



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

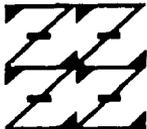
Estudio Químico y Evaluación Biológica de Cirsium jorullense.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :
JOSE MANUEL NARVAEZ MASTACHE

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR: M. en C. ARTURO EDUARDO CANO FLORES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D.F.

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION DISCONTINUA

H Jurado

Presidente	M. en C. Leonora Sánchez GarciaFiguroa
Vocal	M. en C. Arturo Eduardo Cano Flores.
Secretario	Q. Ma. Teresa Mendoza Mata.
Suplente	M. en C. Benito Reyes Trejo.
Suplente	M. en C. Rodolfo Carreón Sánchez

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biotransformaciones y Química de Productos Naturales L-314 de la F.E.S. Zaragoza. Campus II.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

*Caminante son tus huellas el camino y nada más.
Al andar se hace el camino y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca se ha de volver a pisar.
Caminante no hay camino, se hace camino al andar*

Joan Manuel Serrat

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIAS

A MI MAMA:

Muchas veces, a lo largo de mi vida, tu amor ha hecho la diferencia. Me has regalado lo mejor de tí: tu propia vida. Tu ejemplo me acompaña, porque me enseñaste que siempre es mejor luchar con una actitud optimista para así vivir una existencia valiosa. GRACIAS.

A MI PAPA:

Es muy importante para mí el saberte cerca, contar contigo más allá de la relación tradicional que podríamos tener por ser tu quien me dio la vida. El cariño que me inspiras es algo más profundo: respeto y confianza, admiración y orgullo. GRACIAS

A MI HERMANO:

Contigo aprendí que lo verdaderamente valioso de la vida es siempre luchar con entereza y entusiasmo. Eres mi mejor ejemplo como ser humano. GRACIAS.

A MIS HERMANAS:

Siempre que las necesite ahí estuvieron. Muchas gracias por su apoyo y porque sé que siempre contaré con ustedes.

A MIS SOBRINOS:

A esos locos bajitos. Muchas gracias por su alegría.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

"Cuando sientas tu herida sangrar, cuando sientas tu voz sollozar, cuenta conmigo. Amigo, usted sabe que puede contar conmigo, no una ni dos, sino contar conmigo".

Mario Benedetti

A MARINA

Por su valiosa ayuda para la realización del trabajo de tesis
y por que siempre que necesite un amigo ahí estuviste.

A MIS COMPAÑEROS

Román, Ernesto, Erika, Mary, Eloy, Gladys, Roberto
por todo su apoyo. Gracias.

A LA MAESTRA MAGDALENA

Por su amistad y por todo el apoyo que me brindo
en los momentos mas dificiles
Gracias

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

*"Triunfar en la vida es hacer triunfar a los demás.
Porque: el hombre más rico no es el que conserva el primer
peso que gana, sino el que conserva el primer amigo que gana"*

A DULCE
Muchas gracias por tu apoyo, tu amor incondicional
y sobretodo por seguir tu vida a mi lado.
Te amo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

Al M en C Arturo Eduardo Cano Flores por su asesoría, su apoyo y sobretodo por haber confiado en mi. Gracias

Al personal técnico-académico del Instituto de Química de la UNAM por las facilidades prestadas para la realización de este proyecto

Al M en C Jorge Cárdenas Pérez del Instituto de Química de la UNAM por todo el apoyo prestado para la realización de este proyecto.

A la M en C María Teresa Ramírez Apan del Instituto de Química de la UNAM por la realización de las pruebas antiinflamatorias.

Al Biol. Osvaldo Téllez del Instituto de Biología de la UNAM por la identificación y clasificación del material vegetal.

Al Jurado por sus valiosas observaciones hacia este trabajo que ayudaron mucho para que resultara mas sustancioso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

	Página
Lista de tablas	iii
Lista de figuras	iv
Abreviaturas y símbolos	v
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	4
A. Familia <i>Compositae</i>	7
1. Compuestos insaturados.	8
2. Flavonoides	9
a. Clasificación	9
b. Propiedades biológicas	12
c. Biosíntesis	13
3. Terpenos	17
a. Aceites esenciales	18
b. Lactonas sesquiterpénicas	18
4. Sustancias Diversas	19
B. Género <i>Cirsium</i>	21
1. Usos medicinales del género <i>Cirsium</i>	21
2. Química del género <i>Cirsium</i>	23
a. Hidrocarburos insaturados aislados del género <i>Cirsium</i>	38
b. Terpenos aislados del género <i>Cirsium</i>	39
c. Flavonoides aislados del género <i>Cirsium</i>	40
C. Generalidades de los ensayos biológicos	43
a. Bioensayo de <i>Artemia salina</i> L.	45
b. Ensayo antimicrobiano para extractos de plantas	46
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	49
IV. OBJETIVOS	51
V. HIPÓTESIS	53
VI. MATERIAL Y EQUIPO	55
VII. PARTE EXPERIMENTAL	60
A. Estudio Químico	61
B. Estudio Biológico	71
1. Bioensayo de toxicidad sobre <i>Artemia salina</i> L.	71
2. Evaluación antimicrobiana. Método de Mitscher	72
3. Evaluación antiinflamatoria	75

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

	Página
VIII. RESULTADOS	76
A. Estudio Químico	77
1. Estructuras de las sustancias aisladas	78
2. Propiedades espectroscópicas de las sustancias aisladas	79
B. Estudio Biológico	81
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	84
A. Estudio Químico	85
B. Estudio Biológico	103
X. CONCLUSIONES	105
XI. ESPECTROS	107
Espectro 1. IR β -D-glucósido del β -sitosterol	108
Espectro 2. IR, tetracetato β -D-glucósido del β -sitosterol	109
Espectro 3. RMN- ¹ H, tetracetato del β -D-glucósido del β -sitosterol	110
Espectro 4. RMN- ¹³ C, tetracetato del β -D-glucósido del β -sitosterol	111
Espectro 5. IR, Pectolinarigenina	113
Espectro 6. RMN- ¹ H, Pectolinarigenina	114
Espectro 7. RMN- ¹³ C, Pectolinarigenina	115
Espectro 8. IR, Eupatilina	116
Espectro 9. RMN- ¹ H, Eupatilina.	117
Espectro 10. RMN- ¹³ C, Eupatilina	118
Espectro 11. EM, Eupatilina	119
Espectro 12. IR, 3',4',6,7-tetrametoxi-5-hidroxi-flavona	120
Espectro 13. RMN- ¹ H, 3',4',6,7-tetrametoxi-5-hidroxi-flavona	121
Espectro 14. RMN- ¹³ C, 3',4',6,7-tetrametoxi-5-hidroxi-flavona	122
Espectro 15. IR, Hispidulina	123
Espectro 16. RMN- ¹ H, Hispidulina	124
Espectro 17. RMN- ¹³ C, Hispidulina	125
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

LISTA DE TABLAS

	Página
1. Clasificación de los terpenos de acuerdo a las unidades de isopreno	17
2. Usos medicinales de algunas especies del género <i>Cirsium</i>	22
3. Constituyentes químicos del género <i>Cirsium</i>	23
4. Tipos de ensayos biológicos utilizados en una investigación biodirigida	44
5. Bioensayo de <i>Artemia salina</i> L. de alcaloides conocidos	45
6. Propiedades y limitaciones de los métodos antimicrobianos	48
7. Extractos obtenidos a partir de hojas-tallo y flores de <i>Cirsium jorullense</i>	66
8. Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos y sustancias puras en base al método de Mitscher	82
9. Resultados de la evaluación de toxicidad frente a <i>Artemia salina</i> de extractos y sustancias puras	83
10. Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos y sustancias puras	84
11. Desplazamientos químicos de RMN- ¹ H para diversos tipos de flavonoides	89
12. Desplazamientos químicos de ¹ H y ¹³ C de hispidulina, kamferol, pectolinarigenina y galangustina	90
13. Desplazamientos químicos ¹³ C para la cromona, luteolina y eupatilina	98
14. Datos de RMN- ¹ H de la eupatilina y del derivado metilado para los hidrógenos del grupo metoxilo	101
15. Desplazamientos químicos ¹³ C para la flavona metilada en las posiciones 3', 4', 6 y 7 obtenida de <i>Cirsium jorullense</i>	102

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

LISTA DE FIGURAS

1. Esqueleto base de los diferentes diarilpropanos	9
2. Estructuras de metabolitos secundarios aislados del género <i>Cirsium</i>	30
3. Forma de sembrados de los diferentes microorganismos de prueba	75
4. Reacción de una β -hidroxicetona con FeCl_3 en EtOH al 1%	88
5. Efecto electrodonador de los grupos unidos al anillo A de la flavona	89
6. Pectolinarigenina	92
7. Fórmula parcial B	92
8. Fórmula parcial C	93
9. Fórmula parcial D	93
10. Fórmulas parciales establecidas para el anillo B de acuerdo a las señales presentes en el espectro de RMN- ^1H de la eupatilina	94
11. Eupatilina	100
12. Reacción de metilación a partir de CH_2N_2 en éter etílico a 0°C	101

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etilo
APT	Attachment Proton Test
AST	Agar Soya Trypticaseína
ATCC	American Type Culture Collection
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CCP	Cromatografía en Capa Fina Preparativa
CCV	Cromatografía en Columna a Vacío
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CHCl ₃	Cloroformo
CL ₅₀	Concentración letal media (ppm)
COX	Ciclooxigenasa
COSY	Correlación Espectroscópica Homonuclear (RMN- ¹ H)
CST	Caldo Soya Trypticaseína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
<i>d</i>	Señal doble
δ	Desplazamiento químico (ppm)
EM	Espectrometría de Masas
EtOH	Etanol
IE	Impacto Electrónico
IR	Espectroscopia Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento (Hz)
LIC	Límite inferior confiable
LO	Lípooxigenasa
LSC	Límite superior confiable
<i>m</i>	Señal múltiple
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
M ⁺	Ion molecular
MeOH	Metanol
msnm	Metros sobre el nivel del mar
Ω	Número de insaturaciones
pf.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
Py	Piridina
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de ¹ H
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de ¹³ C
<i>s</i>	Señal simple
<i>t</i>	Señal triple
TMS	Tetrametilsilano
TPA	12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate
UV	Espectroscopia de Ultravioleta
ν	Número de onda

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I. *Introducción*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El aprovechamiento de los recursos naturales data desde la existencia del hombre mismo. Han sido múltiples las observaciones y numerosas las experiencias acumuladas sobre este aspecto, éstas se encuentran enmarcadas dentro de ciertos límites geográficos, por la existencia y diversidad de los grupos étnicos y por la disponibilidad del recurso.

México es un país vasto y diverso en recursos vegetales, ya que prácticamente todos los grandes tipos de vegetación existentes en el mundo se presentan en el país y su distribución a menudo es compleja, en función de la amplia variedad de topografía, climas, suelos y usos de la tierra [1]. Sin embargo, el conocimiento sobre la flora mexicana es muy deficiente y fragmentado, aún en sus aspectos básicos; basta mencionar que la descripción botánica de especies presentes en nuestro país, se encuentra en proceso.

El conocimiento de la vegetación y sobre todo de sus interrelaciones ecológicas con los diferentes factores del medio ambiente, constituye hoy en día una base indispensable para el adecuado aprovechamiento y la debida conservación de la flora mexicana.

En las últimas décadas, con el advenimiento de la revolución industrial y la producción masiva de bienes y servicios; muchos recursos naturales han sido sobre explotados de manera tal que hacen peligrar no sólo la producción industrial, sino la existencia del mismo recurso y el equilibrio ecológico mundial.

En este aspecto, los profesionales de la química tienen un papel central, ya que al ser esta ciencia la disciplina que estudia la estructura de la materia y sus transformaciones, resulta evidente que tales conocimientos son esenciales para analizar problemas complejos, ofrecer alternativas, y eventualmente, coadyuvar a la resolución de los mismos.

Con base en lo anterior, el presente trabajo está enmarcado en el área de los productos naturales, específicamente en lo referente al estudio de plantas medicinales mexicanas, como *Cirsium jorullense* (cardo santo), la cual es originaria de San Rafael Tlalmanalco, Estado de México.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El estudio de una planta medicinal, requiere de una metodología específica para examinar las interacciones y relaciones entre los componentes biológicos, químicos y culturales del medio ambiente [2].

El empleo de las plantas medicinales forma parte de nuestra cultura y tradiciones. Sin embargo, el cardo santo, al igual que otras plantas utilizadas con fines curativos por los diversos grupos étnicos y sociales que habitan nuestro país, carecen de estudios botánicos, fitoquímicos, farmacológicos y de aplicación clínica.

Así mismo, las plantas superiores han servido de alimento para hombres y animales, ya que estas además acumulan cantidades considerables de sustancias orgánicas (metabolitos secundarios), las cuales pueden servir principalmente como productos farmacológicos de gran interés en el tratamiento de diversas enfermedades, además de jugar un papel muy importante en la naturaleza.

Por otro lado, la investigación química y biológica en el área de productos naturales ha mostrado un gran desarrollo, gracias a los avances en técnicas instrumentales de análisis y al interés que se tiene sobre algunos metabolitos secundarios que presentan un reto a la química orgánica y son de gran interés para la medicina contemporánea.

Por lo anterior, el presente proyecto tiene como finalidad describir el estudio químico¹ y la evaluación biológica² de *Cirsium jorullense*, especie vegetal utilizada por los habitantes de San Rafael Tlalmanalco, Edo. de México, en el tratamiento de enfermedades de las vías respiratorias y gastrointestinales³.

¹ El estudio químico comprende el aislamiento y determinación de la estructura molecular de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en esta especie vegetal.

² La evaluación biológica abarca la determinación de la actividad antimicrobiana, tóxica y antiinflamatoria de extractos y sustancias puras.

³ Comunicación personal con la M. en C. Abigail Aguilar. Herbario del Centro Médico Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

II. *Fundamentación teórica*

La importancia que tiene el conocimiento sobre la estructura química de las sustancias presentes en las plantas superiores, es de gran utilidad práctica, tanto para la investigación básica como para fines industriales, entre las cuales se pueden mencionar: la industria farmacéutica, de alimentos, agroquímicos y cosméticos, entre otras. Sin embargo, es importante reiterar que los aspectos utilitarios de los recursos naturales deben considerarse sólo después de un estudio integral de los mismos y sobre la viabilidad de su aprovechamiento racional.

A pesar de la gran diversidad de aplicaciones, las mayores contribuciones de los estudios fitoquímicos se enfocan en la determinación de la estructura química, origen biosintético y modo de acción de los productos naturales en el campo de la fisiología vegetal.

El proceso de estudio de una planta, es una actividad en la cual se requiere un amplio trabajo con una estrecha relación de diversas áreas como Biología, Farmacología, Farmacognosia, Química y Toxicología [3]. Para ello, como trabajo de investigación en el área de la Química de Productos Naturales requiere de diversas técnicas. Es necesario primero realizar la selección, colección, clasificación y preparación del material a estudiar, para seguir con la extracción con disolventes de diferente polaridad y análisis preliminar. El extracto crudo obtenido, contiene sin embargo numerosas sustancias, que para lograr su aislamiento y purificación es necesario conformar una estrategia de separación que requerirá de técnicas de extracción, destilación, cristalización y cromatográficas. En la actualidad, una gran cantidad de laboratorios emplean técnicas de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) para el seguimiento y control de la pureza final de sus productos aislados.

Una vez obtenidas las sustancias puras, se determinan las propiedades físicas y sus características moleculares. Para ello, se utilizan métodos espectroscópicos como la absorción molecular en la región del ultravioleta y visible [3], la cual depende de la estructura electrónica de la molécula que se encuentra asociada con moléculas conjugadas. La conjugación aumenta la longitud de onda de la absorción al disminuir la diferencia energética entre el estado fundamental y el estado excitado.

La espectroscopia de infrarrojo, es uno de los métodos más utilizados, dado que permite identificar grupos funcionales presentes en una molécula, Los átomos que la forman oscilan o vibran constantemente alrededor de sus posiciones de equilibrio a temperatura ordinaria, la amplitud de estas oscilaciones es muy pequeña y su frecuencia de vibración es relativamente elevada. Esta frecuencia está asociada a la longitud de onda ubicada en la radiación infrarroja, por lo que existe una interacción de dicha radiación con las vibraciones atómicas de una molécula. Por lo tanto, al incidir una radiación infrarroja de frecuencia apropiada, ocurre una absorción de energía por las moléculas registrándose en un gráfico el porcentaje de la radiación absorbida (o transmitida) en función de la longitud de onda [4].

Uno de los métodos más sensibles es la espectrometría de masas (EM), la cual se basa en la ionización de la molécula a investigar y su ruptura en fragmentos iónicos mediante la aplicación sobre la muestra de un haz de electrones, con lo que se produce un catión molecular M^+ , donde se obtiene el peso molecular de la sustancia problema, el cual es de gran valor en la determinación de su estructura. El estudio de fragmentación, proporciona mucha información que permite reconstruir la estructura total de los compuestos. Además, se han descubierto varias interfaces de la EM como el termospray (TSP)⁴, el flujo continuo FAB (CF-FAB) y el electrospray (ES)⁵.

Otra técnica para la determinación de las características moleculares es la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) [5], la cual da información sobre el entorno químico, el número, tipo y relación de hidrógenos. La RMN-¹³C nos permite conocer el ambiente químico, tipo de hibridación y en algunos casos su orientación en las moléculas.

Actualmente se tiene acceso a equipos mucho más sofisticados que permiten desarrollar otras técnicas espectroscópicas, como el COSY, HETCOR, DEPT, HMBC, HMQC, NOESY, entre otras, con las cuales se posee mayor información en la elucidación estructural.

⁴ El TSP permite la ionización de constituyentes moderadamente polares como polifenoles o terpenoides en un rango de $200 \pm$ unidades de masa atómica (uma).

⁵ El CF-FAB o el ES son empleados generalmente para grandes moléculas polares (mayor a 800 uma)

La búsqueda química de sustancias de los extractos crudos de las plantas, ha permitido con el paso del tiempo, la localización de miles de ellas con diversas propiedades biológicas; sin embargo se ha tomado especial interés por el estudio de ciertas familias que han demostrado poseer peculiares e importantes características químicas, biológicas, taxonómicas, entre otras, como en el caso de la familia *Compositae*.

A. Familia *Compositae*.

Las Compuestas, es una de las familias más numerosas del grupo de las fanerógamas. Está integrada por alrededor de 1, 000 géneros y unas 13, 000 especies [7]. Se encuentra muy diversificada y mejor representada en el norte y centro de la República Mexicana, lo cual se debe, principalmente, a factores ecológicos, pues el clima húmedo y caliente es el menos favorable para este grupo de plantas que alcanzan su máxima representación en sitios secos y en lugares más frescos de las regiones montañosas.

De la gran variedad de plantas que conforman el hábitat natural, la familia *Compositae* es la más vasta dentro de las fanerógamas y la que cuenta con una mayor distribución en el mundo. Se conocen 316 géneros en la familia *Compositae*, distribuidos en dos subfamilias y 13 tribus, las cuales son: *Heliantheae*, *Helenieae*, *Astereae*, *Eupatorieae*, *Imuleae*, *Anthemideae*, *Calenduleae*, *Mutisieae*, *Cichorieae*, *Senecioneae*, *Vernoniaeae*, *Arctateae* y *Asteracea* [8].

Mas allá del conocimiento de la herbolaria medicinal china, hindú y azteca, existe una gran variedad de remedios y paliativos para la preservación de la salud que incluyen plantas medicinales y/o combinaciones de éstas. Razón por la cual, el nuevo enfoque que se ha dado en la investigación de la química de los productos naturales aislado de plantas medicinales, ha sido por la necesidad de validar los conocimientos empíricos que se tienen sobre una especie vegetal determinada, conocer los mecanismos de acción y establecer con claridad la estructura molecular de los principios activos en las plantas.

Entre estas últimas, están comprendidas algunas que poseen actividad antitumoral o antibacteriana y otras que constituyen fuentes comerciales de látex.

Químicamente la familia *Compositae*, como era de esperarse por su dimensión, contiene una amplia variedad de metabolitos secundarios, los cuales se han clasificado en los siguientes grupos: 1). Compuestos acetilénicos, 2) Terpenos, 3) Flavonoides y 4) Sustancias diversas.

Los compuestos acetilénicos, están presentes en todas las tribus de la familia *Compositae* y la variación de la estructura de estos compuestos es extremadamente amplia. Las tribus *Anthemideae*, *Arctateae*, *Astereae*, *Helenieae*, *Heliantheae*, *Inuleae* y *Cynereae* son especialmente ricas en acetilenos [8]. Los flavonoides y terpenos (aceites esenciales, lactonas sesquiterpénicas y triterpenos) están ampliamente distribuidos, a diferencia de los alcaloides, cumarinas y diversos constituyentes fenólicos que tienen una distribución limitada.

1. Compuestos insaturados.

El grupo de las olefinas, está formado por hidrocarburos de cadena abierta en los que existe un doble y/o triple enlace entre dos átomos de carbono. La fórmula general del grupo es C_nH_{2n} , donde n es el número de átomos de carbono, ejemplo de ello son el aplotaxeno (38) y Shikokiol C (54), metabolitos aislados del género *Cirsium*, el cual se encuentra enmarcado dentro de la tribu *Cynereae*.

Los compuestos insaturados, constituyen uno de los principales metabolitos presentes en la familia *Compositae*. Son moléculas lineales en las cuales dos átomos de carbono comparten tres pares de electrones y están representados en términos generales por trienos conjugados cuya estructura base es el acetileno.

Al igual que los alcanos, los miembros más bajos son gases, los compuestos intermedios son líquidos y los más altos son sólidos. Los compuestos de los grupos de los alquenos son más reactivos químicamente que los compuestos saturados. Reaccionan fácilmente con sustancias como los halógenos, adicionando átomos de halógeno a los dobles enlaces.

2. Flavonoides.

En las plantas, los flavonoides se encuentran en gran abundancia, apareciendo en una amplia variedad de formas estructurales, que junto con los carotenos son los responsables de dar color a flores y frutos. Los flavonoides contienen 15 átomos de carbono en su núcleo base y presentan un arreglo $C_6-C_3-C_6$, en el cual dos núcleos bencénicos (A y B) están unidos por un anillo cromano en posición 2, 3, o 4. Aparecen en las plantas como *O*-glucósidos, donde uno o más de los grupos $-OH$ están enlazados a uno o varios azúcares por un enlace hemiacetal [9]. Se clasifican de acuerdo a la posición del anillo B (figura 1) en: (a) 1,3-diarilpropanos, (b) 1,2-diarilpropanos y (c) 1,1-diarilpropanos [9-10].

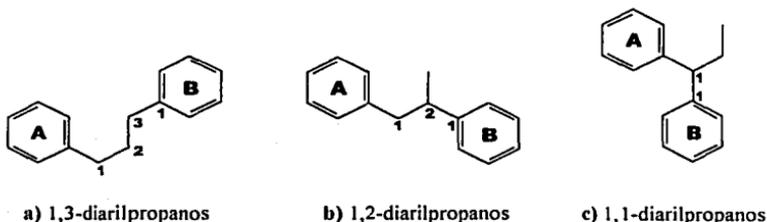
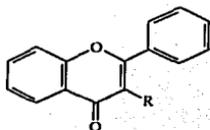


Figura 1. Esqueleto base de los diferentes diarylpropanos.

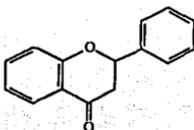
1. 1,3-diarilpropanos.

Son en su mayoría pigmentos responsables de la coloración de numerosas flores y algunos frutos. El elemento común de estos compuestos está relacionado con un núcleo básico, el 2-fenilcromano. El término 1,3-diarilpropano se asocia a una gran diversidad de estructuras:

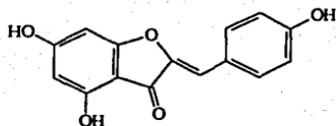
- 2-fenilcromonas: flavonas (1), flavonoles (2), flavanonas (3).
- auronas (4).
- 2-fenilcromanos: 3-flavanol (5) y 3,4-flavandioles (6).
- flavilios: antocianos (7).
- chalconas: flavonas abiertas (8).



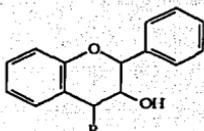
(1) R = H
(2) R = OH



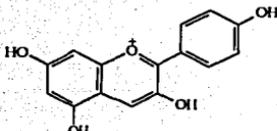
(3)



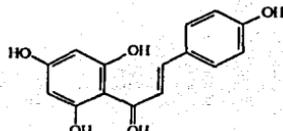
(4)



(5) R = H
(6) R = OH



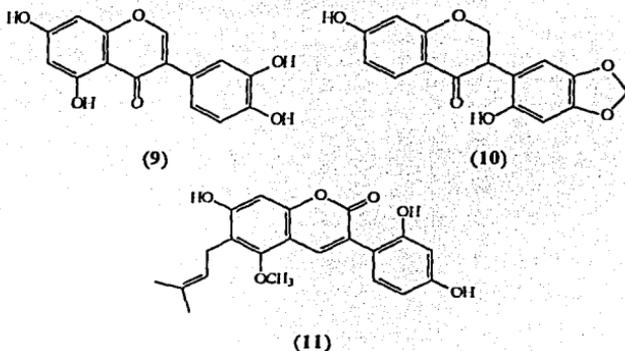
(7)



(8)

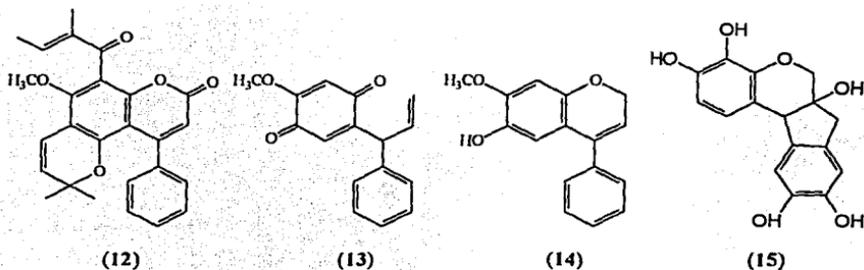
2. 1,2-diarilpropanos.

En los vegetales gran parte de los isoflavonoides correspondes a las fitoalexinas, es decir las sustancias producidas por una planta en respuesta a una infección por un agente patógeno. El término 1,2-diarilpropano se asocia a un importante grupo de estructuras, como son: isoflavonas (9), isoflavanonas (10), 3-arylumarinas (11).



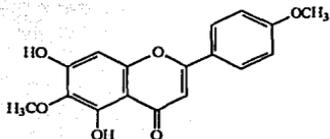
3. 1,1'-diarilpropanos.

La diversidad estructural de estos compuestos es ilimitada, donde las 4-arilcumarinas (12), dalbegionas (13), neoflavenos (14) y 4-arilcromanos (15) son ejemplos característicos de estos compuestos.

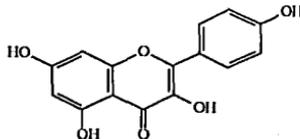


Un gran número de flavonas y flavonoles sustituidos se han identificado en la familia *Compositae*; aunque también se han identificado en pocas tribus, diversas chalconas y auronas.

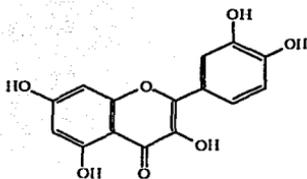
Por ejemplo: la pectolinarigenina (16) se ha separado de ocho especies de *Cirsium* (*microspicatum*, *otaye*, *yoshizawae*, *japonicum*, *kagamontanum*, *nipponicum*, *inundatum* y *oleraceum*) [11]; el kamferol (17) y la quercetina (18) se encuentran en 21 especies de esta familia; las antocianinas han sido identificadas en 11 géneros, siendo la cianidina (19) la más representativa de este grupo de compuestos.



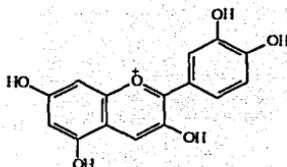
(16)



(17)



(18)



(19)

b. Propiedades biológicas.

La función de los flavonoides como atrayentes de insectos para la realización de la polinización es muy importante. Otras funciones son atribuidas como agentes protectores contra la luz UV y contra diversos organismos fitopatogénicos [9].

La actividad biológica de los flavonoides fue primeramente sugerida por Szent-Györgyi [1], quién informó que la cáscara del limón es efectiva para prevenir la caída del cabello y la fragilidad del mismo asociada con el escorbuto.

Este grupo de sustancias presenta un amplio espectro de propiedades, entre las que se encuentran: antiinflamatorias, antitumorales, antihepatotóxicas, efectos en el sistema vascular, antimicrobiana, antiviral, antialérgica, hipoglucémico, anticoagulante, además inhiben la actividad de diferentes enzimas (reductasa aldosa, oxidasa xantina, AMPc, Bomba ATPasa- 2^+ Ca, proteinasa tirosina, β -glucuronidasa, aromatasas, etc.) mientras que otros tienen actividad antioxidante [12].

Dada la diversidad de las actividades biológicas que presentan los flavonoides y para los fines del presente trabajo, se discutirán detalladamente esta clase de compuestos en términos de su capacidad para afectar la respuesta inflamatoria.

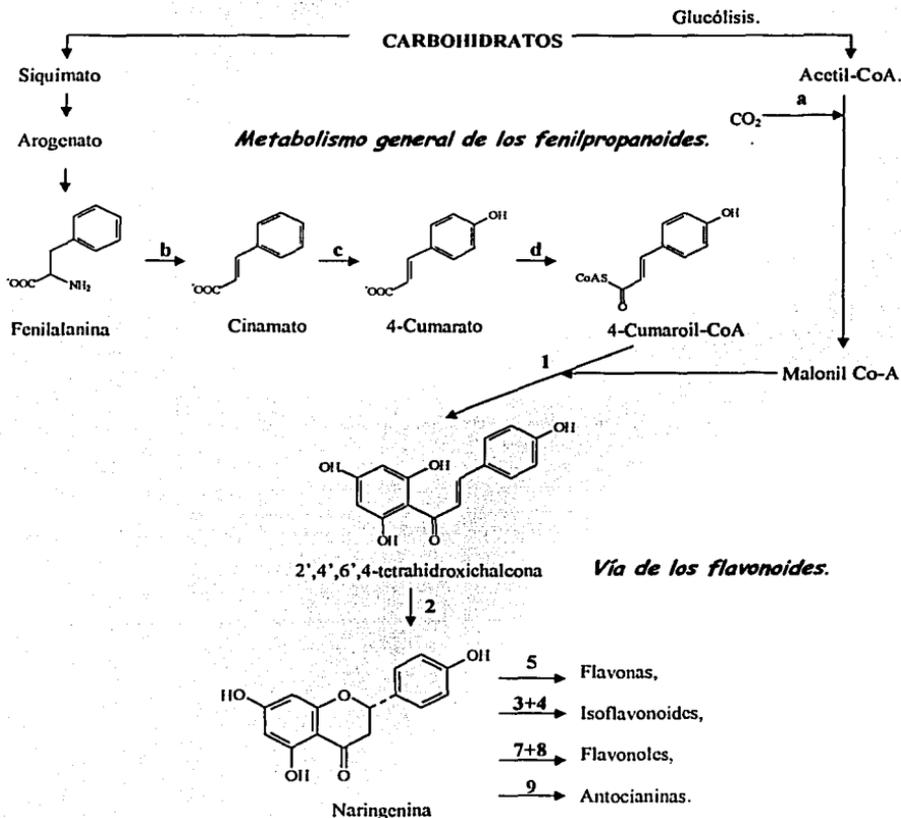
1. Actividad antiinflamatoria.

El interés de los flavonoides como agentes antiinflamatorios naturales, se debe a que presentan ciertas ventajas frente a los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (FAINE) clásicos, debido a que tienen un amplio margen de seguridad y mínima ulcerogenicidad, además de su baja toxicidad cuando son empleados en un tratamiento prolongado [13].

c. Biosíntesis.

Diversos experimentos, con precursores radioactivos, han revelado que el esqueleto de carbono del flavonoide es derivado de tres unidades de acetato y de la fenilalanina [11]. Los pasos de la reacción encaminada a la formación de los precursores de los flavonoides se ilustran en el esquema 1.

El anillo A es formado a partir de tres unidades de acetato, proporcionadas por la malonil-CoA, la cual se obtiene a partir de la condensación de acetilcoenzima A (acetil-CoA) con dióxido de carbono y cuya reacción es catalizada por la acetil-CoA carboxilasa (α); mientras que el anillo B y C-2, C-3 y C-4, del anillo heterocíclico, provienen del éster de ácido hidroxicinámico, (el 4-cumaroil-CoA).



