

00570  
4  
2EJ



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

AISLAMIENTO, CARACTERIZACION Y EVALUACION  
ANTIINFLAMATORIA DE LOS FLAVONOIDES PRESENTES  
EN *Tephrosia crassifolia* y *T. major* (LEGUMINOSAE)

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS QUIMICAS  
(QUIMICA FARMACEUTICA)  
P R E S E N T A  
Q.F.B. MINARDA DE LA VOJ ARCINIEGA



MEXICO, D.F.

OCTUBRE

1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

273194



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

<b>Presidente</b>	<b>Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo</b>
<b>Vocal</b>	<b>Dr. Eugene Bratoeff Titeff</b>
<b>Secretario</b>	<b>Dr. Andrés Navarrete Castro</b>
<b>Primer Suplente</b>	<b>Dr. Mariano Martínez Vázquez</b>
<b>Segundo Suplente</b>	<b>Dra. Isabel Aguilar Laurents</b>

**Sitio donde se desarrollo el tema:**

**El presente trabajo se realizó en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el área de productos naturales.**

<b>Sustentante</b>	<b>Q.F.B. Minarda De la O Arciniega</b>
<b>Asesor</b>	<b>Dr. Federico Gómez Garibay</b>

## DEDICATORIAS

Dedico esta tesis **con todo mi amor,**

**A mis padres,** Leobardo y Leonarda, porque me han dado tanto amor, cariño, comprensión y me han apoyado en todo momento, gracias a éstos y, a sus sabios consejos, he logrado otra de mis metas. ¡Los amo!

**A mis hermanos,** que siendo tan jóvenes ya han formado sus familias. Con admiración, cariño y respeto, Fam. De la O Campechano, Fam. Valdés De la O, Fam. De la O Castro, y Fam. De la O Luis, gracias por todo el apoyo. A Ismael y Deme, que pronto logren sus objetivos, se lo merecen. Todos me han enseñado, lo bello que es la vida en familia, ¡Los quiero mucho!

**A mis sobrinos,** Emmanuel, Marlene, Salvador, Tania Gicela, David, Gerardo, Sisley del Carmen, Lucero y el bebé, porque sus caritas alegres, me motivan cada día. ¡Los quiero mucho!...♥

**A mis amigos** (as) de toda la vida, como ustedes saben que casi todo olvido, no mencionaré nombres por temor a olvidar alguno de ellos, pero siempre los tengo presente. ¡Con mucho cariño!

## AGRADECIMIENTOS

De manera especial, al Dr. Federico Gómez Garibay, por su valiosa asesoría.

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez, por las sugerencias y comentarios en la realización de este trabajo.

A la M. en C. María Teresa Ramírez Apan, por la realización de la evaluación antiinflamatoria.

Al M. en C. Rubén Gaviño Ramírez, Quím. Wilber Matus Medina y Quím. María de los Angeles Peña González, de los laboratorios de resonancia magnética nuclear. Al I.Q. Luis Velasco Ibarra y M en C. Francisco Javier Pérez Flores, del laboratorio de espectrometría de masas. A la Q.F.B. María del Rocío Patiño Maya, del laboratorio de espectroscopía de infrarrojo. Al Quím. Simón Hernández Ortega y la M. en C. Georgina Espinoza Pérez, del laboratorio de rayos-X, por la realización de los análisis correspondientes. A la Lic. Cecilia Aguilar Rocha, Srita. Guadalupe Anaya y Srita. Catalina Vélez, personal de la biblioteca, por la amistad y confianza brindadas, además de su disposición y amabilidad.

De manera especial agradezco a las autoridades del Instituto de Química de la UNAM, por las facilidades otorgadas durante la realización de esta tesis, Dr. Manuel Salmón Salazar, director de este Instituto, Dr. Juan Antonio Cogordan, secretario académico y M. en C. Jorge Cárdenas Pérez, secretario técnico.

Agradezco al Dr. Oswaldo Téllez Valdés, del Instituto de Biología de la UNAM, por proporcionar y clasificar el material vegetal.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca-crédito otorgada durante la realización de mis estudios de posgrado.

De manera muy especial agradezco a los miembros del jurado, Dr. Alfonso Romo de Vivar, Dr. Eugene Bratoeff, Dr. Andrés Navarrete, Dr. Mariano Martínez y Dra. Isabel Aguilar, por sus valiosos comentarios que enriquecieron la versión final de esta tesis.

Con todo respeto, al Honorable Jurado de las “clases de educación integral”, Dr. Tirso Ríos Castillo, Dr. Leovigildo Quijano, Ing. Luis Velasco, Dr. Armando Cabrera y Dr. Francisco Cruz, porque me distinguieron con su amistad, gracias por darme la oportunidad de conocerlos.

Al Dr. José Calderón Pardo, por su apoyo, consejos y constante estímulo, pero sobre todo por su amistad.

A mis amigos (as), Mauricio, Vicky, Eda, Claus, Laura, Lety, Lucy, Ivan, Luis Cortéz y Leti-tuga, con quienes disfruté mi estancia en el maravilloso lab. 2-6, mi más sincero agradecimiento.

Al Biol. Ricardo Villatoro, por sus valiosos comentarios en la escritura de la tesis, a Ivette, Anita, Benjamín, Lulú, Melina, Horte, maestra Mayela y Aída, con quienes compartí el lab. 1-4, gracias por su amistad.

A mis amigos (as) de estudios de posgrado, Maricruz, Bere, Pili, gracias por todo el apoyo, las quiero mucho y agradezco también, con cariño a Hugo, Isabel y José Luis.

Quiero manifestar mi agradecimiento a las familias De la O Vogett y Ramón Arciniega, por todo el cariño, confianza y apoyo brindados, haciendo mi estancia en el D.F., más agradable.

Sobre todo, doy gracias Dios, porque siempre esta a mi lado, guiando mis pasos. Sin su bendición, no lo hubiera logrado. Una vez más... ¡Gracias Jehová!... ♡

# CONTENIDO

	PAGINA
<b>RESUMEN</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	ii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	iii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	iv
<b>ÍNDICE DE ESPECTROS</b>	v
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	vii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 Antecedentes botánicos y químicos sobre el género <i>Tephrosia</i>	2
♦ <i>Tephrosia crassifolia</i> Benth	4
♦ <i>Tephrosia major</i> Micheli	4
1.2 Generalidades sobre flavonoides	5
♦ Propiedades biológicas de los flavonoides	5
♦ Absorción, metabolismo y biodisponibilidad de flavonoides	6
1.3 Inflamación	8
♦ Mediadores de la inflamación	9
♦ Eicosanoides	11
♦ Agentes antiinflamatorios	15
♦ Potencial antiinflamatorio de flavonoides	17
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	19
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL</b>	20
3.1 Material y equipo	20
♦ Análisis cromatográficos	20

◆ Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales y sus derivados.	20
3.2 Estudio químico de <i>Tephrosia crassifolia</i> Benth	21
3.3 Estudio químico de <i>Tephrosia major</i> Micheli	33
3.4 Transformaciones químicas	40
3.5 Evaluación antiinflamatoria	43
<b>IV. DISCUSIÓN Y RESULTADOS</b>	45
◆ Tephromicrocarpanona	45
◆ Crassichalcona	48
◆ Crassifolina	51
◆ Transformaciones químicas	56
◆ Evaluación antiinflamatoria	62
<b>V. CONCLUSIONES</b>	65
<b>VI. BIBLIOGRAFIA</b>	67
<b>ANEXO A</b> (Estructuras químicas)	75
<b>ANEXO B</b> (Espectros)	86

## RESUMEN

Estudios químicos realizados sobre especies mexicanas del género *Tephrosia* (Leguminosae), han permitido el aislamiento de numerosos flavonoides, algunos de los cuales poseen actividades biológicas.

En esta investigación, se llevó a cabo el estudio químico de *Tephrosia crassifolia* y *T. major*, aislando diferentes metabolitos, cuyas estructuras fueron caracterizadas por métodos químicos, espectroscópicos, espectrométricos y algunas confirmadas por difracción de rayos-X.

De la parte aérea y raíz de *T. crassifolia*, se aislaron tres nuevos flavonoides, tephromicrocarpanona, crassichalcona y crassifolina. Además de los siguientes compuestos conocidos: hildgardtol A, metil-hildgardtol A, abbottina, 5-O-metil-obovatina, obovatachalcona, sacarosa y una mezcla de  $\beta$ -sitosterol y stigmasterol.

De la parte aérea y raíz de *T. major*, se aislaron tres flavanonas de estructuras conocidas: glabranina, 7-O-metil-glabranina y spinoflavanona B, además de sacarosa y la mezcla de  $\beta$ -sitosterol y stigmasterol.

Se realizaron transformaciones químicas de la glabranina y 7-O-metil-glabranina con DDQ, obteniéndose en el primer caso como producto de reacción, una flavanona conocida como obovatina, y en el segundo caso, se obtuvieron dos productos isoméricos, aductos de Diels-Alder.

También fue evaluada la actividad antiinflamatoria de tres flavonoides en ratas, los cuales exhibieron una respuesta antiinflamatoria dependiente de la dosis, siendo más activa crassifolina que hildgardtol A y metil-hildgardtol A.

## ABSTRACT

Previous chemical studies on mexican *Tephrosia* species (Leguminosae) resulted in the isolation of a number of flavonoids, some of which possess biological properties.

Investigation of *Tephrosia crassifolia* and *T. major*, afforded several metabolites; their structures were established by chemical transformations, spectroscopic methods and some of them were confirmed by X-ray diffraction.

From the roots and aerial parts of *T. crassifolia*, three new flavonoids, tephromicrocarpanone, crassichalcone and crassifolin were isolated, in addition, the known compounds hildgardtol A, methyl-hildgardtol A, abbottin, 5-O-methyl-obovatin, sucrosa and a mixture of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol were also identified.

The roots and aerial parts of *T. major*, afforded three known flavanones glabranine, 7-O-methyl-glabranine, spinoflavanone B, sucrosa, and a mixture of  $\beta$ -sitosterol and stigmaterol.

Chemical transformation of glabranine with DDQ, yielded a known flavanone obovatine and the reaction of 7-O-methy-glabranine with DDQ afforded two isomeric adducts, as a result of the Diels-Alder reaction.

Anti-inflammatory activity of the three flavonoids were evaluated in rats, which exhibited a dose-dependent antiinflammatory activity. These results showed that crassifolin is a better antiinflammatory agent than hildgardtol A on methyl-hildgardtol A, at the same dose.

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Extractos obtenidos de <i>T. crassifolia</i>	22
Tabla 2.	Resumen de la cc del extracto diclorometánico de hojas de <i>Tc</i>	23
Tabla 3.	Resumen de la cc del extracto hexánico de tallos de <i>Tc</i>	24
Tabla 4.	Resumen de la cc del extracto diclorometánico de tallos de <i>Tc</i>	25
Tabla 5.	Resumen de la cc del extracto de AcOEt de tallos de <i>Tc</i>	27
Tabla 6.	Resumen de la cc de las aguas madres del extracto hexánico de raíz de <i>Tc</i>	28
Tabla 7.	Resumen de la cc de las aguas madres del extracto diclorometánico de raíz de <i>Tc</i>	29
Tabla 8.	Resumen de la cc de las aguas madres del extracto de AcOEt de raíz de <i>Tc</i>	30
Tabla 9.	Resumen de la cc del extracto metanólico de raíz de <i>Tc</i>	31
Tabla 10.	Rendimiento de los metabolitos aislados de <i>T. crassifolia</i>	32
Tabla 11.	Extractos obtenidos de <i>T. major</i>	33
Tabla 12.	Resumen de la cc de los extractos de Hex, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> y AcOEt de hojas de <i>Tm</i>	34
Tabla 13.	Resumen de la cc del extracto hexánico de tallos de <i>Tm</i>	34
Tabla 14.	Resumen de la cc del extracto diclorometánico de tallos de <i>Tm</i>	35
Tabla 15.	Resumen de la cc del extracto de AcOEt de tallos de <i>Tm</i>	36
Tabla 16.	Resumen de la cc del extracto metanólico de tallos de <i>Tm</i>	36
Tabla 17.	Resumen de la cc de los extractos de Hex, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> y AcOEt de raíz de <i>Tm</i>	37
Tabla 18.	Rendimiento de los metabolitos aislados de <i>T. major</i>	38
Tabla 19.	RMN <sup>1</sup> H 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> de los compuestos (4), (I) y (1)	48
Tabla 20.	RMN <sup>1</sup> H 300 MHz, CDCl <sub>3</sub> de los compuestos (3), (4) y (5)	53
Tabla 21.	Efecto antiinflamatorio de flavonoides sobre el edema inducido por carragenina en ratas	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Liberación y metabolismo del ácido araquidónico y sitios de acción de fármacos antiinflamatorios	12
Figura 2.	Biosíntesis de prostaglandinas y tromboxanos	14
Figura 3.	Biosíntesis de leucotrienos	15
Figura 4.	Las dos isoformas de ciclooxigenasa, COX-1 y COX-2	17
Figura 5.	Compuestos aislados de <i>Tephrosia crassifolia</i> y <i>T. major</i>	39
Figura 6.	Estructuras químicas de los productos de reacción	43
Figura 7.	Patrón de fragmentación propuesto para tephromicrocarpanona	47
Figura 8.	Oxidación de hildgardtol A	47
Figura 9.	Patrón de fragmentación propuesto para crassichalcona	50
Figura 10.	Isomerización de crassichalcona	51
Figura 11.	Patrón de fragmentación propuesto para crassifolina	52
Figura 12.	Vista estereoscópica de la estructura molecular de crassifolina	54
Figura 13.	Biflavonoides aislados del género <i>Tephrosia</i>	55
Figura 14.	Estereoquímica relativa de los flavonoides aislados	55
Figura 15.	Reacción de tetrametiletileno con DDQ	56
Figura 16.	Patrón de fragmentación propuesto para el compuesto II	58
Figura 17.	Vista estereoscópica de la estructura molecular del compuesto II	59
Figura 18.	Vista estereoscópica de la estructura molecular del compuesto III	59
Figura 19.	Reacción de 7-O-metil-glabranina con DDQ	60
Figura 20.	Reacción de glabranina con DDQ	61
Figura 21.	Efecto de flavonoides sobre el edema inducido por carragenina en ratas durante 5 h ( $p < 0.01$ )	63

## ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de tephromicrocarpanona (1)	86
Espectro 2	Espectro COSY de tephromicrocarpanona (1)	87
Espectro 3	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de tephromicrocarpanona (1)	88
Espectro 4	Espectro DEPT de tephromicrocarpanona (1)	89
Espectro 5	Espectro HETCOR de tephromicrocarpanona (1)	90
Espectro 6	EMIE de tephromicrocarpanona (1)	91
Espectro 7	Espectro de IR de tephromicrocarpanona (1)	92
Espectro 8	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de hildgardtol A (4)	93
Espectro 9	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del compuesto (I)	94
Espectro 10	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de crassichalcona (2)	95
Espectro 11	Espectro COSY de crassichalcona (2)	96
Espectro 12	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de crassichalcona (2)	97
Espectro 13	Espectro DEPT de crassichalcona (2)	98
Espectro 14	EMIE de crassichalcona (2)	99
Espectro 15	Espectro de IR de crassichalcona (2)	100
Espectro 16	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de crassifolina (3)	101
Espectro 17	Espectro COSY de crassifolina (3)	102
Espectro 18	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de crassifolina (3)	103
Espectro 19	Espectro DEPT de crassifolina (3)	104
Espectro 20	Espectro HETCOR de crassifolina (3)	105
Espectro 21	EMIE de crassifolina (3)	106
Espectro 22	Espectro de IR de crassifolina (3)	107
Espectro 23	Espectro de RMN $^1\text{H}$ metil-hildgardtol A (5)	108
Espectro 24	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del compuesto II	109
Espectro 25	Espectro COSY del compuesto II	110
Espectro 26	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto II	111
Espectro 27	Espectro DEPT del compuesto II	112

Espectro 28	EMIE del compuesto <b>II</b>	113
Espectro 29	Espectro de IR del compuesto <b>II</b>	114
Espectro 30	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del compuesto <b>III</b>	115
Espectro 31	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto <b>III</b>	116
Espectro 32	Espectro DEPT del compuesto <b>III</b>	117
Espectro 33	EMIE del compuesto <b>III</b>	118
Espectro 34	Espectro de IR del compuesto <b>III</b>	119
Espectro 35	Espectro de RMN $^1\text{H}$ 7-O-metil-glabranina ( <b>10</b> )	120
Espectro 36	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del compuesto <b>IV</b>	121
Espectro 37	Espectro COSY del compuesto <b>IV</b>	122
Espectro 38	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto <b>IV</b>	123
Espectro 39	EMIE del compuesto <b>IV</b>	124
Espectro 40	Espectro de IR del compuesto <b>IV</b>	125
Espectro 41	Espectro de RMN $^1\text{H}$ glabranina ( <b>11</b> )	126

## LISTA DE ABREVIATURAS

$[\alpha]_D$	rotación específica
$^{\circ}\text{C}$	grados centígrados
ab rel	abundancia relativa
ABC	área bajo la curva
AcMe	acetona
AcOEt	acetato de etilo
AIes	antiinflamatorios esteroidales
AINEs	antiinflamatorio no esteroidales
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
c	concentración
cc	cromatografía en columna
ccf	cromatografía en capa fina
$\text{CDCl}_3$	cloroformo deuterado
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	diclorometano
$\text{CHCl}_3$	cloroformo
cm	centímetros
$\text{cm}^{-1}$	centímetros a la menos uno
CoA	coenzima A
col.	colaboradores
COSY	correlación espectroscópica homonuclear $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ bidimensional
COX-1	ciclooxigenasa-1
COX-2	ciclooxigenasa-2
d	señal doble
$\delta$	desplazamiento químico
da	señal doble ancha
dd	señal doble de doble
dda	señal doble de doble ancha
DDQ	diclorodicianoquinona
DEPT	experimento de transferencia de polarización
$\epsilon$	coeficiente de extinción molar
EMIE	espectrometría de masas por impacto electrónico
eV	electrovolts
fracc.	fracciones
g	gramos
h	horas

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ácido sulfúrico
HETCOR	correlación espectroscópica heteronuclear <sup>13</sup> C- <sup>1</sup> H bidimensional
HETE	ácido hidroxieicosatetraenoico
Hex	hexano
HPETE	ácido hidroperoxieicosatetraenoico
Hz	hertz
IgE	inmunoglobulina E
IL-1	interlucina-1
IR	infrarrojo
J	constante de acoplamiento
KBr	bromuro de potasio
kg	kilogramos
λ <sub>max</sub>	longitud de onda máxima
LTs	leucotrienos
m	señal múltiple
m.s.n.m.	metros sobre el nivel del mar
m/z	masa/carga
M <sup>+</sup>	ion molecular
MeOH	metanol
mg	miligramos
MHz	megahertz
ml	mililitros
mm	milímetros
nm	nanómetros
v <sub>max</sub>	frecuencia máxima
No.	número
NSAIDs	non steroidal anti-inflammatory drugs
OH	grupo hidroxilo
OMe	grupo metoxilo
PDC	dicromato de piridinio
pf	punto de fusión
PGs	prostaglandinas
PLA <sub>2</sub>	fosfolipasa A <sub>2</sub>
PLC	fosfolipasa C
PMNs	polimorfonucleares
ppm	partes por millón
RMN <sup>13</sup> C	resonancia magnética nuclear de carbono
RMN <sup>1</sup> H	resonancia magnética nuclear de hidrógeno
s	señal simple

SAIDS	steroidal anti-inflammatory drugs
t	señal triple
<i>Tc</i>	<i>Tephrosia crassifolia</i>
td	señal triple de doble
<i>Tm</i>	<i>Tephrosia major</i>
TXs	tromboxanos
UV	ultravioleta

# I. INTRODUCCION

Mucho antes de que se iniciaran las investigaciones sobre los productos químicos naturales y los organismos vivos que los sintetizan, los humanos en diversas partes del mundo, ya hacían extractos, tinturas y otras preparaciones de plantas y animales. Algunas de estas preparaciones naturales les servían como remedios para aliviar malestares de ciertas enfermedades o fueron usados en la cacería y en la guerra.<sup>1</sup>

Actualmente, los compuestos de fuentes naturales juegan un papel muy importante en la medicina moderna, muchos de ellos, son fármacos clínicamente útiles para el tratamiento de enfermedades. Otros, proveen compuestos básicos que pueden ser modificados ligeramente para hacerlos más efectivos o menos tóxicos. Un último papel, pero no menos importante es que algunos productos naturales, contienen compuestos que demuestran poca o ninguna actividad, pero que pueden ser modificados químicamente o utilizados como modelos o prototipos para producir fármacos sintéticos, no muy fáciles de obtener por otros métodos.<sup>2,3</sup> En los países desarrollados, se ha estimado que aproximadamente un 80% de los medicamentos usados en el cuidado de la salud primaria, provienen de plantas.<sup>4</sup>

Por otro lado, el estudio químico de la flora nacional es interesante debido a su gran abundancia y diversidad. Además, muchas de estas plantas constituyen el recurso más amplio y valioso de la medicina indígena tradicional en nuestro país, lo cual motiva al estudio de dichas especies.

A pesar de que las especies mexicanas del género *Tephrosia* no son utilizadas en la medicina tradicional, resulta interesante su estudio químico, ya que estas especies, han demostrado la presencia de flavonoides. Estos compuestos, presentan una gran variedad de actividades biológicas, entre ellas, la antiinflamatoria. Lo anterior motivó el estudio de dos especies de este género, con la finalidad de aislar los metabolitos secundarios de tipo flavonoide para evaluar su actividad antiinflamatoria y de esta manera contribuir al estudio químico de la flora mexicana, en especial del género *Tephrosia*.

## 1.1 Antecedentes botánicos y químicos sobre el género *Tephrosia*.

Dentro de la gran diversidad vegetal que posee México, se encuentra el género *Tephrosia* perteneciente a la familia de las leguminosas. Botánica y taxonómicamente las leguminosas juegan un papel importante en la vegetación de muchas partes del mundo. En general algunas tienen propiedades medicinales, lo que las hace aún más interesantes. Las leguminosas, químicamente están constituidas por diversos metabolitos secundarios, aunque principalmente contienen flavonoides.<sup>5</sup>

El género *Tephrosia* se encuentra ampliamente distribuido en regiones tropicales de clima cálido, abarcando más de 400 especies en todos los continentes a excepción de Europa. En México, se encuentran aproximadamente 50 especies, ubicándose principalmente en las costas del pacífico y del golfo de México.<sup>6,7</sup>

Algunas especies de este género han sido utilizadas por el hombre para diversos fines, por ejemplo *T. sinapou* y *T. multifolia* son utilizadas en la zona del caribe y centroamérica como piscicida.<sup>6</sup> En Africa, *T. vogelii* y *T. macropoda* y en Australia, *T. rosea* y *T. astragaloides*, son usadas para el mismo fin.<sup>6</sup> *T. virginiana* es utilizada en norteamérica como insecticida, esta propiedad se debe a la presencia de rotenona, un flavonoide que ha llegado a ser importante por su actividad insecticida no tóxico para mamíferos. *T. vogelli* y *T. macrantha* son utilizadas en Africa y México respectivamente como ornamentales, por sus atractivas flores. A este género, también se le atribuyen varias propiedades medicinales, entre estas se puede mencionar, el uso de la raíz de *T. virginiana*, como vermífugo y *T. senna*, como purgante en norteamérica.<sup>6</sup> *T. multifolia* y *T. cinerea* son empleadas en la zona del caribe como febrífugos, contra afecciones nerviosas, cutáneas y venéreas, mientras que *T. apollinea* es utilizada en Israel para aliviar los cólicos.<sup>7</sup> En México, no se tiene conocimiento de su uso medicinal, solo se tienen referencias del uso de *T. leiocarpa* (*nawe* o *naweke*), como insecticida, empleado por los tarahumaras para matar los piojos de sus animales y de ellos mismos, además, se sabe que también la usaban para la pesca primitiva.<sup>7</sup>

Hasta el momento, de las especies mexicanas se han estudiado desde el punto de vista químico 37 de ellas (dato no publicado). De estos estudios resalta el hecho de que estas especies sintetizan compuestos flavonoides y la gran mayoría son flavonoides prenilados.<sup>8</sup> A continuación, se listan algunas *Tephrosias* mexicanas publicadas en la literatura, de donde se aislaron algunos metabolitos secundarios de estructuras conocidas y un número importante de flavonoides aislados por primera vez de estas especies. Las estructuras de los flavonoides mencionados a continuación se encuentran en el anexo A.

- ◆ *T. madrensis*:<sup>9</sup> 5,7-dimetil-8-isoprenilflavano, 7-O-metil-glabranina,  $\beta$ -sitosterol.
- ◆ *T. woodii*:<sup>10</sup> oaxacacina, mixtecacina (5-O-metil-obovatina).
- ◆ *T. nitens*:<sup>11</sup> ninetina, rotenona,  $\alpha$ -toxicarol, 5,7-dimetoxi-8-prenilflavano, 7-O-metil-glabranina,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol.
- ◆ *T. watsoniana*:<sup>12</sup> tephrowatsina A, B, C, D, y E, 5-O-metil-quercetina, 5,7-dimetoxi-8-prenilflavano, 7-O-metil-glabranina, ninetina.
- ◆ *T. viridiflora*:<sup>13</sup>, viridiflorina, elongatina, villosinol, 11-hidroxi-tephrosina,  $\beta$ -sitosterol y stigmasterol
- ◆ *T. abbottiae*:<sup>14</sup> abbottina, tephrobbottina, obovatina, 5-O-metil-obovatina, 7-O-metil-glabranina, rotenona, deguelina,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, lupeol.
- ◆ *T. quercetorum*:<sup>15</sup> quercetol A, B, y C, 7-O-metil-glabranina, 5,7-dimetilglabranina, 5-O-metil-obovatina, tephrowatsina A.
- ◆ *T. leiocarpa*:<sup>16</sup> tephroleocarpina A y B, rotenona, rotenolona B, dehidrorotenona, tephrosina, 7-O-metil-glabranina, obovatina.
- ◆ *T. vicioides*:<sup>17</sup> enantiomultijuguina.
- ◆ *T. tepicana*:<sup>18</sup> tepicanol A,  $\alpha$ -toxicarol, 7-O-metil-glabranina, tephrowatsina A y B, y quercetol B.

◆ *Tephrosia crassifolia* Benth.

Es un arbusto perenne, de 1-2 m de altura, con hojas de 10-20 cm de largo, folíolos de 3 x 1.2 cm, ovados o elípticos. Flores de 12-14 mm de largo, pétalos de color rosa a carmín. Su fruto es una legumbre de 4-5 cm x 4-5 mm, casi recta, con 6-7 semillas de color pardo a oscuras. Su floración y fructificación es de octubre a febrero y de noviembre a marzo, respectivamente.<sup>7</sup>

Se distribuye en México, desde Sinaloa hasta Oaxaca, exclusivamente por la vertiente del Pacífico en bosques de *Pinus* y *Pinus-Quercus*, en altitudes entre los 200-900 m.s.n.m.<sup>7</sup>

No se tiene información sobre su uso en la medicina tradicional. En cuanto a estudios químicos realizados, solo se encontró el estudio de la parte aérea, de donde se aislaron dos flavonoides: tephrowatsina B y 7-O-metil-glabranina, además de  $\beta$ -sitosterol.<sup>19</sup>

◆ *Tephrosia major* Micheli

Es un arbusto perenne de 1-1.5 m de altura, con hojas extendidas de 13-20 cm de largo, folíolos de 3-5 cm de largo, ovaladas o elípticas. Flores de 18-21 mm de largo, pétalos de color blanco con rosa o violeta. Legumbres casi rectas de 4-4.5 cm de longitud, con 6-9 semillas casi redondas de 3-4 mm de diámetro, de color café oscuras. Florece en diciembre. Se distribuye en México en los estados de Guerrero y Jalisco en bosques de *Pinus* y *Pinus-Quercus*, en altitudes de 600-900 m.s.n.m.<sup>20</sup>

No se tienen datos de su uso en la medicina tradicional. De los estudios químicos realizados anteriormente, de la parte aérea y raíz de esta especie, se aislaron los siguientes flavonoides: glabranina, 7-O-metil-glabranina, obovatina, sumatrol,  $\alpha$ -toxicarol y quercetina, tephrobbottina, tephrowatsina A, tephrowatsina B, quercetol B y tephromajorchalcona, además de lupeol y una mezcla de  $\beta$ -sitosterol y stigmasterol.<sup>21,22</sup>

## 1.2 Generalidades sobre flavonoides.

Los flavonoides constituyen uno de los más grandes grupos de metabolitos secundarios.<sup>23</sup> Se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, principalmente en forma de glicósidos. La gran mayoría son pigmentos responsables de la coloración de numerosas flores y algunos frutos y del sabor de muchos alimentos y bebidas como el té y el vino.<sup>24,25</sup>

Son compuestos fenólicos que presentan estructuras químicas íntimamente relacionadas, basadas en un esqueleto de 15 átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>).<sup>26</sup> Los flavonoides se biosintetizan a través de una ruta mixta, la ruta del ácido shikimico y la del acetato-malonato.<sup>23</sup> El intermediario común a todos los flavonoides es la chalcona, su formación ocurre por la condensación de *p*-cumaril-CoA (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) con tres unidades de malonil-CoA (C<sub>6</sub>), y a partir de éste derivan los diferentes tipos que existen<sup>24,27</sup> (ver anexo A).

La función fisiológica de los flavonoides en los vegetales, como ocurre para muchos metabolitos secundarios, no es bien conocida, algunas hipótesis indican que son antioxidantes (por quelación de los metales), otros son inhibidores enzimáticos, o bien, protegen contra radiaciones nocivas. La función ecológica de estos pigmentos es más evidente, al ser responsables del color de muchas flores, por lo tanto, son “guías del néctar”, motivos visibles al UV para los insectos, de esta manera atraen y guían a los polinizadores, favoreciendo así, la reproducción de las especies. Algunos son fitoalexinas y otros están implicados en mecanismos alelopáticos.<sup>24,28</sup>

### ◆ Propiedades biológicas de los flavonoides.

La propiedad más importante atribuida a los flavonoides, es la propiedad “vitamínica P”. En 1936, Szent-Györgyi observó que una mezcla de dos flavanonas llamada citrina, disminuía la permeabilidad y fragilidad capilar en humanos, por lo cual se le dio el nombre de vitamina P. Sin embargo el término vitamina P fue abandonado porque estos flavonoides no

podían ser definidos como tal, por lo que fue preferible designarlos con el calificativo de factor P.<sup>24,29</sup>

Por otro lado, los flavonoides despliegan un conjunto impresionante de acciones bioquímicas y farmacológicas, algunas de los cuales sugieren que ciertos miembros de este grupo pueden afectar significativamente la función de múltiples sistemas celulares en mamíferos, ya que algunos poseen actividad antiinflamatoria, antiviral, anticarcinogénica, entre otras.<sup>25</sup>

Estudios experimentales realizados *in vitro* han demostrado que los flavonoides pueden inhibir y algunas veces inducir, una gran variedad de sistemas enzimáticos en mamíferos. Algunas de estas enzimas están involucradas en importantes rutas que regulan la división y proliferación celular, agregación plaquetaria, desintoxicación y respuesta inmune e inflamatoria.<sup>25,29</sup>

Ultimamente, se ha puesto mucha atención a las propiedades antioxidantes de los flavonoides, causada por su habilidad para captar radicales de oxígeno. Estos radicales de oxígeno y la lipoperoxidación pueden estar involucrados en ciertos estados patológicos tales como la aterosclerosis, el cáncer o la inflamación crónica.<sup>29</sup>

#### ◆ **Absorción, metabolismo y biodisponibilidad de flavonoides**

El conocimiento sobre la biodisponibilidad y farmacocinética de flavonoides en humanos es indispensable para evaluar el papel benéfico de estos compuestos en la salud. El destino de los flavonoides en el cuerpo después de la ingestión está determinada por su absorción, distribución, metabolismo y eliminación, de los cuales cada una tiene su propia velocidad y extensión.

**Absorción.** Estudios realizados en roedores y humanos sobre la absorción de flavonoides demostraron que la capacidad de absorción del colon es mucho menor que la del intestino delgado. Además, contrario a lo que siempre se había pensado que solo las agliconas

eran absorbidas, se observó que también los flavonoles glicosidados son bien absorbidos en humanos sin previa hidrólisis por los microorganismos de la flora intestinal, y que los flavonoles glicosidados presentes en alimentos, son mejor absorbidos que las agliconas puras.<sup>29,30</sup> Por otro lado, uno de los factores que puede afectar la absorción de flavonoides, son las proteínas de la dieta, porque se unen a los polifenoles, reduciendo de esta manera, su absorción.<sup>30</sup>

**Metabolismo.** Los sitios principales del metabolismo de los flavonoides, son el hígado y la flora intestinal, aunque otros tejidos como el riñón y la pared intestinal también pueden participar.<sup>30,31</sup>

**Metabolismo por el hígado.** Tanto los flavonoides como sus metabolitos absorbidos del colon después de la acción bacteriana, son subsecuentemente metabolizados por enzimas localizadas principalmente en el hígado. Las reacciones de la fase I de biotransformación introducen grupos polares a la molécula, éstas solo han sido descritas para flavonoides sintéticos carentes de grupos hidroxilos. La conjugación de los grupos hidroxilos polares con ácido glucurónico, sulfato o glicina, constituyen las reacciones de la fase II de biotransformación, de esta manera, el conjugado formado al ser soluble en agua, puede ser excretado en orina.

**Metabolismo por la flora intestinal.** Los flavonoides no absorbidos y los flavonoides conjugados secretados con la bilis en el intestino son degradados por las bacterias en el colon. Las principales reacciones bacterianas son la hidrólisis de flavonoides glicosidados y conjugados y la fisión anular de la aglicona para formar los ácidos fenólicos, los cuales también son absorbidos y excretados en la orina.

**Biodisponibilidad.** La biodisponibilidad absoluta de los flavonoides no ha sido demostrada, pero en estudios realizados, es evidente que ésta, difiere para los alimentos diferentes.

Por otro lado, uno de los objetivos de esta investigación es evaluar la actividad antiinflamatoria de los flavonoides aislados de las especies en estudio, por lo que es conveniente definir qué es la inflamación, qué características clínicas presenta, cuales son sus mediadores y que agentes pueden actuar como antiinflamatorios.

### 1.3 Inflamación

La palabra inflamación deriva del latín “*flamma*”, que significa fuego o “*inflammare*”, prenderse o encenderse. En Grecia fue usada la palabra “*phlogosis*”, que significa área inflamada.<sup>32</sup> Se entiende por inflamación el conjunto de mecanismos involucrados en la respuesta del cuerpo frente a una agresión, encaminados a eliminar al agente agresor y reparar el daño.<sup>33</sup>

El proceso de inflamación, como parte que es del mecanismo de defensa inmune, es normal y, en consecuencia es benéfico para el organismo. No obstante, en algunas condiciones se prolonga en forma indebida dando lugar a daño tisular y manifestaciones clínicas muy importantes.<sup>33</sup>

La inflamación se divide en tres fases: inflamación aguda, respuesta inmunitaria e inflamación crónica.<sup>34</sup> La **inflamación aguda**, constituye la respuesta inicial a la lesión tisular, causada por factores endógenos (fractura de un hueso o necrosis de tejido), y por factores exógenos, los cuales incluyen varios tipos de daños, tales como, daños físicos o mecánicos (quemadura, cortadura), daños químicos (exposición a sustancias corrosivas), daño biológico (infección por microorganismos) y daño inmunológico (reacciones de hipersensibilidad). La **respuesta inmunitaria**, se origina cuando células inmunitariamente competentes se activan en respuesta a microorganismos o sustancias antigénicas extrañas liberadas durante la respuesta inflamatoria aguda o crónica. La falta de una oportuna resolución del proceso inflamatorio por persistencia del antígeno o agente agresor dentro de los tejidos, da lugar a la **inflamación crónica** que llevará irremediablemente al daño

permanente de los tejidos, por ejemplo la artritis reumatoide, gota, asma, tuberculosis, linfogranuloma venéreo, etc.<sup>33</sup>

Las **características clínicas** clásicas que comprende la respuesta inflamatoria son rubor, calor, dolor, tumor y pérdida eventual de función del área afectada.<sup>32</sup> A continuación se describe brevemente el origen de cada una de estas manifestaciones.

La manifestación inicial del proceso es **rubor**, y se debe a la vasodilatación que, aumenta el flujo sanguíneo a la zona afectada. Este mecanismo tiene por objeto asegurar un adecuado suministro al sitio de agresión, de factores plasmáticos como anticuerpos, mediadores de la inflamación, etc. y de células como polimorfonucleares o macrófagos. El incremento del flujo sanguíneo en la zona afectada trae como consecuencia el aumento local de la temperatura o **calor**. El **tumor** o hinchazón, ocurre como consecuencia de la exudación de líquidos y la migración de células de los capilares hacia los tejidos. Al exudado plasmático sigue el proceso de infiltración celular, que en las primeras horas está dado por PMNs (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y luego por macrófagos y linfocitos. Finalmente, el **dolor** se debe a la activación del sistema de las cininas y de las prostaglandinas.<sup>33</sup>

#### ◆ **Mediadores de la inflamación**

Se denominan así, a una serie de compuestos que actúan como mensajeros entre las células involucradas, ellos activan una apropiada respuesta inflamatoria cuando son liberados por algunos tejidos dañados.<sup>32</sup> Son producidos directa o indirectamente por las células antes mencionadas o se derivan de otros factores humorales. Se dividen en dos grupos principales, los primarios o proteinizados, que a su vez pueden ser de origen celular o humoral, y los secundarios, solo de origen celular.<sup>33</sup>

**Mediadores primarios de origen celular.** Se encuentran en los gránulos citoplasmáticos o lisosomas de las células fagocíticas y de los mastocitos.

De los fagocitos salen por degranulación externa inducida por difentes estímulos físicos, químicos u hormonales, la **elastasa** y **colagenasa**, ambos dañan tejidos. La **catepsina G**, actúa sobre los factores C3 y C5 del complemento generando C3a y C5a. La **lactoferrina**, induce la producción de radicales hidroxílicos.<sup>33</sup>

De los mastocitos y basófilos se originan, por degranulación inducida inmunológicamente (IgE), por factores físicos o por factores químicos, los siguientes mediadores: la **histamina**, que representa el mediador de la inflamación de más rápida acción; cuando actúa sobre los receptores H<sub>1</sub> es un potente vasodilatador, aumenta la permeabilidad capilar, induce la contracción del músculo liso y estimula los nervios sensoriales.<sup>33</sup> Por otra parte, el **factor activador de las plaquetas**, el cual incrementa la permeabilidad vascular, produce edema, contracción del músculo liso e hipotensión sistémica. Por último, la **serotonina**, que influye aumentando la permeabilidad vascular y vasodilatación.<sup>34</sup>

**Mediadores primarios de origen humoral.** Se derivan de los sistemas del complemento, coagulación y quininas.<sup>33</sup> Del **complemento**, por acción de la catepsina, se originan polipéptidos anafilotóxicos, como **C4a**, **C3a**, **C5a**, que incrementan la permeabilidad capilar y facilitan la liberación de histamina.<sup>35</sup> Del **sistema de coagulación**, se origina la **fibrina** y el **plasmín**. Del **sistema de las cininas** activado por el factor de Hageman, se produce **bradicidina**, esta incrementa la permeabilidad capilar, produce vasodilatación y dolor, por estímulos sobre las terminaciones nerviosas.<sup>32,33</sup>

**Mediadores secundarios**, su síntesis empieza una vez que la respuesta inflamatoria se ha iniciado.<sup>33</sup> De los macrófagos se origina la **interleucina I (IL-I)**, uno de los mediadores más importantes, responsable de la inducción de fiebre, estimula la producción de proteínas de la fase aguda de la inflamación, tales como: la **proteína C reactiva (PCR)**, la cual aparece dentro de las primeras 24 horas del proceso inflamatorio agudo; ésta incrementa la fagocitosis y se adhiere a linfocitos y macrófagos; **fibrinógeno**, la formación de fibrina a nivel tisular, aísla los antígenos, formando a su alrededor un gel protector; **proteína A sérica del amiloide**, que adquiere importancia en procesos crónicos.<sup>32,33</sup>

De los polimorfonucleares, macrófagos y células endoteliales, se originan los **eicosanoides** (PGs, LTs, TXs), importantes mediadores de la inflamación y punto clave en el tratamiento de la misma, por lo que se describirán más adelante.

De los macrófagos se produce el **factor necrosante tumoral** (TNF), también conocido como linfotoxina y caquexina,<sup>32</sup> potente mediador de la fase aguda de la inflamación, estimula la síntesis de PGE<sub>2</sub>, y de proteínas de la fase aguda, tiene efecto citotóxico sobre células tumorales.<sup>35</sup>

Del metabolismo del oxígeno, activado por degranulación externa de los polimorfonucleares se originan: el **superóxido** ( $\cdot\text{O}_2$ ), los **radicales hidroxílicos** ( $\cdot\text{OH}$ ), el **peróxido de hidrógeno** (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).<sup>33,35</sup>

#### ◆ **Eicosanoides**

Son productos de oxidación de ácidos grasos insaturados, poseen importantes actividades biológicas, algunas de las cuales tienen que ver con el proceso inflamatorio y la respuesta inmune. El ácido graso precursor más importante es el ácido araquidónico, compuesto de 20 átomos de carbono (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico).<sup>34</sup>

El **ácido araquidónico** se deriva de fuentes alimenticias o es sintetizado en el cuerpo a partir del ácido linoleico.<sup>36</sup> Es almacenado en los lípidos de las membranas celulares y esterificado a fosfolípidos como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol. Así, el paso limitante en la síntesis de eicosanoides, es la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana por fosfolipasas específicas, principalmente fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) o fosfolipasa C (PLC) y diacilglicerol lipasa.<sup>34</sup> En algunos tipos de células estas enzimas son dependientes de calcio y son activadas por el incremento en la concentración de calcio intracelular. De esta manera, la síntesis de eicosanoides puede iniciarse por una variedad de estímulos que incrementen el nivel de calcio intracelular. Esto ocurre a través de

mecanismos de transducción de señal, mediado por receptores específicos (hormonas), ó a través de la perturbación de la integridad de la membrana celular (trauma físico, químico ó inmunológico), los cuales provocarán la activación de PLA<sub>2</sub>. Una vez liberado el ácido araquidónico, es oxidado enzimáticamente a través de cuatro rutas principales: ciclooxigenasa, lipoxigenasa, epoxigenasa P450 y vía radicales libres<sup>34,36</sup> (Figura 1).

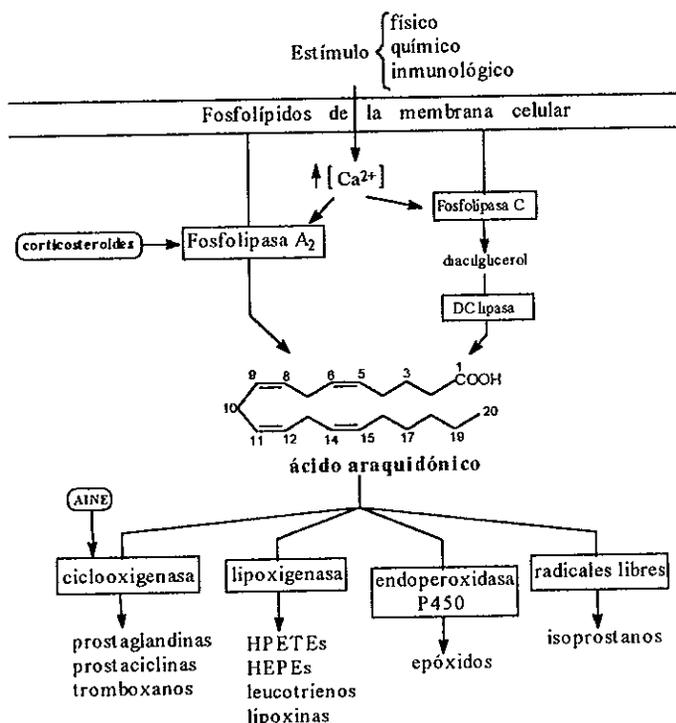


Figura 1. Liberación y metabolismo del ácido araquidónico y sitios de acción de fármacos antiinflamatorios.

**Prostaglandinas (PGs).** El nombre de prostaglandina deriva de “prostata”, ya que en un principio se pensó que se originaban en la glándula prostática.<sup>32,34</sup> Actualmente, se sabe que, estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en pequeñas cantidades en todos los tejidos y líquidos corporales.<sup>37</sup> Son considerados como hormonas que actúan localmente, es decir, cerca de su área de síntesis. Presentan un amplio espectro de actividad

biológica, influyen en la agregación plaquetaria, intervienen en procesos inflamatorios, inhiben las secreciones gástricas, influyen en los aparatos reproductores, estimulan las contracciones uterinas en el parto, entre otras.<sup>34,36</sup>

La estructura básica de una molécula de prostaglandina es un ácido carboxílico de 20 átomos de carbono que contiene un ciclopentano entre C-8 y C-12 y un hidroxilo en C-15. Las primeras prostaglandinas aisladas fueron llamadas E (soluble en Eter) y F (soluble en buffer de Fosfato) respectivamente. Las diferentes clases de prostaglandinas que existen se distinguen por los sustituyentes en el ciclopentano, designadas por letras, por ejemplo PGE<sub>2</sub> y PGH<sub>2</sub>, etc, y el subíndice indica el número de dobles enlaces.<sup>36,38</sup>

Las prostaglandinas se biosintetizan a partir del ácido araquidónico por la acción inicial de la enzima prostaglandina endoperóxido sintetasa. Existen dos isoformas de esta enzima, la PGH sintetasa-1 (COX-1), y la PGH sintetasa-2 (COX-2),<sup>39</sup> que se mencionarán más adelante.

La PGH sintetasa, es una enzima bifuncional que tiene dos actividades distintas sobre el ácido araquidónico: (1) ciclooxigenasa y (2) peroxidasa.<sup>38</sup> En la primera, ambas enzimas (COX-1 y COX-2), promueven la captura de dos moléculas de oxígeno, una para formar el anillo endoperóxido en C-9 y C-11, y otra para formar el grupo hidroperóxido en C-15 dando lugar a PGG<sub>2</sub>. La segunda actividad involucra una reducción del peróxido para dar PGH<sub>2</sub> con un grupo hidroxilo en C-15, que es esencial para la actividad biológica.<sup>34</sup> Ambos endoperóxidos son químicamente inestables, pero pueden ser transformados enzimáticamente a partir de PGH<sub>2</sub> en una variedad de productos que incluyen PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, o TXA<sub>2</sub> (Figura 2).

