

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**“Estudio fitoquímico y determinación de la actividad antiinflamatoria
de los compuestos aislados de *Cnidocolus urens*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

L. F. Ihtiel Benítez Cortés

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE 2020

DR. VICTOR BARBA LÓPEZ
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada "Estudio fitoquímico y determinación de la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados de *Cnidocolus urens*" que presenta el alumno Ihtiel Benítez Cortés (10019223) para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Jaime Escalante García CIQ-UAEM	Aprobado	
Dr. Ismael León Rivera CIQ-UAEM	Aprobado	
Dr. Benjamín Velasco Bejarano FES Cuautitlán-UNAM	Aprobado	
Dra. Ma. Yolanda Rios Gómez CIQ-UAEM	Aprobado	
Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama CIQ-UAEM	Aprobado	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

BENJAMIN VELASCO BEJARANO | Fecha:2020-08-28 14:05:56 | Firmante

pGyblTwhNWgxm2kwlXmoqrue+9kHslph1ala343sO5DrVERhv9TiyTU55Vs+0g9MX43G7Op1aw8WXqkqpsHXRDH1EJpzbDZdYO/8RfxhaqsPbfm27fNhp1Xg67vO4zIN6pEE+kQgk5z5X92618EQT6DPdqKGY+03rmTvmWmcmUoCoI71/i5TPN+ymBeRQyqwk8Yf+pWzHuoB8V7LloqFuJUlv7A4/1+ivsuC7V8DKMGJL9fMadq5JVT6Vs0t/hp68hAYMnQPP0PNgwhV0794PFTAwNcl78POCgEbEwAp8zdHZZ9/Ue4XpuocEQJEzYuhpoKpp3E6mz+oqwQ==

ANGELICA BERENICE AGUILAR GUADARRAMA | Fecha:2020-08-28 14:16:40 | Firmante

iyh91tV8S+Lzpp3he8pTqHKq0xOTeoKGdcOpb3gj32vDweZJhoUVO/P+ZFJebE6NrvdFuKFvvsbuxsKiMy+EQRojrPX0TEK21cFKIGLERB/byqNj6BgVFXtyjtT+20BDVssG0T3jbggR2J7MF3/MXylwifZjYrpH2Zzyb1Kgj4lwxoU1ljLsRAXyaEu7n0mWfFH4h2bW3elobc8Dxj8oSj5pWby1yHuBUKkgQSY2ZvORMJH21KuzTvuOC317d/IN7wJw+zMcbeM0RrRL4dKOHnRaBBMbkPN9P4FylvwwOaXci3uS9+HeD2sIOEX94OhhuCoxJPhhI3NPPIMnzJQ==

JAIME ESCALANTE GARCIA | Fecha:2020-08-28 15:53:12 | Firmante

LbCtIOPRQMEw76sL8j8IRxLxLB/lwkdGFLFFcuBqY+hxySTG9PZpyfdWojnNWI+SjUS4bIVqC7Xh4emc2NNAP0rKstcCQ0tJiwSfpLnPx5YC9vuv6bQqjh6ApMn+JSERtsiT1nPeuIVX5/KZPfvFix0xxXJulBq7ldTRMTr+UAyFXqLUNUJ1aBi4uH/E1B2sbU9ZnDM3klWSx9ceuycne6NTdWk2p7tbi3ru/x2N+PZyVhGYVfclWpA0GyGepPD8yscdSiyKHHHiq/moKEAcM1pLaZEJNbxElYwOmsRiW6vcoWwZ11ADX6rHxzVJFU4dM7ueMLGk1x5TNnSLA==

ISMAEL LEON RIVERA | Fecha:2020-08-28 17:02:12 | Firmante

t4TCiVdWU1iPXEANWnHCMcH6GPXym9xx7FHlzhZsmvpS04iCNHifaeiCh5rt5nQpj+YNQDp5aFcsG0DzzTSsqk3dQXXwcrR00jb9LNh/3BavsmY6C/bul6HdUsNRJ8DrrKwKYBgSF5Ja6pP7C8uc0QcEtIIRFDy7P8kpOkSMLXCkD2Vpb5+zYzGfE4he+OR5PCr6VyZjzLVCg2k1X6SFBDOmq51hIWWhFSGWIMcDpMw2L/NVvffdkdBFk/lzN1zEyrLQkHJyOGvXpb9k/iKZIEgRyvArgTDNz3I7y/T3Y9KlmgG5GSp2Su8uJsn34cMh2Lie9ux7oBFwZQukSw==

MA. YOLANDA RIOS GOMEZ | Fecha:2020-08-28 18:52:00 | Firmante

gkmdfdaelctT0GyClQ4dkR99z25wWihc1EeS3ihtAsPUmkHMRqHZAhYhxV0bDmnRKJl2y8f5Z+YIGZLdRHscyyDTkbq+PHMgyxcLQEQnDgqh9P0mr0Q/k7J669IcBdMnLbWxk5vkgP4UARCV2DeCLwID/RRZpkL5qF101q2XkcWkH5s2JclbBhg4khY5SOR6I804g4RhcCcQdQSfn5DmVPFQ80/rm7sI5bcUhfKSKL9ksqJoxZjvuAhqZEEo4xlAlnRc/NbtvGpabH95tcnSATD2ZSngqLiHn0Trlgnw4FwUQ4RjnQQ4zAJHLHsvyUbsZSHYJpzOxVwFfg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



q5MZ6r

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/gCuPrclMrPveeQCDqfKK5QucvUI9iD7k>

Agradecimientos

A Dios, por las bendiciones siempre recibidas, por las fuerzas para seguir día a día y por ponerme en el lugar en el que estoy, que sin duda alguna ha sido de gran bendición.

A la Dra. Berenice Aguilar, por su dedicación y apoyo en el desarrollo de este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas, por el asesoramiento en cada etapa de este proyecto. Gracias por la confianza puesta en mi desde que llegué a su grupo de trabajo.

Al Centro de Investigaciones Químicas por brindarme los espacios y servicios analíticos utilizados durante la realización de este proyecto, así como al personal técnico y administrativo por las facilidades brindadas en cada una de las áreas de las que necesité.

A mi familia, por siempre brindarme su apoyo incondicional, son la razón para seguir adelante.

A mis compañeras y amigas de laboratorio Bere, Móny y Diana, por su amistad, consejos y apoyo en la realización de este proyecto.

Al Dr. Juan José Acevedo y a Eli, por su valiosa contribución, paciencia y por recibirme en su laboratorio como un miembro más.

A Gaby, por ser parte de este trabajo y contribuir ampliamente, por sus consejos y amistad.

Al Dr. Gabriel Navarrete, por dedicar de su tiempo y buena disposición en el análisis toxicológico *in silico*.

Al Jurado revisor, por dedicar su valioso tiempo y hacer de este trabajo una mejor versión.



El presente trabajo se realizó en el laboratorio 211 de Química de Productos Naturales del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ), IICBA, de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, con la asesoría de la Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama.



Los ensayos en el modelo *in vivo* de inflamación inducida por TPA en oreja de ratón fueron realizados en el Laboratorio 13 de Electrofisiología y Bioevaluación Farmacológica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, con la asesoría de la Mtra. Elizabeth Negrete León y el Dr. Juan José Acevedo Fernández.

La espectroscopia necesaria para el desarrollo de este proyecto fue adquirida en el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM proyecto 251013) del CIQ.

Se recibió beca por CONACyT para estudios de posgrado con número becario 930136.

El presente trabajo se presentó en la modalidad de cartel en la 5^{ta} Reunión de Resonancia Magnética Nuclear Experimental, Escuela Internacional de RMN del 4-6 de septiembre 2019.

ÍNDICE

ÍNDICE

1	LISTA DE FIGURAS.....	I
2	LISTA DE ILUSTRACIONES.....	I
3	LISTA DE TABLAS.....	III
4	ABREVIATURAS.....	V
5	RESUMEN.....	VII
6	INTRODUCCIÓN.....	2
7	ANTECEDENTES.....	7
7.1	La familia Euphorbiacea.....	7
7.2	El género <i>Cnidocolus</i>	7
7.3	El género <i>Cnidocolus</i> en la medicina tradicional.....	8
7.4	<i>Cnidocolus urens</i>	8
7.5	Antecedentes fitoquímicos del género <i>Cnidocolus</i>	9
7.6	Inflamación.....	13
7.6.1	Farmacoterapia de la inflamación.....	15
8	JUSTIFICACIÓN.....	18
9	HIPÓTESIS.....	20
10	OBJETIVOS.....	20
10.1	Objetivo general.....	20
10.2	Objetivos particulares.....	20
11	METODOLOGÍA Y RESULTADOS.....	22
11.1	Metodología general.....	22
11.2	Obtención del Extracto.....	23
11.3	Análisis fitoquímico de las fracciones del extracto hidroalcohólico de <i>Cnidocolus urens</i>	24
11.3.1.1	Purificación e identificación de los compuestos contenidos en la fracción de diclorometano.....	24
11.3.1.2	Purificación e identificación de los compuestos contenidos en la fracción de acetato de etilo.....	35
11.3.1.3	Identificación de los compuestos contenidos en la fracción de n-butanol.....	44
11.3.1.4	Identificación de los compuestos contenidos en la fracción acuosa.....	46
11.4	Evaluaciones biológicas.....	47

11.4.1	Determinación de la actividad antiinflamatoria, utilizando el modelo <i>in vivo</i> de inducción de edema auricular en ratón por TPA.....	48
11.4.2	Determinación de toxicidad oral aguda en un modelo <i>in vivo</i> de ratón. ³⁷	50
12	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	54
12.1	Análisis estructural de los compuestos aislados del extracto Hidroalcohólico e identificados por Resonancia Magnética Nuclear.	54
12.1.1	β-Amirina (8).	54
12.1.2	3',7-Dimetoxi-eriodictiol (50).	58
12.1.3	3',4',7-Trimetoxi-eriodictiol (47).	66
12.1.4	Escopoletina (58).	70
12.1.5	Ácido <i>p</i> -cumárico (62).	74
12.1.6	7-O-(6"- <i>p</i> - <i>E</i> -cumaroil)-β-D-glucósido de apigenina (39).	76
12.1.7	7-O-(6"- <i>p</i> - <i>E</i> -cumaroil)-β-D-glucósido de naringenina (28).	83
12.2	Actividad antiinflamatoria de <i>Cnidoscopus urens</i>	98
12.3	Toxicidad oral aguda de <i>Cnidoscopus urens</i>	102
12.4	Compuestos identificados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.	105
13	CONCLUSIONES.	108
14	ANEXOS.....	110
14.1	Cromatogramas y espectros de masas.	110
15	BIBLIOGRAFÍA.	137

1 LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Clasificación de fármacos aprobados por la FDA entre 1981 al 2010. S= sintéticos, DN= derivados de producto natural, NP= productos naturales de plantas, N= producto natural, B= biológicos, S*/MN= sintéticos con farmacóforo de un producto natural y que son miméticos a productos naturales, S*= de síntesis, pero conservando el farmacóforo de un producto natural, S/MN= de síntesis que son miméticos a productos naturales.	3
Figura 2. Principales fuentes de las que se han aislados productos naturales.	4
Figura 3. Porcentaje de inhibición del extracto hidroalcohólico y subfracciones posterior a la bipartición, de <i>Cnidoscopus urens</i> a dosis de 5, 10, 100 y 300 µg/oreja de ratón. El análisis estadístico se realizó por un ANOVA de dos vías, utilizando un análisis post hoc de Bonferroni (**p<0.001 estadísticamente significativos).....	98
Figura 4. Porcentaje de inhibición de los compuestos aislados de <i>Cnidoscopus urens</i> a dosis de 5 µg/oreja de ratón. El análisis estadístico se realiza por un ANOVA de una vía, utilizando un análisis post hoc de Dunnett (**p<0.001 estadísticamente significativos).....	100
Figura 5. Variación de peso de los dos grupos experimentales. Cada grupo representa el promedio ± EE; n=5, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs vehículo, determinado mediante un ANADEVIA de dos vías seguido de una prueba de Bonferroni.	102

2 LISTA DE ILUSTRACIONES.

Ilustración 1. Partes aéreas de <i>Cnidoscopus urens</i>	7
Ilustración 2. Cromatograma del compuesto 39 obtenido por medio de CL-EM-QTOF, donde se observa un pico a 0.95 min.	37
Ilustración 3. Espectro de masas correspondiente al compuesto 39 a una energía de 175 V, donde se puede observar el ion pseudo molecular [M+H] ⁺ y la formación de un aducto con sodio [M+Na] ⁺	37
Ilustración 4. Cromatograma del compuesto 28 obtenido por CL-EM-QTOF, donde se observa un pico a 0.952 min.....	38
Ilustración 5. Espectro de masas correspondiente al compuesto 28 a una energía de 175 V, donde se puede observar el ion pseudo molecular [M+H] ⁺ y la formación de aductos: [M+NH ₄] ⁺ , [M+Na] ⁺ y [M+K] ⁺	39
Ilustración 6. Cromatogramas obtenidos del equipo de HPLC analítico Dionex Ultimate 3000 en 270 nm (primer cromatograma) y 319 nm (segundo cromatograma).....	41
Ilustración 7. Cromatograma obtenido del equipo Agilent Technologies 1260 infinity para la muestra BAG02-069.....	42
Ilustración 8. Espectro de ¹ H correspondiente al pico 2 de la muestra BAG02-054, se pueden observar señales que pertenecen a más de un solo compuesto.	43
Ilustración 9. Espectro de ¹ H correspondiente al pico 3 de la muestra BAG02-054, se pueden observar que las señales corresponden a un solo compuesto.	43
Ilustración 10. Proceso general llevado a cabo para una reacción de acetilación y recuperación del producto.	44
Ilustración 11. Expansión de las señales en campo bajo del espectro de RMN ¹ H correspondiente a β- Amirina.	54

Ilustración 12. Expansión de las señales en campo alto del espectro de RMN ¹ H correspondiente a β- Amirina (8).	55
Ilustración 13. Expansión del espectro RMN DEPT para metilos y metilenos correspondientes a β-Amirina.	57
Ilustración 14. Expansión de las señales correspondientes al sistema ABX de un sistema aromático del anillo B de una flavanona, la primera expansión, corresponde al espectro obtenido en 600 MHz mientras que el segundo fragmento fue obtenido en 400 MHz, utilizando CDCl ₃ como disolvente en ambos experimentos.	60
Ilustración 15. Expansión de la señal en campo bajo del espectro de RMN ¹ H correspondiente a 3',7-Dimetoxi-eriodictiol (50).	60
Ilustración 16. Expansión de las señales en campo bajo del espectro de RMN ¹ H correspondiente a un sistema ABX del compuesto 3',7-Dimetoxi-eriodictiol (50).	61
Ilustración 17. Expansión de las señales en campo bajo del espectro de RMN ¹ H correspondiente a un sistema AB del compuesto 3',7-Dimetoxi-eriodictiol (50).	61
Ilustración 18. Expansión de las señales correspondientes al sistema de espines que conforman los hidrógenos en posición 2 y 3 de una flavanona.	62
Ilustración 19. Expansión de las señales simples del espectro de hidrógeno 5, la primera señal corresponde a un hidrógeno de hidroxilo, mientras que las señales más grandes, por desplazamiento químico corresponden a metoxilos.	62
Ilustración 20. Correlaciones HMBC para 3',7-Dimetoxi-eriodictiol.	66
Ilustración 21. Correlaciones HMBC para 3',4',7-Trimetoxi-eriodictiol (47).	70
Ilustración 22. Expansión de las señales dobles identificadas en el espectro 13 ¹ H obtenido en CDCl ₃ .	71
Ilustración 23. Expansión de las señales simples del espectro 13 RMN ¹ H obtenido en CDCl ₃ , de las cuales dos de ellas corresponden a hidrógenos pertenecientes a un anillo aromático (6.92, 6.84 ppm) y la otra corresponde a un metoxilo (3.95 ppm).	71
Ilustración 24. Correlaciones HMBC para Escopoletina (58).	73
Ilustración 25. Expansión de las señales dobles con constante de acoplamiento <i>trans</i> .	74
Ilustración 26. Expansión de las señales con constante de acoplamiento <i>orto</i> .	74
Ilustración 27. Expansión de las señales en un desplazamiento químico de 7.85 y 6.89 ppm, correspondientes a un sistema de espines en relación <i>para</i> .	76
Ilustración 28. Expansión de las señales en un desplazamiento químico de 7.42 y 6.25 ppm, correspondientes a un sistema de espines en relación <i>trans</i> .	77
Ilustración 29. Expansión de las señales en un desplazamiento químico de 7.25 y 6.61 ppm, correspondientes a un sistema de espines en relación <i>para</i> .	77
Ilustración 30. Expansión de las señales en un desplazamiento químico de 6.75 y 6.41 ppm, correspondientes a un sistema de espines en relación <i>meta</i> .	78
Ilustración 31. Expansión de la señal en un desplazamiento químico de 5.10 ppm.	78
Ilustración 32. Expansión de las señales más representativas del espectro 19.	79
Ilustración 33. Principales fragmentaciones para 7-O-(6"- <i>p</i> -E-Cumaroil)-β-D-glucósido de apigenina (39) por ESI ⁺ C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂ (masa exacta calculada 578.1424)	82
Ilustración 34. Algunas señales del espectro ¹³ C de 7-O-(6"- <i>p</i> -E-cumaroil)-β-D-glucósido de naringenina (28).	84
Ilustración 35. Cromatogramas obtenidos para la muestra BAG02-054, en los cuales se puede observar dos picos, es decir una mezcla de dos compuestos.	85
Ilustración 36. Cromatograma de la muestra procesada en el cromatógrafo de líquidos semipreparativo, observando dos picos, los cuales fueron colectados por separado.	85
Ilustración 37. Espectro de resonancia magnética nuclear en CD ₃ OD 200 MHz de ¹ H correspondiente al pico 2 mostrado en la ilustración 14, se observa que las señales no se encuentran definidas para un solo compuesto.	87

Ilustración 38. Espectro de resonancia magnética nuclear en CD ₃ OD 200 MHz de ¹ H correspondiente al pico 3 mostrado en la ilustración 14, observando que las señales se encuentran definidas y que pueden ser asignadas para un compuesto.	87
Ilustración 39. Expansión de las señales en 7.60 y 6.35 ppm del espectro 21 ¹ H de RMN.	88
Ilustración 40. Ampliación de las señales del espectro ¹ H de RMN y representación de los sistemas de espines.	89
Ilustración 41. Expansión de las señales en 6.21 y 6.16 ppm correspondientes al espectro 21 RMN de ¹ H, y representación del sistema AB al que representan.	89
Ilustración 42. Expansión de las señales en 5.44, 3.17 y 2.75 ppm correspondientes al espectro 21 RMN ¹ H y representación de un sistema de espines alifáticos.	90
Ilustración 43. Expansión de la señal en 5.15 ppm, correspondiente a un hidrógeno bajo efecto anomérico. .	90
Ilustración 44. Expansiones del espectro en dos dimensiones HMBC 24, donde se pueden apreciar mejor las correlaciones de los hidrógenos de los sistemas aromáticos.	93
Ilustración 45. Principales fragmentaciones para 7-O-(6"- <i>p</i> -E-Cumaroil)-β-D-glucósido de naringenina (28) por ESI ⁺ C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂ (masa exacta calculada 580.1581)	96

3 LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Rendimientos de la bipartición del extracto hidroalcohólico de <i>C. urens</i>	24
Tabla 2. Fracciones y reuniones de la purificación de la fracción de diclorometano.	24
Tabla 3. Compuestos identificados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en la muestra BAG02-004.	26
Tabla 4. Compuestos identificados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en la muestra BAG02-030.	27
Tabla 5 Compuestos identificados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en la muestra BAG02-025, BAG02-027, BAG02-028.	28
Tabla 6 Compuestos identificados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en la muestra BAG02-015, BAG02-016, BAG02-023.	30
Tabla 7. Compuestos identificados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en la muestra BAG02-009.	32
Tabla 8. Fracciones y reuniones obtenidas del fraccionamiento de la fracción de Acetato de etilo A.	35
Tabla 9. Fracciones y reuniones obtenidas del fraccionamiento de la fracción de acetato de etilo B.	39
Tabla 10. Fracciones procesadas por HPLC.	40
Tabla 11. Resultados obtenidos a partir del HPLC semipreparativo.	42
Tabla 12. Rendimientos de la reacción de acetilación correspondiente a la fracción butanólica.	45
Tabla 13. Compuestos identificados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en la muestra BAG02-046.	45
Tabla 14. Compuestos identificados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en la muestra BAG02-047.	45
Tabla 15. Compuestos identificados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en la muestra BAG02-013.	46
Tabla 16. Porcentajes de inhibición del extracto hidroalcohólico de <i>Cnidoscopus urens</i> y fracciones a dosis de 5, 10, 100 y 300 µg/oreja. El análisis estadístico se realiza por un ANOVA de dos vías, utilizando un análisis multicomparación post hoc de Bonferroni (***) p<0.001 estadísticamente significativos).	49

Tabla 17. Porcentajes de inhibición de algunos compuestos de <i>Cnidoscolus urens</i> y fracciones a dosis de 5, µg/oreja. El análisis estadístico se realiza por un ANOVA de una vía, utilizando un análisis post hoc de Dunnet (**p<0.001 estadísticamente significativos).	49
Tabla 18. Registro de pesos por día del grupo experimental administrado con el extracto hidroalcohólico de <i>Cnidoscolus urens</i> . En rojo se muestra el día en que hubo el deceso del animal.....	52
Tabla 19. Datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear para β-amirina.	57
Tabla 20. Datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear comparando datos experimentales y reportados de 3',7-Dimetoxi-eriodictiol (50).	65
Tabla 21. Datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear comparando datos experimentales y con el compuesto previo reportado 3',4',7-Trimetoxi-eriodictiol (47).	69
Tabla 22. Datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear comparando datos experimentales y con el compuesto previo reportado de escopoletina (58).	73
Tabla 23. Datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear para el ácido p-Cumárico (62).	75
Tabla 24. Datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear para 7-O-(6''-O-p-E-cumaroil)-β-D-glucósido de apigenina (39).	80
Tabla 25. Resultados obtenidos del proceso cromatográfico procesando, la muestra BAG02-054.	86
Tabla 26. Datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear para 7-O-(6''-O-p-E-cumaroil)-β-D-glucósido de naringenina (28).	94
Tabla 27. Datos previamente reportados del efecto antiinflamatorio que presentan algunos compuestos aislados de <i>C. urens</i>	101
Tabla 28. Dosis letal media de algunos de los compuestos identificados en el extracto hidroalcohólico de <i>C. urens</i> por dos vías de administración i.p (intraperitoneal) y P.O (oral).	104

4 ABREVIATURAS.

ATP	Adenosin-trifosfato
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de medicamentos y alimentos de los Estados Unidos)
NEM	Nuevas entidades moleculares
PAF	Factor activador de plaquetas
PG	Prostaglandina (D, E, F, I)
LT	Leucotrieno (B, C, D, E)
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
COX	Ciclooxigenasa (I, II)
TPA	Tetradecanoyl phorbol acetate (Acetato de tetradecanoil forbol)
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
TMS	Tetra metil silano
CH₂Cl₂	Diclorometano
DMSO	Dimetil sulfóxido
AcOEt	Acetato de etilo
MeOH	Metanol
n-BuOH	Butanol
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
RMN	Resonancia magnética nuclear
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
HSQC	Heteronuclear simple quantum correlation
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
J	Constante de acoplamiento
s	Señal simple
d	Señal doble

dd	Señal doble de doble
m	Señal múltiple
t	Señal triple
μL	Microlitros
μg	Microgramos
g	Gramos
mg	Miligramos
kg	Kilogramos
i. p	Intraperitoneal
p. o	Vía oral
TOA	Toxicidad oral aguda
OCDE	Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos
SGA	Sistema globalmente armonizado
MHz	Megahertz
HPLC	High performance liquid chromatography (Cromatografía de líquidos de alta resolución)
FAB	Fast atom bombardment
ESI	Electrospray impact (Ionización por electrospray)
QTOF	Quadrupole time-of-flight (Cuadrupolo en tiempo de vuelo)
t_R	Tiempo de retención
IRL	Índice de retención lineal

5 RESUMEN.

Cnidoscopus urens es una especie de la familia Euphorbiaceae utilizada en la medicina tradicional mexicana. Comúnmente conocida como “mala mujer”. En México es útil para tratar diversos padecimientos como enfermedades venéreas, dolor de espalda, piquetes de alacrán, para disminuir los niveles de colesterol y combatir el alcoholismo, además se le atribuyen propiedades laxantes y diuréticas. Otros usos de esta planta que se encuentran reportados son en el tratamiento de la inflamación, para desaparecer verrugas, controlar hemorragias y como analgésico.

También se ha utilizado en el tratamiento de cáncer probándola en un modelo *in vitro*, siendo las partes aéreas activas contra las líneas celulares Hep-2 y NCI-H292 que son células de carcinoma epidermoide laríngeo humano y de carcinoma mucoepidermoide pulmonar humano, respectivamente.

A pesar de los diversos usos de *C. urens* en medicina tradicional, no se han realizado estudios científicos que validen su uso seguro y eficaz en los distintos padecimientos. Debido a ello, el presente estudio planea aportar información sobre su uso como antiinflamatorio, así como un análisis preliminar de la toxicidad de su extracto hidroalcohólico.

Las partes aéreas de *C. urens* fueron extraídas con una mezcla hidroalcohólica 15:85 Agua:MeOH para posteriormente ser fraccionada por bipartición con CH₂Cl₂, AcOEt, y *n*-BuOH, conservando el residuo de la fase acuosa. Estas fracciones fueron estudiadas y analizadas para caracterizar e identificar su composición.

La actividad antiinflamatoria fue determinada mediante el modelo *in vivo* de inducción de edema por TPA en oreja de ratón. El extracto y las fracciones obtenidas de la bipartición fueron probadas a dosis de 5, 10, 100 y 300 µg/oreja y su actividad fue comparada con un vehículo y con un fármaco de referencia, en este caso, indometacina. Comparado con indometacina el efecto antiinflamatorio de las fracciones es similar a las dosis de 5, 10 y 100 µg/oreja, sin embargo, a 300 µg/oreja la actividad antiinflamatoria de las fracciones se mantiene, es decir no hay un aumento considerable comparado con la dosis de 100 µg/oreja, mientras que la actividad antiinflamatoria del fármaco de referencia (Indometacina) mantiene una tendencia dependiente de la dosis.

En este estudio se comprobó que los compuestos β-amirina y 7-O-(6"-*p*-E-cumaroil)-β-D-glucósido de apigenina presentaron un efecto antiinflamatorio cuya eficacia es mayor que indometacina a la dosis

de 5 µg/oreja, y que es estadísticamente significativo en el modelo *in vivo* de edema auricular inducido con TPA.

En lo que respecta a la toxicidad de *Cnidocolus urens* se determinó que el extracto hidroalcohólico se clasifica dentro de la categoría 4 del SGA, que establece que es una sustancia nociva en caso de ingestión a la dosis de 2000 mg/kg de peso.

Entre los compuestos identificados que se ubicaron en la categoría 5, cuyo intervalo de dosis vía oral es de 2000 a 5000 mg/kg de peso se encuentra el ácido *p*-cumárico cuya advertencia por parte del SGA es que **puede ser nocivo si se ingiere**. Por otra parte, para los compuestos 7-*O*-(6''-*p*-*E*-cumaroil)-β-D-glucósido de naringenina, 7-*O*-(6''-*p*-*E*-cumaroil)-β-D-glucósido de apigenina y Escopoletina su descripción es que son **nocivos en caso de ingestión** de acuerdo con el análisis *in silico* obtenido del programa Acute Toxicity Group 2.95 en un intervalo de 300 a 2000 mg/kg de peso.

La purificación de la fracción de diclorometano mostró un contenido de triterpenos, esteroides y en una cantidad muy pequeña compuestos fenólicos, los cuales se encuentran en una mayor proporción en la fracción de acetato de etilo. Su identificación se realizó por resonancia magnética nuclear de una y dos dimensiones, siendo principalmente flavonoides derivados de apigenina y naringenina, los que se encuentran glicosilados y conjugados con cumarato.

En lo que respecta a las fracciones de mayor polaridad del extracto HA como lo son *n*-BuOH y el residuo acuoso se realizó una reacción de acetilación para poder analizar los compuestos por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas identificando productos acetilados de Glicerol, Iditol, Inositol, Galactitol, Sucrosa, Trealosa y Glucitol.

Así, el presente trabajo demuestra que *Cnidocolus urens* presentó actividad antiinflamatoria en el extracto completo, así como en las fracciones, y que los compuestos que biosintetiza poseen una mejor actividad antiinflamatoria que el extracto, sin embargo, su uso debe ser controlado ya que presenta cierto grado de toxicidad observado en el ensayo de TOA en ratón y en el análisis *in silico* de los compuestos.

INTRODUCCIÓN

6 INTRODUCCIÓN.

La química de los productos naturales es una de las áreas de investigación de gran relevancia en la actualidad, ya que a partir de microorganismos u organismos complejos se pueden obtener diversas estructuras químicas las cuales repercuten ampliamente en el descubrimiento de fármacos y en otras áreas de desarrollo.¹ Todos los organismos requieren de un vasto número de compuestos orgánicos los cuales provienen de numerosas reacciones de biosíntesis y transformaciones que son necesarias para la vida; ellas aseguran la producción de energía en forma de ATP y la obtención de moléculas orgánicas necesarias para formar las diversas estructuras que dan lugar a tejidos y órganos. A esa regulación química se le da el nombre de metabolismo, y a las diversas vías envueltas en este se les conoce como rutas metabólicas. Algunas de las moléculas que participan en el metabolismo y que son crucialmente importantes para la vida son los carbohidratos, proteínas, ácidos grasos y ácidos nucleicos. Estas moléculas y las reacciones para su formación o degradación pertenecen al metabolismo primario, siendo idéntico para todos los organismos, ya que constituyen la materia principal de todos los organismos vivos.²

También existe el metabolismo secundario, sin embargo, este no es producido por todos los organismos vivos, sino que su distribución se encuentra más limitada ya que estos productos son encontrados en organismos específicos y su producción depende de cada especie. Los metabolitos secundarios son producidos bajo condiciones de estrés y son utilizados como mecanismo de defensa.²

A través de vastas investigaciones se ha comprobado científicamente que las moléculas que pertenecen o que son producto del metabolismo secundario en su mayoría son estructuras farmacológicamente activas, por lo que el estudio de los productos naturales con énfasis en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad terapéutica se centra en los organismos que son capaces de llevar a cabo un metabolismo secundario, un ejemplo de estos son las plantas.

El uso de las plantas con fines medicinales se ha establecido desde tiempos muy antiguos, desde las civilizaciones como la china de la cual se tienen registros de medicina de ayurveda desde 3000 A.C.,³ continuando con la civilización egipcia de la cual se tienen registros que datan del año 2900 A.C.,⁴ Éstos corresponden a los registros más antiguos de los cuales se tiene evidencia, con alrededor de 700 fuentes. Las preparaban como cataplasmas, ungüentos e infusiones entre otras formas de administración. Además, la cerveza, el vino, la leche y la miel eran empleados como vehículos.⁴ Entre otros personajes

célebres se tiene que Hipócrates y Galeno ejercieron el uso de productos naturales, principalmente plantas, como fuentes para mejorar la salud. Así, el conocimiento de las propiedades medicinales de las plantas ha trascendido a través de los años y aviva el interés en la investigación farmacéutica y química por la obtención de nuevas estructuras químicas con actividad biológica, que puedan sustituir compuestos como fármacos que se encuentran en el mercado y que son responsables de diversas reacciones adversas o que puedan ser más efectivos y/o potentes.

La investigación en productos naturales alcanzó su auge en el periodo de 1970 a 1980 en el cual se vio un panorama grandemente influenciado por este tipo de compuestos.⁵ De acuerdo con un análisis realizado por la FDA (Food and Drug Administration por sus siglas en inglés), los productos naturales ejercen una gran influencia en la producción de nuevos fármacos, como se puede observar en la siguiente gráfica, donde se muestran algunas categorías sobre el origen de los fármacos aprobados entre 1981 al 2010.

De un total de 1355 fármacos aprobados, 5 fueron aislados de plantas y 59 tienen un origen natural distinto, sin embargo, estas estructuras dan lugar a la modificación química, en donde pueden ser derivados de productos naturales (299), de síntesis pero que mantienen el farmacóforo de un producto natural (4%), compuestos que son miméticos a un producto natural (11%) y compuestos miméticos que mantienen el farmacóforo de un producto natural (9%).⁶

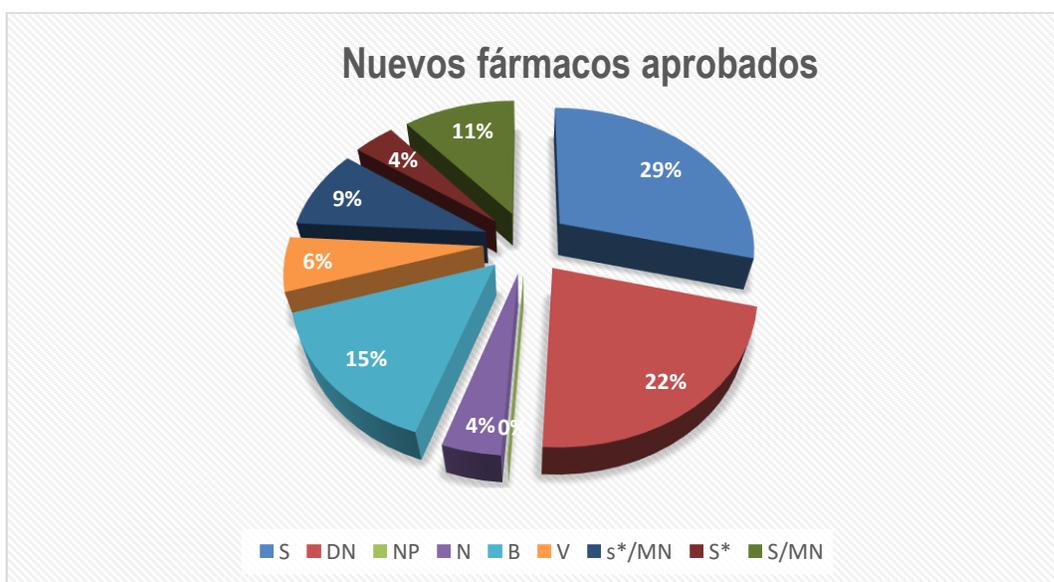


Figura 1. Clasificación de fármacos aprobados por la FDA entre 1981 al 2010. S= sintéticos, DN= derivados de producto natural, NP= productos naturales de plantas, N= producto natural, B= biológicos, S*/MN= sintéticos con farmacóforo de un producto natural

y que son miméticos a productos naturales, S* = de síntesis, pero conservando el farmacóforo de un producto natural, S/MN = de síntesis que son miméticos a productos naturales.