Enzimas: (a) Acetil-CoA carboxilasa, (b) Fenilalanina amoniliasa, (c) Cinamato-4-hidroxilasa, (d) 4-cumarato ligasa, (1) Chalcona sintasa, (2) Chalcona isomerasa, (3) 2-hidroxiisoflavanona sintasa, (4) 2-hidroxiisoflavanona desidratasa, (5) Flavona sintasa I y II, (6) Flavonona-4-reductasa, (7) Flavonona-3-hidroxilasa, (8) Flavonol sintasa.

Esquema 1. Mecanismo general de la biosíntesis de los flavonoides.

El 4-cumaroil-CoA se produce en el primer paso del metabolismo general del fenilpropanoide, el cual inicia con la síntesis de la fenilalanina a través de la vía del siquimato/arogenato.

La reacción clave es la deaminación de la fenilalanina, catalizada por la fenilalanina-amonioliasa (b), la cual une el metabolismo primario con la vía del fenilpropanoide. El producto de la reacción, el *trans*-cinamato, es hidroxilado a 4-cumarato por la cinamato-4-hidroxilasa (c). La activación del 4-cumarato con la formación del ester CoA, el 4-cumaroil-CoA, es catalizada por la 4-cumarato ligasa (d).

La enzima clave en la formación del esqueleto del flavonoide es la chalcona sintasa (1), la cual cataliza la condensación de tres unidades de malonil-CoA con el 4-cumaroil-CoA, para la obtención del intermediario de 15 carbonos, la 2',4',6',4-tetrahidroxichalcona. (esquema 2).

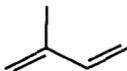
La segunda reacción clave, es la ciclización estereoespecífica de la chalcona, que es catalizada por la chalcona isomerasa (2) formando una (2S)-flavanona con el esqueleto del flavonoide típico (esquema 1).

Las flavanonas son los precursores directos de una gran clase de flavonoides. Los isoflavonoides, los cuales están involucrados en la síntesis de fitoalexinas⁶ (ej. pterocarptano) y en la formación de dos intermediarios de flavonoides, los flavan-4-ol y los dihidroflavonoles. Las flavonas (ej. apigenina) que son obtenidas a partir de la introducción de un doble enlace entre el C-2 y C-3 por dos tipos de enzimas la Flavona sintasa I y II (5). La reducción del grupo carbonilo produce los flavan-4-ol (ej. apiforol), reacción catalizada por la Flavanona-4-reductasa (6). Finalmente, las flavanonas pueden ser hidroxiladas en la posición 3 por la flavanona-3-hidroxilasa (7) para producir los dihidroflavonoles (ej. dihidrokaemferol), los cuales son intermediarios en la formación de flavonoles, catequinas, proantocianidinas y antocianidinas.

⁶ Metabolitos que juegan un rol principal en la inhibición del crecimiento de hongos patógenos *in vivo* [9].

3. Terpenos.

Un gran número de sustancias están agrupadas a la palabra "terpeno", término que indica que todas ellas tienen un origen sintético común. Los terpenos están constituidos por varias unidades de isopreno (20) y se clasifican de acuerdo al número de unidades que los conforman tabla I



(20)

Tabla 1. Clasificación de los terpenos de acuerdo a las unidades de isopreno [16].

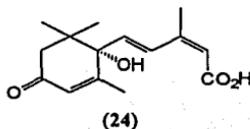
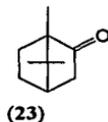
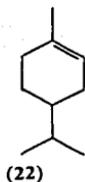
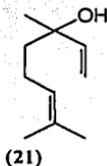
Número de unidades de isopreno	Número de carbonos	Nombre o clase	Algunos tipos e incidencia.
1	C ₅	isopreno	detectado en las hojas de <i>Hamamelis japonica</i>
2	C ₁₀	monoterpeno	monoterpenos en aceites esenciales (ej. mentol) lactonas monoterpénicas (ej. nepetalactona)
3	C ₁₅	sesquiterpeno	sesquiterpenos en aceites esenciales lactonas sesquiterpénicas (especialmente en la familia <i>Compositae</i>) abscisinas (ej. ácido abscísico)
4	C ₂₀	diterpeno	ácidos diterpénicos en las resinas de las plantas giberelinas (ej. ácido giberélico)
6	C ₃₀	triterpeno	esteroles (ej. β-sitosterol) triterpenos (ej. β-amirina) saponinas (ej. yamogenina) glicósidos cardíacos
8	C ₄₀	tetraterpeno	carotenoides (ej. β-carotenos)
n	C _n	polisopreno	caucho (ej. en <i>Hevea brasiliensis</i>)

Dentro de los terpenos encontramos a: aceites esenciales, lactosas sesquiterpénicas, entre otros.

a. Aceites esenciales.

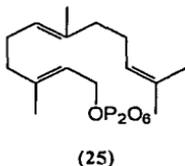
Son metabolitos secundarios presentes en los diversos órganos de las plantas. Se les puede encontrar en hojas, flores, frutos, entre otros. Son una mezcla de terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos) y menos frecuentemente compuestos arénicos derivados del fenilpropano, los cuales son responsables del olor característico de los vegetales.

Los aceites esenciales son comercialmente importantes como bases para perfumes y en la industria alimenticia se emplean como especias y saborizantes, además de tener funciones biológicas bien definidas como la polinización, medio de defensa, entre otras [17]. La familia *Compositae* particularmente es rica en aceites esenciales. Ejemplo de estos compuestos son: linalol (21), limoneno (22), alcanfor (23) y ácido abscísico (24).



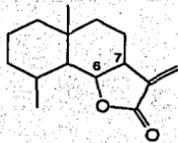
b. Lactonas sesquiterpénicas.

Entre los sesquiterpenos destacan las lactonas sesquiterpénicas, por sus interesantes propiedades químicas y biológicas⁷. Son derivadas del pirofosfato de farnesilo (25) y se han encontrado en diversas tribus de esta familia.

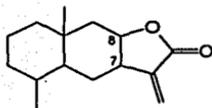


⁷ Dentro de las que destacan la antihelmíntica de la santonina e inhibidora de tumores cancerosos que posee la vernolepina [18]

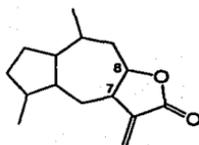
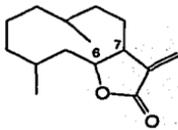
Las lactonas sesquiterpénicas pueden presentar como esqueleto base, a las del tipo: eudesmanólidas — biciclo 6/6 — (26), germacranólidas — anillo de 10 miembros — (27) y guayanólidas — biciclo 5/7 — (28). Algunos de ellos poseen actividad citotóxica.



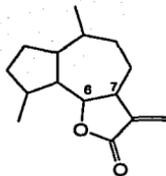
(26) Eudesmanólidas



(27) Germacranólidas



(28) Guayanólidas

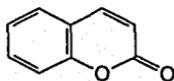


Una característica muy importante y común en todas ellas, es la presencia de un anillo γ -lactona, que se da por el cierre hacia los carbonos 6 o 8, y el cual en muchos casos presenta un grupo α -metileno conjugado con el grupo carbonilo.

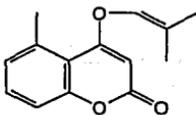
4. Sustancias diversas

Además de las sustancias ya mencionadas, se han aislado, aunque en menor proporción:

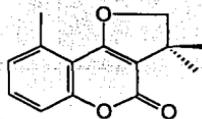
a) *Cumarinas*



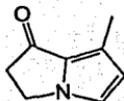
(29) Cumarina



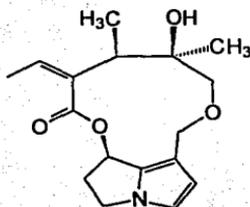
(30) Gerberocumarina



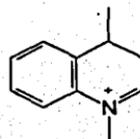
(31) Isogerberocumarina

b) *Alcaloides.*

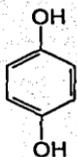
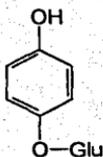
(32) Feromona



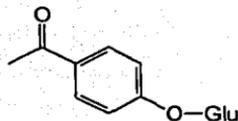
(33) Senecionina



(34) Echinorina

c) *Compuestos Fenólicos*(35) *p*-hidroxifenol

(36) Arbutina



(37) Piceina

Por último la familia *Compositae* cuenta con marcadores quimiotaxonómicos de tipo benzopirano y benzofurano, sin descartar a las tiarubinas, tertiofenos y polienos por sus interesantes propiedades biológicas, entre las que destacan citotóxica, antimicrobiana y antiviral [9]. Entre los miembros de la familia *Compositae* utilizados como medicinales hay que recordar la raíz de diente de león (*Taraxacum officinale*), el lactucario o “opio de lechuga” (*Lactuca virosa*) y las orejas de ratón o pelosilla (*Hieracium pilosella*) que poseen actividad antibiótica y han sido utilizados para el tratamiento de la fiebre de Malta [10].

B. Género *Cirsium*.

El género *Cirsium* pertenece a la familia de las Compuestas y su descripción se encuentra muy bien detallada en la literatura [17-18], además se localiza ampliamente distribuido en las regiones secas y en los lugares más frescos de las regiones montañosas. Se clasifica dentro de la tribu *Asteraceae* (*Cynareae*), la cual comprende entre 2500 y 2900 especies en 80 géneros. Sólo cerca de 300 de estas especies de alrededor de 25 géneros han sido investigadas químicamente [8].

1. Usos Medicinales del Género *Cirsium*.

En México, se encuentran diversas especies de *Cirsium* empleadas en la Medicina Tradicional para el tratamiento de diferentes padecimientos, que se muestran en la tabla 2. Entre ellas se encuentra *Cirsium jorullense*, especie vegetal utilizada por los habitantes de San Rafael Tlalmanalco, Estado de México, para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y de las vías respiratorias

Cirsium jorullense es una hierba erecta de hojas oblongas, de 6-9 cm de largo, lobulado-dentadas, espinosas en el margen, cabezuelas agrupadas en el extremo de las ramas, miden aproximadamente 2 cm, con flores violáceas que florecen en los meses de julio a septiembre [2].

Tabla 2. Usos medicinales de algunas especies del género *Cirsium*.

Nombre científico/ Nombre Común	Localidad	Padecimiento uso	Parte utilizada	Referencia
<i>C. anartiolepis</i> <i>Cardosanto</i>	Michoacán	Granos, heridas y asma.	-----	[19]
<i>C. conspicum</i> <i>Cardosanto</i>	Quimixtlan y Puebla	Dolor de corazón y pulmón	Flor ¹	[20]
<i>C. erenbergi</i> <i>Cardo</i>	Centro del País	Vías respiratorias, flujo vaginal, presión arterial, ojos, antiinflamatorio	-----	[19]
<i>C. chlorolepis</i>	-----	Fractura y hematuria	Raíz	[59]
<i>C. jorullense</i> <i>Cardosanto</i>	Estado de México	vías respiratorias, gastrointestinales	Flor ²	[19]
<i>C. japonicum</i> DC. Var. <i>ussuriense</i>	-----	Antiinflamatorio	-----	[56]
<i>C. japonicum</i>	-----	Artritis reumatoide, hematemesis y hematuria	-----	[21, 54]
<i>C. mexicanum</i> <i>Cardosanto</i>	Estado de México	Calentura y "mal de orín"	Flor ²	[20]
	Mizántla, Veracruz	Diabetes	Raíz ¹	[20]
<i>C. cf. pinetorum</i> . <i>Greenm</i> <i>Cardosanto</i>	Tlaxcala	Antiinflamatorio en heridas cutáneas	-----	[20]
<i>C. raphilepsis</i> <i>Cardosanto</i>	Hutil, Hidalgo	Diabetes y riñon	Flor ²	[20]
	Puebla	Reumas	-----	[19]
	Michoacán	Dolor de corazón	-----	[19]
<i>C. subcoreaccum</i> <i>Cardosanto</i>	Puebla y Oaxaca	Tos	Flor ²	[20]

Preparación: (1) Cocimiento, (2) Infusión.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

2. Química del género *Cirsium*.

Pocos han sido los estudios realizados al género de donde se ha aislado una serie de metabolitos secundarios novedosos e interesantes, tales como poliacetilenos, flavonoides, terpenos, ácidos orgánicos, entre otros. Los cuales se enlistan en la tabla 3 y se muestran en la figura 2. Siendo los poliacetilenos y flavonoides dos grupos de metabolitos de gran interés por la variedad de sustancias aisladas y por la valiosa actividad biológica que presentan.

Tabla 3. Constituyentes químicos del género *Cirsium*.

Especie	Constituyente	Estructura	Referencias
<i>C. japonicum</i>	Aplotaxeno	38	[21-23]
	Epóxido del aplotaxeno (11,12-epóxi-heptadeca-1,8,14-trieno)	39	
	Dihidroaplotaxeno	40	
	Tetrahidroaplotaxeno	41	
	Hexahidroaplotaxeno	42	
	Heptadeca-1-en-11,13-diin-8,9,10-triol	43	
	<i>cis</i> -8,9-epóxiheptadeca-1-en-11,13-diin-10-ol	44	
	Acetonido del heptadeca-1-en-11,13-diin-8,9,10-triol	45	
	<i>cis</i> -8,9-epóxiheptadeca-10-ol	46	
	Cirineol A	47	
	Cirineol B	48	
	Cirineol C	49	
	1-pentadeceno	50	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 3. Continuación.

Especie	Constituyente	Estructura	Referencias
<i>C. nipponicum</i> var. <i>shikokianum</i>	Shikokiol A	51	[24]
	Acetonido del shikokiol A	52	
	Shikokiol B	53	
	Shikokiol C	54	
	9-acetoxi-8-hidroxieptadeca-1,11,14-trieno	55	
	8-acetoxi-9-hidroxieptadeca-1,11,14-trieno	56	
<i>C. helenoides</i>	Aplotaxeno	38	[25]
	Epóxido del aplotaxeno	39	
	Dihidroaplotaxeno	40	
	Tetrahydroaplotaxeno	41	
	8,9-diacetoxieptadeca-1,11,14-trieno	57	
	8-acetoxi-9-hidroxieptadeca-1,11,14-trieno	56	
	9-acetoxi-8-hidroxieptadeca-1,11,14-trieno	55	
	8,9-dihidroxieptadeca-1,11,14-trieno	51	[26]
<i>C. arvense</i>	8,9-epóxieptadeca-1,11,14-trieno	58	
	1,3-dien-5,7,9,11-tridecatetraeno	59	
	1-epoxi-11-en-3,5,7,9-tridecatetraeno	60	
	5,7-dien-9,11,13-pentadecatrienol	61	
	1,3,5-trien-7,9,11-tridecatrieno	62	
	Acetato del 3-en-9-fenil-5,7-nonino	63	
	<i>C. dipsacolepis</i>	Aplotaxeno	38
Dihidroaplotaxeno		39	
Tetrahydroaplotaxeno		40	
Hexahidroaplotaxeno		41	

Tabla 3. Continuación.

Especie	Constituyente	Estructura	Referencias
<i>C. dipsacolepis</i>	7-octenal	64	[27]
	(2E)-2,8-nonadienal	65	
	(2E)-2,9-decadienal	66	
	(2E)-2,10-undecadienal	67	
	(2E,4E)-2,4,10-undecatrienal	68	
	(2E,4E)-2,4,11-dodecatrienal	69	
	(2Z,4Z)-2,4,11-dodecatrienal	70	
	(2E,4Z)-2,4,11-dodecatrienal	71	
	n-dodecano	72	
	n-tridecano	73	
	n-tetradecano	74	
	n-pentadecano	75	
	n-hexadecano	76	
	n-heptadecano	77	
	n-octadecano	78	
	n-nonadecano	79	
	n-eicosano	80	
	2-metildodecano	81	
	2-metiltetradecano	82	
	2-metilhexadecano	83	
	3-metiltridecano	84	
	3-metilpentadecano	85	
	1-dodeceno	86	
	1-tetradeceno	87	
	1-pentadeceno	88	
	1-hexadeceno	89	
	1-heptadeceno	90	
	1 octadeceno	91	

Tabla 3. Continuación.

Especie	Constituyente	Estructura	Referencias
<i>C. hypoleucum</i> , <i>C. canum</i> , <i>C. carolinianum</i>	Aplotaxeno	38	[27]
	Epóxido del aplotaxeno	39	
	Enetetraineno	92	
	Pentaineno	93	
<i>C. olereaceum</i> , <i>C. arvense</i>	Tetracosano	94	[30-32]
	Hexacosano	95	
	Heptacosano	96	
	Octacosano	97	
	Nonacosano	98	
<i>C. texanum</i> , <i>C. olereaceum</i> , <i>C. arvense</i> , <i>C. segetum</i>	Escualeno	99	[29-33]
	Taraxasterol	100	
	Acetato de taraxasterilo	101	
	Estigmasterol	102	
	β -amirina	103	
	Lupeol	104	
	Acetato de lupeilo	105	
<i>C. echinus</i> , <i>C. syriacum</i>	β -sitosterol	106	[34-35]
	Glucósido del β -sitosterol	107	
<i>C. dipsacolepis</i>	Cipereno	108	[36]
	Ciperenol	109	
	Acetato de ciperenilo	110	
	Ciperenal	111	
	Ácido ciperénico	112	

Tabla 3. Continuación.

Especie	Constituyente	Estructura	Referencias
<i>C. japonicum</i>	Tujopseno	113	[21]
	Cariofileno	114	
	α -himachaleno	115	
<i>C. corolinianum</i>	Lactona	116	[28]
	Escutelareína	117	
	5,7,4'-trihidroxi-6-metoxiflavona	118	
	5,6,7,4'-tetrametoxiflavona	119	
<i>C. lanceolatum</i>	3-O-glucósido del kamferol	120	[37]
	3-O-glucósido de la quercetina	121	
	3-O-galactósido de la quercetina	122	
	7-O-diglucósido de la apigenina	123	
<i>C. inumdatum</i> , <i>C. japonicum</i> , <i>C.</i> <i>kagamontanum</i> , <i>C. microspicatum</i> , <i>C. nipponicum</i> , <i>C. olereaceum</i> , <i>C. otaeye</i> , <i>C. yoshizawae</i>	Pectolinarigenina	16	[9]
<i>C. arisanense</i> , <i>C. coloradense</i> , <i>C. ferum</i> , <i>C.</i> <i>kamtschaticum</i> , <i>C. pectillum</i> , <i>C. rhinoceros</i>	Pectolinarina	124	[38-47, 50].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 3. Continuación.

Especie	Constituyente	Estructura	Referencias
<i>C. albescens</i> , <i>C. hosogama</i> , <i>C. japonicum</i> , Var. australe y var. ussuriense, <i>C. kawakamii</i> , <i>C. purpuratum</i> , <i>C. variengatum</i> ,	Linarina	125	[38, 43, 47-50, 56].
<i>C. xanthocanthum</i> , <i>C. setosum</i> .	7-O-glucósido de la Linarina	127	[50]
<i>C. arvense</i> , <i>C. echinus</i> , <i>C. hosogama</i> , <i>C. oleraceum</i> , <i>C. rhinoceros</i>	Luteolina	128	[35, 46, 49, 52- 54]
<i>C. heterophyllum</i> , <i>C. kagamontanum</i> , <i>C. kawakamii</i> , <i>C. matsumurae</i> , <i>C. palustre</i>	7-O-glucósido de la luteolina	129	[39, 50, 54-55]
<i>C. heterophyllum</i>	3,4'-O-diglucósido de la luteolina	130	
<i>C. arvense</i>	7-β-glucuronidopiranosido de la apigenina	131	[52, 54]
	7-O-rutinósido de la apigenina	132	[56]
	Tricina	133	
	5-O-glucósido de la tricina	134	
	3-O-galactósido del kamferol	135	
	7-O-glucósido de la apigenina	136	[37, 54]
	3-metoxikamferol	137	
<i>C. oleraceum</i>	Quercetina	138	
	3-metoxiquercetina	139	
	3-O-digalactósido de la quercetina	140	
	3-O-rutinósido de la quercetina	141	

Tabla 3. Continuación.

Especie	Constituyente	Estructura	Referencias
<i>C. rhinoceros</i>	Apigenina	142	[45]
<i>C. setosum</i>	Acacetina	143	[59]
<i>C. echinus</i>	Rutina	144	[35, 50]
<i>C. aomurensense</i> <i>C. maritimum</i> , <i>C. tanake</i> , <i>C. japonicum</i> DC. Var. <i>ussuriense</i> <i>C. lineare</i>	4'- <i>O</i> -glucósido de la cirsimaritina	145	[50, 57]
	5,4'-dihidroxi-6,7,3'-trimetoxiflavona (Cirsilineol)	146	[50]
	5,3',4'-trihidroxi-6,7-dimetoxiflavona (Cirsileol)	147	
<i>C. maritimum</i> , <i>C. pendulum</i>	Cirsimaritina	148	[57-58]
<i>C. brevistylum</i>	4'- <i>O</i> -rutinósido de la cirsimaritina	149	
<i>C. canum</i>	Furanosesquiterpeno	150	[59]
<i>C. chlorolepis</i>	5-hidroximetil-2-furancarboxaldehído	151	
	5-metoximetil-2-furancarboxaldehído	152	
	Cirsiumaldehído	153	
	Cirsiumósido	154	
<i>C. brevicaulis</i>	Cirsiumamida	155	[60]
<i>C. steigrum</i>	<i>O</i> -acetiljacolina.	156	[61]
<i>C. lanceolatum</i>	Ácido caféico	157	[37]
	Ácido p-hidroxibenzóico	158	
	Ácido p-cumárico	159	
	Ácido ferúlico	160	
	Ácido protocatecuico	161	
	Ácido vainillico	162	
<i>C. arisanense</i> , <i>C. ferum</i> , <i>C. kawakamii</i> , <i>C. wallichii</i>	Ácido fumárico	163	[42-43, 46, 52, 61]

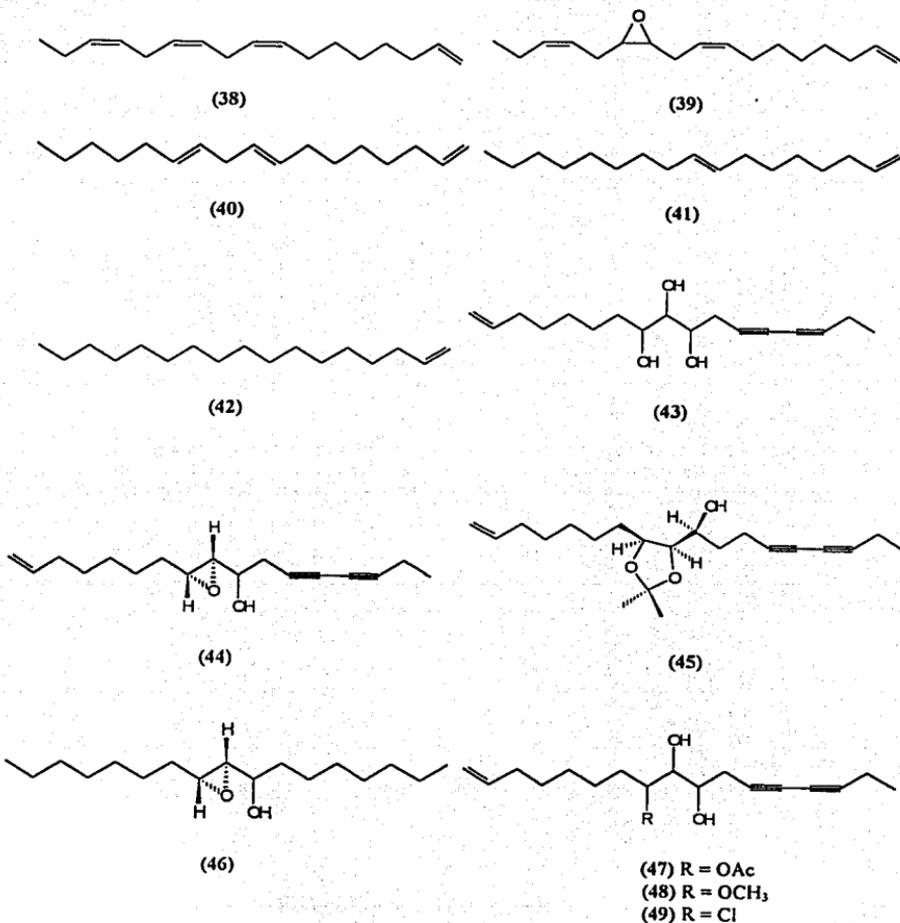


Figura 2. Estructuras de hidrocarburos insaturados aislados del género *Cirsium*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

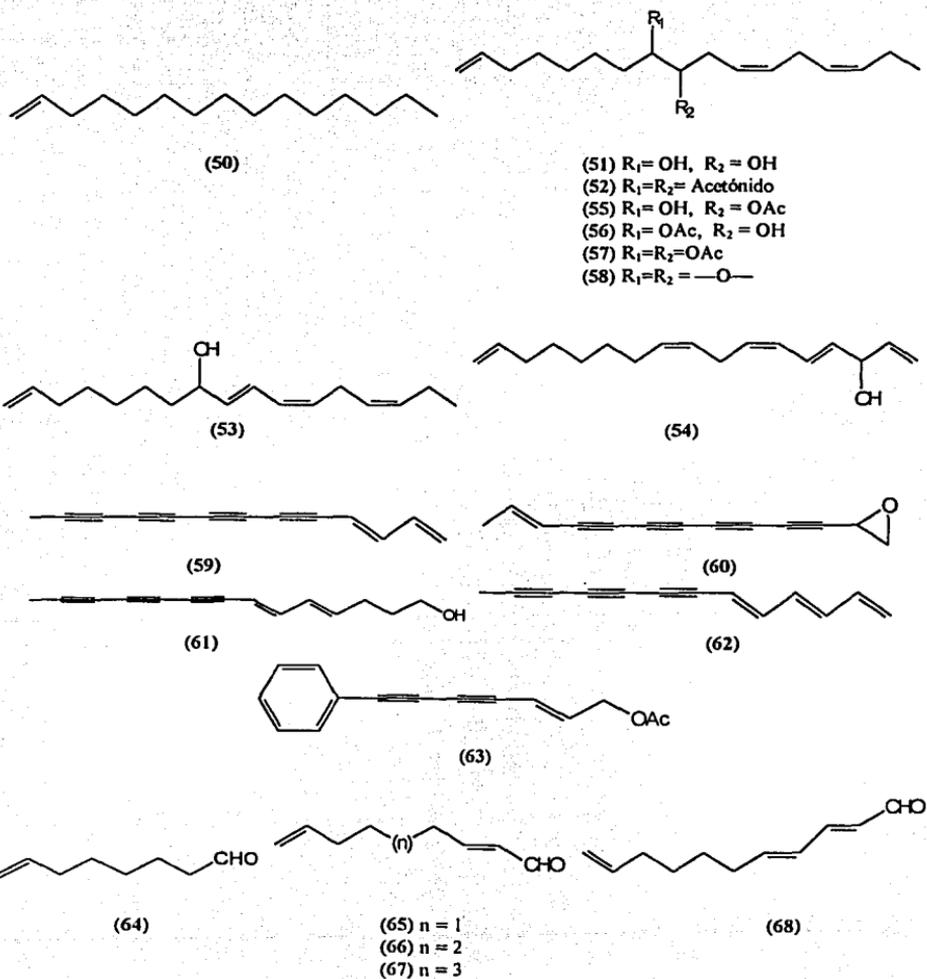
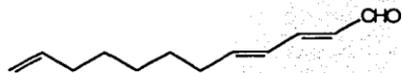


Figura 2. Continuación.



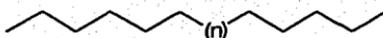
(69)



(70)



(71)



(72) n = 1

(77) n = 6

(73) n = 2

(78) n = 7

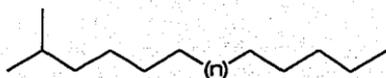
(74) n = 3

(79) n = 8

(75) n = 4

(80) n = 9

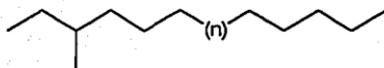
(76) n = 5



(81) n = 1

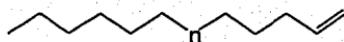
(82) n = 3

(83) n = 5



(84) n = 2

(85) n = 4



(86) n = 1

(89) n = 4

(87) n = 2

(90) n = 5

(88) n = 3

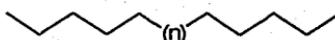
(91) n = 6



(92)



(93)



(94) n = 14

(97) n = 18

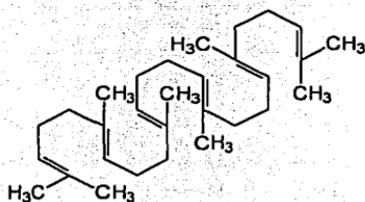
(95) n = 16

(98) n = 19

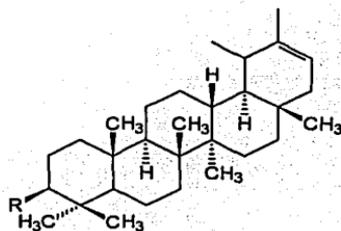
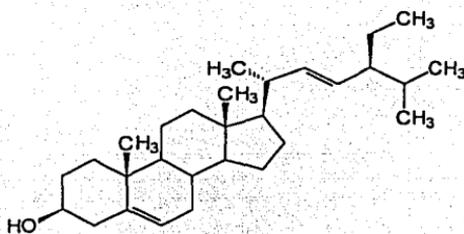
(96) n = 17

Figura 2. Continuación.

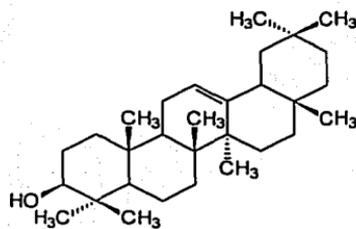
Terpenos



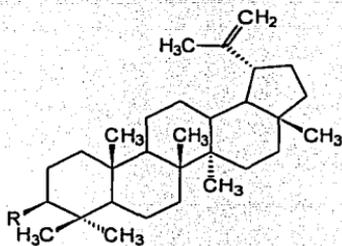
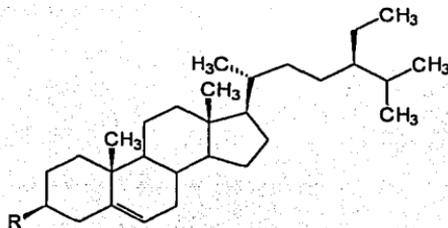
(99)

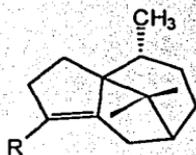
(100) R = OH
(101) R = OAc

(102)

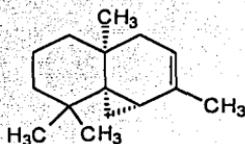


(103)

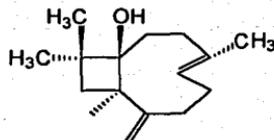
(104) R = OH
(105) R = OAc(106) R = OH
(107) R = OAcFigura 2. Estructuras de terpenos aislados del género *Cirsium*



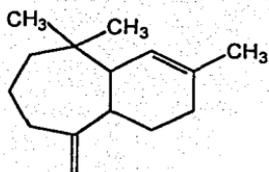
- (108) R = CH₃ (111) R = CHO
 (109) R = CH₂OH (112) R = COOH
 (110) R = OAc



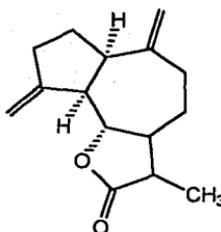
(113)



(114)

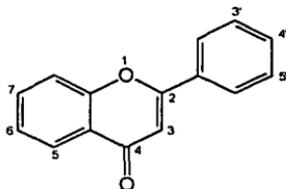


(115)



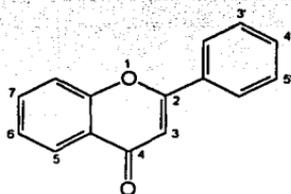
(116)

Flavonoides



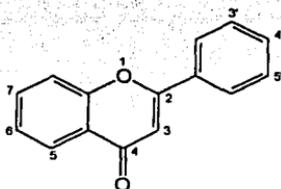
Compuesto	C ₃	C ₅	C ₆	C ₇	C _{3'}	C _{4'}	C _{5'}
117	H	OH	OH	OH	H	OH	H
118	H	OH	OCH ₃	OH	H	OH	H
119	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	H

Figura 2. Continuación.