Las prostaglandinas que actúan como mediadores de la inflamación son PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> y PGD<sub>2</sub>, estas son responsables de la manifestación de rubor y edema que se presentan en la inflamación aguda.<sup>33,34</sup> Además, causan vasodilatación y sensibilizan las terminaciones

nerviosas aferentes a la acción de la histamina y bradicidina. A nivel del hipotálamo, la  $PGE_2$ , producida por estímulo de la IL-1, es la responsable de la producción de fiebre.<sup>33</sup>

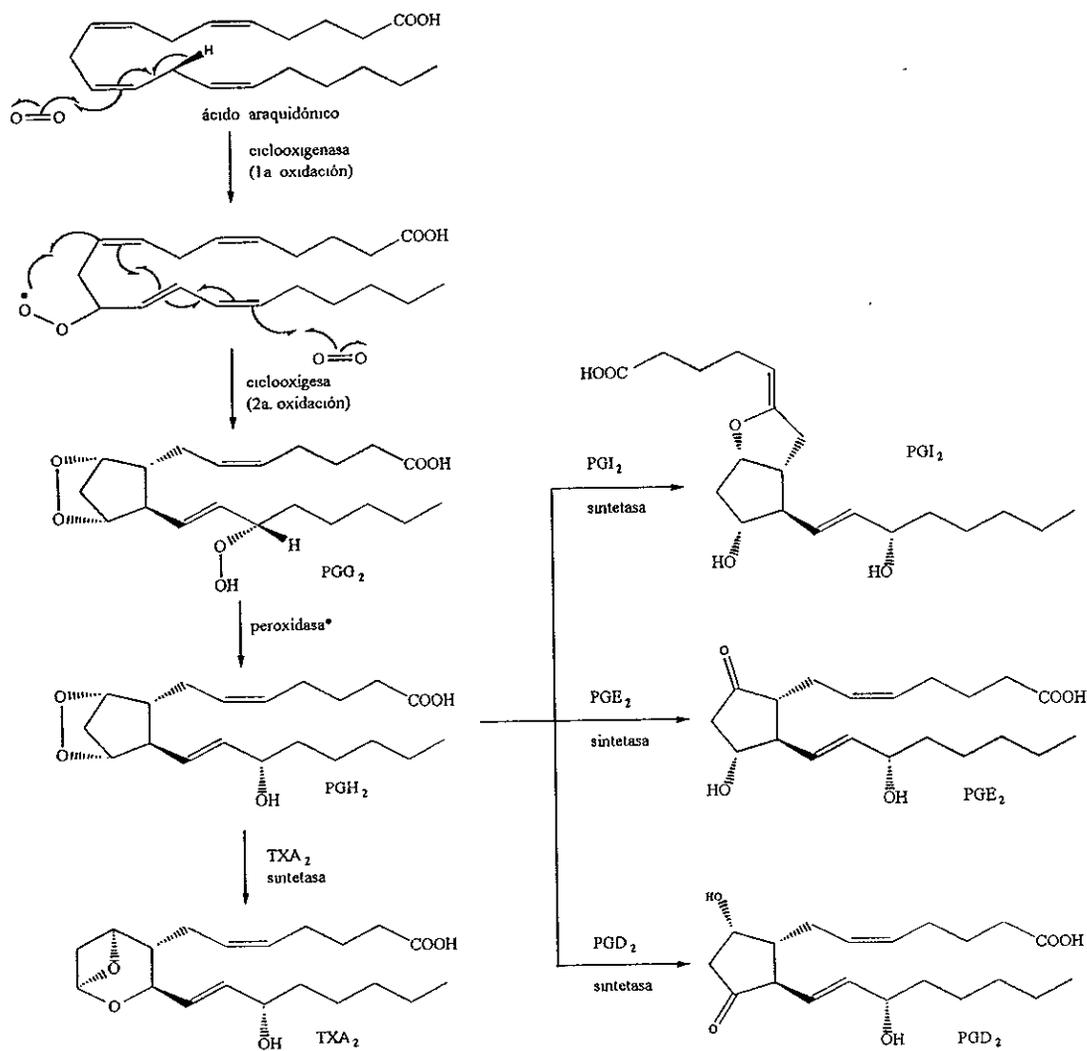


Figura 2. Biosíntesis de prostaglandinas y tromboxanos. (PGH sintetasa\*, enzima bifuncional).

**Tromboxanos (TXs).** Se derivan del ácido araquidónico por la vía ciclooxigenasa (figura 2). El TXA<sub>2</sub>, como mediador de la inflamación, es un potente vasoconstrictor, sus niveles aumentan en la inflamación aguda y pueden actuar previniendo hemorragias.<sup>32</sup>

**Leucotrienos (LTs).** Se generan del ácido araquidónico por acción de la lipoxigenasa, que le agrega un endoperóxido en C-5 o C-12, generando los ácidos hidroperoxitetraenoicos (HPETEs), los cuales se convierten rápidamente a ácidos hidroxeicosatetraenoicos (HETEs) y leucotrienos.<sup>32,34</sup> (Figura 3).

Como mediadores de la inflamación, el  $LTB_4$  y 5-HETE, exhiben una fuerte atracción quimiotáctica para los polimorfonucleares que se acumulan en el sitio afectado.<sup>32</sup> Los leucotrienos,  $LTC_4$  y  $LTD_4$ , incrementan la permeabilidad capilar.<sup>35</sup>

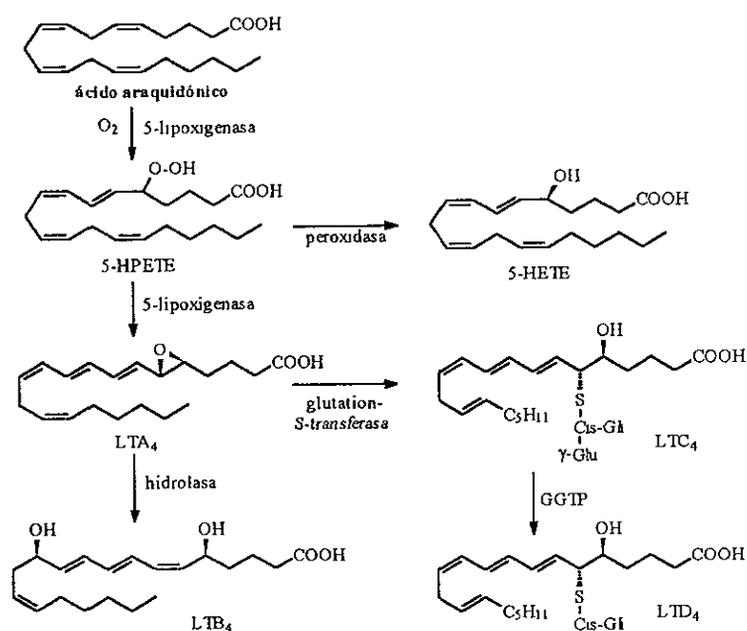


Figura 3. Biosíntesis de leucotrienos.

#### ◆ Agentes antiinflamatorios.

Los fármacos que inhiben algunas enzimas que participan en la biosíntesis de eicosanoides, ejercen acción antiinflamatoria.<sup>33</sup>

Los corticosteroides pueden bloquear la síntesis de eicosanoides, porque estimulan la síntesis de lipocortina, un inhibidor proteico de la PLA<sub>2</sub>, de esta manera, impiden la liberación del ácido araquidónico disminuyendo apreciablemente la producción de PGs, TXs, y LTs que intervienen en el proceso inflamatorio.<sup>33,39</sup>

La terapia con glucocorticoides, **fármacos antiinflamatorios esteroidales** (AIEs o SAIDs), usada en artritis reumatoide, en la medida de lo posible debería evitarse ya que está asociada a un amplio rango de efectos secundarios adversos que dependen de la dosis y duración del tratamiento, tales como osteoporosis, úlceras gástricas, glaucoma, hipertensión, obesidad, impotencia, entre otros.<sup>32,39</sup> En el anexo A se representan las estructuras químicas de algunos AIE, tales como, betametasona, hidrocortisona, parametasona, metilprednisolona, triamcinolona, cloprednol, prednisona, dexametasona.

Los **fármacos antiinflamatorios no esteroidales** (AINE o NSAIDs), como la aspirina, bloquean la formación de PGs y TXs por inhibición de la enzima ciclooxigenasa, pero no inhiben los productos del ácido araquidónico via lipoxigenasa.<sup>40</sup>

Como ya se había mencionado antes, existen dos formas de la enzima ciclooxigenasa conocidas como COX-1 y COX-2 (figura 4). La COX-1, es una enzima vinculada a la producción de las prostaglandinas fisiológicas en el riñón y en el estómago, su activación da lugar a la producción de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), que cuando es liberada por el endotelio vascular, es antitrombótica y por la mucosa gástrica, es citoprotectora. Mientras que la enzima COX-2, está ligada a la producción de prostaglandinas en el sitio de inflamación pero no en otros sitios.<sup>39,41</sup>

Los fármacos AINEs actuales inhiben preferentemente la COX-1 y no son selectivos.<sup>40</sup> En el anexo A, se muestran algunas estructuras de AINE, tales como aspirina, naproxen, ibuprofeno, indometacina, piroxicam, diclofenaco, fenilbutazona, tolmetina, ketorolac y nabumetona. Los inhibidores selectivos de la enzima COX-2 pueden tener mejores perfiles de seguridad gastrointestinales y renales,<sup>42</sup> muy útiles en la terapia de la inflamación crónica, ya que podrían ser antiinflamatorios sin los efectos secundarios que

reducen la función renal o producen ulceraciones gástricas como por ejemplo, meloxicam, nimesulid y etodolac que inhiben preferentemente la COX-2.<sup>43,44</sup>

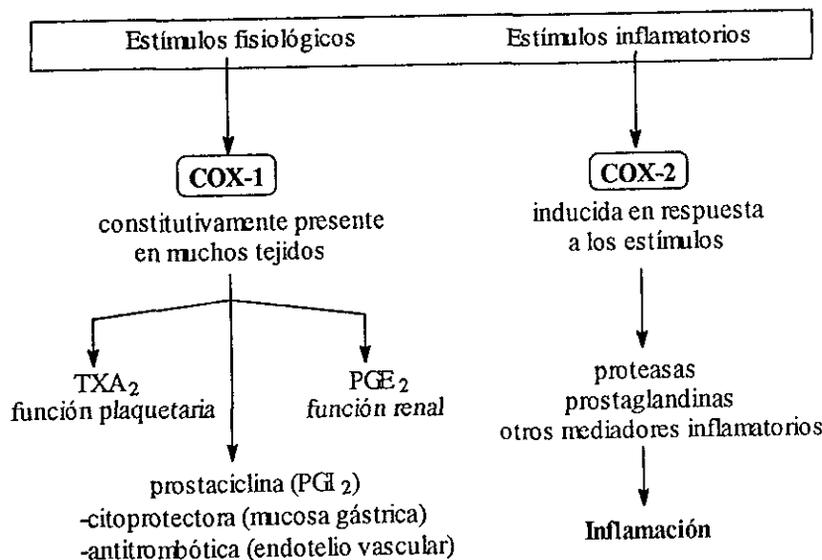


Figura 4. Las dos isoformas de ciclooxigenasa, COX-1 y COX-2.

#### ♦ Potencial antiinflamatorio de flavonoides.

En años recientes se han hecho diferentes estudios para determinar el potencial antiinflamatorio de los flavonoides.<sup>45</sup> Se ha observado que los flavonoides ejercen su actividad antiinflamatoria, ya que muchos pueden modular la síntesis de prostaglandinas, funcionan como inhibidores enzimáticos y también tienen propiedades antioxidantes.<sup>32</sup>

Algunos flavonoides pueden modular la síntesis de prostaglandinas por inhibición de las enzimas que participan en este proceso. Existen aquellos que pueden inhibir la enzima ciclooxigenasa, como por ejemplo la flavanona, hesperetina, flavona y galangina.<sup>46,47</sup> Mientras que otras pueden inhibir la enzima lipoxigenasa, entre ellas se tienen a la fisetina, quercetina, ramnetina y miricetina.<sup>46</sup> Además, la quercetina también es un buen inhibidor de la fosfolipasa A<sub>2</sub>.<sup>25</sup>

Otra de las enzimas que pueden inhibir los flavonoides es la enzima fosfodiesterasa, la cual cataliza la descomposición del AMPc y, como los fármacos que elevan los niveles de AMPc tienen acción antiinflamatoria, los flavonoides que fomenten niveles elevados de AMPc también actuarán de manera similar, como por ejemplo la amentoflavona.<sup>25,32</sup>

Los flavonoides también pueden manifestar propiedades antiinflamatorias a través de su acción antioxidante, que les permite actuar contra el daño tisular, debido a la formación de radicales libres generados como subproductos de las rutas ciclooxigenasa y lipoxigenasa. Su potencial antioxidante radica en su capacidad de captar radicales libres, como por ejemplo la catequina, rutina, morina, cianina, y delfinina.<sup>29,32</sup>

Uno de los modelos experimentales que existen para determinar la actividad antiinflamatoria es el modelo de edema inducido por carragenina en ratas; en el cual se han encontrado niveles elevados de los productos de la ciclooxigenasa, tales como, la PGE<sub>2</sub> y el TXB<sub>2</sub>, que intervienen en el proceso inflamatorio.<sup>48</sup> Por lo tanto, los compuestos que inhiben este edema, pueden ser considerados con actividad antiinflamatoria, como por ejemplo la linarina y pectolarina,<sup>49</sup> y el kolaviron (una mezcla de los biflavonoides: GB1, GB2 y kolaflavanona).<sup>50</sup>

Como se puede apreciar, todos los flavonoides antes mencionados muestran actividad antiinflamatoria de una u otra manera. Algo que es importante mencionar, es la ventaja que tienen los flavonoides sobre los fármacos antiinflamatorios clásicos, ya que carecen de los efectos secundarios tóxicos, asociados con el uso de estos fármacos sintéticos, es decir, no causan ulceración gástrica como los AINE.<sup>32,45</sup>

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Hipótesis:

Si de las especies del género *Tephrosia*, se han aislado principalmente compuestos flavonoides, los cuales presentan diversas actividades biológicas; por lo tanto, es muy probable que del estudio químico de *Tephrosia crassifolia* y *T. major*, se aislen metabolitos secundarios del tipo flavonoide con actividad antiinflamatoria.

### Objetivo general:

Realizar el estudio químico de las especies *Tephrosia crassifolia* y *T. major* y evaluar la actividad antiinflamatoria de los flavonoides mayoritarios aislados de dichas especies.

### Objetivos específicos:

- ◆ Aislar y caracterizar los flavonoides presentes en *T. crassifolia* y *T. major* mediante la aplicación de la metodología convencional en química orgánica.
- ◆ Evaluar la actividad antiinflamatoria de los flavonoides mayoritarios aislados en el modelo de edema inducido por carragenina en ratas.
- ◆ Realizar transformaciones químicas de los flavonoides mayoritarios para determinar su reactividad química.
- ◆ Integrar los conocimientos adquiridos con los informados en la literatura, con el fin de proporcionar antecedentes para estudios posteriores.
- ◆ Contribuir al conocimiento del perfil fitoquímico del género *Tephrosia* y del perfil químico-biológico de los flavonoides.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Material y Equipo

##### ◆ Análisis cromatográfico

Para el análisis cromatográfico en columna se utilizó Sílica Gel Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> como fase estacionaria, en columnas de vidrio de diferentes capacidades.

Para el análisis cromatográfico cualitativo en capa fina se utilizaron cromatofolios de Sílica Gel F<sub>254</sub> Merck de (20 X 20 cm X 0.25 mm). Para el análisis cromatográfico preparativo, se emplearon cromatoplasmas de Sílica Gel F<sub>254</sub> Merck (20 X 20 cm X 0.5, 1 y 2 mm) con indicador de fluorescencia. Se utilizaron diferentes sistemas de elución y como reveladores, una lámpara de UV Spectroline Modelo CX-20 (254 y 365 nm) y una solución de sulfato cérico (12 g sulfato cérico, 22 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 350 g hielo).

##### ◆ Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales y sus derivados.

Los puntos de fusión (°C) se determinaron en un aparato Fisher –Johns y no están corregidos.

Las rotaciones ópticas se determinaron en un polarímetro Jaco Dip-360 con lámpara de sodio, en cloroformo o metanol.

Los espectros en el infrarrojo se obtuvieron en un espectrofotómetro Nicolet Magna 750 FT-IR SX, en disolución de CHCl<sub>3</sub> o en pastilla de KBr, las absorciones se dan en cm<sup>-1</sup>. Los espectros en el ultravioleta, se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV160U, las absorciones se dan en nm.

Los espectros de resonancia magnética nuclear se determinaron a 200 y 300 MHz en el caso de RMN  $^1\text{H}$ , y a 75 MHz para RMN  $^{13}\text{C}$ , en espectrómetros analíticos Varian-UNITY 200 y Varian VXR-300, utilizando como disolvente cloroformo deuterado. Los desplazamientos químicos están dados en ppm referidos al tetrametilsilano como referencia interna. Se utilizaron secuencias de pulso para experimentos de desacoplamiento y por transferencia de polarización en  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (DEPT) y para el registro de espectros bidimensionales de correlación homonuclear (COSY) y correlación heteronuclear (HETCOR).

Los espectros de masas por impacto electrónico se determinaron a 70 eV en un espectrómetro Jeol JMS-AX505HA.

Las difracciones de rayos X, se realizaron en un difractómetro Nicolet P3/F o Siemens P4/PC con radiación de molibdeno.

### 3.2 Estudio Químico de *Tephrosia crassifolia* Benth

**Material vegetal.** El material vegetal utilizado para el presente estudio, fue recolectado por el Dr. Oswaldo Téllez Valdés (Instituto de Biología de la UNAM). Se recolectaron hojas, tallos y raíz de *T. crassifolia* en el Municipio de Compostela en el Estado de Nayarit, el 27 de enero de 1995. Una muestra de esta planta fue depositada en el Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología de la UNAM. Voucher No. 13061.

**Extracción.** El material vegetal seco y molido se extrajo mediante un proceso de maceración con diferentes disolventes en orden de polaridad ascendente, a temperatura ambiente durante 24 horas con cada uno. Se obtuvieron los siguientes extractos después de evaporar el disolvente por destilación a presión reducida, (Tabla 1).

Tabla 1. Extractos obtenidos de *T. crassifolia*

Disolvente	Hojas (143.3g)	Tallos (682.6g)	Raíz (810g)
Hexano	2.2 g	3.1 g	16.3 g
Diclorometano	2.6 g	5.3 g	20.3 g
Acetato de etilo	0.8 g	3.4 g	7.0 g
Metanol	21.7 g	22.6 g	25.3 g

### Análisis del extracto diclorometánico de hojas

Este extracto (2.6 g), se preadsorbió en 5 g de sílica gel para fraccionarlo vía cromatografía en columna empacada con 20 g de sílica gel, eluyendo a presión reducida con mezclas de disolventes de polaridad ascendente. Se obtuvieron 190 fracciones de 100 ml cada una, las cuales se concentraron por destilación a presión reducida y se reunieron aquellas de componentes semejantes en ccf (Tabla 2).

De las fracciones 49-59, se caracterizó una mezcla de  $\beta$ -sitosterol (**12**), y stigmasterol (**13**). De las fracciones 124-146, tras sucesivas cromatografías en placa preparativa en el sistema de elución Hex-AcOEt 7:3, se aislaron 75.8 mg de un compuesto que se caracterizó como 5-O-metil-obovatina (**7**)<sup>51</sup>, además, se aislaron 236.7 mg de otro compuesto que se caracterizó como tephromicrocarpanona (**1**), el cual en c.c.f. revela de color naranja oscuro, cuando se utiliza como revelador químico sulfato cérico, y en luz UV (365nm) revela de color azul fluorescente. De acuerdo con datos no publicados en la literatura, este compuesto fue aislado por primera vez de *T. microcarpa*.

Tabla 2. Resumen de la cc del extracto diclorometánico de hojas de *Tc*

Eluyente	Proporción %	No. Fracciones	Fracc. reunidas
Hexano	100	1-25	1-3, 4-9, 10-19
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	95:5	26-45	20-26, 27-37
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	46-59	38-35
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	60-67	49-59
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	70:30	68-74	60-74
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60:40	75-99	75-80
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	100-116	81-88
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	117-131	89-105
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30:70	132-137	106-123
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	138-141	124-146
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	142-171	147-163
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -AcMe	90:10	172-173	164-172
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -AcMe	50:50	174-190	173-190

**Tephromicrocarpanona (1).** (ver figura 5, pág. 39). Sólido cristalino de color blanco, en forma de pequeñas agujas.

**p.f.**= 112-114°C

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>**= +10 (c=1.1 mg/ml, MeOH)

**UV**  $\lambda_{\max}$  MeOH nm ( $\epsilon$ )= 212 (30010), 242 (14509), 290 (17410)

**IR**  $\nu_{\max}$  CHCl<sub>3</sub> cm<sup>-1</sup>= 3017, 1669, 1621, 1593, 1476, 1345, 1272, 1138, 1103, 911.

**EMIE** m/z (ab. rel.)= C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>, 336 M<sup>+</sup> (100), 321 (18), 259 (9), 232 (43), 217 (80), 108 (16), 77 (8).

**RMN** <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)= 1.77 (3H, s, H-13), 2.81 (1H, dd, J=16.5 y 3Hz, H-3eq), 2.94 (1H, dd, J= 15.45 y 7.5 Hz, H-9a), 2.99(1H, dd, J=16.5 y 12.9 Hz, H-3ax), 3.27 (1H, dd, J= 16.5 y 9.75, H-9b), 3.89 (3H, s, OMe), 4.93 (1H. s, H-12a), 5.07, (1H, s, H-12b), 5.28 (1H,

dd, J= 9.75 y 7.5, H-10), 5.43 (1H, dd, J=12.9 y 3.3 Hz, H-2), 6.12 (1H, s, H-6), 7.40 (5H, m, fenilo). (ver espectro 1, pág. 86)

### Análisis del extracto hexánico de tallos.

El extracto hexánico de tallos (3.1g), se fraccionó en una columna cromatográfica empacada con 32 g de sílica gel, el proceso de elución se efectuó utilizando mezclas de disolvente de polaridad creciente. Se colectaron 75 fracciones de 100 ml cada una (Tabla 3).

De las fracciones 30-39, se caracterizó una mezcla de  $\beta$ -sitosterol (**12**) y stigmasterol (**13**). De las fracciones 67-70, se caracterizaron: 5-O-metil-obovatina (**7**)<sup>51</sup>, no cuantificada y 153.7 mg de tephromicrocarpanona (**1**).

Tabla 3. Resumen de la cc del extracto hexánico de tallos de *Tc*

Eluyente	Proporción %	No. Fracciones	Fracc. reunidas
Hexano	100	1-17	1-7
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	18-23	8-16
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	24-29	17-23
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	70:30	30-34	24-29
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60:40	35-42	30-39
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	43-50	40-67
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	51-56	68-70
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30:70	57-62	71-73
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	63-66	74-75
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10:90	67-70	-
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	71-73	-
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -AcOEt	50:50	74	-
AcOEt-MeOH	90:10	75	-

## Análisis del extracto diclorometánico de tallos

El extracto diclorometánico de tallos (5.3 g), se fraccionó por cromatografía en columna empacada con 53 g de sílica gel. Se obtuvieron 62 fracciones de 100 ml cada una, eluidas con los disolventes que se indican en la Tabla 4.

En las fracciones 10-11 eluidas de esta columna, se caracterizó abbottina (3)<sup>14</sup>, en las fracciones 31-43, la mezcla de  $\beta$ -sitosterol (12) y stigmasterol (13), y en las fracciones 44-51, se caracterizaron tephromicrocarpanona (1) y 5-O-metil-obovatina (7)<sup>51</sup>.

Tabla 4. Resumen de la cc del extracto diclorometánico de tallos de *Tc*

Eluyente	Proporción %	No. Fracciones	Fracc. reunidas
Hexano	100	1-7	1-9
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	8-31	10-11
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	32-38	12-30
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	70:30	39-43	31-43
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60:40	44-52	44-51
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	53-54	52-59
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	55-57	60-62
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	58-59	-
AcOEt	100	60-61	-
AcOEt-MeOH	90:10	62	-

Además, de las fracciones 12-30, se purificaron 40 mg de muestra por cromatografía en placa preparativa en el sistema de elución Hex-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 3:7, obteniéndose 27 mg de un líquido viscoso de color amarillo. La estructura de este compuesto se determinó basándose sus datos espectroscópicos, los cuales corresponden para una chalcona no publicada en la literatura, por lo que se le dio el nombre de crassichalcona (2).

**Crassichalcona (2).**- (ver figura 5, pág.39). Líquido viscoso de color amarillo.

$[\alpha]_D = +37.5$  (c= 4.9 mg/ml,  $\text{CHCl}_3$ )

UV  $\lambda_{\text{max}}$  MeOH nm ( $\epsilon$ ) = 215 (18312), 348 (17668)

IR  $\nu_{\text{max}}$   $\text{CHCl}_3 \text{cm}^{-1}$  = 3026, 1649, 1604, 1110.

EMIE m/z (ab. rel.)=  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_4 \text{M}^+$  336 (100), 335 (37), 321 (20), 307 (17), 259 (60), 233 (8), 131 (8), 103 (10), 77 (6).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )= 1.76 (3H, s, H-11'), 2.94, (1H, dd, J=15 y 7.5 Hz, H-7'a), 3.29 (1H, dd, J=15 y 9.9 Hz, H-7'b), 3.9 (3H, s, OMe), 4.92 (1H, s, H-10'a), 5.07 (1H, s, H-10'b), 5.28 (1H, dd, J= 9.9 y 7.3 Hz, H-8'), 5.99 (1H, s, H-5'), 7.38 (3H, m, H-3, H-4, H-6), 7.57 (2H, m, H-2, H-6), 7.74 (1H, d, J= 15.8 Hz, H- $\alpha$ ), 7.85 (1H, d, J= 15.8 Hz, H- $\beta$ ), 14.17 (1H, s, OH). (ver espectro 10, pág. 95).

La otra parte de las fracciones 12-30 se purificó por cromatografía en columna. En las fracciones eluidas con Hex- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  90:10, se caracterizaron 49 mg de abovatachalcona (**8**)<sup>51</sup> y 311 mg de crassichalcona (**2**).

### **Análisis del extracto de acetato de etilo de tallos**

Este extracto (3.4 g), se preadsorbió en 7 g de sílica gel y se fraccionó en columna cromatográfica empacada con 34 g de sílica gel. Se obtuvieron 33 fracciones de 100 ml cada una, eluidas como se indica en la tabla 5.

En la fracción 11 eluida de esta columna se caracterizó obovatachalcona (**8**)<sup>51</sup>, en las fracciones 12-13, se caracterizó crassichalcona(**2**), en las fracciones 17-20, la mezcla de  $\beta$ -sitosterol (**12**) y stigmasterol (**13**) y en las fracciones 21-29, se caracterizó tephromicrocarpanona (**1**) y 5-O-metil-obovatina (**7**)<sup>51</sup>.

Tabla 5. Resumen de la cc del extracto de AcOEt de tallos de *Tc*

Eluyente	Proporción %	No. Fracciones	Fracc. reunidas
Hexano	100	1-4	1-10
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	5-8	11
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	9-10	12-13
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	70:30	11-14	14-16
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60:40	15-17	17-20
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	18-20	21-29
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	21-23	30-33
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	24.26	-
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -AcOEt	90:10	27.30	-
AcOEt-MeOH	90:10	31-33	-

#### Análisis del extracto hexánico de raíz

Este extracto (16.3 g), fue parcialmente soluble en hexano por lo cual se separó por filtración un sólido insoluble en dicho disolvente, quedando 6.3 g de un compuesto cristalino de color amarillo claro, con  $p_f = 111-114^\circ\text{C}$ . En ccf, en el sistema de elución Hex-AcOEt 7:3, revela una mancha de color café. Se caracterizó como hildgardtol A (4).<sup>52</sup>

Las aguas madres se purificaron por cromatografía en columna empacada con 110 g de sílica gel. Se obtuvieron 158 fracciones de 100 ml cada una eluidas con mezclas de disolventes de polaridad ascendente (Tabla 6).

Tabla 6. Resumen de la cc de las aguas madres del extracto hexánico de raíz de *Tc*

Eluyente	Proporción %	No. Fracciones	Fracc. reunidas
Hexano	100	1-74	1-3, 4-9
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	89-111	10-25, 26-30
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	112-123	31-50, 51-74
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	124-136	75-91, 92-136
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	137-154	137-154
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	155-158	155-158

De las fracciones 10-25 se caracterizó abbotina (**6**)<sup>14</sup>, de la 51-74 una mezcla de  $\beta$ -sitosterol (**12**) y stigmasterol (**13**); en las fracciones 137-154, se caracterizó 5-O-metilobovatina (**7**)<sup>51</sup> y de las fracciones 92-154 se caracterizó hildgardtol A (**4**)<sup>52</sup>.

Además de las fracciones 92-154, cristalizó un compuesto que se purificó por recristalización en hexano, obteniéndose 242 mg del compuesto puro, que ccf usando el sistema de elución CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, revela una mancha de color café claro. Se caracterizó por sus datos espectroscópicos como un biflavonoide, cuya estructura no se encuentra publicada en la literatura, se le dio el nombre de crassifolina (**3**).

**Crassifolina (3)**. (ver figura 5, pág. 39). Sólido cristalino de color blanco en forma de pequeñas agujas, insoluble en hexano, acetona, metanol, soluble en diclorometano, éter y benceno.

**p.f.**= 249-250°C

**[\alpha]<sub>D</sub>**= + 42.4

**UV**  $\lambda_{\max}$  CHCl<sub>3</sub> nm ( $\epsilon$ )= 248.5 (12154), 279 (8916.12)

**IR**  $\nu_{\max}$  CHCl<sub>3</sub> cm<sup>-1</sup>= 3033, 1615, 2973, 1468, 1374, 1254, 1215, 1038, 901

**EMIE** m/z (ab. rel.)= C<sub>42</sub>H<sub>42</sub>O<sub>7</sub>, M<sup>+</sup> 658 (15), 338 (22), 321 (100), 320 (75), 305 (53), 243 (18), 219 (15), 129 (16).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm= 1.75 (6H, sa, H-13, H-13'), 1.94 (2H, td, J= 12 y 2.4 Hz, H-3a, H-3''a), 2.84 (2H, dda, J= 12.6 y 10.8 Hz, H-3a, H-3''a), 2.86 (2H, dd, J= 15.3 y 8.3 Hz, H-9a, H-9'a), 3.16(2H, dd, J= 15.3 Hz y 9.45 Hz, H-9b, 9'b), 3.54 (6H, s, 2 x OMe), 4.86 (2H, sa, H-12a, H-12'a), 4.9 (2H, t, J= 2.4 Hz, H-4, H-4''), 5.04 (2H, sa, H-12b, H-12'b), 5.14 (2H, t, J=9 Hz, H-10, H-10'), 5.37 (2H, da, 10.8 Hz, H, H-2, H-2''), 6.04 ( 2H, s, H-6, H-6), 7.35-7.52 (10H, m, H-grupos fenilo). (ver espectro 16, pág. 101).

### Análisis del extracto diclorometánico de raíz

Este extracto (20.3 g), se disolvió en una mezcla de Hex-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y después de filtrar se obtuvo 1.98 g de un sólido cristalino de color blanco, pf= 249-250°C, que se caracterizó por sus constantes físicas y por comparación en ccf, como crassifolina (3).

Tabla 7. Resumen de la cc de las aguas madres del extracto diclorometánico de raíz *Tc*

Disolvente	Proporcion %	No. Fracciones	Fracc. reunidas
Hexano	100	1-24	1-26
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	95:5	25-34	27-36
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	35-50	37-45
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	51-74	46-53
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	70:30	75-130	54-70
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60:40	131-143	71-77
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	144-196	78-81
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	197-206	82-85
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30:70	207-212	86-245
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	213-218	246-258
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	219-224	259-263
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	225-244	-
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Me <sub>2</sub> CO	90:10	245-258	-
Me <sub>2</sub> CO-MeOH	90:10	259-263	-

Con las aguas madres de este extracto, se montó una columna cromatográfica, de donde se caracterizó en las fracciones 37-35, abbottina (6),<sup>14</sup> en las fracciones 86-244, hildgardtol A (4),<sup>52</sup> metil-hildgardtol A (5)<sup>52</sup> y nuevamente se aisló 1.47 g de crassifolina (3) y de las fracciones 245-258 se caracterizó 5-O-metil-obovatina (7).<sup>51</sup>

### Análisis del extracto de acetato de etilo de raíz

Este extracto (7.0 g), se disolvió en una mezcla de Hex-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 50:50 y después de filtrar se obtuvieron 500 mg de un sólido cristalino, pf= 148-150°C, que se caracterizó como crassifolina (3).

La aguas madres se fraccionaron en columna cromatográfica, de donde se caracterizaron, en las fracciones 2-15 abbottina (6),<sup>14</sup> en las fracciones 17-27 hildgardtol A (4),<sup>52</sup> metil-hildgardtol A (5)<sup>52</sup> y crassifolina (3) y en las fracciones 28-55 se caracterizó 5-O-metil-obovatina (7).<sup>51</sup>

Tabla 8. Resumen de la cc de las aguas madres del extracto de AcOEt de raíz de *Tc*

Eluyente	Proporcion %	No. Fracciones	Fracc. reunidas
Hexano	100	1-15	1, 2-15
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	16-36	16, 17-27
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	37-55	28-55
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -AcMe	90:10	56-60	56-60

## Análisis del extracto metanólico de raíz

Este extracto (25.3 g), se disolvió en metanol y se fraccionó por cromatografía en columna empacada con 250 g de sílica gel, se eluyeron 107 fracciones de 200 ml cada una. (Tabla 9).

De estas fracciones eluidas se caracterizó en 16-23, abbottina (6),<sup>14</sup> en 24-26, hildgardtol A (4)<sup>52</sup> y metil-hildgardtol A (5)<sup>52</sup> y de las fracciones 27-34, 5-O-metil-obovatina (7).<sup>51</sup> Además de las fracciones 105-107, cristalizó un compuesto de  $p_f=188-189^{\circ}\text{C}$ , que se caracterizó como sacarosa (14).

Tabla 9. Resumen de la cc del extracto metanólico de *Tc*

Eluyente	Proporcion %	No. Fracciones	Fracc. reunidas
Hexano	100	1-6	1-15
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	7-12	16-23
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	13-17	24-26
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	70:30	28-30	27-37
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60:40	31-44	38-59
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	45-50	60-69
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	51-58	70-104
AcOEt	100	59-69	105-107
AcOEt-MeOH	90:10	70-81	-
AcOEt-MeOH	80:20	82-91	-
AcOEt-MeOH	70:30	92-107	-

Finalmente, fueron reunidas aquellas fracciones obtenidas de las diferentes columnas cromatograficas, en las que se identificaron los mismos compuestos, con el fin de purificarlos, ya sea por ccf o recristalización, y obtener su rendimiento (Tabla 10). (ver estructuras en la figura 5, pág 39).

Tabla 10. Rendimiento de los metabolitos aislados de *T. crassifolia*

Material vegetal (g)	Metabolito (g)	Rendimiento (%)
Raíz (810)	crassifolina (3) (4.1920)	0.5175
	hildgardtol A (4) (6.800)	0.8395
	metil-hildgardtol A (5) (0.8378)	0.1034
	abbottina (6) (0.1371)	0.0169
	5-O-metil-obovatina (7)	s/c
	$\beta$ -sitosterol (12), stigmasterol (13)	s/c
	sacarosa (15) (0.300)	0.0370
Tallos (682.6)	tephromicrocarpanona (1) (0.5560)	0.0805
	crassichalcona (2) (0.3380)	0.0495
	5-O-metil-obovatina (7) (0.1375)	0.0201
	obovatachalcona (8) (0.0794)	0.0116
	abbottina (6)	s/c
	$\beta$ -sitosterol (12), stigmastrol (13)	s/c
Hojas (143.3)	tephromicrocarpanona (1) (0.2367)	0.1651
	5-O-metil-obovatina (7) (0.0590)	0.0411
	$\beta$ -sitosterol (12), stigmasterol (13)	s/c

s/c= sin cuantificar

### 3.3 Estudio químico de *Tephrosia major* Micheli

**Material vegetal.** El material vegetal de *T. major* fue recolectado en noviembre de 1997 en el estado de Jalisco, por el Dr. Oswaldo Téllez Valdez. Una muestra de esta planta fue depositada en el Herbario Nacional (MEXU).

**Extracción.** El estudio se efectuó con hojas, tallos y raíz previamente secado y molido para ser sometido a una serie de extracciones sucesivas con cuatro disolventes de polaridad ascendente (Hex, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt, MeOH) a temperatura ambiente. Se obtuvieron los extractos correspondientes después de evaporar el disolvente a presión reducida, (tabla 11).

Tabla 11. Extractos obtenidos de *T. major*

Disolvente	Hojas (256 g)	Tallos (335 g)	Raíz (297 g)
Hexano	3.1 g	2.3 g	4.9 g
Diclorometano	4.0 g	5.6 g	25.0 g
Acetato de etilo	1.1 g	3.0 g	7.1 g
Metanol	17.0 g	14.0 g	24.7 g

#### Análisis de los extractos de hojas

Los extractos hexánico (3.1 g), diclorometánico (4.0 g) y de acetato de etilo (1.1 g) de hojas, se reunieron por ser semejantes al compararlos en ccf en el sistema de elución Hex-AcOEt 8:2. El extracto total se preadsorbió en 10 g de sílica gel y se fraccionó en columna cromatográfica empacada con 60 g de sílice. Se obtuvieron 67 fracciones de 150 ml cada una, eluidas como se indica en la tabla 11. De las fracciones 41-50, eluidas de esta columna, se caracterizó 7-O-metil-glabranina (10)<sup>53</sup> y una mezcla de  $\beta$ -sitosterol (12) y stigmasterol (13) (Tabla 12).

Tabla 12. Resumen de la cc de los extractos de Hex, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y AcOEt de hojas *Tm*

Eluyente	Proporción %	No. Fracciones	Fracc. reunidas
Hexano	100	1-31	1-15, 16-20
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	32-44	21-26, 27-35
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	45-50	36-40
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	70:30	51-56	41-45
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	57-58	46-50
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	59-64	51-54
AcOEt-MeOH	90:10	65-66	55-65
AcOEt-MeOH	80:20	67	66-67

### Análisis del extracto hexánico de tallos

El extracto hexánico de tallos (2.3 g), se fraccionó por cromatografía en columna empacada con 23 g de sílice. Se obtuvieron 51 fracciones de 150 ml cada una (Tabla 13).

Tabla 13. Resumen de la cc del extracto hexánico de tallos de *Tm*

Eluyente	Proporción %	No. Fracciones	Fracc. reunidas
Hexano	100	1-16	1-7, 8-11
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	17-39	12-20, 21-31
Hex-AcOEt	90:10	40-45	32-39
AcOEt-MeOH	90:10	46-49	40-49
AcOEt-MeOH	80:20	50-51	50-51

De las fracciones 21-31, se caracterizó spinoflavanona B (**9**),<sup>54</sup> en las fracciones 32-39, 7-O-metil-glabranina (**10**),<sup>53</sup> y en las fracciones 40-49, se caracterizó glabranina (**11**)<sup>55,56</sup> y una mezcla de sitosterol (**12**) y stigmasterol (**13**).

### Análisis del extracto diclorometánico de tallos

Este extracto (5.6 g), se preadsorbió en 8 g de sílica gel y se fraccionó en columna cromatográfica empacada con 50 g de sílica gel. Se colectaron 57 fracciones de 150 ml cada una (Tabla 14).

De las fracciones 8-19, se caracterizó spinoflavanona B (9)<sup>54</sup> y 7-O metil-glabranina (10)<sup>53</sup>, de las fracciones 21-23, se caracterizó la mezcla de  $\beta$ -sitosterol (12) y stigmasterol (13). De las fracciones 24-43 se caracterizó glabranina (11).<sup>55,56</sup>

Tabla 14. Resumen de la cc del extracto diclorometánico de tallos de *Tm*

Eluyente	Proporción %	No. Fracciones	Fracc. reunidas
Hexano	100	1-3	1-7, 8-19
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	4-8	21-23
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	9-18	24-27
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	19-40	28-43
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	41-54	44-54
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	55-57	55-57

### Análisis del extracto de acetato de etilo de tallos

Este extracto (3.0 g), se preadsorbió en 6 g de sílica gel y se fraccionó en columna cromatográfica, empacada con 30 g de sílice. Se obtuvieron 58 fracciones de 150 ml cada una. (Tabla 15)

En las fracciones 12-19, se caracterizó spinoflavanona B (9)<sup>54</sup> y 7-O-metil-glabranina (10)<sup>53</sup>, en las fracciones 20-35, se caracterizó glabranina (11).<sup>55,56</sup>

Tabla 15. Resumen de la cc del extracto de AcOEt de tallos *Tm*

Eluyente	Proporción %	No. fracciones	Fracc. reunidas
Hexano	100	1-7	1-11
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	8-11	12-19
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	12-17	20-35
Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	18-33	36-42
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	34-54	43-50
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	55-58	51-58

### Análisis del extracto metanólico de tallos

Este extracto (14.0 g), se preadsorbió en 18 g de sílica gel y fue separado por cromatografía en columna empacada con 130 g de sílica gel. Se obtuvieron 160 fracciones de 150 ml cada una, (Tabla 16).

Tabla 16. Resumen de la cc del extracto metanólico de tallos de *Tm*

Eluyente	Proporción	No. Fracciones	Fracc. Reunidas
Hexano	100	1-14	1-28, 29-38
Hex-MeCl <sub>2</sub>	90:10	15-22	39-40, 41-44
Hex-MeCl <sub>2</sub>	80:20	23-35	45-50, 51-67
Hex-MeCl <sub>2</sub>	50:50	36-102	68-79
MeCl <sub>2</sub>	100	103-122	80-87
MeCl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	123-140	88-98
AcMe-MeOH	90:10	141-150	99-124
AcMe-MeOH	80:20	151-159	142-159
AcMe-MeOH	50:50	160	160

En las fracciones 29-38 se caracterizó spinoflavanona B (9)<sup>54</sup> y 7-O-metil-glabranina (10),<sup>53</sup> en las fracciones 39-40, se caracterizó una mezcla de sitosterol (12) y stigmasterol

(13), en las fracciones 45-67 se caracterizó glabranina (11)<sup>55,56</sup> y en las fracciones 142-259, se caracterizó sacarosa (14).

### Análisis de los extractos de raíz

Los extractos hexánico (4.9 g), diclorometánico (25.0 g) y de acetato de etilo (7.2 g) de raíz se reunieron por ser semejantes en ccf, usando el sistema de elución Hex-AcOEt 8:2. El extracto total se preadsorbió en 50 g de sílica gel y se fraccionó en columna cromatográfica, empacada con 160 g de sílica gel. Se obtuvieron 280 fracciones de 150 ml cada una. (Tabla 17).

Tabla 17. Resumen de la cc de los extractos de Hex, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y AcOEt de raíz *Tm*

Eluyentes	Proporción %	No. fracciones	Fracc. Reunidas
Hexano	100	1-15	17-20, 21-38
Hex-MeCl <sub>2</sub>	90:10	16-139	39-63, 64-138
Hex-MeCl <sub>2</sub>	80:20	140-202	139-149, 150-174
Hex-MeCl <sub>2</sub>	60:40	203-234	175-214, 215-243
Hex-MeCl <sub>2</sub>	50:50	235-257	244-249, 260-277
MeCl <sub>2</sub>	100	258-274	260-277, 278-281
MeCl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	275-282	282

En las fracciones 21-138 eluidas de esta columna se caracterizaron, spinoflavanona B (9)<sup>54</sup> y 7-O-metil-glabranina (10)<sup>53</sup> y en las fracciones 150-243, se caracterizó glabranina (11).<sup>55,56</sup>

Finalmente, fueron reunidas las fracciones obtenidas de las diferentes columnas cromatográficas, que presentaron los mismos compuestos, para purificarlos y obtener su rendimiento (Tabla 18). (ver estructuras en la figura 5, pág. 39).

Tabla 18. Rendimiento de los metabolitos aislados de *T. major*

Material vegetal (g)	Metabolito (g)	Rendimiento (%)
Raíz (297)	spinoflavanona B (9) (0.120)	0.0404
	7-O-metil glabranina (10) (1.7115)	0.5762
	glabranina (11) (2.1364)	0.7193
	$\beta$ -sitosterol (13), stigmasterol (14)	s/c
Tallos (335)	spinoflavanona B (9) (0.065)	0.0194
	7-O-metil glabranina (10) (0.4971)	0.1483
	glabranina (11) (0.5591)	0.1668
	$\beta$ -sitosterol (13), stigmasterol (14)	s/c
	sacarosa (15) (0.280)	0.0835
Hojas (256)	7-O-metil glabranina (10) (0.025)	0.0097
	$\beta$ -sitosterol (13), stigmasterol (14)	s/c

s/c= sin cuantificar.

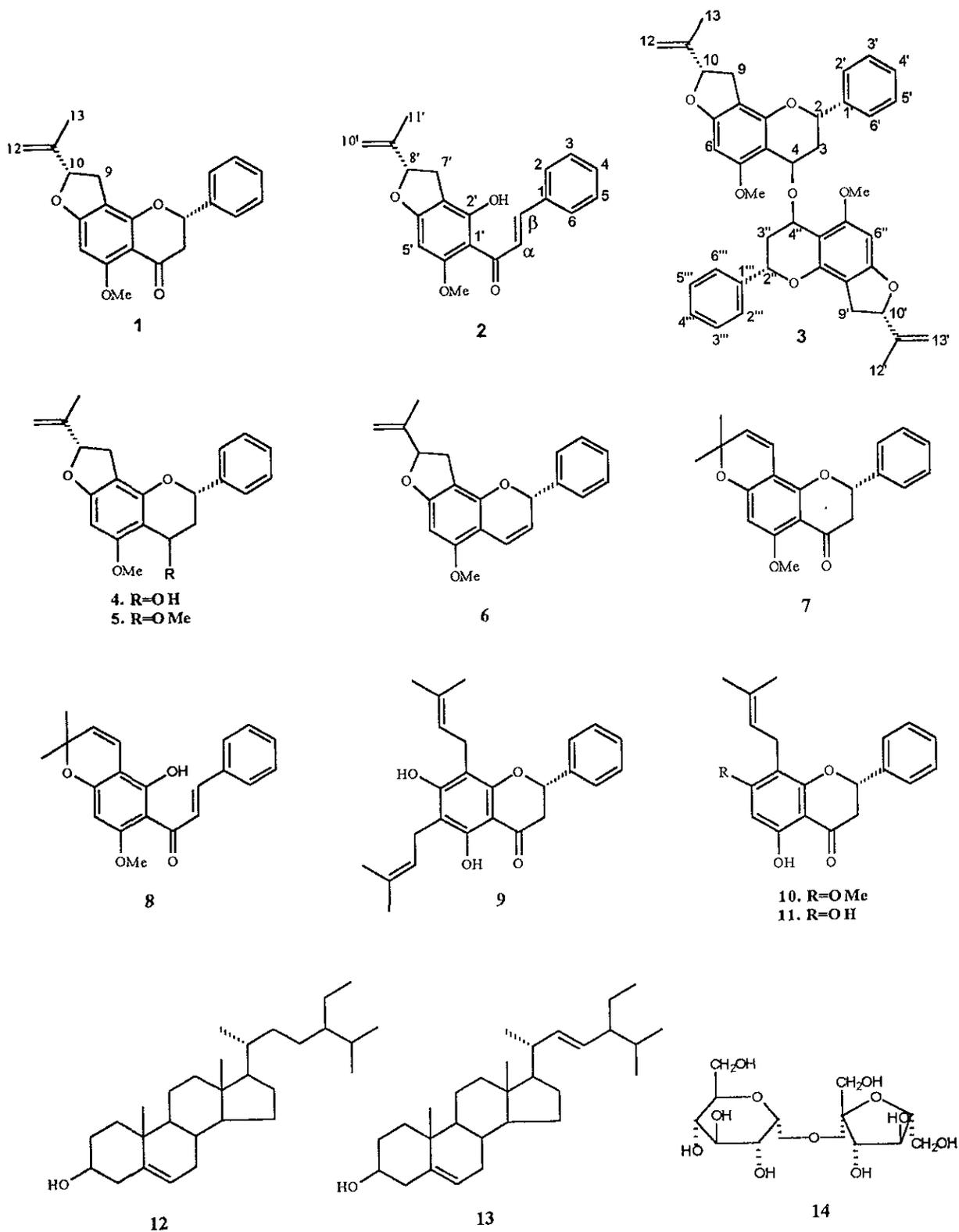


Figura 5. Compuestos aislados de *Tephrosia crassifolia* y *T. major*.