Teniendo en cuenta los datos anteriormente descritos sobre los fármacos que son empleados actualmente, es pertinente considerar que gran parte de tales compuestos provienen de diversas fuentes naturales. Para ello, se realizó un análisis del cual se obtuvieron los datos que se muestran en la gráfica correspondiente a la figura 2 en donde se muestran las principales fuentes de nuevas entidades moleculares (NEM) de origen natural, se puede observar que la principal fuente de nuevas estructuras químicas son las plantas que corresponde a un 46% seguido de bacterias y hongos.⁷

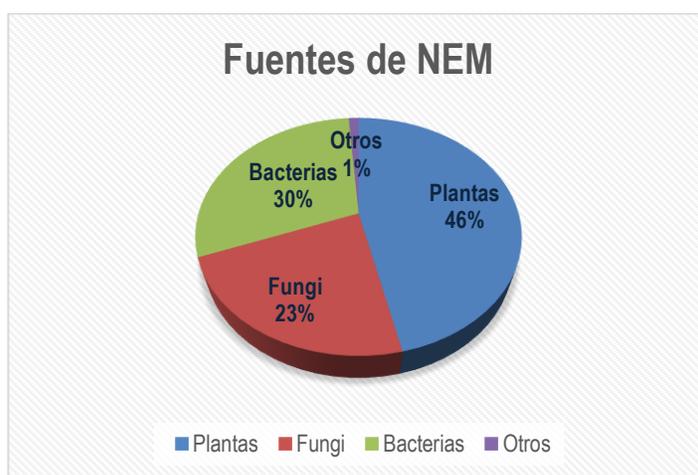
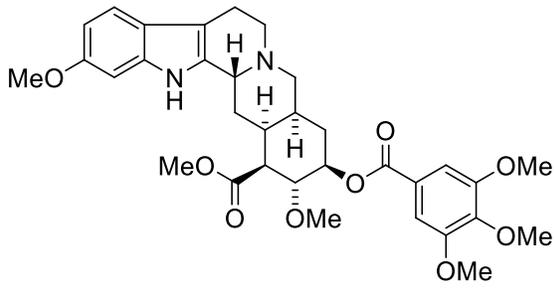


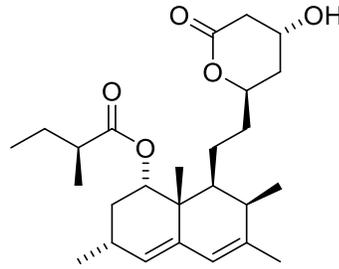
Figura 2. Principales fuentes de las que se han aislados productos naturales.

Así en la actualidad se tienen 119 moléculas químicas aisladas de 90 especies de plantas que son consideradas como medicamentos importantes en uno o más países. De estas 119 estructuras químicas, el 74 % fue resultado de investigaciones biodirigidas en plantas utilizadas en medicina tradicional.⁴

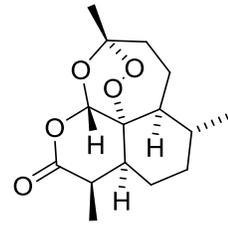
A continuación, se muestran algunas estructuras químicas aisladas de fuentes de productos naturales y que se han empleado como fármacos en el tratamiento de enfermedades:



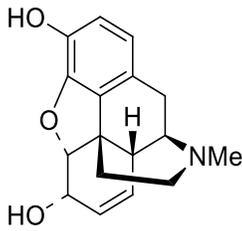
Reserpina (1)
Antihipertensivo



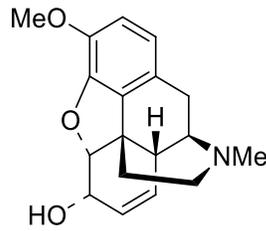
Lovastatina (2)
Reductor de colesterol



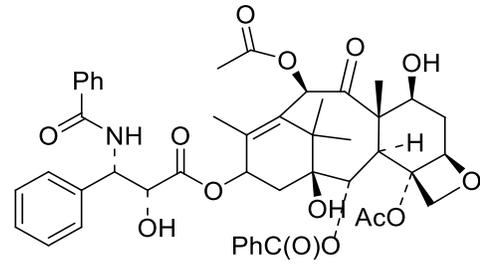
Artemisina (3)
Antimalárico



Morfina (4)
Analgésico



Codeína (5)
Analgésico



Taxol (6)
Antineoplásico

ANTECEDENTES

7 ANTECEDENTES.

7.1 La familia Euphorbiaceae.

Euphorbiaceae es una de las familias más importantes por su amplia variedad de especies, las cuales son usadas como alimento para el ser humano hasta ser ampliamente utilizadas para tratar diversas enfermedades.⁸ Esta familia ocupa el sexto lugar en las angiospermas, se sabe que cuenta con 5 subfamilias, 49 tribus,⁹ 317 géneros y 8100 especies¹⁰ distribuidas alrededor del mundo, principalmente en regiones templadas y tropicales de ambos hemisferios. Además de su amplia distribución, ésta familia es muy diversa ya que se pueden encontrar hierbas anuales, perenes, postradas, escandentes o erectas, con hojas compuestas o simples.¹¹

En México la familia Euphorbiaceae ocupa el sexto lugar en cuanto al número de especies y la cuarta familia en porcentaje de endemismos. Dentro de los géneros que presentan el 50% o más de plantas endémicas en nuestro país son: *Enriquebeltrania* que es 100% endémico, *Acalypha*, *Adelia*, *Astrocasia*, *Alchornea*, *Argythamnia*, *Bernardia*, *Chiropetalon*, *Croton*, *Cnidoscolus*, *Dalembertia*, *Euphorbia*, *Gymnanthes*, *Jatropha*, *Manihot*, *Pedilanthus* y *Piranea*.¹²

7.2 El género *Cnidoscolus*.



Ilustración 1. Partes aéreas de *Cnidoscolus urens*.

El género *Cnidoscolus* incluye un total de 50 especies endémicas del continente americano distribuidas principalmente en México, Brasil y el pacífico. Una de las características principales de este género es la presencia de tricomas urticantes que pueden llegar a medir hasta 1.3 cm.¹³ Éstas son hierbas, arbustos o pequeños árboles que pueden ser mono o dicotiledóneos; sus tallos generalmente armados con tricomas urticantes, hojas alternas simples, nervadura generalmente palmada y glándulas en la base de la hoja; la flor es de 5 pétalos blancos, unidos en la base; su fruto es una cápsula ovoide o subglobosa y semillas globosas.¹² Algunas de estas características se pueden observar en la ilustración 1.

En nuestro país se encuentran 26 especies, un poco más de la mitad de las especies conocidas en todo el mundo y de las cuales 20 son endémicas de México, esto quiere decir en términos de porcentaje que

México cuenta con la presencia del 52 % de especies del género *Cnidoscolus* y un 40 % del total de estas especies son endémicas de nuestro país.

7.3 El género *Cnidoscolus* en la medicina tradicional.

Algunas de las especies que pertenecen al género *Cnidoscolus* han sido ampliamente utilizadas en la medicina tradicional, siendo las mayormente usadas en México: *C. aconitifolius*, *C. chayamansa* y *C. multilobus*.

C. aconitifolius se utiliza en el tratamiento de insomnio, gota, picaduras de escorpión, cáncer, gangrena, presión arterial alta, úlceras, diabetes y afecciones de los riñones; *C. chayamansa* es utilizada para tratar diabetes, obesidad, hemorroides, arterosclerosis, para reducir colesterol, como laxante, diurético, antihipertensivo e hipoglucemiante, mientras que *C. multilobus* es utilizada como antirreumático y antihemorrágico.¹⁴

Cnidoscolus quercifolius y *C. infestus* se utilizan en problemas de inflamación en ovarios y próstata,¹⁵ además se comprobó que un extracto de *C. quercifolius* fue activo contra una cepa de *Staphylococcus* sp. y a *S. aureus* resistente a meticilina,¹⁶ también se reportó que *C. obtusifolius* se utilizó para tratar cáncer, tumores, mientras que *C. phyllacanthus* se utiliza para desaparecer verrugas.¹⁷

7.4 *Cnidoscolus urens*.

Cnidoscolus urens, cuyo nombre común es “mala mujer”, es utilizado en México para curar enfermedades venéreas, dolor de espalda y para los piquetes de alacrán, disminuir colesterol y para combatir el alcoholismo, además se le atribuyen propiedades laxantes y diuréticas.¹⁴ Otros usos para esta planta que se encuentran reportados son el tratamiento de la inflamación,^{18,19} verrugas, hemorragias, analgésico,²⁰ y en el tratamiento de cáncer,¹⁷ además, científicamente se ha probado en un modelo *in vitro* de cáncer siendo las partes aéreas activas contra las líneas celulares Hep-2 y NCI-H292,²¹ que son células de carcinoma epidermoide laríngeo humano y de carcinoma mucoepidermoide pulmonar humano, respectivamente.

La forma en la que se prepara esta planta en su uso etnomédico es infusión¹⁸ y decocción, de esta última se toma un poco y se adiciona a un litro de agua para posteriormente tomarla como agua de uso diario hasta que las molestias desaparezcan.¹⁵

7.5 Antecedentes fitoquímicos del género *Cnidoscopus*.

La producción de metabolitos secundarios en *Cnidoscopus* es muy variada, sin embargo se ha reportado que estas especies producen un látex en el cual se han identificado compuestos como linamarina (**7**), β -amirina (**8**) y glucósidos de flavonoides entre los cuales están kaempferol (**9**) y quercetina (**10**).^{13,22} Para las especies de este género se reportan en si las diversas clasificaciones, por ejemplo en el caso de *C. aconitifolus* se reporta la presencia de fenoles, saponinas y glucósidos cianogénicos,²³ ácidos grasos,²⁴ esteroides como β -sitosterol (**11**); terpenos como α -amirina (**12**) y taraxasterona (**13**), alcaloides,²⁵ antraquinonas y taninos.²⁶

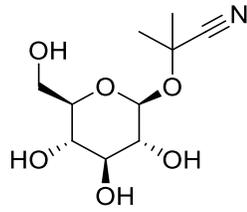
Para *C. quercifolius* se han detectado antocianinas, derivados de antraceno, antraquinonas, flavonoides, taninos, cumarinas, lignanos, mono, di y triterpenos como filacantona (**14**), 3β -O-cinamoil-lupeol (**15**) y 3β -O-dihidrocinamoil-lupeol (**16**),²¹ esteroides, xantinas^{26,27} y otros compuestos como favelina metil éter (**17**), deoxofavelina (**18**), favelanona (**19**) y neofavelanona (**20**).²¹

En *C. chayamansa* se ha descrito la presencia de flavonoides como amentoflavona (**21**), astragalina (**22**), kaempferol-3-O-rutinósido (**23**), dihidromirecetina (**24**), glucósidos cianogénicos, ácidos grasos y cumarinas.¹⁴

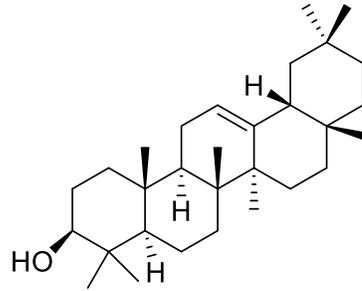
Otra especie del cual se tienen reportes fitoquímicos es *C. texanus* de la cual se han identificado varios flavonoides, cumarinas, derivados del ácido cinámico y triterpenos. Algunos de los compuestos identificados son: 7-O-(4''-O-p-E-cumaroil)- β -glucósido de aromadendrina (**25**), 7-O-(3'',6''-di-O-p-E-cumaroil)- β -glucósido de aromadendrina (**26**), 7-O-(4''-O-p-E-cumaroil)- β -glucósido de naringenina (**27**), 7-O-(6''-O-p-E-cumaroil)- β -D-glucósido de naringenina (**28**), 7-O-(3'',6''-di-O-p-E-cumaroil)- β -glucósido de naringenina (**29**) compuestos que fueron abundantes en *C. texanus* y que sirven como marcadores dentro del género *Cnidoscopus*.²⁸

En el caso particular de *C. urens* se reporta la presencia de derivados de antraceno, cumarinas, lignanos, mono, di y triterpenos, y saponinas. Estos compuestos fueron identificados mediante reveladores y compuestos estándar,²⁷ mientras que en un reporte del año 1992 en un estudio fitoquímico de esta especie se encontraron isoxochitlolona (**30**) y xochitloldiona (**31**).

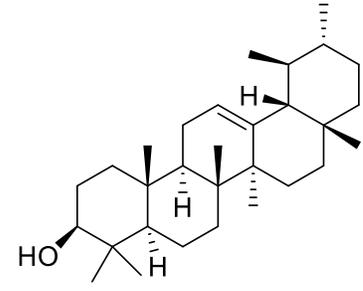
Como se puede apreciar estas especies presentan en su composición metabólica principalmente flavonoides, terpenos, saponinas y glucósidos cianogénicos. A continuación, se muestran las estructuras de algunos de los compuestos reportados en el género *Cnidoscopus*:



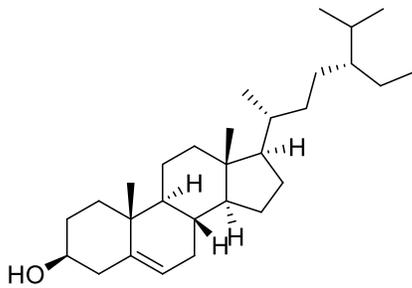
Linamarina (7)



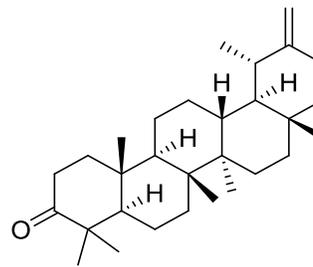
β -Amirina (8)



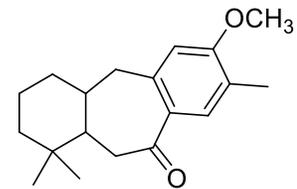
α -Amirina (12)



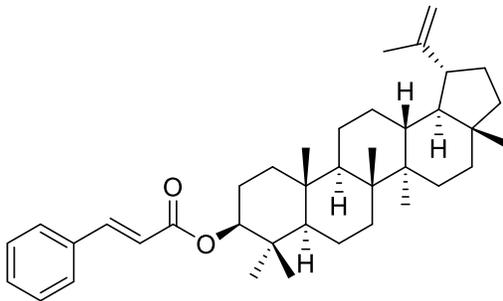
β -Sitosterol (11)



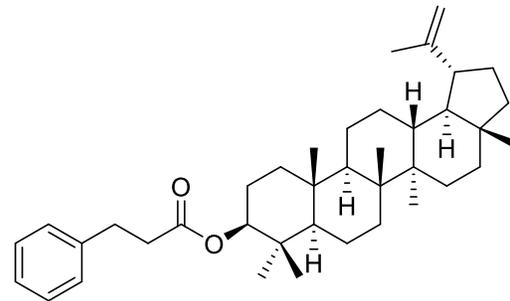
Taraxasterona (13)



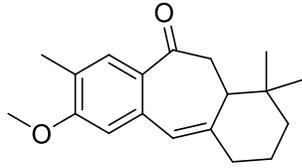
Filacantona (14)



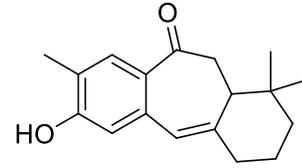
3β -O-cinamoil-lupeol (15)



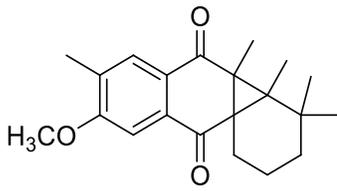
3β -O-dihidrocinamol-lupeol (16)



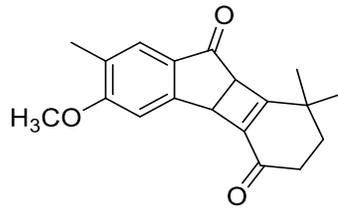
Favelina metil éter (17)



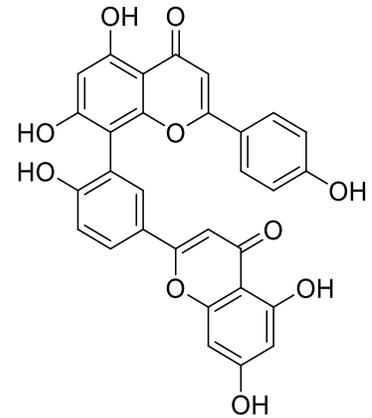
Deoxofavelina (18)



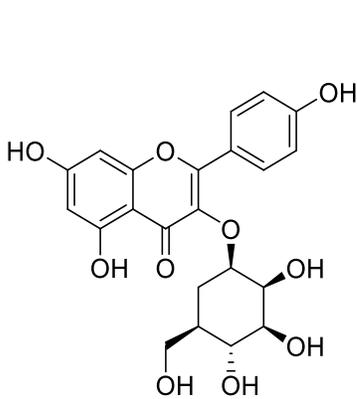
Favelanona (19)



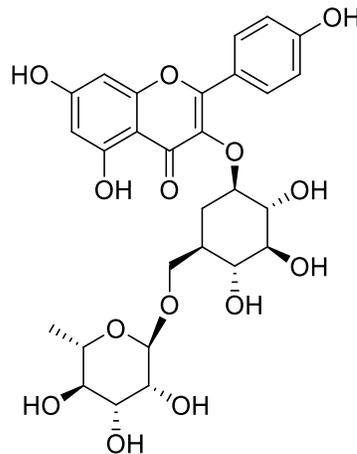
Neofavelanona (20)



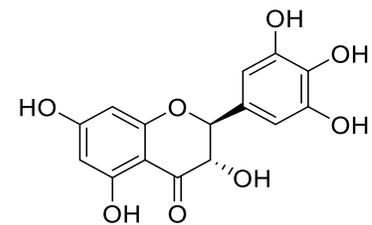
Amentoflavona (21)



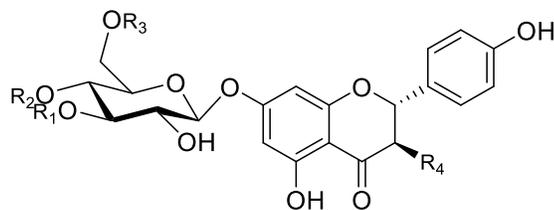
Astragalina (22)



Kaempferol-3-O-rutinósido (23)



Dihidromirecetina (24)



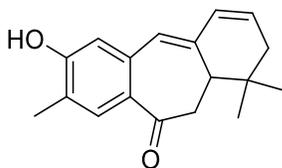
(25) $R_1 = H$, $R_2 = p\text{-}E\text{-cumaroil}$, $R_3 = H$, $R_4 = OH$

(26) $R_1 = p\text{-}E\text{-cumaroil}$, $R_2 = H$, $R_3 = p\text{-}E\text{-cumaroil}$, $R_4 = OH$

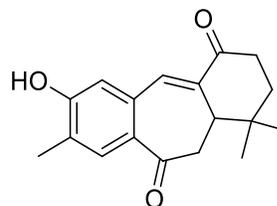
(27) $R_1 = H$, $R_2 = p\text{-}E\text{-cumaroil}$, $R_3 = H$, $R_4 = H$

(28) $R_1 = H$, $R_2 = H$, $R_3 = p\text{-}E\text{-cumaroil}$, $R_4 = H$

(29) $R_1 = p\text{-}E\text{-cumaroil}$, $R_2 = H$, $R_3 = p\text{-}E\text{-cumaroil}$, $R_4 = H$



Isoxochitlolona (30)



Xochitloldiona (31)

7.6 Inflamación.

La inflamación es considerada como uno de los padecimientos más antiguos en el hombre, uno de los reportes sobre este padecimiento fue descrito por Celsus, quien la describió como la presencia de cuatro signos cardinales: rubor, tumor, calor y dolor; posteriormente Virchow asignó el quinto signo clínico, pérdida de la función.³⁰

La inflamación es un conjunto de mecanismos fisiológicos a diversos estímulos del sistema inmune en un tejido, tales estímulos pueden ser infecciosos, físicos, químicos y mecánicos. Podemos clasificar la inflamación en aguda y crónica, dependiendo del tiempo de resolución, es decir hasta que es neutralizado el estímulo lesivo. Con la anterior clasificación se puede definir a la inflamación aguda como la respuesta inmediata que se produce frente a un agente inflamatorio. Considerando que los principales factores defensivos como los anticuerpos y los leucocitos son transportados en la sangre, es primordial pensar que los tejidos vasculares juegan un papel muy importante en la inflamación y por lo tanto se pueden considerar tres pasos en el proceso inflamatorio: 1) un aumento del calibre de los vasos y por lo tanto un mayor flujo sanguíneo, 2) cambios en la microvasculatura que permitan la extravasación de células y proteínas y 3) la migración de las células desde el punto en que abandonan la microcirculación hasta el foco de lesión.³¹ En la inflamación aguda la resolución va desde horas hasta unos pocos días, sin embargo, cuando hay cierto tipo de agentes causantes de la inflamación que no pueden ser controlados la respuesta inflamatoria se prolonga por meses e incluso años como es el caso de la artritis reumatoide en donde se habla de una inflamación crónica.³²

Cuando ocurre un daño local, se comienzan a producir y liberar mediadores de la inflamación como histamina, citocinas proinflamatorias y mediadores lipídicos los cuales, a partir de los lípidos de membrana de células como macrófagos, monocitos y neutrófilos se biotransforman hasta ácido dihomo- γ -linoléico ($\Delta^8, 11, 14$), ácido araquidónico ($\Delta^5, 8, 11, 14$), ácido eicosapentanoico ($\Delta^5, 8, 14, 17$) y el factor activador de plaquetas de los cuales el precursor más relacionado al proceso inflamatorio es el ácido araquidónico el cual es sustrato para la enzima ciclooxigenasa. En el caso del PAF, su principal función en el proceso inflamatorio es ser una sustancia quimiotáctica para eosinófilos y neutrófilos que son acumulados en el sitio donde se origina la inflamación.³³

Las ciclooxigenasas son las principales enzimas involucradas en la producción de mediadores inflamatorios. Existen en tres isoformas a) constitutiva (COX-1), b) inducible (COX-2) y c) isoforma (COX-3) de la cual no se tienen reportes de que función cumpla en el organismo humano.

Siendo que las isoformas 1 y 2 son las que desempeñan un papel fundamental en el correcto funcionamiento del organismo, se tiene que la isoforma 1 se encuentra presente en todos los tejidos y su activación depende principalmente de estímulos hormonales para mantener un equilibrio homeostático (citoprotección gástrica, regulación de tono vascular y función renal), mientras que la isoforma 2 es activada mediante estímulos externos al organismo, principalmente por procesos inflamatorios y su expresión se da en células del sistema inmune. La única diferencia entre estas dos isoformas es un aminoácido que forma parte del sitio activo, específicamente en el aminoácido 523, donde la COX-2 presenta una valina en lugar de isoleucina que es el caso de la isoforma 1. Este cambio hace que la isoforma 2 tenga una cavidad más amplia que la isoforma 1, es por lo que algunos fármacos que inhiben la COX-1 pueden actuar a nivel de las dos isoformas, sin embargo, fármacos de mayor tamaño tienen más especificidad por la isoforma 2.

El metabolismo del ácido araquidónico por la vía de las ciclooxigenasas produce prostaglandinas y tromboxanos, compuestos clave en el proceso inflamatorio; mientras que por la enzima lipooxigenasa se producen los leucotrienos, que se encuentran más relacionados con procesos alérgicos. Entre las células que producen prostaglandinas están los mastocitos que producen PGD₂; los monocitos, macrófagos y neutrófilos que biosintetizan grandes cantidades de PGE₂ y PGF₂ las cuales tienen un potente efecto vasodilatador, y en el caso de la PGE₂ está relacionada con la regulación de la temperatura corporal.

El ácido araquidónico se metaboliza también por la vía de la lipooxigenasa para producir los leucotrienos: LTB₄, LTC₄, LTD₄ y LTE₄.³³ Estos productos del metabolismo del ácido araquidónico poseen variadas actividades fisiológicas, sin embargo, nos centraremos en su función como sustancias que participan en el proceso de la inflamación.

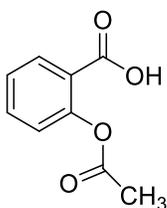
La principal función de las prostaglandinas en el proceso inflamatorio es la vasodilatación, producida principalmente por PGD₂ y la PGI₂, la cual además de provocar vasodilatación aún más potente que la prostaglandina D₂ aumenta la sensibilidad de los nervios sensoriales, es decir, se presenta hiperalgesia que se manifiesta en dolor. En el caso de los leucotrienos que presentan repercusión en el proceso inflamatorio son el LTB₄ el cual produce una actividad quimiotáctica y los leucotrienos LTC₄, LTD₄ y el LTE₄ que son estimulantes de los procesos de inflamación crónica.

7.6.1 Farmacoterapia de la inflamación.

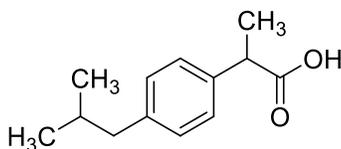
Como se ha podido observar en el apartado anterior, las prostaglandinas y los leucotrienos regulan varias actividades fisiológicas, por lo que el uso de antagonistas de receptores de estos compuestos da lugar a respuestas fisiológicas terapéuticas. Actualmente los blancos terapéuticos en inflamación se centran en la inhibición de las enzimas productoras de prostaglandinas y leucotrienos, principalmente las ciclooxigenasas. Los fármacos actualmente empleados se pueden clasificar principalmente en tres: Glucocorticoides, que actúan a nivel del núcleo inhibiendo la producción de las enzimas fosfolipasas, los AINES (antiinflamatorios no esteroideos) que inhiben de manera no selectiva a la COX, y los COXIB que son fármacos que inhiben de manera selectiva la COX-2.

Uno de los principales grupos farmacológicos son los antiinflamatorios no esteroideos AINE's, sin embargo, estos compuestos inhiben las dos isoformas de la ciclooxigenasa. Considerando que la COX-1 es conocida como una isoforma constitutiva y que sus metabolitos participan en la citoprotección gastrointestinal principalmente por la PGE2 y en la agregación plaquetaria por medio del TXA-2, se tiene que su inhibición produce efectos secundarios, principalmente irritación gástrica. Debido a ello surge otro grupo de fármacos que se centran en la inhibición de la ciclooxigenasa en su isoforma 2 (COX-2) que son los COXIB, estos fármacos no producen los efectos adversos gastrointestinales, sin embargo, estudios clínicos han reportado que el uso de algunos COXIB aumenta el riesgo cardiovascular en forma dependiente de la dosis.³⁴

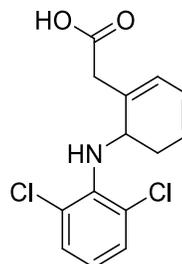
A continuación, se presentan las estructuras químicas de algunos fármacos utilizados en el tratamiento de la inflamación:



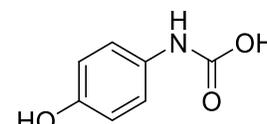
Ácido acetil salicílico
(32)



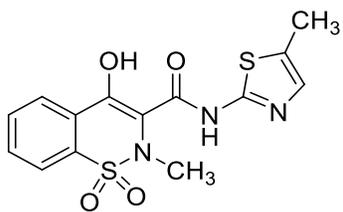
Ibuprofeno (33)



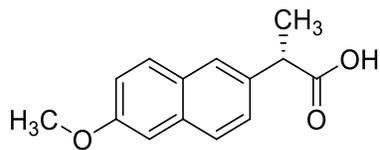
Diclofenaco (34)



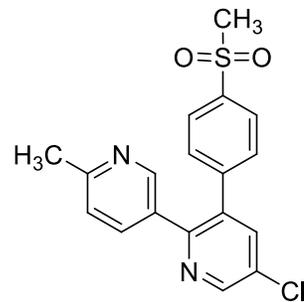
Acetaminofen (35)



Meloxicam (36)



Naproxeno (37)



Etoricoxib (38)

JUSTIFICACIÓN

8 JUSTIFICACIÓN.

Para tratar las distintas enfermedades la población hace un extenso uso de las plantas medicinales. Se sabe que alrededor de un 80% de la población las utiliza. Debido a esto es necesario la determinación de la eficacia y seguridad de las plantas que son utilizadas en la medicina tradicional.

Para poder determinar estos parámetros es necesario contar con bases científicas que respalden su uso, es por esto que se deben realizar estudios fitoquímicos, farmacológicos y de toxicidad.

La familia *Euphorbiaceae* es caracterizada por su amplio uso en la medicina tradicional, a ella pertenece el género *Cnidocolus* del que se han reportado propiedades terapéuticas como antidiabético, antiinflamatorio y para tratar obesidad, entre otras.

La especie *Cnidocolus urens*, planta objeto de esta investigación, fue seleccionada de acuerdo con los diferentes usos en la medicina tradicional y el contenido metabólico que biosintetiza. Esta planta se utiliza en el tratamiento de enfermedades venéreas, dolores, disminución de colesterol en sangre, así como laxante y diurético.

Debido al uso etnomédico de *C. urens* se decidió llevar a cabo los estudios que validen su uso seguro y eficaz como antiinflamatorio en la medicina tradicional.

HIPÓTESIS

Y

OBJETIVOS

9 HIPÓTESIS.

De acuerdo con sus usos en la medicina tradicional, la especie *Cnidoscolus urens* podría presentar entre su composición metabólica compuestos con actividad antiinflamatoria.

10 OBJETIVOS.

10.1 Objetivo general.

- Determinar la actividad antiinflamatoria así como la toxicidad del extracto y metabolitos secundarios más abundantes identificados en *Cnidoscolus urens*.

10.2 Objetivos particulares.

- Purificar los compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico de acuerdo con la polaridad que presentan.
- Identificar y caracterizar estructuralmente los compuestos aislados por medio de sus datos espectroscópicos y/o espectrométricos.
- Determinar la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados, por medio del modelo *in vivo* de edema auricular en ratón inducido por TPA.
- Determinar la toxicidad oral aguda del extracto hidroalcohólico y de los compuestos identificados.

METODOLOGÍA
Y
RESULTADOS

11 METODOLOGÍA Y RESULTADOS.

11.1 Metodología general.

El material vegetal (partes aéreas) de *Cnidoscolus urens* fue recolectado en la carretera federal Cuernavaca-Tepoztlán. Fue secado a la sombra y a temperatura ambiente, y una vez seco se obtuvo el extracto vía maceración exhaustiva con una mezcla hidroalcohólica agua: metanol en proporción 15: 85. Los procesos de purificación se realizaron principalmente por cromatografía en columna abierta (CCA) utilizando sílice *flash* 230:400 y sílice gruesa (0.063-0.2 mm). Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando cromatofolios de aluminio de 0.20 mm de espesor de gel de sílice 60 con indicador de fluorescencia UV254 (Merck). Las cromatoplasmas fueron observadas bajo una lámpara de luz UV (UVP UVGL-25 Compact UV Lamp P/N 95-0021-12, 4 watt) en sus dos longitudes de onda. Los compuestos observados en UV fueron revelados con sulfato cérico amoniacal $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)]$ en H_2SO_4 2N aplicando calor. A partir de la información proporcionada por las cromatoplasmas, se efectuó el cambio en el gradiente de polaridad de la fase móvil para la columna, así como determinar los criterios para reunir aquellas fracciones cuyos compuestos revelados con base en el factor de retención observado.

Los datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear fueron interpretados a partir del análisis de los espectros adquiridos en los equipos Varian Mercury de 200, 400 MHz (9.4T) y Bruker AVANCE III HD 500MHz (11.74T). Las muestras fueron disueltas con disolventes deuterados como dimetil sulfóxido ($\text{DMSO}-d_6$), metanol (CD_3OD), acetona (CD_3COCD_3); cloroformo (CDCl_3) utilizando Tetrametil Silano (TMS) como referencia interna, y en algunos casos utilizando la señal del disolvente residual no deuterado.