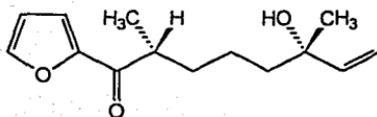
Compuesto	C ₃	C ₅	C ₆	C ₇	C _{3'}	C _{4'}	C _{5'}
120	O-Glu	OH	H	OH	H	OH	H
121	O-Glu	OH	H	OH	OH	OH	H
122	O-Gal	OH	H	OH	OH	OH	H
123	H	OH	H	O-Glu-Glu	H	OH	H
16	H	OH	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	H
124	H	OH	OCH ₃	O-Ram-Glu	H	OCH ₃	H
125	H	OH	H	O-Ram-Glu	H	OCH ₃	H
126	H	OH	H	O-Glu	H	OCH ₃	H
127	H	OH	H	OH	OH	OH	H
128	H	OH	H	O-Glu	OH	OH	H
129	O-Glu	OH	H	OH	OH	O-Glu	H
130	H	OH	H	Glucurónido	H	OH	H
131	H	OH	H	O-Glu-Ram	H	OH	H
132	H	H	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃
133	H	O-Glu	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃
134	O-Gal	OH	H	OH	H	OH	H
135	H	OH	H	O-Glu	H	OH	H
136	OCH ₃	OH	H	OH	H	OH	H
137	OH	OH	H	OH	OH	OH	H
138	OCH ₃	OH	H	OH	OH	OH	H
139	O-Gal-Gal	OH	H	OH	OH	OH	H
140	O-Ram-Glu	OH	H	OH	OH	OH	H

Figura 2. Estructuras de flavonoides aislados del género *Cirsium*

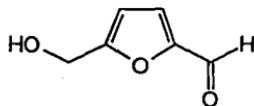


Compuesto	C ₃	C ₅	C ₆	C ₇	C _{3'}	C _{4'}	C _{5'}
141	H	OH	H	OH	H	OH	H
142	H	OH	H	OH	H	OCH ₃	H
143	O-Ram-Glu	OH	OH	OH	OH	OH	H
144	H	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	O-Glu	H
145	H	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	H
146	H	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	H
147	H	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H
148	H	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	O-Ram-Glu	H

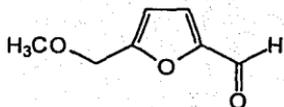
Sustancias Diversas.



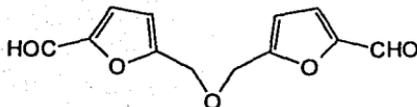
(149)



(150)

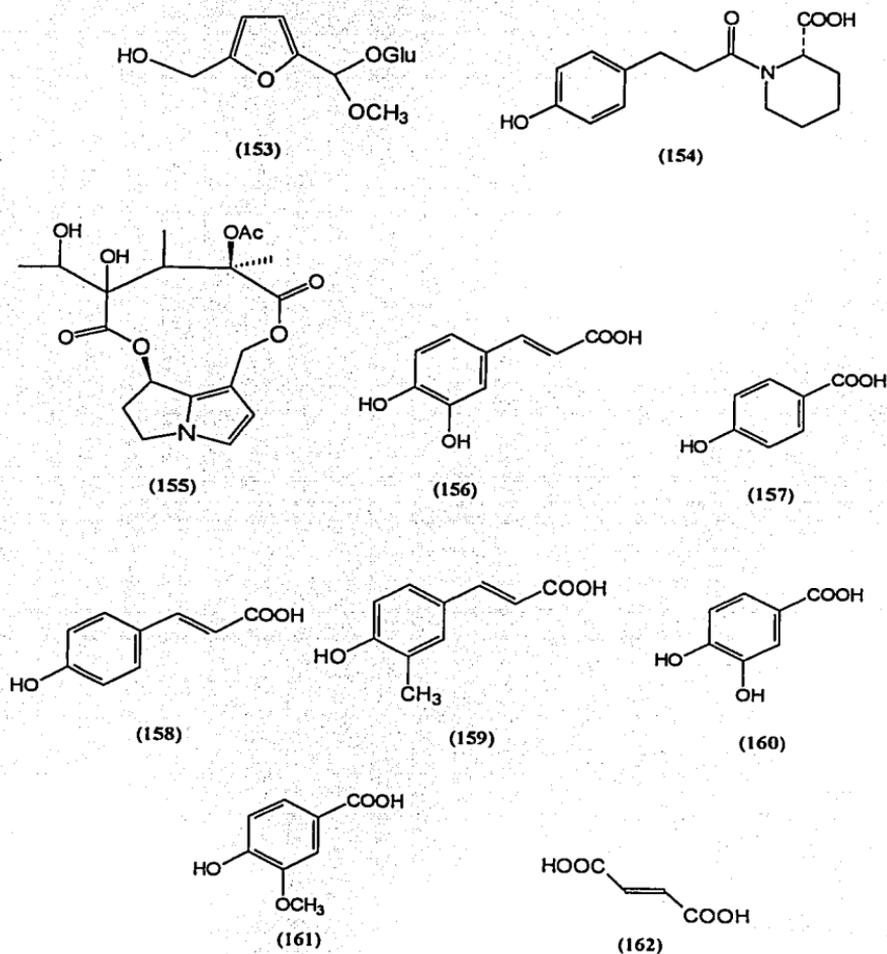


(151)



(152)

Figura 2. Continuación.

Figura 2. Estructuras de sustancias diversas aisladas del género *Cirsium*TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

a. Compuestos insaturados aislados del género *Cirsium*.

Los compuestos acetilénicos constituyen uno de los principales metabolitos secundarios del género *Cirsium*. Dentro de los más abundantes e importantes se encuentran los hidrocarburos insaturados de 17 carbonos. De las raíces de cinco especies de *Cirsium* se han aislado uno de los más importantes: el apotaxeno (38) y sus derivados dihidro-, tetrahidro-, y hexahidroaplotaxeno (40-42). Las raíces de *C. helenoides* y *C. hypoleucum* contienen el epóxido del apotaxano (39). Estos compuestos son importantes intermediarios en la síntesis de poliacetilenos de 17 carbonos a partir del ácido oléico [21], además de ser importantes marcadores quimiotaxónomicos de este género [25].

De las raíces de *C. niponicum* var. *Shikokianum* se han separado cuatro nuevos derivados del apotaxeno (51-54), los cuales son poliolefinas de 17 carbonos, siendo el shikokiol A (51) el más importante, ya que es un potente inhibidor *in vitro* de la actividad de la 5-lipoxigenasa [24], enzima clave en el metabolismo del ácido araquidónico para la formación de prostanglandinas, las cuales actúan como mediador en algunos procesos inflamatorios y juegan un rol importante en la génesis del dolor y reumatismos [62].

De las raíces de *C. helenoides* se aislaron los compuestos (51 y 55-58) que son probablemente biosintetizados por la planta a partir del epóxido del apotaxeno en presencia de agua, el cual a su vez es sintetizado por oxidación Δ^{8-9} del apotaxeno y los cuales solamente habían sido separados de *C. niponicum* var. *Shikokianum* y *C. hypoleucum* [25].

De los aceites de las raíces de *C. japonicum* se aisló el heptadeca-1-en-11,13-diin-8,9,10-triol (43), el *cis*-8,9-epóxi-heptadeca-1-en-11,13-diin-10-ol (44) y por reacción de éstos con: a) una hidrogenación catalítica el *cis*-8,9-epóxiheptadeca-10-ol (46) [22]; y b) una mezcla de 2,2-dimetóxiopropano y ácido sulforcamfónico el acetónido correspondiente (45), el cual protege los hidroxilos adyacentes confiriendo propiedades químicas y físicas diferentes muy importantes para su identificación y caracterización [23].

Además han sido separados tres novedosos acetilenos: el Cirneol A (47), B (48) y C (49), los cuales son los derivados acetilado, metilado y halogenado del compuesto (43) en el carbono C-8, respectivamente. Estos acetilenos inhiben: el crecimiento *in vitro* de las células KB [23], el crecimiento *in vitro* de *Murina leukemia* y la síntesis de proteínas, DNA y RNA *in vitro* de *Murina ascítica* (células tumorales del sarcoma 180) [24].

b. Terpenos aislados del género *Cirsium*.

Los triterpenos son un grupo muy importante de metabolitos aislados de la familia *Compositae* y en particular del género *Cirsium*. Son compuestos con un esqueleto de carbono basado en seis unidades de isopreno y los cuales son derivados biosintéticos del hidrocarburo de C₃₀, escualeno.

De las partes aéreas de *C. hypoleucum* se obtuvo el escualeno (99), el taraxasterol (100), la β-amirina (103) y lupeol (104). Las raíces de *C. canum* contienen al lupeol y taraxasterol, que también han sido obtenidos de las partes aéreas de *C. arvense* junto con el estigmasterol (98).

Se ha observado que el taraxasterol y sus derivados están ampliamente distribuidos en especies pertenecientes a las Compuestas, algunos estudios químicos citan su separación a partir de otras familias con una menor frecuencia, lo cual indica que esta familia de plantas contienen sistemas enzimáticos específicos, los cuales son responsables de la elaboración de estos compuestos [29].

La actividad biológica de los triterpenos es muy importante, sobretodo en el proceso antiinflamatorio. Por ejemplo, tres triterpenos separados de *Diopyros leucomeleas* (betulina, ácido betulínico y ácido ursólico) muestran inhibición de la inflamación sobre edemas en pata de ratón inducidos con carrigenina y serotonina [63]. Estos compuestos poseen características similares a los aislados del género *Cirsium*, los resultados obtenidos de diversos experimentos indican que el esqueleto base no tiene influencia sobre la actividad, pero la presencia de un grupo carboxílico en C₂₈ ó C₃₀ y un grupo hidroxilo en C₂₈ incrementan la actividad antiinflamatoria [64].

El acetato de taraxasterilo (101), obtenido de *C. arvense*, posee gran actividad preventiva contra el daño hepático, sin embargo la hidrólisis y la modificación de los enlaces olefinicos la disminuye de manera considerable [64].

c. Flavonoides aislados del género *Cirsium*.

Los flavonoides pueden inhibir varios estados de la inflamación, incluyendo formación de tejidos de granulación, artritis crónica y el incremento en la permeabilidad capilar.

Han sido realizadas diversas investigaciones para determinar la actividad antiinflamatoria y en recientes años se ha informado de una gran cantidad de flavonoides que presentan actividad antiinflamatoria, por ejemplo algunos derivados semisintéticos como hesperidina, metilchalcona y los O-(β -hidroxietil)-rutinósidos.

La apigenina (141) y luteolina (127), dos flavonoides representativos de la familia *Compositae* y del género *Cirsium*, inhiben la inflamación inducida por indometacina, cuyo efecto está relacionado probablemente a las propiedades antihistamínicos y antiserotonina que poseen [15].

El mecanismo de acción de los flavonoides en el proceso antiinflamatorio, se atribuye a los siguientes pasos:

Inhibición de la liberación de histamina: La degranulación de los mastocitos y la liberación de histamina se lleva a cabo por una gran variedad de agentes, tales como: concanavalina A, antígeno, lecitinas, dextranos de alto peso molecular, ATP y el ionoforo carboxilato A23187, los cuales son dependientes de la presencia de calcio extracelular [65-66].

Ciertas flavonas, notablemente la quercetina (137) separada de *C. olereaceum*, incrementa la eficiencia de la bomba dependiente de ATP, inhibiendo la ATPasa-Na⁺/K⁺ y la ATPasa-Ca²⁺ mitocondrial, siendo estas últimas la responsable para el mantenimiento de bajos niveles de calcio intracelular, inhibiendo la secreción de histamina que es dependiente de un incremento de calcio libre intracelular [67].

También se considera que la ATPasa-Ca²⁺ puede ser responsable de la entrada de calcio de los mastocitos inducida por antígenos, promoviendo la degranulación dependiente de calcio y la secreción de histamina. El orden relativo de varios flavonoides como inhibidores de la secreción de histamina en mastocitos es: fisetina>miricetina>kamferol>morina=rutina [67-68].

Esto sugiere que la ruta de acción de los flavonoides es prevenir la operación de la activación del receptor de la Inmunoglobulina E (IgE). Por lo tanto, la inducción de la secreción por estos canales o sistemas transportadores de calcio no se bloquee por el flavonoide, sino que inhiben la secreción de histamina inducida por la unión a IgE y A23187.

Además se considera que altas concentraciones de flavonoides pueden prevenir la fosforilación oxidativa, impidiendo la secreción causada por los estímulos [68].

La activación por ciertas proteincinasas, incluyendo una cinasa dependiente de fosfolípidos/calcio (C-cinasa) se considera como un aspecto importante en el proceso de transducción de señales y en la mediación de la liberación de histamina [70].

Por otro lado, el orden de activación de una serie de flavonoides como inhibidores de la secreción de histamina de basófilos humanos es la siguiente: quercetina>miricetina>fisetina>kamferol>morina>rutina. En basófilos al incrementar la concentración de calcio extracelular y la presencia de cobre, cobalto o iones magnesio disminuyen el efecto de la quercetina y otros flavonoides [69].

Cuando los macrófagos se activan, producen grandes cantidades de importantes moléculas afectoras que inician la inflamación, entre los que se encuentran el óxido nítrico (NO). Algunos artículos indican que los flavonoides suprimen la producción de NO en fagocitos [71]. La quercetina es un inhibidor importante en la quimiotaxis, degranulación de neutrófilos, también inhiben la activación de varias C-cinasas que son necesarias para la activación de neutrófilos*.

* Los neutrófilos producen potentes metabolitos oxigenados que juegan un papel esencial en una multitud de defensas, pero que también contribuye a la destrucción de tejidos en un número de desordenes inflamatorios agudos y crónicos.

Además inhiben la reacción de fosforilación dependiente de calmodulina importante para la activación de neutrófilos, mastocitos y basófilos [72, 75].

Por otra parte, el amplio interés de esta clase de productos naturales ha conducido a obtener grandes evidencias en las recientes investigaciones sobre la influencia de los flavonoides en el metabolismo del ácido araquidónico.

Esto contribuye a una mejor comprensión de las propiedades farmacológicas y bioquímicas de los flavonoides. La interacción de éstos con la enzima del metabolismo del ácido araquidónico puede emplearse como una herramienta útil para dilucidar las funciones de los derivados del ácido araquidónico en la regulación de los sistemas fisiológicos, así como, en los procesos que son la base de ciertas condiciones patológicas [73].

De esta manera los flavonoides acacetina (142) y pectolarina (124), obtenidos de *C. setosum*, inhiben las propiedades de las enzimas ciclooxigenasa-1 (COX-1) y ciclooxigenasa-2 (COX-2) necesarias para la biosíntesis de las prostaglandinas y/o la 5-LO o bien puede tener ambas propiedades (quercetina, baicaleína) [65, 73-78].

C. Generalidades de los ensayos biológicos.

El reino vegetal representa una extraordinaria reserva de moléculas, se ha estimado que de 250,000 a 500,000 especies de plantas alrededor del mundo, sólo un pequeño porcentaje ha sido investigado fitoquímicamente y la fracción sujeta a ensayos biológicos o farmacológicos es todavía más baja.

La parte crucial de una investigación de plantas con actividades biológicas y la disponibilidad de bioensayos para el monitoreo biodirigido⁹ [89] se encuentra en la capacidad de manejar una gran cantidad de muestras con sistemas de prueba que deben ser idealmente simples, rápidos, reproducibles y baratos. Si los principios activos están sólo presentes en bajas concentraciones en el extracto crudo, el ensayo debe tener alta sensibilidad para su detección. Al mismo tiempo, el número de falsos positivos tienen que ser minimizados.

Otro factor de especial relevancia para los extractos de plantas, es la solubilidad de la muestra — para lo cual se debe emplear un disolvente que no interfiera en los resultados—.

Cuando se decide realizar un ensayo biológico en la investigación de los constituyentes de una planta, el primer paso es escoger el organismo blanco. Ellos pueden ser inferiores (microorganismos, insectos, crustáceos o moluscos), sistemas subcelulares (enzimas, receptores u organelos), cultivos de células de origen humano o animal, organismos aislados de vertebrados o animales integros [88]. La complejidad de los bioensayos está en función de las facilidades, fuentes y personal disponible, la mayoría de los laboratorios fitoquímicos encargados de la investigación de plantas medicinales bioactivas, no tienen las facilidades para utilizar animales especiales (ratas, conejos, cobayos, etc.); consecuentemente, se han hecho esfuerzos para introducir bioensayos simples y baratos para el monitoreo de extractos de plantas y fracciones.

Una selección de estos bioensayos se muestra en la tabla 4, la lista cubre una gran variedad de blancos que van desde la prueba de toxicidad general con *Artemia salina* L., hasta la actividad moluscocida con *Bromphalaria glabrata*; de esta manera diferentes propiedades y tipos de enfermedades, incluyendo afecciones microbianas y enfermedades parasitarias pueden ser investigadas [87].

⁹ Un estudio biodirigido tiene como finalidad seguir la actividad biológica durante el fraccionamiento de los extractos. La actividad biológica a través de un ensayo permite conocer la naturaleza, constitución o potencia de un material o sustancia a través de la dosis empleada.

Los bioensayos en las primeras etapas de una investigación biodirigida no son específicos, sólo nos refieren toxicidad o inhibición de microorganismos. El bioensayo de toxicidad sobre *A. salina* L. de Meyer [89] y el ensayo antimicrobiano de Mitscher [90], que son los utilizados en el presente trabajo se describirán a continuación de manera sucinta.

Tabla 4. Tipos de ensayos biológicos utilizados en una investigación biodirigida [88].

TIPOS DE ENSAYOS BIOLÓGICOS	
ACTIVIDAD	BLANCO
Antibacterial.	Bacterias patógenas (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Erwinia spp.</i> , etc.).
Antifúngica.	Hongos y levaduras patógenas (<i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus spp.</i> , <i>Cladosporium spp.</i> , etc.)
Toxicidad frente al camarón hada	<i>Artemia salina</i> L.
Inhibición del desarrollo de tumores (ensayos de discos de papa).	Células de papa (<i>Solanum tuberosum</i>), tubérculo transformado por <i>Agrobacterium tumerfaciens</i> .
Actividad antimitótica	Erizo de mar (<i>Strongylocentrotus spp.</i>) huevecillos.
Actividad insecticida	Gusano africano (<i>Spodoptera spp.</i>), Escarabajo de hama mexicano (<i>Epilachna varivestis</i>).
Actividad larvicida	Mosquito vector de la fiebre amarilla (<i>Aedes aegypti</i>).
Actividad moluscocida	Caracol transmisor de la esquistosomiasis (<i>Bromphalaria glabrata</i>).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

a. Bioensayo de *Artemia salina* L.

Los organismos invertebrados especialmente los artrópodos acuáticos han adquirido gran interés en los bioensayos de toxicidad [89]. Dentro de la subclase *Branchiopoda* — los filópodos — encontramos a *Anastrocan crustaceans*, conocida como *Artemia salina* L. Sus características físicas dependen en gran medida de las condiciones en las que se encuentre, por ejemplo, se ha determinado que sus dimensiones varían de 10-12 mm con la temperatura, en tanto que el color varía de rosa pálido, en un medio con poco oxígeno, a rojo intenso con alta oxigenación [89, 91].

Las características por las cuales es usado este crustáceo son las siguientes [89]:

- Los huevecillos son de bajo costo y se mantienen viables por varios años en estado seco.
- Proporcionan una prueba de toxicidad a corto plazo debido a su rápido crecimiento.
- Se obtienen poblaciones homogéneas sincronizadas en diferentes estadios de desarrollo.

El bioensayo de *Artemia salina* L. determina la toxicidad — CL_{50} — tanto en extractos como en productos aislados [90]. Esta concentración ha sido determinada por algunos alcaloides como se observa en la tabla 5, y se ha demostrado que este método es de gran utilidad en análisis de residuos de plaguicidas, micotoxinas, anestésicos, compuestos como la morfina, entre otros

Tabla 5. Bioensayo de *Artemia salina* L. de alcaloides conocidos [89].

ALCALOIDE	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Cloruro de terbercina	22.5
Digitalina	151
Sulfato de efedrina	215
Cafeína	306
Sulfato de atropina	686

b. Ensayo antimicrobiano para extractos de plantas.

Los antibióticos y análogos sintéticos siguen siendo fuente de estudio dentro del área clínica, las investigaciones de éstos están encaminadas a encontrar la actividad que presentan contra agentes infecciosos. De esta idea surge el hecho de probar extractos y sustancias puras obtenidas de productos naturales, para lo cual se han ideado una gran variedad de métodos antimicrobianos, los cuales permiten la visualización rápida de la utilidad farmacológica, debido a que los microorganismos empleados son representativos de agentes etiológicos de enfermedades humanas que afectan piel, ojos, aparato respiratorio, digestivo, nervioso, urinario, genital entre otros.

Los métodos antimicrobianos pueden clasificarse en aquellos que requieren o no esterilización. En los primeros, se puede emplear esterilización por filtración con membrana o por medio de radiación; si no se requiere de esterilización, entonces se preparan todas las muestras en un medio aséptico (empleando material de vidrio estéril, campana de flujo laminar, etc.). De los métodos antimicrobianos se conocen los de difusión, dilución y bioautográficos [88], los cuales se describen a continuación:

- **Método de difusión:** Este método fue originalmente desarrollado para monitorear cantidades de antibióticos, sustancias de fermentación y elaboración de antibiogramas. Se emplean discos de papel, cilindros de porcelana u oradaciones en el medio, donde es colocado el extracto de la planta y es puesto en contacto con un medio de agar inoculado de microorganismos. Después de la incubación, la respuesta se mide por el diámetro de la zona de inhibición del desarrollo microbiano. Este método tiene la ventaja de no requerir esterilización, se pueden probar varios extractos al mismo tiempo con un mismo organismo, ya que se requieren cantidades mínimas de la muestra y el resultado de la prueba es lineal. (el diámetro de inhibición está relacionado con la concentración mínima inhibitoria).

- **Método de dilución:** En el método de dilución, las muestras probadas son mezcladas en el medio, el cual posteriormente será inoculado con microorganismos. Después de la incubación, el desarrollo de microorganismos es determinado por observación directa o comparación turbidimétrica con respecto a una muestra control. La ventaja de este método es que no requiere de la esterilización del extracto, además los extractos no polares, pueden ser analizados como los acuosos. A diferencia del método de difusión, en el método de dilución se pueden probar muchos microorganismos en la misma dilución.
- **Método bioautográfico:** La bioautografía es un método que identifica la actividad antimicrobiana en un cromatograma; se encuentra dentro de las aplicaciones de la investigación de antibióticos. Muchos procedimientos se basan en la técnica de difusión en agar, los agentes antimicrobianos son transferidos de una cromatografía en capa fina o papel a una placa inoculada con microorganismos.

Las zonas de inhibición son visualizadas y para diferenciar bien la difusión se emplea la bioautografía directa. Este método requiere de equipo microbiológico especial debido a que las muestras son susceptibles de contaminación.

La selección del método dependerá de las condiciones del laboratorio donde se realice y de las características de sensibilidad requeridas. En la tabla 6 se presentan las propiedades y limitaciones de los métodos antimicrobianos.

De los ensayos más sobresalientes se encuentra el de Carlson y Douglas (1948) y Mitscher (1972). El método de Mitscher se basa en la inhibición del crecimiento de diversos microorganismos, cuando son expuestos a un medio de cultivo que contiene el extracto o las sustancias puras a probar, este método es conocido como estria y dilución en agar, en donde la concentración empleada para los extractos es de 1000 $\mu\text{g/mL}$ [90].

Tabla 6. Propiedades y limitaciones de los métodos antimicrobianos [88]

PROPIEDADES Y LIMITACIONES DE LOS METODOS ANTIMICROBIANOS				
Método	Requerimientos de los extractos de plantas		Detección de actividad antimicrobiana	
	Esterilización	Dispersión homogénea en agua	Evaluación bacteriostática o bactericida	Detección de potencia baja o alta
<i>Difusión en agar</i>				
♦ discos y oradaciones	No	Si	Bacteriostático	Alta y baja
♦ cilindros	No	No	Bacteriostático	Alta y baja
♦ Dilución en agar	No	No	Bacteriostático	Alta y baja
♦ Dilución líquida	Si	No	Bacteriostático Bactericida	Alta y baja
<i>Bioautografía</i>				
♦ contacto	No	No	Bacteriostático	Alta
♦ directa	Si	No	Bacteriostático	Alta

III. *Planteamiento del problema*

A pesar de la riqueza biológica y del enorme acervo cultural con que cuenta nuestro país, existe poca información científica sobre la composición química, ecológica, etnobotánica, farmacológica y clínica de la mayoría de las especies empleadas en la medicina tradicional. El empleo de tales plantas es eminentemente empírico y por lo tanto existen muchas variables que influyen en la eficiencia de las preparaciones que de ellas se hacen. Es importante señalar que la mayoría de los prototipos farmacéuticos son sustancias de origen natural, principalmente vegetal, por lo que la investigación, búsqueda y caracterización de los constituyentes químicos activos de la flora medicinal puede cristalizar en el descubrimiento de nuevos agentes farmacéuticos que superen en eficiencia a los ya conocidos.

Con base en lo anterior, se realizó el estudio químico y la evaluación biológica de *Cirsium jorullense*, la cual es empleada en San Rafael Tlalmanalco, Estado de México, para aliviar diferentes padecimientos relacionados con los riñones, garganta, pulmón, hígado y aparato digestivo, entre otros; con la finalidad de identificar y caracterizar aquellos extractos o sustancias puras que muestren actividad biológica —tóxica, antimicrobiana ó antiinflamatoria—.

IV. Objetivos

OBJETIVO GENERAL.

Realizar el estudio químico y evaluación biológica —actividad tóxica, antimicrobiana y antiinflamatoria— de las partes aéreas de *Cirsium jorullense*, especie vegetal empleada en la medicina tradicional del Estado de México (San Rafael Tlalmanalco).

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Realizar la investigación bibliográfica (1980-1999) sobre los estudios químicos y biológicos de la familia *Compositae* y del género *Cirsium*.
2. Preparar los extractos crudos con disolventes de diferente polaridad (n-hexano, CHCl_3 , AcOEt, EtOH), a partir de las flores y tallo de dicha especie vegetal.
3. Determinar la actividad tóxica, antimicrobiana y antiinflamatoria de los extractos crudos.
4. Aislar y purificar los diferentes metabolitos que constituyen el extracto biológicamente activo del tallo y/o flores de *Cirsium jorullense*.
5. Identificar y caracterizar las sustancias puras aisladas de dicha especie vegetal.
6. Evaluar la actividad tóxica, antimicrobiana y antiinflamatoria de las sustancias puras aisladas obtenidas de *Cirsium jorullense*.

V. Hipótesis

En México actualmente existe un gran interés por las plantas medicinales, algunas de las cuales se limitan a un uso específico. Tal es el caso de *Cirsium jorullense*, especie vegetal empleada en el tratamiento de enfermedades respiratorias y gastrointestinales por diferentes grupos que habitan el oriente del Estado de México. Por otra parte estudios químicos y biológicos realizados en otras especies de *Cirsium*, han mostrado que existen sustancias químicas que presentan actividad antibacteriana, antifúngica, antimalárica, entre otras.

Por lo tanto, en el estudio químico de *Cirsium jorullense*, se aislarán y caracterizarán metabolitos secundarios que posiblemente muestren actividad tóxica, antimicrobiana y antiinflamatoria, por medio de técnicas de extracción y purificación, con lo cual se permitirá correlacionar químicamente a este especie dentro de su género y familia y convalidar su empleo en la medicina tradicional mexicana.

VI. *Material*

A. Material Vegetal.

Parte aérea y flores de *Cirsium jorullense* (San Rafael Tlalmanalco, Estado de México).

B. Material para el estudio químico

(Extracción, aislamiento, purificación y caracterización de metabolitos secundarios).

Material de vidrio.

- ◆ Cámaras de elusión de diferentes tamaños.
- ◆ Campanas de vacío.
- ◆ Capilares.
- ◆ Columnas cromatográficas de diferentes tamaños.
- ◆ Embudos Hirsh de porcelana.
- ◆ Embudos de vidrio de diferentes tamaños.
- ◆ Embudos de separación (250 y 500 mL).
- ◆ Pipetas graduadas (1, 5, 10 mL).
- ◆ Pipetas volumétricas (1, 2, 5, 10 y 25 mL).
- ◆ Equipo para destilación simple y fraccionada.
- ◆ Frascos viales (5mL).
- ◆ Matraz bola (250, 500 y 1000 mL).
- ◆ Matraz Erlenmeyer (25, 50, 100 y 250 mL).
- ◆ Matraz kitazato (25, 50, 100 y 250 mL).
- ◆ Placa de toque de porcelana.
- ◆ Probetas graduadas (10, 250, 500 y 1000 mL).

Sustancias.

- ◆ Carbón activado (J.T. Baker).
- ◆ Celita 545 (Merck).
- ◆ Cloruro Férrico
- ◆ Sílica Gel 50 GF para CCF (Merck).
- ◆ Sulfato de sodio anhidro (Aldrich).
- ◆ Diazald (Aldrich).

- ◆ Sulfato cérico amoniacal (Aldrich).

Disolventes ¹⁰

- ◆ Acetato de etilo, grado técnico (disolventes y mezclas).
- ◆ Acetona, grado técnico (Merck).
- ◆ Cloroformo, grado analítico (Monterrey).
- ◆ Etanol, grado técnico (Merck).
- ◆ Éter etílico, grado analítico (Mallickrodt).
- ◆ Metanol, grado técnico (Merck).
- ◆ n-hexano, grado técnico (disolventes y mezclas).

Otros.

- ◆ Cromatofolios con base de aluminio de Silica gel 60 F 254 (Merck).
- ◆ Placas preparativas con base de vidrio de Silica gel 60 F 254 (Merck).
- ◆ Espátulas de acero inoxidable.

Equipo.

- ◆ Aparato Fisher-Johns.
- ◆ Balanza analítica (Ainswoth 100 A).
- ◆ Balanza granataria (OHAUSE 700-800).
- ◆ Balanza semianalítica (OHAUSE E 400).
- ◆ Baño de agua (Büchi R-124).
- ◆ Lámpara de UV 254/366 nm (Mineralight).
- ◆ Reostato (Staco Energy).
- ◆ Rotavapor (Büchi R-124).
- ◆ Equipo para Diazald.
- ◆ Espectrofotómetro de I.R. (Perkin Elmer, modelo 283 y 681).
- ◆ Espectrómetro de Masas (Hewlett Packard 5985 GC/Ms system 70 eV).
- ◆ Espectrofotómetro de U.V. (Varian FT 8^a y VxR-3005).
- ◆ Espectrómetro de RMN Varian Unity 300

¹⁰ Los disolventes grado técnico fueron purificados mediante destilación fraccionada.

C. Material para ensayo biológico.

Material de vidrio

- ◆ Embudo de talle largo
- ◆ Frascos viales (7 mL)
- ◆ Matraz Erlenmeyer 50 y 1000 mL)
- ◆ Microjeringas (25 ,50 y 500 μ L)
- ◆ Pecera de 12x15x20 cm
- ◆ Pecera especial para la incubación de *Artemia salina* L.
- ◆ Pipetas Pasteur
- ◆ Pipetas graduadas (1, 5 y 10 mL)
- ◆ Probetas graduadas (50, 100, 250, 500 y 1000 mL)
- ◆ Cajas Petri (Pyrex)
- ◆ Tubos de ensayo con tapa de rosca.

Sustancias

- ◆ Sal marina (Aquarium Systems)
- ◆ Solución anticloro y amortiguador de pH (Care)
- ◆ Agar soya tripticaseína
- ◆ Agar nutritivo
- ◆ Estreptomicina
- ◆ Tween 80

Disolventes.

- ◆ Acetato de etilo, grado técnico (disolventes y mezclas).
- ◆ Acetona, grado técnico (Merck)
- ◆ Cloroformo, grado analítico (Monterrey)
- ◆ Etanol, grado técnico (Merck)
- ◆ Éter etílico, grado analítico (Mallickrodt)
- ◆ Metanol, grado técnico (Merck)
- ◆ n-hexano, grado técnico (disolventes y mezclas)

Otros.

- ◆ Aereador de pecera
- ◆ Calentador para pecera
- ◆ Espátula de acero inoxidable
- ◆ Lámpara de luz blanca
- ◆ Reostato

Equipo.

