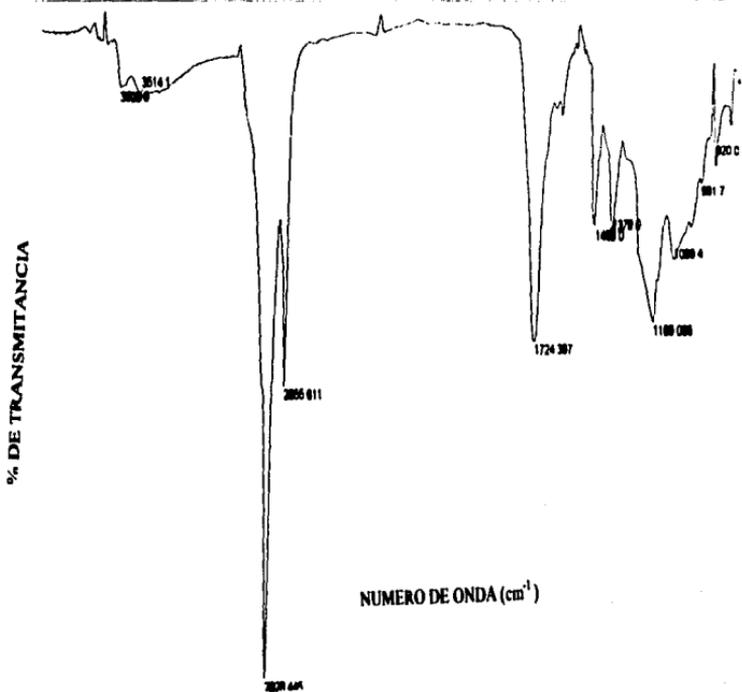
NUMERO DE ONDA (cm⁻¹)



• Espectro S. IR (CHCl₃), derivado acetilado de la sustancia III. (D-III.1).



• Espectro 6. IR (CHCl₃), derivado mesurado de la sustancia III (D-III.2).

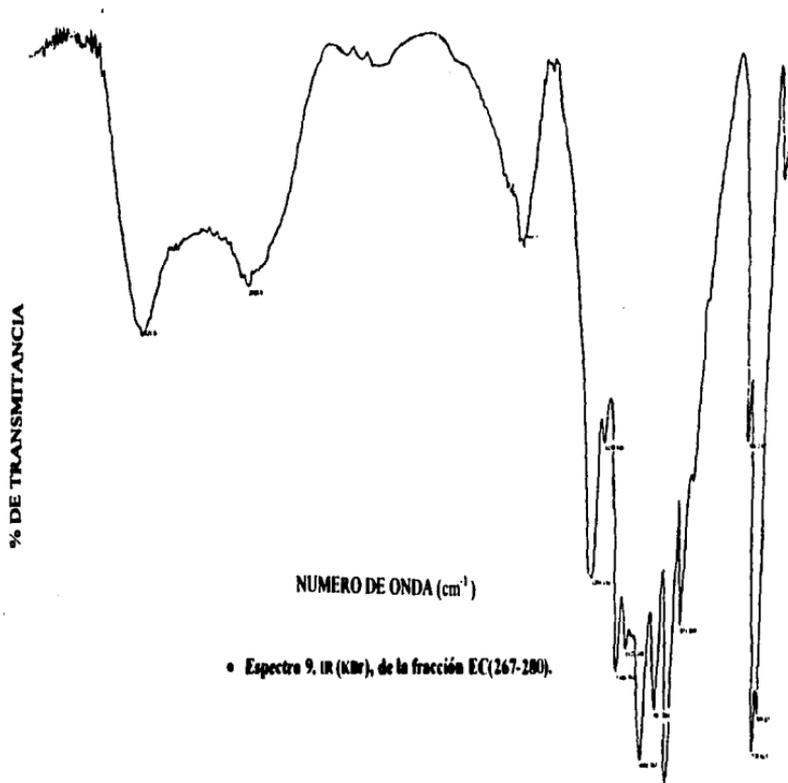


Espectro 7. IR (CHCl₃), de la fracción EC(66).