Los datos de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas fueron obtenidos en el Cromatógrafo de Gases Agilent Technology modelo 6890 plus, acoplado a un espectrómetro de masas 5973N. El modo de ionización en el espectrómetro es por Impacto Electrónico (IE) a 70 eV y el analizador de masas es un cuadrupolo. Además, el equipo cuenta con sistema de inyección automática. La columna empleada en el cromatógrafo de gases fue HP-5MS 30 m x 0.225 mm x 0.25 μm , utilizando como gas acarreador helio a un flujo constante de 1 mL/min. La muestra fue inyectada en modo Splitless (50°C-0min, 2°C/min-285°C-20 min) utilizando 1 μL de esta a 250°C. Además, se utilizó el detector selectivo de masas MSD (por sus siglas en inglés) y una fuente iónica a 230°C.

Los datos de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se obtuvieron del equipo Dionex Ultimate 3000 (Ultimate 3000 pump, ultimate 3000 autosampler, ultimate 3000 column compartment, ultimate 3000 diode array detector y el programa Chromeleon versión 6.80) y una columna Waters (Atlantis dC18 100Å, 3 µm, 2.1 mm X 100 mm). Los datos para la cromatografía líquida semipreparativa se obtuvieron del equipo de HPLC Agilent Technologies 1260 infinity (bomba cuaternaria G1311B, autoinyector G1329A, compartimento de columna termostaticado G1316A y detector de arreglo de diodos DAD G1315D) y una columna preparativa Waters (XTerra Shield RP18 125Å, 5 µm, 7.8 mm X 50 mm). También se requirió el uso del cromatógrafo de líquidos modelo 1290 Infinity II acoplado a un espectrómetro QTOF G6545A ambos Agilent, de software MassHunter para procesamiento de datos de análisis cualitativo, cuantitativo y estadístico, cuenta también con la librería Medline PCDL para metabolómica y pesticidas con forma de ionización ESI en modo positivo. El equipo fue configurado para la búsqueda de compuestos entre un rango de masa de 400-700 (m/z), el volumen de inyección fue de 5 µL, flujo de 0.250 mL/min, un tiempo de corrida de 8 min y una temperatura de 20 °C. Como fase móvil se utilizó una mezcla de disolventes H₂O:MeOH en proporción 30:70 de la cual se fue aumentando la fase orgánica hasta llegar a 100% MeOH en el minuto 5 y a partir del minuto 6 se reestablecieron las condiciones iniciales para que en el minuto 6.10 se tuviera la proporción inicial 30:70 H₂O:MeOH. La determinación de la actividad antiinflamatoria se llevó a cabo por la inducción de edema auricular en ratón con TPA, los grupos consisten en una n=5 ratones de la cepa CD1, de los cuales se realizó un control negativo aplicando solo TPA, un grupo como vehículo y un control positivo con Indometacina a las dosis de 5, 10, 100 y 300 µg/oreja. El análisis estadístico se llevó a cabo en el programa GraphPad Prism 5, utilizando un ANOVA de una vía por el análisis de Dunnet y un ANOVA de dos vías de Bonferroni.

11.2 Obtención del Extracto.

Las partes aéreas fueron secadas a la sombra y a temperatura ambiente. Para obtener el extracto de *Cnidoscopus urens* se molió el material vegetal hasta obtener un polvo fino, obteniendo un total de 1025.1 g. El material vegetal que se utilizó en la maceración fue de 988 g, éstos se colocaron en un recipiente de vidrio de 4L y se agregó la solución (H₂O:MeOH, 15:85) hasta cubrirlo, se dejó reposar durante 72 horas al término de las cuales el disolvente fue filtrado y el proceso finalizó con la eliminación del disolvente con ayuda de un rotaevaporador a presión reducida. Este proceso se realizó las veces necesarias hasta que se observó una disminución considerable en la cantidad obtenida de extracto.

El disolvente residual en el extracto se redujo hasta un volumen de 150 mL y posteriormente se procedió a realizar una bipartición. Se adicionó un volumen de 150 mL de agua para resuspender el extracto, y se

realizaron las biparticiones con disolventes en orden creciente de polaridad CH_2Cl_2 , AcOEt y butanol. Finalmente, una vez que se eliminaron los disolventes se obtuvieron las respectivas fracciones orgánicas y un residuo acuoso.

Tabla 1. Rendimientos de la bipartición del extracto hidroalcohólico de *C. urens*.

Fracción	Cantidad obtenida
CH_2Cl_2	20.5 g
AcOEt	9.8 g
<i>n</i> -BuOH	20.1 g
Residuo acuoso	70.9 g

11.3 Análisis fitoquímico de las fracciones del extracto hidroalcohólico de *Cnidoscopus urens*.

11.3.1.1 Purificación e identificación de los compuestos contenidos en la fracción de diclorometano.

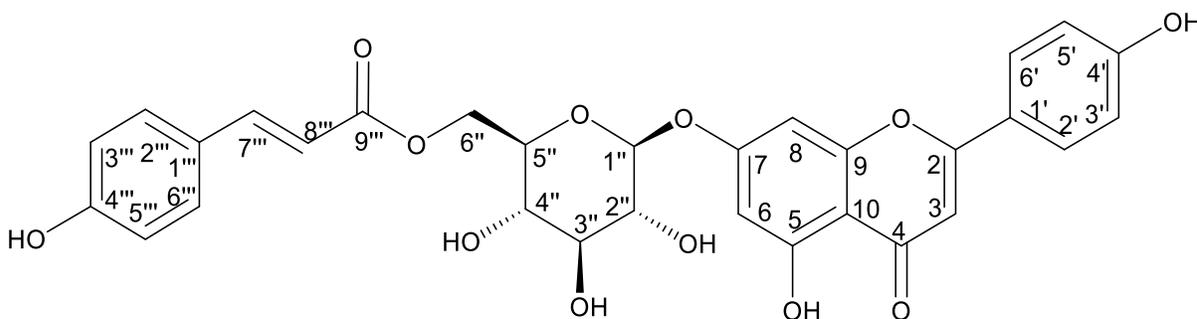
Se utilizó una columna de 60 mm de diámetro, fue empacada con sílice gruesa (0.063-0.2 mm, 200 g) los cuales fueron suspendidos en una mezcla de disolventes 1:1 CH_2Cl_2 :*n*-hexano. 15 g del extracto fueron adsorbidos en la misma cantidad de sílice y aplicados en la columna, obteniendo eluatos de 250 mL con aumento de polaridad desde *n*- C_6H_{14} : CH_2Cl_2 (50:50) hasta 100% MeOH, como se describe a continuación:

Tabla 2. Fracciones y reuniones de la purificación de la fracción de diclorometano.

Fase móvil	Fracciones	Reuniones por similitud	Muestras enviadas a áreas analíticas
50:50 (<i>n</i> - C_6H_{14} : CH_2Cl_2)	1-12	Grupo A, 1-6 (589 mg)	Ceras
		Grupo B, 8-12 (445 mg)	CG-EM: BAG02-004, BAG02-055, RMN: BAG02-055
25:75 (<i>n</i> - C_6H_{14} : CH_2Cl_2)	13-25	Grupo C, 13-21 (608 mg)	CG-EM: BAG02-030, BAG02-025, BAG02-027, BAG02-028. RMN: BAG02-063, BAG02-056
		Grupo D, 22-30 (607 mg)	

100 CH ₂ Cl ₂	26-43	Grupo E, 31-46 (1194 mg)	Contiene los mismos compuestos que la clave: BAG02-023, BAG02-056 Y BAG02-063 en menor cantidad.
		Grupo F, 47-49 (176 mg)	CG-EM: BAG02-015, BAG02-016, BAG02-023 RMN: BAG02-023
95:5 CH ₂ Cl ₂ :Acetona	44-54	Grupo G, 50-69 (2352 mg)	CG-EM: BAG02-009
90:10 CH ₂ Cl ₂ :Acetona	55-68		
80:20 CH ₂ Cl ₂ :Acetona	69-82	Grupo H, 70-87 (686 mg)	BAG02-017
70:30 CH ₂ Cl ₂ :Acetona	83-100	Grupo I, 88-96 (610 mg)	RMN: BAG02-007, BAG02-008, BAG02-010, BAG02-011
50:50 CH ₂ Cl ₂ :Acetona, seguido de 100% Acetona y 100% MeOH	101-139 (3.988g)	Por CCF se determinó que los compuestos contenidos en las fracciones más polares contienen ácido <i>p</i> -cumárico y azúcares.	

Mientras la columna se eluía, en las fracciones 88-96 (Grupo I) se obtuvo un precipitado en forma de polvo blanco (72 mg). Al realizar una CCF comparativa con glucósido de β -sitosterol como referencia se observó que el polvo consistía en una mezcla de este compuesto y un compuesto adicional, el cuál fue identificado como 7-O-(6''-*p*-E-Cumaroil)- β -D-glucósido de apigenina, esto por medio del análisis espectroscópico de resonancia magnética nuclear de hidrógeno cuyas características se muestran a continuación:



7-O-(6''-*p*-E-cumaroil)- β -D-glucósido de apigenina BAG02-005 y BAG02-008 (**39**), (5 mg), r.f: 0.5 (85:15 CH₂Cl₂:MeOH);

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 200 MHz), δ (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento, asignación): 7.85 (2H, d, *J*=8.8 Hz, **H-2'**, **6'**), 7.45 (1H, d, *J*=15.9 Hz, **H-7'''**), 7.28 (2H, d, *J*=8.6 Hz, **H-5'''**, **3'''**), 6.89 (2H, d,

$J=8.8$ Hz, **H-3',5'**), 6.76 (1H, d, $J=2.1$ Hz, **H-8**), 6.73 (1H, s, **H-3**), 6.63 (2H, d, $J=8.6$ Hz, **H-2''',6'''**), 6.44 (1H, d, $J=2.1$ Hz, **H-6**), 6.26 (1H, d, $J=15.9$ Hz, **H-8'''**).

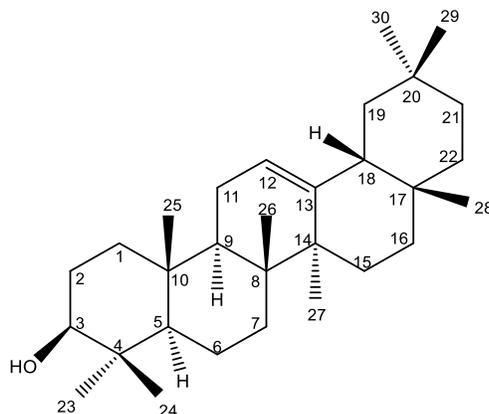
El grupo **A** (fracciones 1-6) por la consistencia oleosa y coloración amarilla se les consideró como ceras, por lo que se decidió no trabajar estas fracciones.

En el grupo **B** (fracciones 8-12) se obtuvo un recuperado oleoso, en cromatografía en capa fina se observó como una mancha alargada de color rojo oscuro. Como esta fracción es de las primeras eluidas en la columna, contiene compuestos poco polares y que se considera son volátiles, por lo que se decidió analizar esta muestra por CG-EM con clave BAG02-004, identificando los siguientes compuestos que se observan en el cromatograma 1 (Anexos):

Tabla 3. Compuestos identificados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en la muestra BAG02-004.

Compuesto	t _R . (min)	Abundancia en la muestra (%)	IRL	IR reportado	Ion molecular [M] ⁺ . m/z	Espectro de masas
Fitol (40)	71.26	57.023	2087	2105	296	1
β-Amirina (8)	113.82	16.540	3250	3337	426	2

Además, se realizó una cromatografía en columna abierta utilizando sílice gruesa (0.063-0.2 mm), en una columna de 2 cm de diámetro empacada hasta 7 pulgadas, la sílice fue hidratada con un sistema 98:2 *n*-hexano:acetona, fase móvil con la que se eluyó la columna. La muestra (445 mg) fue disuelta en 3 mL de la misma mezcla de disolventes y fue aplicada en la columna. Los eluatos se obtuvieron de 10 mL. Posteriormente, las fracciones fueron agrupadas por la similitud observada en CCF. El análisis de una de las muestras (BAG-02-055) en resonancia magnética nuclear de ¹H y ¹³C permitió concluir que el compuesto corresponde a β-amirina (**8**). A continuación, se muestran los datos observados por estas técnicas espectroscópicas:



β -Amirina (8), (29 mg), r.f= 0.5 (98:2 diclorometano-acetona);

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3 , espectro RMN 1), δ , integración, multiplicidad, constante de acoplamiento, asignación): 5.15 (1H, t, **H-12**), 3.20 (1H, dd, $J = 10.05, 5.77$ Hz, **H-3**), 1.10 (3H, s, **H-27**), 0.97 (3H, s, **H-26**), 0.94 (3H, s, **H-23**) 0.91 (3H, s, **H-25**), 0.85 (3H, s, **H-24**), 0.84 (6H, s, **H-29, 30**), 0.80 (3H, s, **H-24**).

^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3 , espectro RMN 2), δ (asignación): 145.4 (**C-13**), 122.0 (**C-12**), 79.3 (**C-3**), 55.4 (**C-5**), 47.9 (**C-9**), 38.8 (**C-1**), 39.0 (**C-4**), 40.0 (**C-8**), 47.5 (**C-18**), 47.1 (**C-19**), 42.0 (**C-14**), 37.2 (**C-10**), 32.9 (**C-7**), 27.5 (**C-2**), 32.7 (**C-17**), 37.4 (**C-22**), 35.0 (**C-21**), 23.8 (**C-11**), 18.6 (**C-6**), 26.4 (**C-15**), 31.3 (**C-20**), 27.2 (**C-16**), 28.3 (**C-23**), 33.6 (C-29), 28.6 (C-28), 26.2 (**C-27**), 23.9 (**C-30**), 15.8 (**C-24**), 17.0 (**C-26**), 15.7 (**C-25**).

Para el grupo **C** (fracciones 13-21, 824 mg) se utilizó una columna de 2.5 cm de diámetro y se empacó con 7 pulgadas de sílice gruesa (0.063-0.2 mm), la cual se hidrató con *n*-Hexano y se obtuvieron fracciones de 50 mL. Los eluatos se obtuvieron por gradiente de polaridad comenzando con 100% *n*-hexano hasta 100% acetona. La resolución de los compuestos no fue la adecuada para obtenerlos puros, sin embargo, se logró identificar por CG-EM: Dihidroactinidiolido (**41**), Campesterol (**42**), Estigmasterol (**43**) y T-Sitosterol (**44**) con clave de muestra BAG02-030 y cuyos espectros de masas corresponden a 3-6, respectivamente.

Tabla 4. Compuestos identificados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en la muestra BAG02-030.

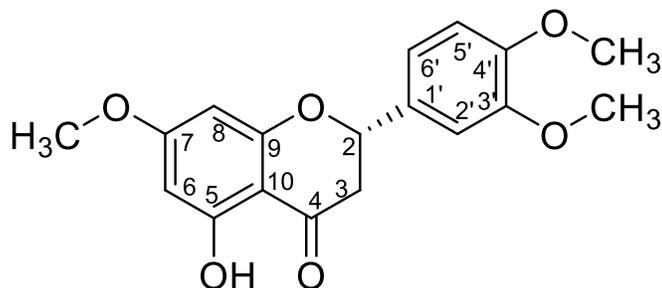
Compuesto	tr. (min)	Abundancia en la muestra (%)	IRL	IR reportado	Ion molecular [M] ⁺ m/z	Espectro de masas
Dihidroactinidiolido (40)	40.93	8.7	1495	1522	180	3
Campesterol (42)	110.30	5.96	3134	3131	400	4

Estigmasterol (43)	111.38	8.29	3169	3170	412	5
T-Sitosterol (44)	113.55	51.76	3240	3203	414	6

En otro grupo de fracciones de este proceso cromatográfico se observó una coloración amarilla al ser reveladas por CCF, por lo que se trató de purificar por Cromatografía radial usando un cromatotrón Harrison Research (Ser. No. 26F). Para ello se preparó una placa de 1 mm de espesor con sílice 60 F₂₆₄ con yeso, la cual se hidrató con *n*-hexano. La muestra se disolvió en 3 mL de una mezcla *n*-hexano y acetona (95:5) y se aplicó con ayuda de una jeringa de 3 mL. Las fracciones fueron obtenidas de acuerdo a las bandas observadas en la placa de sílice con ayuda de la lámpara de ultravioleta y fueron eluidas en mezclas *n*-hexano:acetona. De este proceso se lograron obtener las muestras BAG02-025, BAG02-063, BAG02-027, BAG02-028 y BAG02-056; de ellas sólo las muestras con clave BAG02-056 y BAG02-063 mostraron señales para poder determinar la estructura por resonancia magnética nuclear, identificándolas como las flavanonas 3',4',7-trimetoxi-eriodictiol (**47**) y 3',7-dimetoxi-eriodictiol (**50**). Las otras muestras fueron analizadas por CG-EM (Cromatogramas 3, 4 y 5), algunos datos de los compuestos identificados se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 5. Compuestos identificados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en la muestra BAG02-025, BAG02-027, BAG02-028.

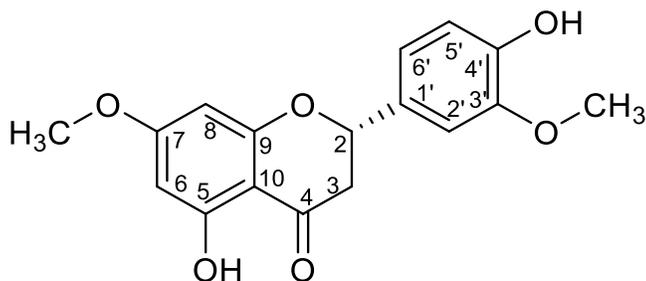
Compuesto	t _R . (min)	Abundancia en la muestra (%)	IRL	IR reportado	Ion molecular [M] ⁺ . <i>m/z</i>	Espectro de masas
6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona (45)	58.14, 61.57, 74.74	18.24	1877	1848	268	7
Fitol (40)	74.01	3.75	2144	2015	196	8
Lupeol (46)	102.29	10.42	2885	3270	426	9
Ácido palmítico (48)	65.47, 65.54	33.18, 54.20	1965	1964	296	10, 12
Dehidrodiosgenina (49)	105.31	20.80	1972	----	412	11



3',4',7-Trimetoxi-eriodictiol (47), (4 mg), r.f: 0.45 (98:02 CH₂Cl₂:Acetona); los datos espectroscópicos corresponden a la muestra BAG02-063.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, espectro 9), δ (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento, asignación): 12.03 (1H, s, **OH-C-5**), 6.99 (1H, d, *J*=2.1 Hz, **H-2'**), 6.98 (1H, dd, *J*=2.1, 8.8 Hz, **H-6'**), 6.91 (1H, d, *J*=8.8 Hz, **H-5'**), 6.08 (1H, dd, *J*=2.31 Hz, **H-6**), 6.07 (1H, dd, *J*=2.31 Hz, **H-8**), 5.37 (1H, dd, *J*=3.0 13.0 Hz, **H-2**), 5.29 (1H, s, **-OH-C-4'**) 3.92 (3H, s, **4'-OMe**), 3.90 (3H, s, **3'-OMe**), 3.81 (3H, s, **7-OMe**), 3.12 (1H, dd, *J*=13.0, 17.1 Hz, **H-3b**), 2.79 (1H, dd, *J*=3.0, 17.1 Hz, **H-3a**).

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃, espectro 10), δ (asignación): 196.1 (**C-4**), 168.1 (**C-7**), 167.8 (**C-5**), 164.3 (**C-9**), 149.4 (**C-3'**), 149.7 (**C-4'**), 130.9 (**C-1'**), 119.0 (**C-6'**), 111.3 (**C-5'**), 109.5 (**C-2'**), 103.3 (**C-10**), 95.3 (**C-6**), 94.4 (**C-8**), 79.3 (**C-2**), 56.1 (**3'-OMe**), 56.1 (**4'-OMe**), 55.8 (**7-OMe**), 43.4 (**C-3**).



3',7-Dimetoxi-eriodictiol (50), (3 mg), r.f: 0.5 (98:02 CH₂Cl₂:Acetona); correspondiente a la muestra con clave BAG02-056, los datos espectroscópicos son:

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, espectro 4), δ (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento, asignación): 12.04 (1H, s, **5-OH**), 6.96 (3H, m, **H-2'**), 6.96 (3H, m, **H-5'**), 6.96 (3H, m, **H-6'**), 6.07 (1H, dd, *J*=2.31 Hz, **H-6**), 6.05 (1H, dd, *J*=2.31 Hz, **H-8**), 5.34 (1H, dd, *J*=3, 13.1, **H-2**), 3.94 (3H, s, **3'-OMe**), 3.81 (3H, s, **7-OMe**), 3.10 (1H, dd, *J*=13.1, 17.2 Hz, **H-3b**), 2.78 (1H, dd, *J*=3.0, 17.2 Hz, **H-3a**).

¹H-RMN (600 MHz, CDCl₃, espectro 5), δ (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento, asignación): 12.04 (1H, s, **5-OH**), 6.97 (1H, d, $J=1.8$ Hz, **H-2'**), 6.95 (1H, d, $J=8.0$ Hz, **H-5'**), 6.93 (1H, dd, $J=1.8, 8.0$ Hz, **H-6'**), 6.08 (1H, dd, $J=2.3$ Hz, **H-6**), 6.06 (1H, dd, $J=2.3$ Hz, **H-8**), 5.73 (1H, s, **4'-OH**), 5.34 (1H, dd, $J=2.9, 13.1$, **H-2**), 3.94 (1H, s, **3'-OMe**), 3.81 (1H, s, **7-OMe**), 3.10 (1H, dd, $J=13.1, 17.2$ Hz, **H-3b**), 2.79 (1H, dd, $J=3.9, 17.2$ Hz, **H-3a**).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃, espectro RMN 6): 196.0 (**C-4**), 168.0 (**C-7**), 164.1 (**C-5**), 162.8 (**C-9**), 146.8 (**C-3'**), 146.2 (**C-4'**), 130.2 (**C-1'**), 119.6 (**C-6'**), 114.5 (**C-5'**), 108.7 (**C-2'**), 103.1 (**C-10**), 95.1 (**C-6**), 94.3 (**C-8**), 79.3 (**C-2**), 56.0 (**3'-OMe**) 55.7 (**7-OMe**), 43.4 (**C-3**).

El grupo **D** (fracciones 22-30) y **E** (fracciones 31-46) Contiene los mismos compuestos: Escopoletina, 3', 7-dimetoxi eriodictiol (**50**) y 3',4',7-trimetoxi eriodictiol (**47**) en menor cantidad, determinado por CCF, comparado con los compuestos ya identificados.

El grupo **F** (fracciones 47-49) fue sometido a un proceso cromatográfico en una columna de 2 cm de \varnothing y se empacó con 30 g de sílice gruesa (0.063-0.2 mm) hidratada con *n*-hexano, aumentando la polaridad de la fase móvil con acetato de etilo, obteniendo fracciones de 50 mL. De este proceso cromatográfico, en la muestra BAG02-015, se logró identificar por CG-EM (cromatograma 6) 2-metil-4-(2,6,6-trimetil ciclohex-2-enil)-3-buten-2-ol (**51**), ursa-9-(11), 12-dien-3-ol (**52**), y tremulona (**53**) en la muestra BAG02-016 (cromatograma 7); 3-metoxi-2,4,6-trimetil-2-ciclohexenona (**54**), éster metílico del ácido (Z) 5,8,11,14-eicotetraenoico (**55**), y el éster metílico del ácido retinoico (**56**) y por último β -Dihidroionol (**57**) y Escopoletina (**58**) de la muestra BAG02-023 (cromatograma 8). Este último compuesto también se logró identificar por resonancia magnética nuclear de una y dos dimensiones.

Tabla 6 Compuestos identificados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en la muestra BAG02-015, BAG02-016, BAG02-023.

Compuesto	t _R (min)	Abundancia en la muestra (%)	IRL	IR reportado	Ion molecular [M] ⁺ m/z	Espectro de masas
2-Metil-4-(2,6,6-trimetil ciclohex-2-enil)-3-buten-2-ol (51)	47.40	20.74	1608	----	208	13
Ursa-9-(11),12-dien-3-ol (52)	111.08	22.81	3159	----	424	14
Tremulona (53)	115.63	11.87	3311	----	410	15

3-Metoxi-2,4,6-trimetil-2-ciclohexenona (54),	55.18	16.74	1751	----	168	16
Éster metílico del ácido 5, 8, 11, 14-eicotetraenoico (z) (55)	68.06	11.06	2012	2231	318	17
Éster metílico del ácido retinoico (56)	91.26	11.34	2571	2528	314	18
β -Dihidroionol (57)	49.49	0.86	1645	1907	182	19
Escopoletina (58)	64.23	51.2	1932	1924	192	20

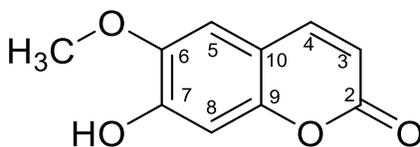
Escopoletina (58), (4 mg), r.f: 0.43 (70:30 *n*-Hexano:Acetona);

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 espectro 13), δ (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento, asignación): 7.60 (1H, d, $J = 9.46$ Hz, **H-4**), 6.84 (1H, s, **H-5**), 6.92 (1H, s, **H-8**), 6.27 (1H, d, $J = 9.46$ Hz, **H-3**), 3.95 (3H, s, **7-OMe**).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , obtenidos por el experimento HMBC), δ (asignación): 161.5 (**C-2**), 150.2 (**C-9**), 143.4 (**C-4**), 144.1 (**C-6**), 113.6 (**C-3**), 107.7 (**C-5**), 111.5 (**C-10**), 103.2 (**C-8**), 56.5 (**7-OMe**).

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD , espectro 13), δ (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento, asignación): 7.86 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, **H-4**), 7.11 (1H, s, **H-8**), 6.77 (1H, s, **H-5**), 6.20 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, **H-3**), 3.91 (3H, s, **7-OMe**).

^{13}C (100 MHz, CD_3OD , espectro 14), δ (asignación): 164.0 (**C-2**), 152.9 (**C-7**), 151.4 (**C-9**), 146.1 (**C-4**), 147.1 (**C-6**), 112.5 (**C-5**), 109.9 (**C-3**), 112.5 (**C-10**), 103.9 (**C-8**), 56.8 (**7-OMe**).



Del grupo **G** (50-69), 2.757g se sometieron a un proceso cromatográfico en una columna de 2 cm \varnothing empacada hasta 7 pulgadas de sílice, e hidrata con *n*-hexano, obteniendo eluatos de 30 mL. La polaridad se fue cambiando con metanol hasta terminar la columna. De este proceso se envió una muestra para su análisis por CG-EM, identificando como constituyentes de esta fracción al 6-(3-acetilcicloprop-1-en-1-il)-3-hidroxi-6-metilheptan-2-ona (**59**), 3-Hidroxi-5,6-epoxi-beta-ionona (**60**) y dehidrovomifoliol (**61**) en la muestra BAG02-009 en el cromatograma 9.

Tabla 7. Compuestos identificados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en la muestra BAG02-009.

Compuesto	tr. (min)	Abundancia en la muestra (%)	IRL	IR reportado	Ion molecular [M] ⁺ m/z	Espectro de masas
6-(3-Acetilcicloprop-1-en-1-il)-3-hidroxi-6-metilheptan-2-ona (59)	48.25	6.07	1623	----	224	21
3-Hidroxi-5,6-epoxi-beta-ionona (60)	50.26	6.94	1660	1690	224	22
Dehidrovomifoliol (61)	55.98	10.53	1777	1799	222	23

El grupo **H** estuvo constituido por las fracciones 70-87, se obtuvieron 2.5 g. Sin embargo, solo se tomaron 2 g, los cuales fueron disueltos en 4 mL de CH₂Cl₂ para ser inyectados a un equipo de cromatografía de mediana presión (sistema de bombas BÜCHI). Para iniciar este proceso se empacó un cartucho de 1x19 cm con sílice flash, posteriormente fue colocado e hidratado mientras se purgó la bomba (CH₂Cl₂), una vez hidratado el cartucho la muestra se introdujo con ayuda de una jeringa de 3 mL, sin embargo, debido a la presión generada por el sistema de bombas solo se logró inyectar la cantidad de 1.314 g. El flujo inicial utilizado fue de 5 mL/min posteriormente se aumentó a 8 mL/min colectando fracciones de 30 mL. El sistema de elución fue inicialmente con 100% diclorometano aumentando la polaridad hasta 100% metanol.

Al realizar las reuniones se observó que no hubo resolución entre los compuestos, sin embargo, por medio de cromatografía en capa fina se realizó una placa comparativa de las fracciones obtenidas en este proceso con el grupo **G** en las cuales se tiene la muestra con clave BAG02-009 con los compuestos 6-(3-acetilcicloprop-1-en-1-il)-3-hidroxi-6-metilheptan-2-ona (**59**), 3-Hidroxi-5,6-epoxi-beta-ionona (**60**) y Dehidrovomifoliol (**61**) y se determinó que contiene los mismos compuestos en mezcla.

Al grupo **I** (fracciones **88-96**) se le realizaron lavados con CH₂Cl₂ quedando un residuo de 160 mg, que se trabajó en este proceso, ya que al realizar CCF y ser revelado se observó una coloración amarilla. Se utilizó una columna de 2 cm de diámetro, se empacó con 7 pulgadas sílice flash, y se hidrató con diclorometano. La muestra se adsorbió en la misma cantidad de sílice flash (160 mg) y se colocó en la columna, los eluatos obtenidos fueron de 10 mL. En las fracciones eluidas se observó una mancha homogénea, sin embargo, se observó que no solo se trató de un compuesto (BAG02-007) sino de una

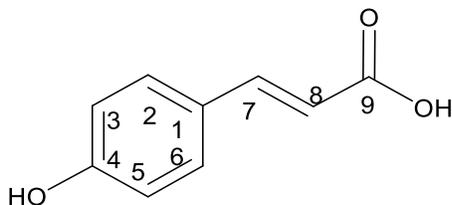
mezcla de al menos tres flavonoides, ya que se observan 3 señales aproximadamente en 12 ppm, por lo que se buscaron otros métodos para purificarlos.

Una de las fracciones (32 mg) del proceso anterior mostró ser una mezcla por lo que se decidió realizar la purificación por medio de fase reversa. La muestra se trató de solubilizar en 4 mL de agua. Para la purificación se utilizó un cartucho de fase reversa C-18 de 3 mL, el cual se hidrató con MeOH y posteriormente agua. Una vez que el cartucho está hidratado se agregó la muestra disuelta en los 4 mL de agua y se adicionaron 6 mL más, para obtener un total de 10 mL, posteriormente se eluyó disminuyendo la fase acuosa del sistema en proporción de 10 en 10 con MeOH, colectando fracciones de 10 mL. De este proceso cromatográfico se obtuvieron dos muestras que se enviaron a RMN con las claves BAG02-011 y BAG02-010. En el espectro de la muestra BAG02-010 se observaron señales para más de un compuesto, sin embargo, las señales más intensas, es decir el compuesto más abundante corresponde a 7-O-(6''-*p*-E-cumaroil)- β -D-glucósido de naringenina (**28**), cuyos datos espectroscópicos se encuentran descritos más adelante. En lo que respecta la muestra BAG02-011 se observan señales definidas para el ácido *p*-cumárico. A continuación, se muestran las características observadas en RMN:

Ácido *p*-Cumárico (62), (5 mg), r.f: 0.37 (85:15 CH₂Cl₂:MeOH); con clave BAG02-011:

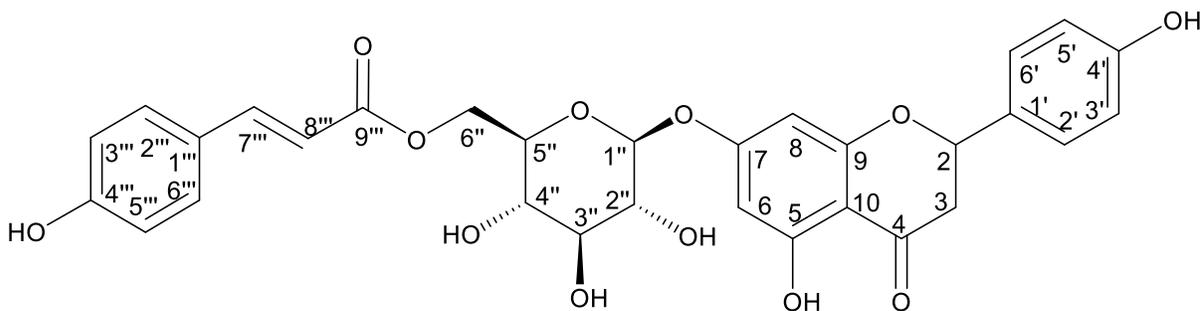
RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD espectro 16), δ (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento, asignación): 7.61 (1H, d, $J=15.9$ Hz, **H-7**), 7.42 (2H, d, 8.70, $J=8.7$ Hz, **H-3,5**), 6.77 (2H, d, 8.70, $J=8.7$ Hz, **H-2,6**), 6.29 (1H, d, $J=15.9$ Hz, **H-8**).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD, espectro 17), δ (asignación): 170.0 (**C-9**), 163.0 (**C-3**), 146.9 (**C-7**), 131.2 (**C-2,6**), 126.3 (**C-1**), 117.4 (**C-3,5**), 114.1 (**C-8**).