### 3.4 Transformaciones Químicas

**Reacción de oxidación de hildgardtol A con dicromato de piridinio.** A 50 mg de hildgardtol A (4) disueltos en 10 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se le adicionaron 150 mg de dicromato de piridinio (PDC) (1:3), esta mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente con agitación magnética, se siguió el curso de la reacción por ccf, después de 2 horas, la mezcla de reacción se filtró y se purificó por cromatografía en columna eluyendo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Se obtuvieron 19.2 mg del producto de reacción, compuesto (I) (38.4 %), el cual se caracterizó por sus datos espectroscópicos como una flavanona.

**Compuesto I.** (ver figura 6, pág.43). Sólido cristalino blanco.

pf = 111-113°C

UV  $\lambda_{\text{max}}$  MeOH nm ( $\epsilon$ )=212 (30010), 242 (14509), 290 (17410)

$[\alpha]_{\text{D}} = +10$  (c= 2.0 mg/ml, MeOH)

IR  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$   $\text{CHCl}_3$  = 2497, 1668, 1622, 1595, 1482, 1346, 1273, 1137, 1103, 914.

EMIE m/z (ab. rel.)=  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_4$ ,  $\text{M}^+$  336 (100), 321 (7), 259 (8), 232 (38), 217(46), 104(21), 103(15), 77(15).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )= 1.77 (3H, sa, H-11'), 2.82 (1H, dd, J= 16.5 y 3 Hz, H-3a), 2.95 (1H, dd, J= 15.3 y 7.5 Hz, H-7'a), 2.99 (1H, dd, J= 16.5 y 12.6, H-3b), 3.27 (1H, dd, J=15 y 9.9 Hz, H-7'b), 3.89 (3H, s OMe), 4.93 (1H, sa, H-10'a), 5.07(1H, sa, H-10'b), 5.29 (1H, dd, J= 9.6 y 7.5 Hz, H-8'), 5.43 (1H, dd, J= 12.6 y 3Hz, H-2), 6.12 (1H, s, H-6), 7.36-7.46 (5H, m, H-grupo fenilo). (ver espectro 9, pág. 94).

**Reacción de 7-O-metil-glabranina con DDQ.** A 60 mg de 7-O-metil-glabranina (10) disueltos en 8 ml de dioxano seco se le adicionaron 121 mg de diclorodicianobenzoquinona (1:3 eq) se dejó a reflujo con agitación magnética, siguiendo el curso de la reacción por ccf, después de 2 horas, ya había reaccionado toda la materia prima, por lo que se detuvo la reacción enfriando la mezcla y se procedió a purificar el producto de reacción por filtración y

cromatografía en columna. Se obtuvieron los compuestos II (18.6 mg) y III (9.4 mg) que se caracterizaron como aductos de Diels-Alder.

**Compuesto II.** (ver figura 6, pág.43). Cristales ortorrómbicos de color naranja.

pf = 214-216°C

$[\alpha]_D = -30$  (c= 2.4 mg/ml, CHCl<sub>3</sub>)

UV  $\lambda_{max}$  CHCl<sub>3</sub> nm ( $\epsilon$ )= 241.5 (2099), 288.5 (4949), 323.5 (793).

IR  $\nu_{max}$  cm<sup>-1</sup> CHCl<sub>3</sub>= 3400, 2922, 1720, 1638, 1583, 1555, 1444, 1373, 1301, 1253, 1205, 1166, 1111, 789, 760.

EMIE m/z (ab. rel.)= C<sub>29</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, M<sup>+</sup> 562 (5), [M+2] 564 (3), 336 (100), 321 (12), 217 (10), 204 (6), 189 (5), 161(5), 136(5), 131 (4), 103 (4), 77 (4).

RMN <sup>1</sup>H 300 MHz, CDCl<sub>3</sub>= 1.57 (3H, s, H-16), 2.51 (1H, da, J=17.4 Hz, H-15eq), 2.80 (1H, dd, J=17.4 y 3 Hz, H-3eq), 2.96 (1H, da, J=17.4 Hz, H-15ax), 3.06 (1H, dd, J=17.4 y 14.1 Hz, H-3 ax), 3.69 (3H, s, OMe), 4.15 (1H, sa, H-12), 5.42 (1H, sa, H-13), 5.54(1H, dd, J=14.1 y 3 Hz, H-2), 6.04 (1H, s, H-6), 7.4 (5H, sa, H-anillo B), 12.38 (1H, s, OH). (ver espectro 24, pág. 109).

**Compuesto III.** (ver figura 6, pág.43). Cristales en forma de agujas de color amarillo.

Pf= 151-153°C

$[\alpha]_D = -115.3$  (c=1.3 mg/ml, CHCl<sub>3</sub>)

UV  $\lambda_{max}$  CHCl<sub>3</sub> nm ( $\epsilon$ )=241.5 (10954), 289.0 (25729), 304.5 (6297).

IR  $\nu_{max}$  CHCl<sub>3</sub> cm<sup>-1</sup>= 3400, 2980, 1720, 1638, 1584, 1143, 1373, 1252, 1205, 1111, 720, 667.

EMIE m/z (int. rel) = C<sub>29</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, M<sup>+</sup> 652, [M+2] 654, 336 (100), 321 (15), 228 (12), 217 (14), 204 (6), 189 (5), 161(5), 136(5), 131 (4), 103 (4), 77 (4).

RMN <sup>1</sup>H 300 MHz, CDCl<sub>3</sub>= 1.23 (3H, s, H-16), 2.67 (1H, da, J=17.1 Hz, H-15eq), 2.73 (1H, dd, J=17.1 y 2.4 Hz, H-3eq), 2.98 (1H, da, J=17.7 Hz, H-15ax), 3.14 (1H, dd, J=17.1 y 14.1 Hz, H-3 ax), 3.70 (3H, s, OMe), 4.12 (1H, sa, H-12), 5.15 (1H, sa, H-13), 5.22

(1H, dd, J=13.8 y 2.4 Hz, H-2), 6.05 (1H, s, H-6), 7.4 (5H, m, H-anillo B), 12.30 (1H, s, OH).  
(ver espectro 30, pág. 115).

**Reacción de glabranina con DDQ.** A 150 mg de glabranina (11) disueltos en 10 ml de dioxano seco, se le adicionaron 116 mg de DDQ (1:1.1 eq), la mezcla resultante se dejó reflujar con agitación magnética, siguiendo el curso de la reacción por ccv, después de 2 hrs de reflujo, la mezcla de reacción se dejó enfriar y el precipitado se filtró. El filtrado fue concentrado a presión reducida y cromatografiado para purificarlo. Se obtuvieron 117 mg del producto de reacción, compuesto **IV** (78%), que se caracterizó como el producto de ciclación de glabranina.

**Compuesto IV.** (ver figura 6, pág.43). Sólido cristalino de color blanco.

pf = 124-125°C

$[\alpha]_D^{25} = -64.2^\circ$  (c=1.4 mg/mL, MeOH)

IR  $\nu$  cm<sup>-1</sup> CHCl<sub>3</sub>= 2935, 1641, 1589, 1477, 1375, 1276, 1114, 1091.

UV  $\lambda_{max}$  nm ( $\epsilon$ ) MeOH= 359 (2,645), 295 (9,200), 270 (32,810), 228 (10,817).

EMIE m/z (ab. rel.)= C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>. M<sup>+</sup> 322 (43), 307 (100), 203 (87)

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)= 1.42 (3H, s, H-10'), 1.44 (3H, s H-11'), 2.84 (1H, dd, J=17.25 y 3 Hz, H-3a), 3.06(1H, dd, J=17.4, 12.9 Hz, H-3b), 5.43(1H, dd, J=12.9 y 3 Hz, H-2), 5.47 (1H, d, J= 9.9 Hz, H-8'), 6.0 (1H, s, H-6), 6.55 (1H, d, J= 9.9 Hz, H-7'), 7.43 (5H, m, H-grupo fenilo), 12.08 (1H, s, OH). (ver espectro 36, pág. 121)

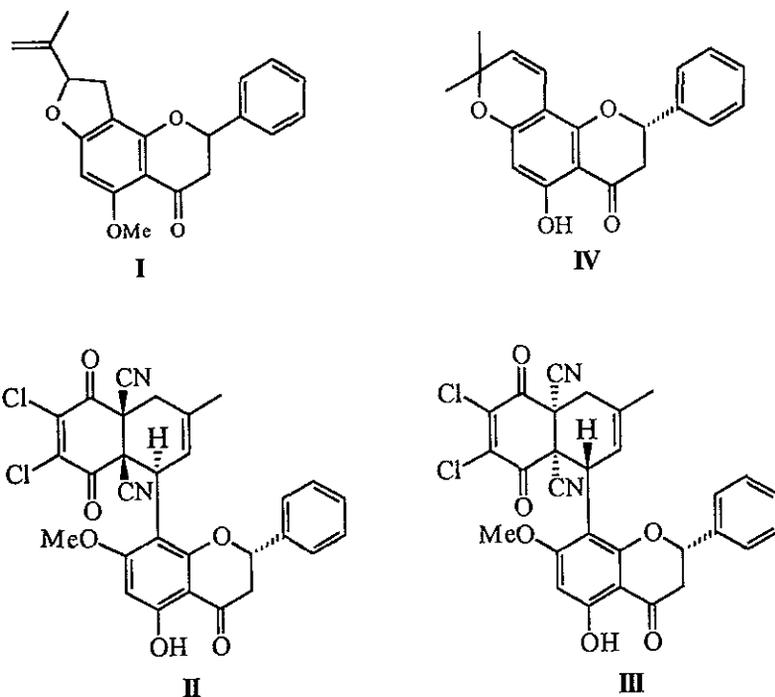


Figura 6. Estructuras químicas de los productos de reacción

### 3.5 Evaluación antiinflamatoria<sup>49</sup>

La actividad antiinflamatoria de los flavonoides se determinó usando el modelo de edema inducido por carragenina en rata descrito por Winter y col.,<sup>57</sup> y se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se usaron ratas wistar macho (110-150 g), las cuales fueron colocadas en cajas de acrílico (5 ratas por caja). Fueron alimentadas *ad libitum* (dieta del laboratorio), se les permitió libre acceso para beber agua, y permanecieron en ciclos de 12/12 horas de luz/obscuridad.

Para medir el edema de la pata del animal se usó un pletismómetro, que consiste en un aparato con una celda llena de agua dentro de la cual es sumergida la pata de la rata y se desplaza un volumen que es registrado en un transductor calibrado a 1 y 2 ml de desplazamiento. Antes del tratamiento a los animales, se determinó el volumen de la pata trasera de cada rata ( $V_0$ ). Después, los compuestos en estudio fueron administrados por vía oral. Crassifolina (3), hildgartol A (4) y metil-hildgartol A (5), fueron administrados en dosis de 10, 31 y 100 mg/kg. Se usó indometacina (Sigma) como fármaco de referencia en dosis de 2.5, 5 y 7.5 mg/kg. Los animales control recibieron como vehículo una solución de DMSO al 10% en metilcelulosa al 0.5% (vehículo 1). Para la indometacina el vehículo empleado fue aceite mineral (Vehículo 2). Sesenta minutos después de estas administraciones, cada rata recibió en la pata trasera derecha, una inyección subcutánea de 0.1 ml de una suspensión de carragenina al 1% ( $\lambda$  carragenina tipo IV, Sigma). Se determinó el volumen de la pata trasera de cada rata ( $V_t$ ), el cual fue el promedio de 3 o 4 mediciones, a la 1, 2, 3, 4 y 5 horas después de la inyección del agente inflamatorio.

La diferencia de las mediciones del volumen con carragenina ( $V_t$ ) menos el volumen obtenido antes del tratamiento ( $V_0$ ), en cada uno de los animales, reflejó la variación del edema.

Para cada grupo, se obtuvo el porcentaje de inhibición, usando la siguiente ecuación:

$$\%I = [ABC_{\text{control}} - ABC_{\text{trat.}}] \times 100 / ABC_{\text{control}}$$

El área bajo la curva (ABC) representa la integración del efecto antiinflamatorio (variación del edema) durante el periodo de observación (5 h), es decir, relaciona la variación del edema contra el tiempo, obtenido por el método trapezoidal.<sup>58</sup>

## IV. DISCUSION Y RESULTADOS

En el presente capítulo se describen los resultados obtenidos del estudio químico de dos especies del género *Tephrosia*, de las transformaciones químicas realizadas a los productos naturales y la evaluación antiinflamatoria.

La caracterización de los compuestos aislados se realizó basándose en sus constantes físicas y espectroscópicas, así como por comparación en ccf en algunos casos, con muestras auténticas. Para los compuestos de estructura conocida solo se darán las citas bibliográficas, mientras que para aquellos que no se encuentran publicados en la literatura, serán discutidos con más detalle.

De los extractos obtenidos de *T. crassifolia*, se aislaron y caracterizaron los siguientes flavonoides: hildgardtol A (4)<sup>52</sup>, metil-hildgardtol A(5)<sup>52</sup>, abbottina (6)<sup>14</sup>, 5-O-metil-obovatina (7)<sup>51</sup> y obovatachalcona (8)<sup>51</sup>, la mezcla de esteroides:  $\beta$ -sitosterol (12) y stigmasterol (13) y un disacárido: sacarosa (14). Además de tres flavonoides cuyas estructuras no están descritas en la literatura, los cuales fueron nombrados como: **tephromicrocarpanona (1)**, **crassichalcona (2)** y **crassifolina (3)**.

De los extractos obtenidos de *T. major*, se aislaron la mezcla de esteroides:  $\beta$ -sitosterol (12) y stigmasterol (13), sacarosa (14) y tres flavanonas conocidas como: spinoflavanona B (9),<sup>54</sup> 7- metil-glabranina (10)<sup>53</sup> y glabranina (11).<sup>55,56</sup>

**Tephromicrocarpanona (1).** Se aisló del extracto diclorometánico de hojas como un sólido cristalino blanco, p.f.=112-114°C,  $[\alpha]_D = +10$ , su espectro de IR presenta bandas de absorción 3017  $\text{cm}^{-1}$  para (C-H) aromático, una banda fuerte en 1668  $\text{cm}^{-1}$ , para grupo carbonilo conjugado, en 1662 y 1595, bandas para (C=C) aromático y bandas de absorción en 1137 y 1103 para (C-O). En su espectro de UV, presenta 3 máximos de absorción en 212, 242, 290 nm, lo cual nos sugiere junto con los datos de IR, que este compuesto debe ser de tipo flavonoide.<sup>59,60</sup>

Por otro lado, se confirmó los antes mencionado analizando su espectro de RMN  $^1\text{H}$ , donde presenta un sistema ABX, por la señal doble de doble en  $\delta$  2.81 ( $J=16.5$  y  $3$  Hz), asignada al H-3eq, la señal doble de doble en  $\delta$  2.99 ( $J=16.5$  y  $12.9$  Hz) asignada al H-3ax y la señal doble de doble en  $\delta$  5.43 ( $J=12.9$  y  $3.0$  Hz) asignada al H-2, característico del núcleo de una flavanona.<sup>53,61</sup> En la región de los protones aromáticos, se encuentra una señal múltiple que integra para 5H del anillo B monosustituído. Además en  $\delta$  6.12 se encuentra una señal simple que integra para un protón, esta posición y multiplicidad sugiere que el anillo A presenta un protón aislado orto a dos grupos electronegativos, uno de ellos debe ser un metoxilo ya que en  $\delta$  3.89 se encuentra una señal simple que integra para 3H, el otro sustituyente del anillo A, debe ser un anillo dihidrofurano en C-7 y C-8, con una cadena isopropenilica tal y como lo presentan hildgardtol A (4)<sup>52</sup>, metil-hildgardtol A (5)<sup>52</sup> y abbottina (6),<sup>14</sup> porque presenta las señales que forman el sistema ABX que lo caracteriza, estas son, las señales dobles de doble en  $\delta$  2.94 ( $J=15.4$  y  $7.5$  Hz), en  $\delta$  3.27 ( $J=15.4$  y  $9.7$ ) y en  $\delta$  5.28 ( $J=9.7$  y  $7.5$ ) asignadas a H-9a, H-9b y H-10 respectivamente, además de la señal simple en  $\delta$  1.77 que integra para 3H, se asigna al metilo vinílico y las señales simples en  $\delta$  4.93 y  $\delta$  5.07 se asignan a los protones de un metileno vinílico que forman la cadena isopropenilica en C-11 de este compuesto.

El espectro de masas por impacto electrónico presenta un ion molecular de  $m/z$  336, congruente para la fórmula molecular  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_4$ , además se observa que sigue el patrón de fragmentación característico de las flavanonas,<sup>59,62</sup> dando lugar a los fragmentos  $m/z$  232 [ $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_4$ ]<sup>+</sup> y  $m/z$  104 [ $\text{C}_8\text{H}_8$ ]<sup>+</sup> que se originan de la ruptura retro-Diels-Alder (Figura. 7).

La estructura de la tephromicrocarpanona (1) quedó confirmada al efectuar la oxidación de hildgardtol A (4) con dicromato de piridonio en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a temperatura ambiente, obteniéndose el compuesto (I) (Figura 8). La comparación de los datos espectroscópicos del producto de reacción con los de tephromicrocarpanona (Tabla 19), así como la comparación de ambos en ccf, llevó a la conclusión de que estos compuestos tenían la misma estructura, por lo cual, se asigna la estructura (1) a esta flavanona.

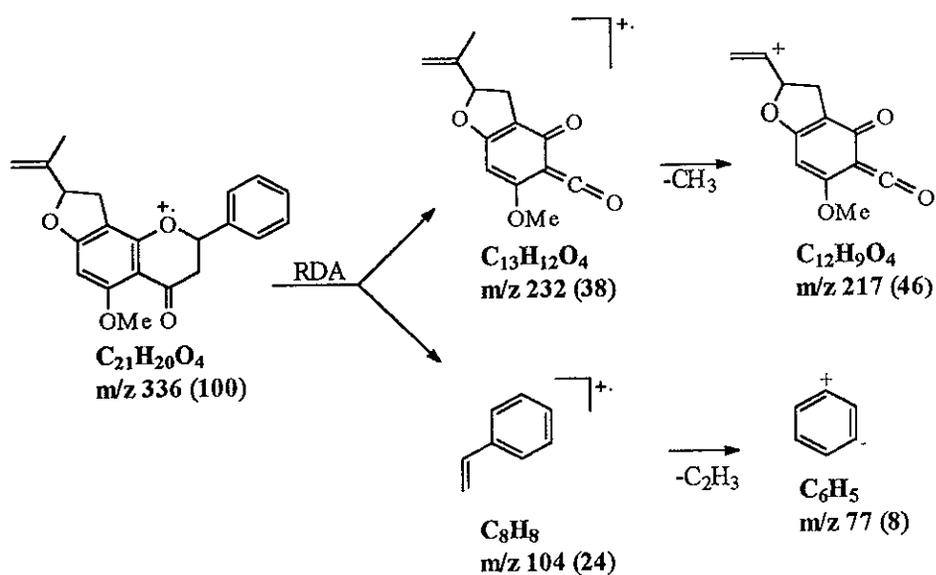


Figura 7. Patrón de fragmentación propuesto para tephromicrocarpanona

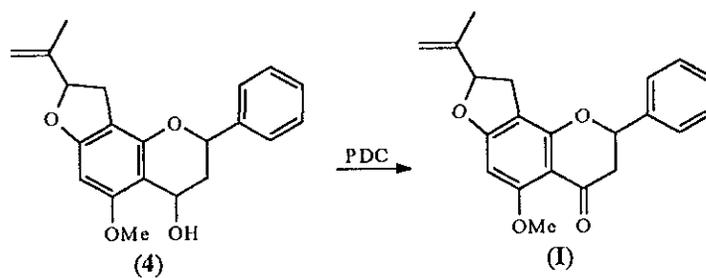


Figura 8. Oxidación de hildgardtol A

Tabla 19. RMN <sup>1</sup>H 300 MHz, CDCl<sub>3</sub> de los compuestos (4), (I) y (1)

No. de H	Hilgardtol A (4) <sup>52</sup>	Compuesto (I)	Tephromicrocarpano (1)
H-2	5.19, dd, (12.3, 2.0)	5.43, dd (12.6, 3.0)	5.43, dd, (12.9, 3.3)
H-3eq	1.97, ddd (14.5, 12.1, 3.9)	2.82, dd (16.5, 3.3)	2.81, dd (16.5, 3.3)
H-3ax	2.26, dt (14.4, 2.0)	2.99, dd (16.5, 12.6)	2.99, dd (16.5, 12.9)
H-4	4.98, dd (3.9, 2.0)	-	-
H-6	6.11, s	6.12, s	6.12, s
H-9eq	2.92, dd (15.1, 7.7)	2.95, dd (15.3, 7.5)	2.94, dd (15.4, 7.5)
H-9ax	3.24, dd (15.1, 9.6)	3.27, dd (15.0, 9.9)	3.27, dd (15.4, 9.7)
H-10	5.18, dd (8.63, 7.9)	5.29, dd (9.6, 7.5)	5.28, dd (9.7, 7.5)
H-12a	4.89, s	4.93, sa	4.93, sa
H-12b	5.06, s	5.07, sa	5.07, sa
H-13	1.73, sa	1.76, s	1.77, s
C <sub>4</sub> -OH	2.5, sa	-	-
C <sub>5</sub> -OMe	3.83, s	3.89, s	3.89, s
H-anillo B	7.40	7.40	7.40

**Crassichalcona (2).** Se aisló del extracto diclorometánico de tallos como un aceite viscoso de color amarillo. Las bandas de absorción que presenta en su espectro de IR en 3050 (C=C), 1633 (C=O  $\alpha,\beta$ -insaturado), 1597 (C-H aromático) y 1109 (C=O) y los máximos de absorción en UV en 348 (17,668) y 215 (18,312), sugieren la presencia de una chalcona.<sup>59</sup>

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H, las señales dobles observadas en  $\delta$  7.74 (J=15.8 Hz) y  $\delta$  7.85 (J=15.8 Hz), forman un sistema AB y se asignan a los H- $\alpha$  y H- $\beta$  del núcleo de la chalcona, confirmando lo antes mencionado. Dos señales múltiples en  $\delta$  7.38 y  $\delta$  7.57, que integran para 3H y 2H, corresponden a los protones del anillo A monosustituído, H-3, H-4, H-

5 y H-2, H-4 respectivamente. Para el anillo B, solo se observa una señal simple en  $\delta$  5.99 que integra para un protón aislado vecino a dos grupos electronegativos dado su desplazamiento a campo alto, uno de estos grupos es un metoxilo por la señal simple en  $\delta$  3.9 que integra para 3H y el otro grupo es el anillo dihidrofurano representado por las señales que forman un sistema ABX, como el que presentan los compuestos (4),<sup>52</sup> (5)<sup>52</sup>, (6)<sup>14</sup>, por las señales dobles de doble en  $\delta$  2.94 (J=15 y 7.5 Hz),  $\delta$  3.29 (J=15 y 9.9 Hz) y doble de doble en  $\delta$  5.28 (J=9.9 y 7.5 Hz) asignadas a H-7'a, H-7'b y H-8' respectivamente. Además de las señales simples anchas en  $\delta$  4.92 y  $\delta$  5.07 que integran cada una para un protón del metileno vinílico y la señal simple en  $\delta$  1.76 que integra para 3H asignada al metilo vinílico de la cadena isopropenilica en C-8' del anillo dihidrofurano en C-4' y C-5' de la chalcona. El otro sustituyente del anillo B es un grupo hidroxilo que se encuentra formando un puente de hidrógeno con el grupo carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado por la señal simple a campo bajo en  $\delta$  14.1 que integra para un protón y que desaparece cuando el compuesto es tratado con agua deuterada.

El espectro de masas por impacto electrónico de crassichalcona presenta un ión molecular de m/z 336 congruente para la fórmula  $C_{21}H_{20}O_4$ , además de los fragmentos típicos de las chalconas<sup>62</sup> de m/z 335  $[M-H]^+$ , 307  $[M-CHO]^+$ , 259  $[M-C_6H_5]$ , 217  $[M-C_9H_{11}]^+$ , 233  $[M-103]^+$ , 131  $[M-C_{12}H_{13}O_3]$  y 103  $[C_9H_7O-CO]^+$  (Figura 9).

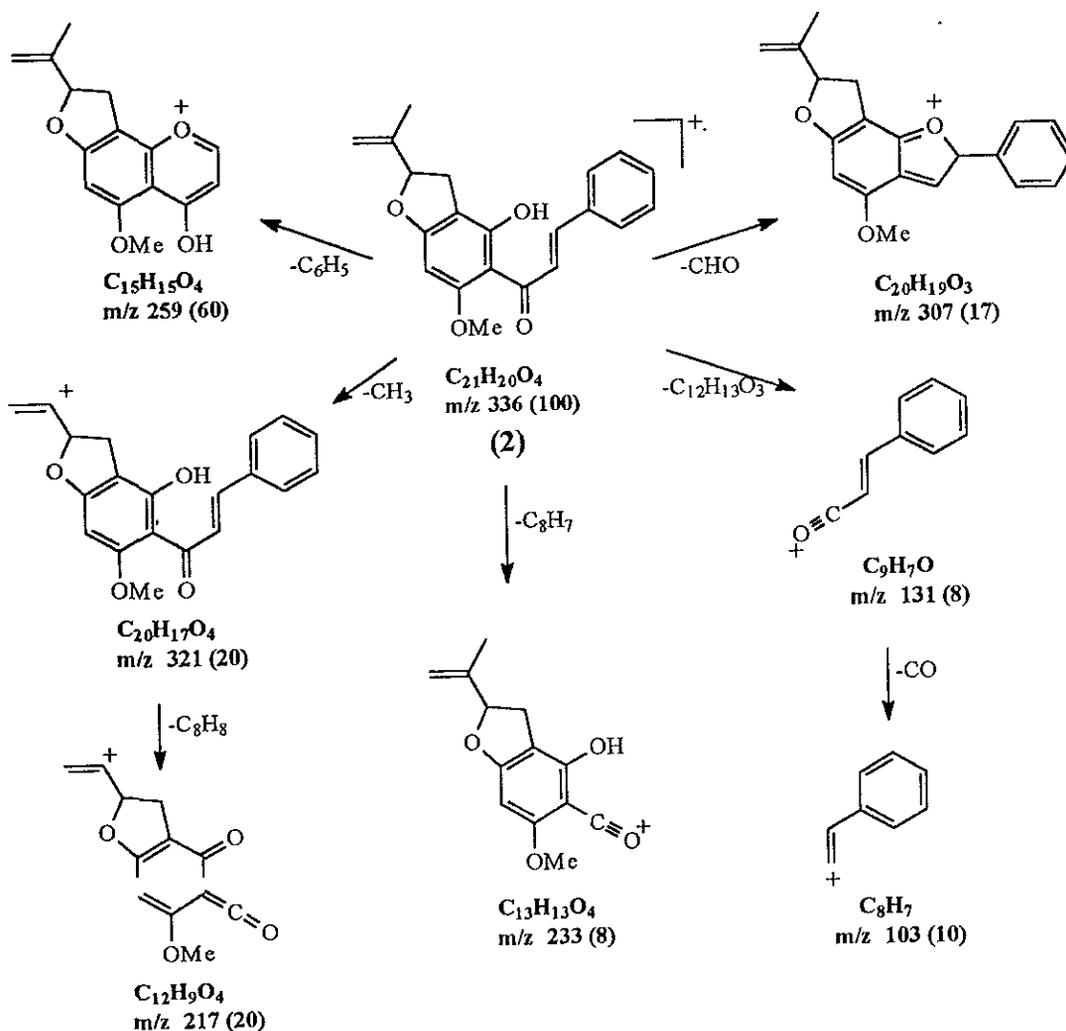


Figura 9. Patrón de fragmentación propuesto para crassichalcona

De acuerdo con lo antes mencionado y también por razones biogénicas<sup>23,27</sup> se propone la estructura (2) para este compuesto, ya que si se tiene la flavanona, tephromicrocarpanona(1), el precursor debe ser la chalcona, crassichalcona(2), (Figura 10).

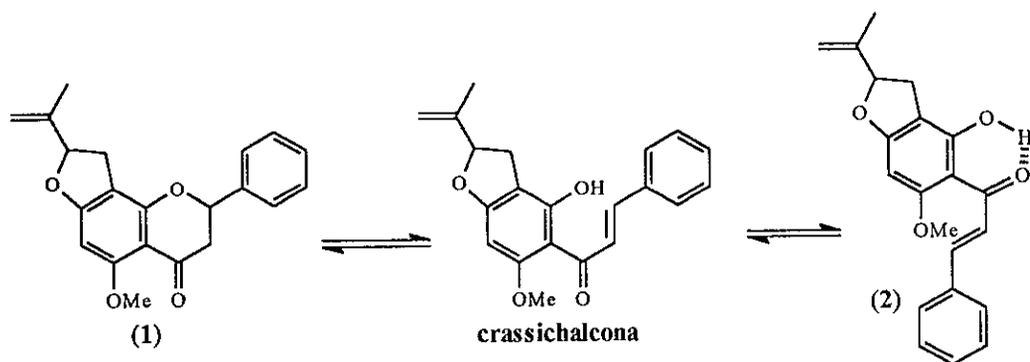


Figura 10. Isomerización de crassichalcona

**Crassifolina (3).** Se aisló del extracto hexánico de raíz como un sólido cristalino en forma de pequeñas agujas blancas,  $pf= 249-250^{\circ}C$ ,  $[\alpha]_D= +42.4$ . Su espectro de IR mostró la presencia de bandas de absorción para grupos aromáticos en 3060 y 1620, bandas para (C-O) en 1112, pero no presentó bandas para grupos hidroxilo o carbonilo. El espectro de UV presenta dos máximos de absorción en 248 (12,154) y 279 (8,926) similares al hildgartol A (4)<sup>52</sup>, siendo la magnitud del coeficiente de extinción molar casi el doble de éste. Estos datos, junto con los de espectrometría de masas, sugieren que este compuesto debe ser un biflavonoide.

El espectro de masas mostró un ion molecular de  $m/z$  658, congruente para la fórmula molecular  $C_{42}H_{42}O_7$ . Además presenta los fragmentos de  $m/z$  338  $[C_{21}H_{22}O_4]^+$ , 321  $[C_{21}H_{21}O_3]^+$  y 320  $[C_{21}H_{20}O_3]$ , característicos de un biflavonoide<sup>62</sup> con unión éter (R-O-R), ya que se sabe que este tipo de compuestos tienden a sufrir ruptura sobre ambos lados del ligando etéreo dando lugar a los fragmentos I y II (Figura 11), los cuales sufren posteriores rupturas. Cabe mencionar que el peso molecular de crassifolina es el doble de  $m/z$  338 correspondiente al hildgartol A (4)<sup>52</sup> con 18 unidades de masa menos, lo que indica que este compuesto debe ser un dímero de hildgartol A (4).<sup>52</sup>

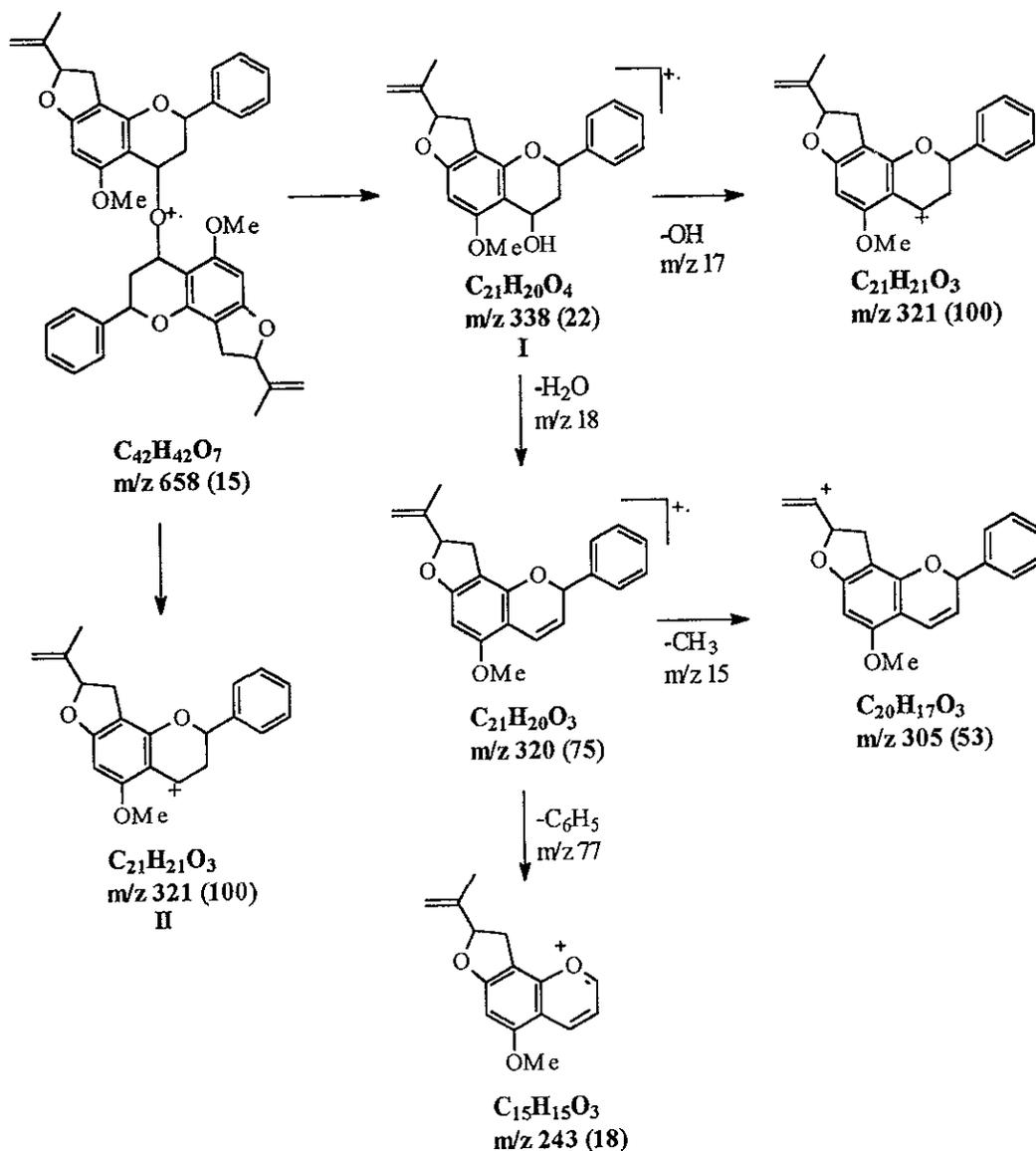


Figura 11. Patrón de fragmentación propuesto para crassifolina

Lo anterior se confirmó al analizar su espectro de RMN  $^1H$ , donde las señales triple de doble en  $\delta$  1.94 ( $J=13.0$  y  $2.4$  Hz), doble de doble en  $\delta$  2.86 ( $J=13.2$ , y  $10.8$  Hz) triple en  $\delta$  4.90 ( $J=2.4$  Hz) y doble ancha en  $\delta$  5.37 ( $J=10.8$  Hz), forman un sistema ABMX que describen el núcleo de un flavano-4-sustituído<sup>52</sup>, y dado el peso molecular y que no se observa la señal para el sustituyente en C-4, como en los compuestos (4)<sup>52</sup> y (5)<sup>52</sup>, para hidroxilo o metoxilo, el sustituyente para crassifolina debe ser otra unidad del mismo flavonoide (Tabla

20). Además, en la región de los protones aromáticos presenta una señal múltiple en  $\delta$  7.43 que integra para 10H y se asignan a los protones de los anillos B y B' del biflavonoide, una señal simple a campo alto en  $\delta$  6.04 que integra para 2H, corresponde a los protones aromáticos H-6 y H-6'' de los anillos A y A'. La señal simple en  $\delta$  3.54 que integra para 6H se asigna a dos metoxilos en C-5 y C-5'' respectivamente. Las señales dobles de doble en  $\delta$  2.86 ( $J=15.3$  y  $8.3$  Hz), y  $\delta$  3.16 ( $J=15.3$  y  $9.45$ ) y triple en  $\delta$  5.14 ( $J=8.85$  Hz) que integran cada una para dos protones, forman un sistema ABX que corresponde al anillo dihidrofurano en C-7 y C-8 del anillo A y C-7' y C-8' del anillo A' respectivamente, con la cadena isopropenilica en C-10 y C-10', representada por una señal simple en  $\delta$  1.94 que integra para 6H de los metilos vinílicos y dos señales simples en  $\delta$  4.86 y  $\delta$  5.04 que integran cada una para 2H de los metilenos vinílicos, estas señales son similares a las que presentan hildgardtol A (4)<sup>52</sup>, metil-hildgardtol A (5)<sup>52</sup> y abbottina (6)<sup>14</sup> para el anillo dihidrofurano con la cadena isopropenilica.

Tabla 20. RMN <sup>1</sup>H, 300 MHz, CDCl<sub>3</sub> de los compuestos (3), (4) y (5)

No. de H	Crassifolina (3)	Hildgardtol A (4) <sup>2</sup>	Metil-hildgardtol A (5) <sup>2</sup>
H-2	5.37, da (10.8)	5.19, dd, (12.3, 2.0)	5.25, dd (12.4, 2.2)
H-3eq	1.94, td (13.0, 2.4)	1.97, ddd (14.5, 12.1, 3.9)	1.83, ddd (13.4, 12.3, 3.0)
H-3ax	2.86, dd (13.2, 10)	2.26, dt (14.4, 2.0)	2.30, dt (14.2, 2.3)
H-4	4.90, t (2.4)	4.98, dd (3.9, 2.0)	4.52, t (2.7)
H-6	6.04, s	6.11, s	6.08, s
H-9eq	2.86, dd (15.3, 8.4)	2.92, dd (15.1, 7.7)	2.90, dd, (15.1, 8.0)
H-9ax	3.16, dd (15.3, 9.4)	3.24, dd (15.1, 9.6)	3.22, dd, (15.1, 9.7)
H-10	5.16, t (8.8)	5.18, dd (8.63, 7.9)	5.16, t (8.7)
H-12 <sup>a</sup>	4.86, s	4.89, s	4.87, s
H-12b	5.04, s	5.06, s	5.05, s
H-13	1.76, s	1.73, sa	1.76, s
C <sub>4</sub> -R	-	2.5, sa, OH	3.45, s, OMe
C <sub>5</sub> -Ome	3.54, s	3.83, s	3.81, s
H-anillo B	7.43	7.4, m	7.4, m

La estructura propuesta para crassifolina (3) quedó confirmada por difracción de Rayos X (Figura 12), en donde se puede asignar además la estereoquímica relativa para los centros asimétricos de este biflavonoide.

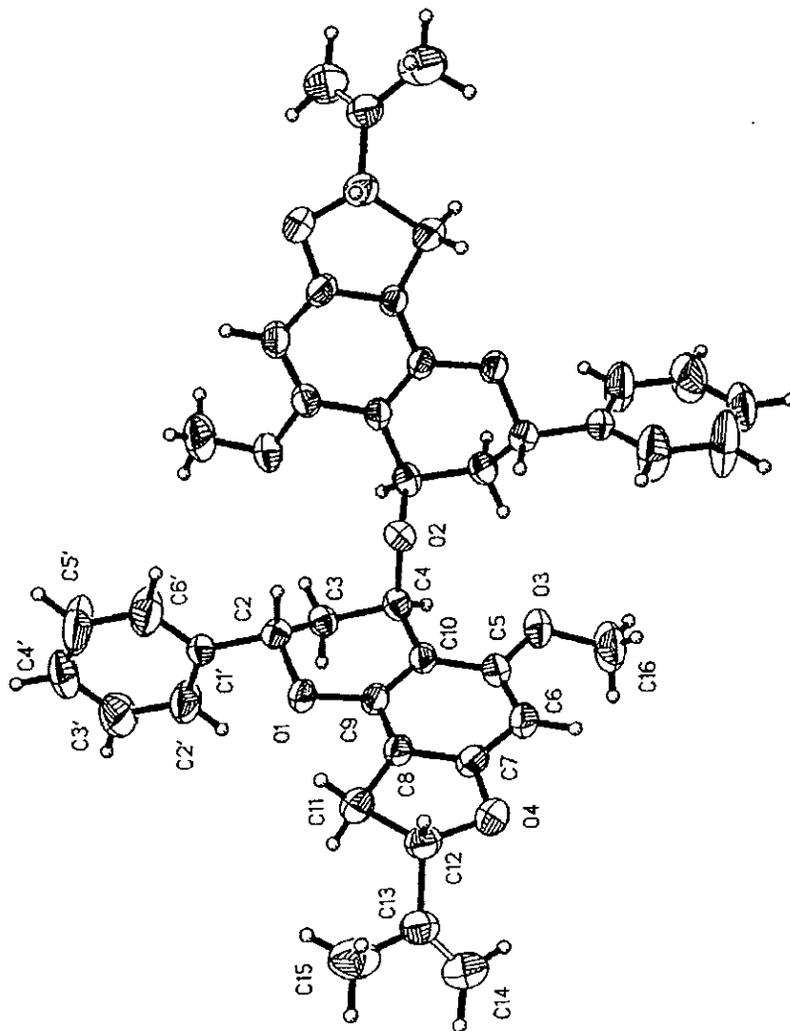


Figura 12. Vista estereoscópica de la estructura molecular de crassifolina

Cabe mencionar que crasifolina es el segundo biflavonoide aislado del género *Tephrosia* después del tepicanol A, aislado de *T. tepicana*.<sup>18</sup> Ambos dímeros presentan la unión C-O-C, es decir: éter-4,4''-biflavanilo. (Figura 13).

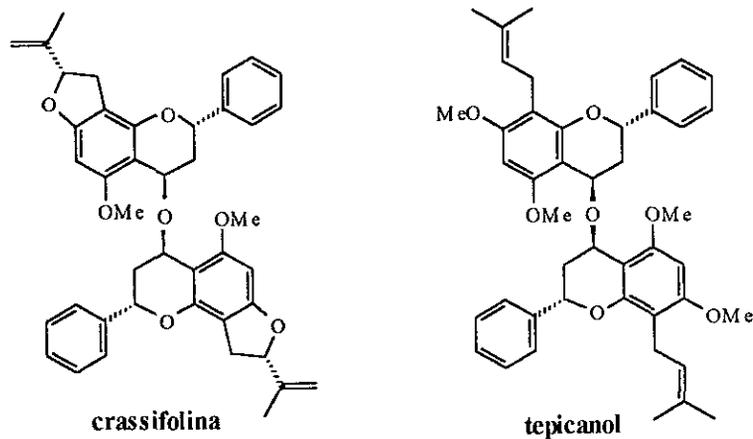


Figura 13. Biflavonoides aislados del género *Tephrosia*

Con respecto a la estereoquímica relativa de los centros asimétricos de tephromicrocarpanona (1) y crassichalcona (2), así como para hildgardtol A (4)<sup>52</sup>, en este caso, se pueden asignar tomando como referencia la propuesta para crassifolina (3) por difracción de rayos X, ya que sus estructuras están íntimamente relacionadas por razones biogénéticas. (Figura 14).

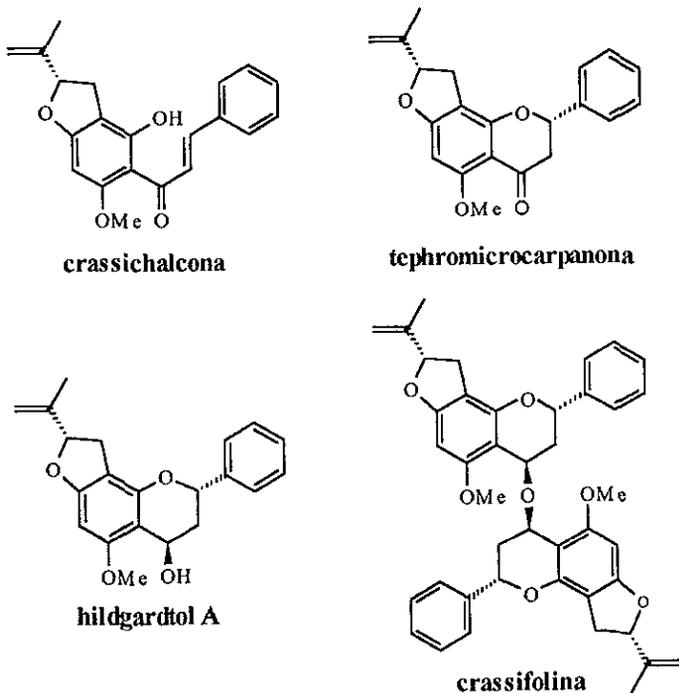


Figura 14. Estereoquímica relativa de los de los flavonoides aislados

## ◆ Transformaciones químicas

Con la finalidad de determinar la reactividad de 7-O-metil-glabranina (10)<sup>53</sup> y glabranina (11),<sup>55,56</sup> se hicieron reaccionar estas flavanonas con DDQ, el cual es un reactivo fuertemente oxidante muy usado en reacciones de aromatización,<sup>63</sup> en la ciclación de compuestos fenólicos,<sup>64</sup> en reacciones de dehidrogenación de compuestos carbonílicos aplicado en la química de cetonas esteroideas<sup>64</sup> o para preparar flavonas,<sup>65</sup> entre otras.<sup>66,67</sup>

**Reacción de 7-O-metil-glabranina con DDQ.** En esta reacción se esperaba obtener a partir de la 5,7-dihidroxi-8-isoprenilflavanona (10),<sup>53</sup> la flavona correspondiente,<sup>65</sup> sin embargo, al analizar los datos espectroscópicos de los compuestos obtenidos, se determinó que no fue así, sino que se obtuvieron dos compuestos isoméricos II y III (Figura 19), cuyos pesos moleculares determinados por espectrometría de masas por impacto electrónico, indican un aumento de 226 unidades de masa.

Haciendo referencia al trabajo publicado por Asato y Kiefer<sup>68</sup>, donde obtienen un aducto de Diels-Alder a partir de tetrametiletileno en presencia de DDQ (Figura 15), se puede pensar que en este caso, la cadena isoprenílica en C-8 de la flavanona, reacciona con DDQ, obteniéndose también como producto de reacción el aducto de Diels-Alder correspondiente.

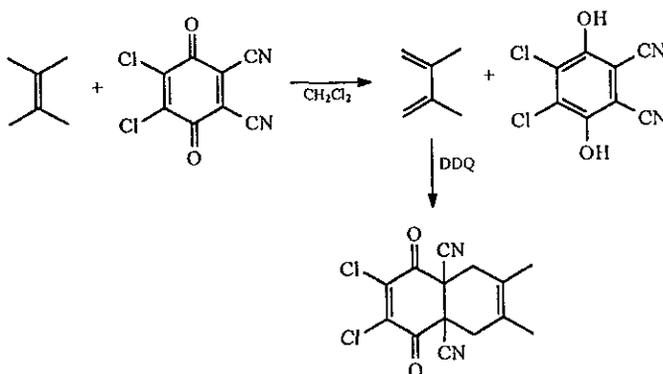


Figura 15. Reacción de tetrametiletileno con DDQ

**Compuesto II.** Cristales ortorrómbicos de color naranja,  $pf=214-216^{\circ}C$ ,  $[\alpha]_D = -30.8$ , su espectro en el IR presentó bandas de absorción en  $3400\text{ cm}^{-1}$  (OH),  $1720$  (cetona cíclica  $\alpha$ -halogenada),  $1638$  (C=O conjugado),  $1583$  (C=C),  $789$  y  $760$  (C-Cl), su espectro en el UV presentó máximos de absorción en  $241.5$ ,  $288.5$  y  $323.5$  nm. Por RMN  $^1H$ , se observó que no hubo cambios en el núcleo base de la flavanona, aún presenta el sistema ABX característico,<sup>53</sup> por las señales dobles de doble en  $\delta 2.82$  ( $J=17.4$  y  $3$  Hz),  $\delta 3.08$  ( $J=17.4$  y  $14.1$  Hz) y  $\delta 5.55$  ( $J=14.1$  y  $3$  Hz), similares a las de 7-O-metil-glabranina (10), además, presenta la señal múltiple que integra para 5H del anillo B, la señal simple en  $\delta 6.06$  que integra para un protón, H-6, en  $\delta 3.71$  una señal que integra para 3H asignada al grupo metoxilo en C-7 y la señal simple a campo bajo en  $\delta 12.1$  del grupo OH quelatado con el carbonilo de esta flavanona. La diferencia más notable con respecto a la materia prima son las señales para la cadena isoprenílica que no aparecen, en lugar de estas, aparecen dos señales simples anchas en  $\delta 5.44$  y  $\delta 4.16$ , cada una integra para un hidrógeno, dos señales dobles que forman un sistema AB en  $\delta 2.53$  ( $J=17.7$  Hz) y  $\delta 2.17$  ( $J=18$  Hz), se asignan a un metileno y otra señal simple ancha en  $\delta 1.58$  que integra para 3H asignada a un metileno vinílico. En el espectro de RMN  $^{13}C$  (DEPT), presenta señales para CH-vinílico en  $\delta 121.7$ , para CH-alifático en  $\delta 37.7$ , para  $CH_2$ -alifático en  $\delta 31.2$  y para  $CH_3$ -vinílico en  $\delta 22.5$ , estas señales corresponden a las últimas señales mencionadas de RMN  $^1H$  respectivamente.