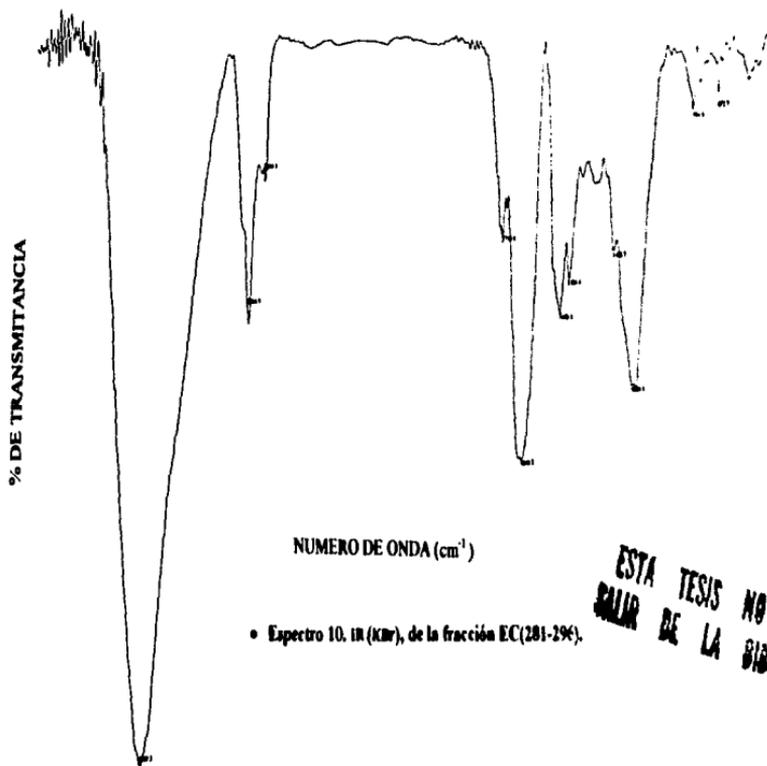
% DE TRANSMITANCIA

NUMERO DE ONDA (cm^{-1})

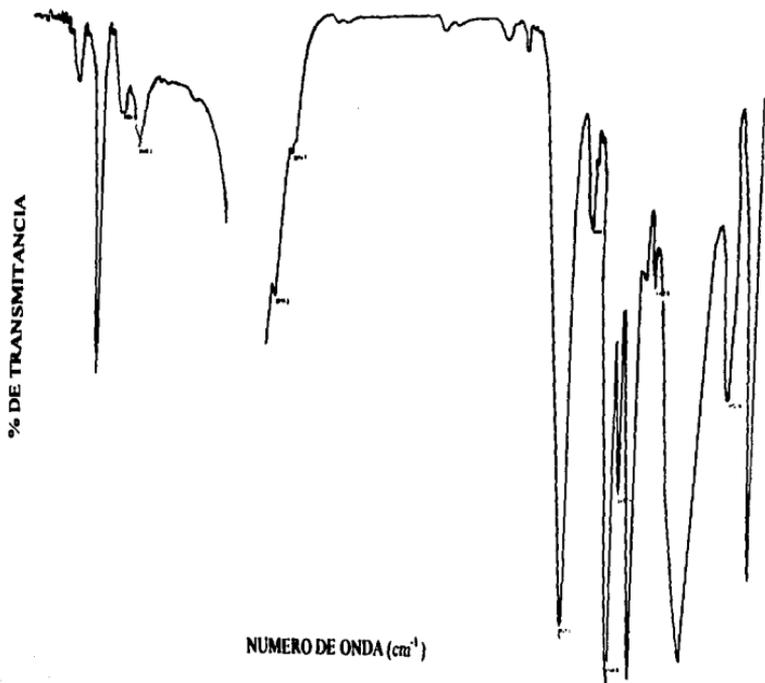
• Espectro IR (KBr), de la fracción EC(103-119).



• Espectro 9. IR (KBr), de la fracción EC(267-280).



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



Espectro IR (CHCl₃), de la fracción EC(406-416).