Se toma la fracción BAG02-007 del proceso de purificación del grupo I que contenía mezcla de compuestos y algunas fracciones del proceso G en las cuales se observó una coloración amarilla al ser revelados en CCF. Un total de 400 mg, se utilizaron para la cromatografía en columna, la cual fue de 3 cm de diámetro y se empacó con 7 pulgadas de sílice gruesa (40 g). El sistema de elución inicial fue

diclorometano, aumentando el gradiente de polaridad con metanol hasta llegar a MeOH al 100% obteniendo eluatos de 30 mL. De este proceso se logró aislar e identificar una flavanona, cuyos datos espectroscópicos corresponden a la 7-O-(6''-*p*-E-cumaroil)- β -D-glucósido de naringenina (**28**). Sus espectros de resonancia magnética nuclear son 21 (hidrógeno) y 22 (carbono). Otro compuesto que se encontró en menor cantidad y cuyas señales en el experimento de ^1H corresponden a 7-O-(6''-*p*-cumaroil)- β -D-glucósido de apigenina (**39**). A continuación, se muestran las señales obtenidas para el compuesto mayoritario:



7-O-(6''-*p*-E-cumaroil)- β -D-glucósido de naringenina (28**)**, (25 mg), r.f: 0.58 (85:15 CH_2Cl_2 : MeOH);

RMN ^1H (500 MHz, Acetona- d_6 , espectro 21), δ (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento, asignación): 7.60 (1H, d, $J=15.95$ Hz, **H-7'''**), 7.49 (2H, d, $J=8.64$ Hz, **H-2'''**, **6'''**), 7.34 (2H, d, $J=8.57$ Hz, **H-2'**, **6'**), 6.89 (4H, m, **H-3'''**, **5'''**, **3'**, **5'**), 6.35 (1H, d, $J=15.95$ Hz, **H-8'''**), 6.21 (1H, d, $J=2.24$ Hz, **H-6**), 6.16 (1H, d, $J=2.24$ Hz, **H-8**), 5.44 (1H, dd, $J=12.62$, 2.73 Hz, **H-2**), 5.15 (1H, d, $J=7.28$ Hz, **H-1''**), 4.58 (1H, dd, $J=11.90$, 2.12 Hz, **H-6''**), 4.28 (1H, dd, $J=11.90$, 6.65 Hz, **H-6''**), 3.90 (1H, ddd, $J=9.18$, 6.68, 1.85 Hz, **H-3''**), 3.63 (1H, t, $J=8.64$ Hz, **H-5''**), 3.55 (2H, dd, $J=9.09$, 7.70 Hz, **H-2''**), 3.50 (1H, ddd, $J=10.17$, 8.79, 1.59 Hz, **H-4''**), 3.17 (1H, d, $J=17.09$, 12.62 Hz, **H-3_b**), 2.75 (1H, dd, $J=17.09$, 3.09 Hz, **H-3_a**).

RMN ^{13}C (50 MHz, Acetona- d_6 , espectro 22), δ (asignación): 197.9 (**C-4**), 167.5 (**C-9'''**), 166.5 (**C-7**), 164.7 (**C-5**), 163.9 (**C-9**), 160.7 (**C-4'''**), 158.8 (**C-4'**), 145.8 (**C-7'''**), 130.9 (**C-2'''**, **6'''**), 130.5 (**C-1'''**), 128.9 (**C-2'**, **6'**), 126.8 (**C-1'**), 116.7 (**C-3'''**, **5'''**), 116.2 (**C-3'**, **5'**), 115.2 (**C-8'''**), 104.5 (**C-10**), 100.8 (**C-1''**), 97.6 (**C-6**), 96.6 (**C-8**), 79.9 (**C-2**), 77.6 (**C-5''**), 75.2 (**C-3''**), 74.4 (**C-2''**), 71.2 (**C-4''**), 64.2 (**C-6''**), 43.5 (**C-3**).

FAB $^+$ (Espectro 26): $[\text{M}+\text{H}]^+$. m/z 581.

HRMS (ESI $^+$, m/z , espectro 25): calculado $[\text{M}+\text{Na}]^+= 603.5318$; encontrado $[\text{M}+\text{Na}]^+=603.1427$ para $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{NaO}_{12}$.

11.3.1.2 Purificación e identificación de los compuestos contenidos en la fracción de acetato de etilo.

Como en los procesos anteriores se observó que los compuestos tienden a favorecer la solubilidad en acetona y metanol, por ello, se realiza el proceso de solubilización en estos disolventes, iniciando con el disolvente menos polar obteniendo así: 2.2 g en acetona y 4.4 g en metanol y por cromatografía en capa fina se observó que los compuestos de interés se observan en proporciones similares, sin embargo, se trabajan por separado.

Purificación e identificación de los compuestos contenidos en la fracción de acetato de etilo disuelta en metanol.

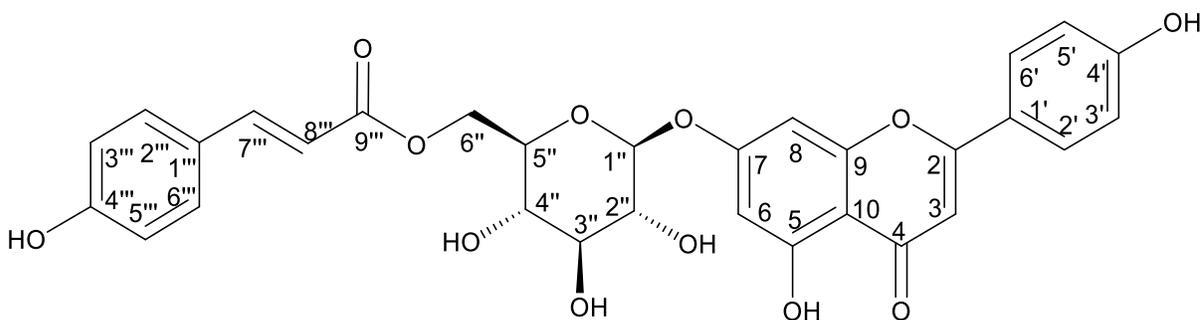
Se tomó la cantidad disuelta en metanol (4.4 g) para ser fraccionada mediante cromatografía en columna, estos fueron adsorbidos en la misma cantidad de sílice (0.063-0.2 mm), la columna que se utilizó tiene las siguientes características: 3.5 cm de diámetro y se empacó con sílice hasta 7 pulgadas de altura, fue hidratada con diclorometano aumentando la polaridad del sistema con metanol y los eluatos fueron obtenidos de 50 mL. A continuación, se muestra la tabla con las reuniones hechas por similitud en el factor de retención de los compuestos determinado por CCF:

Tabla 8. Fracciones y reuniones obtenidas del fraccionamiento de la fracción de Acetato de etilo A.

Fase móvil	Fracciones	Reuniones por similitud	Muestras enviadas a áreas analíticas
100 CH ₂ Cl ₂	1-8	1-17 (38 mg)	Por la textura oleosa de las fracciones y al no presentar una coloración particular de compuestos fenólicos se asume que estas fracciones contienen ácidos grasos.
98:2 CH ₂ Cl ₂ : MeOH	9-11		
95:5 CH ₂ Cl ₂ : MeOH	12-37	18-25 (Acetona) 746 mg	BAG02-038 (9 mg), BAG02-039 (7 mg)
		26-48 (Acetona) 922 mg	BAG02-054 (25 mg), BAG02-036 (mezcla)
		33-48 (MeOH) 57 mg	Contiene los mismos compuestos que el grupo anterior.
90:10 CH ₂ Cl ₂ : MeOH	38-51	49-69 1.665 mg	BAG02-036 (32mg), BAG02-011(50 mg).
80:20 CH ₂ Cl ₂ : MeOH	52-88	70-88 895 mg	BAG02-036 (36 mg) y contiene los mismos compuestos anteriores, pero en mezcla.

Nota: una parte de la fracción 33-48 se disolvió en acetona por lo que fue separada del resto y se reunió en la fracción anterior (26-32), es por ello que lleva la numeración 26-48.

Mientras se realizaban las reuniones 55-63 y 64-69, posteriormente agrupadas como Fx 49-69, se obtuvo un precipitado, por lo que fue separado de las aguas madres. Del precipitado se tomó una muestra representativa para obtener su experimento de RMN con la clave BAG02-036, se observó que el patrón de sustitución de las señales en ^1H son las mismas que las obtenidas para la muestra BAG02-008 en el fraccionamiento primario de la fracción de diclorometano, así los datos espectroscópicos corresponden a 7-O-(6''-*p*-E-cumaroil)- β -D-glucósido de apigenina (**39**). En la muestra BAG02-008 la cantidad de muestra no fue la adecuada para poder obtener un espectro de ^{13}C , sin embargo, ahora se muestran los datos espectroscópicos de ^1H y adicionalmente los de ^{13}C :



7-O-(6''-*p*-E-cumaroil)- β -D-glucósido de apigenina (39**)**, (56 mg), r.f. 0.5 (85:15 CH_2Cl_2 :MeOH).

^1H -RMN (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, espectro RMN 18), δ (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento, asignación): 7.88 (2H, d, $J=8.5$ Hz, **H-2',6'**), 7.45 (1H, d, $J=15.9$ Hz, **H-7''**), 7.28 (2H, d, $J=8.5$ Hz, **H-1''**, **5''**), 6.89 (2H, d, $J=8.6$ Hz, **H-3',5'**), 6.76 (1H, d, $J=2.0$ Hz, **H-6**), 6.67 (1H, s, **H-3**), 6.63 (2H, d, $J=8.4$ Hz, **H-2''**, **6''**), 6.44 (1H, d, $J=2.0$ Hz, **H-8**), 6.26 (1H, d, $J=15.9$ Hz, **H-8''**), 5.08 (1H, d, $J=6.6$ Hz, **H-1''**).

^{13}C -RMN (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, espectro RMN 19), δ (asignación): 182.5 (**C-4**), 167.16 (**C-9''**), 164.9 (**C-7**), 163.1 (**C-2**), 161.8 (**C-9**), 161.5 (**C-4'**), 160.1 (**C-4'''**), 157.4 (**C-5**), 145.6 (**C-7''**), 130.5 (**C-2''**, **6''**), 129.0 (**C-2'**, **6'**), 125.4 (**C-1''**), 121.5 (**C-1'**), 116.6 (**C-3',5'**), 116.2 (**C-3''**, **5''**), 114.1 (**C-8''**), 105.9 (**C-10**), 103.4 (**C-3**), 100.1 (**C-1''**), 99.9 (**C-6**), 95.2 (**C-8**), 76.6 (**C-3''**), 74.3 (**C-5''**), 73.4 (**C-2''**), 70.7 (**C-4''**), 64.0 (**C-6''**).

HRMS (ESI⁺, m/z , espectro 20): calculado $[\text{M}+\text{Na}]^+=601.1322$; encontrado $[\text{M}+\text{Na}]^+=601.1267$ para $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{NaO}_{12}$.

Adicionalmente, para corroborar la estructura de la molécula se analizó la muestra por Cromatografía de Líquidos-Masas QTOF donde se obtuvieron los siguientes resultados:

Compound Table

Compound Label	RT	Mass	Abund	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)	Hits (DB)
Cpd 1: C30 H26 O12; 0.950	0.95	578.1382	244126	C30 H26 O12	578.1424	-7.39	1

Compound Label	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C30 H26 O12; 0.950	579.1455	0.95	Find By Formula	578.1382

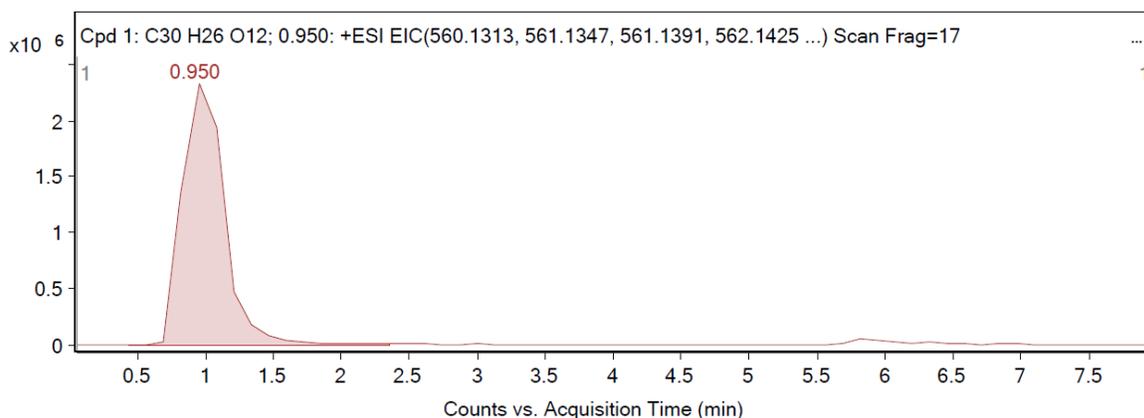
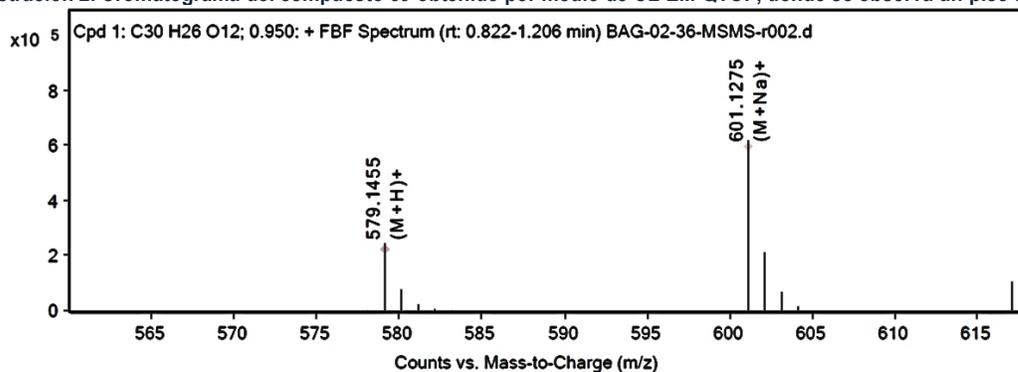


Ilustración 2. Cromatograma del compuesto 39 obtenido por medio de CL-EM-QTOF, donde se observa un pico a 0.95 min.



MS Zoomed Spectrum

Ilustración 3. Espectro de masas correspondiente al compuesto 39 a una energía de 175 V, donde se puede observar el ion pseudo molecular $[M+H]^+$ y la formación de un aducto con sodio $[M+Na]^+$.

Recromatografía de las fracciones 18-25.

Para purificar las fracciones 18-25, se utilizó una columna de 3 cm de diámetro, utilizando sílice (0.063-0.2 mm), la columna fue empacada hasta una altura de 7 pulgadas, la sílice fue hidratada con 100% acetato de etilo, obteniendo eluatos de 10 mL y aumentando la polaridad del sistema con metanol hasta llegar a 100 % de este disolvente. Se logró identificar el compuesto 7-O-(6''-*p*-E-cumaroil)- β -D-glucósido

de naringenina (BAG02-039, 7mg), cuyos datos se encuentran descritos para el compuesto **28** en el apartado anterior, específicamente en el grupo I que corresponde al fraccionamiento de diclorometano. Además, otra fracción (BAG02-038, 9 mg) que se analizó por RMN indicó que se trata de una mezcla de tres flavonoides como mínimo, entre ellos se pueden observar como mayoritarios a 7-O-(6''-*p*-E-cumaroil)- β -D-glucósido de naringenina (**28**) y 7-O-(6''-*p*-E-cumaroil)- β -D-glucósido de apigenina (**39**) como compuestos mayoritarios.

Recromatografía de las fracciones 26-48.

Las fracciones 26-48 (922 mg), fueron aplicadas en una columna de 3 cm de diámetro utilizando sílice gruesa (0.063-0.2 mm), la columna fue empacada hasta una altura de 7 pulgadas, la sílice fue hidratada con 100% acetato de etilo, obteniendo eluatos de 50 mL. De este proceso se logró obtener 25 mg, los cuales fueron etiquetados con clave BAG02-054 y corresponden a la flavona 7-O-(6''-*p*-E-cumaroil)- β -D-glucósido de naringenina (**28**) esto mediante cromatografía en capa fina comparativa y por comparación entre los espectros de ^1H con el compuesto anteriormente identificado de la muestra BAG02-017, además la muestra BAG02-054 fue procesada por Cromatografía de Líquidos-Masas QTOF obteniendo los siguientes resultados:

Compound Table

Compound Label	RT	Mass	Abund	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)	Hits (DB)
Cpd 1: C30 H28 O12; 0.952	0.952	580.1535	1063279	C30 H28 O12	580.1581	-7.8	1

Compound Label	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C30 H28 O12; 0.952	603.143	0.952	Find By Formula	580.1535

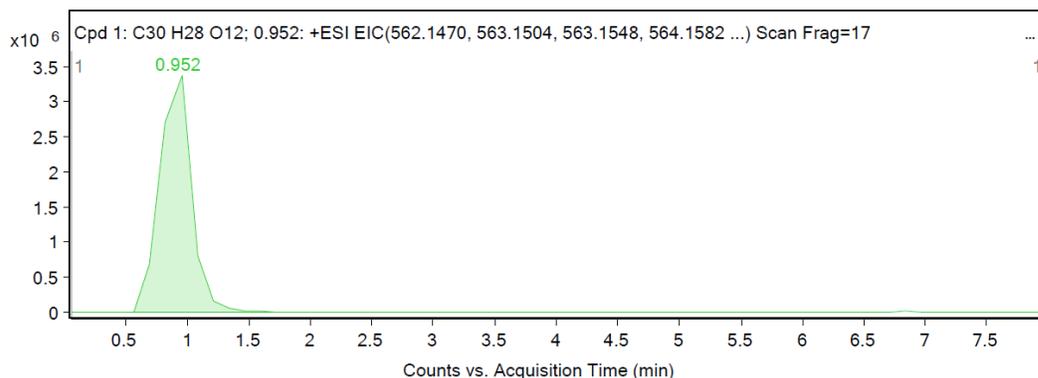


Ilustración 4. Cromatograma del compuesto **28** obtenido por CL-EM-QTOF, donde se observa un pico a 0.952 min.

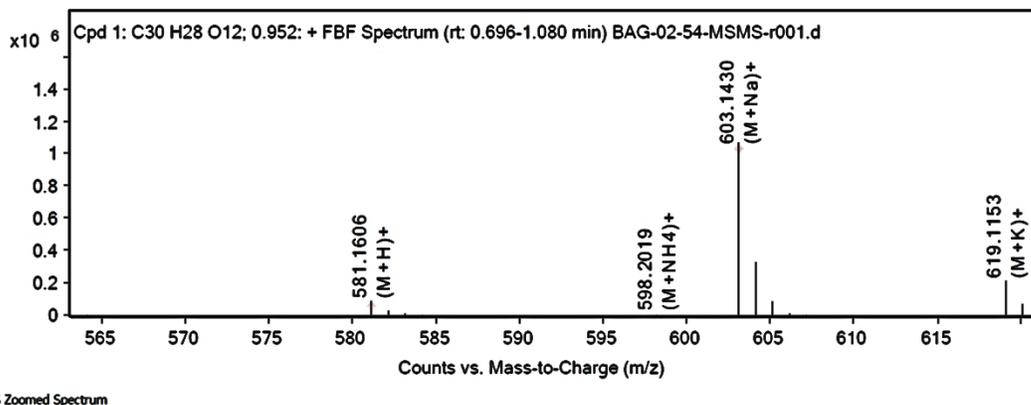


Ilustración 5. Espectro de masas correspondiente al compuesto 28 a una energía de 175 V, donde se puede observar el ion pseudo molecular $[M+H]^+$ y la formación de aductos: $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$ y $[M+K]^+$.

Recromatografía de las fracciones 49-69.

Una columna de 4 cm de diámetro fue empacada hasta una altura de 7 pulgadas utilizando sílice gruesa (0.063-0.2 mm) la cual fue hidratada con 100% acetato de etilo, y en ella se aplicaron los 1.665 g de las fracciones 49-63. Se obtuvieron eluatos de 50 mL y se aumentó la polaridad del sistema con metanol hasta llegar a 100% de este disolvente. Como resultado de este proceso se identificó 7-O-(6''-*p*-*E*-cumaroil)- β -D-glucósido de apigenina (**39**), el cual está en mezcla con ácido *p*-cumárico (**62**).

Purificación e identificación de los compuestos contenidos en la fracción de acetato de etilo disuelta en acetona.

De la fracción disuelta en acetona (2.4 g) se tomaron 729 mg para ser fraccionada mediante cromatografía radial utilizando el cromatotrón Harrison Research (Ser. No. 26F), en una placa de sílice de 2 mm de espesor. La muestra fue solubilizada en 3 mL de acetato de etilo y se obtuvieron eluatos de 30 mL aumentando la polaridad del sistema con metanol hasta 100 % de este disolvente.

Tabla 9. Fracciones y reuniones obtenidas del fraccionamiento de la fracción de acetato de etilo B.

Fase móvil	Fracciones	Reuniones por similitud	Principal composición
100 AcOEt	1-25	1-5, 6-14 15-28	El compuesto mayoritario es 7-O-(6''- <i>p</i> - <i>E</i> -cumaroil)- β -D-glucósido de naringenina (28) en mezcla con 7-O-(6''- <i>p</i> - <i>E</i> -cumaroil)- β -D-glucósido de apigenina (39).
98:2 AcOEt: MeOH	26-38	29-59	

96:4 AcOEt: MeOH	39-51		Corresponde a una mezcla de 7-O-(6"- <i>p</i> - <i>E</i> -cumaroil)- β -D-glucósido de apigenina (39) y ácido <i>p</i> -cumárico (62).
94:6 AcOEt: MeOH	52-65	60-76	Contiene como principal componente ácido <i>p</i> -cumárico (62) en mezcla con azúcares.
90:10 AcOEt: MeOH	66-81	77-91	
80:20 AcOEt: MeOH	82-87		Al ser reveladas las fracciones en estas reuniones se pudo observar que los compuestos principales corresponden a azúcares.
70:30 AcOEt: MeOH	88-98	92-98	

Posteriormente se realizó una placa comparativa de las reuniones de los compuestos ya identificados con anterioridad y se determinó que el compuesto mayoritario en las fracciones 1-28 es el 7-O-(6"-*p*-*E*-cumaroil)- β -D-glucósido de naringenina (**28**) y contiene en mezcla 7-O-(6"-*p*-*E*-cumaroil)- β -D-glucósido de apigenina (**39**) en menor proporción, sin embargo, en las fracciones siguientes (29-59) se tiene una mezcla de 7-O-(6"-*p*-*E*-cumaroil)- β -D-glucósido de apigenina (**39**) y ácido *p*-Cumárico (**62**).

El resto de la fracción (aproximadamente 1.2) g se adsorbió en la misma cantidad de sílice gruesa (0.063-0.2 mm) para ser colocada en una columna de 3.5 cm de diámetro empacada hasta 10 pulgadas de la misma sílice utilizada para adsorber la muestra. La columna fue hidratada con acetato de etilo y posteriormente fue aplicada la muestra obteniendo eluatos de 10 mL hasta la fracción 30, y posteriormente de 50 mL. De este proceso se obtuvieron fracciones en las cuales por cromatografía comparativa en capa fina se determinó la composición, siendo el principal componente el 7-O-(6"-*p*-*E*-cumaroil)- β -D-glucósido de naringenina (**28**). Una de las fracciones se observó en mezcla menos compleja y se asignó con clave BAG02-060.

Purificación por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC):

Se procesaron las siguientes muestras:

Tabla 10. Fracciones procesadas por HPLC.

Clave	Cantidad
BAG02-054	25 mg
BAG02-069	59 mg

Nota: la muestra BAG02-017 y la muestra BAG02-060 se reunieron para ser procesadas por HPLC analítico con la clave BAG02-069:

Como las muestras continuaban en mezcla, se decidió analizarlas por HPLC con detector DAD utilizando un λ de 270 y 319 nm, tomando como referencia lo reportado por Hideji Itokawa en 1981. La muestra se eluyó utilizando un sistema isocrático agua:metanol 30:70, una temperatura de 35°C, un tiempo de corrida de 20 minutos y una inyección de 20 μ L. A continuación, se muestran los cromatogramas obtenidos:

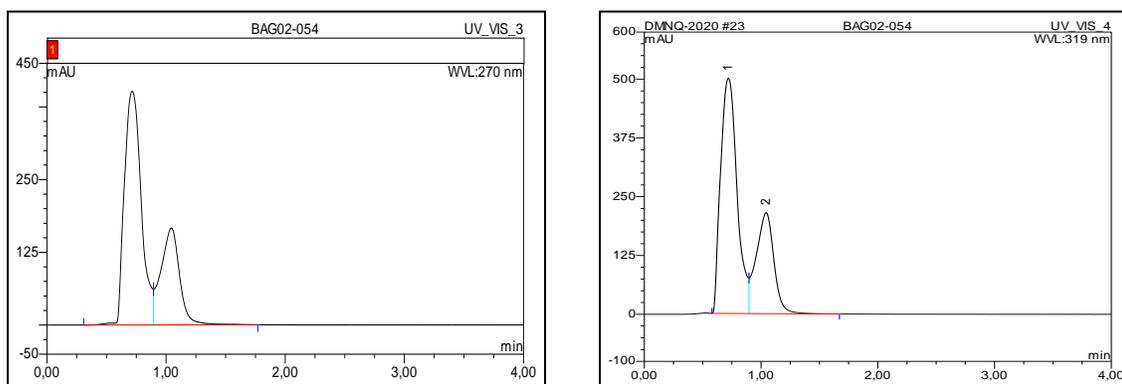


Ilustración 6. Cromatogramas obtenidos del equipo de HPLC analítico Dionex Ultimate 3000 en 270 nm (primer cromatograma) y 319 nm (segundo cromatograma).

Se puede observar en ambos cromatogramas tanto a 270 nm (primer cromatograma) como a 319 nm (segundo cromatograma) que se detectan dos picos, es decir al menos dos compuestos, lo que coincide con lo observado en RMN respecto a la complejidad de las señales para esta muestra. Por ello se decidió trabajar en purificar la muestra por HPLC semipreparativo. Para ello, inicialmente la muestra de 25 mg (BAG02-054) se disolvió en 0.5 mL de metanol grado HPLC, para realizar inyecciones de 50 μ L en el cromatógrafo y las fracciones fueron colectadas de acuerdo con el tiempo de retención de los picos observados en el cromatograma. Una vez colectadas las fracciones se evaporó la fase móvil con ayuda de un rotaevaporador obteniendo 6 y 7 mg de los picos 2 y 3, respectivamente. Esto mismo se hizo con la muestra BAG02-069, de las cuales el comportamiento en el equipo fue muy similar, obteniendo el cromatograma como se muestra a continuación:

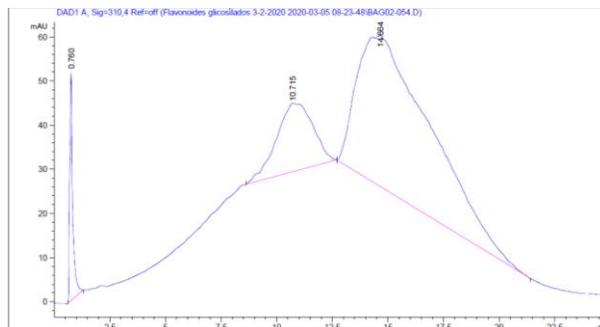


Ilustración 7. Cromatograma obtenido del equipo Agilent Technologies 1260 infinity para la muestra BAG02-069.

Tabla 11. Resultados obtenidos a partir del HPLC semipreparativo.

```

=====
                          Area Percent Report
=====

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=310,4 Ref=off

Peak RetTime Type  Width   Area   Height   Area
#   [min]         [min] [mAU*s] [mAU]    %
----|-----|----|-----|-----|-----|
  1  0.760 BB     0.1236 479.24060 51.95467  4.6509
  2  10.715 BB    1.3767 1759.68835 15.45084 17.0773
  3  14.664 BB    2.7769 8065.32764 34.30492 78.2718

Totals :                      1.03043e4 101.71043
  
```

Los picos 2 y 3 observados en la ilustración 7, fueron colectados teniendo en cuenta los tiempos de elución de acuerdo con el detector del equipo utilizado. Una vez que fueron colectados se eliminó la fase móvil con ayuda de un rotaevaporador. Las muestras se enviaron a RMN ¹H para observar si las señales habían disminuido en su complejidad. En los siguientes espectros, correspondientes a los picos 2 y 3 respectivamente, se observa que el primer espectro muestra señales adicionales a la mezcla inicial, es decir presenta contaminantes con respecto al compuesto mayoritario; mientras que en el caso del espectro correspondiente al pico 3 se observa una mayor pureza ya que las señales se pueden observar más definidas para 7-O-(6"-*p*-E-cumaroil)-β-D-glucósido de naringenina (**28**) y al contrario que el espectro del pico dos, no se observaron señales ruido:

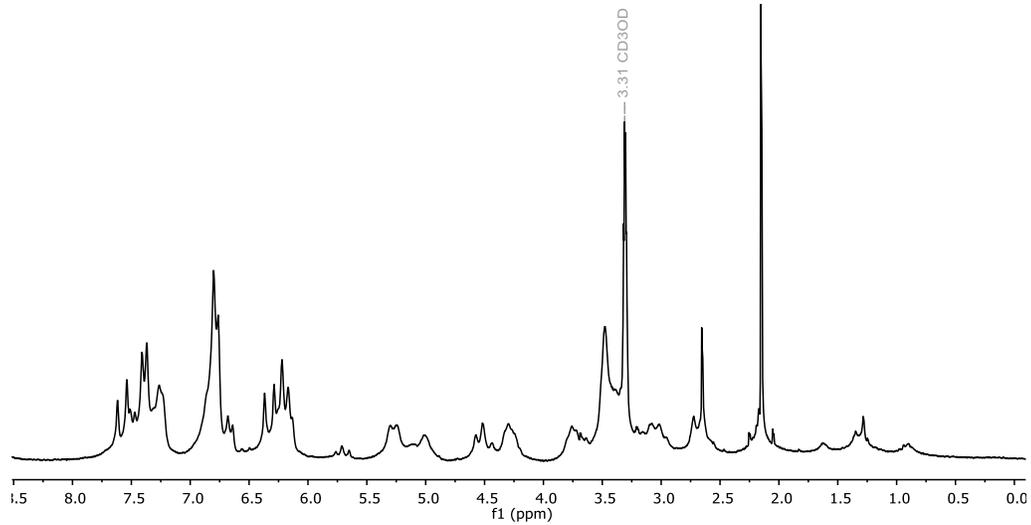


Ilustración 8. Espectro de ^1H correspondiente al pico 2 de la muestra BAG02-054, se pueden observar señales que pertenecen a más de un solo compuesto.

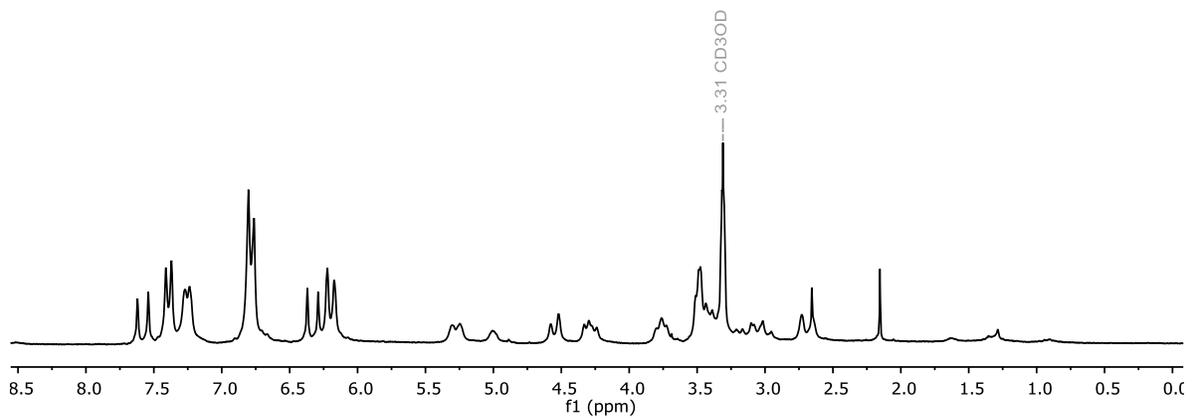


Ilustración 9. Espectro de ^1H correspondiente al pico 3 de la muestra BAG02-054, se pueden observar que las señales corresponden a un solo compuesto.

11.3.1.3 Identificación de los compuestos contenidos en la fracción de *n*-butanol.

Para tener una mezcla menos compleja de la fracción de butanol se realizaron lavados con metanol (7.7 g) y obteniendo un residuo que no solubilizó en metanol (12.8 g). Para poder determinar los compuestos que forman parte de la fracción butanólica se llevó a cabo una reacción de acetilación con, la finalidad de disminuir la polaridad de los compuestos contenidos en esta fracción. Para ello se tomaron muestras representativas de 157 mg (MeOH) y 220 mg (residuo) se colocaron cada una en un vial de vidrio de 10 mL con 2.5 mL de anhídrido acético y tres gotas de piridina, con el tiempo se fue monitoreando la reacción por cromatografía en capa fina. Después de 7 días se detuvo, agregando aproximadamente 5 g hielo al vial. Al agregar el hielo a la reacción se observó la presencia de un precipitado que se separó por filtración al vacío. A la parte filtrada se le realizó una extracción con diclorometano para así obtener el producto acetilado en la fase orgánica; como en la fracción orgánica se encuentra la piridina se realizan 3 lavados (5 mL c/u) con ácido clorhídrico al 10% formando la correspondiente sal, y por lo tanto dejando libre de piridina la fase orgánica; por último, para eliminar los residuos de HCl en la fase orgánica se agregaron 5 mL de una solución saturada de Na_2CO_3 , el procedimiento se ilustra en el siguiente esquema:

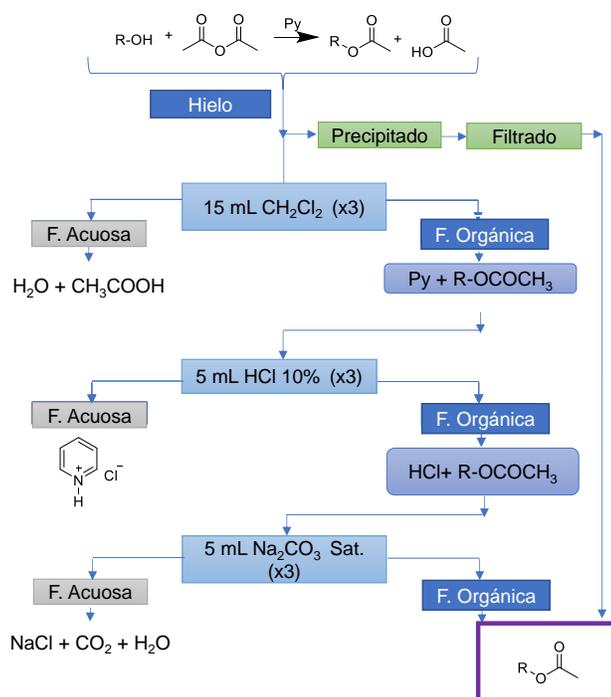


Ilustración 10. Proceso general llevado a cabo para una reacción de acetilación y recuperación del producto.