Su espectro de masas por impacto electrónico presenta un ion molecular de  $m/z 562$  con una contribución isotópica  $M+2$  de  $m/z 564$  con un peso molecular promedio calculado de  $563.3943$  congruente con la fórmula  $C_{29}H_{20}Cl_2N_2O_6$  y un pico base de  $m/z 336$   $[M-227]^+$ , que se origina de la ruptura RDA, esta pérdida de 226 unidades de masa corresponde a  $C_8Cl_2N_2O_2$ , es decir, el reactivo DDQ, utilizado en esta reacción, como se puede apreciar en el patrón de fragmentación propuesto (Figura 16).

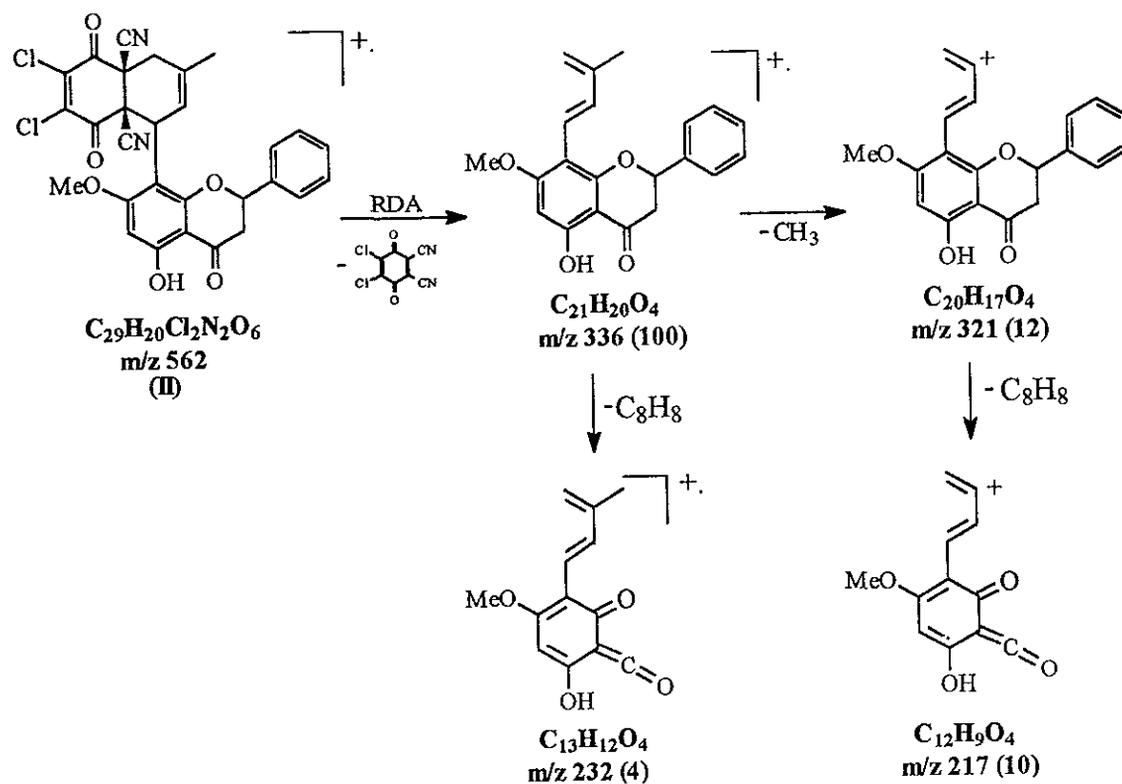


Figura 16. Patrón de fragmentación propuesto para el compuesto **II**

Por lo antes mencionado y por difracción de rayos-X de este producto, se establece la estructura de uno de los isómeros, el compuesto **II**, además de la estereoquímica relativa para sus centros asimétricos (Figura 17).

**Compuesto III.** Cristales amarillos en forma de agujas,  $pf = 151-153^{\circ}C$ ,  $[\alpha]_D = 115.3$ , los mismos máximos de absorción que presenta en el UV y las bandas de absorción en el IR, así como, su peso molecular determinado por espectrometría de masas por impacto electrónico son los iguales que para el compuesto **II**. Su espectro de RMN  $^1H$ , también presenta las mismas señales que el compuesto **II**. Finalmente, se logró cristalizar una fracción que contenía ambos productos, y los cristales de los isómeros se separaron manualmente, para realizar la difracción de rayos X, con el que se pudo establecer sin lugar a dudas la estructura de este isómero minoritario, el compuesto **III**. (Figura 18).

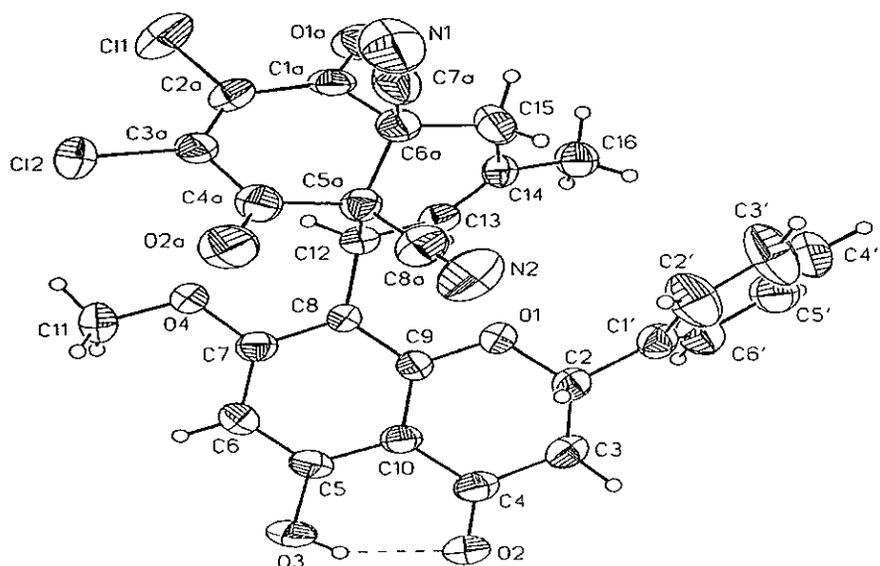


Figura 17. Vista estereoscópica de la estructura molecular del compuesto **II**

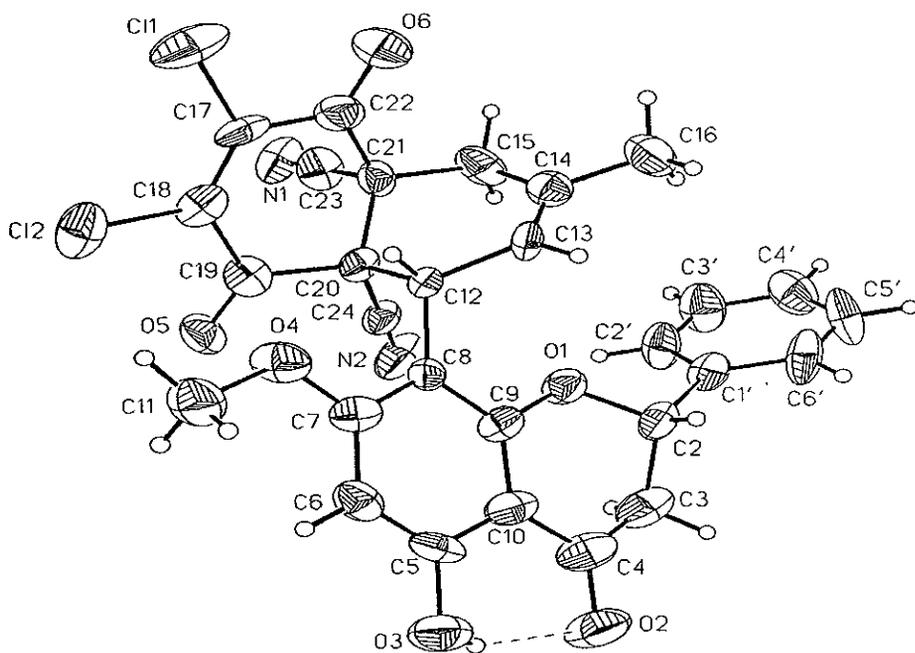


Figura 18. Vista estereoscópica de la estructura molecular del compuesto **III**

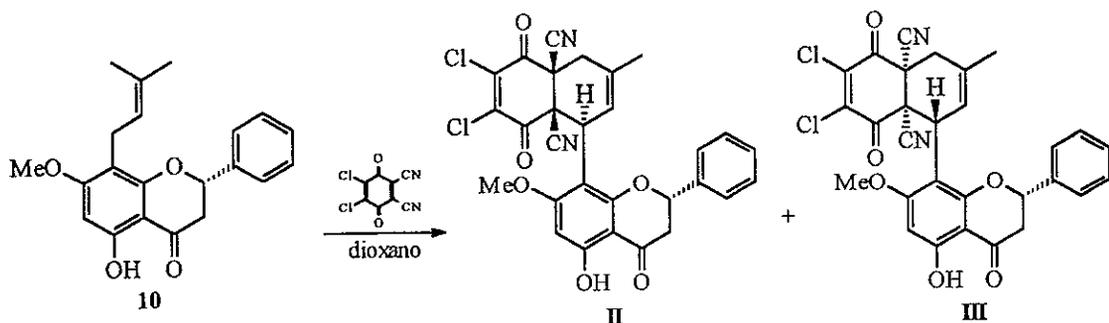


Figura 19. Reacción de 7-O-metilglabranina con DDQ

Como es sabido, en la reacción de Diels-Alder, es posible obtener dos aductos isoméricos de acuerdo con las reglas de Alder, estos pueden ser debido a la adición endo o exo.<sup>69</sup> En este caso, se obtuvieron ambos productos y como era de esperarse, en esta mezcla de estereoisómeros, el producto endo (**II**) se obtuvo en mayor cantidad que el producto exo (**III**).

**Reacción de glabranina (11) con DDQ.** De esta reacción se obtuvo el compuesto **IV**, como un sólido cristalino blanco,  $pf = 124-125^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]_D = -64.2^{\circ}$ . Su espectro de RMN  $^1\text{H}$  presenta las señales dobles de doble que integran cada una para 1H en  $\delta$  2.84 ( $J = 17.25$  y 3 Hz),  $\delta$  3.06 ( $J = 17.4$  y 12.9 Hz) y  $\delta$  5.43 ( $J = 12.9$  y 3 Hz), éstas forman un sistema ABX típico del núcleo de una flavanona, además presenta la señal múltiple en  $\delta$  7.43 que integra para 5H, asignada a los protones del anillo B monosustituído, una señal simple que integra para un protón aislado en  $\delta$  6.00, asignada al H-6, orto a dos grupos electronegativos, uno de estos grupos es un grupo OH en C-5 formando puente de hidrógeno con el carbonilo de la flavanona, por la señal simple que se encuentra desplazada a campo bajo en  $\delta$  12.08, estas señales son iguales a las que se observan para glabranina (**11**), por lo tanto se deduce que en esta reacción no hubo cambios en el núcleo de la flavanona. La diferencia más notable en RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **IV** con glabranina (**11**)<sup>55,56</sup> son las señales para los protones de la cadena isoprenílica y la señal para el grupo hidroxilo en C-7, que en este caso no aparecen, sin embargo aparecen las señales dobles que integran para un protón formando un sistema AB en

$\delta$  5.47 (J= 9.9 Hz) y  $\delta$  6.55 (J= 9.9 Hz) y dos señales simples en  $\delta$  1.42 y  $\delta$  1.44, cada una integra para 3H. Su espectro de masas presenta un ion molecular de m/z 322, congruente para la fórmula molecular  $C_{20}H_{18}O_4$ , el hecho de que presente dos unidades de masa menos que glabranina, por consiguiente una insaturación más y que su espectro de RMN  $^1H$  no presente más señales para protones vinílicos, esta insaturación debe ser un ciclo, por lo tanto las dos señales simples que integran para 3H y el sistema AB corresponden a las señales de un anillo gem-dimetil-cromeno.<sup>51</sup>

Por otro lado, se sabe del uso de DDQ para la síntesis de cromenos naturales<sup>70,71</sup> a partir de un fenol con una cadena isoprenílica en orto.<sup>72</sup> Si la glabranina (11) presenta ambos grupos, la cadena isoprenílica en C-8 orto al grupo OH, se puede decir que esta es la parte más reactiva de la molécula en la reacción frente a DDQ, llevándose a cabo una reacción de ciclación oxidativa,<sup>54</sup> dando lugar al anillo gem-dimetil-cromeno. (Figura 20).

El compuesto IV, producto de ciclación de glabranina (11), fue aislado como producto natural de *Tephrosia obovata*<sup>1</sup>. Esto se comprobó haciendo una comparación en ccf y de sus constantes físicas y espectroscópicas del compuesto IV con los publicados para obovatina,<sup>51</sup> llegando a la conclusión de que se trata del mismo compuesto. Lo cual sugiere que en la biosíntesis de la obovatina (IV), el precursor inmediato puede ser la glabranina (11), pudiendo considerar esta reacción como una reacción biomimética.

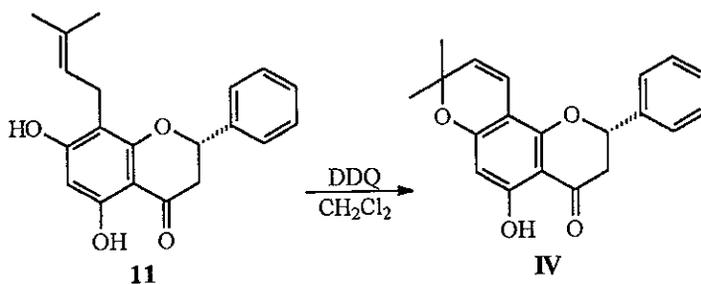


Figura 20. Reacción de glabranina (11) con DDQ

## ◆ Evaluación antiinflamatoria

En este trabajo se evaluaron solamente los tres flavonoides mayoritarios aislados de *Tephrosia crassifolia*. La evaluación de los demás metabolitos secundarios, tanto de *T. crassifolia* como de *T. major*, constituyen un estudio posterior.

Los flavonoides evaluados fueron crassifolina (3), hildgardtol A (4) y metil-hildgardtol A (5), los cuales mostraron una actividad antiinflamatoria dependiente de la dosis. En la tabla 21 se muestran los resultados de la actividad antiinflamatoria de estos compuestos.

Los valores del área bajo la curva (ABC), indican el efecto inhibitorio que mostraron los flavonoides evaluados, en un periodo de observación de 5 horas.

De los compuestos valorados, crassifolina resultó ser más activo que hildgardtol A y metil-hildgardtol A, como se puede apreciar en la figura 21.

Estudios previos, han demostrado que existen niveles elevados de los productos de la ciclooxigenasa, como la PGE<sub>2</sub>, en el edema inducido por carragenina.<sup>48</sup> Probablemente la actividad antiinflamatoria de 3, 4 y 5, se deba a su efecto inhibitorio sobre la ciclooxigenasa, enzima que interviene en la síntesis de prostaglandinas en el metabolismo de ácido araquidónico. Esta suposición, se ve apoyada por el hecho de que la mezcla de biflavonoides conocida como kolaviron<sup>50</sup> inhibe la síntesis de prostaglandinas que intervienen en el proceso inflamatorio. Aunque no se ha demostrado con precisión cuál es el mecanismo. Otra posibilidad, podría ser, la inhibición de la enzima ciclooxigenasa, como es el caso del biflavonoide amentoflavona<sup>73</sup> ó, a través de su acción antioxidante como captadores de radicales libres.<sup>29,32</sup>

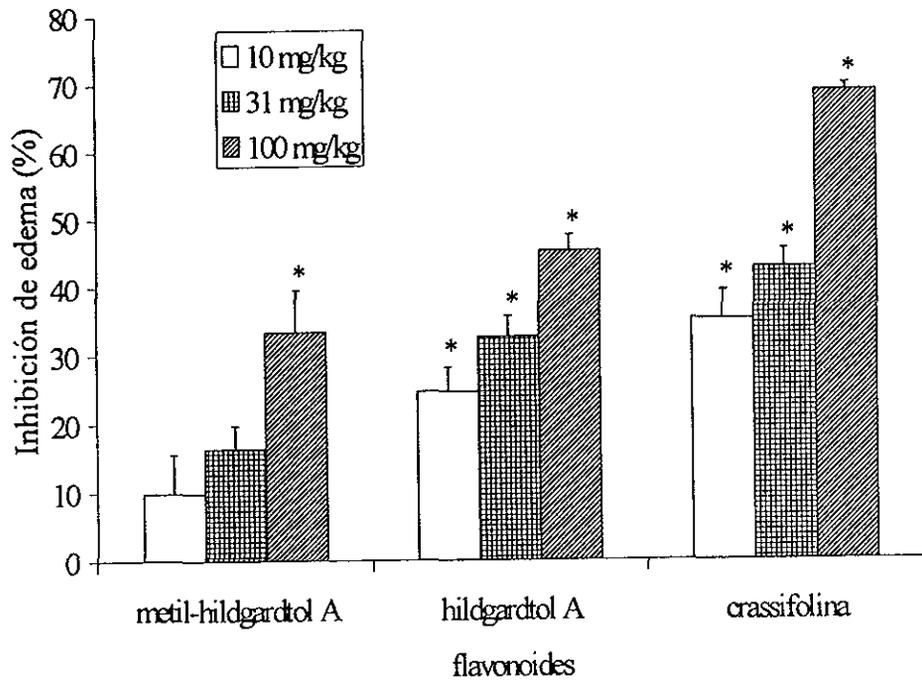


Figura 21. Efecto de flavonoides sobre el edema inducido por carragenina en ratas durante 5 h; \* $p < 0.01$  respecto a su control.

Tabla 21. Efecto antiinflamatorio de flavonoides sobre el edema inducido por carragenina en ratas

Grupos	dosis mg/kg	% variación del edema $\pm$ EEM					ABC	%I
		tiempo (horas)						
		1	2	3	4	5		
Control (vehículo 1)		29.6 $\pm$ 1.5	30.4 $\pm$ 2.1	36.0 $\pm$ 1.8	32.6 $\pm$ 2.0	29.8 $\pm$ 2.2	128.7 $\pm$ 7.7	—
Metil-hildgardtol A	10	25.0 $\pm$ 1.7	29.0 $\pm$ 2.0	31.6 $\pm$ 2.2	29.4 $\pm$ 1.7	27.2 $\pm$ 1.6	116.1 $\pm$ 7.3	9.8 $\pm$ 5.6
	31	24.2 $\pm$ 1.1**	27.8 $\pm$ 1.2	28.8 $\pm$ 0.9*	26.6 $\pm$ 1.2	24.8 $\pm$ 1.2	107.7 $\pm$ 4.4	16.3 $\pm$ 3.4
	100	20.8 $\pm$ 2.0*	23.8 $\pm$ 1.8**	21.0 $\pm$ 2.7*	20.4 $\pm$ 1.9*	19.8 $\pm$ 1.8*	85.9 $\pm$ 8.3*	33.3 $\pm$ 6.2*
Control (vehículo 1)		31.5 $\pm$ 1.8	32.8 $\pm$ 1.5	39.3 $\pm$ 1.1	35.3 $\pm$ 1.0	32.5 $\pm$ 1.9	139.5 $\pm$ 4.8	—
Hildgardtol A	10	24.0 $\pm$ 1.6**	25.5 $\pm$ 1.7**	18.5 $\pm$ 1.3*	26.8 $\pm$ 0.9*	24.8 $\pm$ 0.9*	105.1 $\pm$ 5.0*	24.6 $\pm$ 3.5*
	31	22.3 $\pm$ 1.8*	23.7 $\pm$ 1.0*	25.0 $\pm$ 1.1*	23.3 $\pm$ 0.9*	22.0 $\pm$ 0.4*	94.1 $\pm$ 4.3*	32.5 $\pm$ 3.0*
	100	17.3 $\pm$ 1.1*	19.5 $\pm$ 0.6*	20.5 $\pm$ 0.9*	19.0 $\pm$ 1.2*	17.8 $\pm$ 0.8*	76.5 $\pm$ 3.4*	45.2 $\pm$ 2.4*
Control (vehículo 1)		24.8 $\pm$ 0.9	28.6 $\pm$ 0.9	30.2 $\pm$ 0.4	26.6 $\pm$ 0.4	23.4 $\pm$ 0.7	109.5 $\pm$ 2.4	—
Crassifolina	10	17.2 $\pm$ 0.8*	18.6 $\pm$ 1.1**	19.6 $\pm$ 1.2**	17.0 $\pm$ 1.5**	14.6 $\pm$ 1.4**	71.1 $\pm$ 4.7*	35.1 $\pm$ 4.2*
	31	16.2 $\pm$ 0.9*	17.8 $\pm$ 1.0**	16.8 $\pm$ 0.7*	14.2 $\pm$ 0.6*	11.6 $\pm$ 0.5*	62.7 $\pm$ 2.9*	42.7 $\pm$ 2.7*
	100	12.6 $\pm$ 0.5*	10.4 $\pm$ 0.8*	8.6 $\pm$ 0.9*	6.8 $\pm$ 0.6*	4.4 $\pm$ 0.2*	34.3 $\pm$ 1.1*	68.8 $\pm$ 1.0*
Control (vehículo 2)		14.4 $\pm$ 0.8	18.6 $\pm$ 1.5	22.0 $\pm$ 2.0	18.6 $\pm$ 1.3	15.0 $\pm$ 1.7	73.9 $\pm$ 5.7	—
Indometacina	2.5	10.8 $\pm$ 0.2**	13.4 $\pm$ 1.3**	14.8 $\pm$ 1.2**	1.2 $\pm$ 0.9*	9.4 $\pm$ 0.9**	50.3 $\pm$ 3.3*	31.9 $\pm$ 4.5*
	5	10.8 $\pm$ 0.3*	12.6 $\pm$ 0.8*	12.6 $\pm$ 0.8*	11.0 $\pm$ 1.0*	6.8 $\pm$ 1.5*	45.0 $\pm$ 3.4*	39.1 $\pm$ 4.6*
	7.5	8.0 $\pm$ 0.3*	8.0 $\pm$ 1.0*	11.0 $\pm$ 0.7*	7.6 $\pm$ 1.0*	4.2 $\pm$ 0.6*	32.7 $\pm$ 2.7*	55.8 $\pm$ 3.6*

Cada valor indica el promedio  $\pm$  EEM de 5 ratas.

\*p < 0.01, \*\*p < 0.05 respecto al control

% I: porcentaje de inhibición del edema

## V. CONCLUSIONES

El estudio químico de las especies *Tephrosia crassifolia* y *T. major* permitió el aislamiento de diferentes metabolitos secundarios, de estos resalta el hecho de que a excepción de  $\beta$ -sitosterol y stigmasterol, todos son de tipo flavonoide.

De los extractos obtenidos de las partes aéreas y raíces de *T. crassifolia*, se lograron aislar y caracterizar por análisis químicos, espectroscópicos y por difracción de rayos X en uno de los casos, tres flavonoides cuyas estructuras no se encuentran publicadas en la literatura, estos fueron, una flavanona, tephromicrocarpanona (1), una chalcona, crassichalcona (2) y un biflavonoide, crassifolina (3). Además, los siguientes flavonoides de estructuras conocidas como: hildgardtol A (4), metil-hildgardtol A (5), abbottina (6), 5-O-metil-obovatina (7), y obovatachalcona (8) así como, sacarosa (14) y una mezcla de  $\beta$ -sitosterol (12) y stigmasterol (13).

De los extractos obtenidos de las partes aéreas y raíces de *T. major*, se aislaron y caracterizaron, tres flavanonas conocidas como: spinoflavanona B (9), 7-O-metil-glabranina (10) y glabranina (11), además de sacarosa (14) y la mezcla de  $\beta$ -sitosterol (12) y stigmasterol (13).

En las transformaciones químicas, la reacción de 7-O-metilglabranina (10) con DDQ, permitió la obtención de dos isómeros aductos de Diels-Alder, estos fueron, el compuesto II, producto endo, mayoritario y el compuesto (III), producto exo, minoritario, sus estructuras fueron establecidas sin lugar a dudas por difracción de rayos X. Mientras que de la reacción de glabranina (11) con DDQ, se obtuvo el producto de ciclación correspondiente, el compuesto (IV). De estas dos reacciones se puede concluir que la parte más reactiva de ambas moléculas frente a DDQ, es la cadena isoprenílica en C-8, que en el primer caso, da como productos de reacción los aductos de Diels-Alder correspondientes, y en el segundo caso, ocurre la ciclación con el grupo OH, en C-7. Por otro lado, el compuesto (IV), es conocido

como obovatina, un producto natural aislado de *T. obovata*, por lo que esta reacción podría considerarse como una reacción biomimética en la síntesis de este producto.

Con respecto a la evaluación antiinflamatoria, solamente fueron evaluados los flavonoides: crassifolina (3), hildgardtol A (4) y metil-hildgardtol A (5), empleando el modelo de edema inducido por carragenina en ratas. En la cual se observó que el edema producido en un periodo de 5 horas, fue inhibido por estos compuestos, mostrando una actividad antiinflamatoria dependiente de la dosis. Siendo más activo crassifolina, que hildgardtol A y metil-hildgardtol A. Estos flavonoides, presentaron una respuesta favorable, de manera que, pueden ser considerados como flavonoides antiinflamatorios. Lo anterior comprueba la hipótesis propuesta en un principio.

Finalmente, por el estudio químico realizado y los antecedentes que se mencionaron, es importante hacer notar que las especies del género *Tephrosia* biosintetizan principalmente compuestos de tipo flavonoide, los cuales presentan diversas actividades biológicas y podrían ser considerados como prototipos de fármacos, por lo que resulta interesante continuar con el estudio químico-biológico de dichas especies.

## VI. BIBLIOGRAFIA

1. Agosta, W. Medicines and drugs from plants. *Journal of Chemical Education* 1997; 74:857-860.
2. Shu, Y-Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *Journal Natural Products* 1998; 61:1053-1071.
3. Robers, J.E., Speedie, M.K., Tyler, V.E. *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*, Williams & Wilkins, U.S.A., 1996:1-14, 138-139.
4. Houghton, P.J. Roots of remedies: plants, people and pharmaceuticals. *Chemistry and Industry* 1999: 15-19.
5. Bisby, F.A., Buckingham, J., Harbone, J.B., *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae*, vol. 1, Chapman & Hall, 1994.
6. Wood, C.E., The American barbistyled species of *Tephrosia* (Leguminosae), Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University, No. CLXX. *Rodhora*, 1949; 51:193-231.
7. Téllez, O. El género *Tephrosia* (Leguminosae) en Oaxaca. *Tesis de Licenciatura*, UNAM, México, D.F. 1986: 3-9, 33.
8. Barron, D. and Ibrahim, R.K. Isoprenylated flavonoids- A survey. *Phytochemistry* 1996; 43, 921-982.
9. Gómez, F., Quijano, L., García, G., Calderón, J.S. and Ríos, T. A prenylated flavan from *Tephrosia madrensis*. *Phytochemistry* 1983; 22: 2925-2926.

10. Domínguez, X.A., Téllez, O. and Ramírez, E.G. Mixtecacin, A prenylated flavanone and oaxacacin its chalcone from the roots of *Tephrosia woodi.*, *Phytochemistry* 1983; **22**: 2047-2049.
11. Gómez, F., Calderón, J.S., Quijano, L., Cruz, O., and Ríos, T. Ninetin: a new flavan from *Tephrosia nitens* Benth. *Chemistry and Industry*, 1984: 632.
12. Gómez, F., Quijano, G., Calderón, J.S., Rodríguez, C. and Ríos, T. Prenylflavans from *Tephrosia watsoniana*. *Phytochemistry* 1985; **24**: 1057-1059.
13. Gómez, F., Quijano, L., Domínguez, M., Calderón, J.S. and Ríos, T. Viridiflorin, an isoflavone from *Tephrosia viridiflora*. *Phytochemistry* 1985; **24**: 1126-1128.
14. Gómez, F., Quijano, L., Aguirre, G., Calderón, J.S. and Ríos, T. Abbottin and tephrobbottin: two new flavonoids from *Tephrosia abbottiae*. *Chemistry and Industry*, 1986: 827.
15. Gómez-Garibay, F., Quijano, L., Calderón, J.S., Morales, S. and Ríos, T., Prenylflavanols from *Tephrosia quercetorum*. *Phytochemistry* 1988; **27**: 2971-2973.
16. Gómez-Garibay, F., Quijano, L., and Ríos, T. Flavanones from *Tephrosia leiocarpa*. *Phytochemistry* 1991; **30**: 3832-3834.
17. Gómez, F., Quijano, L., García, G., Calderón, J.S. and Ríos, T. Enantiomultijugin, a flavone from *Tephrosia viciodes*. *Phytochemistry* 1992; **31**: 2925-2926
18. Gómez-Garibay, F., Calderón, J.S., Quijano, L., Téllez, O., Olivares, M.S. and Ríos, T., An unusual prenyl biflavanol from *Tephrosia tepicana*. *Phytochemistry* 1997; **46**: 1285-1287.

19. Hernández, C.C. Determinación de la estructura molecular de la enantiomultijugina aislada de *Tephrosia viciodes*. *Tesis de Licenciatura*, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. 1988.
20. Wood, C.E., The American barbistyled species of *Tephrosia* (Leguminosae), Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University, No. CLXX. *Rodhora*, 1949; 51:361-364.
21. Aguilar, D. M.A. Componentes químicos de *Tephrosia major* Micheli. *Tesis de Licenciatura*, Universidad Nacional Autónoma de México, 1984.
22. Moreno, T. G. Estudio fitoquímico de leguminosas mexicanas *Tephrosia major* y *platymiscium yucatanum*. *Tesis de Licenciatura*, Universidad Veracruzana, 1995.
23. Mann, J., *Secondary metabolism*, 2<sup>nd</sup> ed., Oxford University, New York, 1987: 275-284.
24. Bruneton, J. *Elementos de fitoquímica y farmacognosia*, ACRIBIA, S.A., 1991:159-186.
25. Middleton, E., Kandaswami, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity and cancer. En: *The flavonoids: Advances in research since 1986*, ed. Harbone, J.B., Chapman & Hall, London, 1994: 619-552.
26. Harbone, J.B., Baxter, H. *Phytochemical Dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants*, Taylor & Francis, London, 1995: 323-432.
27. Herbert, R.B. *The biosynthesis of secondary metabolites*, 2<sup>nd</sup> ed, Chapman & Hall, New York, 1989: 96-119.
28. McClure, J. Physiology and functions of flavonoids. En: *The flavonoids*, eds. Harbone, J.B., Mabry, T.J. and Mabry H., Chapman & Hall, London 1975: 970-1055.

29. Hollman, PCH., Katan, MB. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed. & Pharmacother.* 1997; **51**: 305-310.
30. Hollman, P.C.H. and Katan M.B. Absorption, metabolism, and bioavailability of flavonoids. En: *Flavonoids in health and disease* 1998; vol 7: 483-522.
31. Griffiths, L.A., Mammalian Metabolism of flavonoids. En: *Flavonoids: Advances in research*, ed. Harbone J.B., Mabry, T.J., Chapman and Hall, London, 1982:681-718.
32. Recent trends in research on inflammation and treatment of inflammatory diseases. PJB Publications Ltd., 1991.
33. Rojas-M, W., *Inmunología*, 7ª ed., Corporación para la Investigación Biológica CIB, Colombia, 1988: 56-78.
34. Katzung, B.G., Furst, D.E., *Basic & Clinical Pharmacology*, 7<sup>th</sup> ed., Appleto & Lnge, USA, 1998: 304, 578.
35. Wicher, J.T., Evans, S.W., An overview of the inflammatory response. En: *Immunology and medicine. Biochemistry of inflammation*, Klower Academic Publishers, 1992:1-90.
36. Goodman-Gilman A., Limbid, L.E., *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill, New York, 1996: 579-657.
37. Zubay, G.L., Parson, W.W., Vance, D.E., *Principles of Biochemistry*, vol. 2 Metabolism. WCB, USA, 1995: 452-457.
38. Garret, R.H., Grisham, C.M., *Biochemistry*, Saunders Collage Publishing. 1995: 780-783.

39. Page, C.P., Curtis, M.J., Sutter, M.C., Walker, M.J.A., *Farmacología Integrada*, Hoffman B.B., Harcourt Brace, España, 1998: 342-345.
40. Vane, J.R. and Botting R.M., Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. En *Advances in Experimental Medicinal and Biology*, vol. 433. Recent advances in prostaglandin, tromboxane and leukotriene reseach, ed. Sinzinger, H., Samuelson, B., Vane, J.R., Paoletti. R., Ramwell, P. and Wong, P.Y-K., Plenum Press, New York, 1997: 131-138.
41. Picot, D., Loll, P.J., Garavito. R.M., The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H<sub>2</sub> synthase-1, *Nature* 1994; 367: 243-248.
42. Vane, J. Towards a better aspirin, *Nature* 1994; 367: 215-216.
43. Gorman C. Aspirin without ulcers, *Time* 1998: 39.
44. Lawton, G. New drugs dull the pain of aspirin. *Chemistry and Industry* 1999: 292.
45. Pathak, D., Pathak, K. Singla, A.K. Flavonoids as medicinal agents-Recent advances. *Fitoterapia* 1991; LXII: 371-389.
46. Michel, F., Merckklein, L., Rey, R., Crastes de Paulet, A. Comparative effects of some flavonoids on cyclooxygenase and lipoxigenase activities in different cell systems or subfractions. En: *Studies in Organic Chemistry* 23. Flavonoids and biflavonoids, ed. Farkas, L., Gábor, M., Kallay, F., Elseiver, Oxford, 1985: 389-401.
47. Bauman, J., Bruchhausen, F.V. Wurm, G. Flavonoids and arachidonic acid metabolism. Flavonoids and biflavonoids, 1981. *Studies in Organic Chemistry*, 11. Elseiver, Oxford, 1982: 411-419.

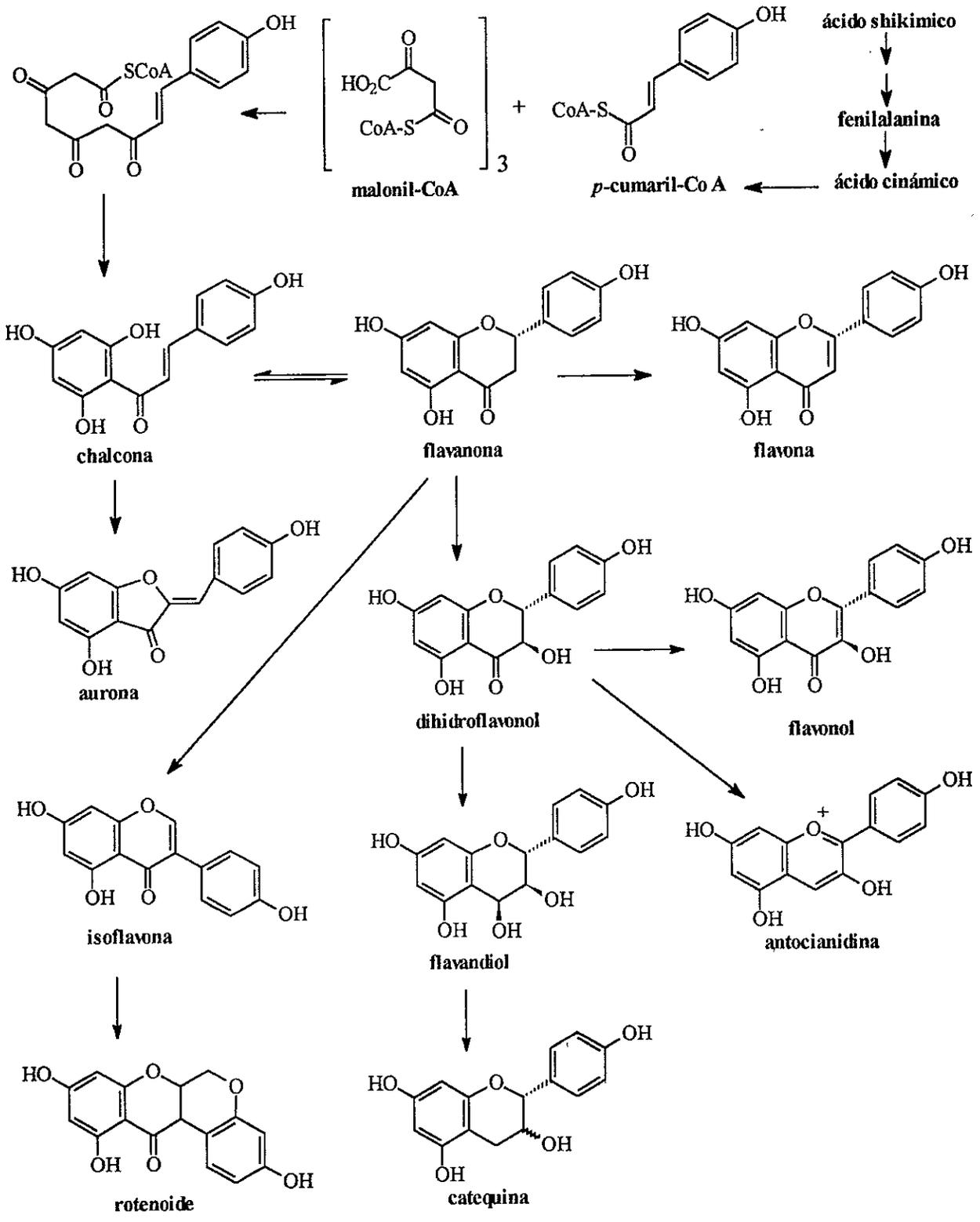
48. Pettipher, E.R., Higgs, G.A. and Salmon, J.A. Eicosanoids (prostaglandins and leukotrienes). En: *Biochemistry of inflammation*, ed. Wicher, J.T. and Evans, S.W., Kluwer Academic Publishers, 1992: 91-107.
49. Martínez-Vázquez, M. Ramírez, T., Lastra, A.L. and Bye, R. A comparative study of analgesic and antiinflammatory activities of pectolinarin isolated from *Cirsium subcoriaceum* and linarin isolated from *Buddelia cordata*. *Journal Natural Products* 1998; **64**: 134- 137.
50. Braide, V.B. Antiinflammatory effect of kolaviron, a biflavonoid extract of *Garcinia kola*. *Fitoterapia* 1993; **LXIV**: 433-436.
51. Chen, Y-L.; Wang, Y-S., Lin, Y-L., Munakata, K. and Ohta, K. Obovatin, obovatin methyl ether and obovatachalcona, new piscicidal flavonoids from *Tephrosia obovata*, *Agric. Biol. Chem.* 1978; **42**: 2431-2432.
52. Delle Monache, F., Labiento, L., Marta, M. and Lwande, W. 4 $\beta$  -substituted flavans from *Tephrosia hildebrandtii*. *Phytochemistry* 1986; **25**: 1711-1713.
53. Jayaraman, I., Ghanim, A. and Khan, H. A., A new prenylated flavanona from *Tephrosia villosa*. *Phytochemistry* 1980; **19**: 1267-1268.
54. Venkata Rao, E., and Rejandra Prasad, Y. Prenylated flavonoids from *Tephrosia spinosa*. *Phytochemistry* 1993; **32**: 183-185.
55. Kattaev, N. Sh. And Nikonov, G. K. *Khim. Prir. Soedin.* 1972; **8**: 805.
56. Mitscher, L. A., Rao, G. S R., Khanna, I., Veysoglu, T. and Drake, S. Antimicrobial agents from higher plants: prenylated flavonoids and other phenols from *Glycyrrhiza lepidota*. *Phytochemistry* 1983; **22**: 573-576.

57. Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1962; **111**: 544-547.
58. Tallarida, R.J., Murray, R.B. *Manual of pharmacologic calculations*. Springer-Verlag, New York, 1981.
59. Markham, K. R. *Techniques of flavonoids Identification*, Academic Press, London, 1982: 36-49, 72-93.
60. Markham, K.R., Mabry, T.J. Ultraviolet-visible and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonoids. En: *The flavonoids*, ed. Harbone, J. B., Mabry, T. J. and Mabry, H. Chapman and Hall, London, 1975: 45-77.
61. Markham, K. R. and Geiger. <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide. En: *Flavonoids*, ed. Harbone, J. B. Chapman & Hall, London, 1994: 441-499.
62. Mabry, T. J. and Markham, K. R. Mass spectrometry of flavonoids. En: *Flavonoids*, ed. Harbone, J. B., Chapman & Hall, London, 1975: 79-115.
63. Fu, P. P. and Harvey, R.G. Dehydrogenation of polycyclic hydroaromatic compounds, *Chemical Reviews* 1978; **78**: 317-361.
64. Paquette, L.A. *Encyclopedia of reagents for organic synthesis*, John Wiley and Sons, New York, 1995: 1679-1704.
65. Matsuura, S., Iinuma, M., Ishikawa, K., Kagei, K. Synthetic studies of flavone derivatives (V). The use of DDQ in the dehydrogenation of flavanones (I), *Chem. Pharm. Bull* 1978: **26**: 305-307.

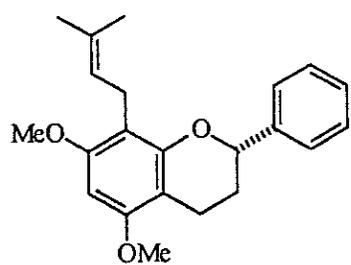
66. Buckle, D.R. and Pinto I.L. Oxidation adjacent to C=X bonds by dehydrogenation. En *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 7, eds. Trost, B.M. and Fleming, I., Oxford, 1991: 135-149.
67. Walker, D. and Heibert, J.D. 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone and its reactions, *Chemical Reviews* (1967; 67: 153-195.
68. Esato, A.E. and Kiefer, E.F., Dehydrogenation of a simple aliphatic alkene by 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone, *Chemical Communications* 1968: 1684-1685.
69. Carey, F.A. and Sundberg R.J. *Advanced Organic Chemistry*, 3th ed. Plenum Press, New York, 1993, parte A: 625-640, parteB: 283-300.
70. Cardillo, G., Cricchio, R., Merlini, L. Synthesis of D,L- cannabichromene, franklinone and other natural cromenes, *Tetrahedron* 1968; 24: 4825-4831.
71. Cardillo, G., Orena, M., Porzi, G. and Sandri, S. Simple methods of oxidation of *o*-allylphenols to chrom-3-enes, *Chemical comunicatios*, 1979: 836-837.
72. Cardillo, G., Cricchio, R., Merlini, L. Reaction of ortho alkenyl and alkylphenols with 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone (DDQ), *Tetrahedron* 1971; 27: 1875-1883.
73. Bucar, F., Jackak, S.M., Noreen, Y., Kartnig, T., Perera, P., Bohlin, L. and Schuber-Zsilavec, M. Amentoflavona from *Biophytum sensitivum* and its effect on COX-1/COX-2 catalysed prostaglandin biosynthesis. *Planta medica* 1998; 64: 373-374.