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Ruiz, A.; *Análisis Fitoquímico de Artemisia ludoviciana en Busca de Sustancias con Propiedades Antimálaricas*; Tesis de Maestría; UAEM, Cuernavaca- Morelos (1990).
- [2]. Varro, E. T.; Medicinal Plant Research. *Planta Medica*. (1988), 54, 95-100.
- [3]. Aranda, T. F. M.; *Guía México Desconocido*, "Plantas que curan" (1996), 29.
- [4]. Martínez, M.; *Las Plantas Medicinales de México*. Botas, México (1992), 41-42.
- [5]. Bruneton, J.; *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*, Actibia, España (1996), 5-6.
- [6]. Harborne, J.; *Phytochemical Methods*, 2a ed.; Chapman and Hall Japan (1991).
- [7]. Dey, P. M., and Harborne, J. B.; *Methods in Plant Biochemistry* Vol. 6. *Assays for the Bioactivity*. Press, London (1991), 1-3.
- [8]. Williams, H., Stone, M., Hanck, P., and Rahman, S. K.; Why are Secondary Metabolites (Natural Products) Biosynthesized?. *Journal of Natural Products* (1989), 52, 1189-1208.
- [9]. Lozoya, X., Aguilar, A., y Camacho, J.; Encuesta sobre el uso Actual de Plantas en la Medicina Tradicional Mexicana. *Rev. Med. IMSS* (1987), 25, 283.
- [10]. Rzedowski, J.; *Vegetación de México*. Limusa, México (1994), 33-34 y 39.
- [11]. Sánchez, O.; *La Flora del Valle de México*, Herrero, México (1972), 390-391.

- [12]. Rzedowski, J.; Contribuciones a la Fitogeografía Florística e Histórica de México; Algunas Tendencias en la Distribución Geográfica y Ecológica de las Compositae Mexicanas. *Ciencia XXII* (1972), 5-9, 123-132.
- [13]. Pa-Breiter, C. M., Günter, W., Steigel, A., and Matthiesen, U.; Chromenes from *Arnica sachalinensis* and *A. amplexicaulis*. *Phytochemistry* (1992), 31, 1070-1072.
- [14]. Merfort, I., Pa-Breiter, C. M. and Günter, W.; Chromenes from *Arnica lesingii* and *A. amplexicaulis*. *Biochemical Systematics and Ecology* (1992), 20, 590.
- [15]. Constabel, C., and Towers, G. H.; The Complex Nature of Mechanism of Toxicity of Antibiotic Dithiaclohexadiene Polyines (Thiarubines) from Asteraceae. *Planta Medica* (1983), 55, 35-39.
- [16]. Hudson, J. B., Graham, E. A., Rossi, R., Carpita, A., Neri, D. and Towers, H. N.; Biological Activities of Terthiophenes and Polyines from the Asteraceae. *Planta Medica*. (1993), 59, 447-150.
- [17]. Pinchon, T. M. et Pinkas, M.; Le Genre *Arnica*. *Plantas Medicinales of Phytothérapie* (1988), 2, 124-156.
- [18]. Herz, W. and Sosa, E.; Sesquiterpene lactones and other constituents of *Arnica acaulis*. *Phytochemistry* (1988), 27, 155-159.
- [19]. Marcinek-Hüpen, B., Willuhn, G., Stigel, A., Wendisch, D. and Mootz, D.; Germacranolide, Guaianolide, und Xanthanolide aus Blüten von *Arnica mollis* und Röntgenstrukturanalyse von Baileyinacetat. *Planta Medica* (1990), 56, 104-110.