Tabla 12. Rendimientos de la reacción de acetilación correspondiente a la fracción butanólica

Fracción	Producto soluble	Producto precipitado	Rendimiento	Muestras enviadas a áreas analíticas
Metanol	110	19 mg	82.16	BAG02-046 (CG-EM)
Residuo	13.83	43 mg	25.83	BAG02-047 (CG-EM)

A continuación, se muestran los compuestos identificados en la muestra con clave BAG02-046:

Tabla 13. Compuestos identificados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en la muestra BAG02-046.

Compuesto	t _R (min)	Abundancia en la muestra (%)	IRL	IR reportado	Ion molecular [M] ⁺ m/z	Espectro de masas
Triacetato de glicerol (63)	30.97	5.0	1333	1344	218	24
Hexaacetato de Iditol (64)	60.74	17.44	1860	----	414	25
Hexaacetato de Myo Inositol (65)	69.93	2.30	2053	2044	432	26
Hexaacetato de Inositol (66)	71.19	6.64	2081	----	432	27
Hexaacetato de galactitol (67)	71.49	6.13	2045	2070	434	28
Octaacetato de sucrosa (68)	106.85	3.86	3024	----	664	29
Octaacetato de Trealosa (69)	107.67	5.81	3050	----	678	30

Los compuestos que a continuación se muestran son los que se identificaron en la muestra BAG02-047:

Tabla 14. Compuestos identificados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en la muestra BAG02-047.

Compuesto	t _R (min)	Abundancia en la muestra (%)	IRL	IR reportado	Ion molecular [M] ⁺ m/z	Espectro de masas
Triacetato de glicerol (63)	27.67	7.29	1281	1344	218	31

R-S-Tetra acetato de 1,2,3,4-Butanotetrol (70)	32.84	17.44	1363	----	290	32
Hexaacetato de D-glusitol (71)	62.75	39.68	1900	----	434	33
Hexaacetato de galactitol (67)	72.74	8.55	2015	2070	434	34
Tetraacetato de 1-propil-β-D-glucosa (72)	75.57	12.26	2290	----	390	35

11.3.1.4 Identificación de los compuestos contenidos en la fracción acuosa.

De la fracción acuosa se realizó una reacción de acetilación con la finalidad de disminuir la polaridad de los compuestos contenidos en esta fracción. Para ello se tomó una muestra representativa de 130 mg, se colocó en un vial de vidrio de 10 mL con 0.5 mL de anhídrido acético y tres gotas de piridina. La reacción se fue monitoreando por cromatografía en capa fina y se le fue adicionando anhídrido acético hasta un volumen de 2.5 mL. Después de 7 días la reacción se detuvo agregando hielo al vial (aproximadamente 5 g). El compuesto acetilado fue recuperado siguiendo la técnica que se mencionó en el apartado anterior.

De este procedimiento se obtuvieron 21 mg de producto acetilado de los cuales se tomó una muestra de 5 mg para ser analizado por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (cromatograma 12) con la clave BAG02-013 identificando los siguientes compuestos:

Tabla 15. Compuestos identificados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en la muestra BAG02-013.

Compuesto	t _R . (min)	Abundancia en la muestra (%)	IRL	IR reportado	Ion molecular [M] ⁺ . m/z	Espectro de masas
Hexaacetato de Iditol (64)	61.21, 61.86	18.68	1870	----	414	35
Hexaacetato de Myo Inositol (65)	70.25, 71.93	37.98	2060	2044	432	36
Octaacetato sucrosa (68)	107.05	3.9	3030	----	664	37
Octaacetato Trealosa (69)	108.02	9.49	3061	---	678	38

11.4 Evaluaciones biológicas.

Se llevó a cabo la evaluación biológica antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico de *C. urens* en un modelo *in vivo* de inducción de edema auricular en ratón por TPA. Para la realización de este estudio se utilizaron ratones macho de la cepa CD1 de 25 a 30 g de peso, obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Estos se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (21 ± 1 °C), humedad relativa (55 y con un ciclo luz oscuridad de 12 horas). Previo al experimento los ratones tuvieron acceso a agua y alimento *ad libitum*. El experimento fue realizado siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062- ZOO-1999, donde se dan especificaciones para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Además, el protocolo fue aprobado por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CCUAL) de la Facultad de Medicina. Al final del experimento los animales fueron sacrificados por dislocación cervical.

Para el estudio de toxicidad oral aguda se emplearon ratones hembra de la cepa CD1 obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Los animales se mantuvieron en condiciones de laboratorio, a temperatura ambiente constante (22 ± 1 °C), ciclo de luz /oscuridad de 12 h y humedad entre 45-65%. Para el estudio toxicológico agudo se siguieron las indicaciones de la guía 420 de la OCDE sobre toxicidad oral aguda. Los animales se alimentaron *ad libitum* con dieta estándar y agua. Antes de realizar el experimento, todos los animales se mantuvieron en ayuno durante 4 h con agua *ad libitum*. El cuidado y manejo de los animales durante el ensayo se llevó a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, revisada en 2001 y de la NIH (National Institutes of Health) #85-23 para el cuidado y uso de animales en laboratorio.

11.4.1 Determinación de la actividad antiinflamatoria, utilizando el modelo *in vivo* de inducción de edema auricular en ratón por TPA.

Para realizar el ensayo de la actividad antiinflamatoria, se utilizaron ratones macho de la cepa CD1 (25 a 30 g), formando grupos de 5 ratones para cada tratamiento, además, grupos para el control positivo utilizando como fármaco de referencia indometacina en las mismas dosis que el extracto y fracciones, un grupo como control negativo y uno más como vehículo.

Los ratones son anestesiados con pentobarbital sódico administrando 60 μL vía intraperitoneal de una solución stock al 6.3 %. Una vez anestesiados se induce la inflamación en la oreja derecha aplicando 5 μL de la solución de TPA (0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en etanol) en la parte externa y 5 μL en la parte interna, mientras tanto en la oreja izquierda sólo se aplica el vehículo. Una vez aplicado TPA al primer ratón del grupo, se toman 10 minutos para aplicar los extractos a ensayar, es decir, se administraron las dosis de 5, 10, 100 y 300 $\mu\text{g}/\text{oreja}$ para los tratamientos e indometacina. Transcurridas 4 h después de la aplicación de los tratamientos sobre las orejas de los ratones, estos son sacrificados por dislocación cervical, para posteriormente remover una muestra de 6 mm de diámetro de ambas orejas. Las muestras removidas son pesadas para determinar el porcentaje de inhibición del edema por diferencia de peso entre oreja derecha y oreja izquierda,³⁵ obtenido con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibition} = (\text{Cr} - \text{Ct}) / (\text{Cr}) \times 100$$

Donde *Cr* se refiere al grupo control, es decir que solo se aplicó TPA, y *Ct* se refiere a los grupos a los cuales se les aplicó el TPA más los extractos, compuestos e indometacina.³⁶

El análisis estadístico se llevó a cabo en el programa GraphPad Prism 5, utilizando un ANOVA de una y dos vías por el análisis de Dunnett para los compuestos, y un análisis multicomparación post hoc de Bonferroni en el cual se compara cada extracto a las diferentes dosis con el fármaco de referencia.

A continuación, se muestra una tabla con los resultados descritos en porcentajes de inhibición obtenidos para el extracto HA y fracciones:

Tabla 16. Porcentajes de inhibición del extracto hidroalcohólico de *Cnidoscopus urens* y fracciones a dosis de 5, 10, 100 y 300 µg/oreja. El análisis estadístico se realizó por un ANOVA de dos vías, utilizando un análisis multicomparación post hoc de Bonferroni (***) $p < 0.001$ estadísticamente significativos).

% de Inhibición del edema				
Fracción	5 µg/oreja	10 µg/oreja	100 µg/oreja	300 µg/oreja
Indometacina	4.43	11.11	22.68	35.44
E. Hidroalcohólico	24.87***	27.41***	29.44***	28.12***
CH ₂ Cl ₂	10.41***	19.04***	23.10	28.59***
AcOEt	20.05***	27.16***	29.44***	24.37
<i>n</i> -BuOH	7.61***	8.12	22.08	22.33***
Acuoso	13.71***	16.50***	23.60	28.93***
Control negativo	-0.13***	-0.13***	-0.13***	-0.13***

En la tabla anterior se muestra el nivel de significancia *** $p < 0.001$ en comparación con el control positivo que es indometacina, los asteriscos en color negro muestran un nivel de significancia positivo, es decir muestran una mayor actividad en la disminución del edema comparados con indometacina, mientras que los asteriscos en rojo indican una diferencia significativa, sin embargo, su actividad antiinflamatoria es menor que indometacina.

Adicionalmente se realizó el ensayo probando los compuestos β -amirina (**8**) y 7-*O*-(6''-*p*-*E*-cumaroil)- β -D-glucósido de apigenina (**39**) realizando el mismo procedimiento descrito anteriormente, sin embargo, sólo se administró la dosis de 5 µg/oreja. A continuación, se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 17. Porcentajes de inhibición de algunos compuestos de *Cnidoscopus urens* y fracciones a dosis de 5, µg/oreja. El análisis estadístico se realiza por un ANOVA de una vía, utilizando un análisis post hoc de Dunnet (***) $p < 0.001$ estadísticamente significativos).

% de Inhibición del edema	
Compuesto:	5 µg/oreja
Indometacina	4.43***

β-Amirina (8)	44.50***
7-O-(6"-p-E-cumaroil)-β-D-glucósido de apigenina (39)	62.84**
Vehículo	-0.13

En la tabla anterior se muestra el nivel de significancia *** $p < 0.001$ en comparación con el vehículo, los asteriscos en color azul muestran un nivel de significancia positivo, es decir muestran actividad positiva en la disminución del edema.

11.4.2 Determinación de toxicidad oral aguda en un modelo *in vivo* de ratón.³⁷

Para el estudio preliminar se utiliza un ratón, siendo el caso particular de *Cnidoscolus urens*, de la cual no se tienen reportes de toxicidad de los extractos y compuestos, la dosis recomendada inicial es de 300 mg de extracto a evaluar por kilogramo de peso. El propósito del estudio de observación es permitir la selección de la dosis inicial apropiada para el estudio principal.

De acuerdo con el diagrama 1, una vez administrado el ratón con la dosis de 300 mg/kg de peso hay tres posibilidades, la primera (A) que el ratón muera, esto nos indica que hay que administrar un segundo ratón con dosis menores, siendo las dosis recomendadas de 50 mg/kg o 5 mg/kg de peso, esto de acuerdo con los signos que presente el animal después de ser administrado. La segunda posibilidad (B), es que a la dosis de 300 mg/kg de peso el ratón presente toxicidad evidente, principalmente alteraciones en el comportamiento del animal, siendo este el propósito de realizar el análisis exploratorio y seleccionar la dosis para el ensayo principal de toxicidad oral aguda. Por último, hay la probabilidad de que administrando la dosis de 300 mg/kg de peso, el ratón no presente signos de toxicidad (C), por lo que se debe continuar con el estudio exploratorio a una dosis de 2000 mg/kg.

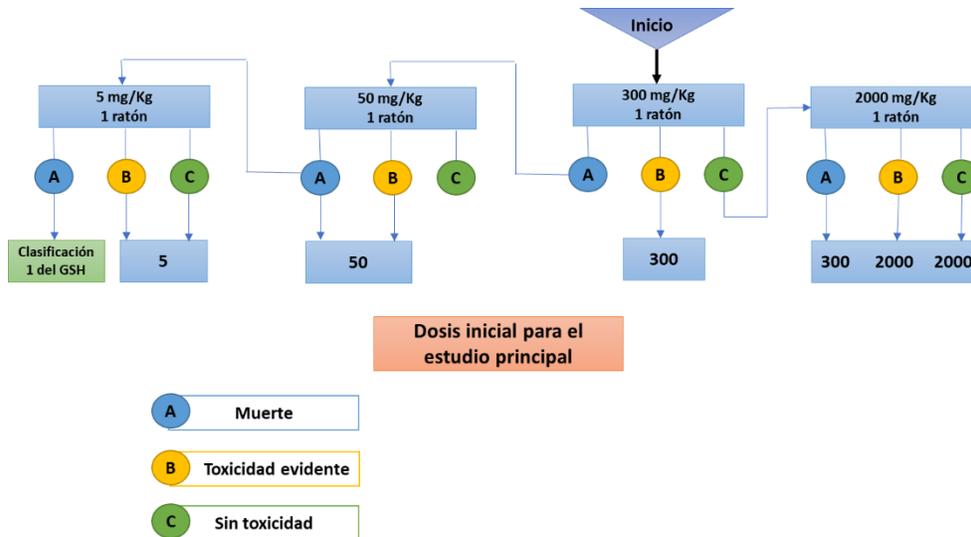


Diagrama 1. Proceso preliminar de toxicidad oral aguda.

La segunda etapa es el estudio principal, en el cual el extracto de prueba es administrado a la dosis establecida en el estudio de observación acorde al diagrama anterior. Las observaciones de interés en este ensayo son cambios en la piel y pelaje, cambios en las mucosas, comportamiento, temblores, convulsiones, salivación, diarrea y sueño principalmente.

Previo al inicio del ensayo, los animales fueron puestos en ayuno por 4 h, con acceso libre a agua, tal y como lo indica la guía 420 de la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos). Para el estudio de observación, se utilizaron dos animales, de los cuales, uno fue administrado con la dosis exploratoria de 300 mg/kg del extracto hidroalcohólico, mientras que el otro fue administrado únicamente con vehículo (Tween 20 al 10%). Los animales fueron observados durante los primeros 30 minutos después de la administración del extracto, y periódicamente las primeras 24 h con especial atención en las primeras 4 h, y diariamente por 14 días y poder reportar signos evidentes de toxicidad, como cambios en el comportamiento, salivación, piloerección, cambios en la respiración, ojos, mucosas y actividad somatomotora. Durante las primeras horas después de la administración, se observaron algunos signos, como piloerección, somnolencia y letargo, los cuales desaparecieron luego de 24 horas, y los siguientes 14 días los animales mantuvieron un comportamiento normal. Por lo anterior, se decidió administrar a un segundo animal, una dosis de 2000 mg/kg, del cual se observó el mismo comportamiento que el animal administrado a 300 mg/kg de peso.

Con base en lo reportado en el estudio de observación, se inició el estudio principal, administrando a 5 animales, una dosis de 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico, y un segundo grupo fue administrado con vehículo. Durante las primeras 4 h después de la administración, los animales presentaron piloerección, somnolencia y letargo, sin embargo, estos signos desaparecieron a las 4 horas después de ser administrados. A pesar de que los animales mostraban un comportamiento normal durante los siguientes días de observación, al final del periodo se reportaron 4 decesos, el primero ocurrido en el día 6, y los otros tres ocurrieron entre los días 13 y 14.

Así mismo se registró el peso de los animales durante los 14 días de observación los cuales se muestran en la siguiente tabla, observando que el peso de algunos ratones comenzó a disminuir al siguiente día después de la administración:

Tabla 18. Registro de pesos por día del grupo experimental administrado con el extracto hidroalcohólico de *Cnidoscolus urens*. En rojo se muestra el día en que hubo el deceso del animal.

TOA del extracto HA de <i>C. urens</i> a dosis de 2000 mg/kg														
Peso (g)/día														
<i>n</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
(1)	30	30	32	33	33	33	32	31	30	30	29	29	28	28
(2)	27	29	27	28	30	30	28	28	27	26	24	24	23	
(3)	30	25	24	24	23									
(4)	31	31	29	28	26	24	23	23	22	22	21	21	20	
(5)	32	25	25	24	23	23	22	22	22	21	20	19		

**DISCUSIÓN
DE
RESULTADOS**

12 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

12.1 Análisis estructural de los compuestos aislados del extracto Hidroalcohólico e identificados por Resonancia Magnética Nuclear.

12.1.1 β -Amirina (8).

Mediante la cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas se logró deducir que la muestra BAG02-055 corresponde al compuesto β -amirina (Cromatograma 1), esto debido a que en el espectro 1 de ^1H (espectro 1) en resonancia magnética nuclear se observa una señal triple en 5.15 ppm con constante de acoplamiento $J=3.5$ Hz, que por desplazamiento químico y multiplicidad se asigna al hidrógeno vinílico H-12, el cual es característico de triterpenos cíclicos con insaturación en C-12 y C-13.

Otra señal característica es la que se observa en 3.20 ppm correspondiente al H-3 base de oxígeno. Es una señal doble de doble que integra para un hidrógeno y presenta dos constantes de acoplamiento $J=10.0, 5.8$ Hz, que corresponden al ángulo diedro con el que se acopla con el CH_2 en posición número 2 del triterpeno.

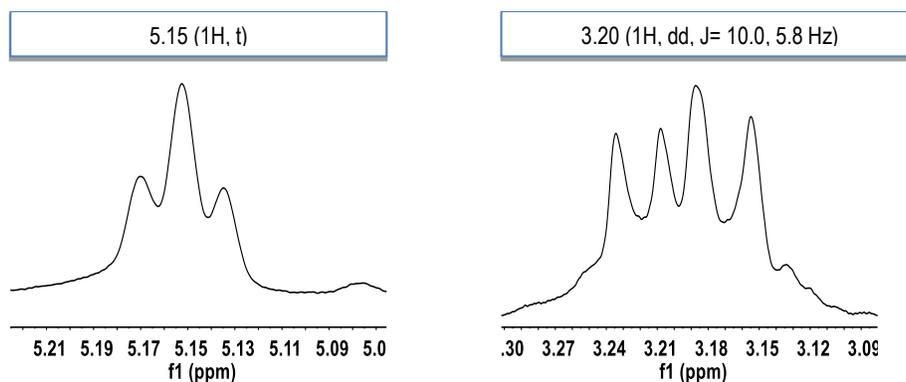


Ilustración 11. Expansión de las señales en campo bajo del espectro de RMN ^1H correspondiente a β - Amirina.

Otras señales que son de ayuda para la identificación de este compuesto son las observadas entre 0.8 y 1.10 ppm donde se pueden encontrar las ocho señales para los metilos del compuesto:

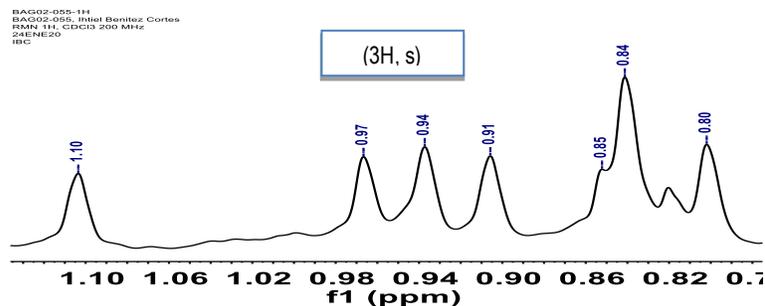
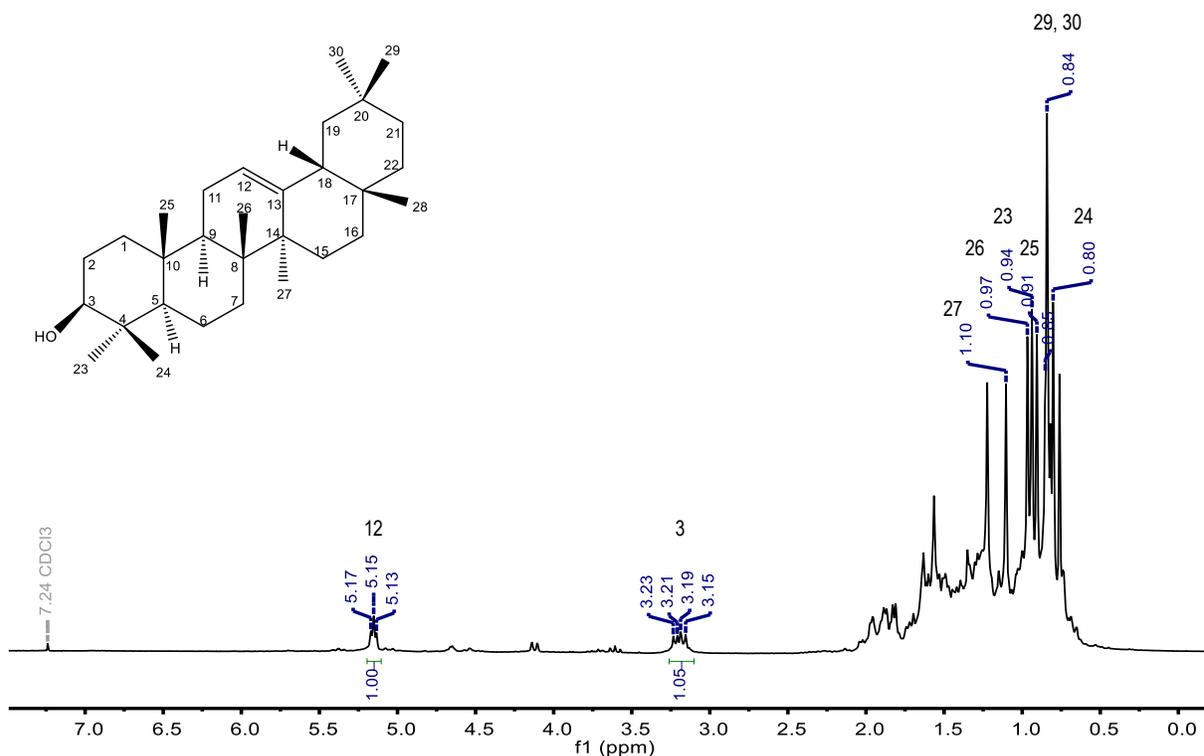
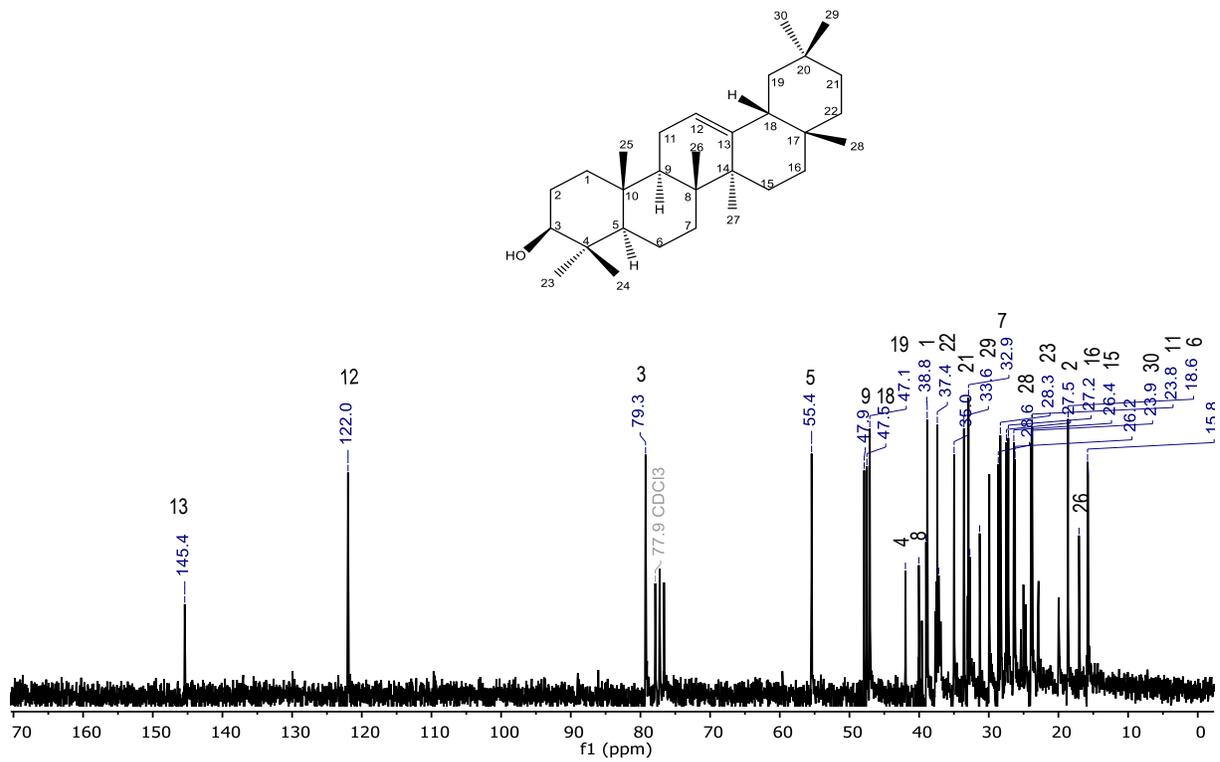


Ilustración 12. Expansión de las señales en campo alto del espectro de RMN ^1H correspondiente a β -Amirina (8).

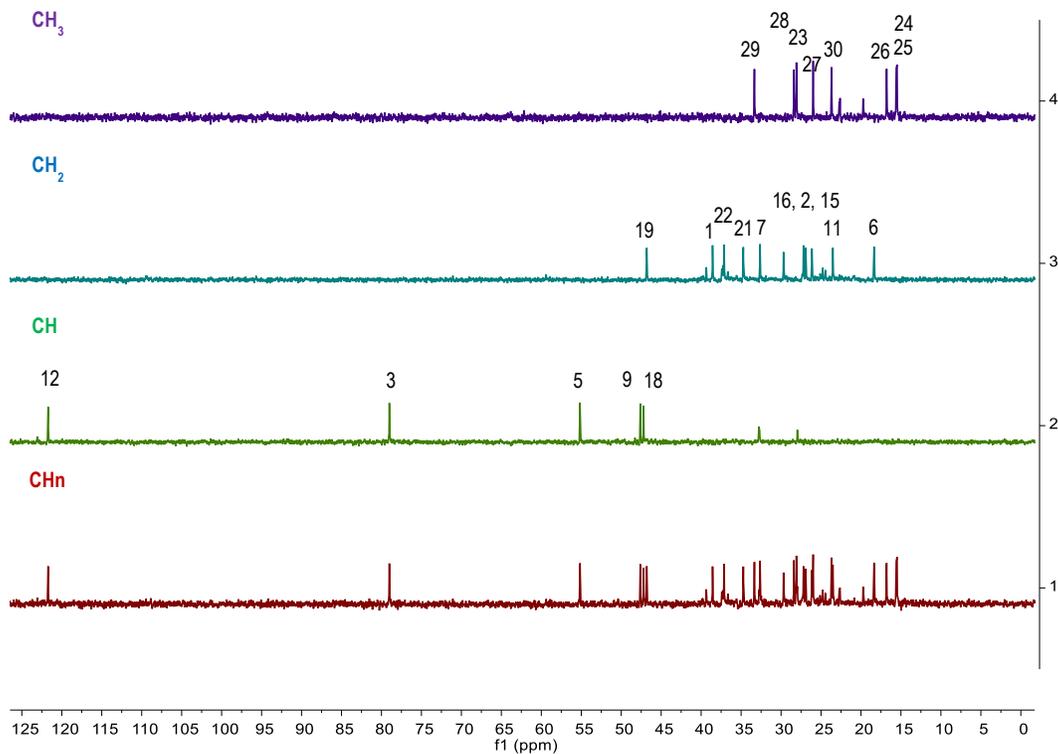


Espectro 1. RMN ^1H de β -Amirina (8), 200 MHz, CDCl_3 .

Así también con el experimento de carbono 13 y DEPT (espectros 2 y 3) se puede corroborar la presencia de 8 metilos, 10 metilenos, 5 metinos y los carbonos restantes se pueden asignar como carbonos cuaternarios (7 carbonos), dando un total de 30 carbonos que corresponden al esqueleto del triterpeno β -amirina, adicional a esto se realizó la comparación con datos previos reportados para este compuesto que se pueden observar en la tabla 19. En los respectivos espectros para este compuesto se logran observar algunas señales adicionales, que no corresponden a β -amirina, estas señales corresponden al compuesto con el que se encuentra en mezcla que de acuerdo con el cromatograma 1 corresponde a fitol.



Espectro 2. RMN ^{13}C de β -Amirina (8), 50 MHz, CDCl₃.



Espectro 3. DEPT RMN ^{13}C de β -Amirina (8), 50 MHz, CDCl₃.

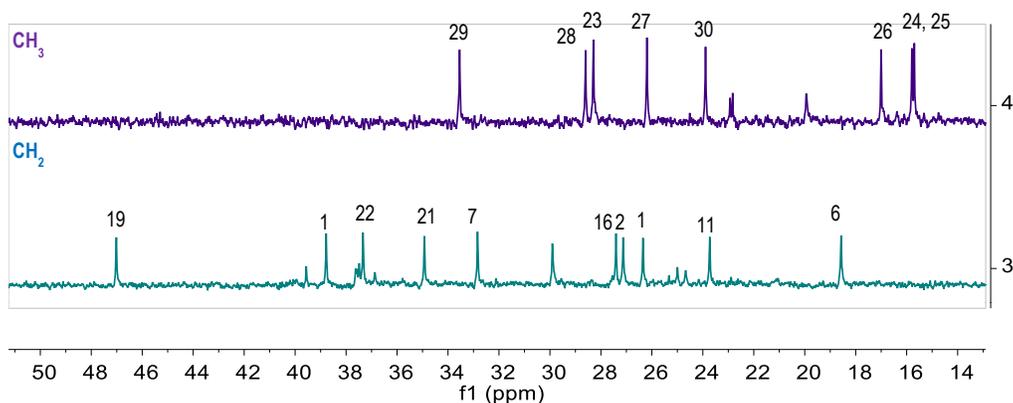


Ilustración 13. Expansión del espectro RMN DEPT para metilos y metilenos correspondientes a β -Amirina.

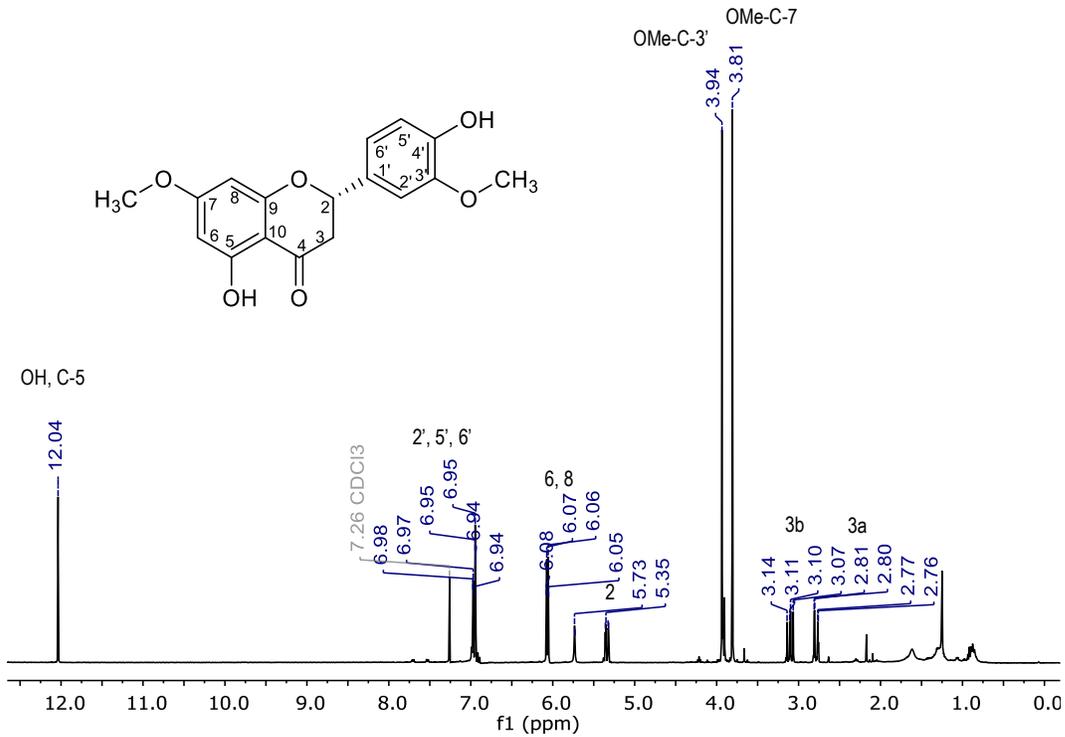
Tabla 19. Datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear para β -Amirina.