# ANEXO A

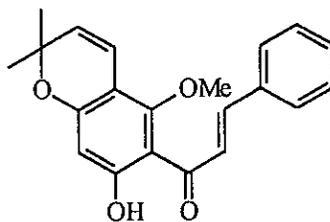
**BIOSINTESIS DE FLAVONOIDES**



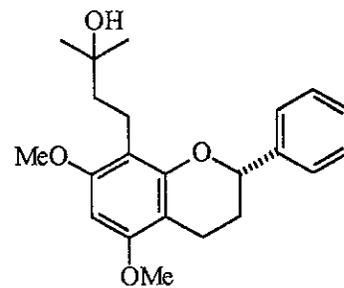
**FLAVONOIDES AISLADOS POR PRIMERA VEZ DE TEPHROSIAS MEXICANAS**



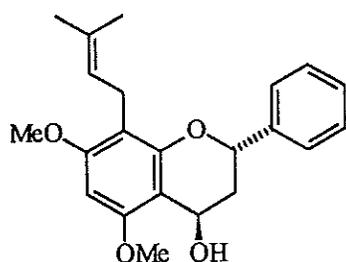
**5,7-dimetoxi-8-prenilflavano**



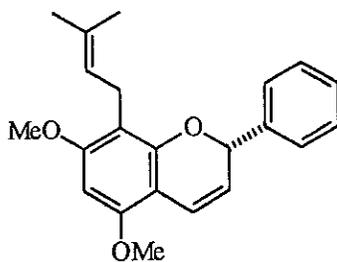
**oaxacacina**



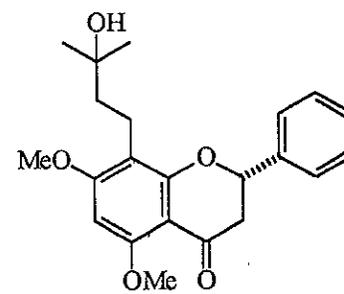
**ninetina**



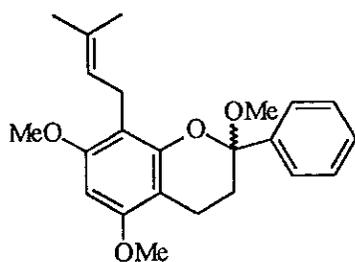
**tephrowatsina A**



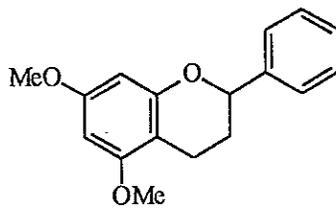
**tephrowatsina B**



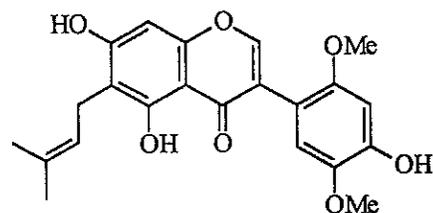
**tephrowatsina C**



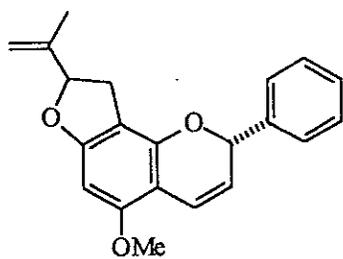
**tephrowatsina D**



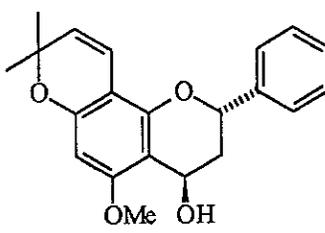
**tephrowatsina E**



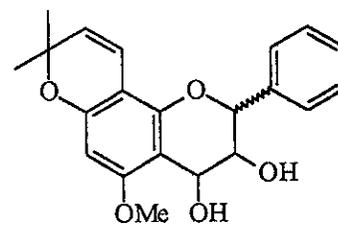
**viridiflorina**



**abbottina**

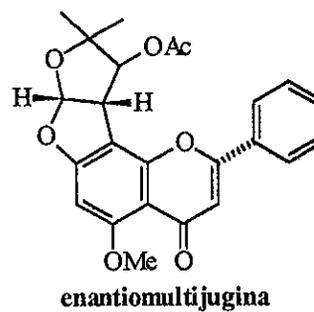
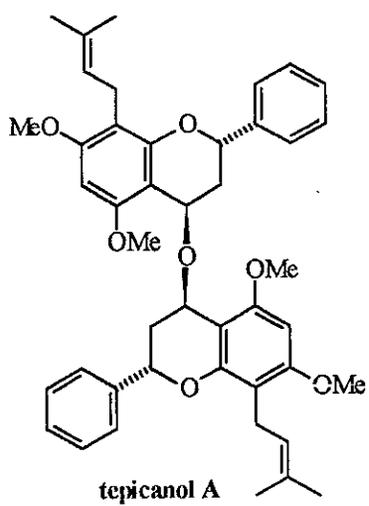
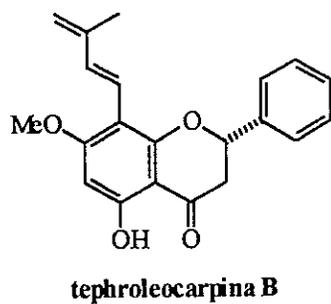
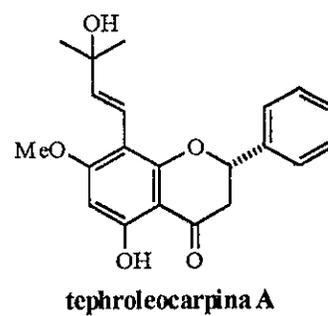
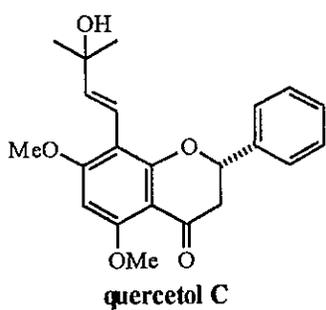
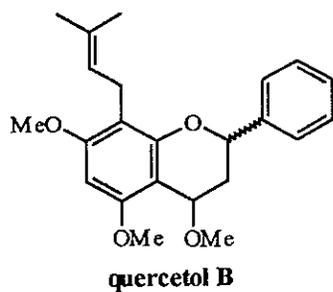


**tephrobbottina**

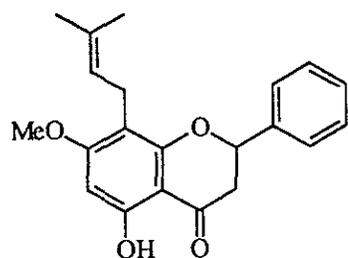


**quercetol A**

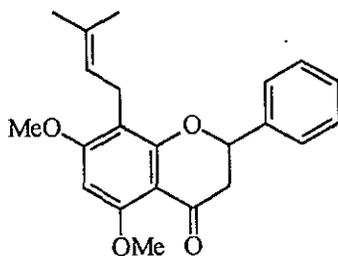
CONTINUACION



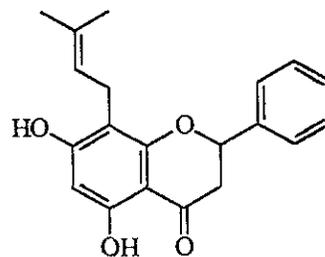
**FLAVONOIDES CONOCIDOS AISLADOS DE TEPHROSIAS MEXICANAS**



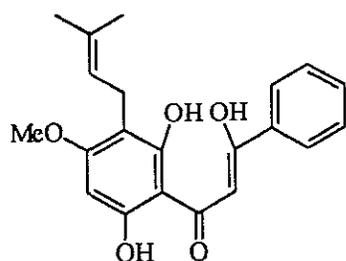
**7-O-metil-glabranina**



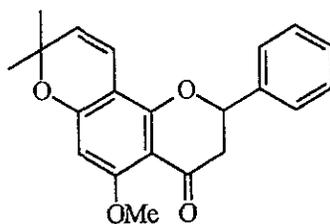
**5,7-dimetil-glabranina**



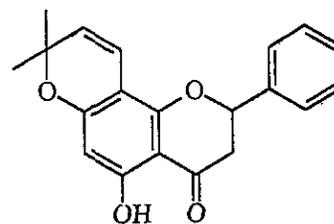
**glabranina**



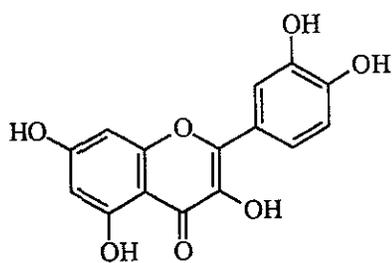
**tephromajorchalcona**



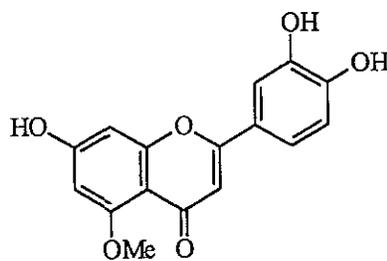
**5-O-metil-obovatina**



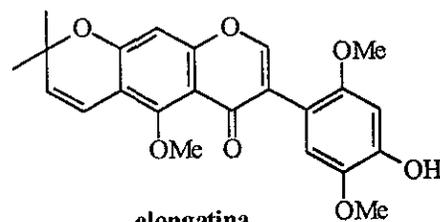
**obovatina**



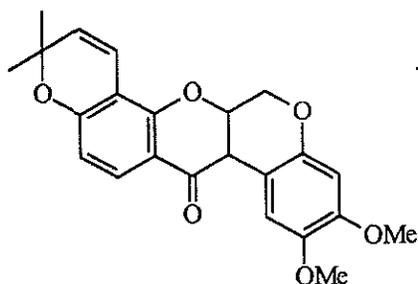
**quercetina**



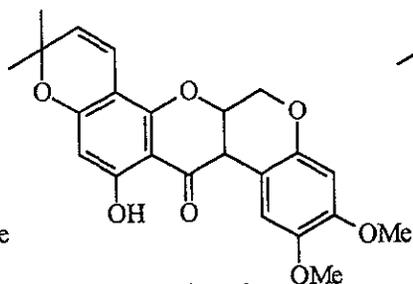
**5-O-metil-quercetina**



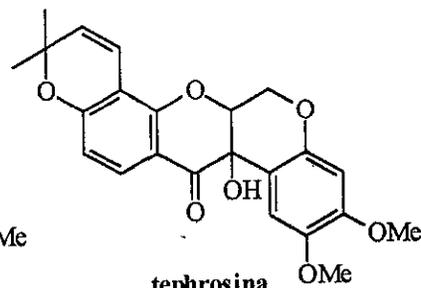
**elongatina**



**deguelina**



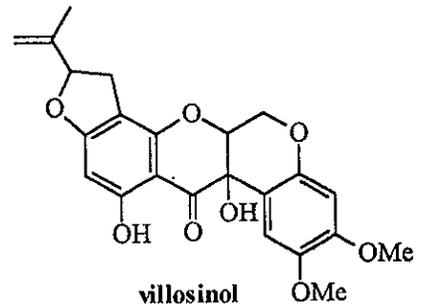
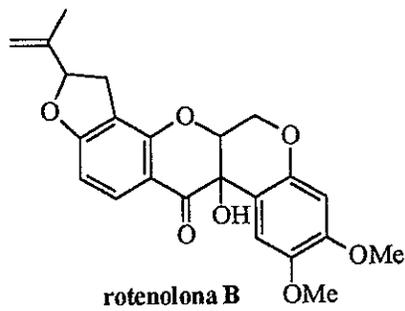
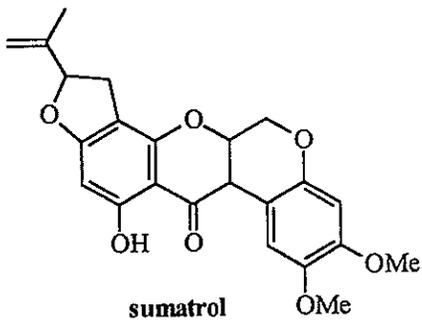
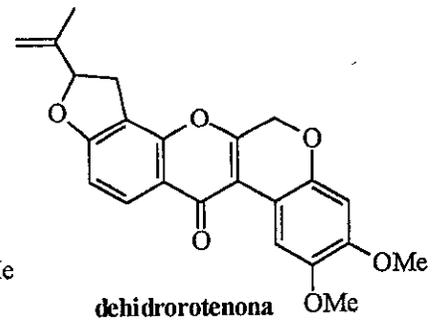
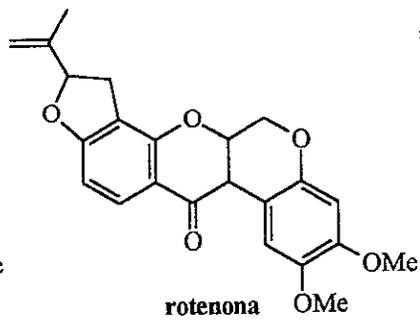
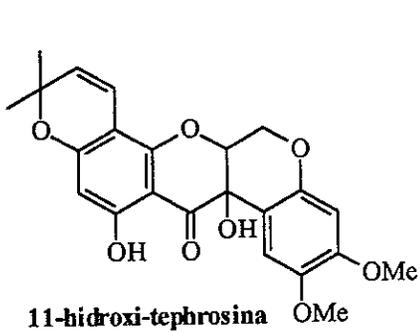
**α-toxicarol**



**tephrosina**

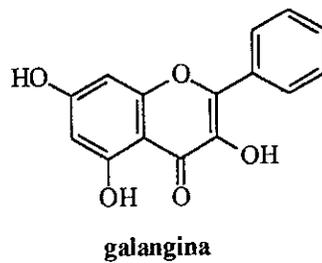
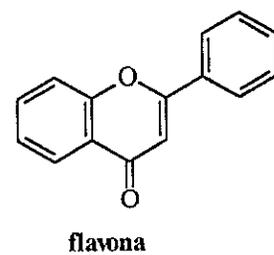
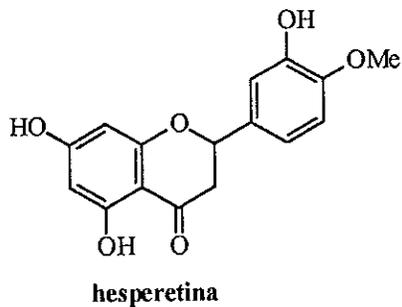
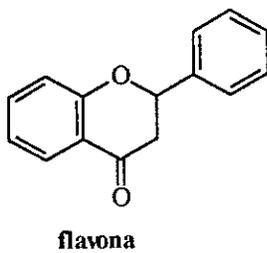
**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

## CONTINUACION

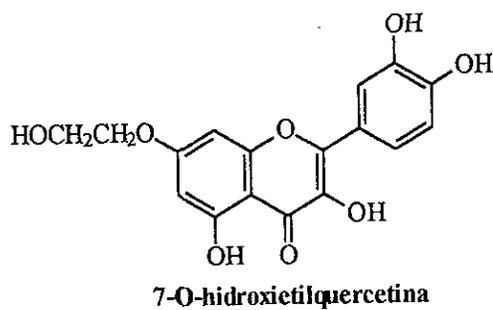
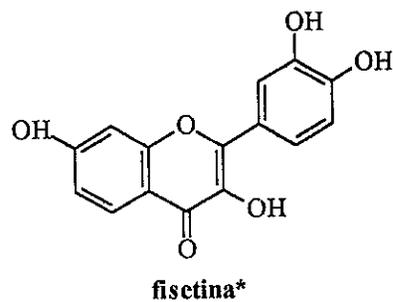
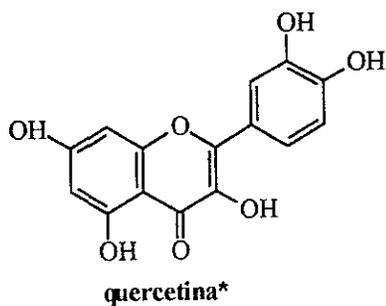
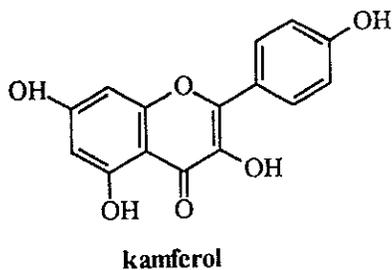
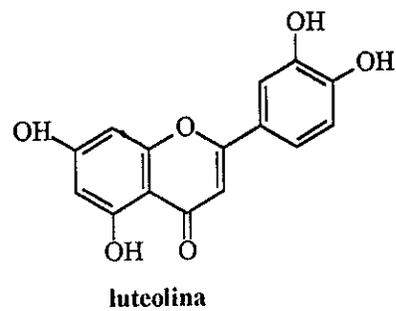
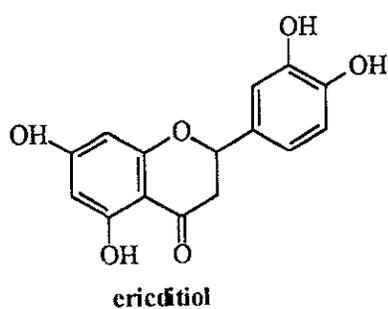


## FLAVONOIDES ANTIINFLAMATORIOS

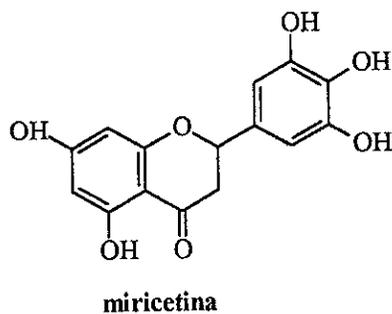
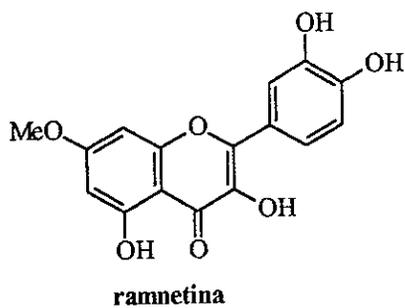
### ◆ INHIBIDORES DE CICLOXIGENASA



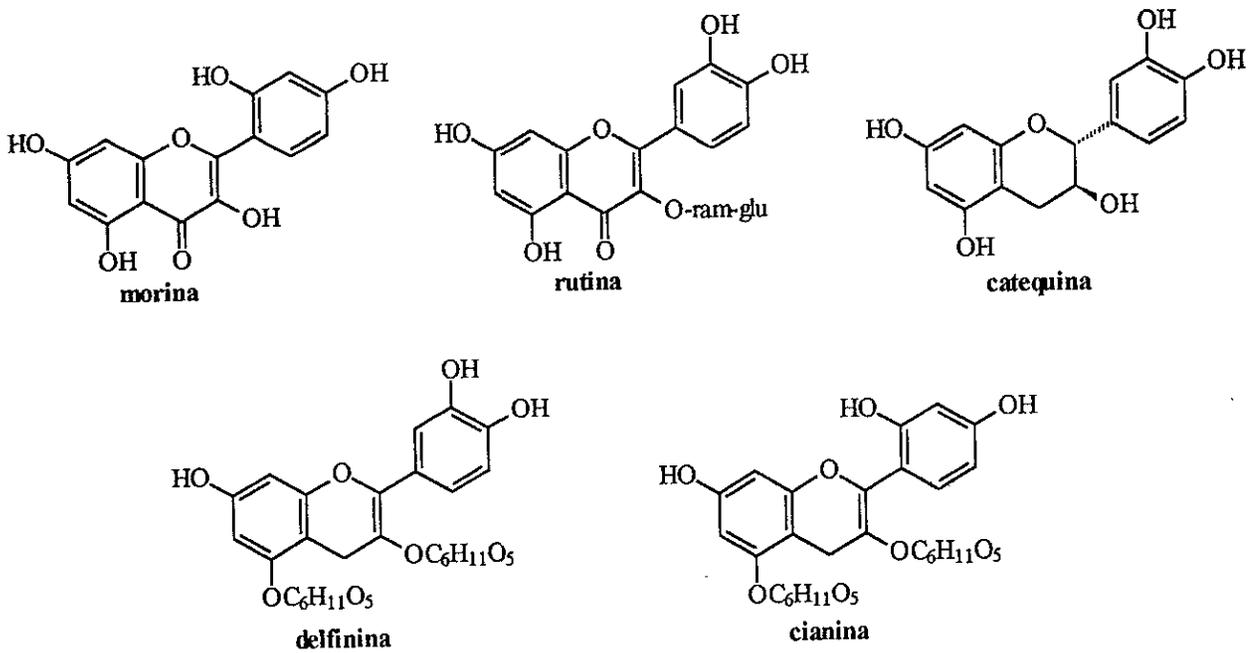
◆ INHIBIDORES DE LIPOXIGENASA



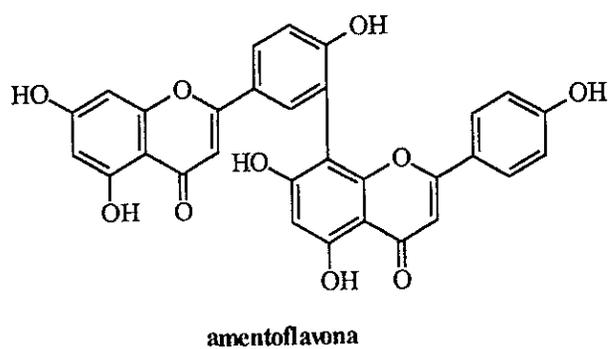
◆ INHIBIDORES DE CICLOOXIGENASA\* Y LIPOXIGENASA



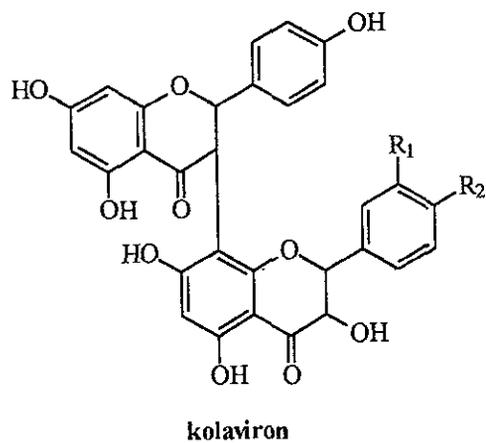
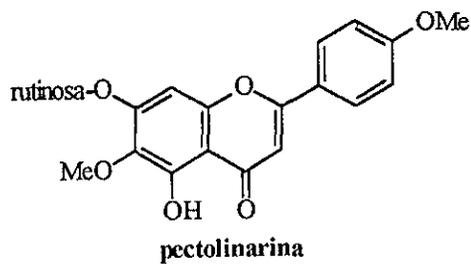
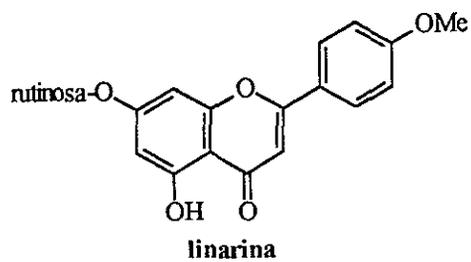
◆ **CAPTADORES DE RADICALES LIBRES**



◆ **INHIBIDOR DE FOSFODIESTERASA**

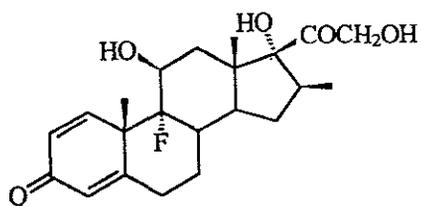


## FLAVONOIDES INHIBIDORES DEL EDEMA INDUCIDO POR CARRAGENINA

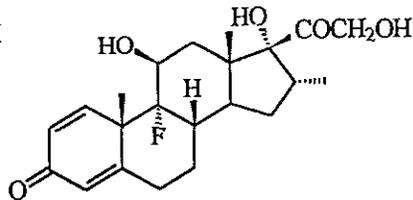


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>GB1</b>	OH	H
<b>GB2</b>	OH	OH
<b>kolafavanona</b>	OMe	OH

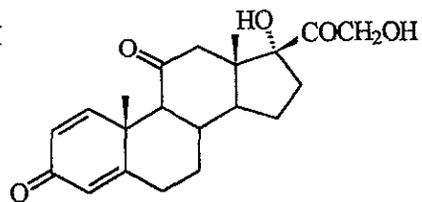
## ESTRUCTURAS QUIMICAS DE ALGUNOS ANTIINFLAMATORIOS ESTEROIDALES



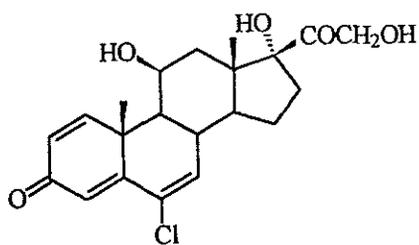
betametasona



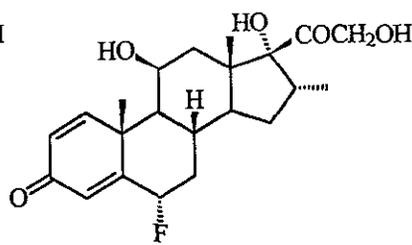
dexametasona



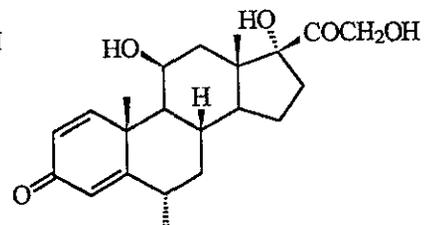
prednisona



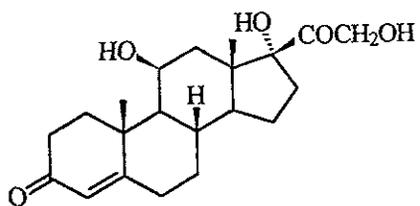
cloprednol



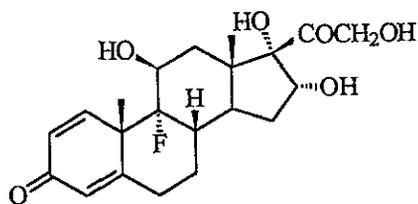
parametasona



metilprednisona

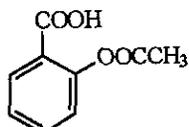


hidrocortisona

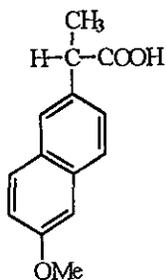


triamcinolona

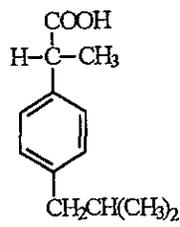
# 1. ESTRUCTURAS DE ALGUNOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES



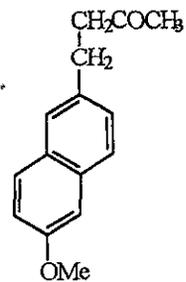
aspirina



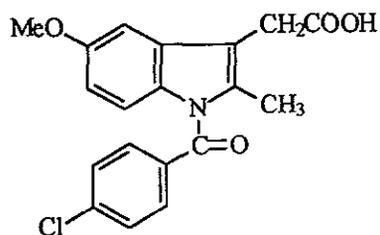
naproxen



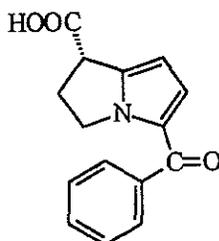
ibuprofeno



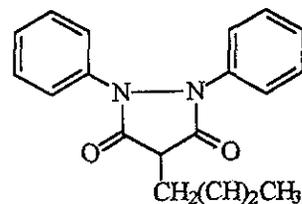
nabumetona



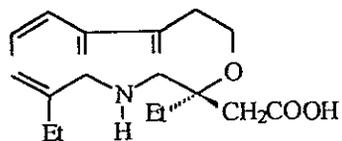
indometacina



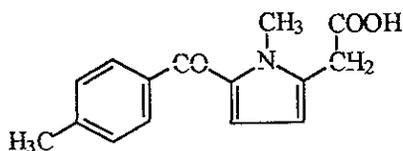
ketorolac



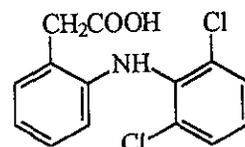
fenilbutazona



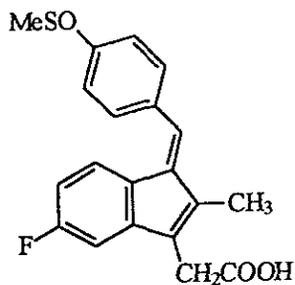
etodolac



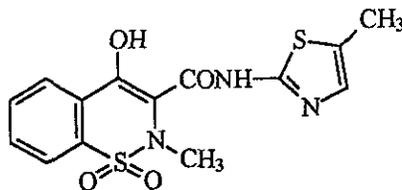
tolmetina



Diclofenaco



sulindac

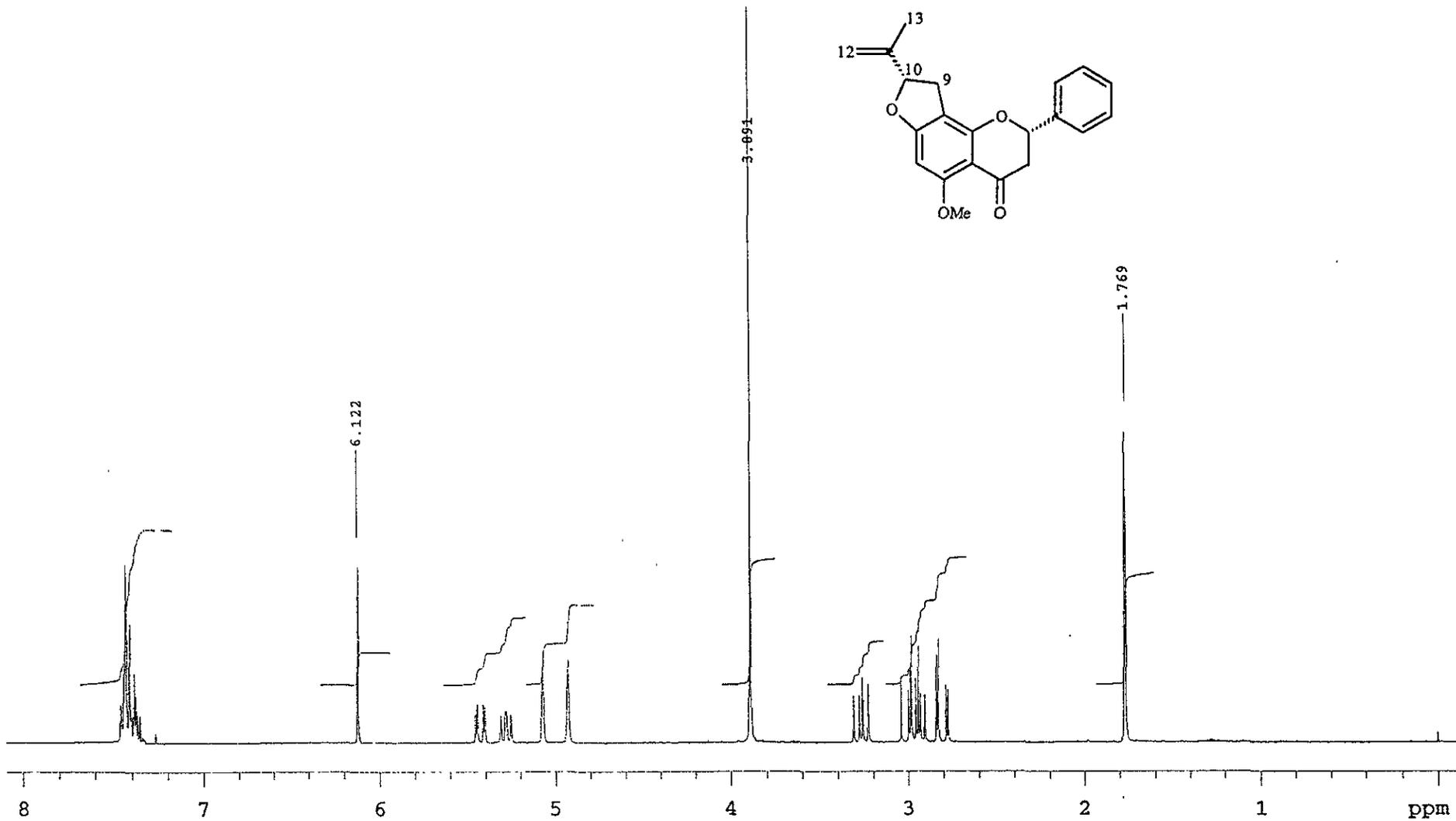


meloxicam

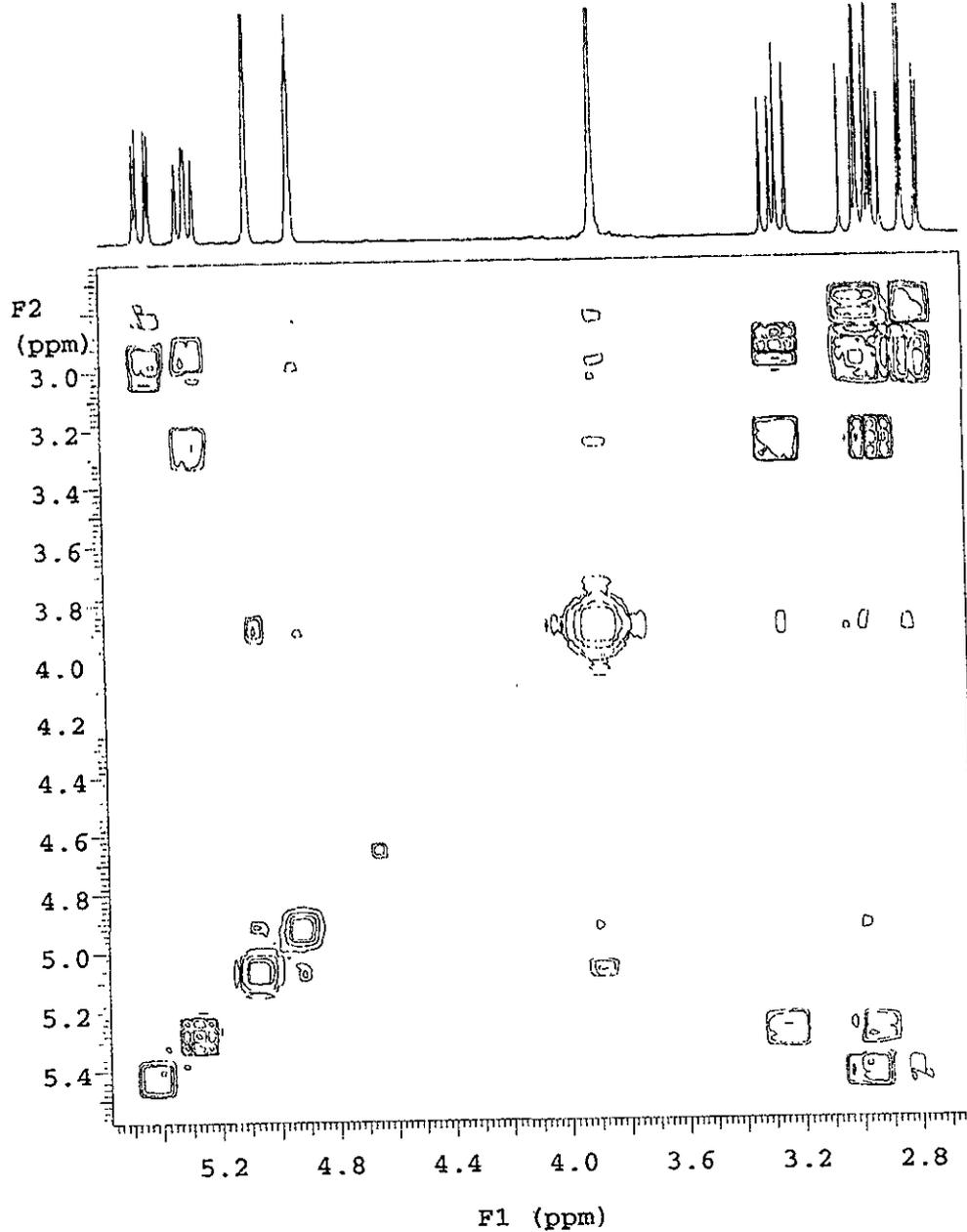
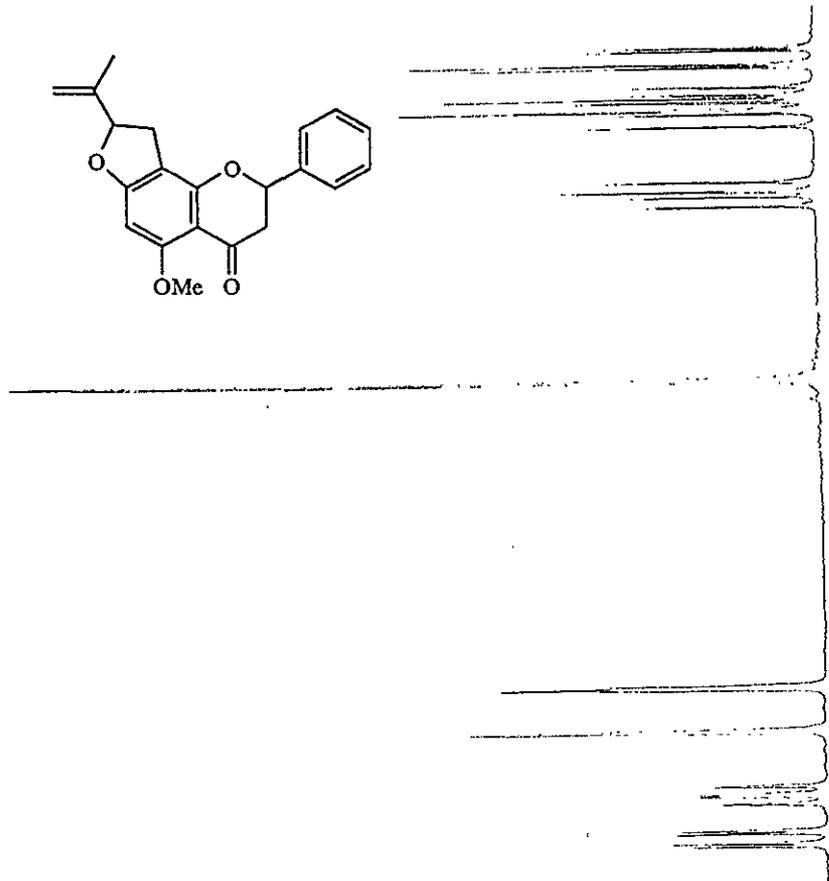
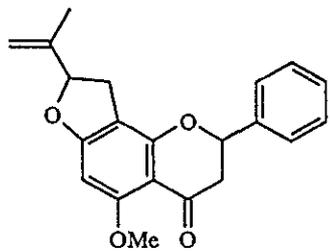


nimesulid

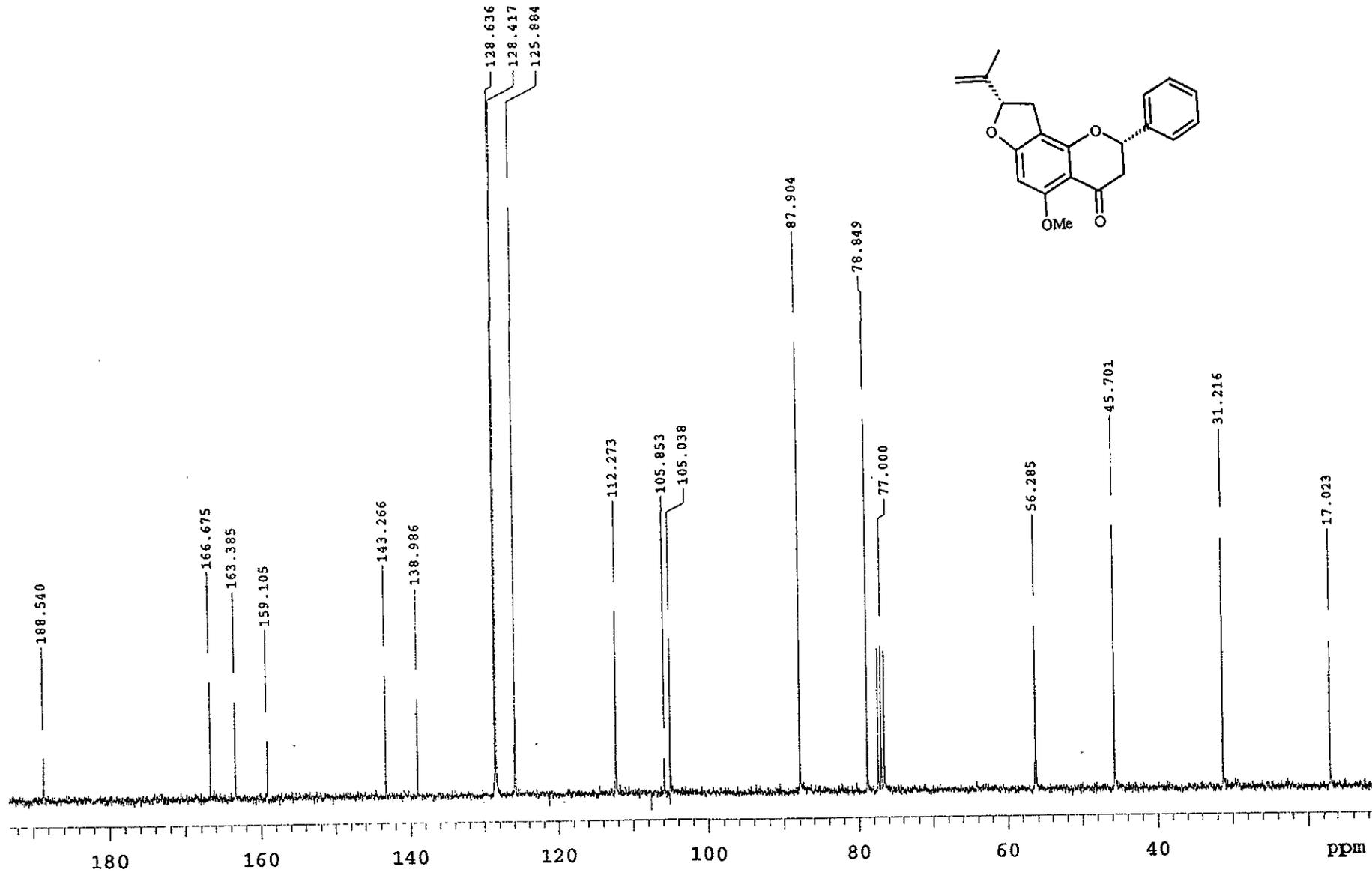
## **ANEXO B**



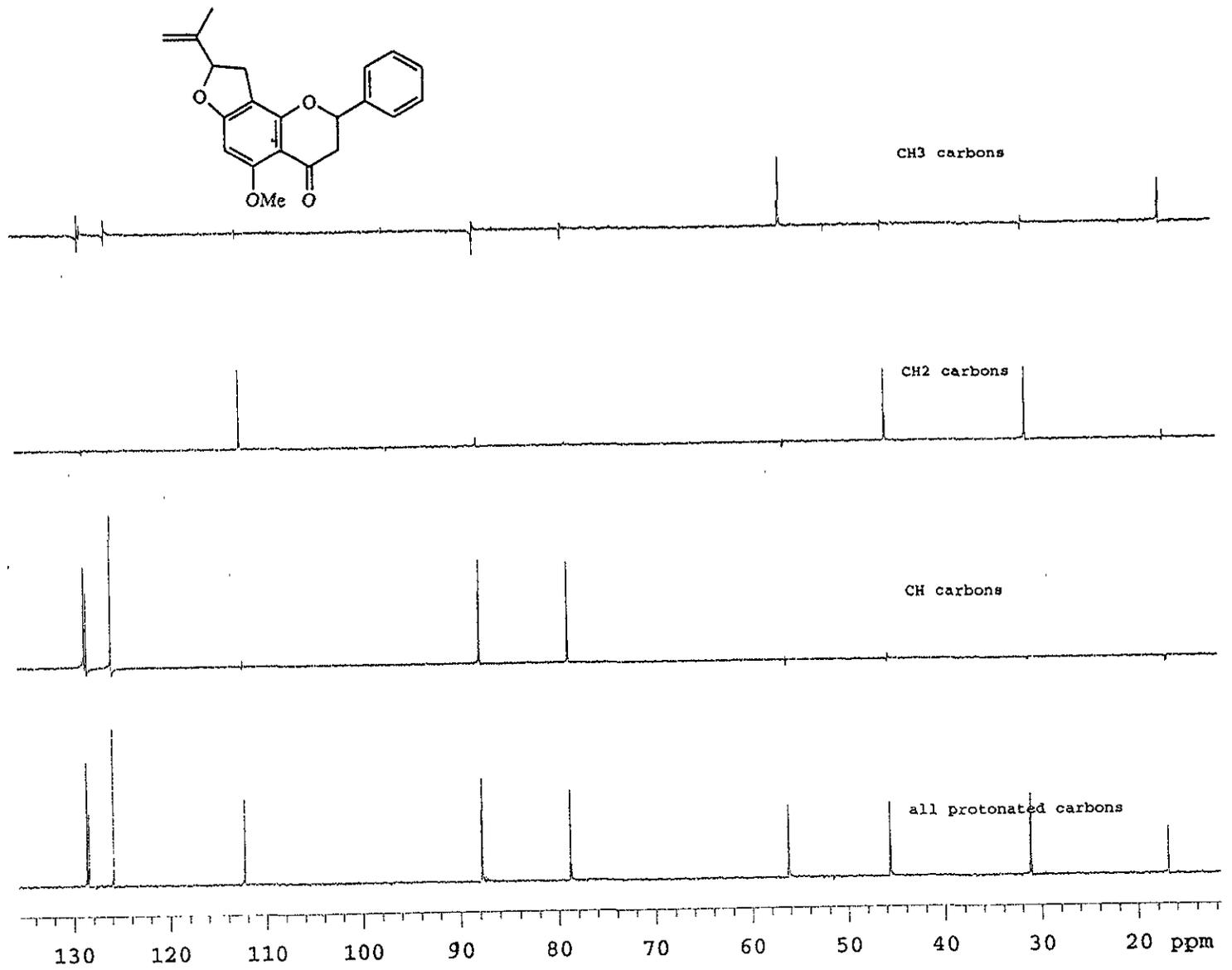
Espectro 1 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de tephromicrocarpanona (1)



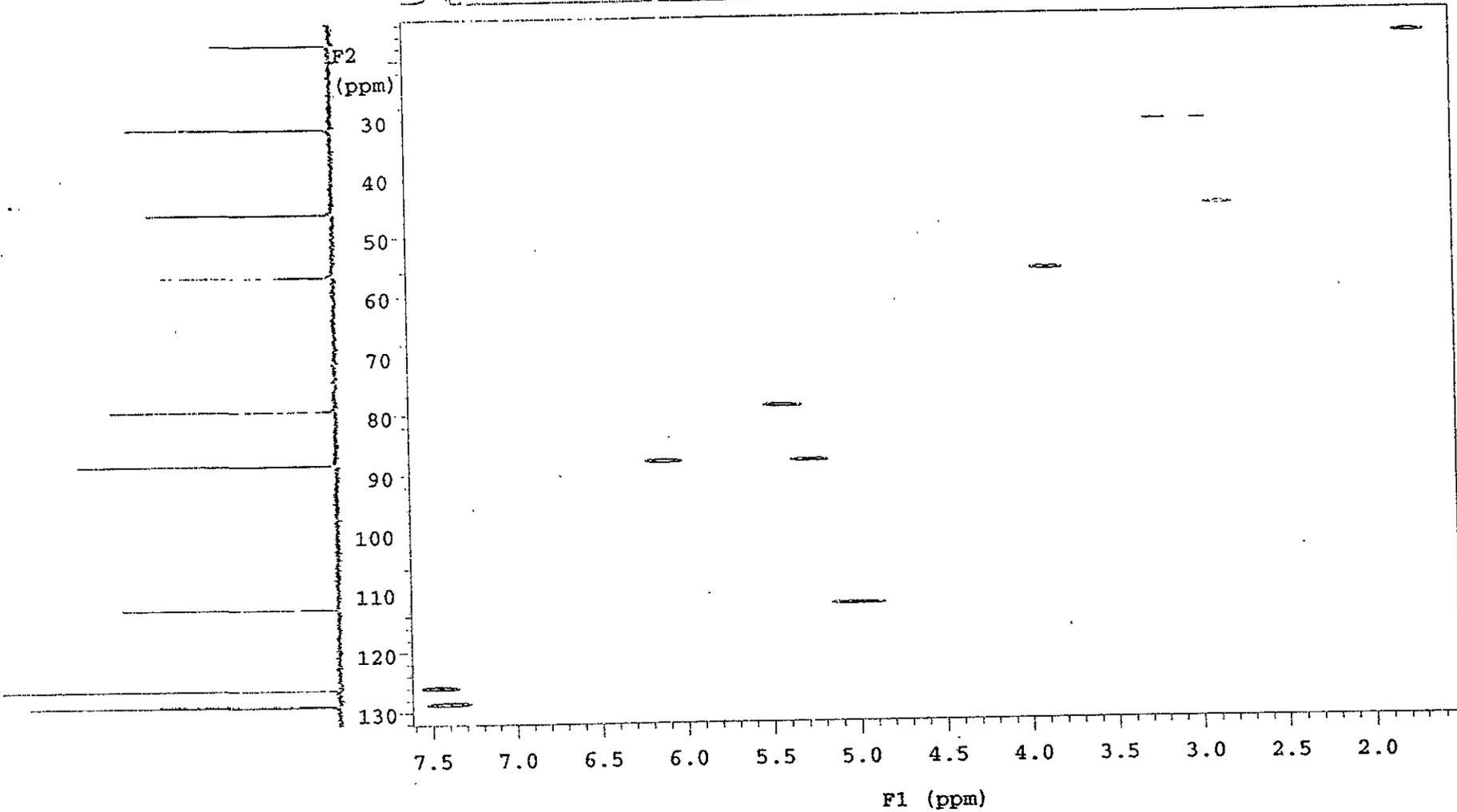
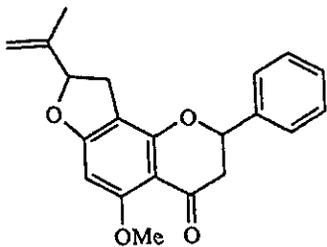
Espectro 2 Espectro COSY de tephromicrocarpanona (1)