- [20]. Merfort, I., and Wendisch, D.; Sesquiterpene lactones of *Arnica cordifolia*, subgenus *Austromona*. *Phytochemistry* (1993), 34, 1436-1437.
- [21]. Leven, W., and Willuhn, G.; Sesquiterpene lactones from *Arnica chamissonis* Less. VI Identification and Quantitative Determination by HPLC / GC. *Journal of Chromatography* (1987), 410, 329-342.
- [22]. Merfort, I., and Detle, W.; Flavonol glucuronide aus den Blüten von *Arnica montana*. *Planta Medica* (1988), 38, 247-250.
- [23]. Merfort, I., Marcinek, C. and Eggert, A.; Flavonoid distribution in *Arnica* subgenus *chamissonis*. *Phytochemistry* (1986), 25, 2901-2903.
- [24]. Merfort, I.; Acetylated and other Flavonoid Glycosides from *Arnica chamissonis*. *Phytochemistry* (1988), 27, 3281-3284.
- [25]. Merfort, I., and Wendisch, D.; Flavonoid glycoside aus *Arnica montana* und *Arnica chamissonis*. *Planta Medica* (1987), 26, 434-437.
- [26]. Merfort, I., Willuhn, G. and Ebert, M.; Flavonoid Distribution in *Arnica* subgenera *montana* and *austromona*. *Phytochemistry* (1988), 27, 3849-3851.
- [27]. Stephen, R. and Denford, D. E.; The Flavonoids of *Arnica frigida* and *A. louseana* (Asteraceae). *Canadian Journal of Botany* (1986), 64, 2748-2752.
- [28]. Merfort, I.; Flavonoid Glycosides in Flowers of *Arnica acaulis* subgenus *Austromona*. *Biochemical Systematics and Ecology* (1994), 22, 229.

- [29]. Downie, S., and Denford, K. E.; Flavonoids Variations in *Arnica* sgenus *Arctica*. *Biochemical Systematics and Ecology* (1988), 16, 133-137.
- [30]. Merfort, I., and Wendisch, D.; New Flavonoids Glycosides from *Arniceae* Flos DAB9. *Planta Medica* (1962), 58, 355-357.
- [31]. Pa-Breiter, C. M.; Co-Ocurrence of 2-Pyrrolidineacetic with the pirrolizidines tussilaginic acid and isotussilaginic acid and their 1-Epimers in *Arnica* species and *Tussilage farfara*. *Phytochemistry* (1992), 31,4135-4137.
- [32]. Pa-Breiter, C. M., Willuhn, G., and Röder, E.; Tussilagine and Isotussilagine: Two Pyrrolizidine Alkaloids in the genus *Arnica*. *Planta Medica* (1992), 58, 556-557.
- [33]. Pa-Braiter, C. M., Willuhn, G., and Wendisch, D.; An Unusual Terpenoid Compound from *Arnica sachalinensis* *Planta Medica* (1993), 59, A599.
- [34]. Shmidt, T., Pa-Breiter, C. M., and Wendisch, G.; First Diterpenes from *Arnica*. *Planta Medica* (1992), 58, A713.
- [35]. Argueta, A., Cano, M. L., y Rodarte, M., *Atlas de Las Plantas de La Medicina Tradicional Mexicana*. Insituto Nacional Indigenista. México (1994), 1, 163-169.
- [36]. Kubo, I., Muroi, H., Kubo, A., Chaudhuri, S. K., Sánchez, G., and Ogura, T.; Antimicrobial agents from *Heterotheca inuloides*. *Planta Medica* (1994), 60, 218-221.
- [37]. Woerdenbag, H. J., and Merfort, I.; Citotoxicity of flavonoids and sesquiterpene lactones from *Arnica* species against GLC4 and COLO cell lines. *Planta Medica* (1997), 60, 434-437.

- [38]. Tortoriello, J., and Losoya, X.; Effects of *Galphimia glauca* methanolic extract on neuropharmacological test. *Planta Medica* (1992), 58, 234-236.
- [39]. Tortoriello, J., and Ortega, A.; Sedative effects of Galphimine B, a Nor-Seco-triterpenoid from *Galphimia glauca*. *Planta Medica* (1993), 59, 398-400.
- [40]. Merfort, I.; Caffeoylquinic acids from flowers of *Arnica montana* and *A. chamissonis*, *Phytochemistry* (1992), 31, 2111-2113.
- [41]. Cano, M.; *Caracterización, identificación y determinación de la actividad biológica de flavanonas preniladas aisladas de Esenbeckia berlandieri ssp acapulquencis (Rose)*. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM (1996).
- [42]. Dominguez, X.; *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Limusa, México, (1985), 69-137.
- [43]. Pomilio, A. y Vitale, A.; *Métodos Experimentales de Laboratorio en Química Orgánica*. Secretaría General de la OEA, USA (1988).
- [44]. Gros, E., Pomilio, A., Seldes, A. y Brunton, G.; *Introducción al Estudio de los Productos Naturales*. Secretaría General de la OEA, USA (1985).
- [45]. Cool, J. C., and Bowden, B. F.; The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *Journal of Natural Products*. (1986), 49, 936-939.
- [46]. Jork, H., Funk, W., Fisher, W., and Wimmer, H.; *Thin-Layer Chromatography* Vol. I, VCH, Verlagsgesellschaft, Womheim, Germany (1990), 166, 252, 401 y 514.