β -Amirina.							
#C	Reportados ^1H -RMN (CDCl_3 , 500 MHz, ^{13}C -RMN 125 MHz) ³⁸			Experimentales ^1H -RMN (CDCl_3 , 500 MHz, ^{13}C -RMN 125 MHz)			
	^{13}C ppm	δ	^1H δ ppm (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento)	^{13}C ppm	δ	^1H δ ppm (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento)	DEPT
1	38.60			38.8			-CH ₂ -
2	27.14			27.5			-CH ₂ -
3	78.50			79.3		3.20 (1H, dd, J= 10.05, 5.77 Hz)	-CH-
4	38.69			39.0			C
5	55.19			55.4			-CH-
6	18.38			18.6			-CH ₂ -
7	32.66			32.9			-CH ₂ -
8	39.80			40.0			C
9	47.64			47.9			-CH-
10	36.95			37.2			C
11	23.53			23.8			-CH ₂ -
12	121.71		5.183 (1H, dd, J=3.5, 3.5 Hz, H-12)	122.0		5.15 (1H, dd, 3.5)	-CH-
13	145.21			145.4			C
14	41.73			42.0			C

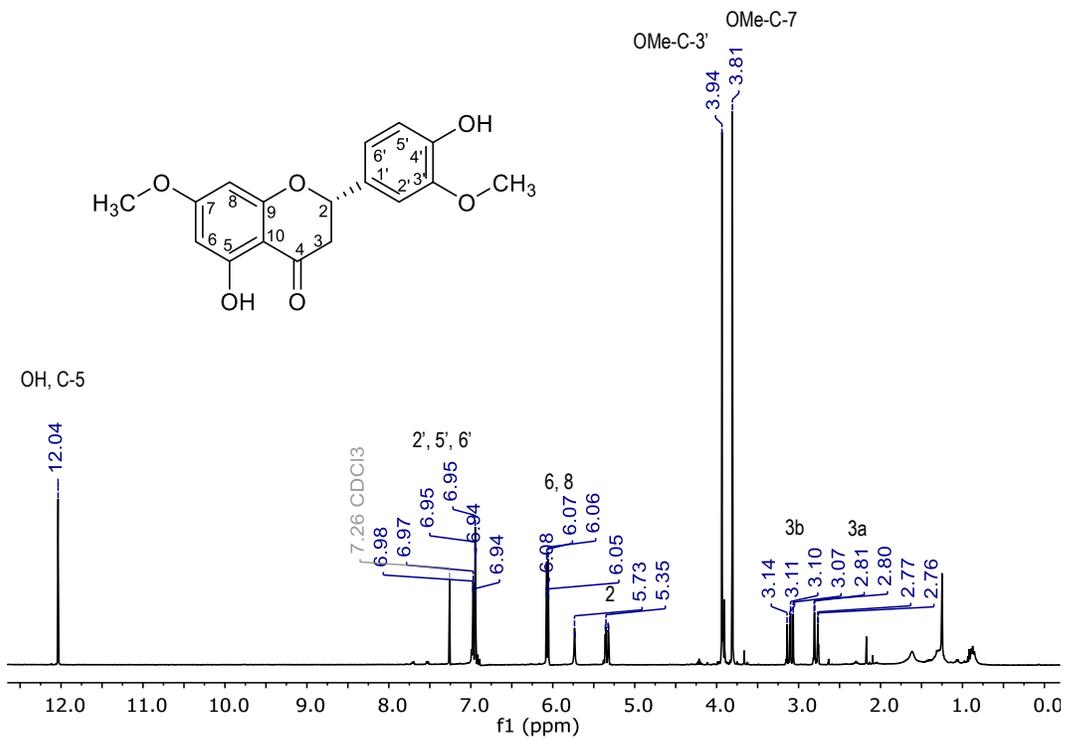
15	26.16		26.4		-CH ₂ -
16	26.89		27.2		-CH ₂ -
17	32.26		32.7		C
18	47.17		47.5		-CH-
19	46.81		47.1		-CH ₂ -
20	31.09		31.3		C
21	34.72		35.0		-CH ₂ -
22	37.05		37.4		-CH ₂ -
23	28.06	0.99 (3H, s)	28.3	0.94 (3H, s)	-CH ₃
24	15.56	0.79 (3H, s)	15.8	0.80 (3H, s)	-CH ₃
25	15.5	0.92 (3H, s)	15.7	0.91 (3H, s)	-CH ₃
26	16.8	0.97 (3H, s)	17.0	0.97 (3H, s)	-CH ₃
27	25.9	1.13 (3H, s)	26.2	1.10 (3H, s)	-CH ₃
28			28.6	0.85 (3H, s)	-CH ₃
29	33.4	0.87 (6H, s)	33.6	0.84 (6H, s)	-CH ₃
30	23.7	0.87 (6H, s)	23.9	0.84 (6H, s)	-CH ₃

12.1.2 3',7-Dimetoxi-eriodictiol (50).

El compuesto etiquetado con clave BAG02-056 fue analizado inicialmente por su experimento de RMN ¹H a 400 MHz, sin embargo, en la zona de resonancia de los hidrógenos aromáticos, específicamente entre un desplazamiento de 6.91-6.96 ppm se encuentra un conjunto de señales complejo lo cual se observa en el espectro 4 de ¹H y en la ilustración 14; por la información obtenida del experimento HSQC se confirma la presencia de tres hidrógenos (metinos) aromáticos. Una alternativa para poder observar una mejor resolución de las señales fue obtener un espectro a otra frecuencia, en este caso se obtuvo a 600 MHz, cuyas señales se discuten a continuación.



Espectro 4. RMN ¹H de 3',7-dimetoxi-eriodictiol (50), 400 MHz, CDCl₃.



Espectro 5. RMN ¹H de 3',7-dimetoxi-eriodictiol (50), 600 MHz, CDCl₃.

A continuación, se muestra una expansión de las señales entre un desplazamiento entre 6.90 y 7.0 ppm en donde se puede observar una mejor distribución de las señales para los hidrógenos 2',5' y 6' y con lo cual fue posible la asignación de estos:

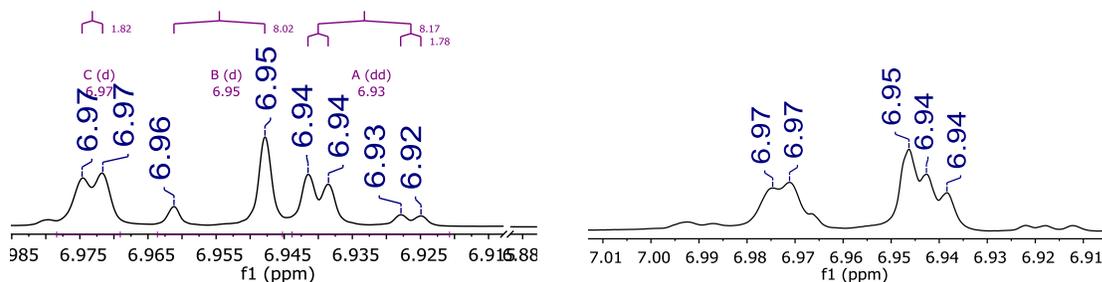


Ilustración 14. Expansión de las señales correspondientes al sistema ABX de un sistema aromático del anillo B de una flavanona, la primera expansión, corresponde al espectro obtenido en 600 MHz mientras que el segundo fragmento fue obtenido en 400 MHz, utilizando CDCl_3 como disolvente en ambos experimentos.

A un desplazamiento químico de 12.04 ppm, se encuentra una señal que es característica para el hidrógeno del hidroxilo en posición 5 de un flavonoide (espectro RMN 4) ya que se encuentra formando un puente de hidrógeno con el carbonilo en posición 4 y por lo tanto se observa a desplazamientos altos (campo bajo):

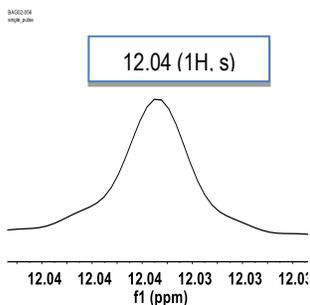


Ilustración 15. Expansión de la señal en campo bajo del espectro de RMN ^1H correspondiente a 3',7-Dimetoxi-eriodictiol (50).

Las señales que continúan a campo alto corresponden a un sistema aromático ABX, comenzando con la señal doble en 6.97 ppm que integra para 1 hidrógeno con una constante de acoplamiento de 1.8 Hz, la que corresponde a una constante para hidrógenos en relación *meta*, esta constante de acoplamiento la comparte con la señal que se encuentra en 6.93 ppm que integra para un hidrógeno y es una señal doble de doble con las constantes de acoplamiento de 1.8 y 8.0 Hz que corresponden a relaciones *meta* y *orto* respectivamente, así la siguiente señal con la que comparte la constante de acoplamiento de 8.0 Hz la encontramos en un desplazamiento de 6.95 ppm e integra para un hidrógeno.

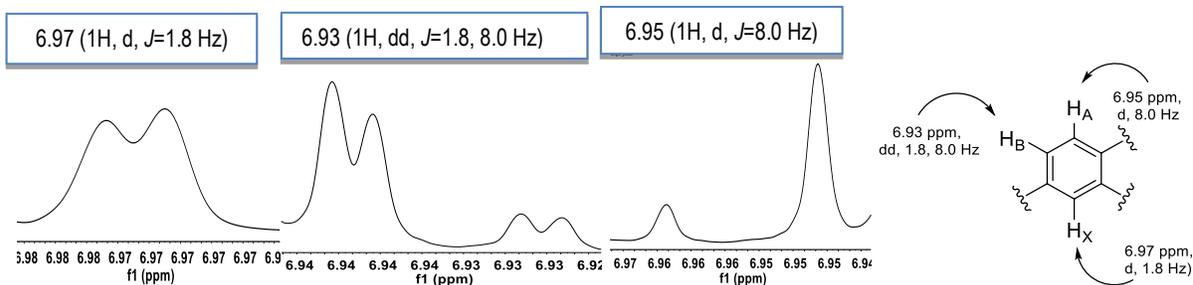


Ilustración 16. Expansión de las señales en campo bajo del espectro de RMN ^1H correspondiente a un sistema ABX del compuesto 3',7-Dimetoxi-eriodictiol (50).

Continuando con la descripción de las señales de hidrógenos aromáticos, se encuentran dos señales adicionales, en 6.08 y 6.05 ppm e integran para un hidrógeno cada una. Ambas muestran constante de acoplamiento de 2.3 Hz, características de su relación *meta* y que pueden corresponder a la sustitución del anillo A de un flavonoide, siendo un sistema de espines AB:

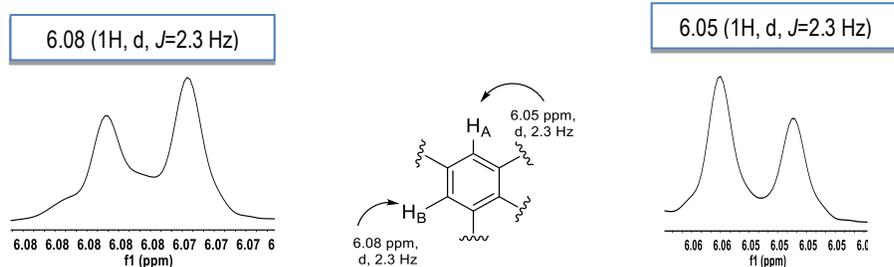


Ilustración 17. Expansión de las señales en campo bajo del espectro de RMN ^1H correspondiente a un sistema AB del compuesto 3',7-Dimetoxi-eriodictiol (50).

Posteriormente se encuentra una señal doble de doble en 5.34 ppm con constantes de acoplamiento de 2.9 y 13.1 Hz, por desplazamiento químico se deduce que es un hidrógeno base de oxígeno y es característico para el hidrógeno en posición 2 del anillo C de una flavanona. Las señales con las que comparte las constantes de acoplamiento se encuentran en 3.10 y 2.79 ppm, que de acuerdo con el experimento HSQC corresponden a un CH_2 y cuya multiplicidad nos indica que son hidrógenos diastereotópicos. Con la señal en 3.10 ppm comparte la J de 13.1 Hz que corresponde a un acoplamiento tipo *axial-axial* o una relación *anti* y es asignado a $\text{H}_{3\text{B}}$; por otra parte, está también la constante de acoplamiento de 2.9 Hz que acopla con la señal en 2.79 ppm, la cual se establece una interacción *axial-ecuatorial* o una relación tipo *syn* y es asignado a $\text{H}_{3\text{A}}$. Por último, la constante de acoplamiento que comparten las señales de 3.10 y 2.79 ppm es de 17.2 Hz y corresponde a una relación geminal, es decir que ambos hidrógenos $\text{H}_{3\text{A}}$ y $\text{H}_{3\text{B}}$ están sobre el mismo carbono.

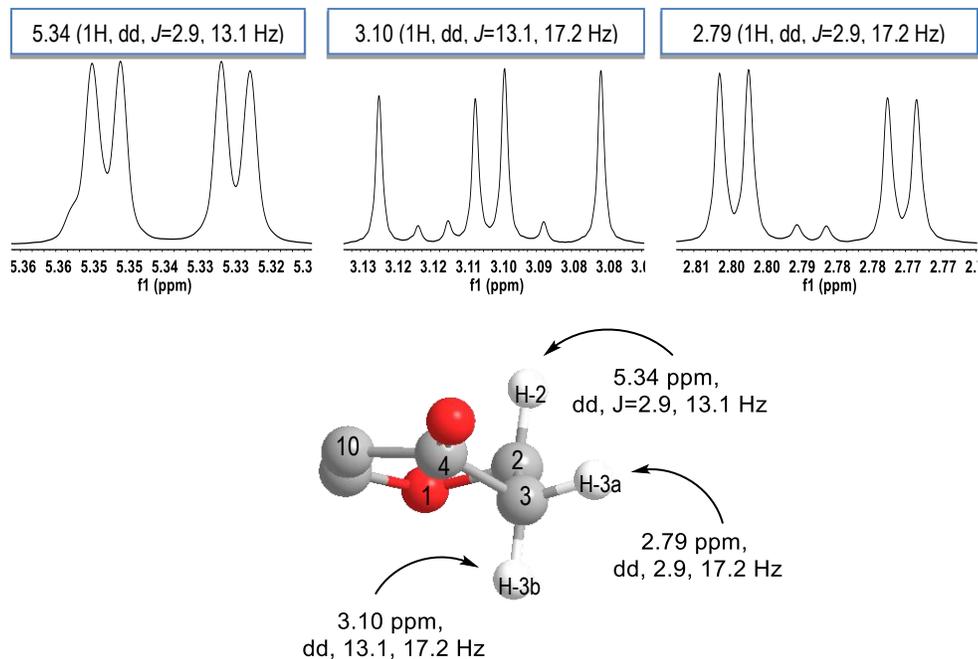


Ilustración 18. Expansión de las señales correspondientes al sistema de espines que conforman los hidrógenos en posición 2 y 3 de una flavanona.

Para terminar con la descripción del espectro se encuentran las siguientes señales simples: una señal que integra para un hidrógeno en 5.73 ppm, lo cual indica la presencia adicional de un grupo hidroxilo como sustituyente; las siguientes señales se pueden observar a 3.94 y 3.81 ppm, ambas son simples e integran para 3 hidrógenos. Estas señales en desplazamientos a frecuencias altas nos indican que son metilos bases de oxígeno, es decir que corresponden a metoxilos. Las características descritas corresponden al flavonoide 3',7-dimetoxi-eriodictiol (**50**). Adicionalmente estos datos fueron comparados con los reportados en la literatura (Tabla 21).³⁹

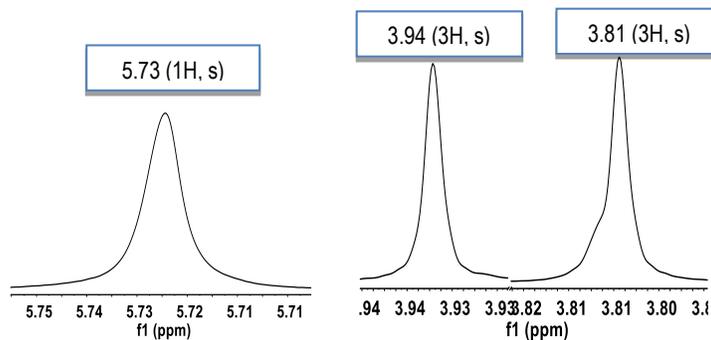
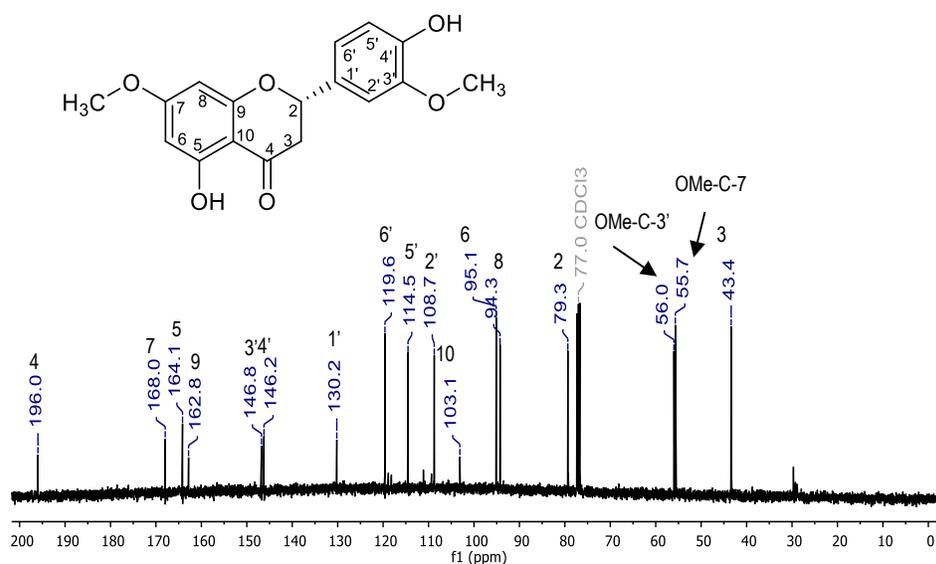


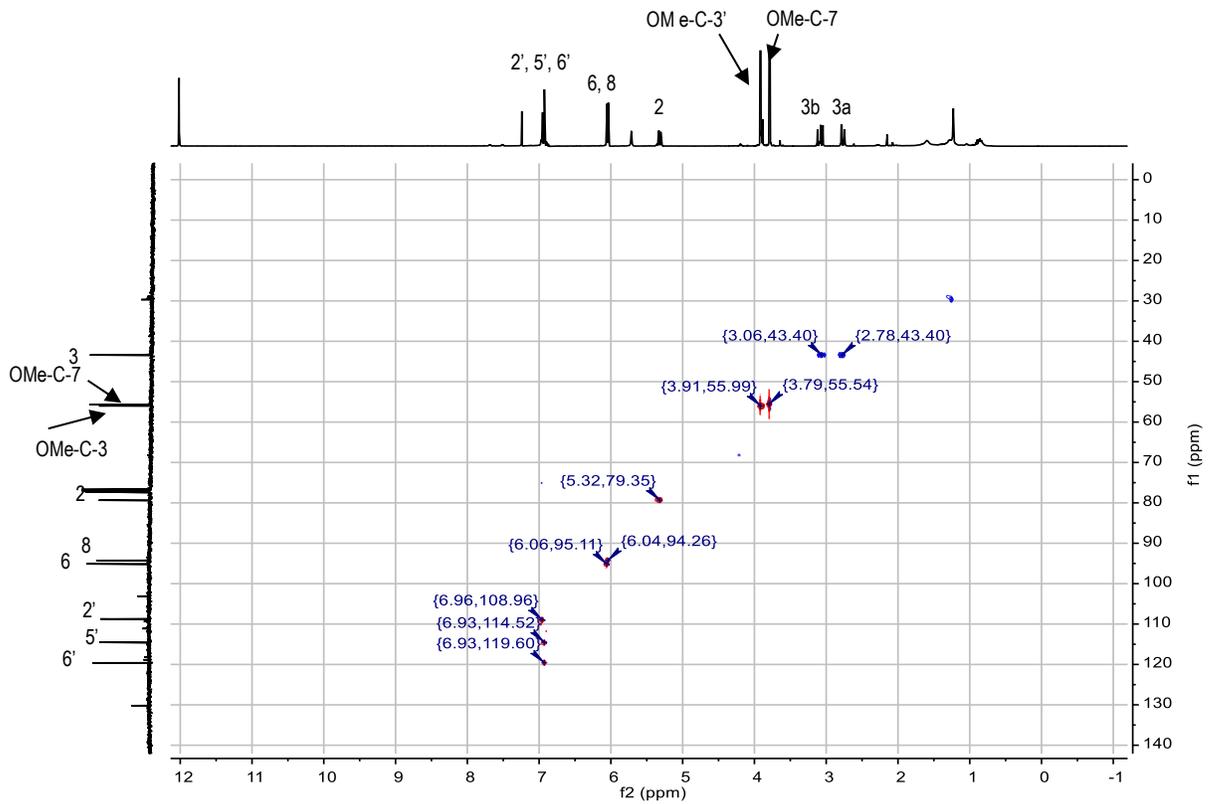
Ilustración 19. Expansión de las señales simples del espectro de hidrógeno 5, la primera señal corresponde a un hidrógeno de hidroxilo, mientras que las señales más grandes, por desplazamiento químico corresponden a metoxilos.

Por otra parte, en el espectro de ^{13}C (Espectro 6) se observan un total de 17 señales, las cuales corresponden con el número de carbonos en la estructura 3',7-dimetoxi-eriodictiol (**50**), de estos se observa una señal a un desplazamiento químico de 196 ppm que corresponde al carbonilo en posición 4; de ahí se observan 12 señales entre un desplazamiento químico de 91.3- 168.0 y corresponden a carbonos de dos sistemas aromáticos de seis carbonos cada uno. Adicionalmente se encuentra una señal característica para el carbono 2 de la flavanona en posición 2 en 79.3 ppm, es un carbono base de oxígeno y que además soporta a un sistema aromático. Las siguientes señales corresponden a dos metoxilos en 56.0 y 55.0 ppm y un CH_2 correspondiente al C-3 de la flavanona en 43.4 ppm.

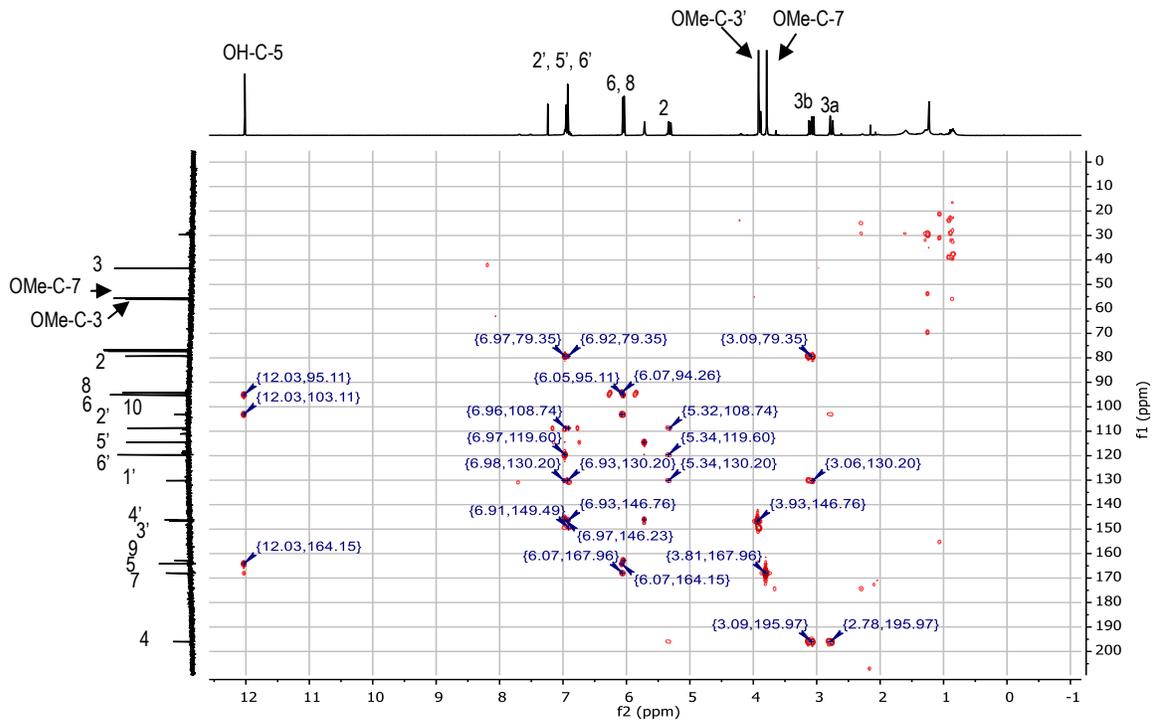


Espectro 6. RMN ^{13}C de 3',7-dimetoxi-eriodictiol (**50**), 100 MHz, CDCl_3 .

Para poder asignar de manera inequívoca tanto hidrógeno como carbono se requirió de los experimentos de dos dimensiones HSQC que es la correlación H-C a un enlace y del experimento HMBC que es la correlación H-C a dos y tres enlaces, a continuación, se muestran tales espectros:



Espectro 7. RMN HSQC de-3',7-Dimetoxi-eriodictiol (50), 400 MHz, CDCl₃.



Espectro 8. RMN HMBC de-3',7-Dimetoxi-eriodictiol (50), 400 MHz, CDCl₃.

Tabla 20. Datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear comparando datos experimentales y reportados de 3',7-Dimetoxi-eriodictiol (50).

3',7-Dimetoxi-eriodictiol (50):						
	Experimentales CDCl ₃				Reportados DMSO-d ₆ ³⁹	
	¹³ C 100 MHz	¹ H 600 MHz	¹ H 400 MHz		¹³ C 125 MHz	¹ H 500 MHz
	δ ppm	δ ppm (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento)		HMBC	δ ppm	δ ppm (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento)
-OH		12.04 (1H, s)	12.02 (1H, s)	95.1, 103.1, 164.1, 168.0		
2	79.3	5.34 (1H, dd, J=2.9, 13.1)	5.32 (1H, dd, J=3, 13.1)	108.7, 119.6, 130.2	79.5	5.33 (dd, J= 3.0, 12.5)
3	43.4	3.10 (1H, dd, J=13.1, 17.2 Hz)	3.08 (1H, dd, J=13.1, 17.2 Hz)	79.3, 130.2, 196.0	42.8	2.70 (dd, J=2.4, 17)
		2.79 (1H, dd, J=2.9, 17.2 Hz)	2.76 (1H, dd, J=3.0, 17.2 Hz)	196.0		3.1 (dd, J=12.4, 19.2)
4	196.0				197.6	
5	164.1				163.8	
6	95.1	6.08 (1H, dd, J=2.3 Hz)	6.06 (1H, dd, J=2.31 Hz)	94.3, 103.1, 164.1, 168.0	95.3	6.06 (d, J=2.2)
7	168.0				168.2	
8	94.3	6.05 (1H, dd, J=2.3 Hz)	6.03 (1H, dd, J=2.31 Hz)	95.1, 103.1, 162.8, 168.0	94.4	6.06 (d, J=2.2)
9	162.8				163.5	
10	103.1				103.2	
1'	130.2				129.9	
2'	108.7	6.97 (1H, d, J=1.8 Hz)	6.95 (m)	79.3, 119.6, 146.2, 146.7	111.8	6.94 (br, s)

3'	146.8				148.2	
4'	146.2				147.6	
5'	114.5	6.95 (1H, d, $J=8.0$ Hz)	6.93 (m)	130.2, 146.7	115.8	6.95 (d, $J=8.8$)
6'	119.6	6.93 (1H, dd, $J=1.8, 8.0$ Hz)	6.92 (m)	79.3, 108.7	120.4	6.96 (br, d, $J=8.8$)
OMe	56.0	3.94 (3H, s)	3.93 (3H, s)	146.8	56.5	3.93 (1H, s)
OMe	55.7	3.81 (3H, s)	3.81 (3H, s)	168.0	56.3	3.80 (1H, s)

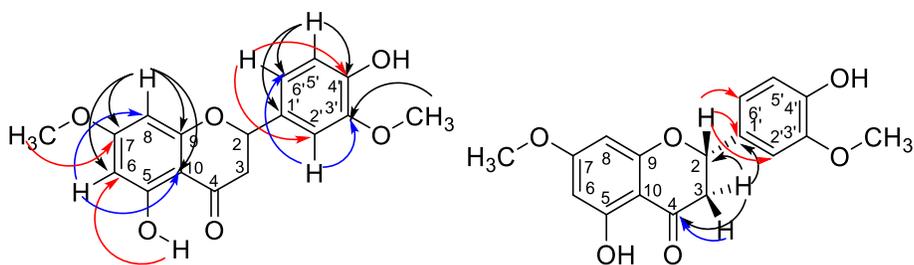
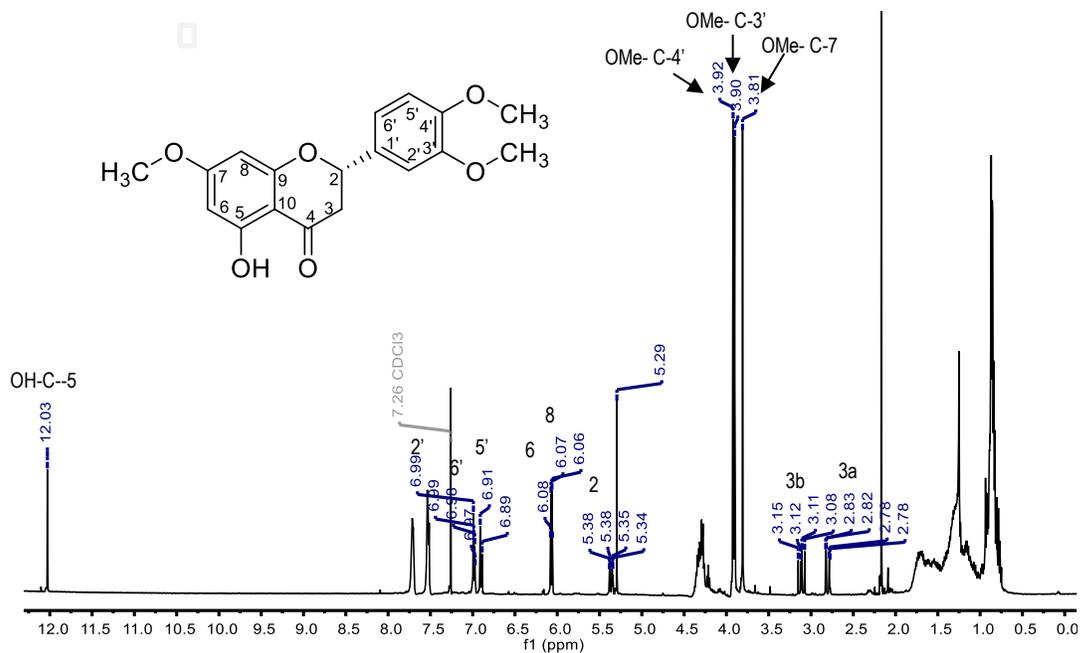


Ilustración 20. Correlaciones HMBC para 3',7-Dimetoxi-eriodictiol.

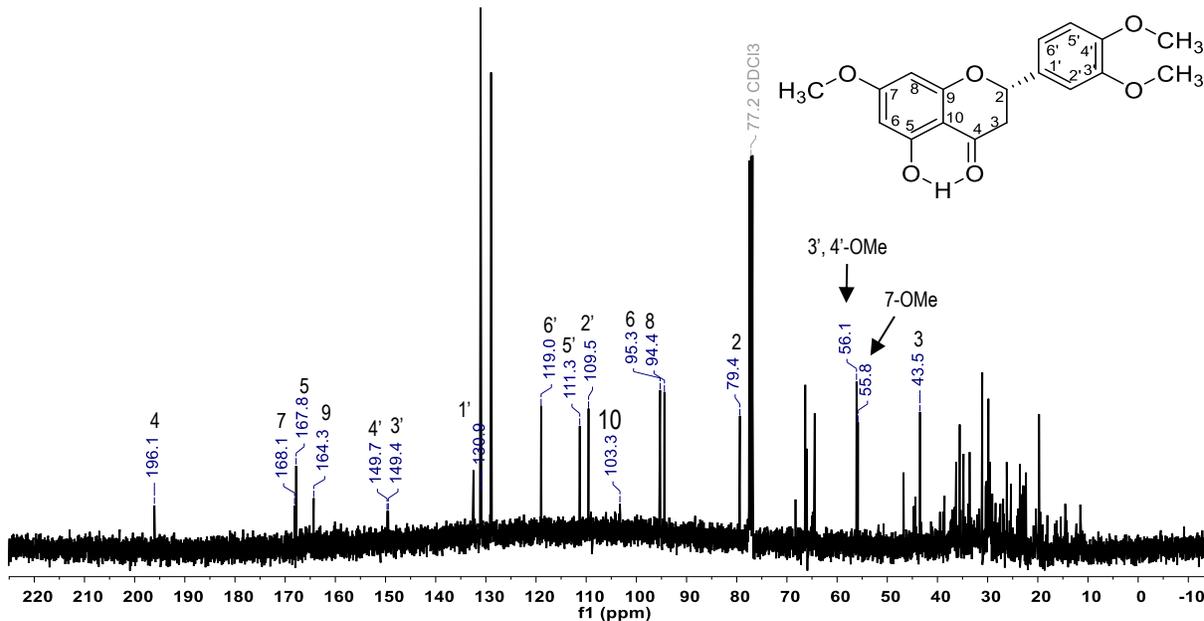
12.1.3 3',4',7-Trimetoxi-eriodictiol (47).