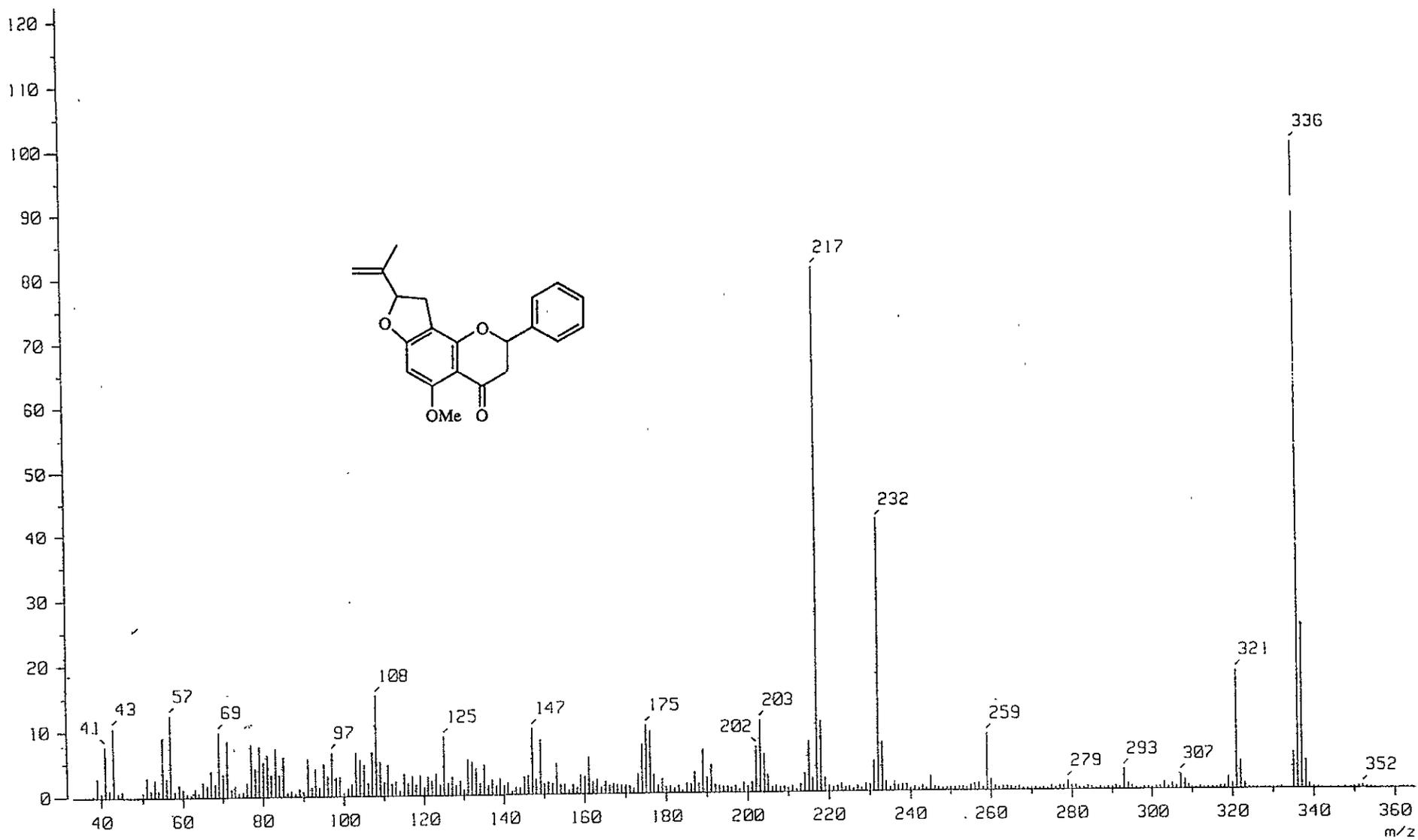
Espectro 3 Espectro de RMN <sup>13</sup>C de tephromicrocarpanona (1)

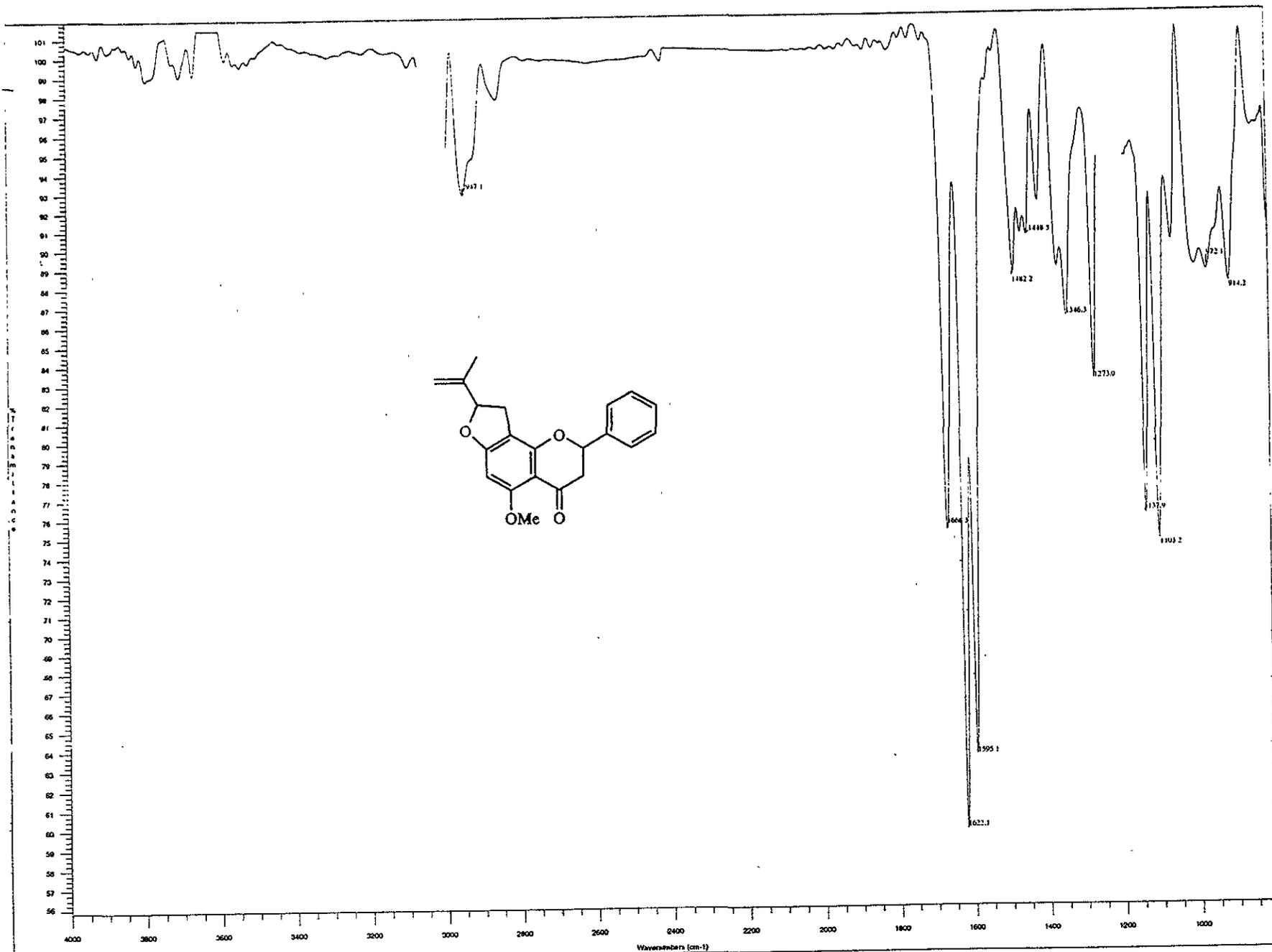


Espectro 4 Espectro DEPT de tephromicrocarpanona (1)

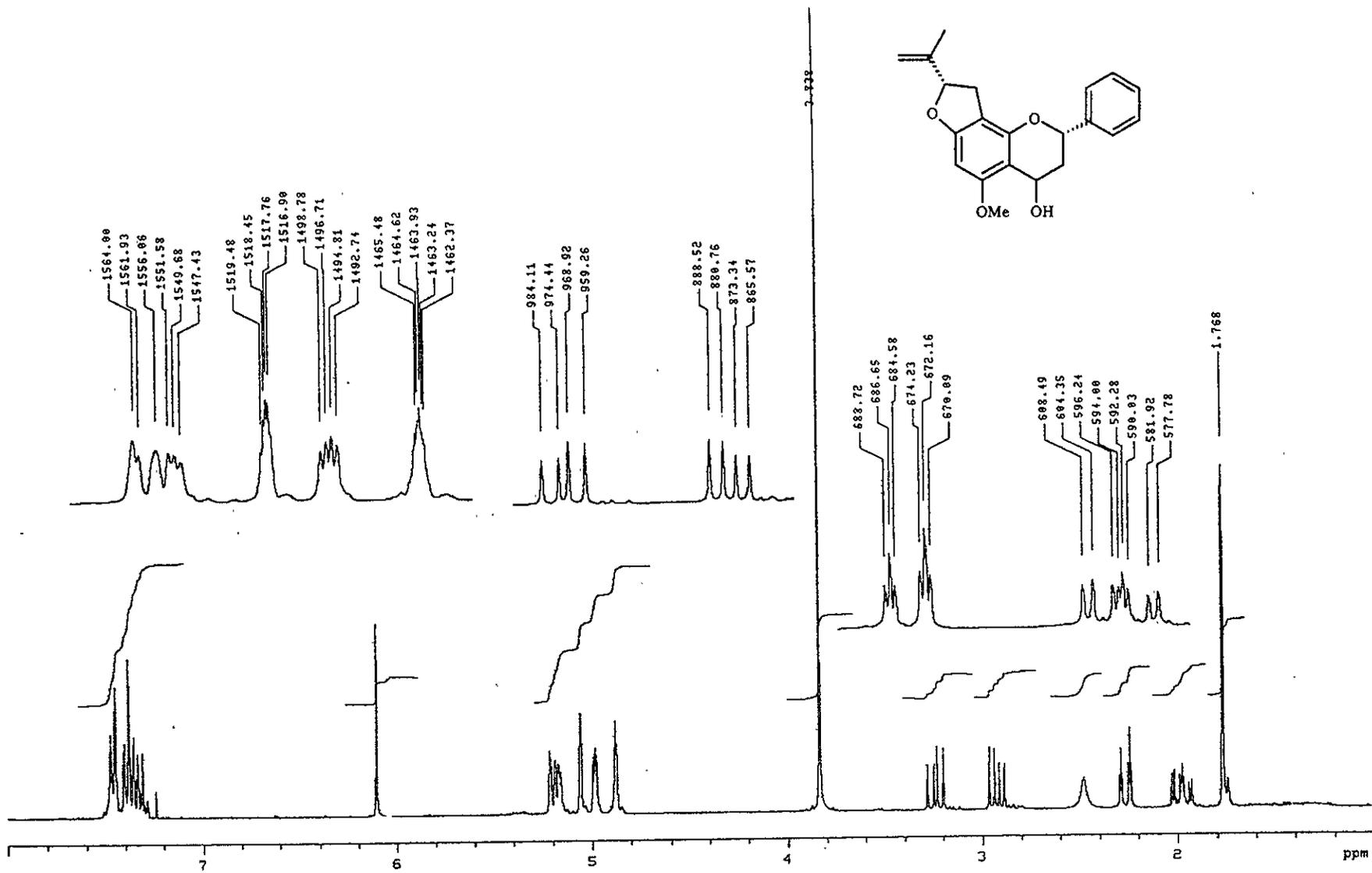


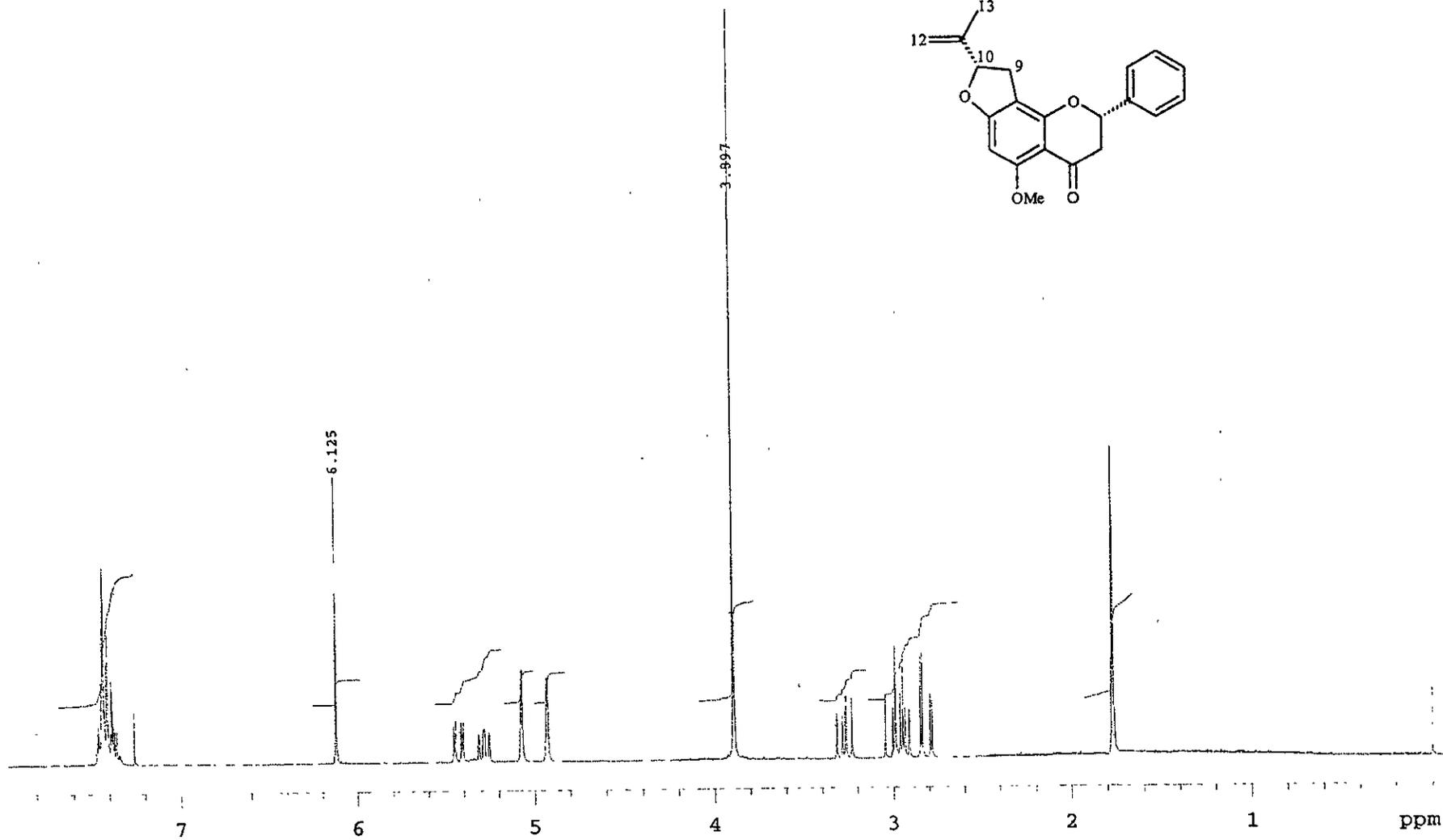
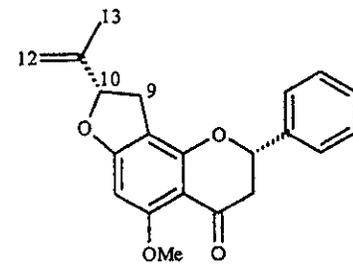
Espectro 5 Espectro HETCOR de tephromicrocarpanona (1)



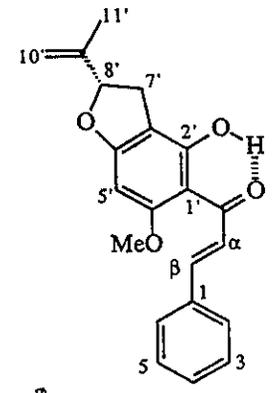
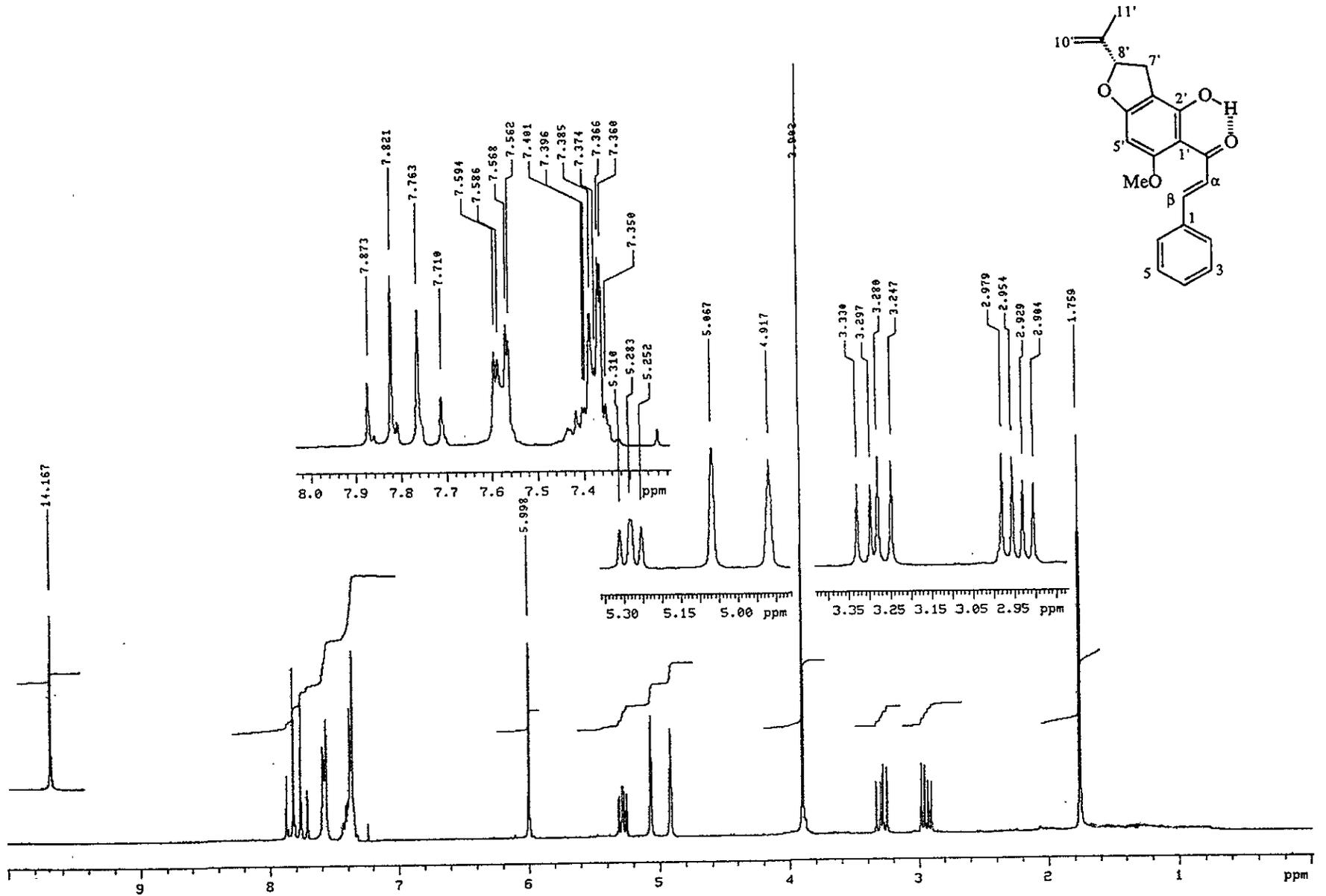


Spectro 7 Espectro de IR de tephromicrocarpanona (1)

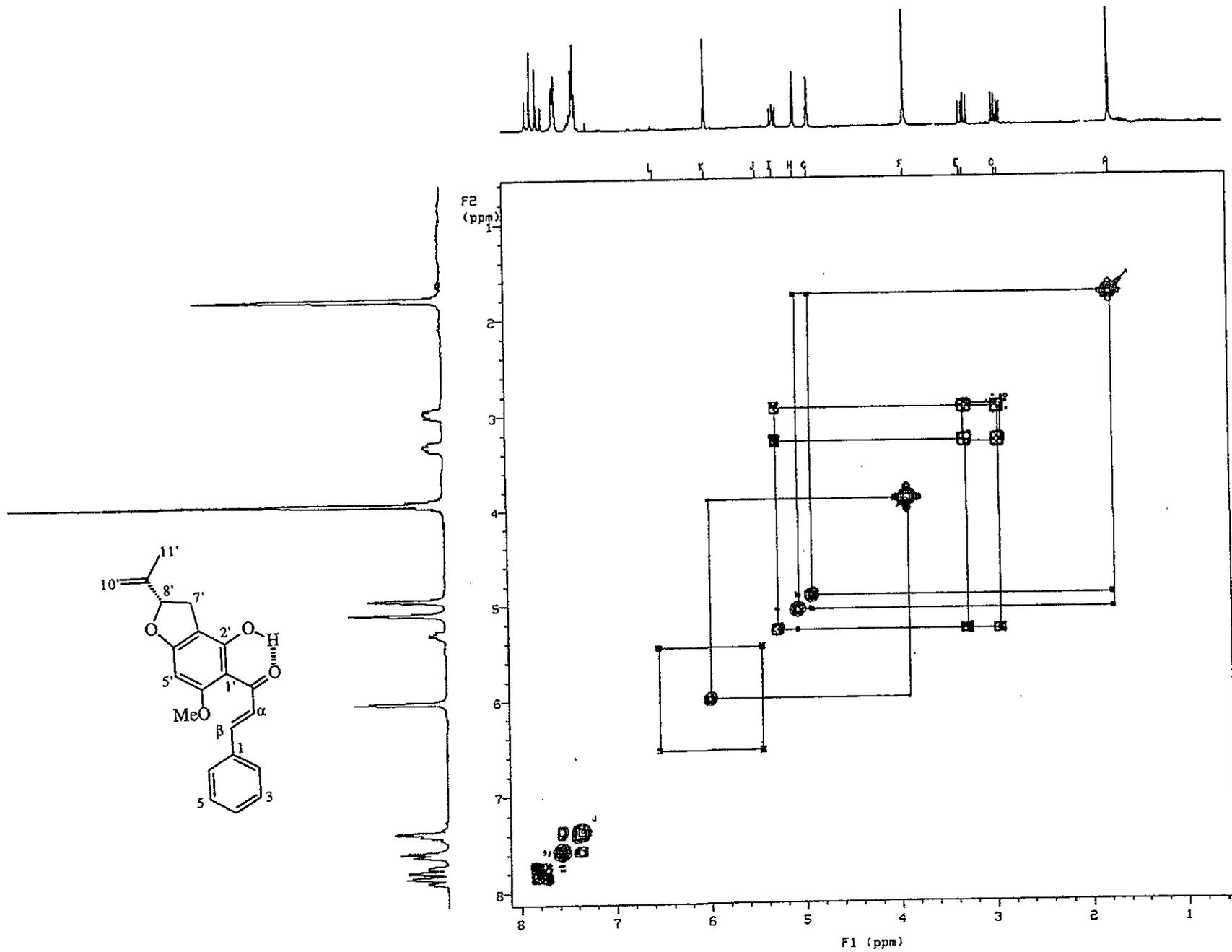




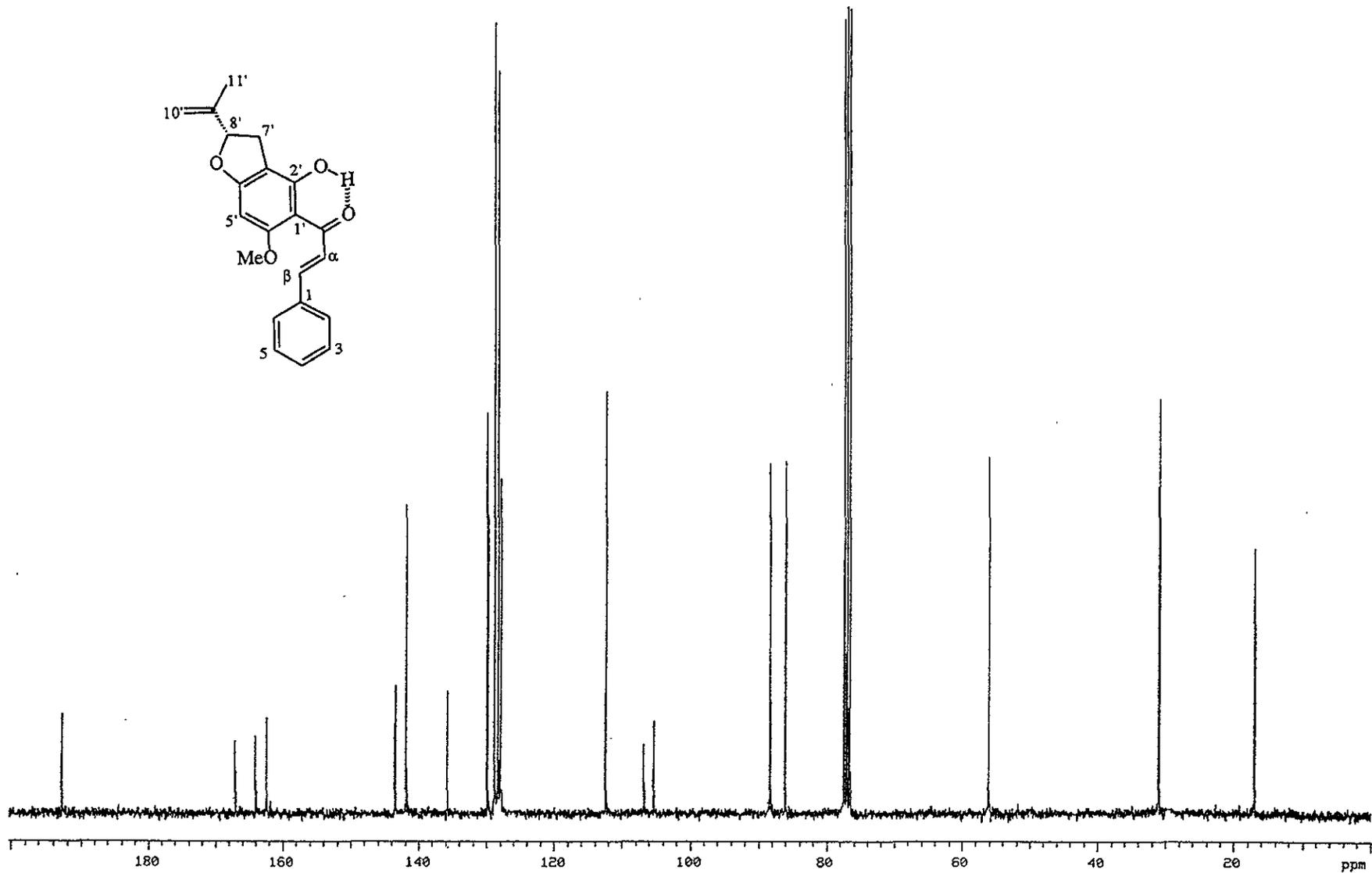
Espectro 9 Espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto (I)

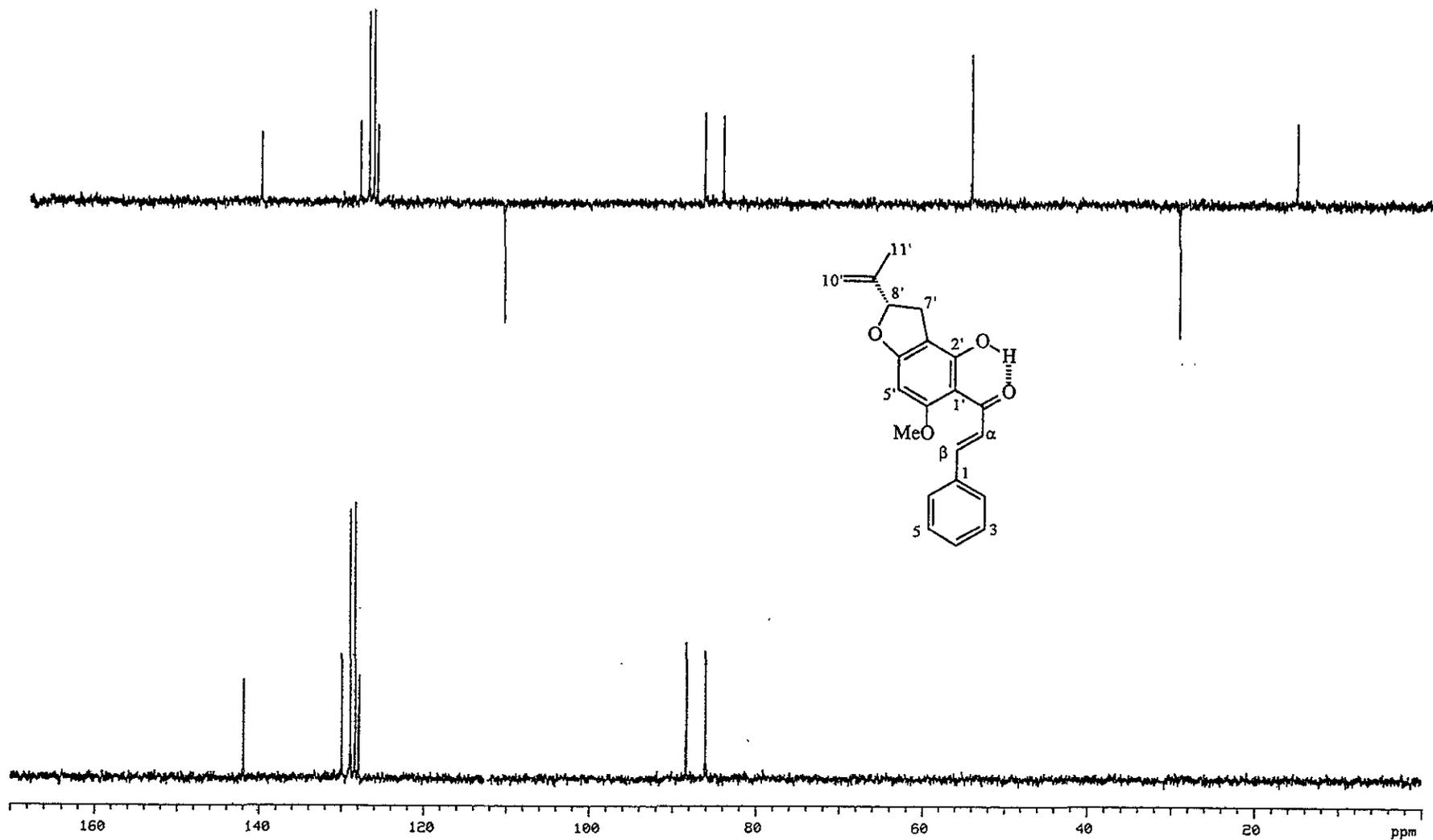


Espectro 10 Espectro de RMN <sup>1</sup>H de crassichalcona (2)

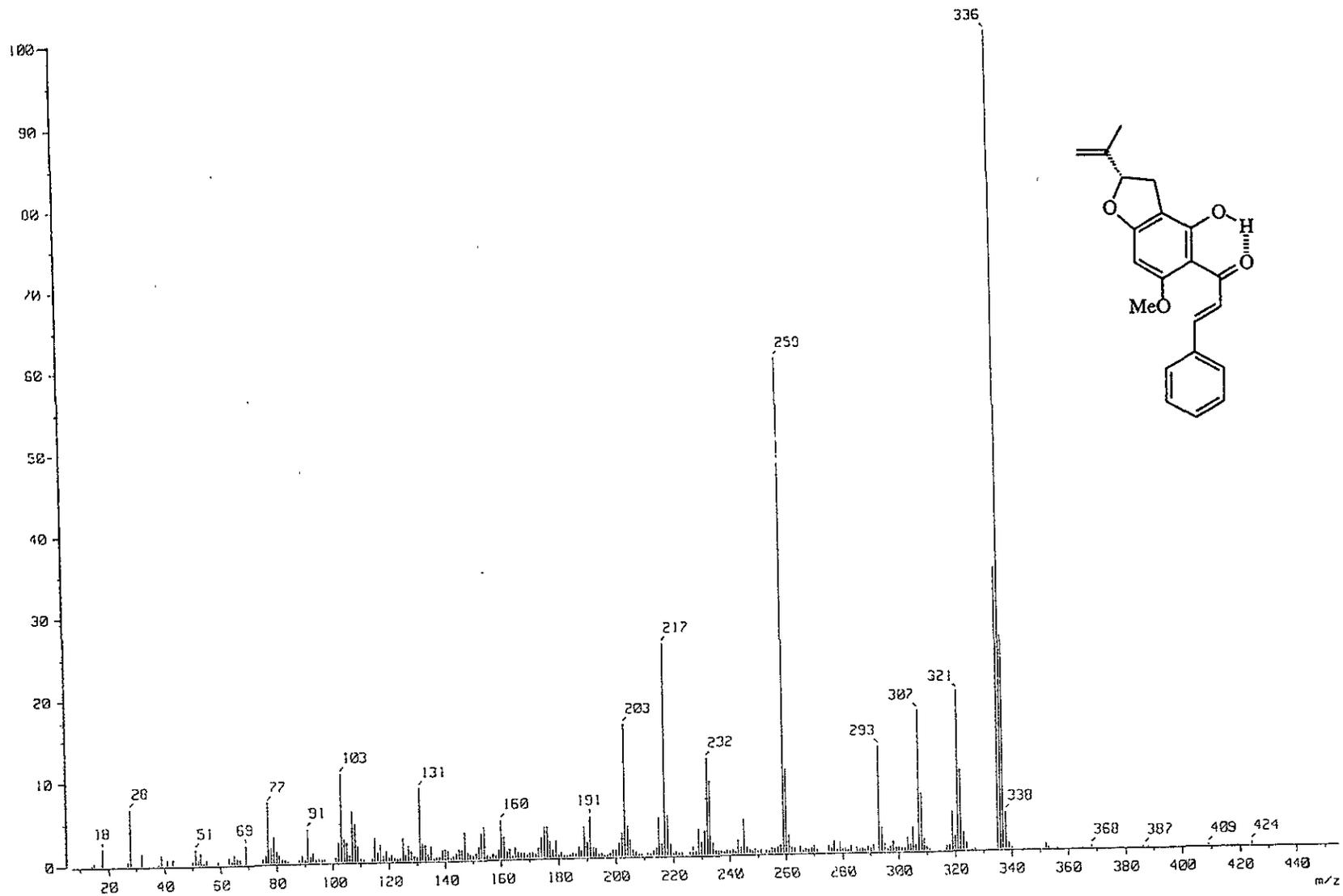


Espectro 11 Espectro COSY de crasichalcona (2)

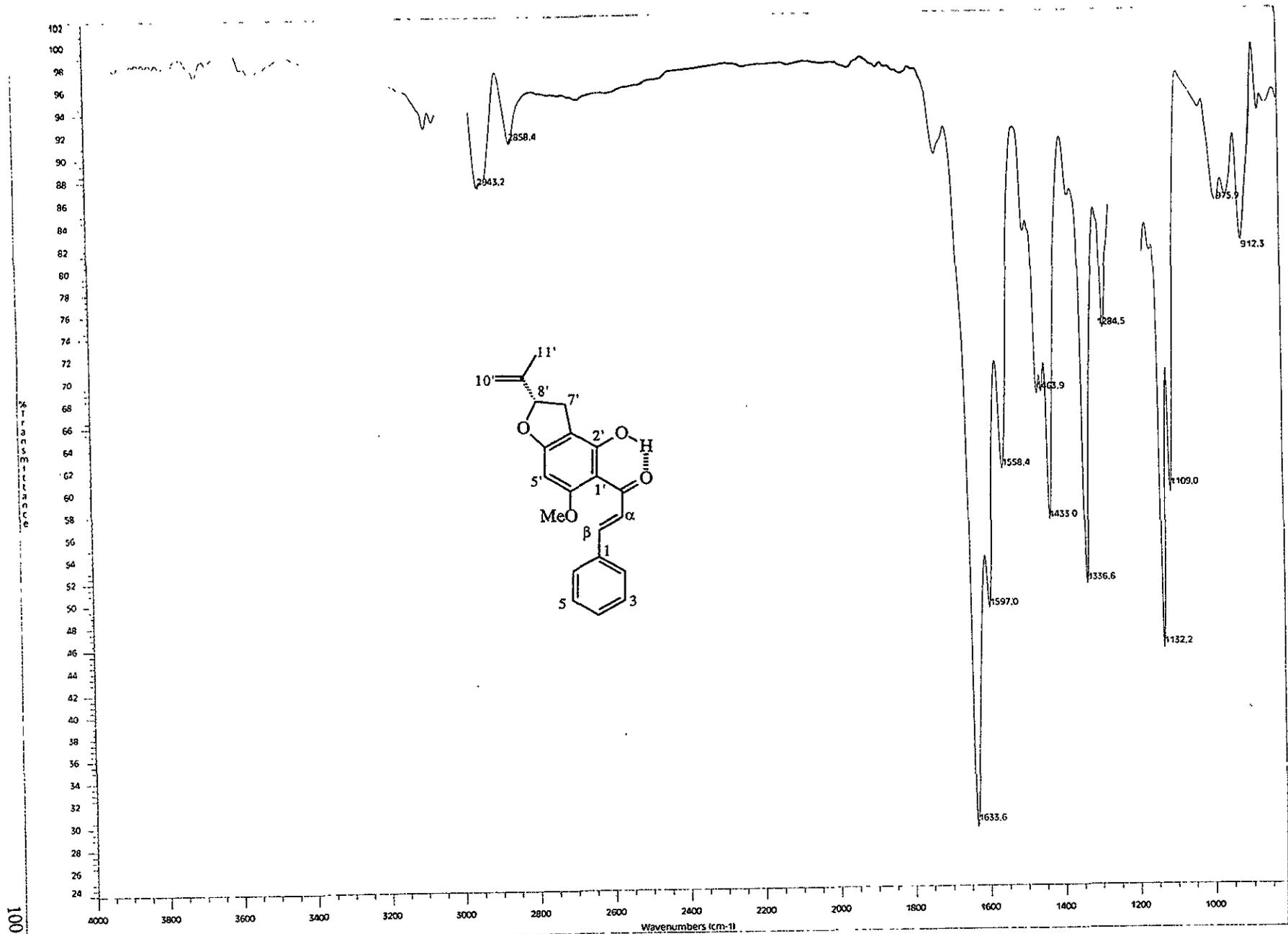




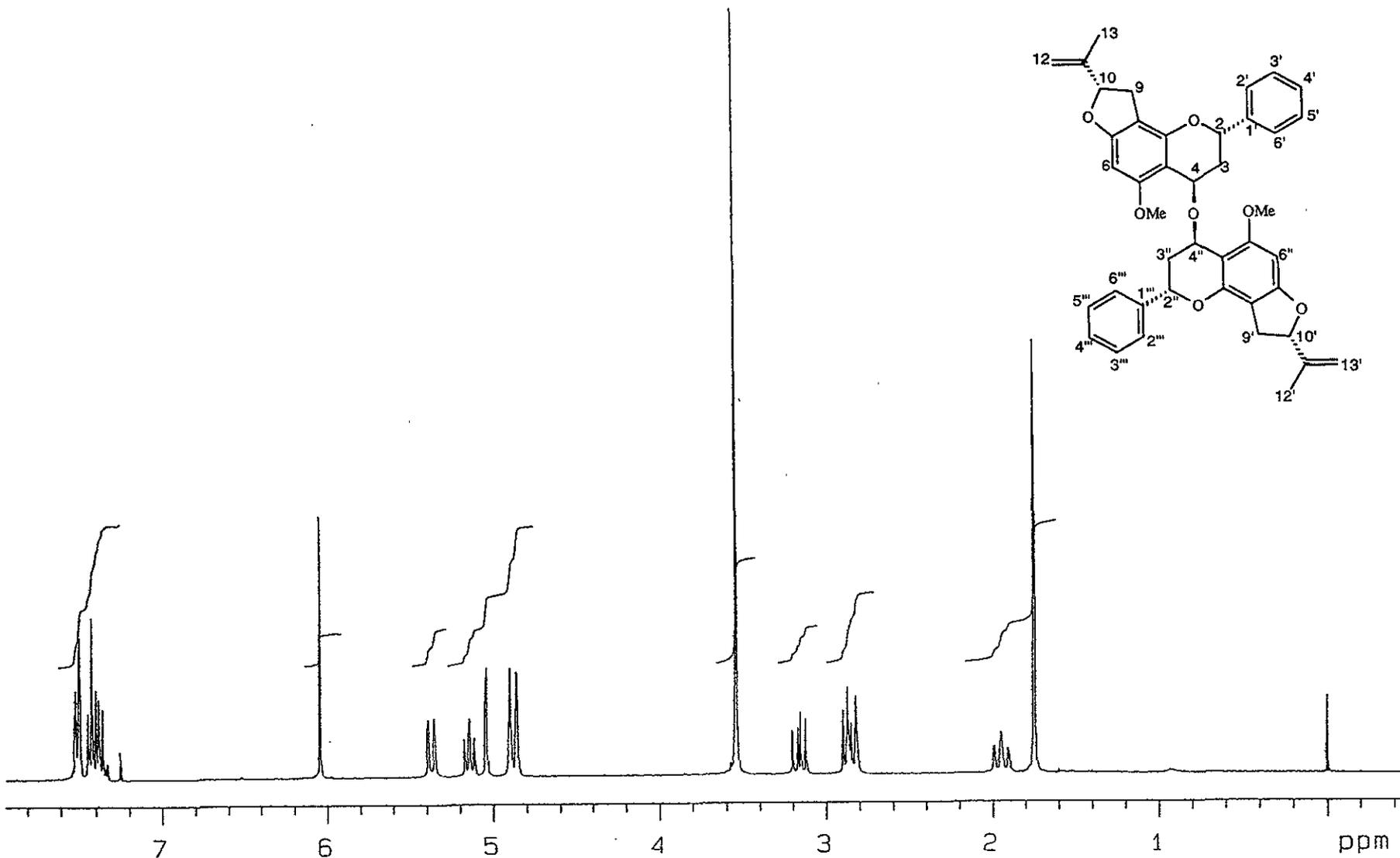
Espectro 13 Espectro DEPT de crassichalcona (2)



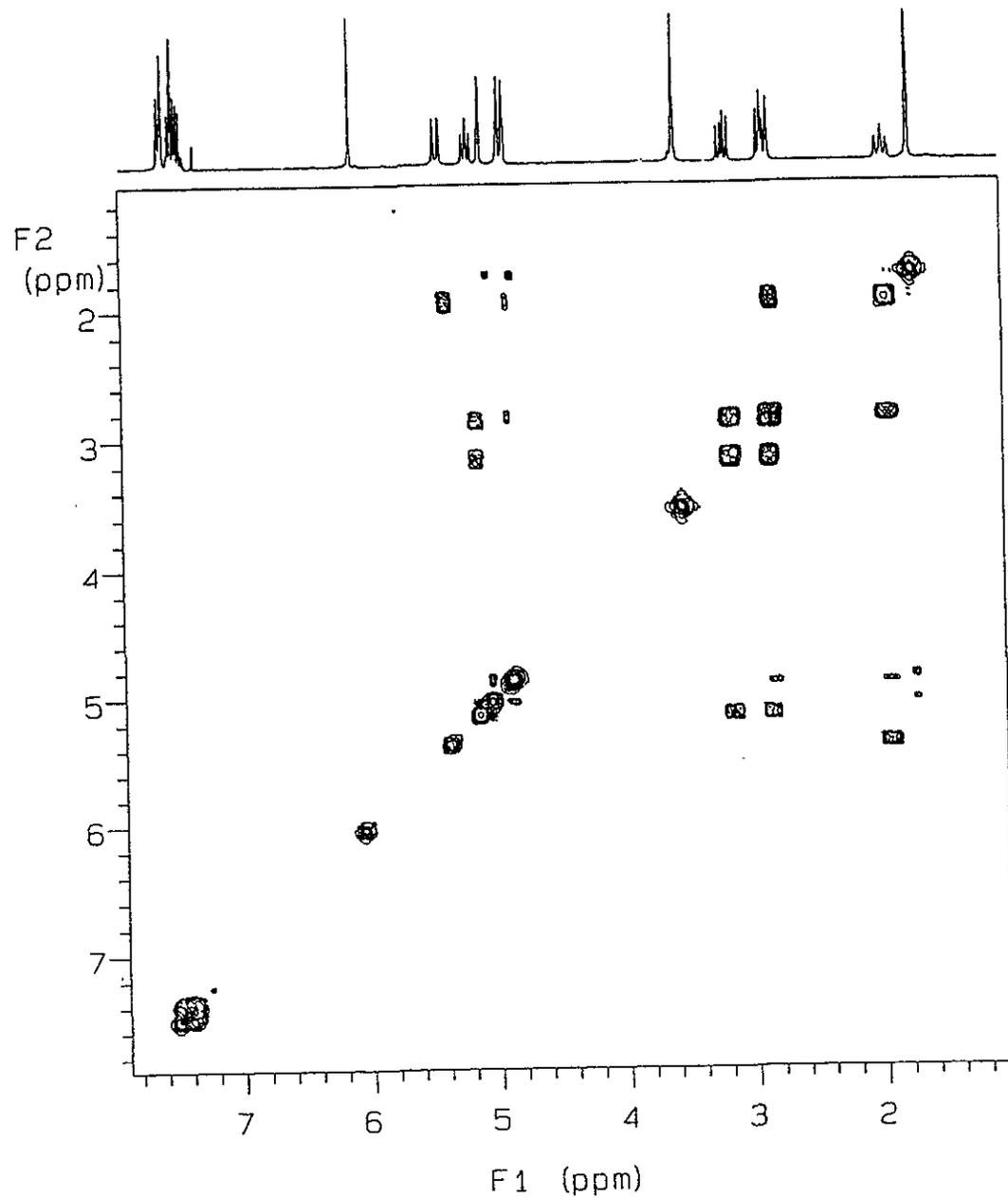
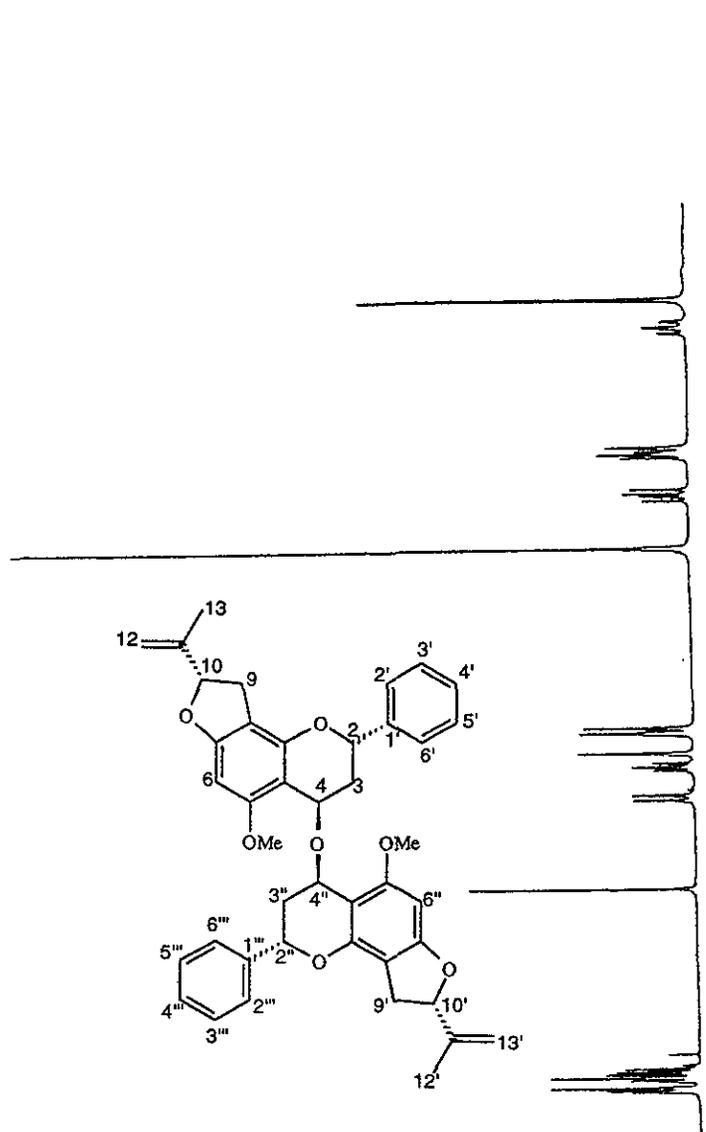
Espectro 14 EMIE de crassichalcona (2)