- ◆ Balanza analítica (Ainsworth 100 A)
- ◆ Balanza semianalítica (OHAUSE 400)
- ◆ Incubadora

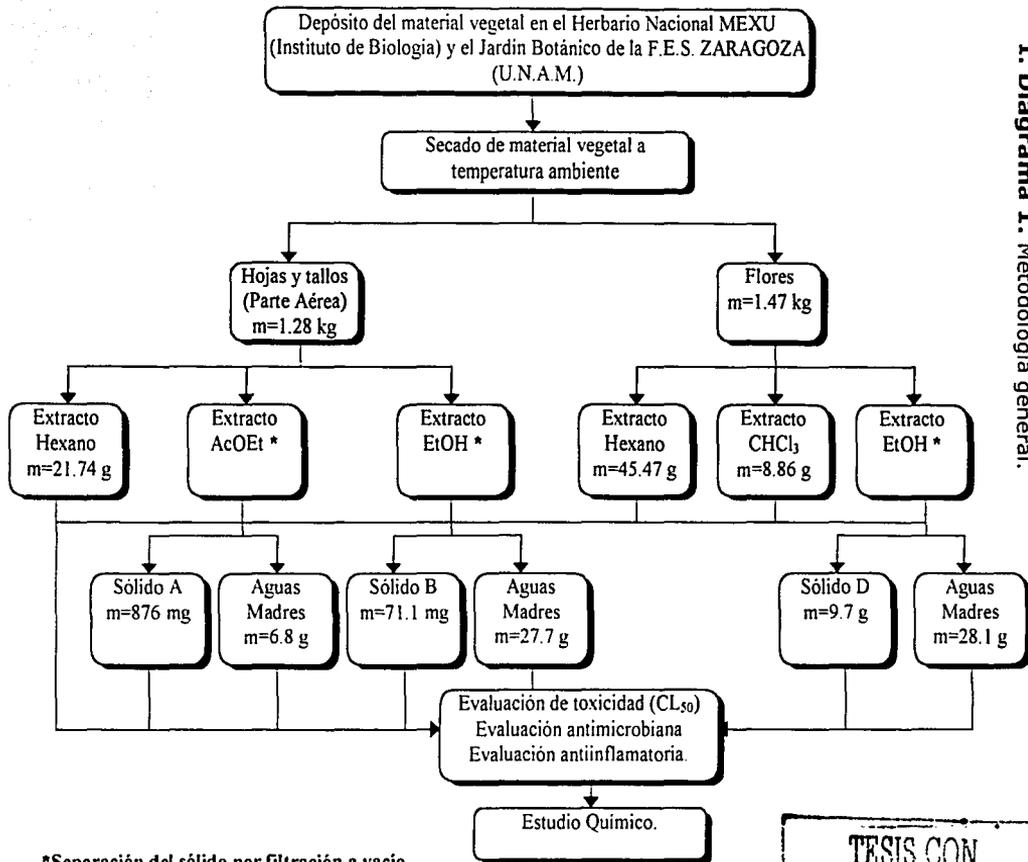
Material biológico.

- ◆ Larvas de *Artemia salina* L.
- ◆ Microorganismos de prueba:
 1. *Salmonella typhi* ATCC 6539
 2. *Bacillus subtilis* ATCC 6633
 3. *Candida albicans* ATCC 10231
 4. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619
 5. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p
 6. *Escherichia coli* ATCC 536
 7. *Micrococcus luteus* ATCC 9341
 8. *Streptococcus faecalis* ATCC 6130.
 9. *Sarcina lutea* ATCC 6540.

VII. *Parte Experimental.*

A. Estudio químico de *Cirsium jorullense*.

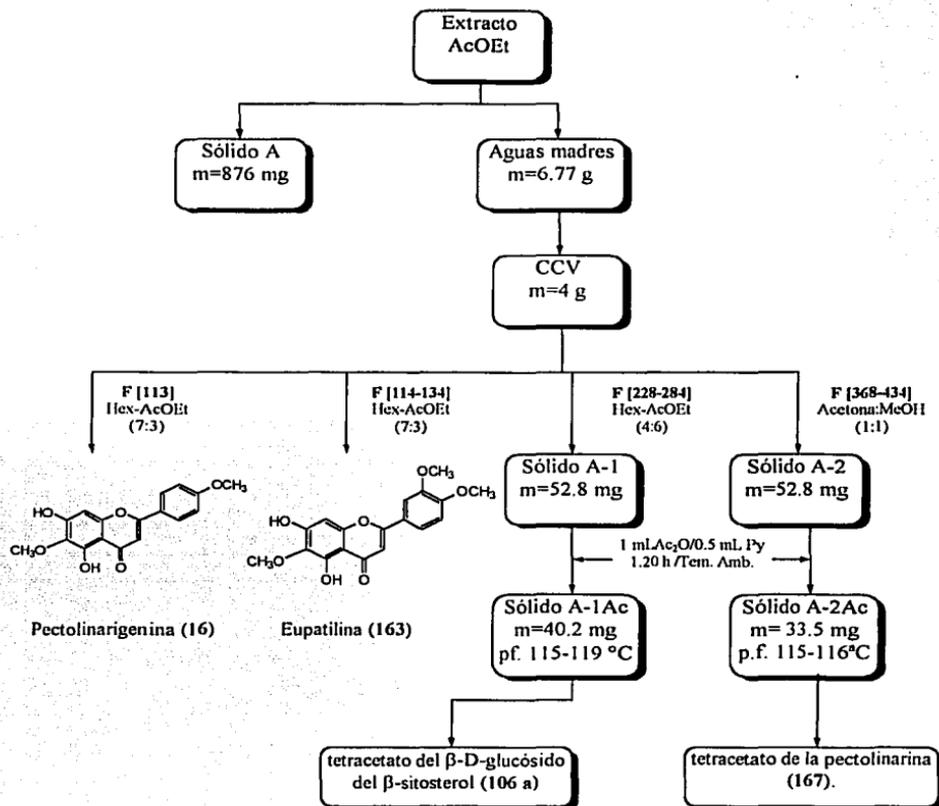
I. Diagrama 1. Metodología general.



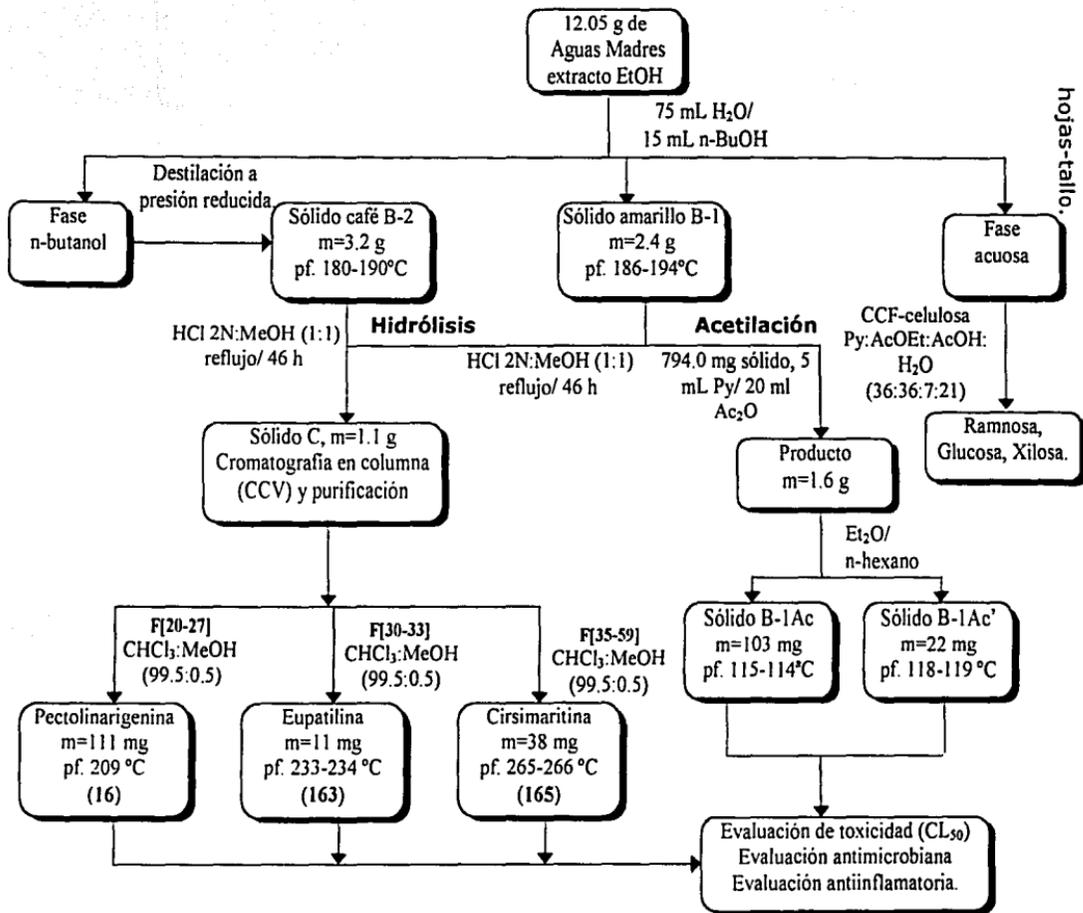
*Separación del sólido por filtración a vacío

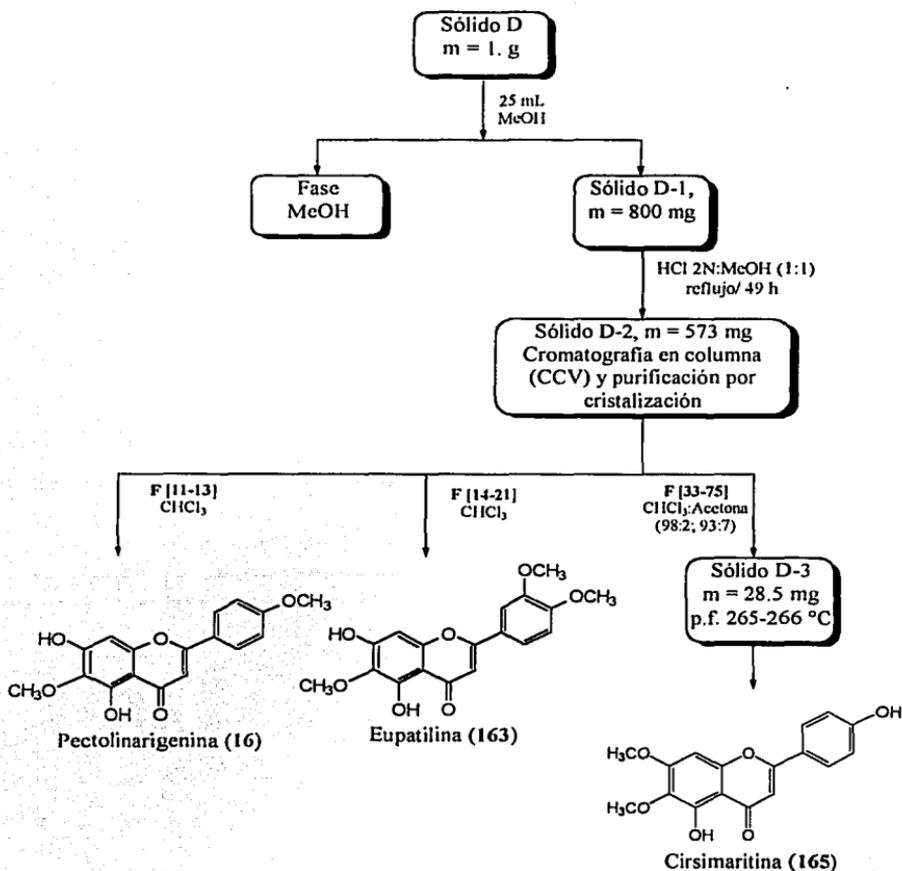
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. Diagrama 2. Tratamiento del extracto de AcOEt de hojas-tallo.



III. Diagrama 3. Tratamiento de Aguas Madres del extracto de EtOH de hojas-tallo.



IV. Diagrama 4. Tratamiento del sólido de extracto de EtOH de Flores.

Cirsium jorullense (Compositae) fue colectada en un bosque de pino a 2700 msnm, el 3 de septiembre de 1996 por el M en C Arturo Eduardo Cano Flores a 3 Km al NO de San Rafael Tlalmanalco, Estado de México. Se depositó en el Herbario MEXU de Instituto de Biología de la UNAM. Fue identificada y clasificada por el Dr. Osvaldo Téllez, a quién le agradecemos su colaboración.

El material vegetal de *Cirsium jorullense* se dividió en partes aéreas (hojas-tallo, 1.28 kg) y flores (1.47 g), se dejó secar a temperatura ambiente. La preparación de los extractos crudos, se realizó con disolventes de polaridad creciente, de acuerdo con el diagrama 1.

1. Hojas y Tallo (Diagrama 1).

1.28 kg de hojas-tallo se sometieron a lixiviación con n-hexano, donde se obtuvo 21.74 g de extracto crudo. El residuo vegetal se dejó secar a temperatura ambiente, y la obtención del extracto fue por percolación con AcOEt caliente empleando una columna de vidrio (70 cm de largo por 9 cm de diámetro) empacada con planta molida, a través de la cual se hizo pasar el disolvente en repetidas ocasiones, para obtener 6.77 g de extracto con AcOEt. Cabe mencionar que al evaporar el disolvente fue separado por filtración a vacío 876 mg de un sólido color verde-amarillento (sólido A).

Una vez seco el material vegetal se obtuvo el extracto con EtOH, por el mismo método que el descrito para el extracto con AcOEt. Después de concentrar el disolvente, se obtuvieron 71.11 g de un sólido amarillo-verdoso (sólido B), separado por filtración a vacío y 27.68 g de residuo.

2. Flores (Diagrama 1).

Se sometieron 1.47 kg de flores a extracción por maceración a temperatura ambiente con n-hexano, CHCl_3 y EtOH, del cual al concentrar en rotavapor se obtuvieron 9.66 g de un sólido amarillo verdoso, ver tabla 7.

Tabla 7. Extractos obtenidos a partir de hojas-tallo y Flores de *Cirsium jorullense*.

	Extracto (g)						
	n-hexano	AcOEt		CHCl ₃	EtOH		MeOH
		Sólido	Aguas Madres		Sólido	Aguas Madres	
Hojas – tallo (1.28 kg)	21.74	0.876 (A)	6.77	-----	-----	-----	12.05
Flores (1.47 kg)	45.467	-----	-----	8.866	9.66 (B)	26.1	-----

Una vez obtenidos los extractos, se determinó la CL₅₀, la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria de cada uno de ellos. De acuerdo a la actividad presentada se realizó el estudio químico de los extractos.

A. Aguas Madres del extracto con AcOEt de tallo-hojas (Diagrama 2).

La separación de los metabolitos secundarios mayoritarios se llevó a cabo mediante cromatografía en columna a vacío (CCV) [79], para lo cual se absorbieron 4 g del residuo de las aguas madres del extracto con AcOEt de tallo-hojas en 7.33 g de celita y se colocaron en una columna de vidrio (45 cm de alto por 10 cm de diámetro) previamente empacada con 240 g de silica gel para cromatografía en capa fina (CCF) y utilizando mezclas de disolventes de polaridad creciente [hexano, (n-hex:AcOEt), (AcOEt:Acetona) y EtOH], de donde se obtuvieron 457 fracciones de 200 mL cada una.

De las fracciones 228-284, obtenidas al eluir la columna con una mezcla de Hex:AcOEt (4:6 a 2:8) se obtuvieron 77.9 mg de un sólido blanco (sólido A-1), soluble en: una mezcla de CHCl₃:MeOH caliente y en MeOH caliente, e insoluble en n-hexano, AcOEt y Acetona. Debido a que en el espectro de IR se observa una banda muy intensa a 3359 cm⁻¹ correspondiente a ν (O-H), se procedió a la obtención de su correspondiente derivado acetilado.

1. Acetilación sólido A-1 (Diagrama 2).

Para la acetilación del sólido A-1, se hicieron reaccionar 52.8 mg de éste sólido con 1 mL de Ac_2O y 0.5 mL de Py por 2 h a temperatura ambiente. Terminada la reacción se agregó 5 mL de agua destilada.

El producto se recuperó mediante extracciones con CHCl_3 (5 x 3 mL). La fase cloroformica se lavó con HCl 10 % (4x 4 mL), posteriormente se trató con una solución de NaHCO_3 al 10 % y finalmente se realizaron lavados con agua (4x 4 mL). La fase cloroformica se secó a través de Na_2SO_4 anhidro. El producto fue recristalizado por par de disolventes (CHCl_3 :n-propanol) de donde se obtuvo 40.13 mg (77.89 %) de un sólido cristalino en forma de agujas con pf. 115-119 °C, soluble en n-hexano, CHCl_3 e insoluble en propanol. Su identificación y caracterización se realizó con base a sus propiedades físicas y espectroscópicas, las cuales permiten concluir que el producto obtenido es el derivado *per* acetilado del β -D-glucósido del β -sitosterol (106 a).

2. Acetilación del sólido A-2 (Diagrama 2).

De los eluatos 368-457 (AcOEt , Acetona y MeOH) se obtuvo un sólido blanco de pf. 196 °C, soluble en DMSO e insoluble en EtOH y MeOH. Debido a su alta polaridad y para poder facilitar su identificación y caracterización, se procedió a la preparación de su derivado acetilado para lo cual 52.8 mg fueron acetilados con 2 mL de Ac_2O y 1 mL de Py. El producto de reacción mostró un $R_f = 0.45$ [Hex: AcOEt (3:7)] igual al del *per* acetil de la pectolarina (167), los cuales en CCF dan reacción positiva con FeCl_3 en EtOH al 1%.

3. CCF fracciones [73-81] y [113].

Por medio de CCF [81], eluyendo con una mezcla de [CHCl_3 :MeOH (8:2)] y comparando con muestras de referencia, se identificaron a los flavonoides Eupatilina (163) y Pectolarigenina (16) en las fracciones [73-81] y [113].

B. Aguas Madres del extracto con EtOH de tallo-hojas (Diagrama 3).

A 12.05 g de las Aguas Madres del extracto etanólico se agregaron 75 mL de agua destilada y se agitó por 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se agregaron 15 mL de *n*-butanol, de donde se separó 2.41 g de un sólido amarillo (sólido B-1) de pf. 184-194 °C, soluble en DMF y DMSO e insoluble en AcOEt, acetona, EtOH y MeOH. La fase butanólica se sometió a una destilación a presión reducida [78] obteniéndose un sólido café (sólido B2) de pf. 188-190 °C soluble en DMF y DMSO e insoluble en AcOEt, Acetona, EtOH y MeOH. Los sólidos se aplicaron en CCF [CHCl₃:MeOH (9:1)], donde se observó que se trataba de una mezcla de sustancias.

1. Hidrólisis del sólido B-1(Diagrama 3).

A 120 mg del sólido B-1 se le agregaron 25 mL de una solución metanólica de HCl (2 N) y calentándose a reflujo por 46 horas. Una vez concluida la reacción se agregaron 5 mL de agua destilada, separándose un sólido amarillo constituido de tres compuestos (sólido C) de pf. 240-251°C soluble en CHCl₃, AcOEt, CHCl₃:MeOH, DMF y DMSO, e insoluble en *n*-hexano, el cual se obtuvo por filtración a vacío.

2. Hidrólisis del sólido B-2 (Diagrama 3).

1.9 g de sólido B-2 se sometieron a hidrólisis ácida de acuerdo a la metodología utilizada en la hidrólisis del sólido B-1, obteniéndose 1.24 g de un sólido amarillo (sólido E), el cual al aplicar en CCF [CHCl₃:MeOH (96:4)] junto al producto de hidrólisis del sólido B-1 se determinó la presencia de los mismos compuestos.

a. Separación cromatográfica de sólidos C (Diagrama 3).

1.1 g del sólido se absorbieron con 1.1 g de celita y se colocaron en una columna cromatográfica previamente empacada con 24 g de silica gel para CCF y utilizando disolventes y mezclas de polaridad creciente (CHCl_3 , $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ y MeOH), obteniéndose 151 fracciones de 30 mL cada una.

De los eluatos 20-27 [$\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (96:4)] se obtuvieron 111 mg de un sólido amarillo cristalino de pf. 209 °C (sólido C-1), cristalizado por par de disolventes [80] con $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1). Los datos obtenidos a partir de los estudios espectroscópicos y espectrométricos, permitieron caracterizar a esta sustancia como la Pectolinarigenina (16) [44, 47].

A partir de las fracciones 30-33, obtenidas con mezcla [$\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (99.5:0.5)] se aislaron y purificaron por cristalización de par de disolventes ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$) 11 mg de un sólido cristalino amarillo de pf. 234°C (sólido C-2), soluble en mezcla $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$, el cual se identificó como la Eupatilina (163) [86], con base en sus constantes espectroscópicas y espectrométricas.

De las fracciones 35-59, obtenidas con una mezcla de [$\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (99.5:0.5)] se aisló y purificó, por cristalización con MeOH , 38 mg de un sólido cristalino en forma de agujas con p.f. de 265-267 °C soluble en MeOH , caliente, DMF y DMSO, e insoluble en CHCl_3 , AcOEt , y acetona el cual, en base a sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas, se identificó como Cirsimaritina (165) [57-58].

2. Acetilación del sólido B-1 (Diagrama 3)

794 mg del sólido B-1 colocados en un matraz Erlenmeyer, se hicieron reaccionar con 20 mL de Ac_2O y 5 mL de Py por 46 h a temperatura ambiente y en condiciones anhidras. Terminada la reacción se agregaron 5 mL de agua destilada. El producto de interés se recuperó de manera convencional, obteniendo 1.6 g de una mezcla de 2 compuestos, el Sólidos B-1Ac y B-1Ac', los cuales fueron separados al agregar una mezcla de n-hexano:éter etílico (1:1).

3. Metilación del sólido C-2

De la reacción de metilación de las aguas madres de la Espatolina efectuada con diazometano en éter etílico a 0 °C, se obtuvieron 36 mg de un sólido amorfo cristalino amarillo verdoso, el cual fue purificado por cristalización por par de disolventes (CHCl_3 -n-hexano) y cuyas propiedades físicas son las que a continuación se describen: pf. 183-186 °C, soluble en AcOEt, CHCl_3 , MeOH y EtOH, insoluble en n-hexano. El cual fue caracterizado, en base a sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas, como la 6,7,3',4'-tetrametoxi-5-hidroxi-flavona (164).

C. Sólido del extracto de Flores con EtOH, sólido D (Diagrama 4).

1. g del sólido fueron colocados en un matraz Erlenmeyer, al cual se agregaron 25 mL de MeOH y se agitó a temperatura ambiente, separándose un sólido color crema que se filtró (sólido D-1) soluble en agua e insoluble en MeOH caliente. Las aguas madres se aplicaron en CCF y se eluyó con una mezcla de CHCl_3 :MeOH (9:1) determinándose la presencia de una mezcla de dos compuestos, los cuales al revelar una coloración café con FeCl_3 , indican la presencia de dos flavonoides.

1. Hidrólisis del sólido D-1 (Diagrama 4).

800 mg de sólido fueron colocados a reflujo con 40 mL de una solución metabólica de HCl (2N), durante 49.4 horas. Una vez transcurrido el tiempo se agregó 15 g de hielo, donde precipitaron 573 mg de un sólido amarillo (sólido D-2) soluble en CHCl_3 y AcOEt e insoluble en hexano y Et_2O . Por medio de CCF y eluyendo con una mezcla de CHCl_3 :Acetona (96:4) se determinó la presencia de 5 flavonoides.

a. Separación cromatográfica de sólido D-2 (Diagrama 4).

De las fracciones 20-27 [CHCl_3] se obtuvieron 86 mg de un sólido amarillo cristalino de $\text{pf. } 209^\circ\text{C}$ (sólido D-3), cristalizado con $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1) y que se identificó por CCF a la Pectolinarigenina (16). A partir de las fracciones 14-21, obtenidas con CHCl_3 se obtuvo un sólido amarillo el cual en CCF y con muestras de referencia se determinó la presencia de Pectolinarigenina (16) y Eupatilina (163), las cuales fueron separados por CCF preparativa eluyendo con [$\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (99:1)].

De los eluatos [33-75] obtenidos con [$\text{CHCl}_3:\text{acetona}$ (98:2), (93:7)] se aisló y purificó, por cristalización con MeOH, 58 mg de un sólido cristalino en forma de agujas de $\text{pf. } 265\text{-}267^\circ\text{C}$, soluble en MeOH caliente, DMF y DMSO, e insoluble en CHCl_3 , AcOEt y acetona determinándose por CCF a la flavona Cirsimaritina (165) [57-58].

D. Identificación de azúcares.

75 mL de la fase acuosa, separada en el tratamiento de las aguas madres del extracto EtOH de partes aéreas, se sometieron a destilación a presión reducida, obteniéndose un sólido blanco el cual fue filtrado a vacío y que al reaccionar con una solución al 1% de AgNO_3 se determinó como NH_4Cl . El residuo se aplicó en CCF en celulosa eluyéndose con una mezcla de Py:AcOEt:AcOH: H_2O (36:36:7:21) y utilizando como revelador 0.9 mL de anilina y 1.66 g de ácido fáltico en 100 mL de acetona [10] y al comparar con estándares se determinó la presencia de los azúcares $\alpha\text{-L-Ramnosa}$ ($R_f = 0.79$), $\alpha\text{-D-Xilosa}$ ($R_f = 0.70$) y $\alpha\text{-D-Glucosa}$ ($R_f = 0.63$).

E. Sólido del extracto con AcOEt de tallo-hojas.

Para la purificación de la mezcla de sólidos obtenidos a partir del extracto con AcOEt (Sólido A) se procedió de la manera siguiente:

Se colocaron 547 mg de sólido impuro en un equipo de extracción Soxhlet empleando *n*-hexano como disolvente durante 4 h. Finalizada la extracción se concentró el disolvente obteniéndose 4.3 mg de extracto.

Posteriormente se extrajo con éter etílico (11 mg), benceno (4 mg), acetona (16 mg) y MeOH (84 mg). De la extracción con éter etílico, benceno y acetona se comprobó la presencia de la Hispidulina (166) y Eupatilina (163), por medio CCF comparando con muestras de referencia.

F. Sólido del extracto con EtOH de tallo-hojas.

Para tratar de purificar el sólido B impuro obtenido de la extracción sólido líquido con EtOH de parte aérea, se montó un sistema de extracción con un equipo Soxhlet de la misma manera que para el sólido A.

Se colocaron 2 g de sólido y se inició la extracción con n-hexano (2 mg) como disolvente por 4 h, prosiguiéndose con éter etílico (29 mg), benceno (4 mg), acetona (125 mg) y MeOH (327.8 mg). De la extracción con éter etílico, benceno y acetona se determinó la presencia de la Hispidulina (166) y Eupatilina (163), por medio CCF y en comparación con muestras de referencia.

B. Estudio Biológico de *Cirsium jorullense*.

1. Bioensayo de toxicidad sobre *Artemia salina* L. [89].

Se realizó el ensayo de toxicidad sobre *Artemia salina* L. de los extractos crudos y las sustancias puras obtenidas de *Cirsium jorullense* colectada en San Rafael Tlalmanalco, Estado de México de acuerdo al diagrama 5.

- Incubación de *Artemia salina* L.

Se utilizó una pecera conformada de un área oscura y otra iluminada, ésta contenía 700 mL de agua de mar artificial¹¹, donde se depositaron 80 mg de huevecillos en la zona oscura, manteniendo la aeración ligera y continua a 28°C durante 48 horas, después de la incubación se colectaron las larvas fototrópicas.

- Preparación de la muestra.

Se pesaron 20 mg del extracto y 4 mg para las sustancias puras, se agregó 2 mL del disolvente en el cual éste fuera más soluble. A partir de esta dilución, se colocaron en viales limpios alícuotas de 5, 50 y 500 μL cada una por triplicado, para obtener una concentración final de 10, 100, 1000 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Se preparó un blanco con 500 μL del disolvente empleado. Las muestras se prepararon con 48 horas de anticipación con la finalidad de eliminar el disolvente.

- Realización del bioensayo.

A cada vial con muestra se agregó suficiente DMSO para disolver, hasta un máximo de 200 μL ¹². Posteriormente se adicionó 2 mL de agua de mar artificial y 10 larvas de *Artemia salina* L. (fototrópicas) previamente incubadas. Se llevó a un volumen total de 5 mL con agua de mar artificial y se incubó bajo luz blanca durante 24 horas. Terminado el periodo de tiempo se contó el número de larvas muertas, determinando la CL_{50} por el método de probitas de Finney [94].

2. Evaluación antimicrobiana. Método de Mitscher [90].

- Preparación de los microorganismos.

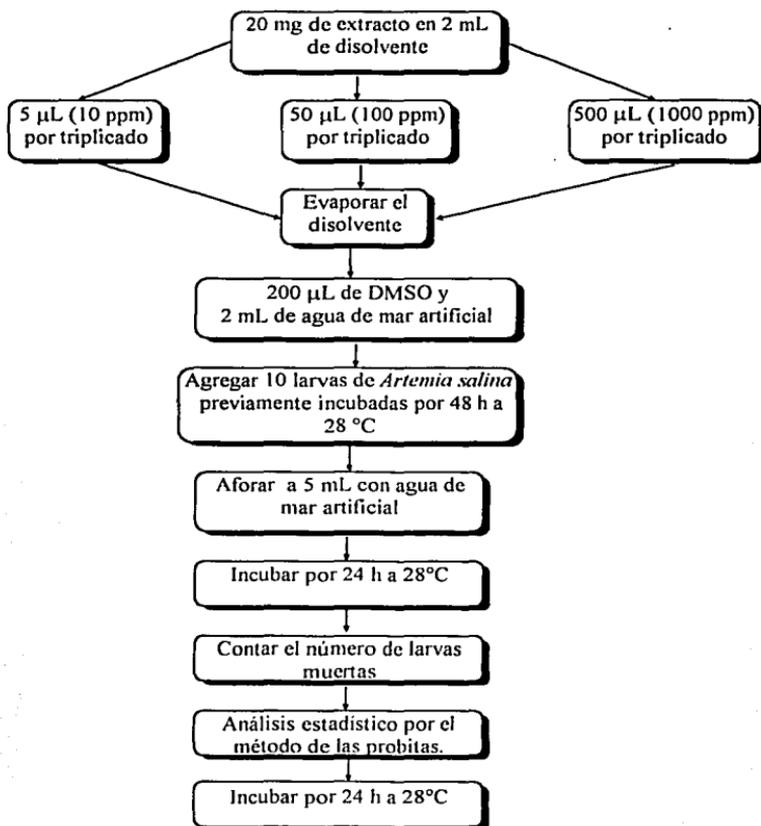
Los microorganismos¹³ se mantuvieron en AST. Para el bioensayo se preparó CST, el cual se colocó en tubos de ensaye con tapón de bakelita y después de ser esterilizados con el medio de CST en autoclave a 15 lbs de presión y 121 °C durante 20 minutos se inocularon (del tubo de cultivo en AST) e incubaron los microorganismos durante 24 horas a 37°C; excepto *Mycobacterium smegmatis*, el cual se incubó durante 48 horas.

Después de la incubación, se tomó una alícuota de 0.1 mL de medio de cultivo y se diluyó con 9.9 mL de solución salina estéril para alcanzar una dilución final de 1:100 misma que se utilizó para el bioensayo

¹¹ Se colocan 38 g de sal marina artificial por cada litro de agua, una vez disuelta se le adiciona 5 gotas de anticloro.

¹² Se emplea DMSO para disolver completamente el extracto, debido a que es el disolvente menos tóxico para las larvas de *Artemia salina* L [91].

¹³ Las cepas fueron adquiridas del cepario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (IPN, México, D.F.)

Esquema 3. Metodología general del bioensayo de toxicidad sobre *Artemia Salina L.* de extractos crudos de *Cirsium jorullense*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Preparación de las muestras.

40 mg de muestra, se disolvieron en 0.5 mL de Tween 80 y 1.5 mL de solución salina fisiológica estéril en un vial de 5 mL. Una vez solubilizado se adicionó aseptícamente a un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 38 mL de AST, previamente estéril y a una temperatura de $50 \pm 5^\circ\text{C}$, para obtener una concentración de 1 mg/mL, se mezcló y se vertió por partes iguales en dos cajas Petri. Una vez solidificado el agar, se incubaron a 37°C las cajas durante 24 h para realizar la prueba de esterilidad.

- Prueba microbiológica.

Después de la prueba de esterilidad, las dos cajas con el extracto, fueron divididas en 10 sectores cada una, procediéndose a realizar la siembra por estria cerrada, como indica en la figura 3. Finalmente se incubaron las muestras por 24 h, transcurrido el tiempo se observó la inhibición o el crecimiento de los microorganismos. A la par se realizó un blanco y un control positivo con sulfato de estreptomocina.

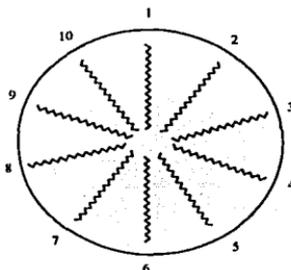


Figura 3. Forma de sembrado de los diferentes microorganismos de prueba.

- | | |
|---|---|
| 1. <i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539. | 7. <i>Escherichia coli</i> ATCC 536 |
| 2. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633. | 8. <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341 |
| 3. <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. | 9. <i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 6130. |
| 4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 2561. | 10. No se siembra ninguna cepa |
| 5. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538p. | |
| 6. <i>Sarcina lutea</i> ATCC 6540. | |

Después de la incubación por 24 hrs, se consideró activos aquellos extractos que inhibieron el crecimiento de algún microorganismo.

3. Evaluación antiinflamatoria¹⁴.

a. Evaluación de extractos de flores y parte aérea.

Se emplearon 3 ratones albinos por muestra, cuyo peso osciló entre 28 y 30 g de peso. Los animales fueron anestesiados con ketamina y posteriormente se les aplicó tópicamente con una jeringa de Hamilton, 10 μ L una solución acetónica de TPA (2.5 μ g en 10 mL), para producir la inflamación, en la parte interna de cada oreja.