Se analizó el espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (Espectro 9) para el compuesto con clave BAG02-063, en el que se observan señales para hidrógenos que corresponden al anillo C de una flavanona similares a los de la muestra descrita con anterioridad, esto corresponde a un sistema ABX con las mismas las constantes de acoplamiento. También se presenta la sustitución para las señales en un sistema AB (*meta*) para el anillo A de la flavanona, y un sistema de espines ABX (*orto*, *orto-meta* y *meta*) que es similar al anillo B del eriodictiol. La única diferencia con 3',7 Trimetoxi-eriodictiol radica en la presencia de un metoxilo adicional en posición 4' del anillo B:



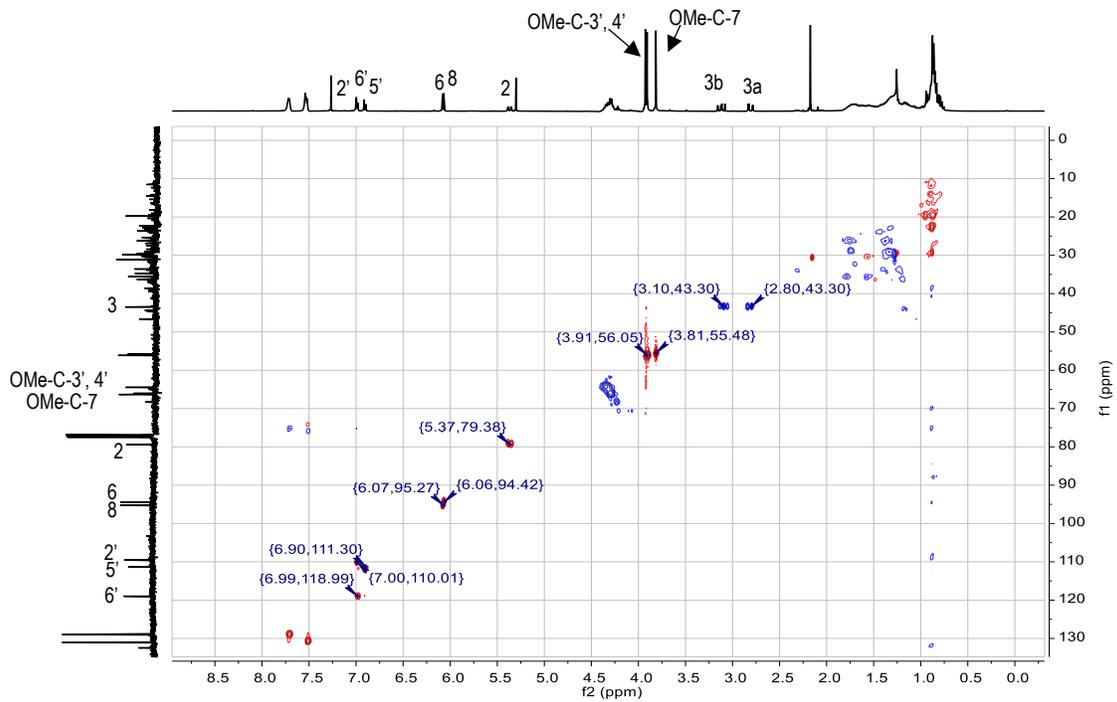
Espectro 9. RMN ^1H de 3',4',7-Trimetoxi-eriodictiol (47), 400 MHz, CDCl_3 .

También por el espectro de ^{13}C se encontraron un total de 18 carbonos (espectro 10) que corresponden con el número de carbonos constituyentes de la molécula:

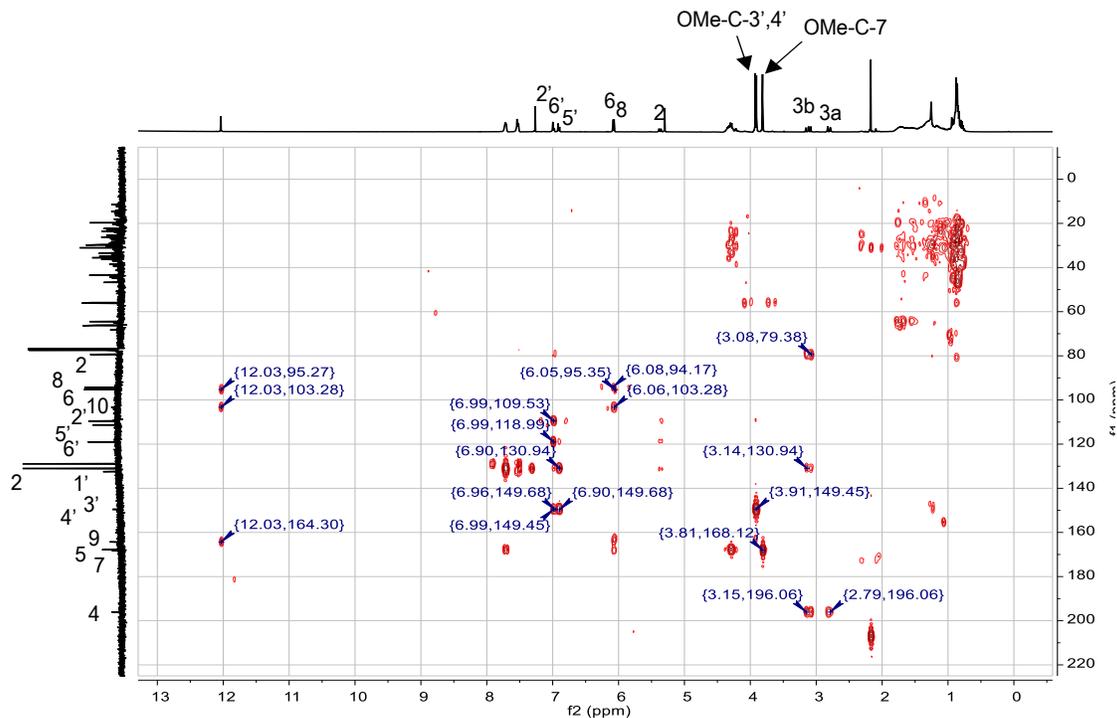


Espectro 10. RMN ^{13}C de 3',4',7-trimetoxi-eriodictiol (47), 100 MHz, CDCl_3 .

Así mismo se asignó por correlaciones de HSQC y HMBC (espectro RMN 11 y 12); las asignaciones se muestran en la tabla 21.



Espectro 11. RMN HSQC de 3', 4', 7-trimetoxi-eriodictiol (47), 400 MHz, CDCl₃.



Espectro 12. RMN HMBC de 3',4',7-trimetoxi-eriodictiol (47), 400 MHz, CDCl₃.

Tabla 21. Datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear comparando datos experimentales con los datos previos reportados para 3',4',7-Trimetoxi-eriodictiol (47).

3',4',7-Trimetoxi-eriodictiol (47)					
#	Datos experimentales CDCl ₃			Datos Reportados C ₆ D ₆ ⁴⁰	
	¹³ C 100 MHz	¹ H 400 MHz	HMBC	¹³ C 100 MHz	¹ H 400 MHz
	δ ppm	δ ppm (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento)			δ ppm (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento)
-OH		12.03 (1H, s)	95.3, 103.3, 167.8		12.91 (1H, brs)
2	79.3	5.37 (1H, dd, <i>J</i> =3.0 13.0)	109.5, 119.0, 130.9	79.7	4.76 (1H, dd, 13.1, 2.9 Hz)
3	43.4	3.12 (1H, dd, <i>J</i> =13.0, 17.1 Hz)	79.4, 130.9, 196.1	43.9	2.62 (1H, dd, 17.1, 13.1 Hz)
		2.76 (1H, dd, <i>J</i> =3.0, 17.1 Hz)	196.1		2.39 (1H, dd, 17.1, 2.9 Hz)
4	196.1			196.6	
5	167.8			165.7	
6	95.3	6.08 (1H, dd, <i>J</i> =2.31 Hz)	94.4, 103.3, 167.8, 168.1	95.6	6.25 (1H, d, 2.2 Hz),
7	168.1			168.6	
8	94.4	6.07 (1H, dd, <i>J</i> =2.31 Hz)	95.3, 103.3, 164.3, 168.1	94.9	6.16 (1H, d, 2.2 Hz)
9	164.3			163.7	
10	103.3			104.2	
1'	130.9			131.8	
2'	109.5	6.99 (1H, d, <i>J</i> =2.1 Hz)	119.0, 149.4	111.0	6.69 (1H, d, 2 Hz)
3'	149.4			150.8	
4'	149.7			150.6	
5'	111.3	6.91 (1H, d, <i>J</i> =8.8 Hz)	119.0, 130.9, 149.7	112.2	6.52 (1H, d, 8.8 Hz)

6'	119.0	6.98 (1H, dd, J=2.1, 8.8 Hz)	109.5, 130.9, 149.7	119.4	6.68 (1H, dd, 9.2 Hz)
OMe	55.8	3.81 (1H, s)	168.1	55.4	3.07 (3H, s)
OMe	56.1	3.91 (1H, s)	149.4	55.9	3.40 (3H, s)
OMe	56.1	3.93 (1H, s)	149.7	55.9	3.36 (3H, s)

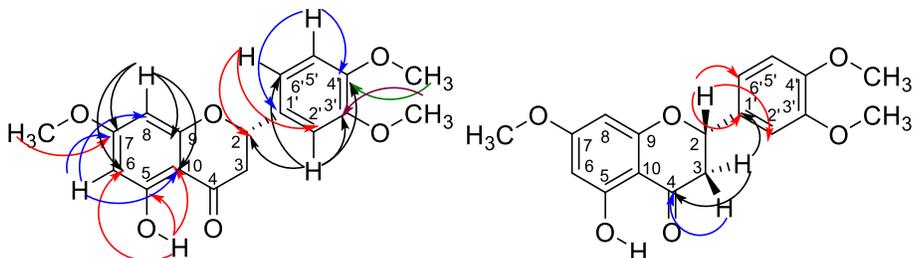
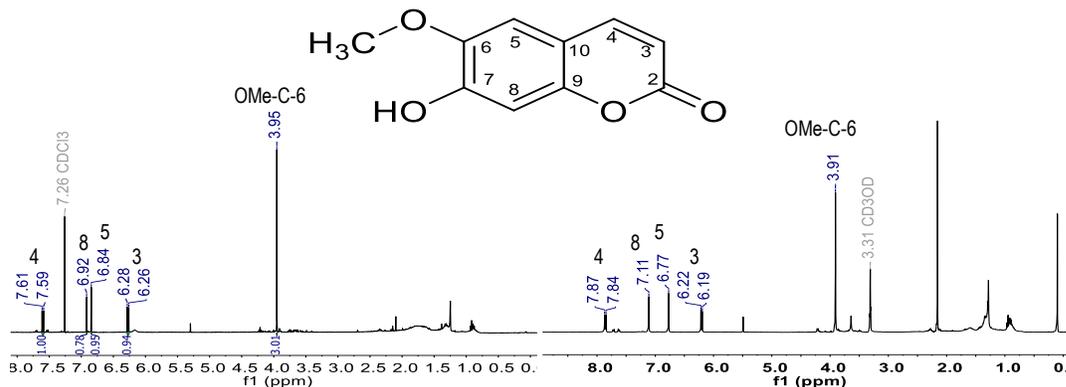


Ilustración 21. Correlaciones HMBC para 3',4',7-Trimetoxi-eriodictiol (47).

12.1.4 Escopoletina (58).

La muestra BAG02-23 se analizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, obteniendo como compuesto principal a la cumarina escopoletina, lo cual se corroboró con el espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C .



Espectro 13. RMN ^1H correspondiente a escopoletina (58), 400 MHz, CDCl_3 (izquierda) y CD_3OD (derecha).

El espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H (espectro RMN 13, obtenido en CDCl_3) se puede dividir en dos zonas, la de los hidrógenos aromáticos y los de base de oxígeno. En la zona de aromáticos se observa una señal doble en 7.60 ppm que integra para un hidrógeno y presenta una constante de acoplamiento de 9.5 Hz, misma que comparte con la señal doble que integra para un hidrógeno y que se

encuentra en 6.27 ppm, por las constantes de acoplamiento presentadas y la diferencia entre los desplazamientos químicos se puede inferir que se trata de un compuesto α - β insaturado *cis*, información que se puede corroborar por la presencia de los carbonos vinílicos en 113.6 y 143.4 ppm (espectro RMN 14) y la presencia de un grupo carbonilo en 161.5 ppm cuyo desplazamiento hace inferir que se trata de un carbonilo de éster.

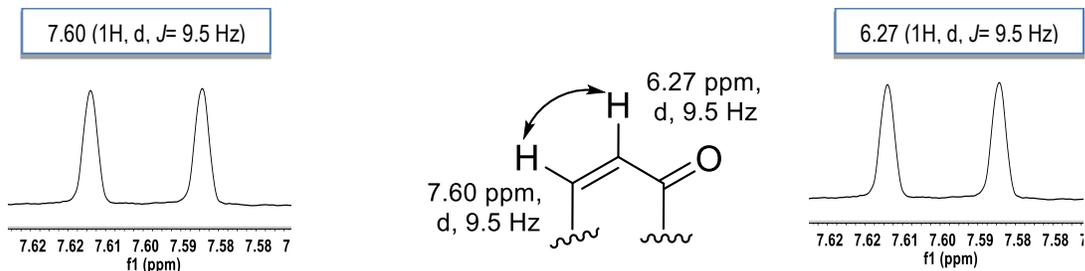


Ilustración 22. Expansión de las señales dobles identificadas en el espectro 13 ^1H obtenido en CDCl_3 .

Adicionalmente, en el espectro de hidrógeno se encuentran dos señales simples cada una integra para 1 hidrógeno en los desplazamientos de 6.92 y 6.84 ppm, lo que indica que son hidrógenos aromáticos que se encuentran en relación *para* uno con respecto del otro.

Por último, en 3.95 ppm se encuentra una señal simple que integra para 3 hidrógenos, es decir es un $-\text{CH}_3$ que por la frecuencia a la que se observa se trata de un metoxilo.

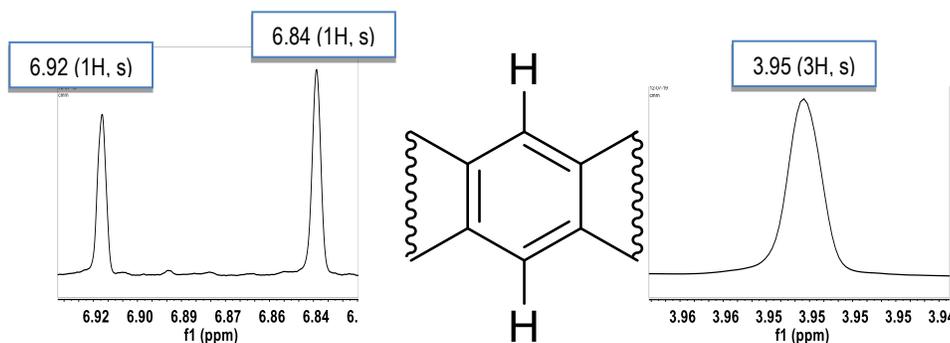
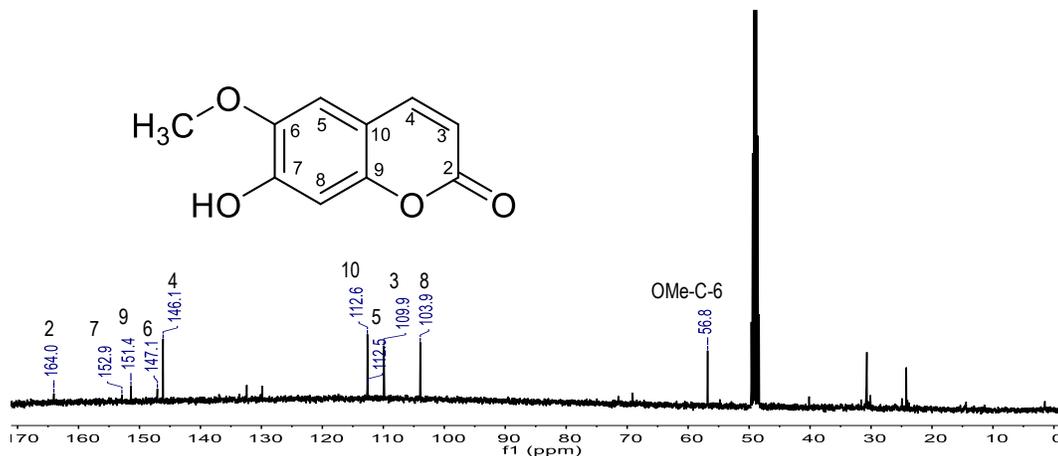
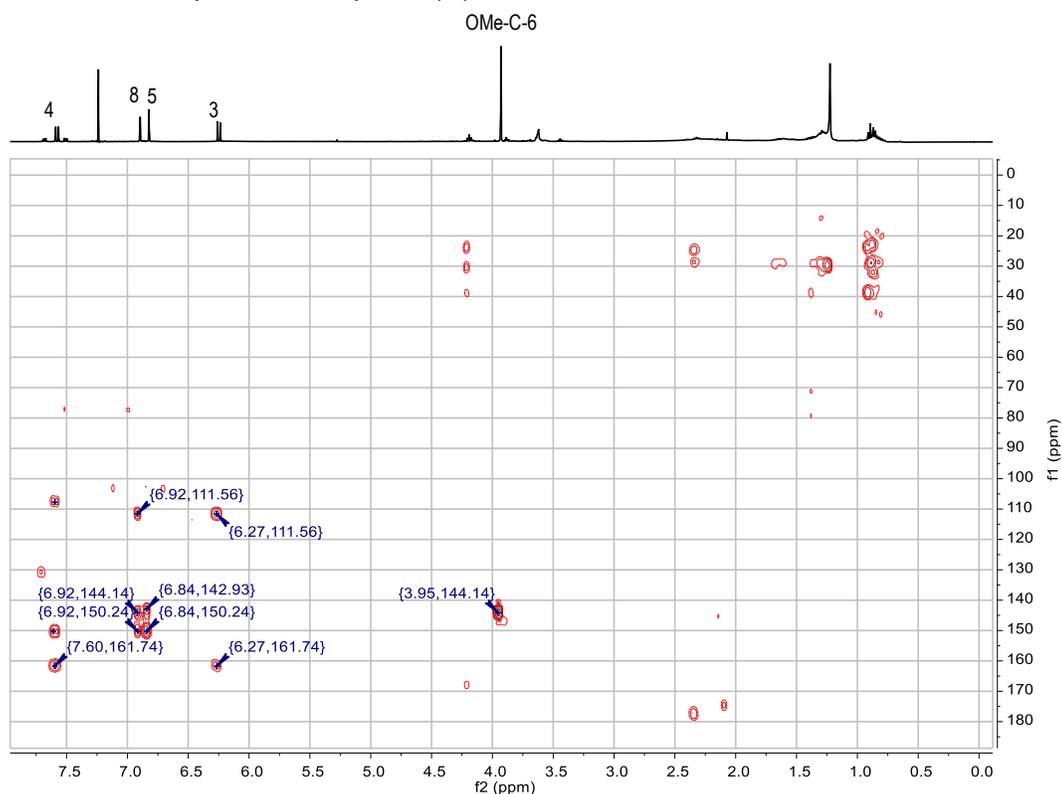


Ilustración 23. Expansión de las señales simples del espectro 13 RMN ^1H obtenido en CDCl_3 , de las cuales dos de ellas corresponden a hidrógenos pertenecientes a un anillo aromático (6.92, 6.84 ppm) y la otra corresponde a un metoxilo (3.95 ppm).

En el espectro de ^{13}C (espectro RMN 14) se logró identificar los carbonos correspondientes para escopoletina, y por medio del experimento HMBC (espectro RMN 15) se asignaron los hidrógenos y carbonos correspondientes.



Espectro 14. RMN ^{13}C correspondiente a escopoletina (58), 100 MHz, CD_3OD .



Espectro 15. RMN HMBC correspondiente a escopoletina (58), 400 MHz, CDCl_3 .

A continuación, se muestran las correlaciones del experimento HMBC y una tabla con los datos experimentales y reportados de ^1H , ^{13}C :

Tabla 22. Comparación de los datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear obtenidos experimentalmente y con los datos previos reportados para escopoletina (58).

Escopoletina (58)									
#C	Reportados ¹ H CD ₃ OD 700 MHz, ¹³ C 175 MHz ⁴¹		Experimentales ¹ H CD ₃ OD 400 MHz, ¹³ C 100 MHz		Reportados ¹ H CDCl ₃ 400 MHz, ¹³ C 100 MHz ⁴²		Experimentales ¹ H CDCl ₃ 400 MHz, ¹³ C 100 MHz		HMBC
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	
2	164.2		164.0		162.6		161.5		
3	112.8	6.18	109.9	6.20 (1H, d, J = 9.2 Hz)	108.1	6.20 (1H, d, J = 9.2 Hz)	113.6	6.27 (1H, d, J = 9.46 Hz)	111.5, 161.5
4	146.3	7.84	146.1	7.86 (1H, d, J = 9.2 Hz)	144.2	7.70 (1H, d, J = 9.2 Hz)	143.4	7.60 (1H, d, J = 9.46 Hz)	107.7, 150.2, 161.5
5	110.1	7.10	112.5	6.77 (1H, s)	111.6	6.80 (1H, s)	107.7	6.84 (1H, s)	111.5, 144.1, 150.2
6	147.2		147.1		145.3		144.1		
7	153.1		152.9		151.0				
8	104.1	6.75	103.9	7.11 (1H, s)	102.9	6.90 (1H, s)	103.2	6.92 (1H, s)	143.4, 150.2
9	151.6		151.4		149.8		150.2		
10	112.7		112.5		110.9		111.5		
OMe	56.9	3.88	56.8	3.91 (3H, s)	55.8	3.88 (3H, s)	56.5	3.95 (3H, s)	144.1

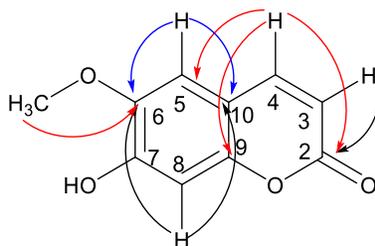


Ilustración 24. Correlaciones HMBC para Escopoletina (58).

12.1.5 Ácido *p*-cumárico (62).

En el espectro de resonancia de la muestra con clave BAG02-011, en un desplazamiento de 7.61 ppm se observa una señal doble que integra para un hidrógeno y tiene una constante de acoplamiento de 15.9 Hz, está constante de acoplamiento la comparte con la señal doble en 6.29 ppm, la cual también integra para un hidrógeno. La diferencia en desplazamiento químico indica la presencia de un sistema vinílico α - β insaturado *trans*.

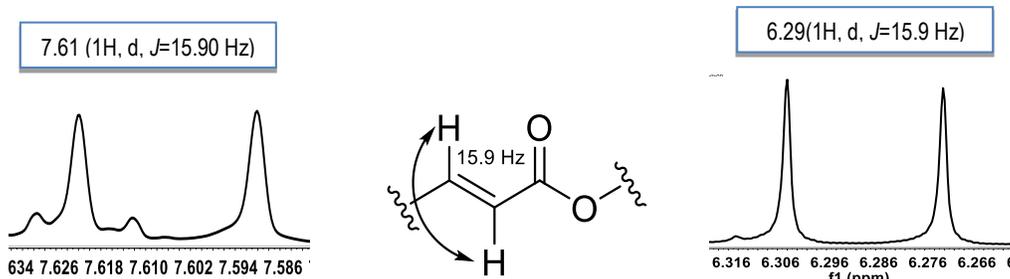


Ilustración 25. Expansión de las señales dobles con constante de acoplamiento *trans*.

También, en un desplazamiento de 7.42 ppm se encuentra otra señal doble que integra para dos hidrógenos y presenta una constante de acoplamiento de 8.7 Hz la cual comparte con la señal en 6.77 ppm que también integra para dos hidrógenos, esto da una clara idea de que es un sistema A_2B_2 de un sistema aromático que está conjugado con el sistema α , β insaturado.

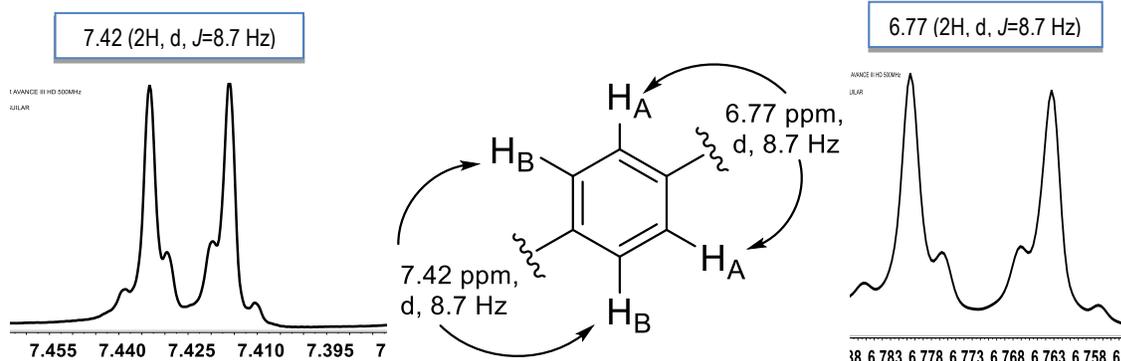
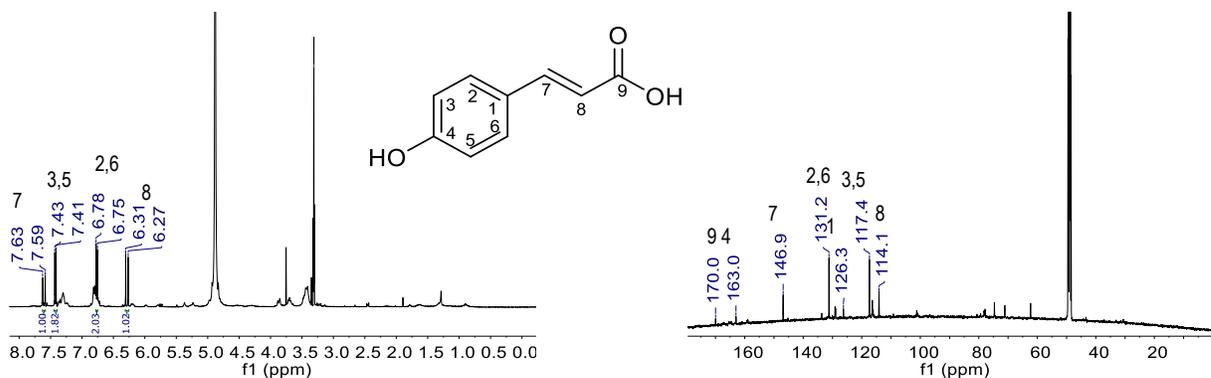


Ilustración 26. Expansión de las señales con constante de acoplamiento *ortho*.



Espectro 16. RMN ^1H del ácido *p*-E-cumárico (62), 400 MHz, CD_3OD

Espectro 17. RMN ^{13}C del ácido *p*-E-cumárico (62), 100 MHz, CD_3OD .

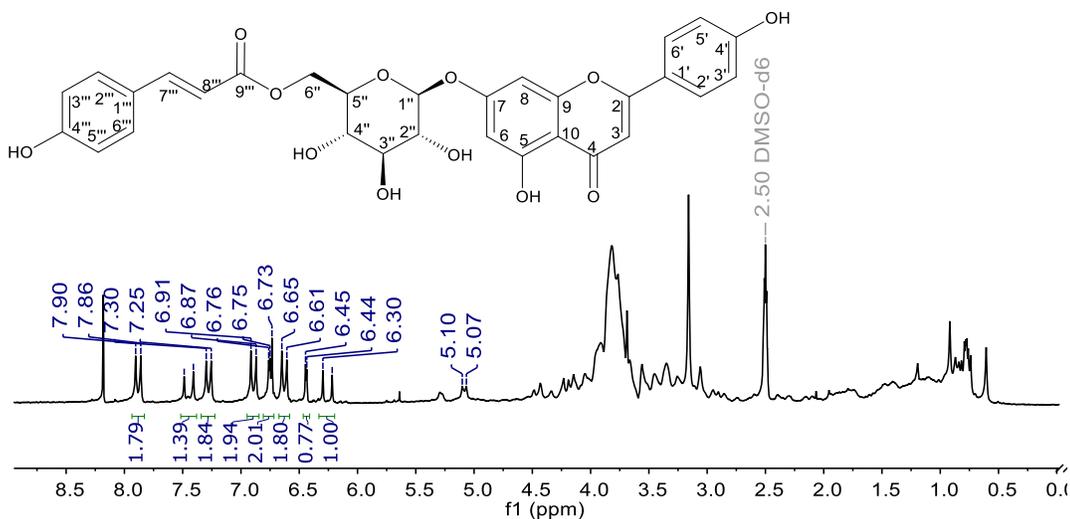
Debido al patrón de sustitución del anillo aromático se propone la estructura del ácido *p*-cumárico la cual se corrobora con los datos de ^{13}C (espectro RMN 13) comparados con los que se encuentran en la literatura en la siguiente tabla:

Tabla 23. Datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear para el ácido *p*-Cumárico (62).

Ácido <i>p</i> -Cumárico (62)				
#	Experimentales		Reportados ⁴³	
	^{13}C 100 MHz, CDCl_3 , (ppm)	^1H 400 MHz, CDCl_3 , δ ppm (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento)	^{13}C 100 MHz, DMSO- d_6 , (ppm)	^1H 400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento)
1	126.25	---	125.36	---
2, 6	131.2	6.77 (2H, d, $J=8.7$ Hz)	130.17	7.49
3, 5	117.4	7.42 (2H, d, $J=8.7$ Hz)	115.83	6.79
4	163.0	---	159.67	---
7	146.9	7.61 (1H, d, $J=15.90$ Hz)	144.27	7.52
8	114.1	6.29 (1H, d, $J=15.9$ Hz)	115.41	6.29
9	170.0	---	168.05	---
10	---	---	---	12.13

12.1.6 7-O-(6''-*p*-E-cumaroil)- β -D-glucósido de apigenina (39).

Para el espectro de resonancia magnética nuclear de la muestra con clave BAG02-008 y para la muestra BAG02-036 se observa el mismo patrón de sustitución para el espectro de hidrógeno, sin embargo, para BAG02-008 no se logró obtener un espectro de ^{13}C , por lo que se describen los datos espectroscópicos para la muestra BAG02-036:



Espectro 18. RMN ^1H de 7-O-(6''-*O*-*p*-E-cumaroil)- β -D-glucósido de apigenina (39), 200 MHz, DMSO- d_6 .

Se puede observar en el espectro de ^1H (espectro 18) que en un desplazamiento de 7.85 ppm se encuentra una señal doble con una integral para dos hidrógenos y una constante de acoplamiento de 8.5 Hz que es compartida con la señal en 6.89 ppm, esto indica constantes de acoplamiento en relación *orto*, en conjunto, estas señales son características para un sistema A_2B_2 por lo que corresponde a un anillo aromático disustituido en relación *para*.

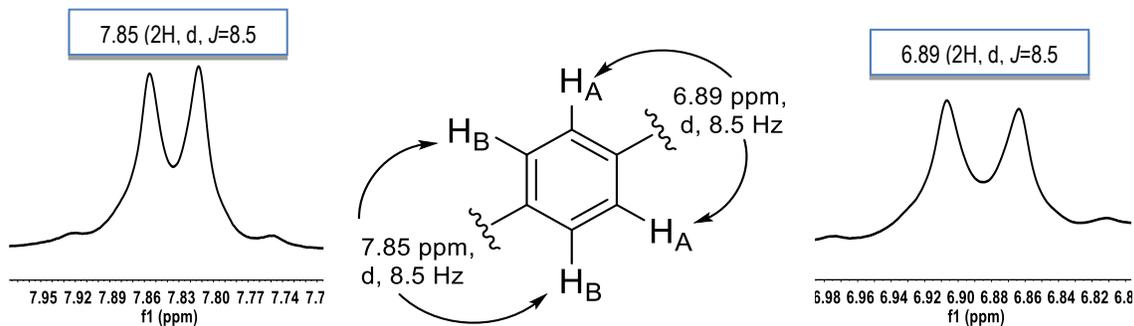


Ilustración 27. Expansión de las señales en un desplazamiento químico de 7.85 y 6.89 ppm, correspondientes a un sistema de espines en relación *para*.

La siguiente señal en el espectro se observa en un desplazamiento de 7.42 ppm, es una señal doble con integral para un hidrógeno y con una constante de acoplamiento de 15.9 Hz, esto nos indica que corresponde a un sistema vinílico *trans*, así, esta misma constante de acoplamiento se presenta nuevamente en la señal doble en 6.25 ppm y que integra para un hidrógeno. Por la diferencia de desplazamiento se deduce que corresponde a un sistema vinílico α, β insaturado conjugado con un grupo carbonilo.

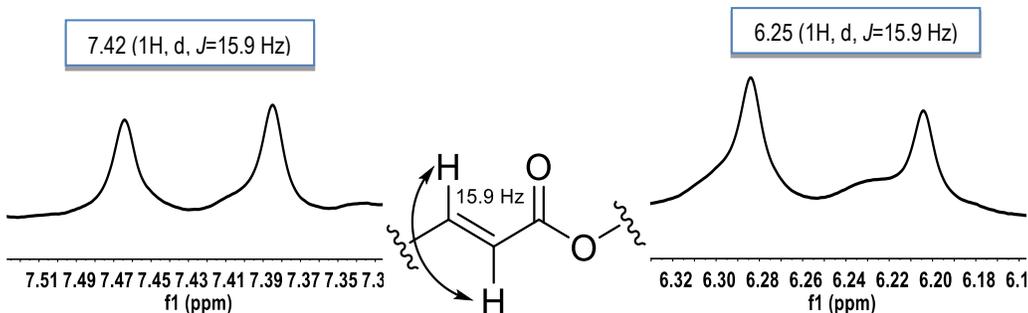


Ilustración 28. Expansión de las señales en un desplazamiento químico de 7.42 y 6.25 ppm, correspondientes a un sistema de espines en relación *trans*.