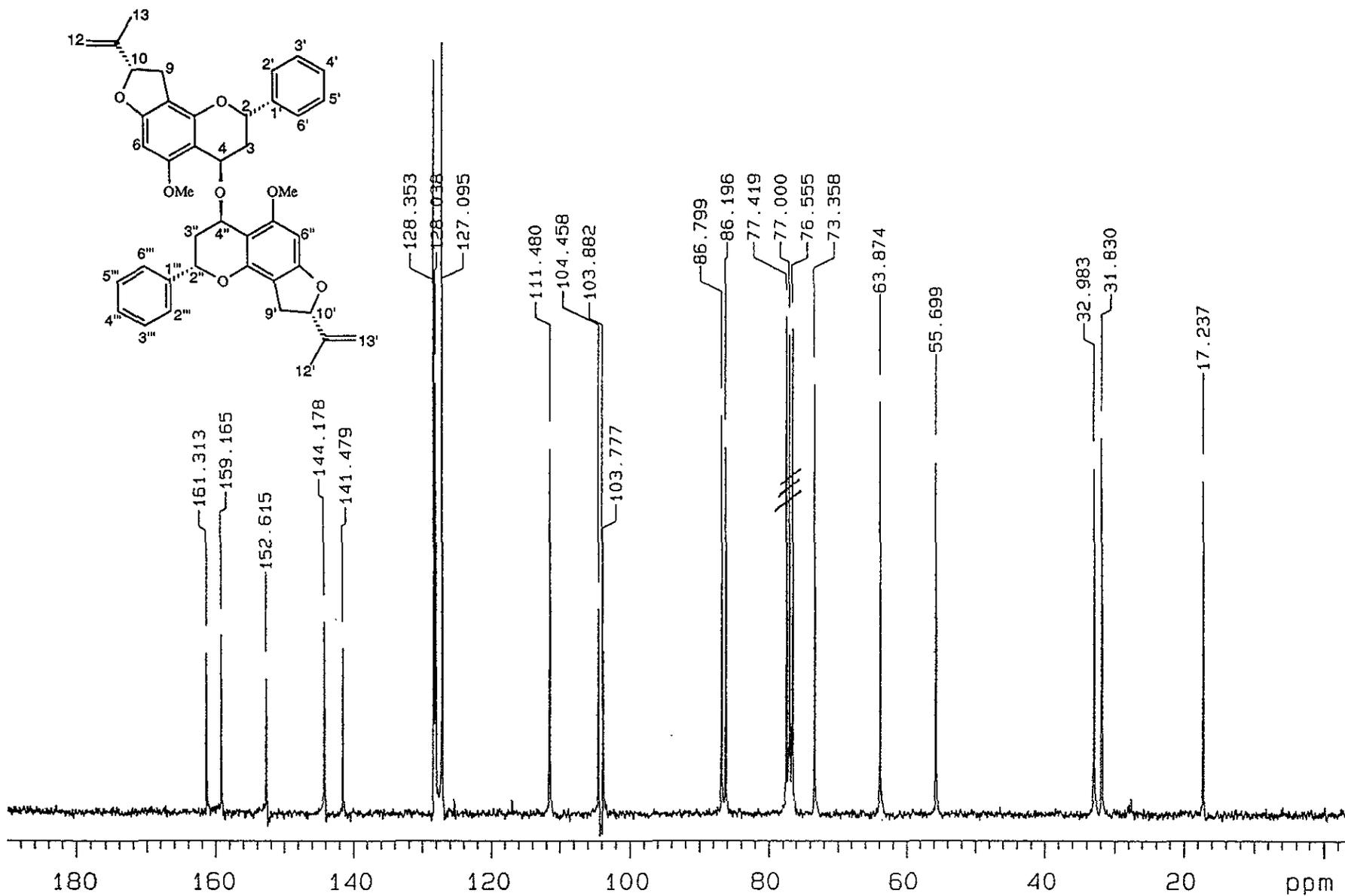
Espectro 15 Espectro de IR de crassichalcona (2)

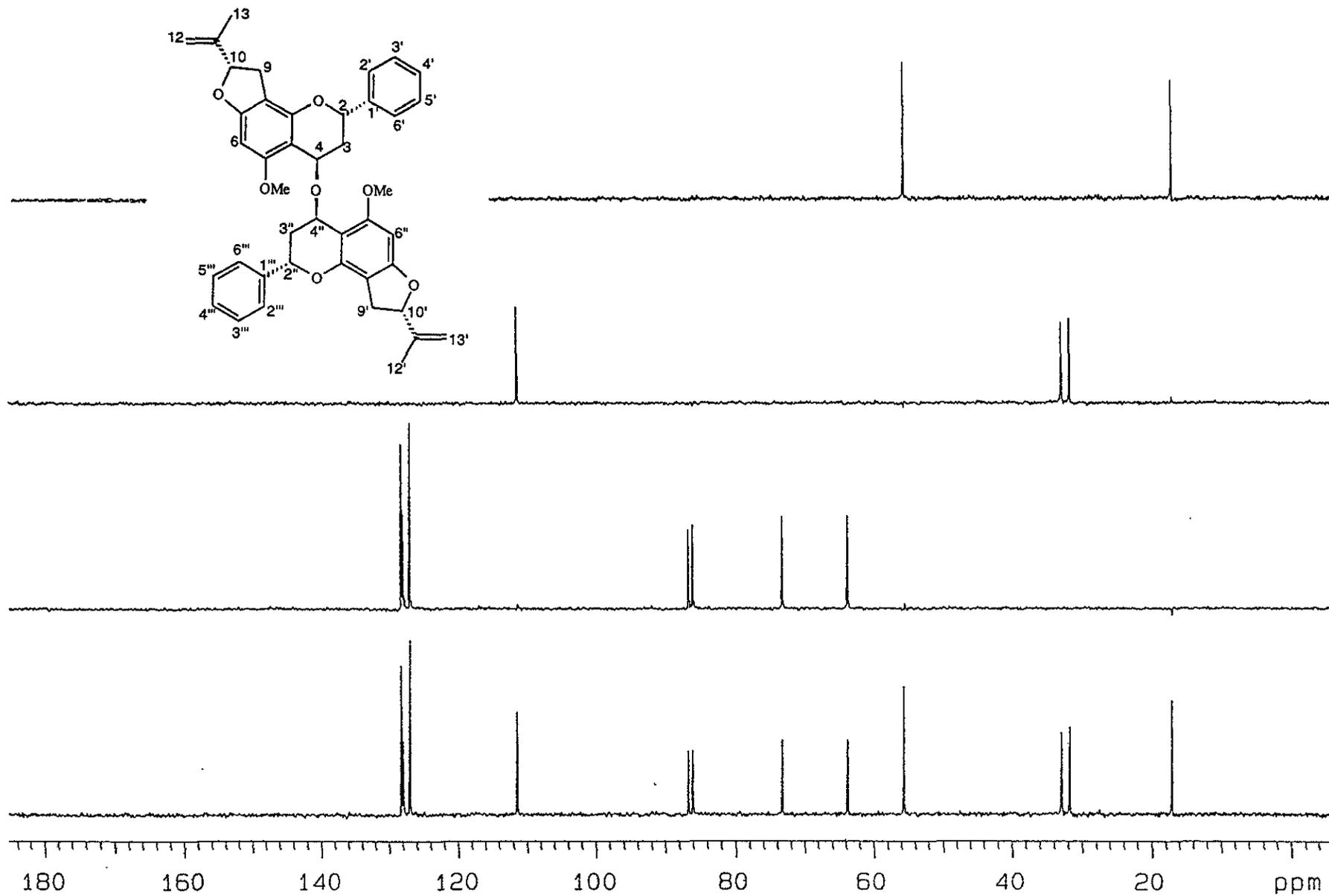


Espectro 16 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de crassifolina (3)

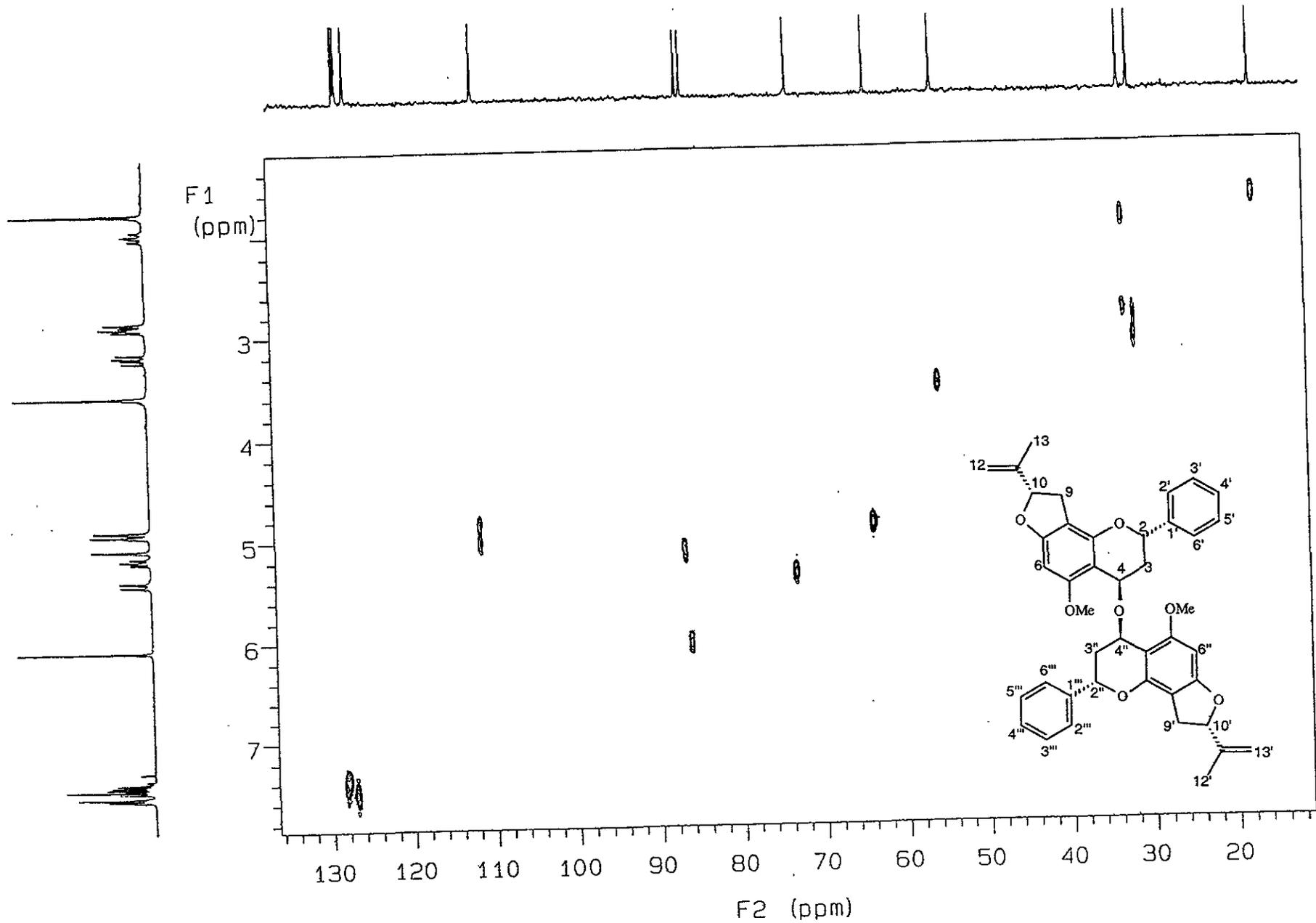


Espectro 17 Espectro COSY de crassifolina (3)

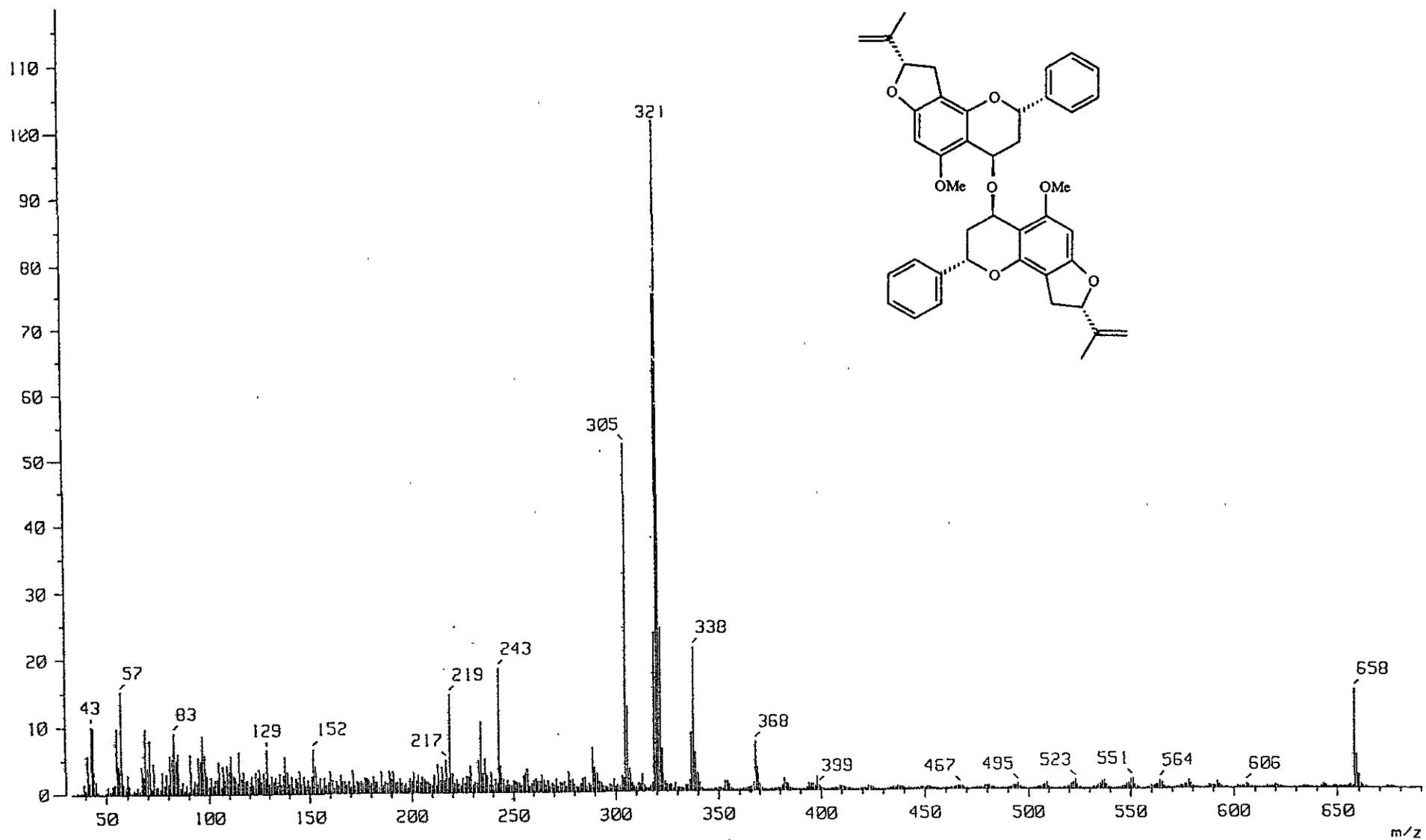




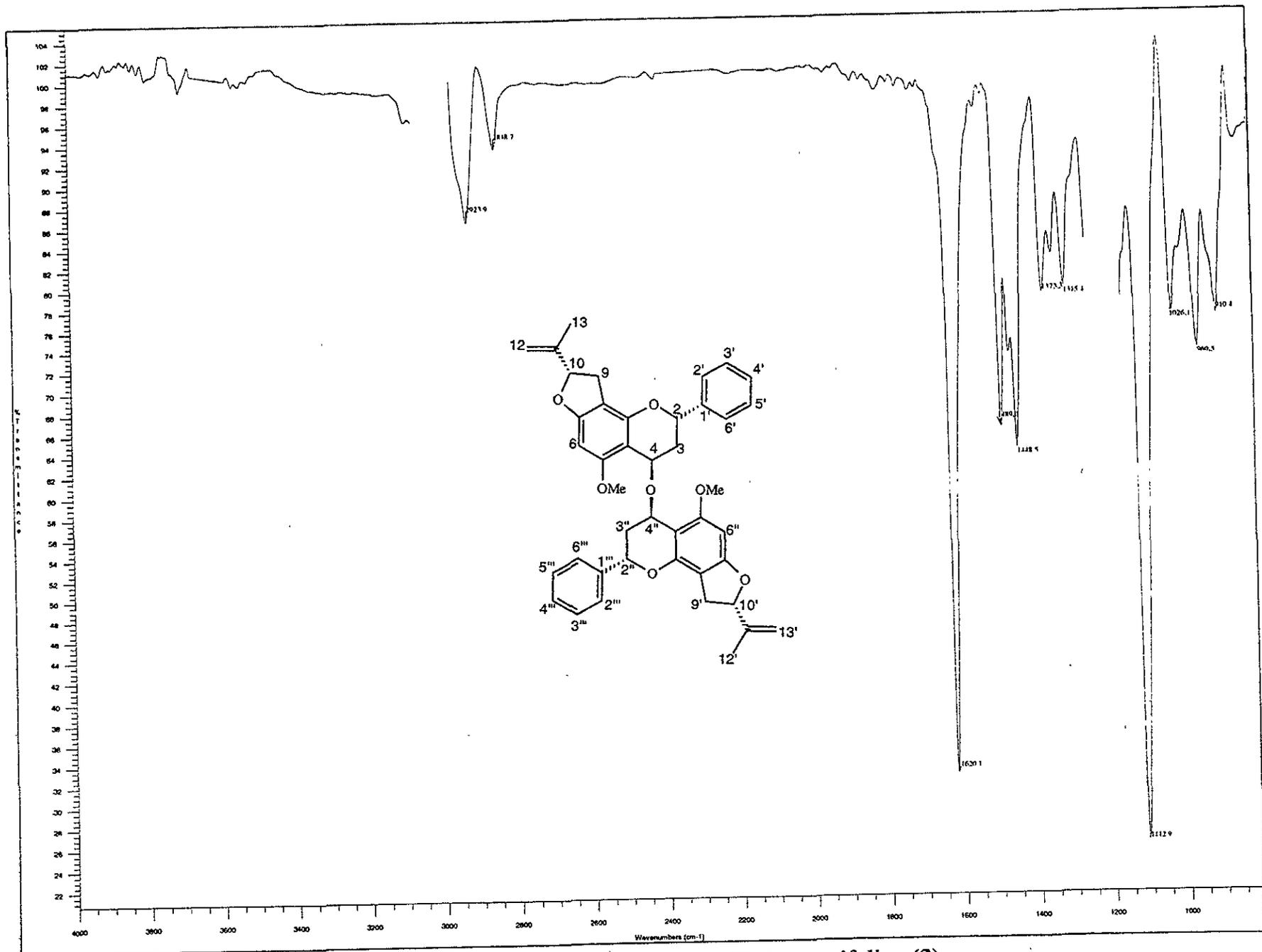
Espectro 19 Espectro DEPT de crassifolina (3)



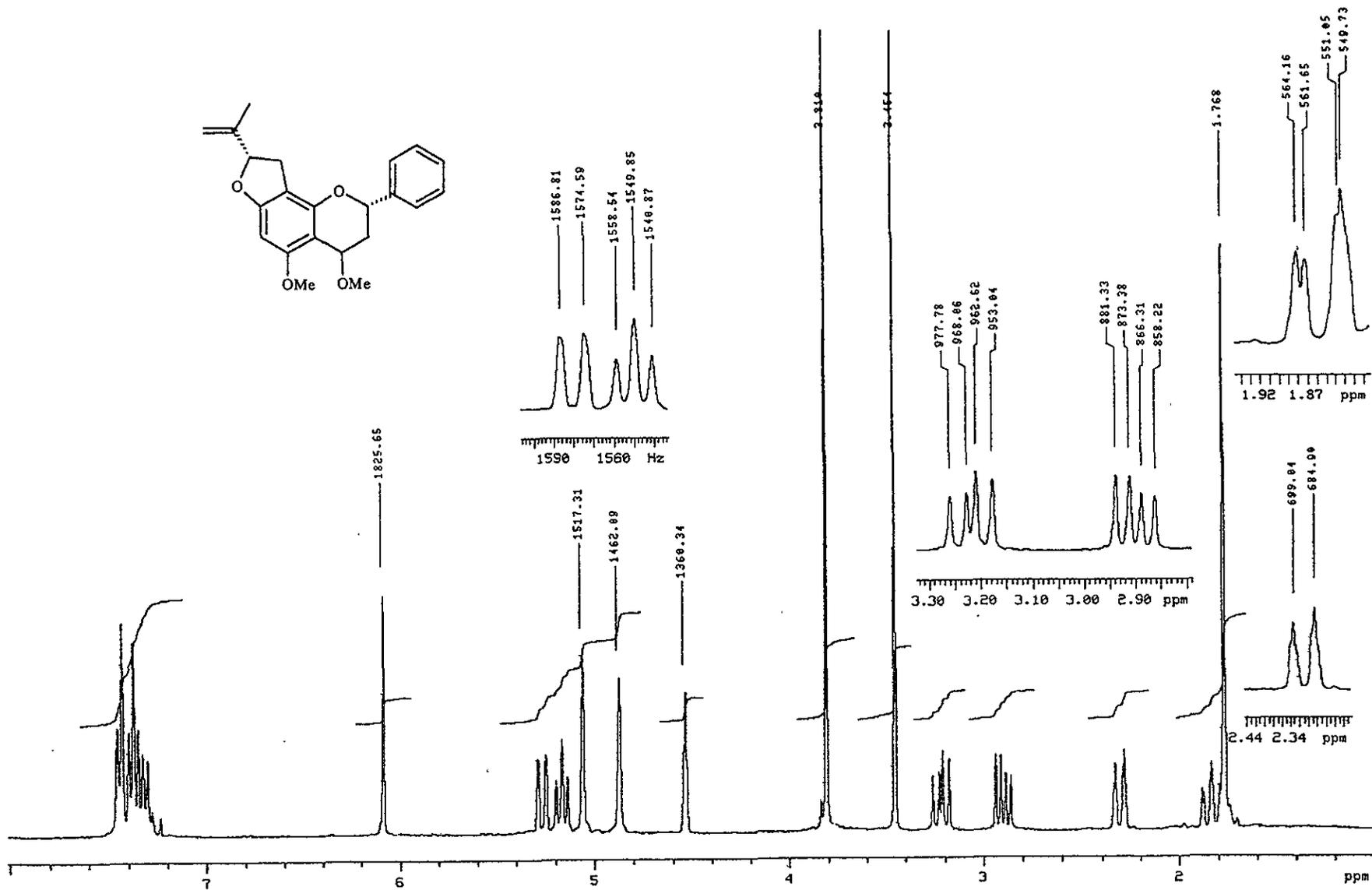
Espectro 20 Espectro HETCOR de crassifolina (3)



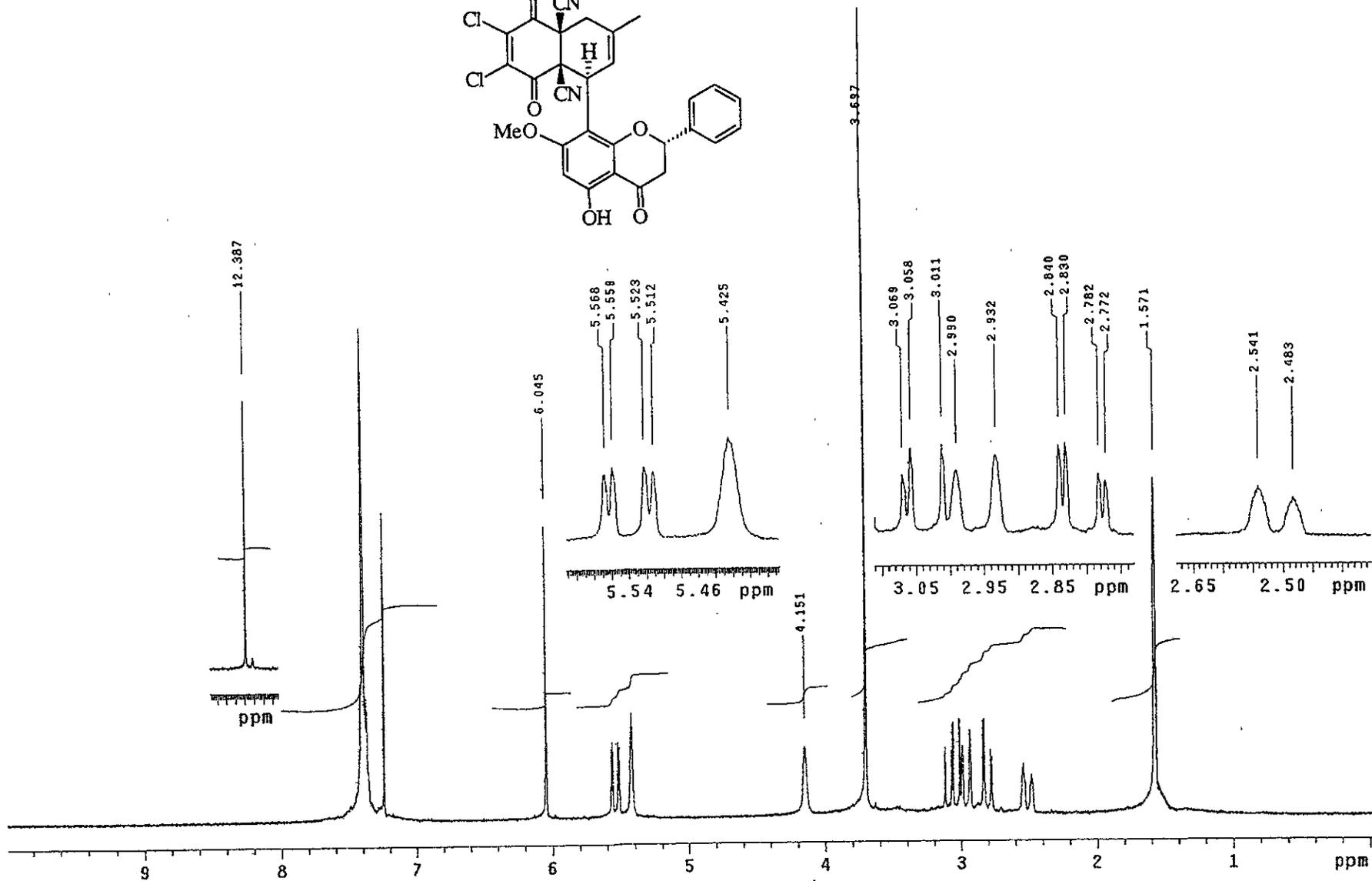
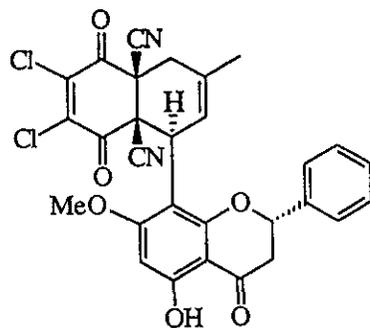
Espectro 21 EMIE de crassifolina (3)



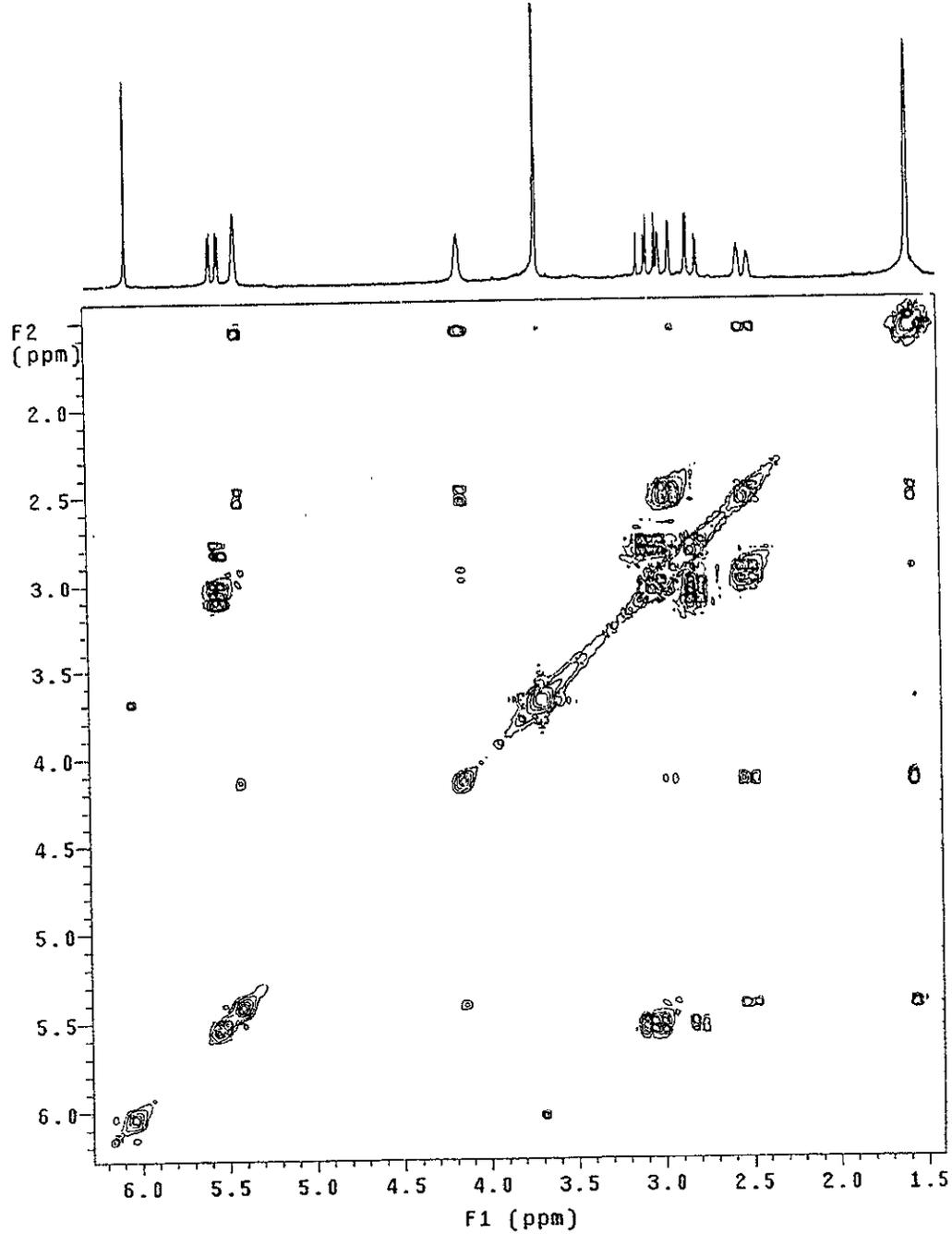
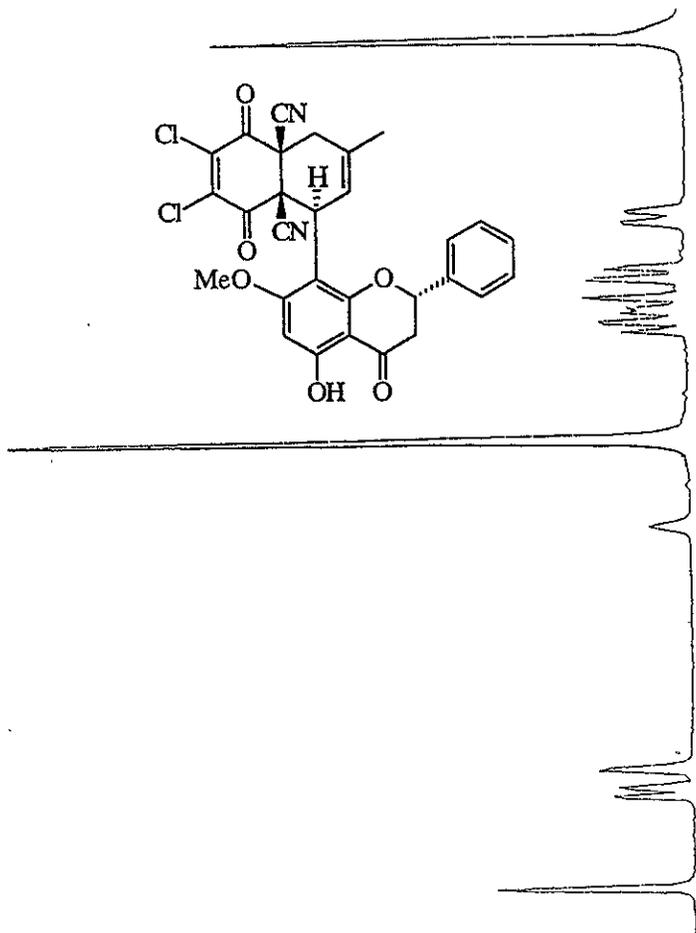
Espectro 22 Espectro de IR de crassifolina (3)



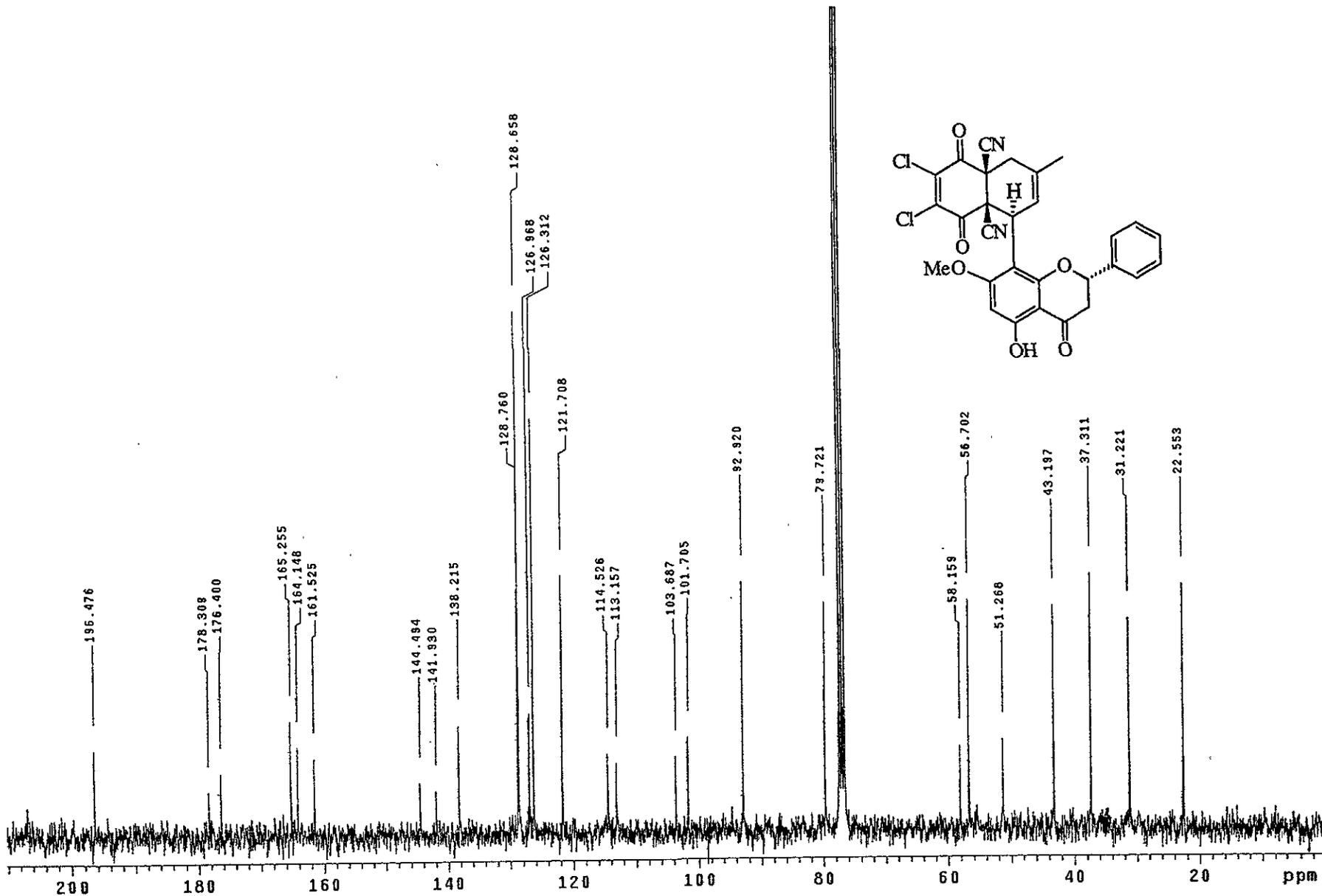
Espectro 23 Espectro de RMN <sup>1</sup>H metil-hildgardtol A (5)



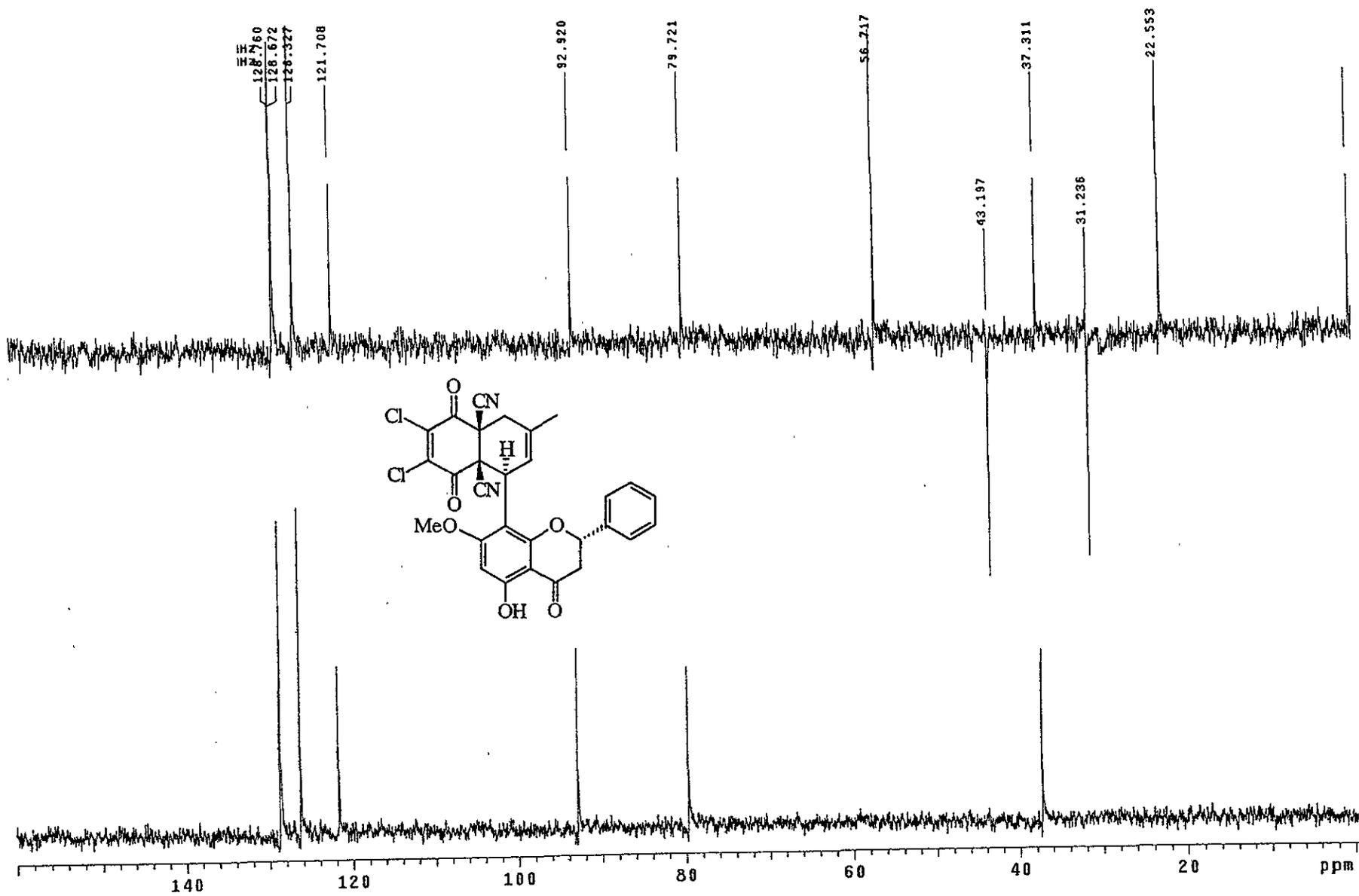
Espectro 24 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto II



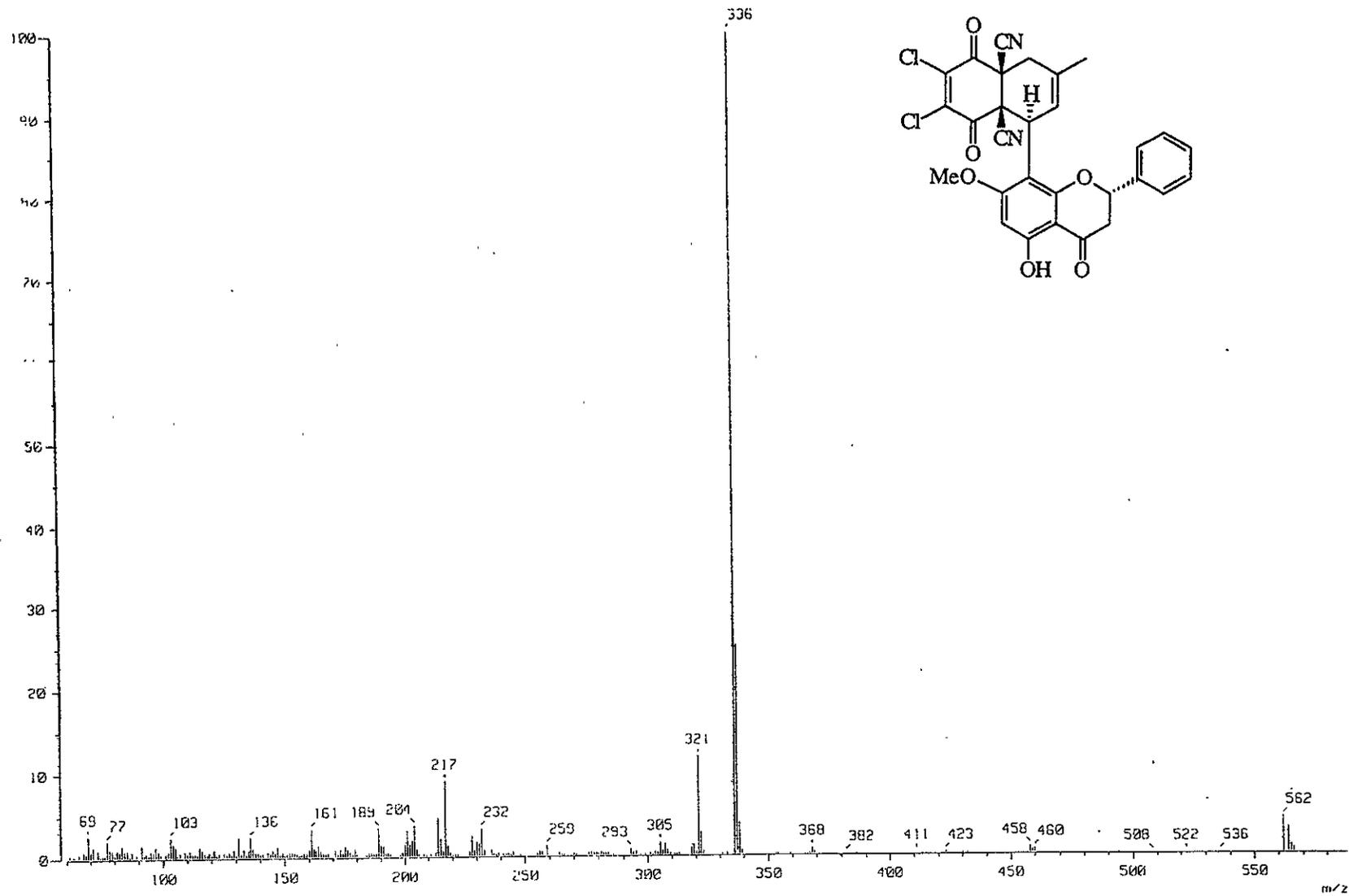
Espectro 25 Espectro COSY del compuesto II



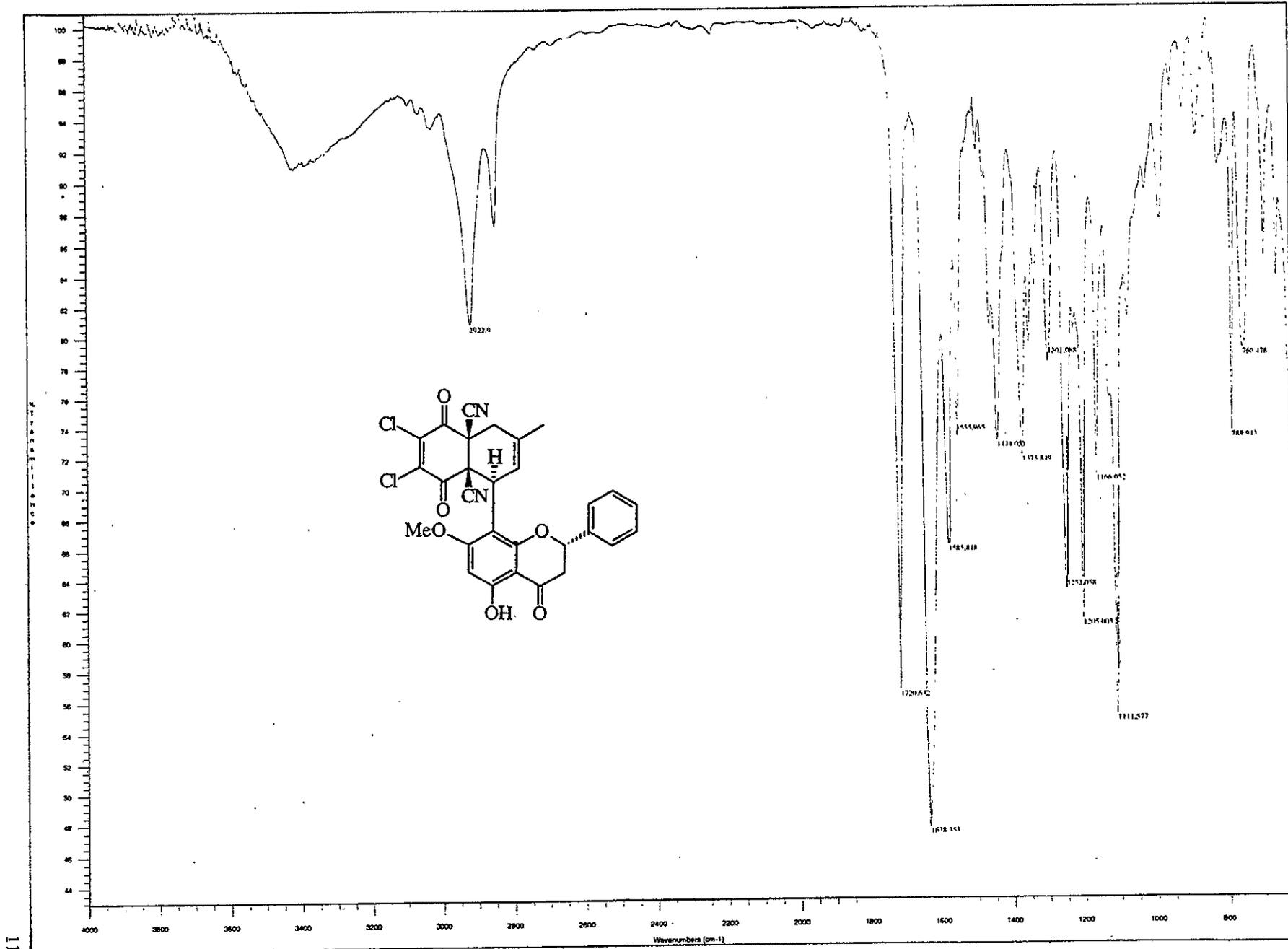
Espectro 26 Espectro de RMN <sup>13</sup>C del compuesto II