- [47]. Bermejo, M. F.; *Química analítica general, cuantitativa e instrumental*, 6a ed., Paraninfo, España, (1991), 13-49-1353.
- [48]. Creary, X., and Mehrsheikh-Mohammadi, M. E.; The nature of cationic intermediates derived from α -thiophosphoryl and α -thiocarbonyl mesitates. *Journal of Organic Chemistry* (1986), 51,7-15.
- [49]. Castellens, S., Dessinges, A., Faghih, R., Luckas, G., Olesker, A., and Thang, T.; Synthesis of 2'-C-Fluoro- β -daunomycin. An example of configurational retention in fluorodehydroxylation with diethylaminosulfur trifluoride. *Journal of Organic Chemistry* (1985), 50, 4913-4917.
- [50]. Meyer, B., Ferrigni, N., Putman, J., Jacobson, L., Nichols, D. and McLaughlin, J.; *Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents*. *Planta Medica* (1982), 45, 31-34.
- [51]. McLaughlin, J.; *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 6, *Assay for Bioactivity*. Academic Press limited, USA, (1991), 1-30.
- [52]. Finney, D.; *Statistical Methods in Biological Assay*; 3a ed., McMillan Pub. Co., Inc., USA, (1978), 349-403.
- [53]. Nakanishi, K.; *Natural products chemistry 1*, Academic press, New-York (1974), 12-35.
- [54]. Markham, K. R.; *Techniques of flavonoid identification*, Academic Press, USA, (1982), 45-47.

- [55]. Ault, A., and Duded, G.: *NMR and introduction to proton nuclear magnetic resonance spectroscopy*, Holden-Day, USA, (1985), 63-65.
- [56]. Wade, L. G.: *Química orgánica*, 2a. ed., Prince-Hall, Hispanoamericana, México, (1993), 541.
- [57]. Gonzalez, G. A., Fraga, M. B., Hernández, G. M., Lamiga, F., and Revelo G. A.: Flavones from some canary species of Sidority. *Lloydia* (1978), 41, 279-280.
- [58]. Ulubelen, A., and Miski, M.: Flavonoids of *Salvia tomentos* (Labiatae). *Journal of Natural Products* (1979), 42, 261-263.
- [59]. Farid, S.: A new flavone from *Borgamott* oil wak coupling in *NMR* between ring and methoxyl proton. *Tetrahedron*, (1968), 24, 221-223.
- [60]. Le Quesne, P. W., Pastore, M. P., and Raffauf, R. F.: The cytotoxic flavonoids of *Lychnophora affinis*. *Lloydia* (1976), 39, 391-394.
- [61]. Rodriguez, E., Carman, N. J., and Mabry, T. M.: A general *NMR* procedure for locating methoxyl groups in all flavone and flavonol aglycones and some glycosides utilizing trimethylsilyl ethers and benzene-induced shifts. *Phytochemistry* (1972), 11, 409-410.
- [62]. Moreno, P. N.: *Glosario botánico ilustrado*. Continental, México (1984).
- [63]. Font Quer, P.: *Diccionario de botánica*. Labor, Barcelona (1979).

- [64]. Crescente, O., Henriquez, W., Hidalgo, D., and Romo, A. R.; Biological activity of flavonoids from *Chromolaena odorata*. *Phytochemical Society of North America (1995)*, 35, 6.
- [65]. Nathan, P. y Diaz, A.; *Introducción a la resonancia magnética nuclear*, Limusa, México (1980), 91.