Los compuestos de prueba, así como el fármaco de referencia, se disolvieron en un vehículo apropiado para cada uno y fueron aplicados en dosis de 10 mg/Kg en la oreja derecha, mientras que en la oreja izquierda se aplicó únicamente el vehículo (oreja control).

Una vez desarrollada la inflamación por espacio de 4 horas, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, y se tomó de la porción central de cada oreja un tapón de 6 mm de diámetro con la ayuda de un sacabocados. La diferencia de peso entre la oreja tratada con el compuesto de prueba y del peso de la oreja que solamente recibe el vehículo, se tomó como medida de la respuesta antiedematosa.

b. Evaluación de sustancias puras.

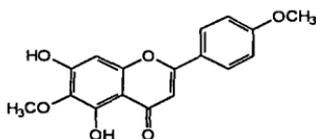
Los ratones después de ser anestesiados fueron inoculados por vía intraperitoneal con la sustancia de prueba, en dosis de 10 mg/Kg, 30 minutos antes de la aplicación del agente inflamatorio (TPA). Transcurrido este período se aplicaron en la oreja derecha con una jeringa de Hamilton, 10 μ L de solución de TPA, adicionalmente en la oreja izquierda se aplicó 10 μ L de etanol. La inflamación se desarrolló por espacio de 4 horas, y al finalizar dicho período fueron tratados de la misma manera que en el método anterior.

¹⁴ Estas pruebas se realizaron en el Instituto de Química de la UNAM por la M en C Teresa O. Ramírez Apan.

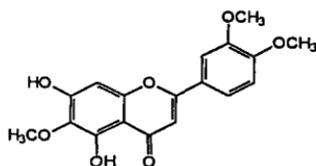
VIII. *Resultados*

A. Estudio Químico.

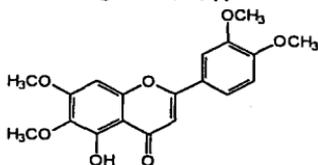
1. Estructuras de las sustancias aisladas de *Cirsium jorullense*.



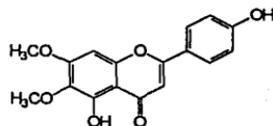
Pectolarigenina (16) pp. 69



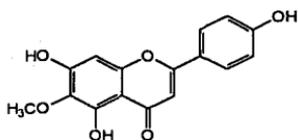
Eupatilina (163) pp. 69



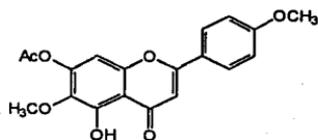
6,7,3',4'-tetrametoxi-5-hidroxi flavona (164) pp. 70



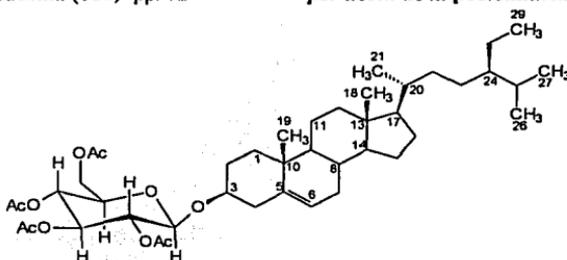
Cirsimaritina (165) pp. 69



Hispidulina (166) pp. 72



per acetil de la pectolarina (167) pp. 69



tetracetato del β -D-glucósido del β -sitosterol (106 a) pp. 62

2. Propiedades espectroscópicas de sustancias puras aisladas de *Cirsium jorullense*.**a. β -D-glucósido del β -sitosterol.**

♦ IR ν_{max} (CHCl_3 , cm^{-1}), espectro 1: 3381, 2725, 1259, 1165, 1110, 1066.

b. tetracetato del β -D-glucósido del β -sitosterol (106 a).

♦ IR ν_{max} (Nujol, cm^{-1}), espectro 2: 2938, 2868, 1731, 1380, 1033.

♦ RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS), espectro 3: δ 0.68 (s, 3H, CH_3 -18), δ 0.84 (d, J= 6.3 Hz, 6H, CH_3 -26 y CH_3 -27) δ 0.93 (d, J= 7 Hz, 3H, CH_3 -21), δ 0.99 (s, 3H, CH_3 -19), δ 2.00-2.08 [4s, 12H, (CH_3COO -)], δ 3.45 (ddd, J=10 y 5 Hz, 1H, H-3), δ 3.68 (m, J=10.5 y 2Hz, 1H, H-5'), δ 4.11 (dd, J= 12.45 y 2.6 Hz, 1H, H_b -6'), δ 4.26 (dd, J= 12.45 y 5.0 Hz, 1H, H_a -6'), δ 4.58 (d, J= 8.1 Hz, 1H, H-1'), δ 4.95 (dd, J=9.3 y 8.1 Hz, 1H, H-2'), δ 5.07 (t, J= 9.6 Hz, 1H, H-4'), δ 5.20 (t, J= 9.45 Hz, 1H, H-3'), δ 5.35 (d, J=5.4 Hz, 1H, H-6) [111].

♦ RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS), espectro 5: δ 170.66-169.27 (4-AcO-), δ 140.35 (C-5), δ 122.15 (C-6), δ 99.65 (C-1'), δ 80.08 (C-3'), δ 72.71 (C-5'), δ 71.71 (C-3), δ 71.53 (C-2'), δ 68.60 (C-4') δ 62.13 (C-6'), δ 56.78 (C-14), δ 56.08 (C-17), δ 50.20 (C-9), δ 45.87 (C-24), δ 42.34 (C-13), δ 39.75 (C-12), δ 38.93 (C-4), δ 37.21 (C-1), δ 36.73 (C-10), δ 36.12 (C-20), δ 33.97 (C-22), δ 31.95 (C-7), δ 31.88 (C-25), δ 29.46 (C-8), δ 29.20 (C-2), δ 28.23 (C-23), δ 26.12 (C-16), δ 24.29 (C-28), δ 23.09 (C-15), δ 21.06 (C-11), δ 20.70 (C-19), δ 20.61 (C-26), δ 19.79 (C-21), δ 19.34 (C-27), δ 19.04 (C-29), δ 18.78 (C-18) [111].

♦ EM (I.E. m/z): 396 [M^+ -348, 100%], 331 (18%), 169 (44%), 145 (15%), 127 (13%), 109 (38%), 95 (15%), 81 (19%), 43 (58%).

ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA

c. Pectolarigenina (16).

- ♦ IR ν_{\max} (Nujol, cm^{-1}), espectro 5: 3328, 1661, 1606, 1511, 1467, 1359, 1187, 1078 [47, 77].
- ♦ RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 + $\text{DMSO-}d_6$, TMS), espectro 6: δ 12.94 (s, 1H, C5-OH), δ 10.00 (s, 1H, C7-OH), δ 7.86 (dd, $J=9$ Hz, 2H, H-2' y H-6'), δ 7.03 (dd, $J=9$ Hz, 2H, H-3' y H-5'), δ 6.55 (s, 2H, H-3 y H-8), δ 3.92 (s, 6H, OCH_3) [47, 77].
- ♦ RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 + $\text{DMSO-}d_6$, TMS), espectro 7: δ 181.61 (C-4), δ 162.87 (C-4'), δ 161.59 (C-2), δ 152.17 (C-9), δ 152.06 (C-5), δ 130.70 (C-6), δ 127.07 (C-2', C-6'), δ 22.57 (C-1'), δ 113.59 (C3', C-5'), δ 103.96 (C-10), δ 102.50 (C-3), δ 93.45 (C-8), δ 59.48 (C4'- OCH_3), δ 54.59 (C6- OCH_3) [47, 77].
- ♦ EM (I.E. m/z): 314 [M^+ , 100%], 229 (53.43), 296 (44.37), 271 (40.30), 268 (9.37), 240 (15.93), 150 (22.50), 133 (8.75), 121 (4.37), 89 (3.47), 69 (10.63), 15 (2.18) [47, 77].

d. Eupatilina (163).

- ♦ IR ν_{\max} (Nujol, cm^{-1}), espectro 8: 3183, 1655, 1620, 1580, 1510, 1425, 1336, 1264, 1149 [86].
- ♦ RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 + $\text{DMSO-}d_6$, TMS), espectro 9: δ 12.99 (s, 1H, C5-OH), δ 10.35 (s, 1H, C7-OH), δ 7.60 (dd, $J=2.1$ y 8.4, 1H, H-6'), δ 7.47 (d, $J=2.1$, 1H, H-2'), δ 7.06 (d, $J=8.7$, 1H, H-5'), δ 6.76 (s, 1H, H-8) δ 6.57 (s, 1H, H-3), δ 3.94 (s, 3H, OCH_3), δ 3.91 (s, 3H, OCH_3) y δ 3.83 (s, 3H, OCH_3) [86].
- ♦ RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 + $\text{DMSO-}d_6$, TMS), espectro 10: δ 181.90 (C-4), δ 163.11 (C-2), δ 163.11 (C-7), δ 158.88 (C-5), δ 152.59 (C-4'), δ 152.32 (C-9), δ 148.73 (C-3'), δ 131.04 (C-6), δ 123.05 (C-1'), δ 119.62 (C-6'), δ 111.08 (C-5'), δ 108.94 (C-2'), δ 104.14 (C-3), δ 103.20 (C-10), δ 93.93 (C-8), δ 59.59 (OCH_3), δ 55.62 (OCH_3), δ 55.45 (OCH_3) [86].

- ♦ EM (IE m/z), espectro 11: 344 [M⁺, 100], 329 (64.12), 301 (40.45), 298 (9.16), 243 (3.05), 163 (18.32), 139 (7.63), 129 (4.58), 120 (3.05) y 69 (16.79) [86].

e. 3',4',6,7-tetrametoxi-5-hidroxi flavona (164).

- ♦ IR ν_{\max} (Nujol, cm^{-1}), espectro 12: 2939, 2843, 4657, 1435, 1126 [86, 112].
- ♦ RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) espectro 13: δ 12.76 (s, 1H, C5-OH), δ 7.53 (dd, J=2.1 y 8.4, 1H, H-6'), δ 7.34 (d, J=2.1, 1H, H-2'), δ 6.98 (d, J=8.7, 1H, H-5'), δ 6.60 (s, 1H, H-8), δ 6.56 (s, 1H, H-3), δ 3.99 (s, 3H, OCH₃), δ 3.98 (s, 3H, OCH₃), δ 3.97 (s, 3H, OCH₃), δ 3.93 (s, 3H, OCH₃) [86, 112].
- ♦ RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS), espectro 14: δ 182.63 (C-4), δ 164.01 (C-2), δ 158.81 (C-7), δ 158.81 (C-5), δ 153.18 (C-4'), δ 152.47 (C-9), δ 152.47 (C-3'), δ 123.95 (C-1'), δ 123.95 (C-6'), δ 120.12 (C-6), δ 111.36 (C-5'), δ 109.10 (C-2'), δ 106.25 (C-10), δ 104.56 (C-3), δ 90.64 (C-8), δ 60.84 (OCH₃), δ 56.34 (OCH₃), δ 56.21 (OCH₃), δ 56.16 (OCH₃) [86, 112].

f. Hispidulina (166).

- ♦ IR ν_{\max} (Nujol, cm^{-1}), espectro 15: 3368, 1660, 1610, 1571, 1463, 1378, 1166, 1094.
- ♦ RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃ + DMSO-*d*₆, TMS), espectro 16: δ 13.01 (s, 1H, C5-OH), δ 9.68 (amplia, 1H, C7-OH), δ 7.75 (dd, J= 9 Hz, 2H, H-2' y H-6'), δ 6.96 (dd, J= 9 Hz, 2H, H-3' y H-5'), δ 6.54 (s, 1H, H-8), 6.50 (s, 1H, H-3), δ 3.92 (s, 6H, OCH₃) [98].
- ♦ RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃ + DMSO-*d*₆, TMS), espectro 17: δ 182.12 (C-4), δ 163.85 (C-2), δ 160.66 (C-4'), δ 156.38 (C-7), δ 152.51 (C-5 y C-9), δ 130.95 (C-6), δ 127.53 (C-2'), C-6'), δ 121.50 (C-1'), δ 115.66 (C3', C-5'), δ 104.476 (C-10), δ 102.34 (C-3), δ 93.73 (C-8), δ 60.84 (C6-OCH₃) [98].

B. Estudio Biológico.

1. Evaluación de la actividad antimicrobiana.

Tabla 8. Resultados de evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos y sustancias puras en base al método de Mitscher.

Sustancia	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Hojas y tallo (Parte aérea).									
Sólido B-1	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Etanólico (A.M.)	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Acetato de etilo (A.M.)	+	+	-	-	+	-	-	+	-
Acetonico	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Hexánico	+	-	-	-	+	+	+	-	-
Flores									
Etanólico (A.M.)	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Clorofórmico	-	-	-	-	-	-	-	-	*
Hexánico	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sustancias Puras									
Cirsimaritina	-	-	-	-	-	-	-	-	*
,6,7,3',4'-tetrametoxi-5-hidroxi-flavona	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pectolinarigenina	-	-	-	-	-	-	-	-	*
Eupatilina	-	-	-	-	-	-	-	-	*
Hispidulina	-	-	-	-	-	-	-	-	*
tetracetato del β -D-glucósido del β -sitosterol	-	-	-	-	-	-	-	-	*
per acetil de la pectolinarina	-	-	-	-	-	-	-	-	*
Control positivo									
Sulfato de estreptomina	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ Inhibición; - Crecimiento

* No se probó esta cepa

Microorganismos de prueba.

1. *Micrococcus luteus* ATCC 9341
2. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p
3. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2561
4. *Escherichia coli* ATCC 536
5. *Candida albicans* ATCC 10231
6. *Salmonella typhi* ATCC 6539
7. *Streptococcus faecalis* ATCC 6130.
8. *Bacillus subtilis* ATCC 6633.
9. *Sarcina lutea* ATCC 6540.

TESIS CC
FALLA DE ORIGEN

2. Evaluación de toxicidad frente a *Artemia salina*.

Tabla 9. Resultados de evaluación de toxicidad frente a *Artemia salina* de extractos y sustancias puras.

Sustancia	CL₅₀ (ppm)	LS	LI
Hojas y tallo (Parte aérea)			
Sólido B-1	470.53	987.89	274.97
Etanólico (A.M.)	296.20	647.41	164.98
Acetato de etilo (A.M.)	59.88	82.89	42.49
Hexánico	4740.16	52532.40	1378.96
Flores			
Etanólico (A.M.)	628.07	4213.60	247.48
Etanólico (Sólido)	5572.31	69619.78	1792.72
Clorofórmico	110.45	143.32	84.51
Hexánico	303.77	-	-
Sustancias puras			
Pectolarigenina	58.18	78.48	42.82
Eupatilina	-	-	-
Cirsimaritina	38.33	51.82	27.76
<i>Per</i> acetil de la pectolarina	13458.34	9984.34	564.45

CL₅₀ = Concentración Letal Media

LS = Limite superior confiable

LI = Limite inferior confiable

2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria.

Tabla 10. Resultados de evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos y sustancias puras.

Sustancia	% de inhibición	X (mg) ± ES
Hojas y tallo (Parte aérea)*		
Etanólico (A.M.)	10.29	13.33 ± 0.44
Acetato de etilo	69.60	4.66 ± 2.1
Hexanico	17.61	12.63 ± 0.83
Flores*		
Etanólico (A.M.)	13.86	12.80 ± 0.84
Hexanico (Flores)	25.64	15.33 ± 0.29
Sustancias puras**		
6,7,3',4'-tetrametoxi-5-hidroxi flavona	34.94	-
Eupatilina	23.65	-
Hispidulina	25.20	-
Control positivo		
Indometacina	29.58	-

% de inhibición = $100 - (X \text{ tratado}/X \text{ control}) \times 100$; promedio del tejido de tres animales.

*Dosis 0.5 mg/oreja en el modelo del edema inducido con TPA en la oreja de ratón.

** Dosis 10 mg/Kg, por vía intraperitoneal.

IX. *Análisis de resultados*

A. Estudio Químico

1. β -D-glucósido del β -sitosterol (106).

De los eluatos [228-284], obtenidos con una mezcla de Hex:AcOEt (4:6), se purificó un sólido amorfo de color blanco. En su espectro de IR (espectro 1) a 3381 cm^{-1} se observa una señal muy intensa, la cual corresponde a la ν (O-H) y debido a su solubilidad en disolventes polares, se estableció que se trataba de una sustancia muy hidroxilada, lo cual ocasiona que sea poco manejable para el análisis espectroscópico, por lo que se procedió a realizar su derivado acetilado.

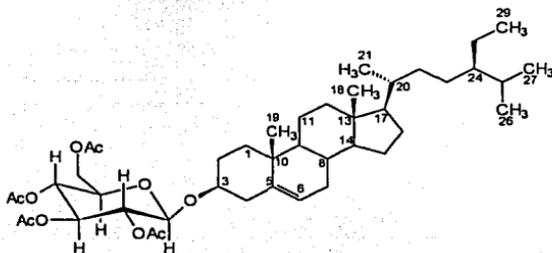
Del producto de reacción de acetilación, se obtuvo un sólido blanco cristalino, con pf. $166\text{-}167\text{ }^{\circ}\text{C}$, soluble en CHCl_3 . Su espectro de masas por impacto electrónico presenta un ion molecular de m/z 396 [M^+ -348, 100%]. El espectro de IR (espectro 2) muestra una banda en 1754 cm^{-1} , correspondiente a la ν (C=O) de los grupos acetato adicionados a la molécula original, el cual fue corroborado con su espectro de RMN- ^{13}C (espectro 4), donde aparecen 4 señales entre $169\text{-}170.66\text{ ppm}$ de grupos carbonilos. Estos datos permitieron proponer como hipótesis estructural a un triterpeno derivado del β -sitosterol, con fórmula molecular $\text{C}_{43}\text{H}_{79}\text{O}_{10}$.

El espectro de RMN- ^1H (espectro 3) presenta señales múltiples a campo alto, asignados de la siguiente manera: δ 0.68 (s, 3H, CH_3 -18), δ 0.84 (d, J= 6.3 Hz, 6H, CH_3 -26 y CH_3 -27) δ 0.93 (d, J= 7 Hz, 3H, CH_3 -21), δ 0.99 (s, 3H, CH_3 -19). A campo bajo se observa una señal doble, en δ 5.35 (J=5.4 Hz), la cual integra para 1H y es asignado al hidrógeno vinílico del C-6. Por otro lado en el espectro de RMN- ^{13}C , al emplear la técnica de APT (espectro 4-A) se observan 6 señales cerca de 20 ppm correspondientes a los metilos del estero.

Los desplazamientos químicos, asignados a los hidrógenos de la parte glucosídica son los siguientes: δ 4.58 (*d*, $J=8.1$ Hz, 1H, H-1'), δ 4.95 (*dd*, $J=9.3$ y 8.1 Hz, 1H, H-2'), δ 5.20 (*t*, $J=9.45$ Hz, 1H, H-3'), δ 5.07 (*t*, $J=9.6$ Hz, 1H, H-4'), mientras que para H-5' se asignó el *m* en δ 3.68 ($J=10.5$ y 2Hz, 1H), y para H_aC-6' y H_bC-6' los δ 4.26 y δ 4.11 respectivamente, los cuales se visualizan como *dd*. De 2.00 a 2.08 ppm (*s*, 12H) se localizan cuatro señales correspondientes a los cuatro metilos de los acetatos adicionados a la molécula original.

En el espectro de RMN-¹³C en δ 122.15 y δ 140.36 se visualizan dos señales, correspondientes a los carbonos vinílicos de la posición 5 y 6 respectivamente, mientras que en a δ 99.65 se observa la señal del C-1', las señales de los carbonos restantes de la parte glucosídica se encuentran entre 80.08 y 62.13 ppm.

Con base en la comparación de sus propiedades físicas y constantes espectroscópicas, con los informados en la literatura [111], se concluyó que la sustancia analizada es el tetracetato del β -D-glucósido del β -sitosterol (106 a).



(106 a) tetracetato del β -D-glucósido del β -sitosterol.

2. Pectolarigenina (16).

De las fracciones [20-27], obtenidas al eluir la columna de la separación del sólido C con una mezcla de $[\text{CHCl}_3:\text{MeOH} (99.5:0.5)]$, se aisló un sólido amarillo de pf. 209 °C, que en CCF resultó positivo al reaccionar con FeCl_3 al 1% en EtOH, indicando la presencia de un hidrógeno quelatado, ver figura 4.

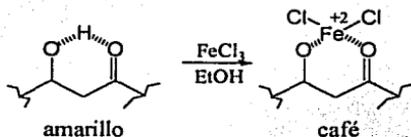
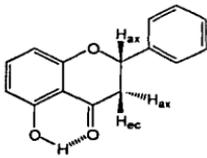
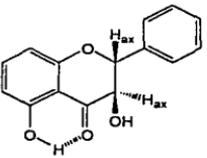
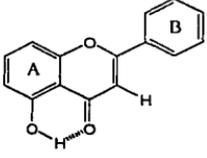
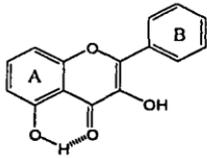


Figura 4. Reacción de una β -hidroxicetona con FeCl_3 en EtOH al 1%

La formación del quelato en la molécula se corrobora en su espectro de IR (espectro 5), donde se observan señales a 1661 y 1606 cm^{-1} correspondientes a la $\nu(\text{C}=\text{O})$ del grupo carbonilo que forma un puente de hidrógeno con el hidrógeno del grupo hidroxilo [$\nu(\text{O}-\text{H})$, 3328 cm^{-1}] del C_5 . Por otro lado, a campo bajo se observa una señal simple en δ 12.94 (1-H, $\text{C}_5\text{-OH}$). La estructura base de una flavona fue propuesta de acuerdo a la multiplicidad y desplazamientos químicos observados en su espectro de RMN- ^1H (espectro 6), lo cual está de acuerdo con lo descrito en la literatura para otros tipos de flavonoides, como se muestra en la tabla 11 [10-11]. Donde el H-3 se observa como un singulete (s) en 6.50 ppm; la señal en δ 10 corresponde al grupo hidroxilo del carbono C-7, mientras que en δ 3.89 se observa una señal simple que integra para 6 hidrógenos, que por su desplazamiento químico corresponde al grupo éter aromático, la presencia de dicho grupo funcional se corroboró en su espectro de RMN- ^{13}C (espectro 7), donde se observan dos señales para el grupo metoxilo en δ 59.4 y δ 54.5.

La ubicación de un grupo metoxilo en el C₆ es apoyada por la perdida de 15 uma (299, 53.4%) a partir del ión molecular (M⁺, *m/z* 314) [99], mientras que debido al patrón de sustitución del anillo B, el otro grupo metoxilo se puede ubicar en el C-4', lo cual concuerda con los desplazamientos químicos observados para dicho carbono en la galangustina [113], hispidulina [97] y kamferol [99], estos se enlistan en la tabla 12.

Tabla 11. Desplazamientos químicos de RMN-¹H para diversos tipos de flavonoides [11, 98].

Flavanona	Hidroflavanona	Flavona	Flavonol		
					
H-2	5.43 <i>dd</i>	5.2 <i>βax</i>	H-3	6.84 <i>s</i>	-
H-3 _{ax}	3.26 <i>dd</i>	4.2 <i>αax</i>	H-6	-	6.36 <i>d</i>
H-3 _{ec}	2.69 <i>dd</i>	-	-	-	-
H-8	5.90 <i>d</i>	6.14 <i>d</i>	-	6.75 <i>s</i>	6.75 <i>d</i>

De ahí que la señal simple en δ 6.55 corresponda al H-8; el desplazamiento químico mostrado a campo alto para este hidrógeno es debido al efecto electrodonador de los sustituyentes del anillo A presentes en la molécula, figura 5.

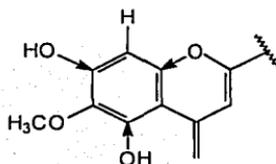
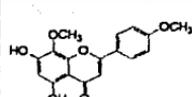
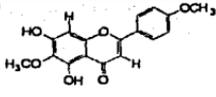
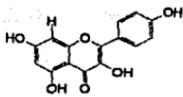
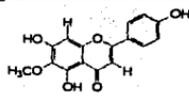


Figura 5. Efecto electrodonador de los grupos unidos al anillo A de la flavona.

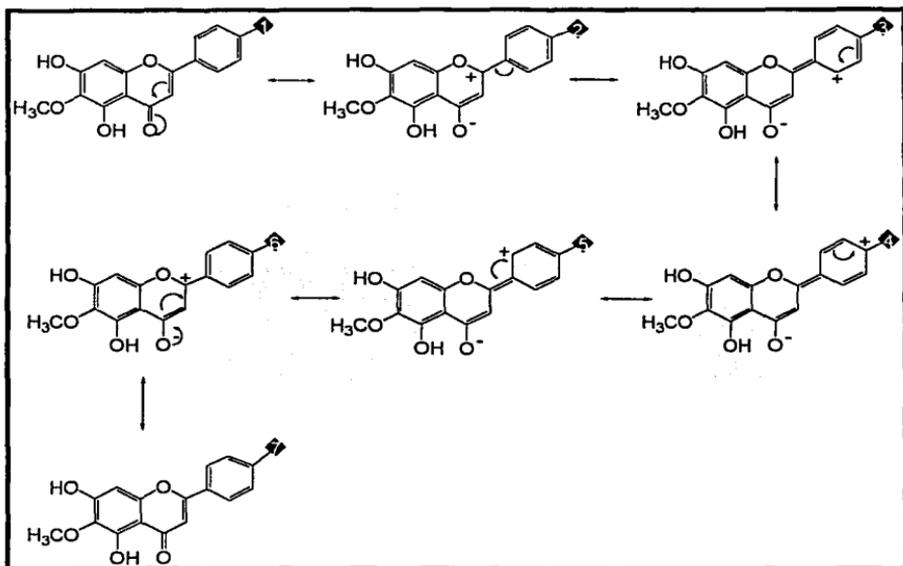
Tabla 12. Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C de hispidulina, kamferol, pectolarigenina y galangustina.

Número de C	Hispidulina (DMSO- d_6)		Kamferol (DMSO- d_6)		Pectolarigenina (CDCl $_3$ +DMSO- d_6)		Galangustina (DMSO- d_6)	
	C 13	H 1	C 13	H 1	C 13	H 1	C 13	H 1
2	163.85	-	156.37	-	161.59	-	163.1	-
3	102.34	6.50 s	133.21	-	102.50	6.55 s	103.4	6.53 s
4	182.12	-	177.40	-	181.61	-	181.9	-
5	152.51	-	161.00	-	152.06	-	156.2	-
6	130.95	-	98.69	6.24 d	130.70	-	99.1	6.55 s
7	156.38	-	164.48	-	156.31	-	157.1	-
8	93.73	6.54 s	93.75	6.44 d	93.45	6.55 s	127.7	-
9	152.51	-	156.30	-	152.17	-	149.5	-
10	104.47	-	103.70	-	103.96	-	103.5	-
1'	121.50	-	120.68	-	122.57	-	122.9	-
2'	127.53	7.75 d	130.97	8.12 d	127.07	7.86 d	128.2	7.86 d
3'	115.66	6.96 d	115.04	6.92 d	113.59	7.04 d	114.7	7.21 d
4'	160.66	-	160.01	-	162.83	-	162.3	-
5'	116.66	6.96 d	115.04	6.92 d	113.59	7.04 d	114.7	7.21 d
6'	127.53	7.75 d	130.97	8.12 d	127.07	7.86 d	128.2	7.86 d
5-OH	-	13.00 s	-	-	-	12.94 s	-	-
7-OH	-	9.68 s	-	-	-	10.00 s	-	-
4'-OH	-	9.68 s	-	-	-	-	-	-
3-OMe	-	-	-	-	-	-	-	-
6-OMe	60.84	3.93 s	-	-	59.48	3.89 s	-	-
7-OMe	-	-	-	-	-	-	-	-
3'-OMe	-	-	-	-	-	-	-	-
4'-OMe	-	-	-	-	54.60	3.89 s	-	-



TRABAJO CON
FALLA DE ORIGEN

Por otro lado, en la región de los aromáticos, aparecen un patrón de sustitución que corresponde a un sistema AA'BB'; por lo tanto, la señal en δ 7.03 (d , $J=9$ Hz, 2H) corresponde a los H-3' y 5', mientras que para H-2' y H-6' se le asigna la señal doble en δ 7.63 (d , $J=9$ Hz, 2H), lo cual está de acuerdo con las formas resonantes que se muestra en el esquema 4.



Esquema 4. Estructuras resonantes que establecen la desprotección de los hidrógenos 2' y 6'.

Con base en la discusión anterior, aunada a sus propiedades físicas y confrontándolas con las descritas en la literatura [83], se pudo concluir que la sustancia aislada del producto de hidrólisis de los sólidos B-1 y B-2, es la Pectolinarigenina (figura 6) —6,4'-dimetoxi-5,7-dihidroxi-flavona— (16), aglicona correspondiente de la pectolinarina (124), aislada de *Cirsium subcoriaceum*, la cual ha mostrado poseer propiedades analgésicas y antiinflamatorias [77].

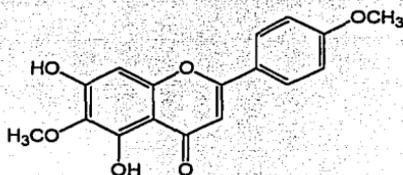


Figura 6. 6,4'-dimetoxi-5,7-dihidroxi flavona
Pectolarigenina (16).

3. Eupatilina (163).

De las fracciones 30-33, obtenidas con [CHCl₃:MeOH (99.5:0.5)], en la separación del sólido C, se obtuvo un sólido amarillo de pf. 234 °C, el cual muestra en su espectro de masas por impacto electrónico (espectro 11), un ion molecular de m/z 344, que corresponde a una fórmula molecular C₁₈H₁₆O₇ (Ω= 11) y que da prueba positiva con FeCl₃ al 1% en EtOH.

En su espectro de IR (espectro 8) se observa una banda en 1655 y 1620 cm⁻¹ correspondiente al grupo carbonilo en C₄ [103], formando un puente de hidrógeno con un grupo hidroxilo del C₅. Por lo anterior se propuso la fórmula parcial B (figura 7), lo cual explica dos grados de insaturación.

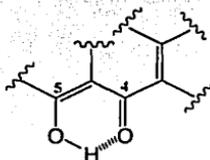


Figura 7. Fórmula parcial B.

La formación del puente de hidrógeno fue corroborada al analizar su espectro de RMN-¹H (espectro 9), donde se observa una señal simple a campo bajo en δ 12.99 (C₅-OH). Las señales simples que aparecen en: δ 3.94, δ 3.91 y δ 3.83 que integran para 3-H cada una, corresponden a 3 grupos metoxilo unidos a anillos aromáticos, (fórmula parcial C, figura 8), lo cual permite justificar 4 grados de insaturación más en la molécula. La presencia de un grupo metoxilo en el carbono C-6, se puede confirmar al observar en su espectro de masas (EM) por impacto electrónico un ión de m/z 329 (M⁺-CH₃, 64.3 %), que se genera por la pérdida del grupo metilo del éter [99].

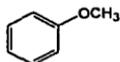


Figura 8. Fórmula parcial C.

Por lo tanto, el esqueleto corresponde al de una flavona, ya que en δ 6.56 se observa una señal simple que, por su desplazamiento químico, corresponde a un hidrógeno vinílico, fórmula parcial D (figura 9) semejante a lo observado en el H-3 para la pectolinarigenina y la hispidulina (Pag. 89).

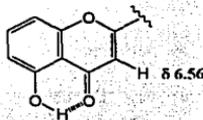


Figura 9. Fórmula parcial D.

A campo bajo se observan tres señales que integran para 3 hidrógenos, por lo cual en el anillo B existe la posibilidad de tener diferentes patrones de sustitución.

En su espectro COSY, esquema 5, se observa que la señal en δ 7.60 (*ddl*, $J = 8.4$ y 2.1 Hz, 1H), tiene un acoplamiento *meta* [101] con el doble (*d*) que aparece en δ 7.47 ($J = 2.1$ Hz) y un acoplamiento de tipo orto [101] con la señal δ 7.06 ($J = 8.4$ Hz). Basándose en lo anterior pueden ser sugeridas tres posibles estructuras para el anillo B, establecidas en fórmulas parciales A, B y C de la figura 10.