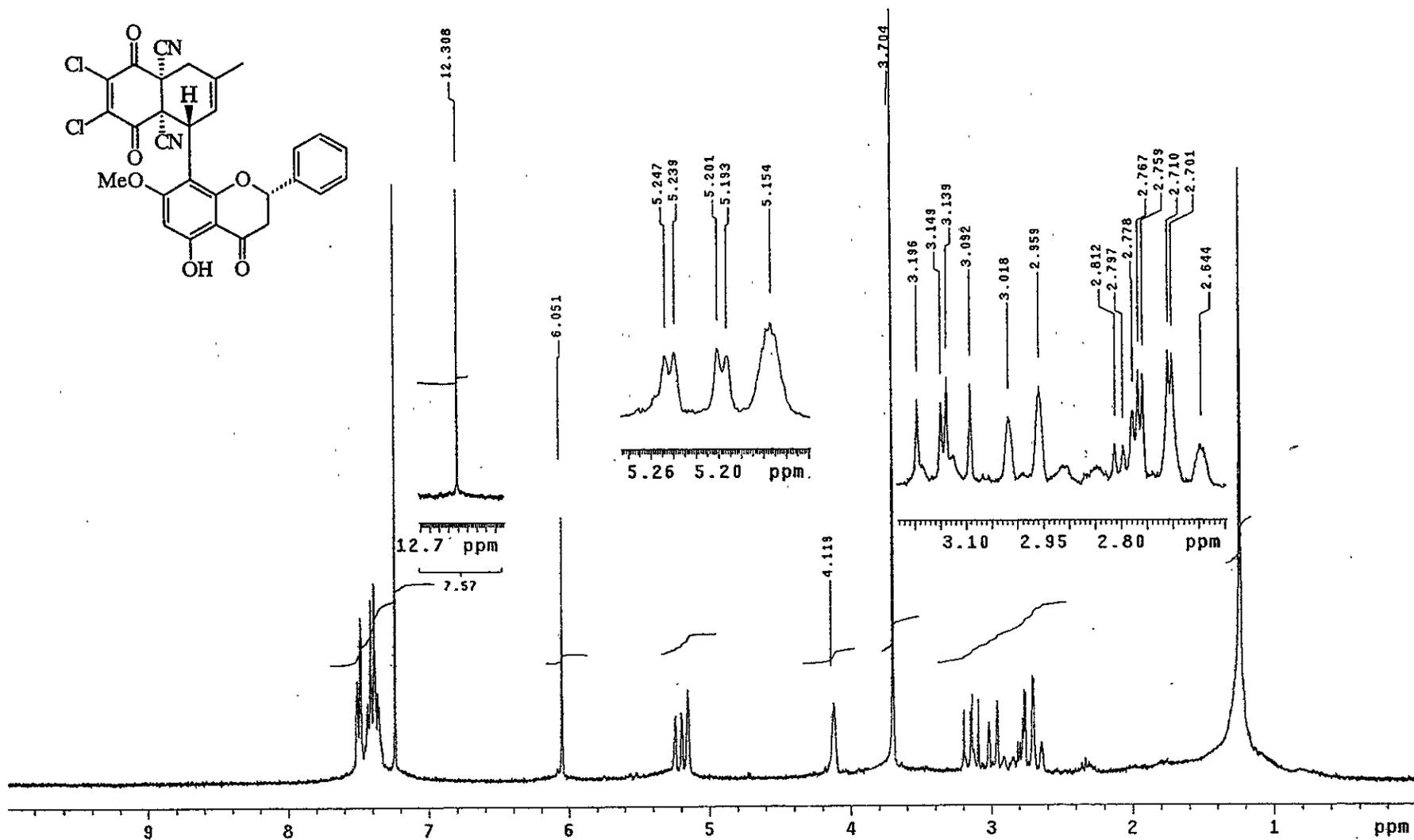
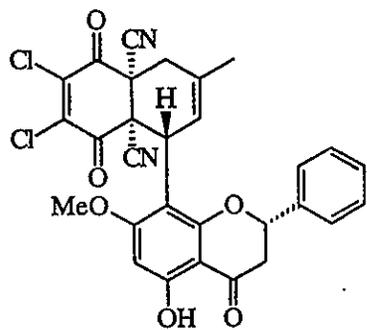
Espectro 27 Espectro DEPT del compuesto II



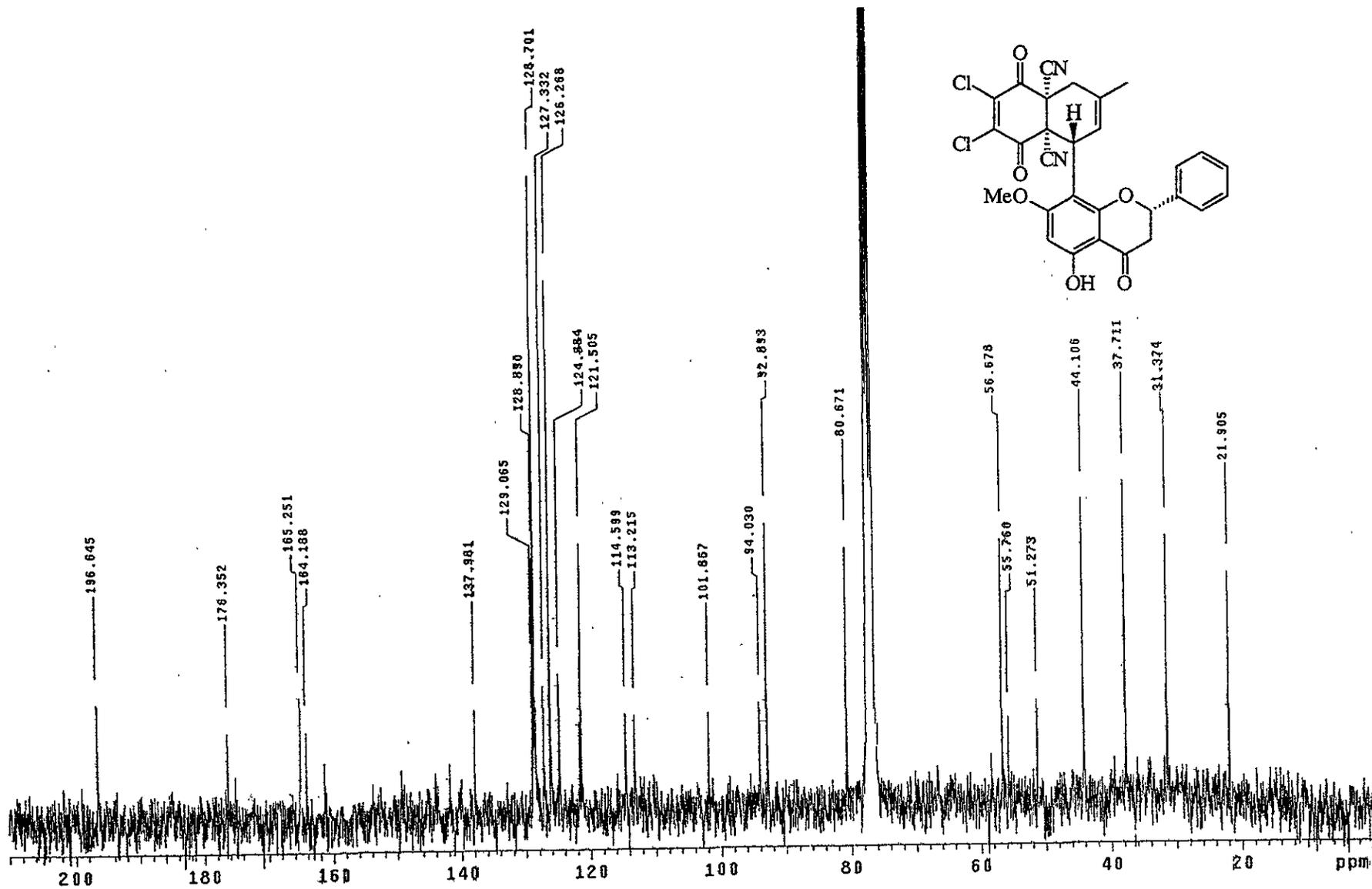
Espectro 28 EMIE del compuesto II



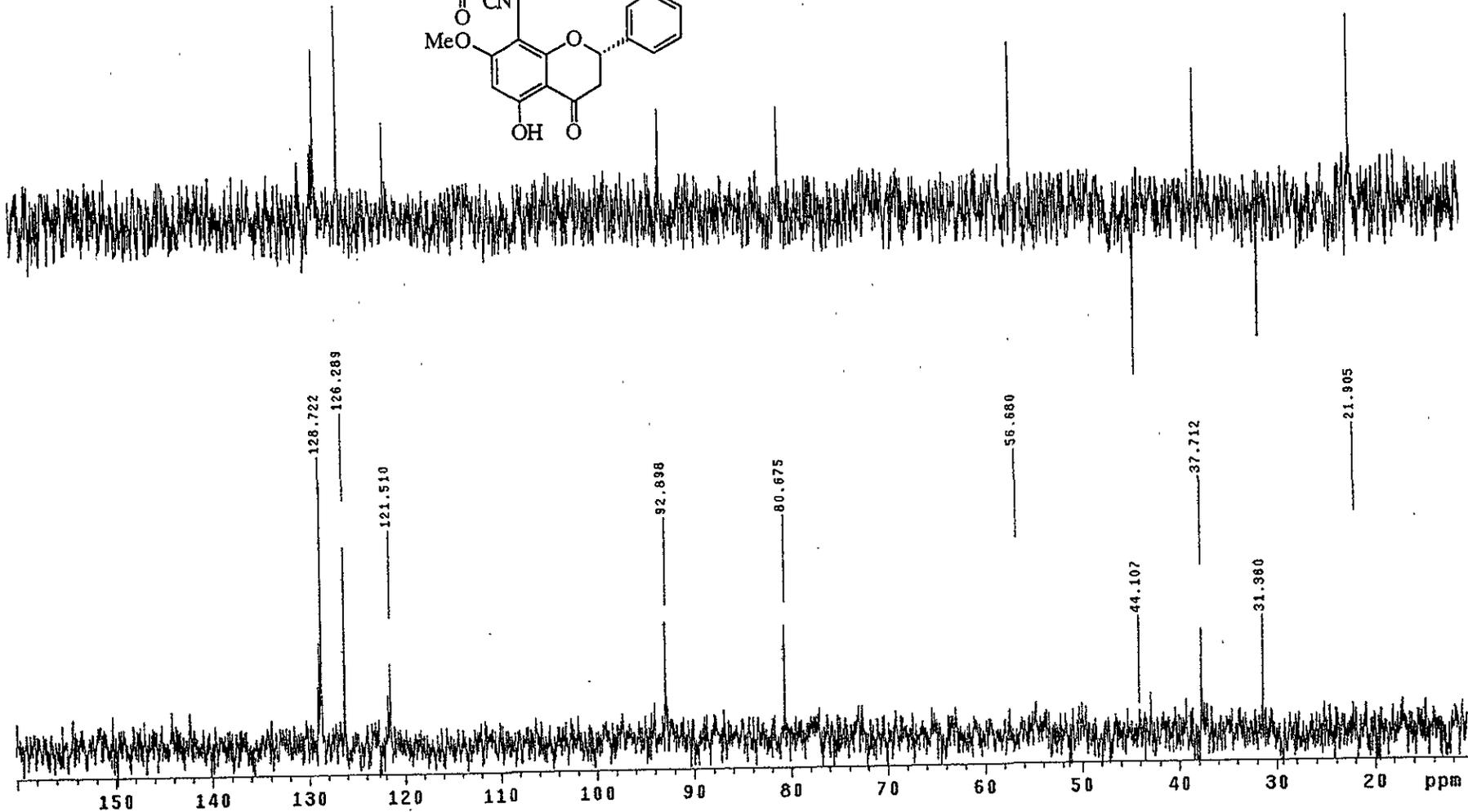
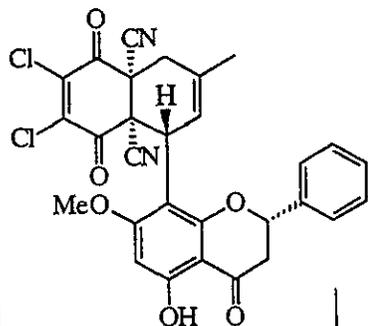
Espectro 29 Espectro de IR del compuesto II



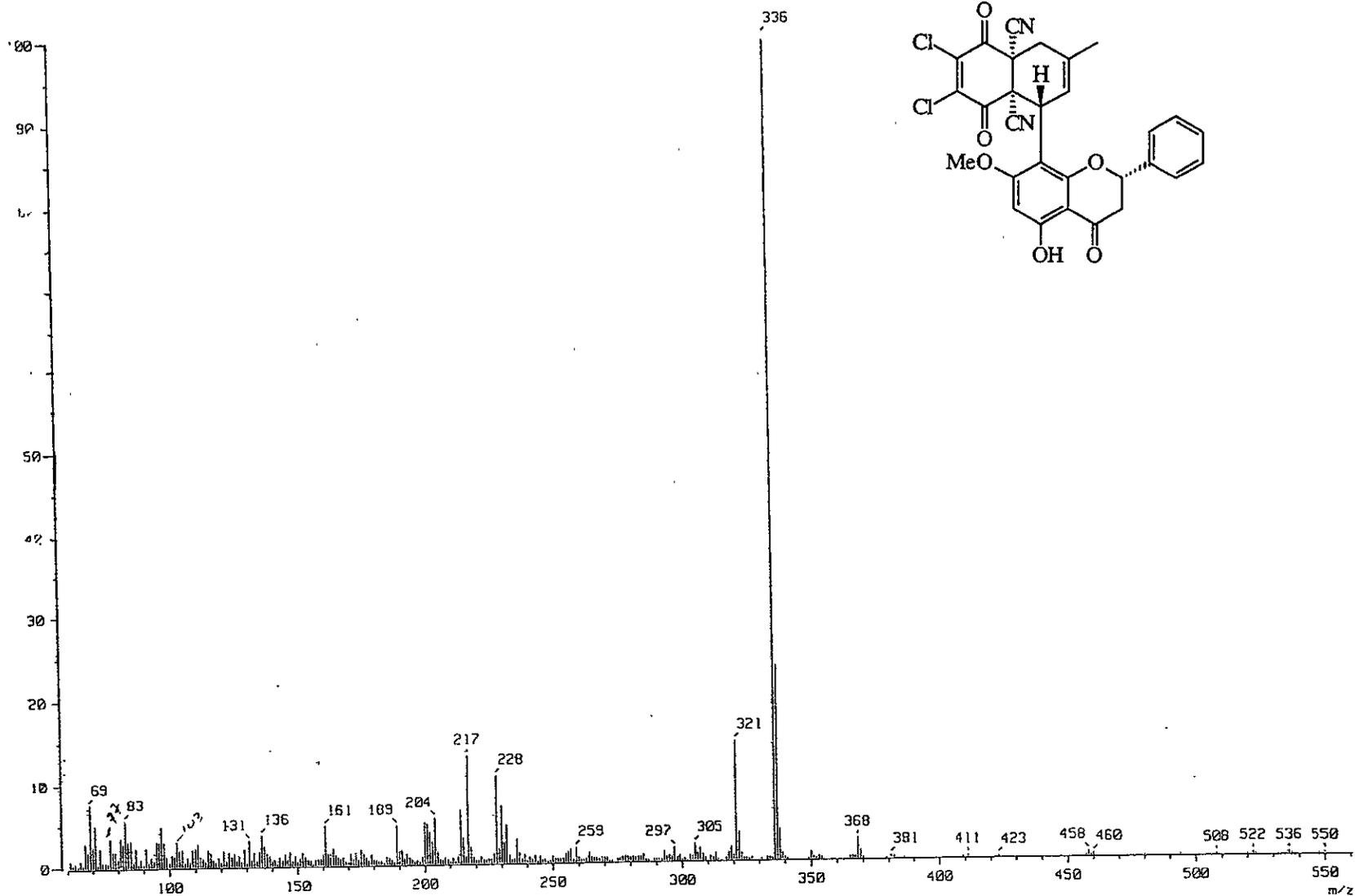
Espectro 30 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto III



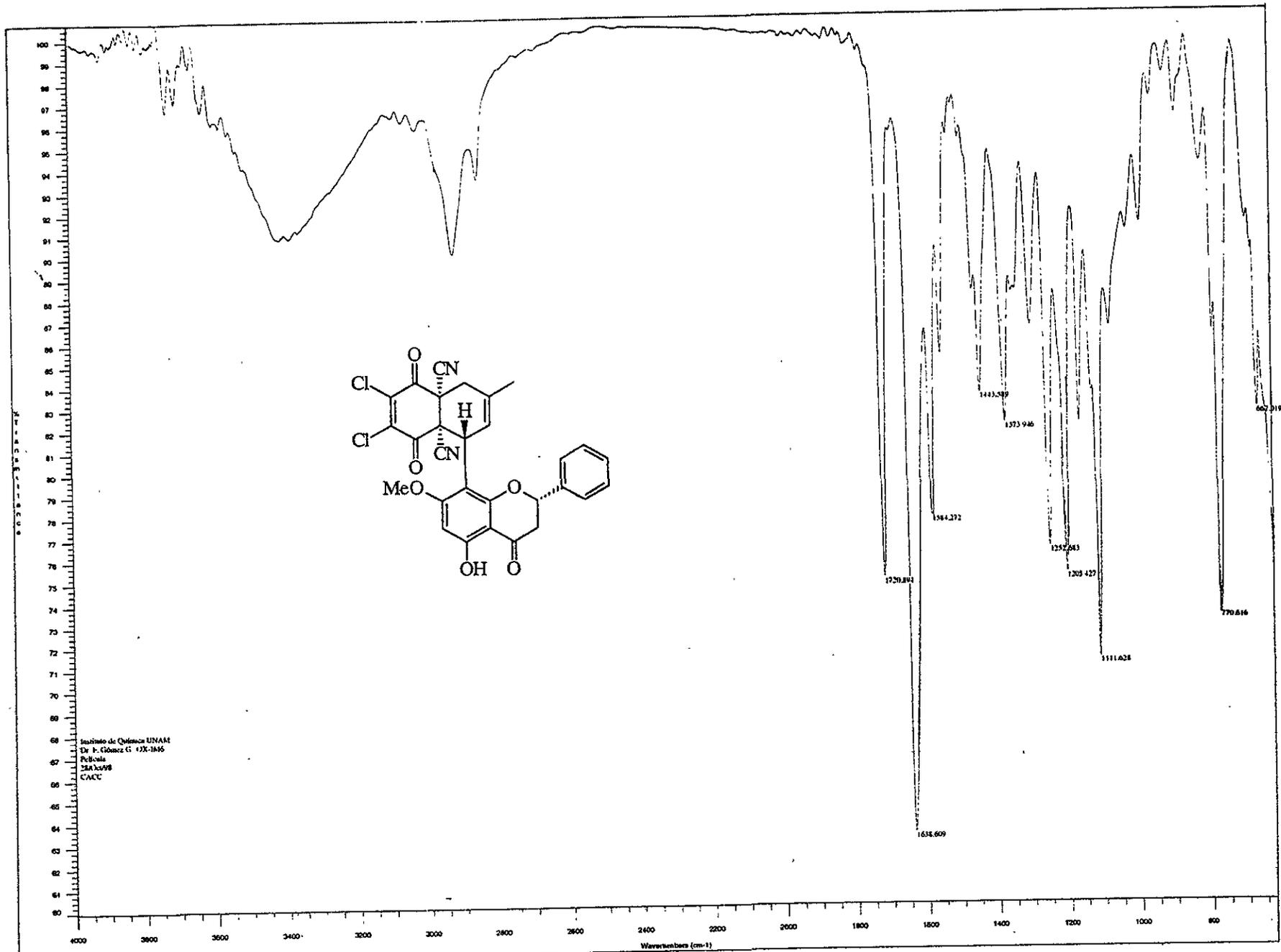
Espectro 31 Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto III

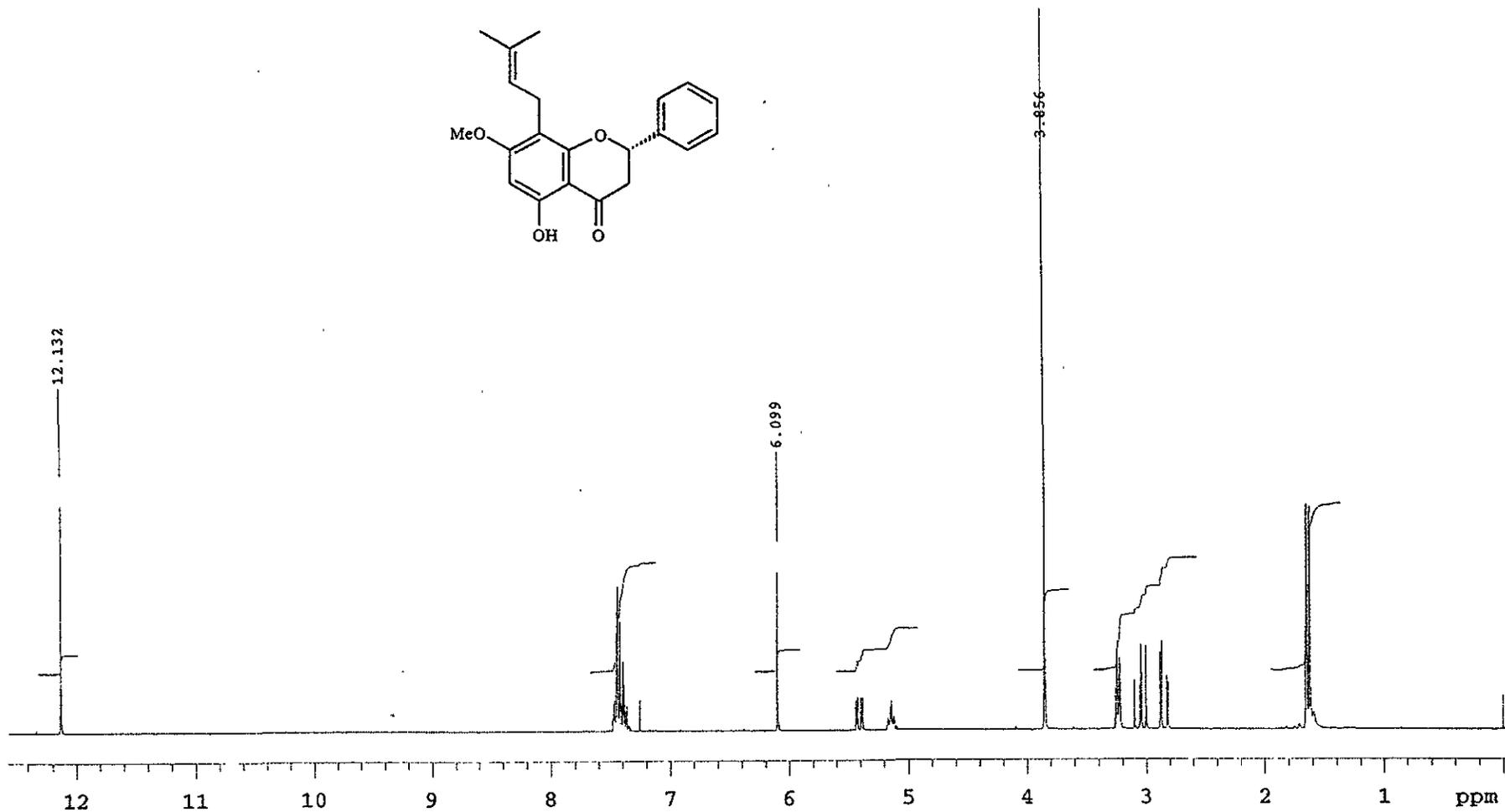
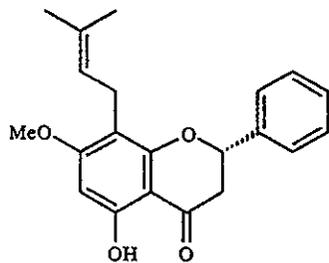


Espectro 32 Espectro DEPT del compuesto III

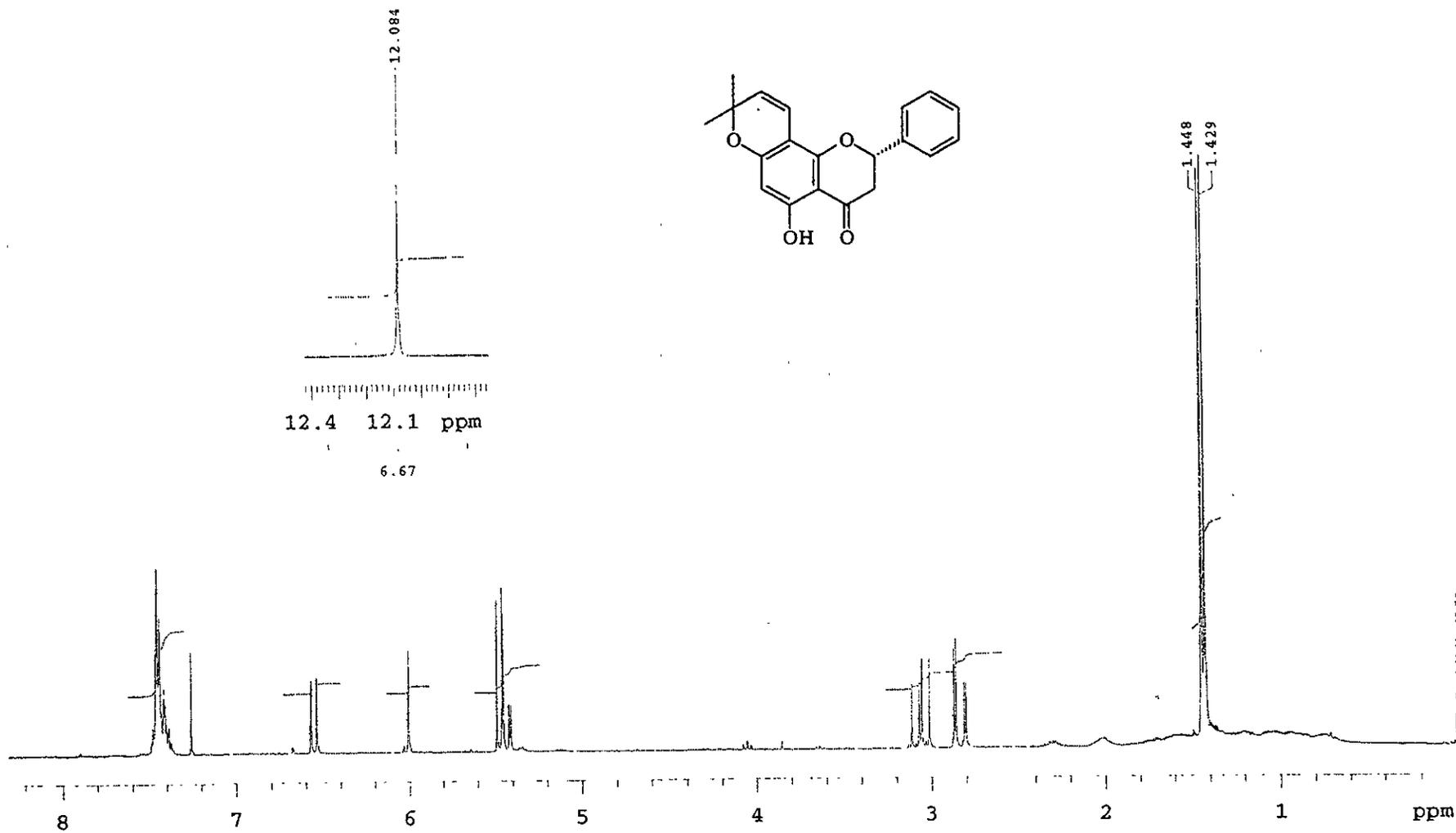


Espectro 33 EMIE del compuesto III

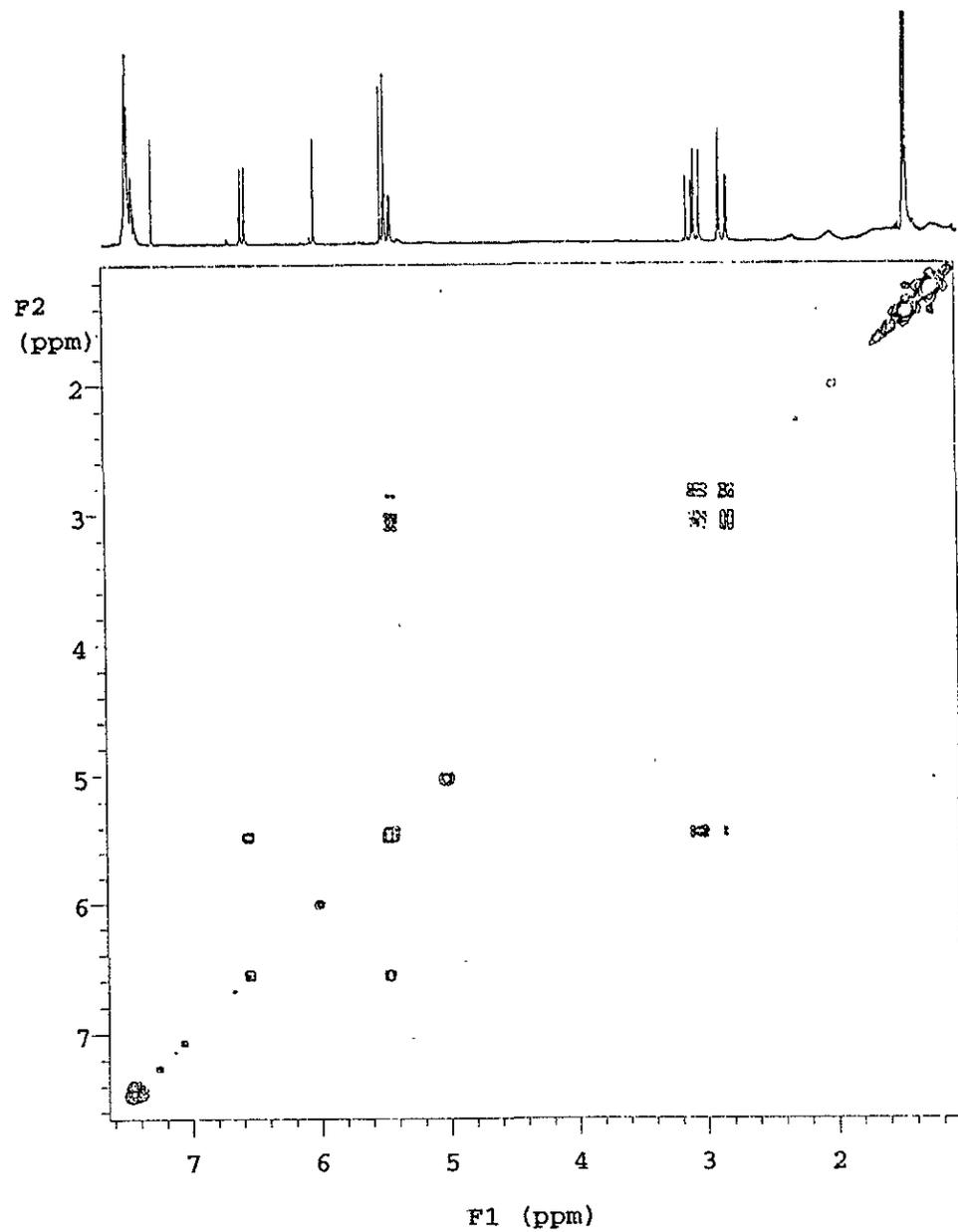
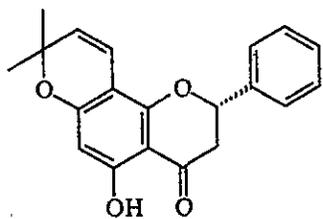
Espectro 34 <sup>2</sup> Espectro de IR del compuesto III



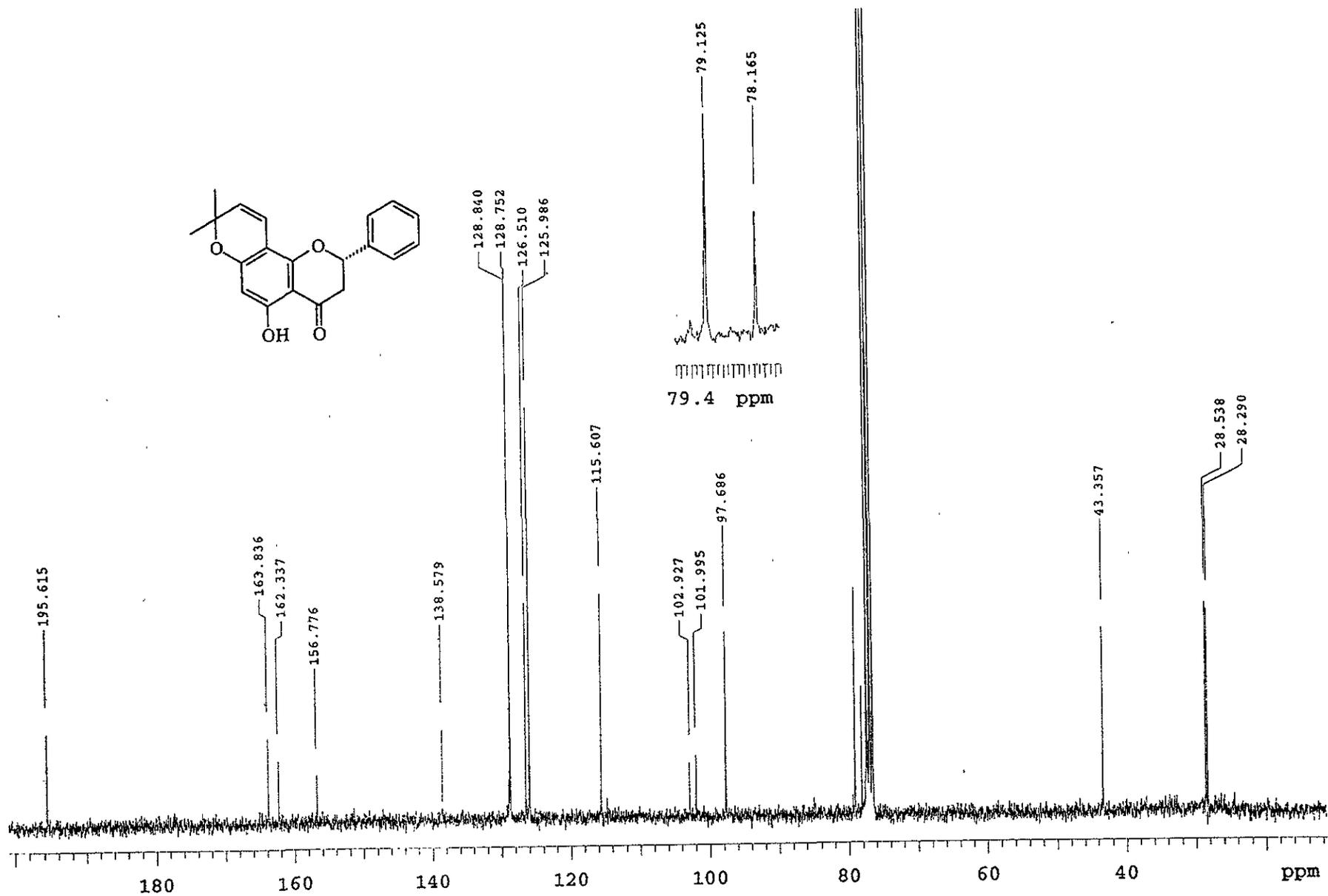
Espectro 35 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  7-O-metil-glabranina (10)



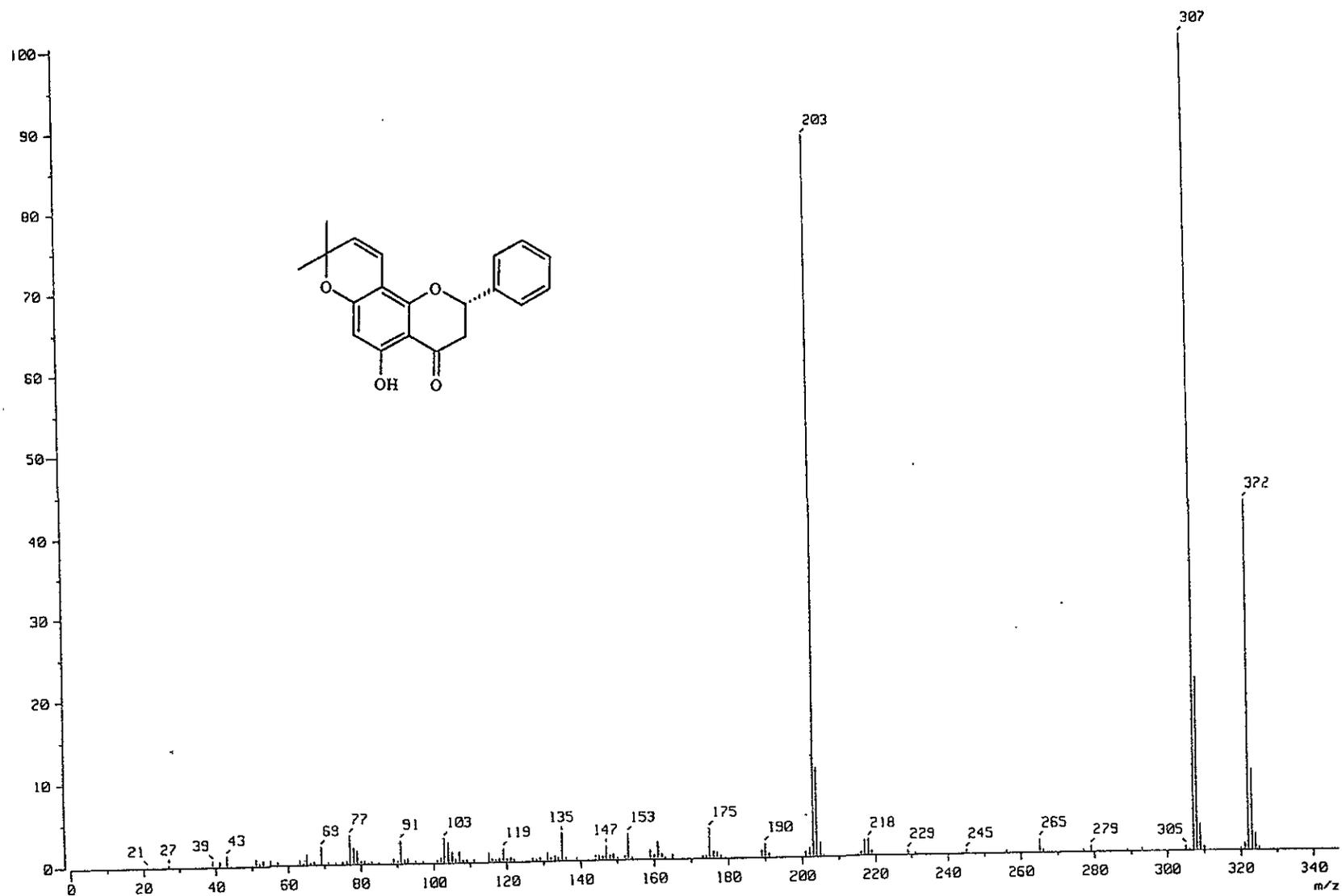
Espectro 36 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto IV



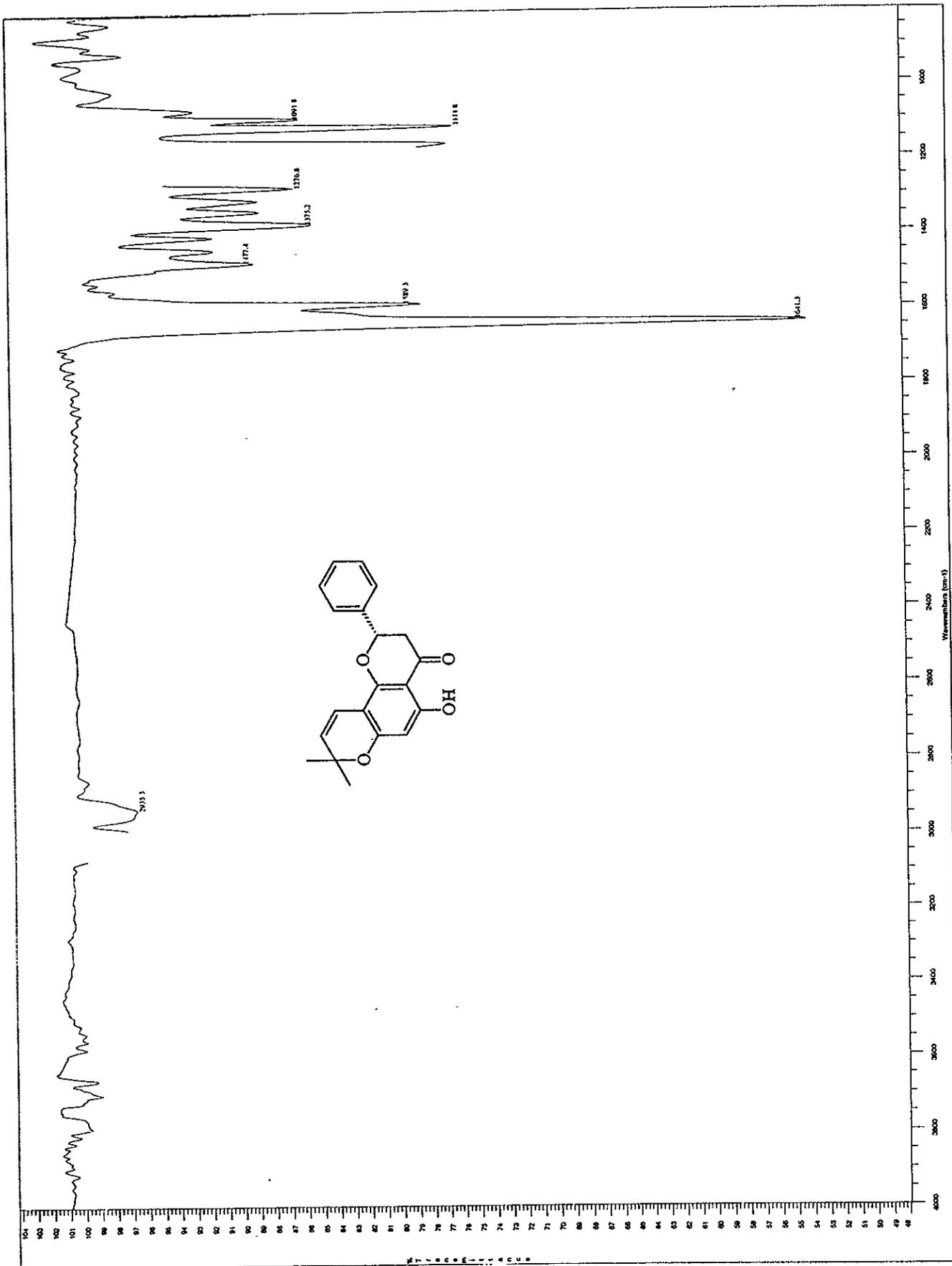
Espectro 37 Espectro COSY del compuesto IV



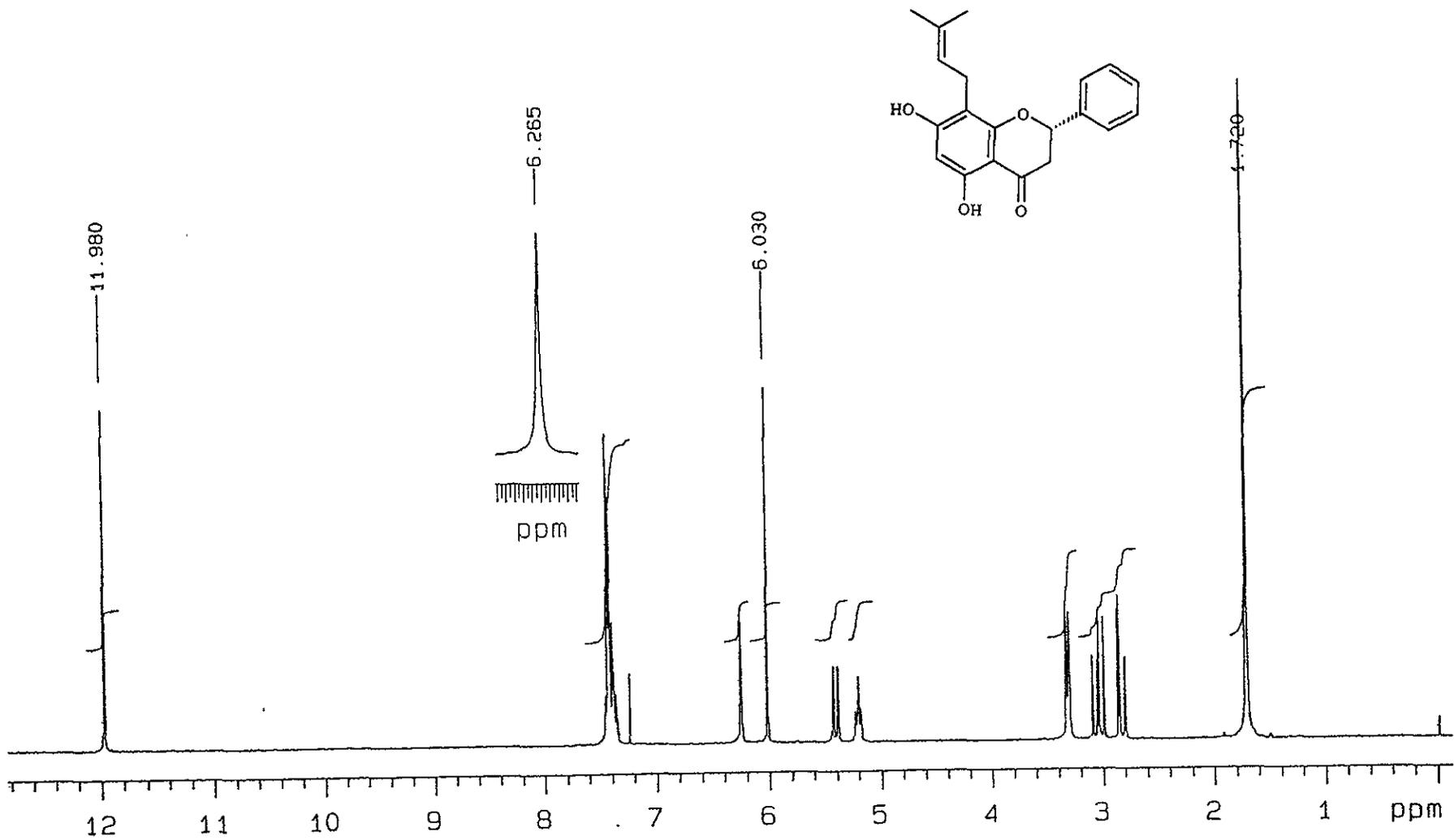
Espectro 38 Espectro de RMN <sup>13</sup>C del compuesto IV



Espectro 39 EMIE del compuesto IV



Espectro 40 Espectro de IR del compuesto IV



Espectro 41 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  glabranina (11)