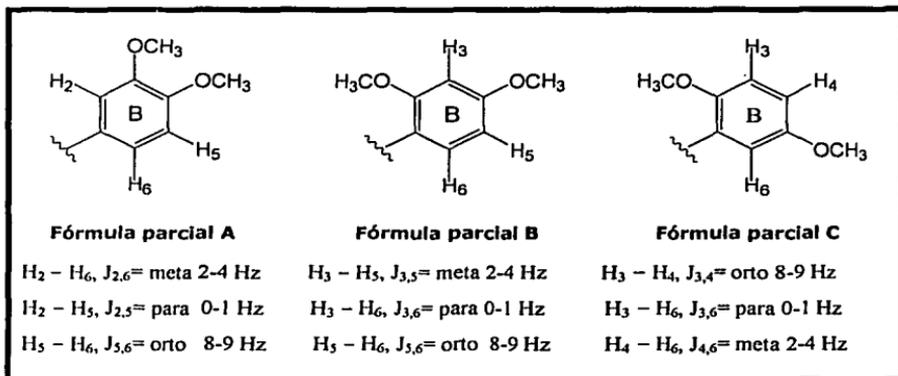
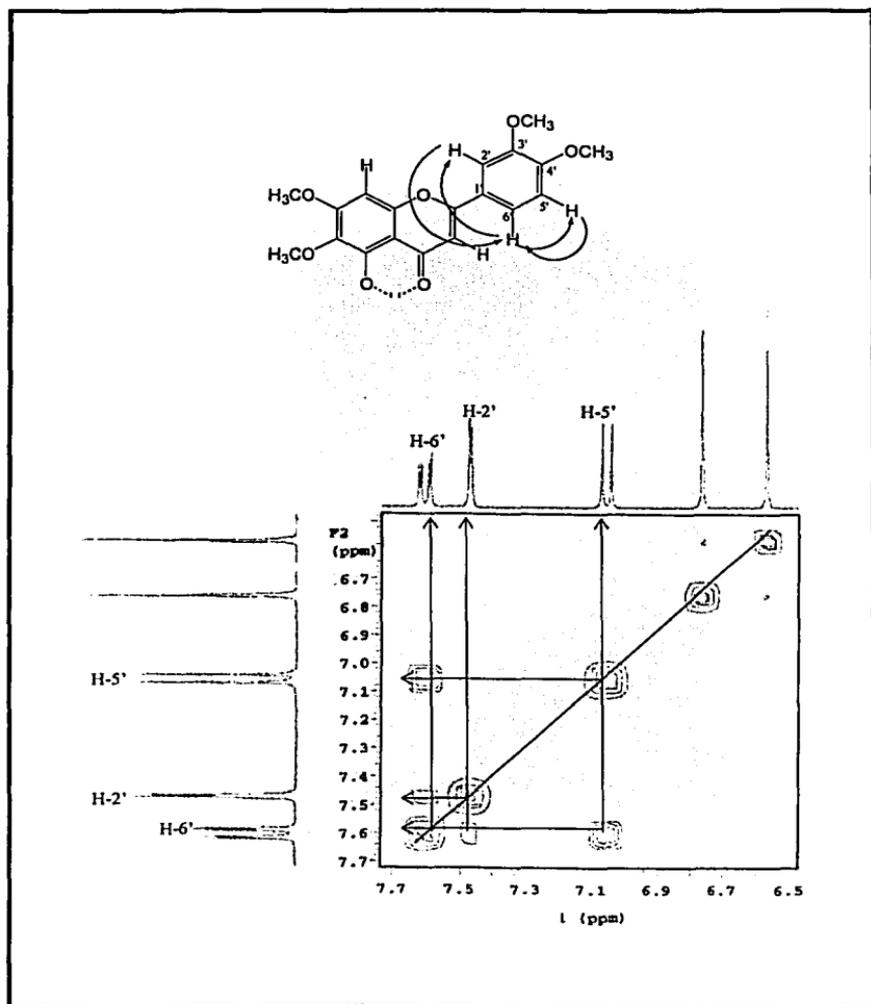


Figura 10. Fórmulas parciales establecidas para el anillo B de acuerdo a las señales presentes en el espectro de RMN-¹H de la eupatilina. [101]

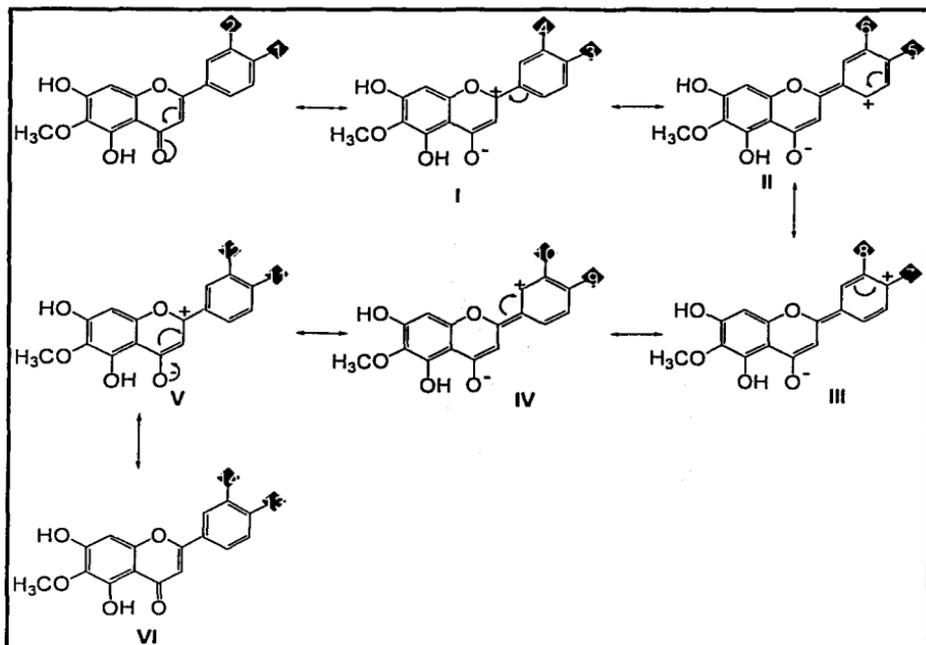
Los desplazamientos químicos de los hidrógenos del anillo B se asignaron con base a las estructuras resonantes mostradas en el esquema 6, las cuales indican que los hidrógenos que se localizan en los carbonos 2' y 6' se encuentran a campo bajo, debido a la desprotección ocasionada por el grupo carbonilo del anillo C.

De esta forma las señales en δ 7.60 y δ 7.47 muestran desprotección con respecto al doble (*d*) en δ 7.06, por lo que se asume que el hidrógeno se puede localizar en las posiciones 5' o 3'.

Por lo anterior, la fórmula parcial B no está de acuerdo con los desplazamientos químicos para cada protón como se aprecia en el espectro, ya que sólo un hidrógeno se encontraría desprotegido, mostrando un doblete a campo bajo (H-6') y dos señales a campo más alto para H-5' (*ald*) y H-3' (*d*).



INSTITUTO
NACIONAL DE INVESTIGACIONES
FARMACOLÓGICAS Y BIOLÓGICAS
FALLA DE ORIGEN



Esquema 6. Estructuras resonantes que establecen la desprotección en los carbonos 2', 4' y 6'.

En lo que respecta la fórmula parcial C, los hidrógenos de las posiciones 4' y 6' se encuentran con diferente ambiente químico. Ambos están protegidos por el efecto electrodonador del grupo metoxilo adyacente y a su vez sufren desprotección ocasionada por el efecto resonante, lo que provoca que las señales se desplacen a campo bajo; sin embargo, de acuerdo a su biogénesis [11] se puede afirmar que la posición 4', se encuentra sustituida por un grupo metoxilo, quedando como único patrón de sustitución el que se plantea en la fórmula parcial A.

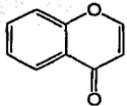
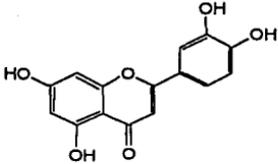
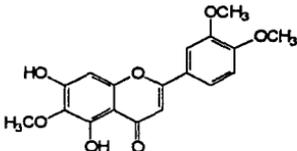
El espectro de RMN-¹³C totalmente desacoplado (espectro 10), muestra 18 átomos de carbono. La naturaleza del grupo funcional, así como el grado de hidrogenación de éstos, se dedujo en función de sus desplazamientos químicos y por la multiplicidad mostrada. Con base en lo anterior, se pudo corroborar la presencia de un grupo carbonilo de cetona, 10 carbonos cuaternarios, 5 metinos y 3 metilos, lo cual está de acuerdo para la fórmula C₁₈H₁₆O₇.

La asignación de los carbonos presentes en dicha sustancia se hizo considerando los desplazamientos químicos descritos en la literatura para la cromona y la luteolina [103-104], las cuales se indican en la tabla 13.

La variación en los desplazamientos químicos de la sustancia aislada con respecto a la Luteolina, principalmente en el C₆ y en los carbonos del anillo B, se puede atribuir a los sustituyentes en dicho anillo; ya que como se sabe, la sustitución con grupos hidroxilo tienden a proporcionar una mayor protección a los carbonos vecinos en comparación con el efecto generado por el grupo metoxilo, cuando se encuentran en posición *orto* o *para* con respecto a ellos [100].

En δ 108.9 se aprecia la señal correspondiente al C₆ de la sustancia en discusión, el cual posee un desplazamiento a campo mas bajo que la Luteolina, ya que esta última no se encuentra sustituida en esa posición, además el metoxilo es un grupo más débil que el hidroxilo, provocando la desprotección del anillo A. En cambio, con respecto a la Cromona, el desplazamiento químico para el C₆ es a campo alto, ya que esta posición se encuentra protegida por dos grupos hidroxilos adyacentes en posición *orto*.

Tabla 13. Desplazamientos químicos de ^{13}C para la Cromona, Luteolina y Eupatilina (espectro 10).

Carbono	Cromona	Luteolina	Eupatilina
2	145.5	164.5	163.1
3	113.0	103.3	104.13
4	177.6	182.2	181.8
5	125.3	157.9	156.88
6	125.8	99.2	108.9
7	133.8	164.7	163.1
8	118.3	94.2	93.9
9	156.0	162.1	156.88
10	125.0	104.2	103.2
1'	_____	119.3	119.62
2'	_____	113.8	119.61
3'	_____	146.2	151.74
4'	_____	150.1	152.59
5'	_____	116.4	11.08
6'	_____	122.1	123.05
			

Para los carbonos 3, 4, 9 y 10, se puede asignar desplazamientos químicos similares a los de la Luteolina por mostrar un patrón de sustitución similar. La señal asignada a C₄ se encuentra en desplazamientos similares para la sustancia C₂ y la Luteolina. El grupo cetona, por si sola, muestra un δ 200 [100]; sin embargo, la variación que se da por la presencia del doble enlace en posición α , β hace que la señal se desplace a campo alto. Esta misma resonancia afecta el desplazamiento del C₂, ya que para la luteolina y la sustancia en discusión no existen diferencias significativas ($\Delta\delta=1.4$), pero al comparar la señal del C₂ con respecto a la Cromona, se observa que la señal de dicho carbono se encuentra más protegida debido a que la cetona no muestra quelación con el hidroxilo del C₃, por lo que la deficiencia electrónica tiende a ser menor.

Para los carbonos C₅ y C₇, los desplazamientos químicos con respecto a la Cromona tienden a ser a campo mas bajo, ya que como la Luteolina y la sustancia en cuestión están sustituidas en dichas posiciones por un átomo electronegativo que tiende a desproteger al carbono por un efecto α [105].

Al C₈ se le asignó la señal en δ 93.9, el cual se encuentra desplazado a la región de los carbonos sp³, por el efecto protector de los grupos sustituyentes situados en posición *orto* y *para* con respecto a dicho átomo de carbono (figura 9).

Para la determinación de los desplazamientos químicos de los carbonos del anillo B se empleo como referencia la Luteolina. En ella se observa que los carbonos sustituidos C₃ y C₄ se desplazan a campo bajo, entre 150-140 ppm, mientras que para los carbonos sin sustituir los desplazamientos se encuentran entre 123-113 ppm; este mismo comportamiento se observa para la sustancia obtenida.

Finalmente las señales de su espectro de RMN ¹³C en δ 59.7, 55.6 y 55.4 se atribuyen a los carbonos del grupo metoxilo en C₄, C₃ y C₆, respectivamente. La asignación para C₆ se hizo considerando el efecto protector del grupo hidroxilo en los carbonos adyacentes (C₇ y C₅) y para C₄ la señal a campo bajo por su participación en la deslocalización de la carga positiva generada por el grupo carbonilo α,β -insaturado del C₄.

Tomando en cuenta lo anterior, las señales en RMN-¹H se definen de la siguiente forma: la señal *dd* en δ 7.60 es asignada al H-6' que se acopla en posición *orto* a H-5' ($J=8.7$) y en posición *meta* a H-2' ($J=2.1$). El doblete en δ 7.47 corresponde al H-2' y la señal en δ 7.06 a H-5'

Con base a lo anterior se llegó a la conclusión que la sustancia aislada de *Cirsium jorullense* es la Eupatilina (163) —3',4',6-trimetoxi-5,7-dihidroxi-flavona— (figura 11) previamente aislada de otras especies de la familia *Compositae* [86].

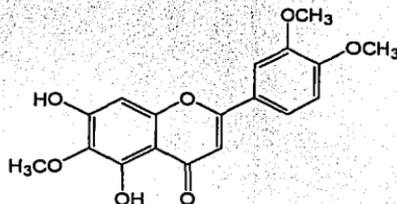


Figura 11. 3',4',6-trimetoxi-5,7-dihidroxi-flavona.
Eupatilina (158)

4. 3',4',6,7-tetrametoxi-5-hidroxi-flavona (164).

Las aguas madres de la Eupatilina (sólido C₂), fueron tratadas con una solución de diazometano (CH₂N₂) en éter etílico a 0 °C (figura 12), dando como producto un sólido cristalino, el cual fue cristalizado por par de disolventes (CHCl₃-n-hexano). Dicho sólido, presenta en su espectro de IR (espectro 12) bandas entre 2940 y 2840 cm⁻¹ correspondientes a la ν (C-H), una banda intensa en 1656 cm⁻¹ que pertenece a la ν (C=O) y en 1126 cm⁻¹ es debida a la ν (C-O-C). Comparando con el espectro de la eupatilina se observa una diferencia significativa, la desaparición de la banda correspondiente a la ν (O-H) en alrededor de 3184 cm⁻¹.



Figura 12. Reacción de metilación a partir de CH_2N_2 en éter etílico a 0°C .

En su EM (IE) se observa un ion molecular de m/z 358, que indica la adición de una molécula de carbono y dos hidrógenos con respecto a la Eupatilina (ion molecular m/z 344). Anudado a ello se observa en su espectro de RMN- ^1H (espectro 13) una señal adicional en δ 3.93 y en su espectro de ^{13}C (δ 3.93) que corresponde al grupo metoxilo en la posición 7, como se muestra en la tabla 14.

Tabla 14. Datos de RMN- ^1H de la Eupatilina y del derivado metilado para los hidrógenos del grupo metoxilo

	Eupatilina	Derivado metilado
-OCH ₃	δ 3.94 (s)	δ 3.99 (s)
	δ 3.91 (s)	δ 3.98 (s)
	δ 3.83 (s)	δ 3.97 (s)
		δ 3.93 (s)

La 3',4',6,7-tetrametoxi-5-hidroxi flavona, la cual muestra sus desplazamientos químicos en la tabla 15, ha sido aislada previamente de la familia *Compositae* [86] pero no se informa su aislamiento de especies pertenecientes al género *Cirsium*.

Es importante señalar que la metilación sólo se dió en el hidroxilo del C-7, debido a que el hidrógeno del grupo -OH en el C-5, se encuentra formando un puente de hidrógeno con el oxígeno del grupo carbonilo de la posición 4, que a su vez, se estabiliza por deslocalización de los electrones del sistema α,β y del anillo B, como se mostró previamente en el esquema 4.

Finalmente, los desplazamientos químicos de RMN- ^{13}C se compararon con los descritos en la literatura [112], cuyo espectro fue determinado en DMSO- d_6 . Los valores para cada carbono concuerdan con los observados para la sustancia en cuestión. Sin embargo, en el desplazamiento correspondiente para el carbono C-6 existe una diferencia de 10 ppm, debido al efecto paramagnético que ocasiona el DMSO sobre los carbonos unidos a oxígeno, desplazandolos hacia campo bajo [114].

Tabla 15. Desplazamiento químicos de ^{13}C para la flavona metilada en las posiciones 3',4',6 y 7 obtenida de *Cirsium jorullense*.

Número de C	3',4',6,7-tetrametoxi-5-hidroxi flavona (164) (CDCl ₃)	3',4',6,7-tetrametoxi-5-hidroxi flavona [112] DMSO- d_6	Eupatilina (163) CDCl ₃ -DMSO- d_6
2	164.01	163.58	163.1
3	104.56	103.61	104.13
4	182.63	182.26	181.8
5	153.18	152.64	156.88
6	120.12	131.88	108.9
7	158.81	158.64	163.1
8	90.64	91.63	93.9
9	152.47	152.93	156.88
10	106.25	105.12	103.2
1'	123.95	122.76	119.62
2'	109.10	109.41	119.61
3'	152.47	149.02	151.74
4'	153.18	152.02	152.59
5'	111.36	111.65	111.08
6'	123.95	120.08	123.05

--	--	--

En un estudio quimiotaxonómico de especies de *Cirsium* se ha informado el aislamiento de glicósidos de flavonas metiladas [50, 56, 58, 110]. Una de las flavonas ampliamente encontradas en especies del género *Cirsium* es el 7-rutinósido de la pectolarigenina, frecuentemente acompañada con el 7-rutinósido de la acetina [47, 50, 56, 110]. Además el 4'-glucósido y 4'-rutinosido de la cirsimaritina [58], el cisilneol y 4'-glucósido del cirsiliol [50], el 7-glucósido de la cirsitakaogenina [110] y el 7-neoheperidósido de la hispidulina [56] también han sido informados.

B. Estudio Biológico.

En las pruebas de toxicidad sobre *Artemia salina* L., se encontró que las aguas madres del extracto de AcOEt de parte aérea presentaron una alta toxicidad marcada (CL_{50} = 59.88 ppm), mientras que de las aguas madres del extracto EtOH de parte aérea y el extracto EtOH de flores tuvieron una menor toxicidad sobre este crustáceo (CL_{50} = 296.20 y CL_{50} = 303.77 ppm respectivamente), como se indica en la tabla 9. Se considera que estas variaciones están influenciadas por los tipos de constituyentes y la concentración en la que se encuentran en cada uno de los extractos, mientras que la pectolarigenina y cirsimaritina, presentaron una alta toxicidad.

Con respecto a las pruebas antiinflamatorias de los extractos evaluados (tabla 10), el extracto con AcOEt presentó un mayor porcentaje de inhibición al edema de oreja de la rata [111] (69.60%). Sin embargo, al evaluar algunas sustancias presentes el dicho extracto, tales como la eupatilina e hispidulina, mostraron un bajo porcentaje de inhibición (23.65 y 25.20% respectivamente); cabe mencionar que estas sustancias fueron evaluadas por un método distinto al utilizado para los extractos, debido a problemas de solubilidad de las mismas, lo cual pudo repercutir en los resultados.

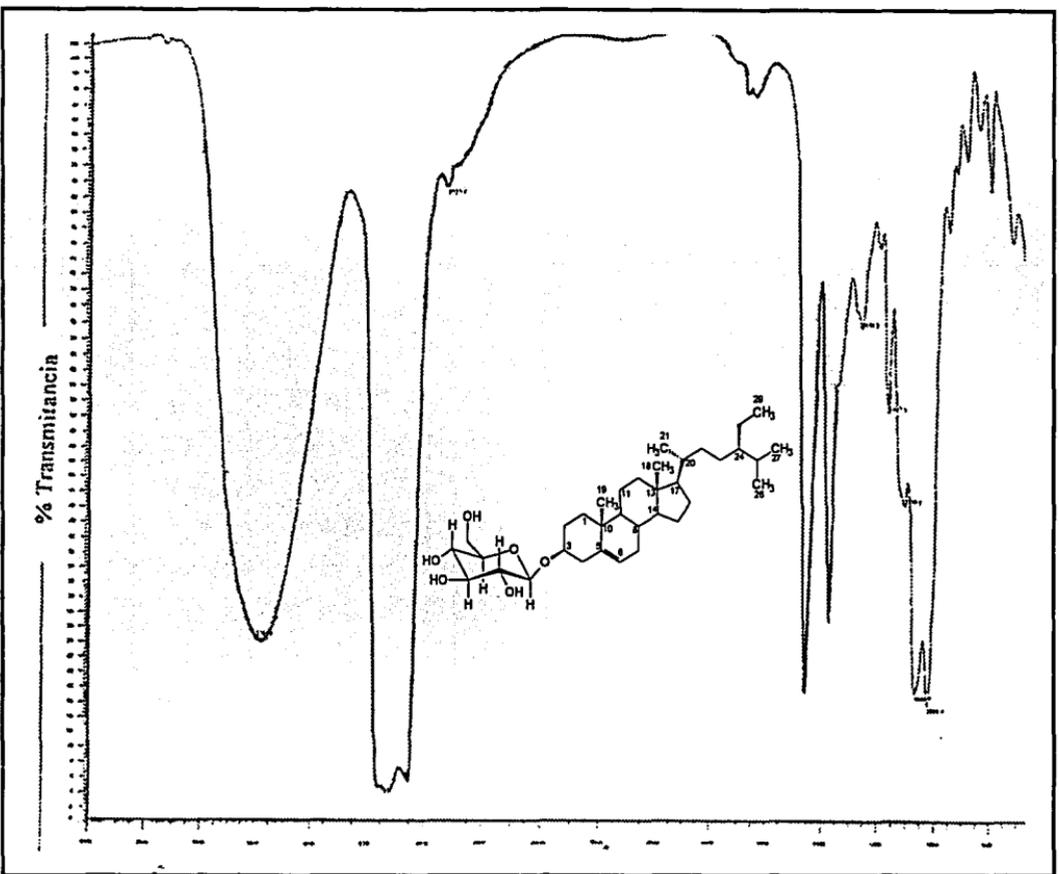
En la literatura se informa que la Eupatilina presenta actividad antiinflamatoria al inhibir la 5-lipooxigenasa [106]. De aquí que no se puede considerar que las sustancias evaluadas no presenten efecto antiinflamatorio. Asimismo, esta actividad pudo estar influenciada por la presencia de otras sustancias, tales como flavonoides glicosilados, presentes en los extractos y que no fue posible aislar.

De la evaluación antimicrobiana se encontró que los extractos activos fueron el EtOH (A.M./P.A.) frente a 8 de las 9 cepas probadas, el de AcOEt (A.M./P.A.) frente a *M. luteus*, *S. aureus* y *C. albicans*, el hexánico de parte aérea que inhibió a *M. luteus*, *C. albicans*, *S. thypi* y *S. faecalis* y Acetónico (P.A.) frente a *P. aeruginosa*. Las agliconas no presentaron actividad lo cual corrobora que las especies activas son aquellas que están glicosiladas, dado que el sólido B-1, que presentó actividad sobre *M. luteus*, *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans*, y que al ser sometido a hidrólisis ácida dispuso a las agliconas. Cabe mencionar que en la literatura se establece que los flavonoides libres y glicosilados poseen diferente actividad antimicrobiana, donde las flavonas glicosiladas presentan mayor espectro [110] con respecto a las flavonas libres [107-109]. Por lo que, se considera que este tipo de sustancias son las responsables de la actividad biológica.

X. Conclusiones.

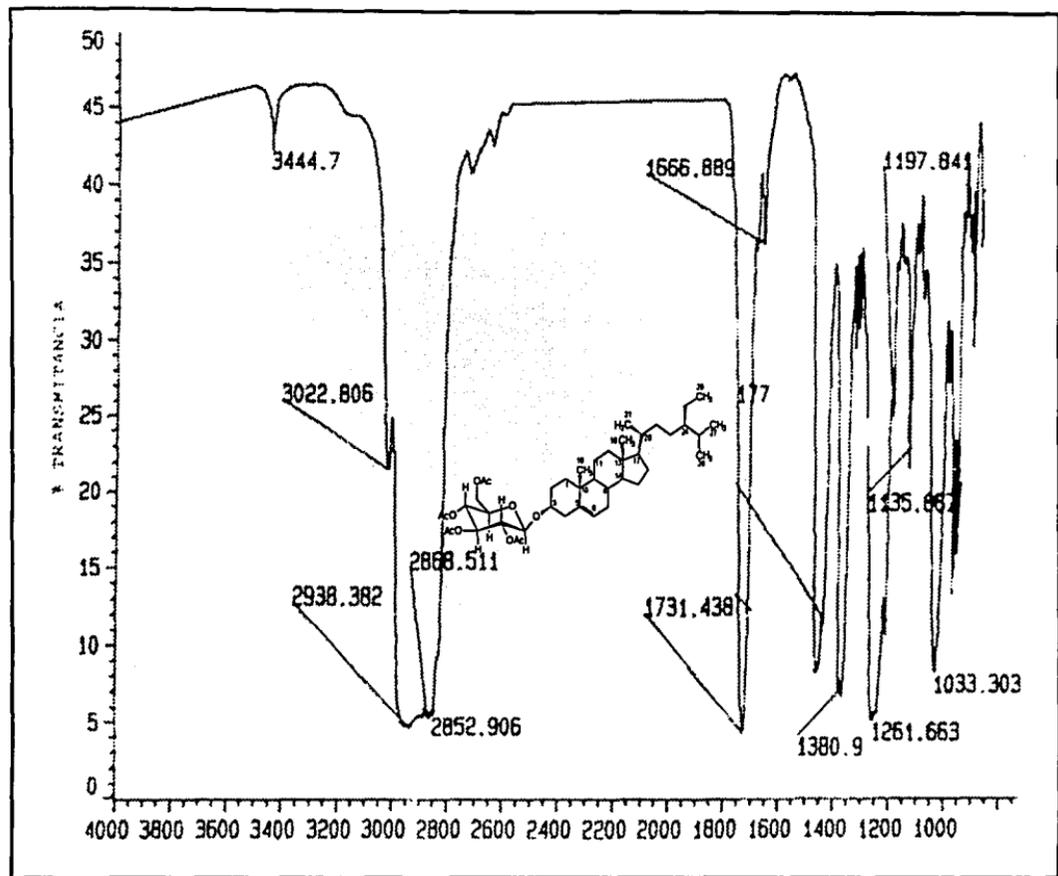
- Se obtuvieron los extractos con: n-hexano, AcOEt y EtOH de hojas y tallos, así como el CHCl₃ y EtOH de flores de *Cirsium jorullense*, los cuales fueron evaluados frente a *Artemia salina* L., siendo los de AcOEt y EtOH de parte aérea y CHCl₃ de flores los más tóxicos.
- De las pruebas antiinflamatorias, el extracto que presentó mayor inhibición a la inflamación inducida por una solución acetónica de TPA fue el de AcOEt (69.60 %).
- En las pruebas antimicrobianas, los extractos activos fueron el EtOH (A.M./P.A.) frente a 8 de la 9 cepas probadas, el de AcOEt (A.M./P.A.) frente a *M. luteus*, *S. aureus* y *C. albicans*, el hexánico de parte aérea que inhibió a *M. luteus*, *C. albicans*, *S. thypi* y *S. faecalis*, y el Acetónico (P.A.) frente a *P. aeruginosa*.
- En la separación por CCV de las Aguas Madres del extracto con AcOEt, se identificó por medio de CCF a los flavonoides pectolinarigenina, eupatilina, además se preparó el tetracetato del β-D-glucósido del β-sitosterol.
- Del tratamiento de las Aguas Madres del extracto con EtOH de parte aérea, se aisló y caracterizó a los flavonoides pectolinarigenina, eupatilina, cirsimaritina y se preparó al peracetilado de la pectolinarina. La pectolinarigenina (CL₅₀= 58.18 ppm) y cirsimaritina (CL₅₀= 38.33 ppm) fueron las sustancias más activas frente a *Artemia salina* L.
- En la purificación de la mezcla de sólidos obtenidos en la extracción con AcOEt (Sólido A) y EtOH (Sólido B) de hojas-tallo, se identificó por medio de CCF a los flavonoides hispidulina y eupatilina
- Por medio de CCF, eluyendo con Py:AcOEt:AcOH: H₂O (36:36:7:21) y revelando con anilina-ácido ftálico, se identificó a los azúcares α-L-Ramnosa (Rf= 0.79), α-D-Xilosa (Rf= 0.70) y α-D-Glucosa (Rf= 0.63) al comparar con estándares.

XI. Espectros



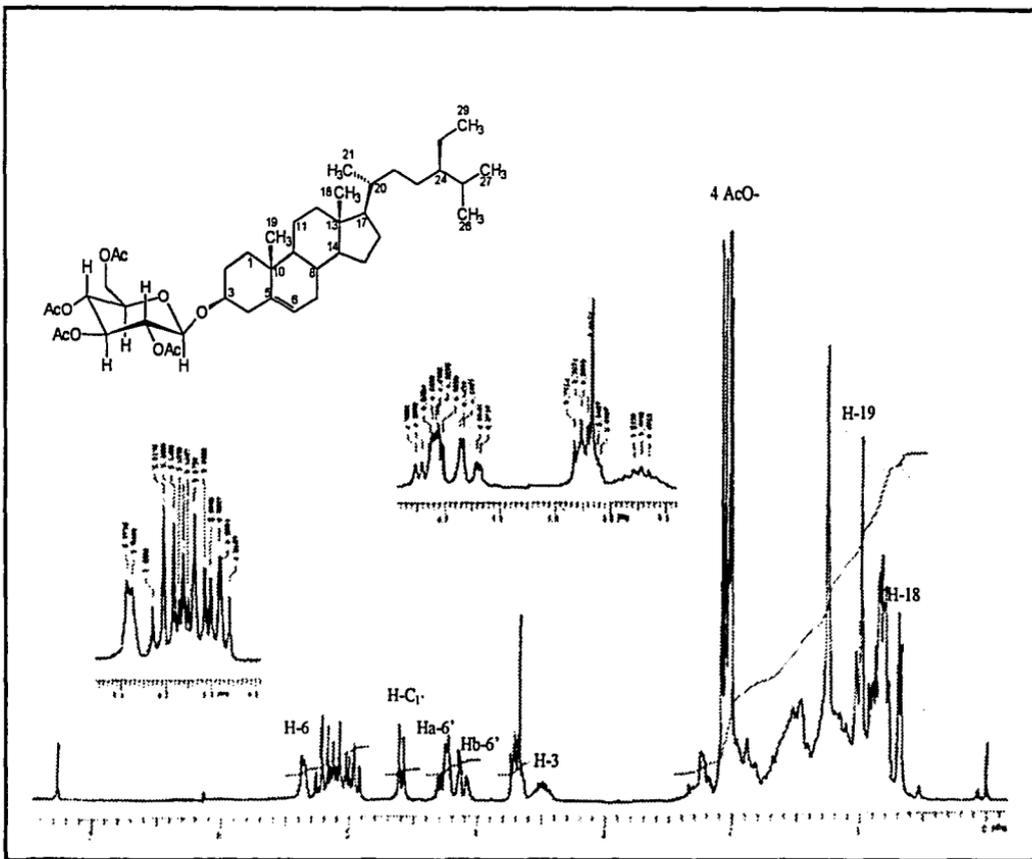
Espectro 1. IR ν_{max} (CHCl_3 , cm^{-1}), β -D-glucósido del β -sitosterol (106).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



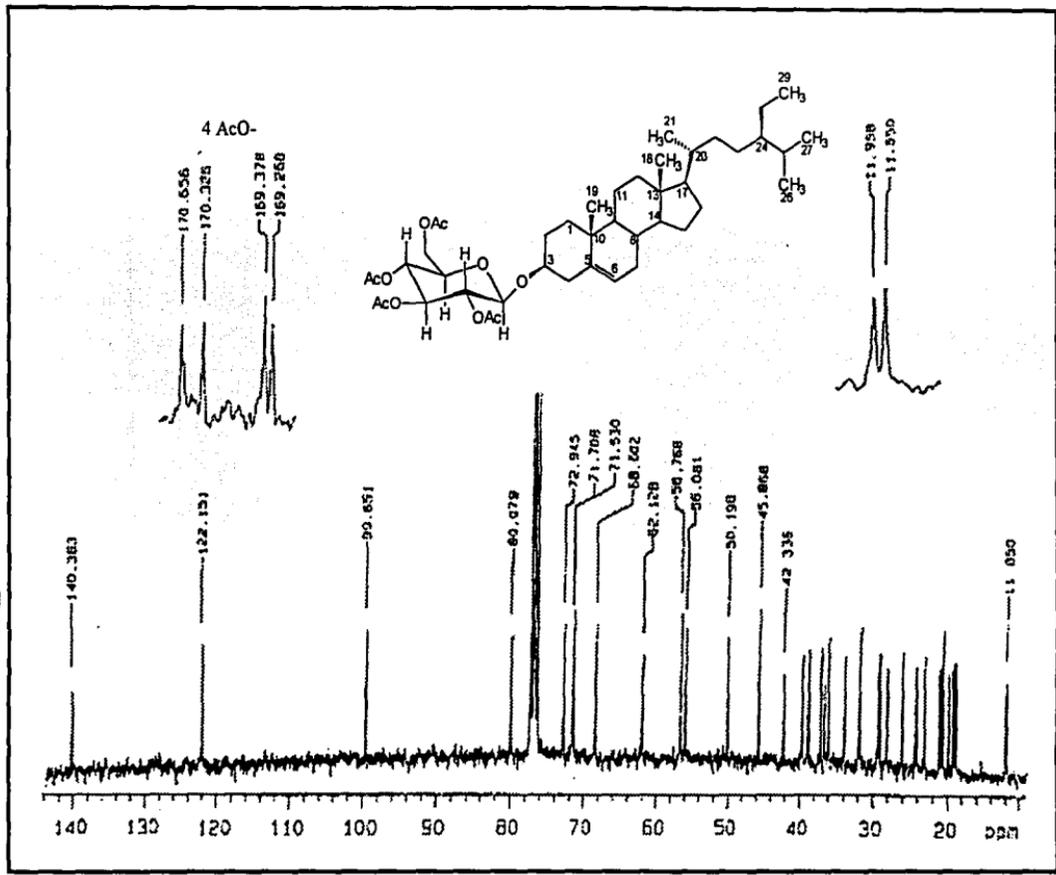
Espectro 2. IR ν_{max} (CHCl₃, cm⁻¹), tetracetato β -D-glucósido del β -sitosterol (**106 a**).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

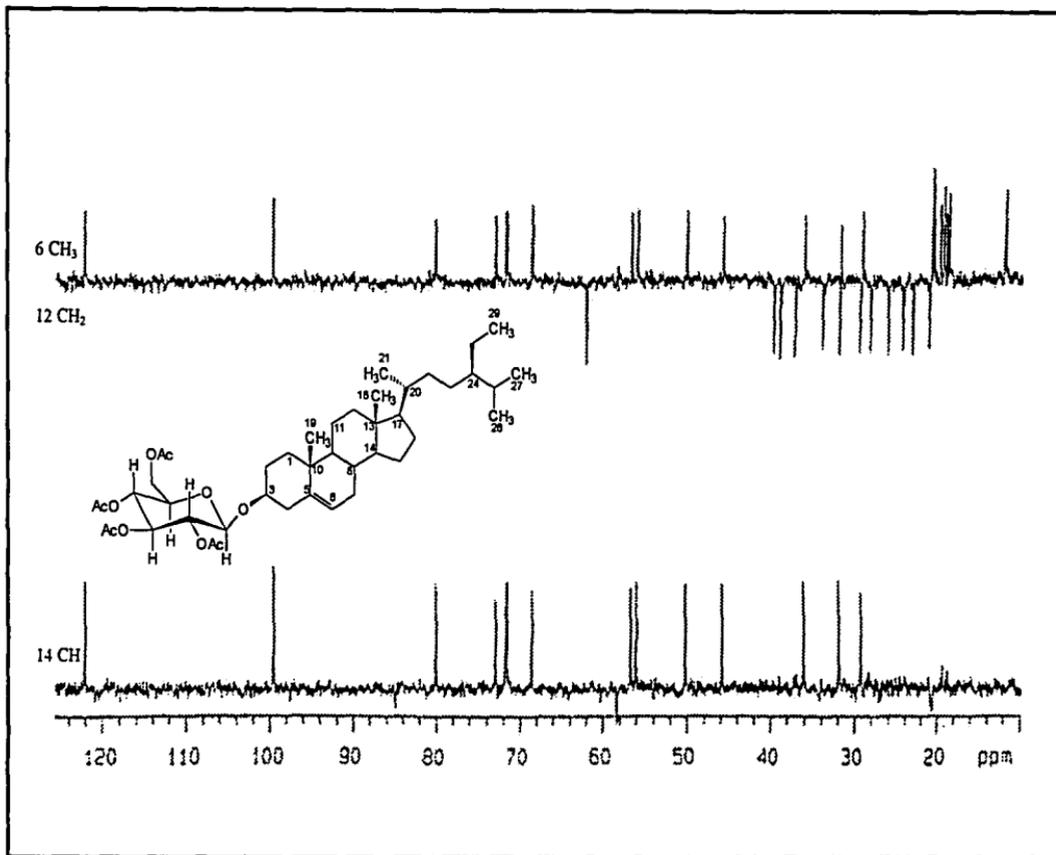


Espectro 3. RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS), tetracetato del β -D-glucósido del β -sitosterol (106 a).

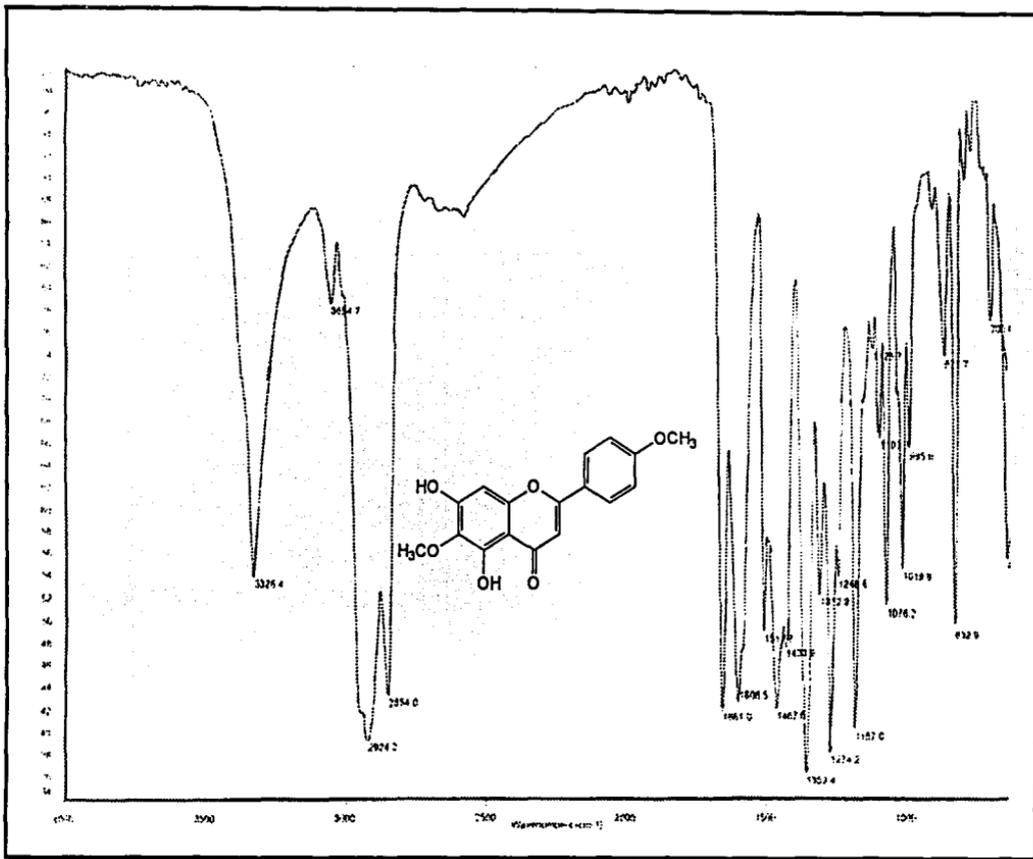
INSTITUTO
 FARMACOLÓGICO



Espectro 4. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS), tetraacetato del β-D-glucósido del β-sitosterol (**106 a**)

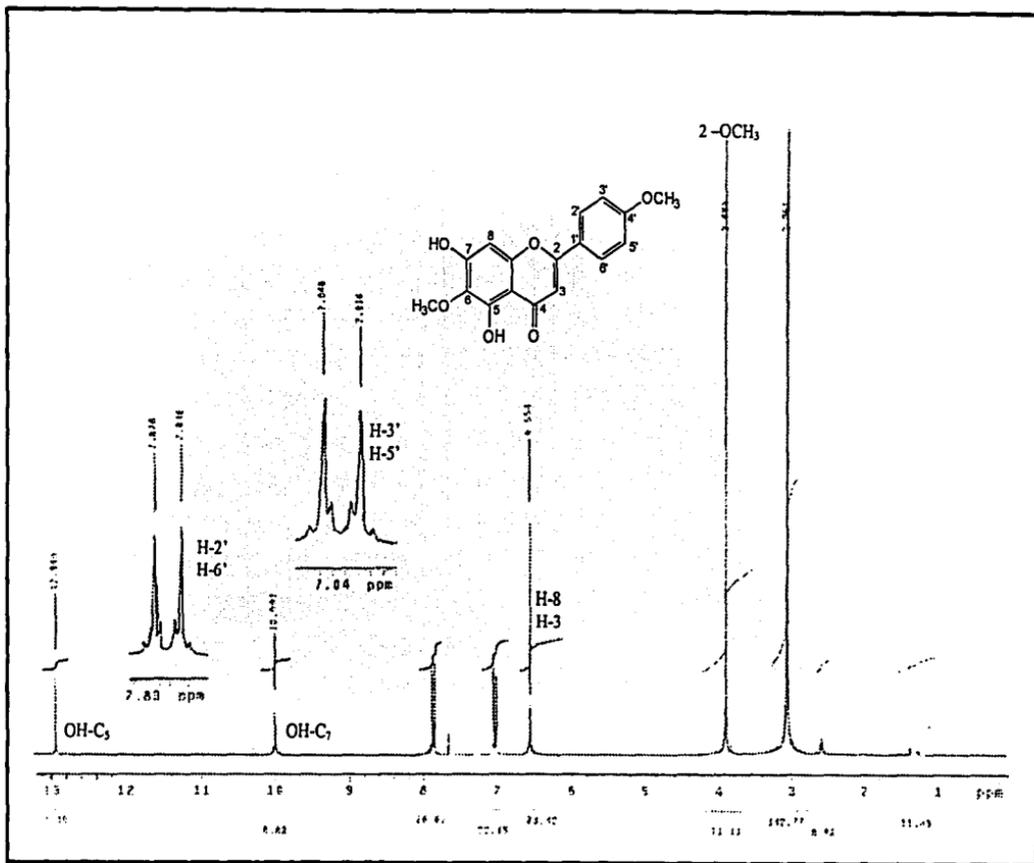


Espectro 4a. RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS), APT tetraacetato del β -D-glucósido del β -sitosterol (106 a)

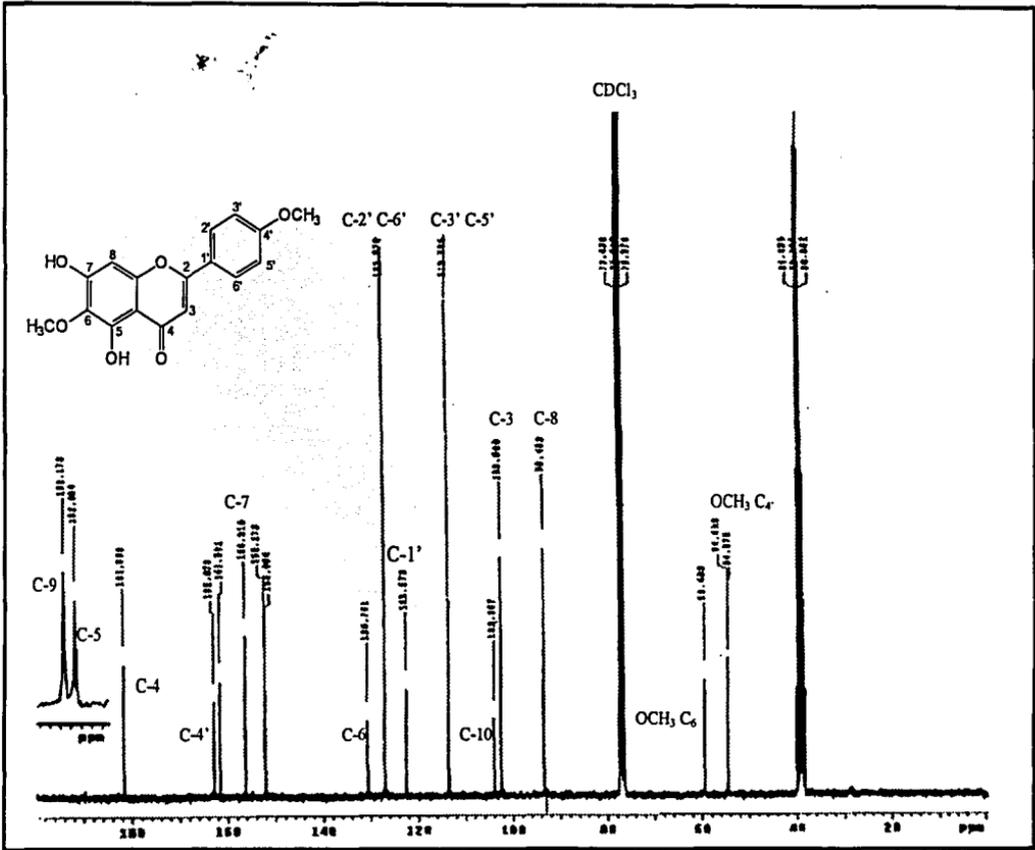


Espectro 5. IR ν_{max} (Nujol, cm⁻¹), Pectolarigenina (16).

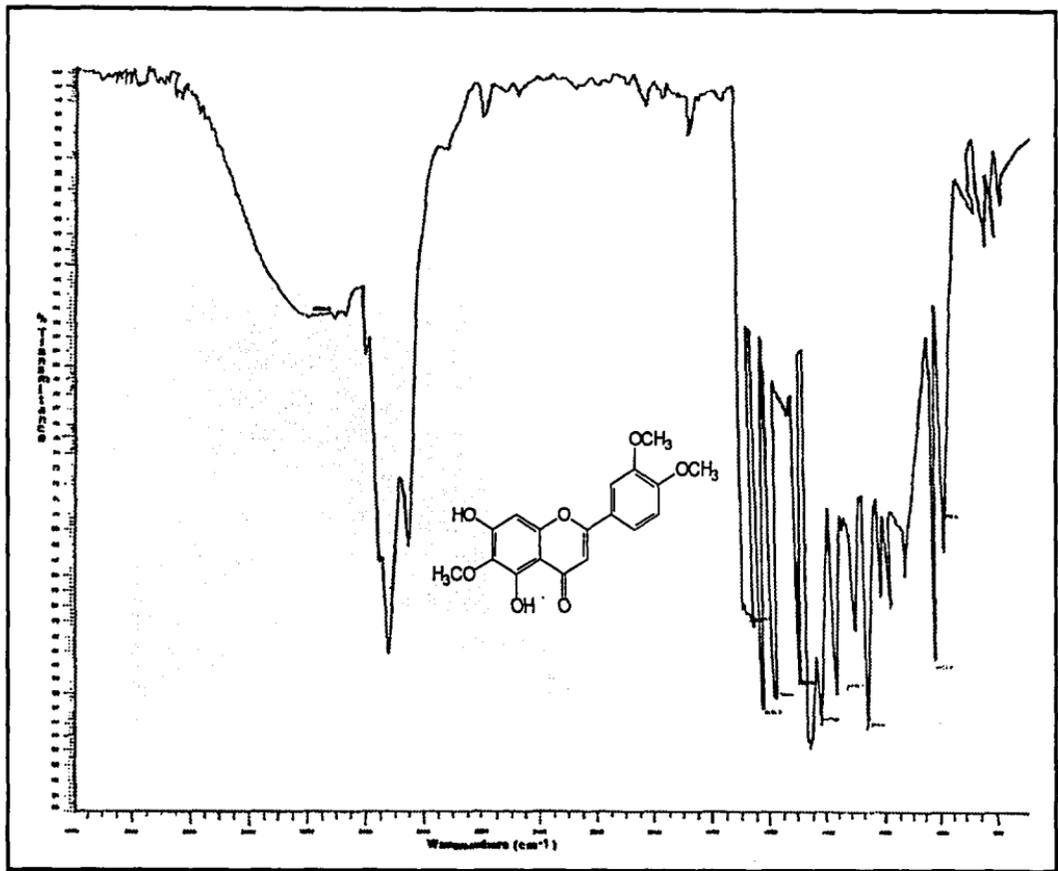
ESTUDIO QUÍMICO
Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA
DE *Cristina jorillense*

Espectro 6. $\text{RMN}-^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$, TMS), Pectolarigenina (16).

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

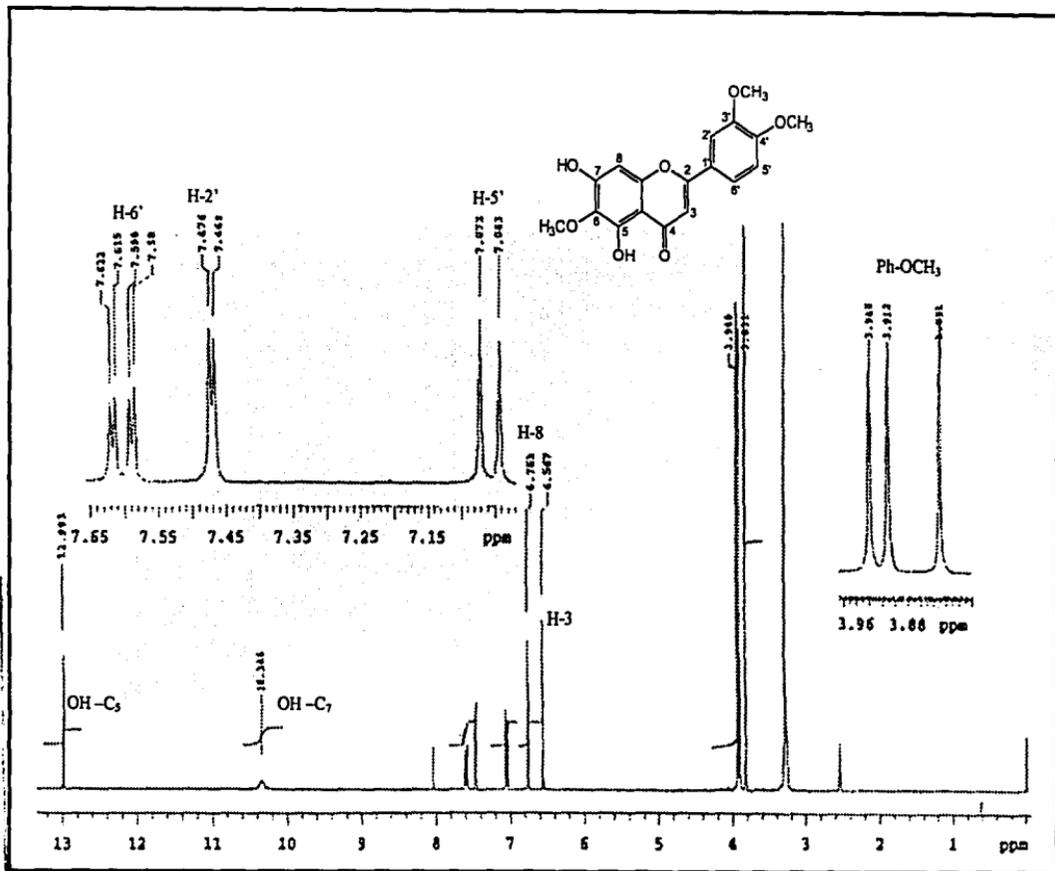


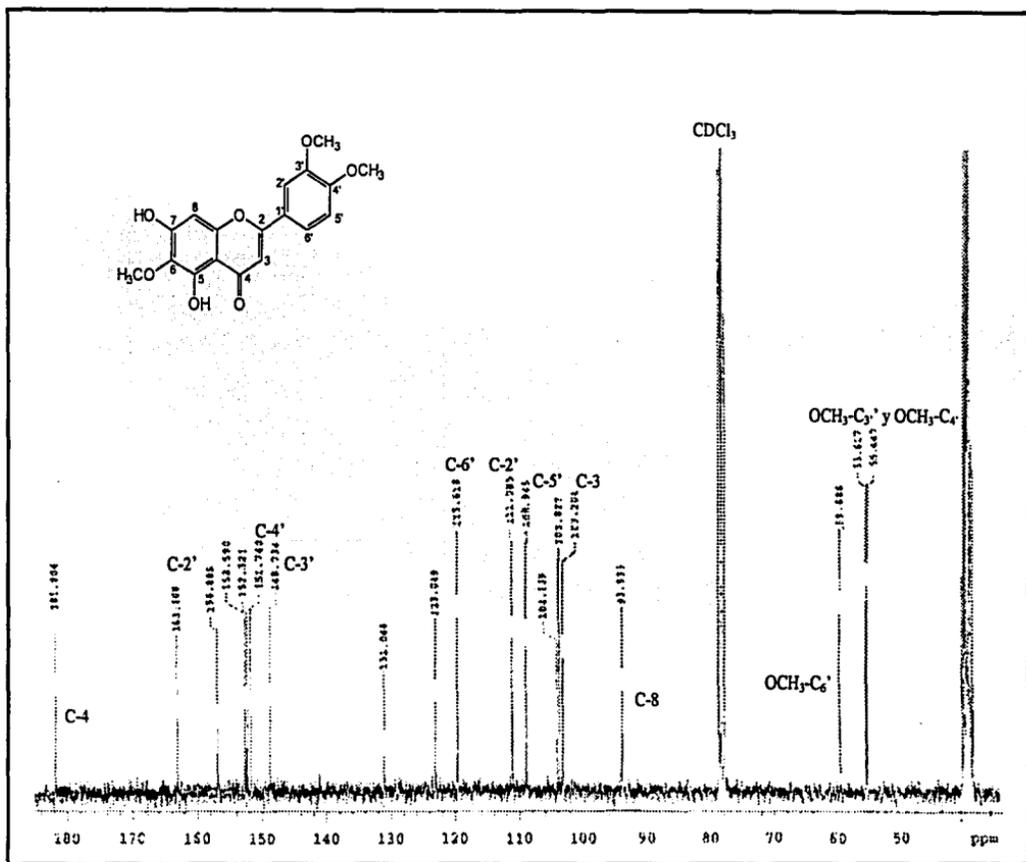
Espectro 7. RMN- ^{13}C (75 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$, TMS), Pectolinarigenina (16).



Espectro 8. IR ν_{max} (Nujol, cm^{-1}), Eupatilina (163).

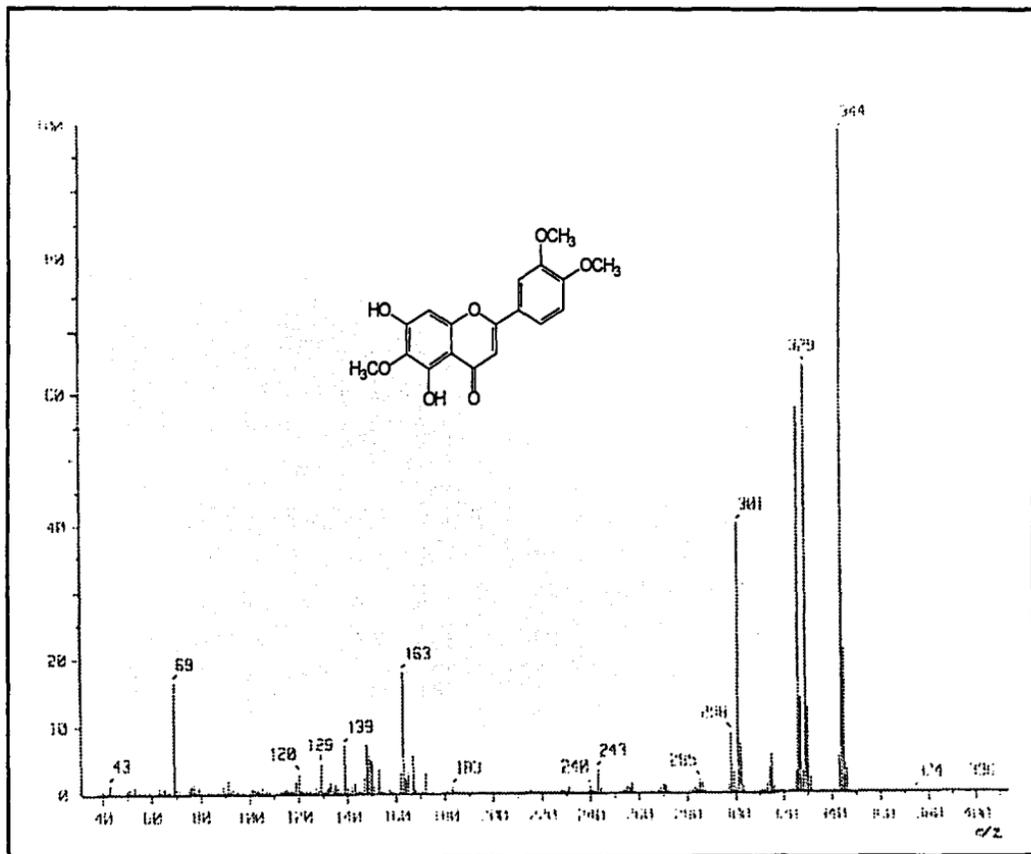
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectro 9. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃ + DMSO-d₆, TMS), Eupatilina (163).

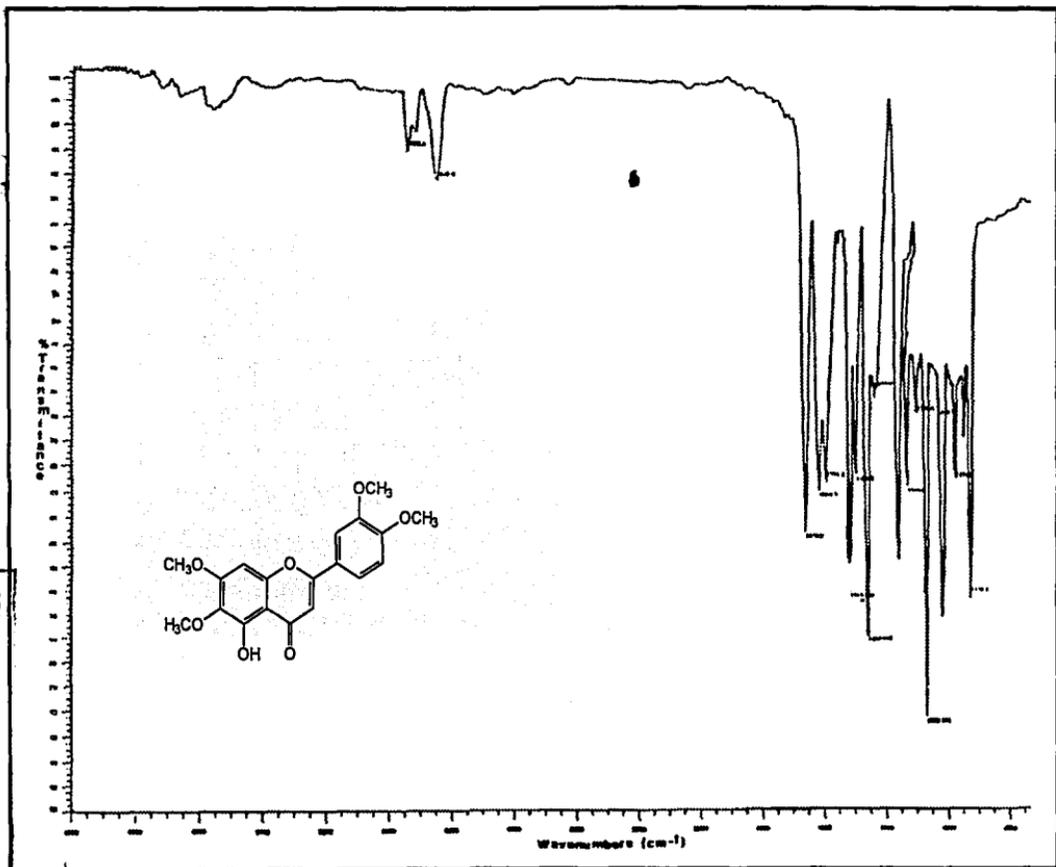


Espectro 10. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃ + DMSO-*d*₆, TMS), Eupatilina (163).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



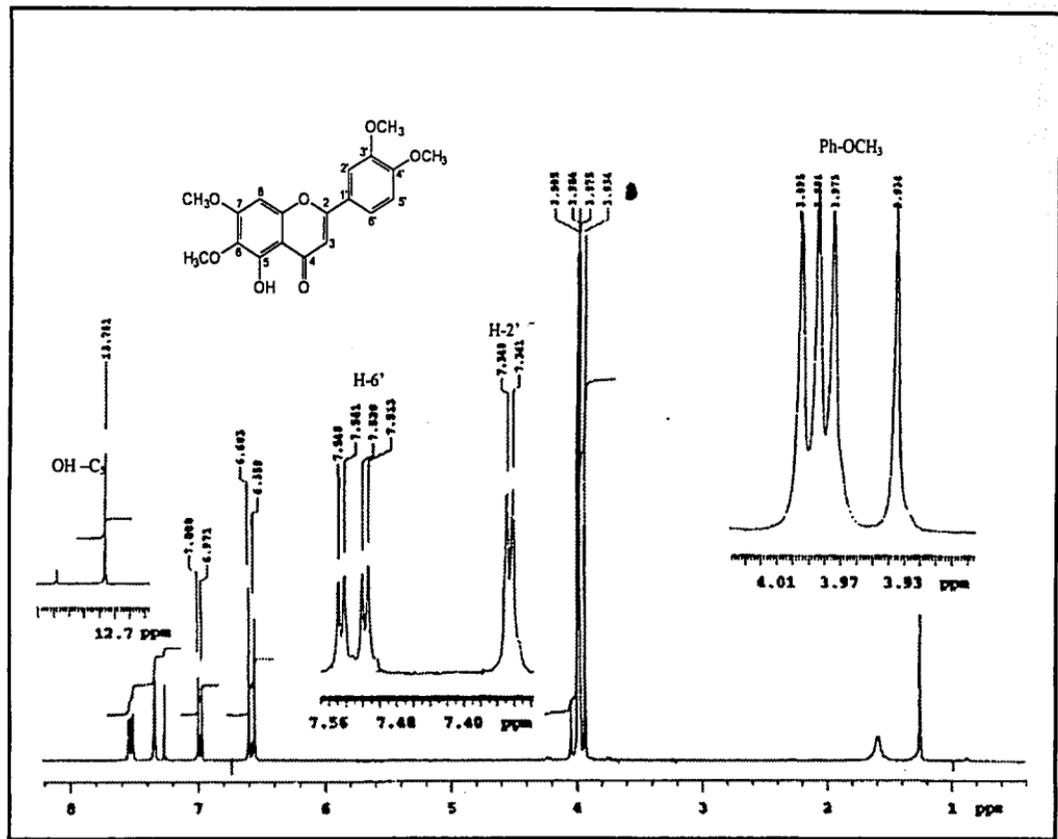
Espectro 11. EM (IE) m/z, Eupatilina (163).



Espectro 12. IR ν_{\max} (Nujol, cm^{-1}), 3',4',6,7-tetrametoxi-5-hidroxi flavona (**164**).

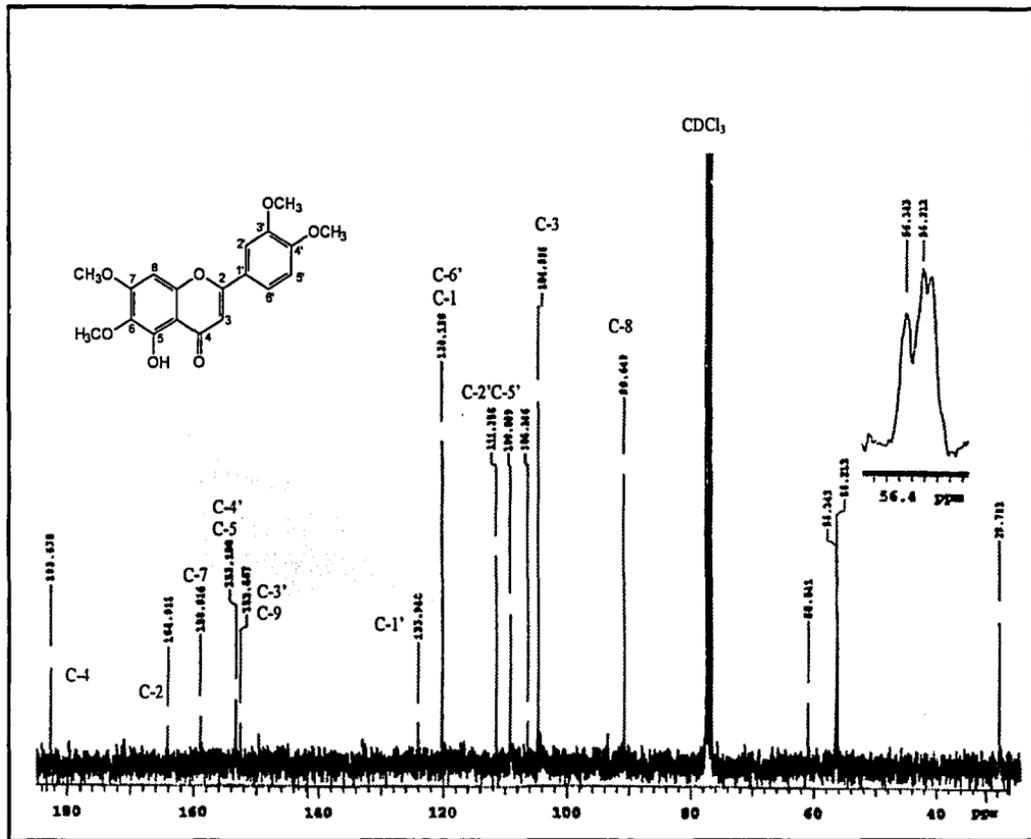
N. L. ...
 ...
 ...

TESIS CC
FALLA DE ORUGUEN

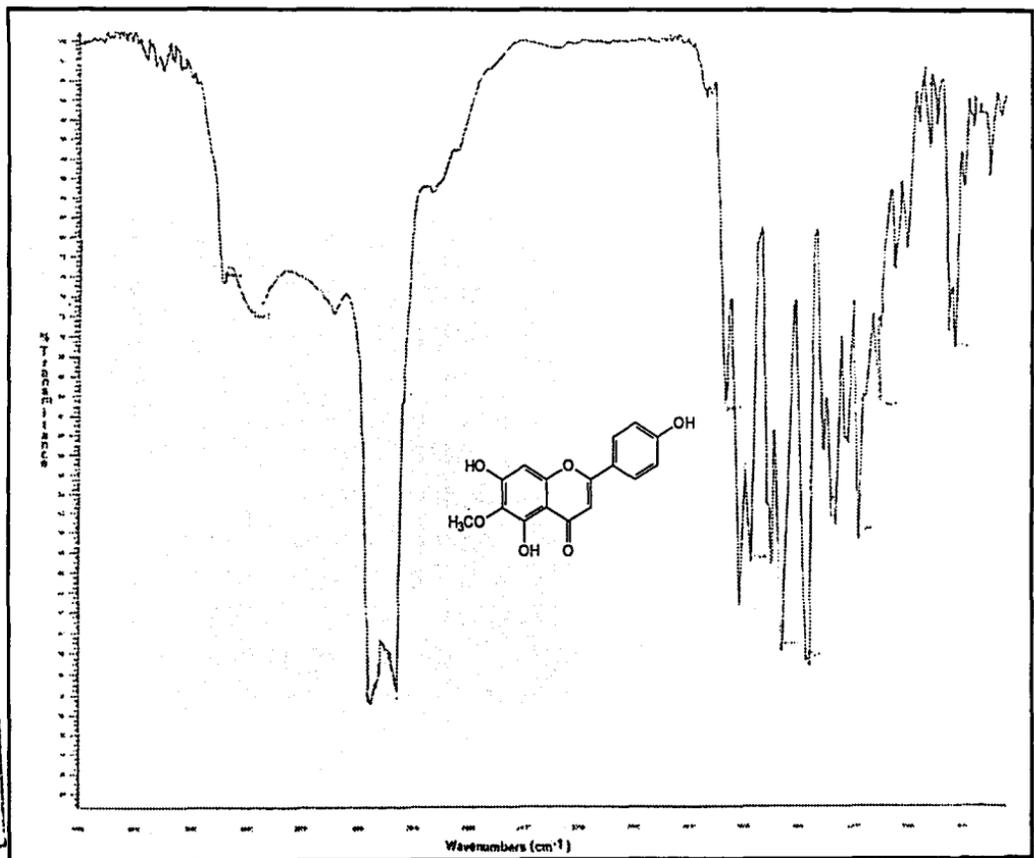


Espectro 13. RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS), 3',4',6,7-tetrametoxi-5-hidroxi flavona (164).

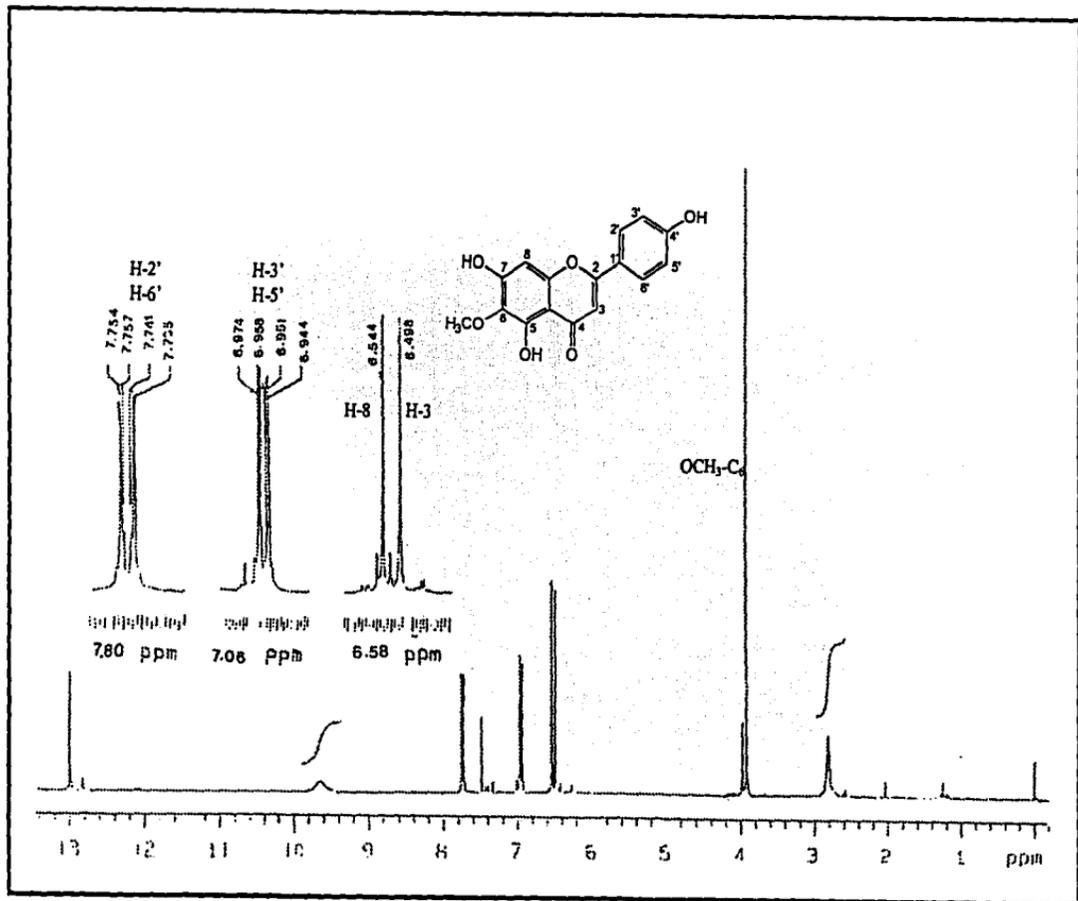
CCN
E ORIGEN



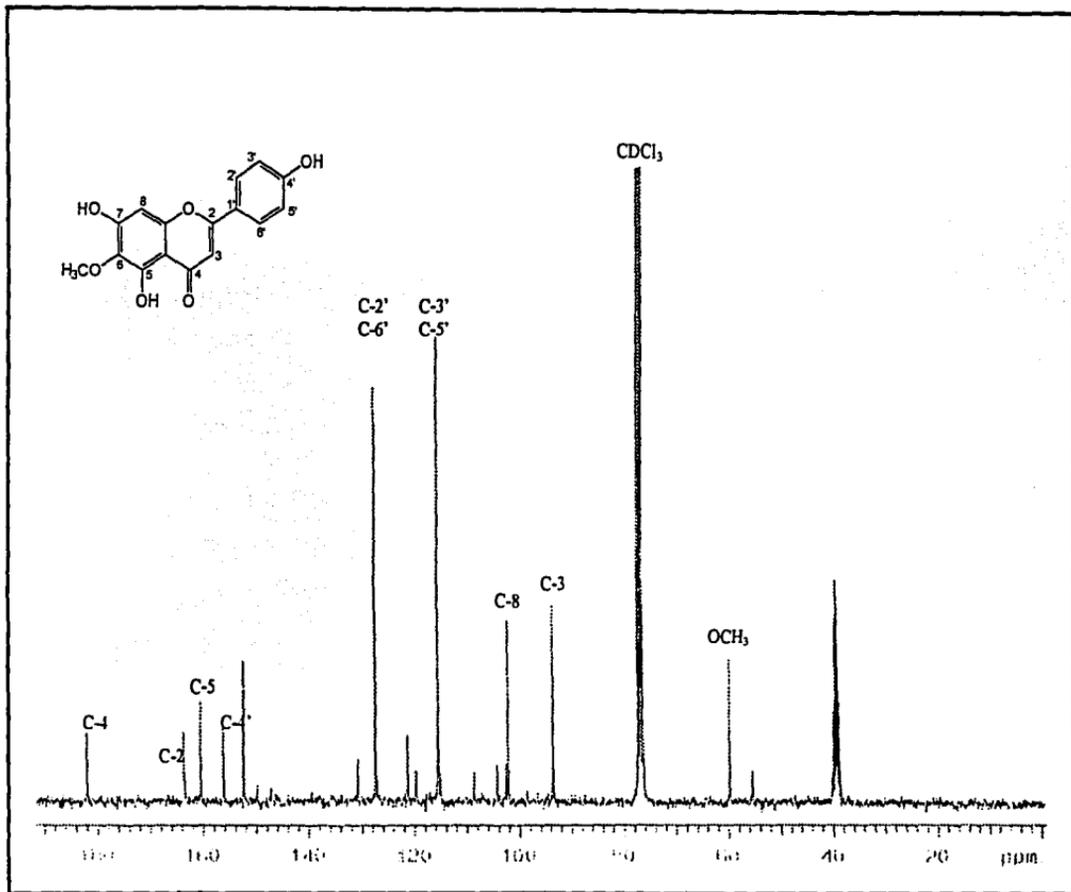
Espectro 14. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS), 3',4',6,7-tetrametoxi-5-hidroxi flavona (164).

Espectro 15. IR ν_{\max} (Nujol, cm⁻¹), Hispidulina (166).TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Espectro 16. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃ + DMSO-d₆, TMS), Hispidulina (166).



Espectro 17. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃ + DMSO-*d*₆, TMS), Hispidulina (**166**).

XII. Referencias Bibliográficas

1. Rzedowsky, J., Vegetación de México, Limusa: 2-20. México (1994).
2. Bye, R. A., Medicinal plants of the Sierra Madre: Comparative study of Tarahumara and Mexican Market Plants. *Economic Botany*. **40**: 103 (1986)
3. Hostettmann, K., Wolfender, L. and Rodríguez, S., Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. *Planta Médica*. **63**: 2-10 (1997).
4. Conley, R. T., Espectroscopia de infrarrojo. Alhambra S.A., España (1979).
5. Morris, G. A., Modern NMR techniques for structure elucidation. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **24**: 371-403 (1986).
6. Martin, G. and Zektzer, A., *Two-Dimensional NMR methods for establishing molecular connective*. VCH Publishers. New York: 267-305 (1988).
7. Cano, G. y Marroquín J., Taxonomía de plantas superiores. Trillas. México: 305 (1992).
8. Christensen, L. and Jorgen, L., Acetilenes and related compounds in *Cynareae*. *Phytochemistry*. **29**: 2753-2785 (1990).
9. Stamp, P.K. and Conn, E .E., *Flavonoids*. The Biochemistry of plants. 7. Academic-Press. USA. (1981).
10. Markham, K. R., Techniques of flavonoid identification. Academic Press. Londres: 52-53 (1982).
11. Harborne, J. B., The flavonoids. Chapman & Hall. Gran Bretaña (1994).
12. Alcaraz, M. J. and Jiménez, M. J., Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Fitoterapia* **LIX**, 25-38 (1988).
13. Reddy, G. B. S., Udupa, A. L., Shirwaikar, A., Srinivasa-Aithal, K. and Srinivasan, K. K., Comparison of the anti-inflammatory activity of certain methoxyflavonoids. *Fitoterapia* **LXI**, 460-461 (1990).
14. Gabor, M., "Handbook of Experimental Pharmacology: Anti-inflammatory Drugs". Vane J. R. Ferreira S. H. (Eds) Springer. New York: 698 (1979).
15. Martínez, M. Las plantas medicinales de México, Ed. Botas V., 6a. ed. México, 66 y 68 (1992).
16. Harborne, J. B. Phytochemistry methods. *A guide to modern techniques of plants analysis*. 2a. ed. Chapman & Hall. Gran bretaña. (1984).

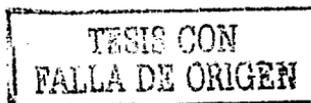
17. Sánchez, O., La flora del Valle de México. 5a. ed. Herrero S. A. 291-463. México (1979).
18. Trease, A., Farmacognosia. 13a. ed. Interamericana-McGraw-Hill. 448-453 (1991).
19. Argueta, V. A., Cano, A. L. y Rodarte, M. E. Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana I. Ed. Instituto Nacional Indigenista. México. 328, 333-335 (1994).
20. Aguilar, A. y Camacho, J. R. Información Etnobotánica. Herbario Medicinal Del Instituto Mexicano de Seguro Social. México 42-43 (1994).
21. Yano, K., Hidrocarbons from *Cirsium japonicum*. *Phytochemistry*. 16: 263-264 (1977).
22. Yano, K., A new acetilenic alcohol from *Cirsium japonicum*. *Phytochemistry*. 16: 1864-1866 (1990).
23. Takaishi, Y., Okuyama, T., Masuda, A., Nakano, K., Murakami, K. and Tomimatsu, T., Acetylenes from *Cirsium japonicum*. *Phytochemistry*. 29 : 3849-3852 (1990).
24. Takaishi, Y., Okuyama, T., Nakano, K., Murakami, K., Tomimatsu, T. and Yamahara, J., Poliolefinic compounds from *Cirsium nipponicum*., *Phytochemistry*. 30: 1539-1542 (1991).
25. Christensen, L. Aplotaxene derivates from *Cirsium helenoides*. *Phytochemistry*. 31 (6): 2039-2041 (1992).
26. Binder, R., Benson, M., Haddon, W. F. and French, R. C., Aplotaxene derivates from *Cirsium arvense*. *Phytochemistry*. 31: 1033-1034 (1992).
27. Bohlmann, F. and Abraham, W., Aplotaxene epoxide from *Cirsium hypoleucum*. *Phytochemistry*. 20: 885-886 (1981).
28. Takano, S. and Kawaminami, S., Eight aliphatic aldehydes from *Cirsium dipsacolepis* and their stereoselective synthesis. *Phytochemistry*. 26: 435-438 (1987).
29. Dutta, C. P. and Ray, P. K. Taraxasterol and its derivates from *Cirsium arvense*. *Phytochemistry*. 11: 355-364 (1971).
30. (75: 72522t) Krzysztofik, and B., Ludwiczak, R., Triterpenes and sterols from *Cirsium olereaceum*. *Rocz. Chem.* 45: 355-364 (1971) *Chem Abstrc.*
31. (77: 16569t) Piatak, D., and Eichmeier, L., S., Plant investigations II. Hexane extract of *Cirsium arvense*. *State Acad. Sci.* 64: 300-304 (1971) *Chem Abstrc.*
32. Yucheng, G., and Youyou T. Chemical constituents of *Cirsium segetum* (kitam). *Zhonggou Zhongyao Zazhi*. 19: 547-548 (1992).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

33. Dominguez, X., González A., Zamudio, M. A. and Garza, A., Taraxasterol from *Stevia berlandieri* and *Cirsium texanum*. *Phytochemistry*. **13**: 2001 (1974).
34. Khafagy, S., Halim, A. F. and Gohar, A. A., Chemical study of *Cirsium Syriacum*. *Fitoterapia*. **52**: 21-23 (1981).
35. (116: 55515r) Rasulov, F. A., Serkerov, S. V., Ismailov, N. M. and Novrozov, E. N., Chemical investigations of *Cirsium echinus*. *Biol. Nauk.* 14-16 (1989) *Chem Abstrc.*
36. Takano, S. and Kawakaminami, S. Cyperenyl acetate and Cyperal from *Cirsium dipsacolepis*. *Phytochemistry*. **27**: 1197-1199 (1988).
37. Shirley, G. and Wallace, J. W. Flavonoids and phenolic acids from *Cirsium lanceolatum*. *Phytochemistry*. **11**: 1503-1504 (1972).
38. (55: 9580d) Warner, H., Hörhammer, L. and Kirchner, W., Flavones of *Compositae* and *Papilionactae* I. Occurrence Pectolinarin and Linarin in the plant kingdom. *Arch. Pharm.* **293**: 1053 (1960 *Chem Abstrc.*)
39. (55: 3065i) Nakaoki, T. and Morita, N., Medicinal Resources XIV. Flavonoids of *Cirsium* 2. Components of the leaves of *Cirsium kagamontanum*, *C. inundatum* and *C. matsumare*. *Yakugano Zasshi*. **80**: 1296-1299 (1960) *Chem Abstrc.*
40. (54: 3855a) Nakaoki, T. and Morita, N., Medicinal Resources XIII. Flavonoids of *Cirsium* 1. Components of the leaves of *Cirsium microspicatum*, *C. otaye*, *C. yoshizawae*, *C. japonicum* and *C. purpuratum*. *Yakugano Zasshi*. **79**: 1338-1340 (1959) *Chem Abstrc.*
41. (83: 40200k) Lin, Ch. N., and Cheng-Itsiung, Ch., Components of Formosan *Cirsium* species II. Components of *C. arisanense*. *J. Chin. Chem. Soc.* **22**: 53-55 (1975) *Chem Abstrc.*
42. (88: 34562s) Naoyoshi, M., Studies in the components of Formosan *Cirsium* Species IV. Components of *C. arisanense* kitamura and *C. ferum* kitamura. *T'ai-won yao Hsueh Tsa Chih.* **28**: 40-42 (1977) *Chem Abstrc.*
43. (89: 126161j) Shelyuto, V. L., Glyzin, V. Y., Yurchenko, G. N. and Sirnova, L. P., Flavonoids from *Cirsium oleraceum* flowers. *Khim. Prir. Soedin.* 400 (1978) *Chem Abstrc.*
44. (121: 104074k) Jaechul, D., Keun, K. Y. and Son, K. H., Insolation of Pectolinarin from the aerial parts of *Cirsium nipponicum*. *Saengyak Hakhoechi.* **25**: 73-75 (1975) *Chem Abstrc.*
45. (122: 27693c) Lee, H. B. and Kwak, J. H., Flavonoids from *Cirsium Rhinoceros*. *Arch Pharmacol. Res.* **17**: 273-277 (1994) *Chem Abstrc.*

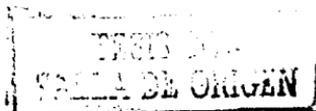
46. (75: 115878h) Shelyuto, V. L., Glyzin, V. I., Ban'kouskii, A. Y. and Bubon, N. T., Flavonoids glycosides of *Cirsium oleraceum*. *Khim. Prir Soedin*. 7: 372 (1971) *Chem Abstrc.*
47. Gardner, R. C., Acacetin-7-O-rutunoside and Pectolinarin from *Cirsium coloradense*. *Phytochemistry*. 12: 223 (1973).
48. (102: 12242t) Lee, Y. Ch and Park, Y. H., Chemical studies on *Cirsium* Species (V). Chemical constituents of the roots of *C. xanthocanthum*. *Saengyak Hakhoe Chi*. 15: 74-77 (1984) *Chem Abstrc.*
49. (96: 31651z) Wu, T. S., Constituents of Formosan folk medicine VIII. Flavonoids of the leaves of *Cirsium albescens*, *C. japonicum* var. *australe*, *C. kawakamii*, *C. variegatum* and *C. hosogama*. *T'ai-wan Yao Hsueh Chi*. 32: 88-90 (1981) *Chem Abstrc.*
50. Morita N., Shimizu, M. and Arizawa, M., Two new flavone glycosides from *Cirsium Lineare*. *Phytochemistry*. 12: 421-423 (1973).
51. (88: 117796x) Rendyuk, T. D., Glyzin, V. Y. and Shreter, A. J., Phytochemical study of *Cirsium setosum* (wild). *Acta Pharm. Jugosl*. 27: 135-138 (1977) *Chem Abstrc.*
52. (77: 58854n) Shelyuto, V. L., Glyzin, V. Y. and Bubon, N. T., Flavonol glucuronides from *Cirsium arvense*. *Khim. Prir Soedin*.: 240-241 (1972) *Chem Abstrc.*
53. (73: 106309e) Shelyuto, V. L. and Glyzin, V. Y., Ban'kouskii, A. Y., Flavonoids from *Cirsium arvense*. *Khim. Prir Soedin*. 6: 365-366 (1970) *Chem Abstrc.*
54. (77: 58855p) Shelyuto, V. L., Glyzin, V. Y. and Bubon, N. T., Flavonoids from *Cirsium palustre*. *Khim. Prir Soedin*.: 241-242 (1972) *Chem Abstrc.*
55. Wallace, J. W., Tricin-5-O-glucoside and other flavonoids of *Cirsium arvense*. *Phytochemistry*. 13: 2320-2321 (1974).
56. Park, J. Ch., Lee, J. H. and Choi, J. S., A flavone diglycoside from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*. *Phytochemistry*. 39: 261-262 (1995).
57. (91: 189826s) Yung, H. S. and Chang I. M., Separation and identification of Cirsimarín from *Cirsium pendulum*. *Saengyak Hakoe Chi*. 9: 145-147 (1978) *Chem Abstrc.*
58. Wallace, J. W., Cirsimaritin-4'-O-rutinoside, a new flavone glycoside from *Cirsium brevistylum*. *Phytochemistry*. 10: 452-454 (1971).
59. Shen, Y. M. and Mu, Q. Z., New furans from *Cirsium chlorolepis*. *Planta Medica* 56: 472-474 (1990).

60. (121: 251185a) Sawaguchi, K., Nakao, K., Shimamura, T. and Ohsawa, K., A new antimicrobial and antioxidative component of extracts from rhizomes of *Cirsium breviacule* A. Gray var. *irumtense* Kitam. *Bokin Bobai*. 22: 271-275 (1994) *Chem Abstrc.*
61. Negi, R. K. S., Fakhir, T. M. and Rajagopalan, T. R., A pyrrolizidine alkaloid from *Cirsium wallichii* DC. *Ind. J. Chem.* 28B: 524-525 (1989).
62. Yamamoto, S., Yoshimoto, T., Furukawa, M., Horie, T. and Watanabe-Kohno, S., Arachidonate 5-lipoxygenase and its new inhibitors. *J. allergy clin. immunol.* 74: 349 (1984).
63. Recio, M. C., Giner, R. M., Máñez, S., Gueho, J., Julien, H. R., Hostettmann, K. and Rios, J. L., Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. *Planta Médica*. 61: 9-12 (1995).
64. Recio, M., Giner, R. M., Máñez, S. and Rios, J. L., Structural Requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Médica*. 61: 182-185 (1995).
65. Middleton, E., Drzewinecki, G. and Krishoaroo, D., Quercetin: an inhibitor of antigen-induced human basophil histamine release. *The journal of immunology* 127: 546-550 (1981).
66. Fewtrell, C. M. S. and Gomperts, B. D., Quercetin: a novel inhibitor of Ca^{2+} influx and exocytosis in rat peritoneal mast cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 469: 52-60 (1977).
67. Berton, G., Shneider, C. and Romeo, D., Inhibition by quercetin of activation of polymorphonuclear leucocyte functions. *Biochimica et Biophysica Acta* 595: 47-55 (1980).
68. Gschwendt, M., Horn, F., Kittstein, W. and Marks, F., Inhibition of the calcium and phospholipid-dependent protein kinase activity from mouse Brain cytosol by quercetin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 117: 444-447 (1983).
69. Williams, A., Harborne, J.B., Geiger, F., Robin, J. and Houit, S., The flavonoids of *Tanacetum patthenium* and *T. Vulgaris* an their anti-inflammatory properties. *Phytochemistry* 51: 147-423 (1999).
70. Fewtrell, C. M. S. and Gomperts, B. D., Effect of flavone inhibitors of transport ATPases on histamine secretion from rat mast cells. *Nature* 265: 635-636 (1977).
71. Fushiya, S., Kishi, Y., Hattori, K., Batkhuu, J., Takano, F., Singab, A, N, B and Okuyama, T., Flavonoids from *Cleome droserifolia* suppress NO production in activated macrophages in vitro. *Planta Medica* 65: 404-407 (1999).



72. Lanni, C. and Becker, E. L.; Inhibition of neutrophil phospholipase A2 by *p*-bromophenylacetyl bromide, nordihydroguaiaretic acid, 5,8,11,14-eicosatetraenoic acid and quercetin. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.* 76: 214-217 (1985).
73. Kimura, Y., Okuda, H. and Arichi, S.; Studies on *Scutellariae radix*, XIII. Effects of various flavonoids on arachidonate metabolites in leukocytes. *Planta Medica* 132-136 (1985).
74. Goel, R. K., Maiti, R. N. and Tavares, I. A., Role of endogenous eicosanoids in the antiulcer effect of kaempferol. *Fitoterapia* LXVII, 548-552 (1996).
75. Blackburn, W. D., Heck, L. W. and Wallace, R. W., The bioflavonoid quercetin inhibits neutrophil degranulation, superoxide production, and the phosphorylation of specific neutrophil proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 144, 1229-1236 (1987).
76. Foreman, J. C., Mast cells and the actions of flavonoids. *Journal Allergy Clinical Immunology* 73, 769-774 (1984).
77. Martínez-Vázquez, M., Ramírez, A. T., Lastra, A. L. and Bye, R., A comparative study of the analgesic and anti-inflammatory activities of pectolinarin isolated from *Cirsium subcoriaceum* and linarin isolated from *Buddleia cordata*. *Planta Medica* 64, 134-137 (1998).
78. Vogel's, Textbook of practical organic chemistry, 5a de., Longman scientific & technical, New York, U.S.A., 181-197 (1989).
79. Coll, J.C. and Bowder, B.T., The application of vacuum liquid chromatography. An alternative to common chromatography methods. *J. Org. Chem.* 44: 4962 (1971).
80. Weissberger, A., (ed) Crystallization and recrystallization. 5: 395 (1978).
81. Gringerb, N., Modern Thin Layer Chromatography Science Series. Marcel Dekker, Inc., New York. 52 (1990).
82. Hostettmann, K., Preparative Chromatography Techniques. Springer-Verlag. Berlin GDK (1986).
83. Jork, H., Thin Layer Chromatography. VCH. Federal Republic of Germany. (1990).
84. Martson, A. and Hostettmann, K., Modern Separation Methods. *Natural Products Reports*. 8:391 (1991).

85. Farkas, L., Constituents of *Iva* Species. isolation, structure and synthesis of Nevadensin, a new flavone from *Iva nevadensis* M. E. Jones and *Iva acerosa* (Nutt.) Jackson. *J. Org Chem.* **31**: 3228-3232 (1966).
86. Kupchan, S. M., Sigel, C. W., Hemingway, R. J., Knox, J. R. and Udayamurthy, M. S., Tumor Inhibitors-XXXIII. Cytotoxic flavones from *Eupatorium* species. *Tetrahedron.* **25**: 1603-1615 (1969).
87. McLaughlin, J., Crow gall tumors on potato disc and Brine Shrimp lethaly: Two simples bioassay for higher plant screening and fractionation. *Methods in plant Biochemistry.* **6. Assay for Bioactivity.** Academic Press. Limited. USA. 1-30 (1991).
88. Hostettmann, K. Marston, A. and Wolfender, J. L., Strategy in the search for new biologically active plant constituents. In phytochemistry on plants used in traditional medicine. Oxford University Press. USA. 17-45 (1995).
89. Meyer, B., Ferrigni, N., Putman, J., Jacobsen, L., Nichols, D. and McLaughlin, J., Brine shirp: A concient general bioassay, for active plant constituents. *Planta Medica.* **45**: 31-34 (1982).
90. Mitscher, L. A., Ruey-Ping, Mohidar S. B., Wunan Wu and Jack L. B., Antimicrobial agents from higer plants 1. Introduction, rationale and methodology. *Lloydia.* **35**: 157-163 (1972).
91. Barahona, M., Cano, M. y Sánchez-Fortún, S., Toxicidad de cuatro solventes orgánicos sobre tres estadios de desarrollo larvario de *Artemia salina*. *Revista de Toxicología.* **11**: 92-95 (1994).
92. Flores, G., Sinergismo de la actividad larvicida de α -sanshool sobre *Culex quinquefasciatus* y *Artemia salina*. Compuestos metilendioxfenilos. Tesis Químico Farmacéutico Biólogo. F.E.S. Zaragoza. U.N.A.M. México (1995).
93. Vander, D. and Vlietinck, A., Screening methods for antibacterial and antiviral agent from higer plants. *Methods in plant biochemistry.* **6. Assay for activity.** Academic Press Limited. USA. 47-67 (1991).
94. Finney, D., Statical method in biological assay. 3a ed. McMillan Pub. Co. USA. 349-403 (1978).
95. Rao, C. N. R. Espectroscopia Ultravioleta y Visible. Alhambra. España (1970).



96. Voirin, B., UV spectral differentiation of 5-hydroxy and 5-hydroxy-3-metoxylflavones with mono-(4'), di (3',4'), o tri (3',4',5')-substituted brings. *Phytochemistry*. **22**: 2107 (1983).
97. Mears, J. A., A procedure for the UV detection of hydroxyl and methoxyl groups at C6 in flavones and 3-O-substituted flavonols. *Phytochemistry*. **11**: 411-412 (1972).
98. Iwashina, T., Hispidulin and nepetin 4'-glucosides from *Cirsium oligophyllum*. *Phytochemistry*. **51**:1109-1111 (1999).
99. Timmermann, B.N., Mues, R., Mabry, T. J. and Powell, M., 6-methoxylflavonoids from *Brickellia laciniata* (Compositae). *Phytochemistry*. **18**: 1855-1858 (1979)
100. Merfort, I., Flavonolglucuronide aus den Blüten von *Arnica montana*. *Planta Medica*. **54**: 247-250 (1988).
101. Wade, L. G., Química Orgánica, 2a. ed., Ed. Prentice-Hall. Hispanoamericana. México. 527-599 (1993).
102. Nanishi, K., *Natural Products Chemistry I*. Academic Press, New York. 12-35. (1982).
103. Ternal, B. and Markham, K. R. Carbon-13 NMR studies of flavonoids I, flavones and flavonols. *Tetrahedron*. **32**:565-569. (1976).
104. Voelter, W. and Breitmaier, F., Carbon-13 NMR spectroscopy. 3ª ed. VCH Publishers. New York. 450-453. (1990).
105. Furukawa, M., Yoshimoto, T., Ochi, K., and Yamamoto, Sh., Studies on arachidonate 5-lipoxygenase in rat basophilic leukemia cells. *Biochemica et Biophysica Acta*. **795**: 458-465 (1984).
106. Huffor, Ch D. and Lassawell, I. Antimicrobial activities of constituents of *Uvaria chamae*. *Lloydia*. **41**: 156-160. (1978).
107. Zheng, W. E. Tan, R. X., and Liu, Z. L., Two flavones from *Artemisia giraldi* and their antimicrobial activity. *Planta Medica*. **62**:160-162. (1996).
108. Rwangabo, P.C., Muhengerin, a new antimicrobially active flavonoid from *Lantana trifolia*. *Journal of Natural Products*. **51**: 966-968. (1988).
109. Waage. S. K. and Hedin, P. Quercetin-3-O-galactosyl-(1→6)-glucoside, a compound from arrow leaf vetch with antibacterial activity. *Phytochemistry*. **34**: 343-245. (1985).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

110. Lin, Ch N., Arisawa, M., Shimizu, M., and Morita N., The constituents of *Cirsium japonicum* D. C. var. *takaoense* Kitamura. Isolation of two new flavonoids, cirsitakaoside (IV) and cirsitakaogenin (VI). *Chem. Pharm. Bull.* 26: 2036-2039. (1978).
111. Faizi, S., Ali, M., Saleem, R., Irfanullah, Bibi, S., Complete ^1H and ^{13}C NMR assignments of stigma-5-en-3- β -glucoside and its acetyl derivative. *Magnetic Resonance in Chemistry.* 39: 399-405. (2001).
112. Martínez, V., Barbera O., Sánchez-Parareda, J., Marco, J., Phenolic and acetylenic metabolites from *Artemisia Assoana*. *Phytochemistry.* 26: 2619-2624. (1987).
113. Dommise, R. A. and Savona, G., Additional proof for the structure of the new flavone galagustine (bucegin) obtained by ^{13}C -NMR spectroscopy. *Bull Soc. Chim. Belg.* 92: 497-198 (1983).
114. Laszlo, P., Solvent effects and nuclear magnetic resonance. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy.* 3: 231-419 (1967).

FALTA DE ORIGEN
NO SISL