Continuando con las señales del espectro de resonancia magnética nuclear para este compuesto se encuentra una señal en 7.25 ppm, su multiplicidad es doble, integra para dos hidrógenos y presenta una constante de acoplamiento *orto* de 8.4 Hz que se acopla con otra señal doble en 6.61 ppm cuya integral es para dos hidrógenos, es decir corresponde a un sistema aromático di sustituido en posición *para* como se muestra en la siguiente ilustración:

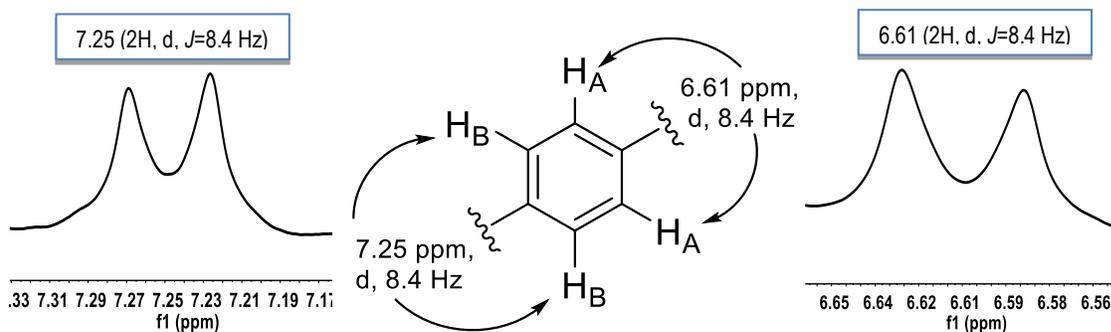


Ilustración 29. Expansión de las señales en un desplazamiento químico de 7.25 y 6.61 ppm, correspondientes a un sistema de espines en relación *para*.

En un desplazamiento de 6.76 y 6.44 ppm se identifica un sistema de espines aromático AB, las cuales son señales dobles que integran para un hidrógeno cada una y comparten una constante de acoplamiento de 2.1 Hz, estas señales se observan anchas, sin definirse propiamente los picos de la señal, sin embargo, se puede

encontrar la J , esto quiere decir que se trata de un anillo aromático tetrasustituido con dos hidrógenos en relación *meta* lo cual es característico en la sustitución del anillo **A** en flavonoides.

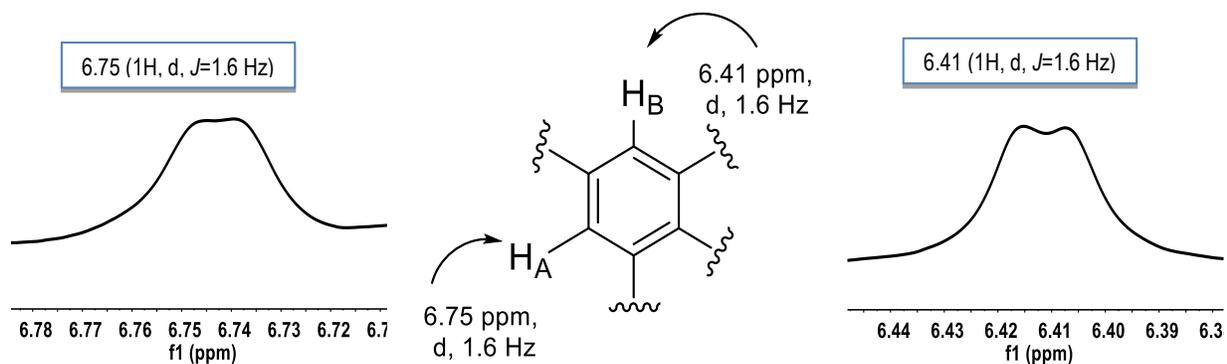


Ilustración 30. Expansión de las señales en un desplazamiento químico de 6.75 y 6.41 ppm, correspondientes a un sistema de espines en relación *meta*.

Otra señal de importancia es la observada en 5.10 ppm que es característica para un hidrógeno anómero de glucosa y por la constante de acoplamiento se trata del anómero β , por lo que se puede decir que las partes que componen la molécula son: apigenina, ácido *p*-cumárico y una glucosa.

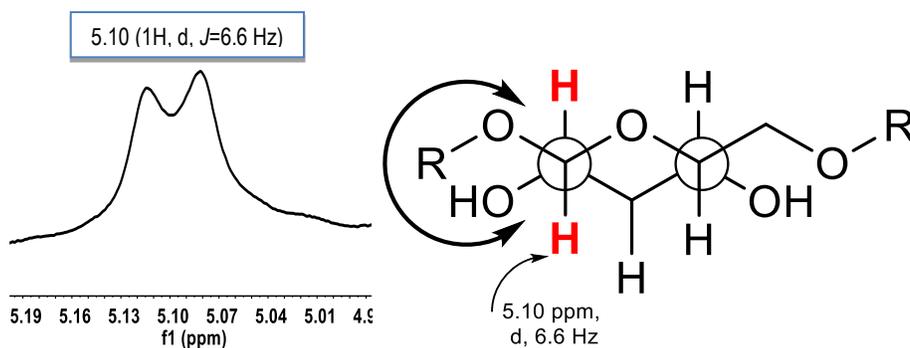


Ilustración 31. Expansión de la señal en un desplazamiento químico de 5.10 ppm.

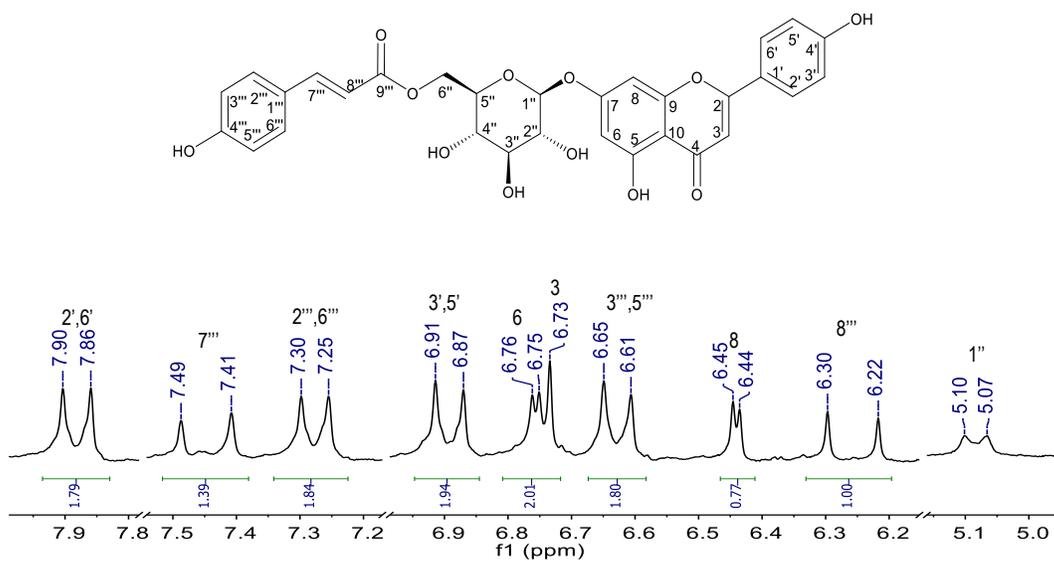
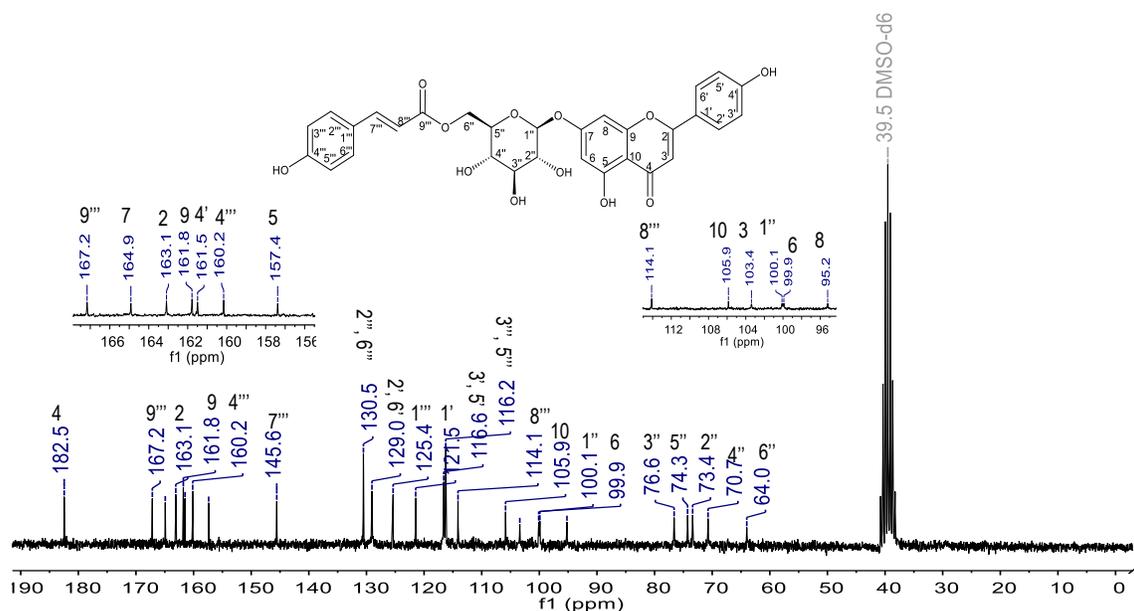


Ilustración 32. Expansión de las señales más representativas del espectro 18.

En lo que respecta al espectro de ¹³C (espectro 20) se pueden observar un total de 26 señales, de estas se encuentran dos señales en 182.5 y 167.2 ppm, que corresponden a carbonos de carbonilo, siendo el más desplazado la señal correspondiente al C-4 de 7-O-(6''-O-p-E-cumaroil)-β-D-glucósido de apigenina (39) y el de 167.2 ppm correspondiente al C-9'''. Las señales que se encuentran entre 164.9-157.4 corresponden a carbonos que pertenecen a sistemas aromáticos y además son base de oxígeno, siendo estas un total de seis señales que corresponden a los carbonos en la estructura que presentan estas características. Posteriormente se encuentran señales entre 145.6 y 95.2 donde podemos encontrar las señales correspondientes a metinos y carbonos cuaternarios que pertenecen a sistemas aromáticos. Otras señales de importancia que nos ayudan a corroborar la estructura propuesta es la señal que se encuentra en 100.1 ppm que es característico para un carbono que está siendo afectado por un efecto anomérico, en este caso pertenece a una glucosa ya que se pueden encontrar los carbonos restantes que son carbonos alifáticos bases de oxígeno entre 76.6 y 64.0 ppm. A continuación, se muestra el espectro de ¹³C:

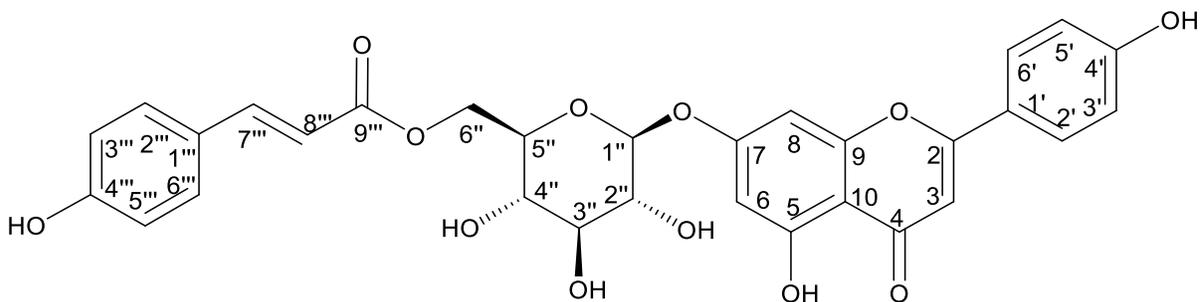


Espectro 19. RMN ^{13}C de 7-O-(6''-O-p-E-cumaroil)- β -D-glucósido de apigenina (39), 50 MHz, DMSO- d_6 .

Tabla 24. Datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear para 7-O-(6''-O-p-E-cumaroil)- β -D-glucósido de apigenina (39).

7-O-(6''-O-p-E-cumaroil)- β -D-glucósido de Apigenina (39)				
#	Experimentales		Reportados ⁴⁴	
	^{13}C 50 MHz, DMSO- d_6 , (ppm)	^1H 200 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento)	^{13}C JEOL FX- 100, DMSO- d_6 , (ppm)	^1H JEOL JNM PS-100, DMSO- d_6 , δ ppm (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento)
Apigenina				
2	163.1		162.7	
3	103.4	6.69 (1H, s)	103.0	6.80 (1H, s)
4	182.5		181.9	
5	157.4		156.8	
6	99.9	6.75 (1H, d, $J=1.6$ Hz)	99.5	6.84 (1H, d, $J=2$ Hz)
7	164.9		164.3	
8	95.2	6.41 (1H, d, $J=1.6$ Hz)	94.7	6.48 (1H, d, $J=2$ Hz)
9	161.8		161.3	
10	105.9		105.3	
1'	121.5		121.0	
2', 6'	129.0	7.85 (2H, d, $J=8.5$ Hz)	128.5	7.94 (2H, d, $J=9$ Hz)

4'	161.5		161.1	
3', 5'	116.6	6.89 (2H, d, $J=8.6$ Hz)	116.0	6.93 (2H, d, $J=9$ Hz)
Glucosa				
1''	100.1	5.10 (1H, d, $J=6.6$ Hz)	99.5	5.11 (1H, d, $J=6$ Hz)
2''	73.4		73.0	
3''	76.6		76.3	
4''	70.7		70.0	
5''	74.3		73.8	
6''	64.0		63.4	
Cumarato				
1'''	125.4		124.9	
2''', 6'''	130.5	7.25 (2H, d, $J=8.5$ Hz)	131.7	7.34 (2H, d, $J=8.4$ Hz)
3''', 5'''	116.2	6.61 (2H, d, $J=8.5$ Hz)	115.7	6.68 (2H, d, $J=8.4$ Hz)
4'''	160.1		159.7	
7'''	145.6	7.42 (1H, d, $J=15.9$ Hz)	144.9	7.50 (1H, d, $J=16$ Hz)
8'''	114.1	6.24 (1H, d, $J=15.9$ Hz)	113.7	6.32 (1H, d, $J=16$ Hz)
9'''	167.16		166.4	



Como se menciona en la parte de resultados, este compuesto se analizó por cromatografía de líquidos acoplado con detección de masas (Líquidos-Masas QTOF), utilizando como método de ionización ESI (ionización por electrospray) en modo positivo. Para la búsqueda del compuesto se utiliza el modo MS-MS (masas-masas) buscando específicamente el compuesto por fórmula y peso molecular ($C_{30}H_{26}O_{12}$, 578.1424 uma), por esta razón, el cromatograma presentado en la ilustración 2 solo presenta un pico. Adicionalmente en el espectro de masas obtenido (Ilustración 3) se muestra un ion pseudo molecular m/z

en 579.1955 [M+H]⁺ y además un aducto con sodio por lo que presenta un pico en *m/z* en 601.1275 [M+Na]⁺. Por lo tanto, los datos obtenidos por el espectro de masas con los picos *m/z* 579.1955 [M+H]⁺ y en 601.1275 [M+Na]⁺ concuerdan con el peso molecular de la estructura propuesta a partir del espectro de hidrógeno y carbono para el compuesto 7-O-(6''-*p*-*E*-cumaroil)-β-D-glucósido de apigenina (espectro 18 y 19, respectivamente).

El espectro de masas ESI⁺ (espectro 20) correspondiente a 7-O-(6''-*p*-*E*-cumaroil)-β-D-glucósido de naringenina (**39**) se observa la presencia de las siguientes fragmentaciones a partir de *m/z* 603 en: *m/z* 483 [M+Na-CH₁₂NaO₆]⁺, *m/z* 295 [M+Na-C₁₅H₁₆O₇]⁺ y *m/z* 174 [M+Na-C₂₃H₂₄NaO₈]⁺. Las fragmentaciones fueron obtenidas con energías de colisión de 20, 30 y 40. A continuación se representan algunas fragmentaciones identificadas para este compuesto:

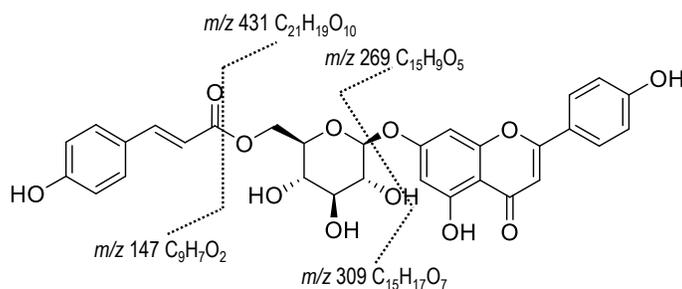
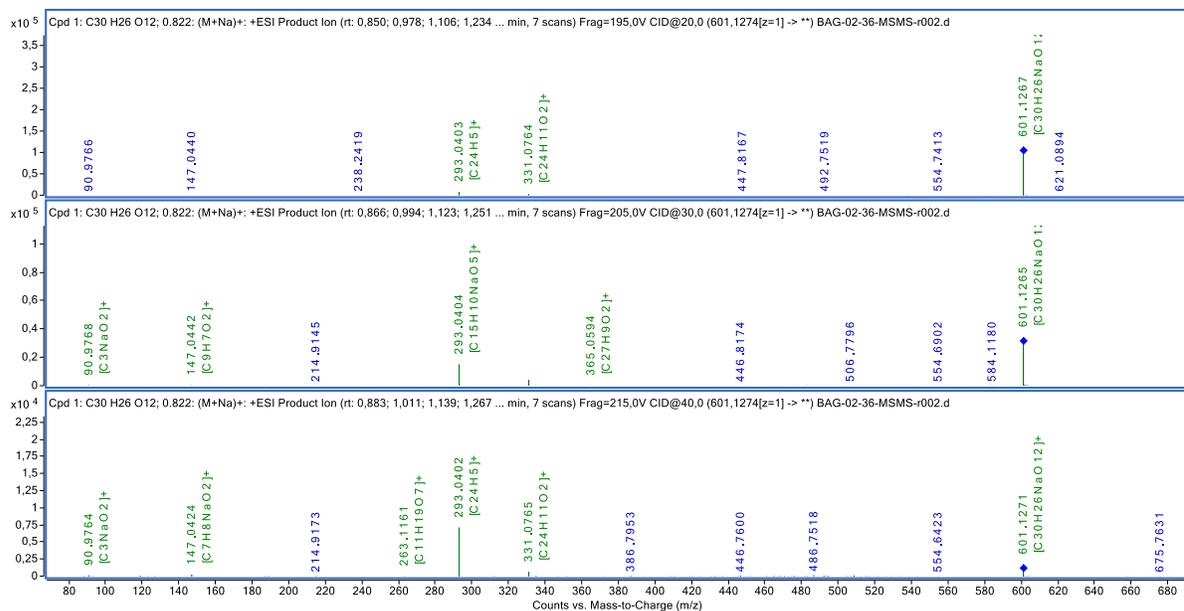


Ilustración 33. Principales fragmentaciones para 7-O-(6''-*p*-*E*-cumaroil)-β-D-glucósido de apigenina (**39**) por ESI⁺ C₃₀H₂₆O₁₂ (masa exacta calculada 578.1424).

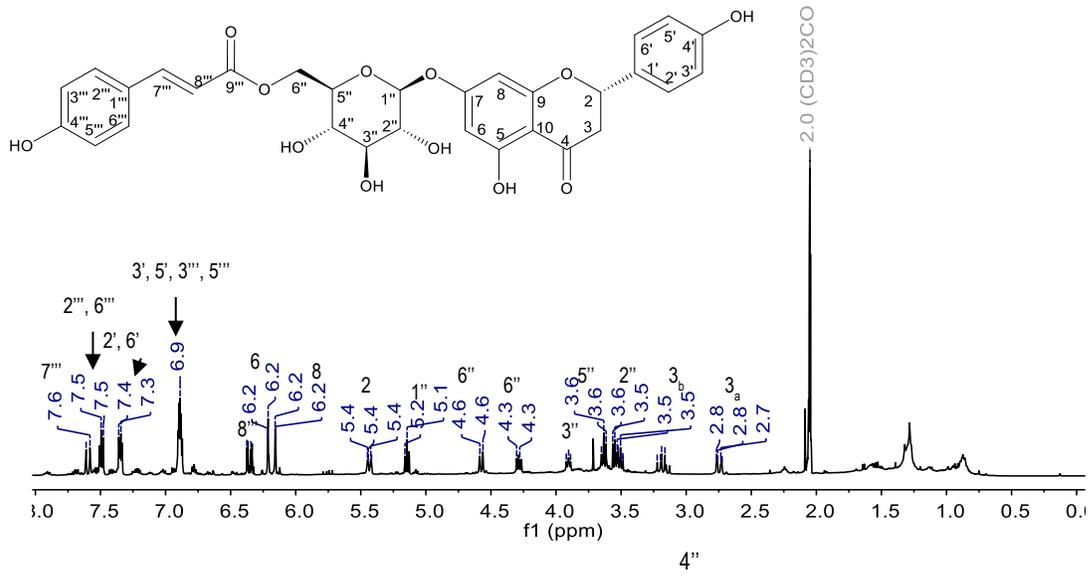
El fragmento en el pico *m/z* 293 [C₁₅H₁₀NaO₅]⁺, corresponde a la ruptura del enlace entre el oxígeno β del monosacárido y el carbono anomérico dando lugar al fragmento de 269 uma (C₁₅H₉O₅), el cual es observado como [M+H+Na]⁺; Adicionalmente se observa el ion en relación *m/z* 147 [C₉H₇O₂]⁺, que corresponde a la pérdida de 431 uma [M-C₂₁H₁₉NaO₁₀]⁺. Esto por la ruptura entre el enlace del C correspondiente al carbonilo del cumarato y el oxígeno con el cual está formando el ester.



Espectro 20. ESI⁺ de 7-O-(6''-O-p-cumaroyl)-β-D-glucósido de apigenina (39), obtenido en 3 energías de colisión 20, 30 y 40.

12.1.7 7-O-(6''-p-E-cumaroyl)-β-D-glucósido de naringenina (28).

Este compuesto se observó una sola mancha en CCF, por lo que se envió a RMN teniendo un comportamiento peculiar ya que en el espectro de RMN de ¹H y ¹³C se observa que las señales aparecen duplicadas, por lo que se sugirió inicialmente que se trataba de un conformero debido a que se empleó acetona como disolvente (espectro RMN 21), la cual tiene un ligero efecto de solvatación, por lo que tal vez estaría solvatando ambos conformeros de la molécula y así observar tal multiplicidad en las señales. Debido a ello se decidió cambiar de acetona a metanol como disolvente, pero se siguió observando el mismo comportamiento, inclusive aún más marcado en el ¹³C (espectro RMN 22).



Espectro 21. RMN ^1H de 7-O-(6''-O-*p*-E-cumaroil)- β -D-glucósido de naringenina (28), 50 MHz, Acetona- d_6 .

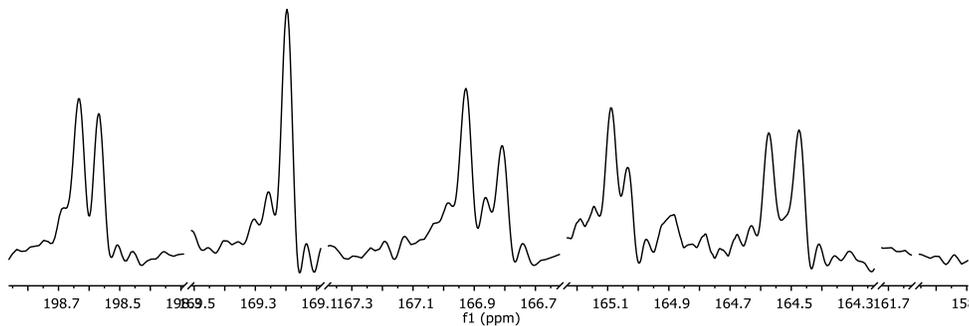


Ilustración 34. Algunas señales del espectro ^{13}C de 7-O-(6''-*p*-E-cumaroil)- β -D-glucósido de naringenina (28).

Como se continuó con este problema se decidió analizar esta muestra por HPLC con detector DAD utilizando una λ de 270 y 319 nm tomando como referencia lo reportado por Hideji Itokawa en 1981. La muestra se corrió utilizando un sistema isocrático agua-metanol 30:70, una temperatura de 35°C, un tiempo de corrida de 20 minutos y una inyección de 20 μL . A continuación, se muestran los cromatogramas obtenidos:

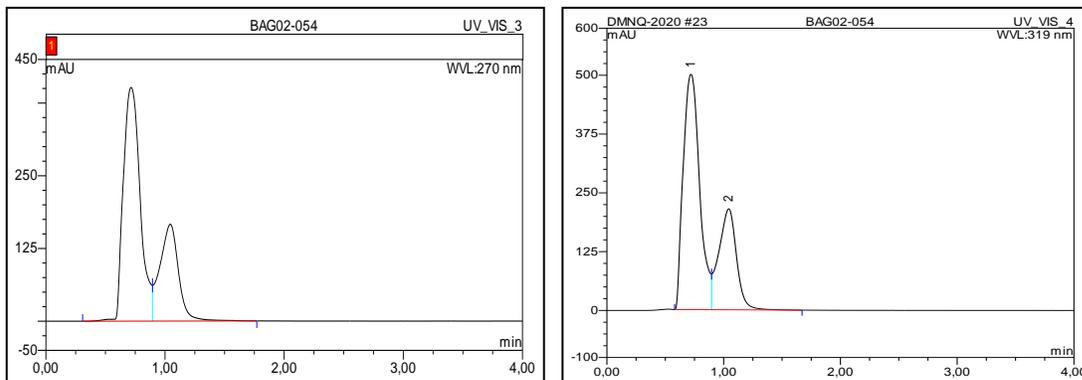


Ilustración 35. Cromatogramas obtenidos para la muestra BAG02-054, en los cuales se puede observar dos picos, es decir una mezcla de dos compuestos.

Se puede observar en ambos cromatogramas tanto a 270 nm (primer cromatograma) como a 319 nm dos picos, es decir dos compuestos por lo que lo observado en RMN respecto a la multiplicidad de las señales confirma la presencia de dos compuestos. Por ello se decide purificar la muestra por HPLC semipreparativo como se indica en la parte experimental. De tal proceso se obtuvieron los siguientes resultados:

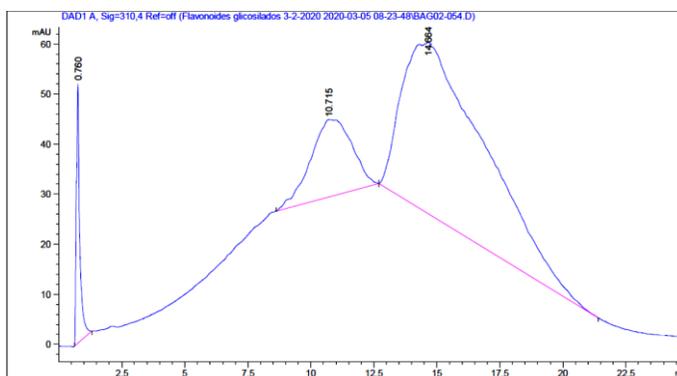


Ilustración 36. Cromatograma de la muestra procesada en el cromatógrafo de líquidos semipreparativo, observando dos picos, los cuales fueron colectados por separado.

Tabla 25. Resultados obtenidos del proceso cromatográfico procesando, la muestra BAG02-054.

```

=====
                          Area Percent Report
=====

Sorted By           :      Signal
Multiplier          :      1.0000
Dilution            :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=310,4 Ref=off

Peak RetTime Type   Width      Area      Height      Area
#   [min]           [min]   [mAU*s]    [mAU]       %
----|-----|-----|-----|-----|-----|
  1   0.760 BB      0.1236  479.24060  51.95467   4.6509
  2  10.715 BB     1.3767 1759.68835  15.45084  17.0773
  3  14.664 BB     2.7769 8065.32764  34.30492  78.2718

Totals :                      1.03043e4  101.71043

```

Se puede observar en la tabla 25 que se detectaron 3 compuestos de los cuales los compuestos más abundantes corresponden a los identificados en el pico 2 y pico 3 con porcentajes de área de 17.0773 y 78.2718 respectivamente. El compuesto 3 es el más retenido por la columna ya que comienza a ser detectado en el minuto 14.664, también es el compuesto mayoritario de la muestra, con un porcentaje de área de 78.2718 %.

Los siguientes espectros que corresponden al análisis realizado por RMN al recuperado de colectar los picos 2 y 3 respectivamente, se observa que el primer espectro muestra señales adicionales a las que se tenían en la mezcla original, es decir contaminantes con respecto al compuesto mayoritario; mientras que en el caso del espectro correspondiente al pico 3 se observa una mayor pureza ya que las señales se pueden observar más definidas y al contrario que el espectro del pico 2, no se observan señales ruido.

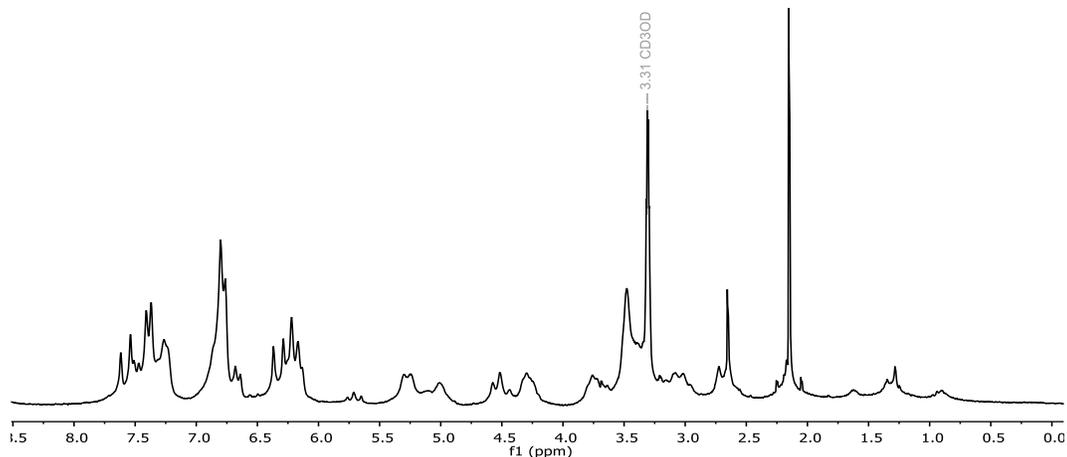


Ilustración 37. Espectro de resonancia magnética nuclear en CD₃OD 200 MHz de ¹H correspondiente al pico 2 mostrado en la ilustración 14, se observa que las señales no se encuentran definidas para un solo compuesto.

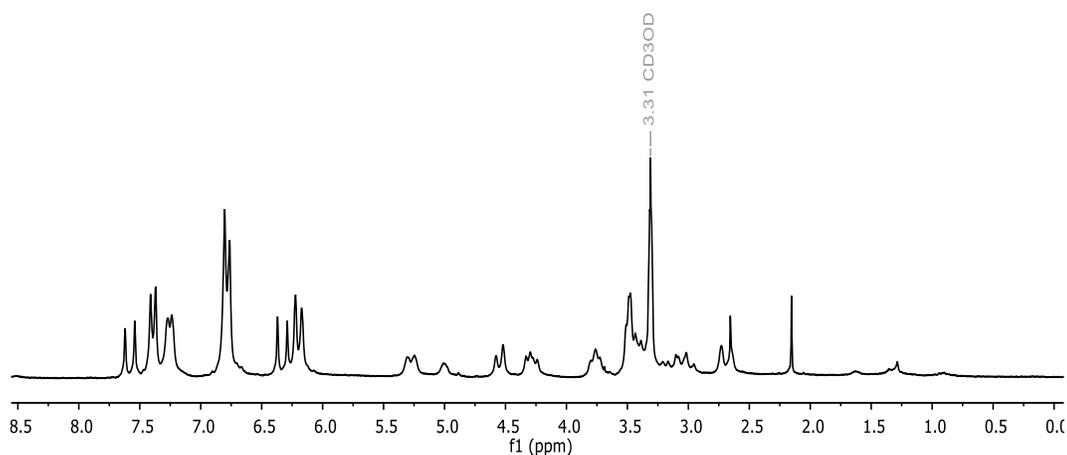


Ilustración 38. Espectro de resonancia magnética nuclear en CD₃OD 200 MHz de ¹H correspondiente al pico 3 mostrado en la ilustración 14, observando que las señales se encuentran definidas y que pueden ser asignadas para un compuesto.

Así, del análisis del espectro 21 de resonancia magnética nuclear de ¹H se observan las señales que se describen a continuación.

En un desplazamiento químico de 7.60 ppm se encuentra una señal doble que integra para un hidrógeno con una constante de acoplamiento de 15.90 Hz, la cual se comparte con la señal doble en 6.35 ppm que también integra para un hidrógeno. Esto nos indica la presencia de un sistema α - β insaturado con geometría *trans* conjugado con un grupo carbonilo como se muestra en la siguiente ilustración:

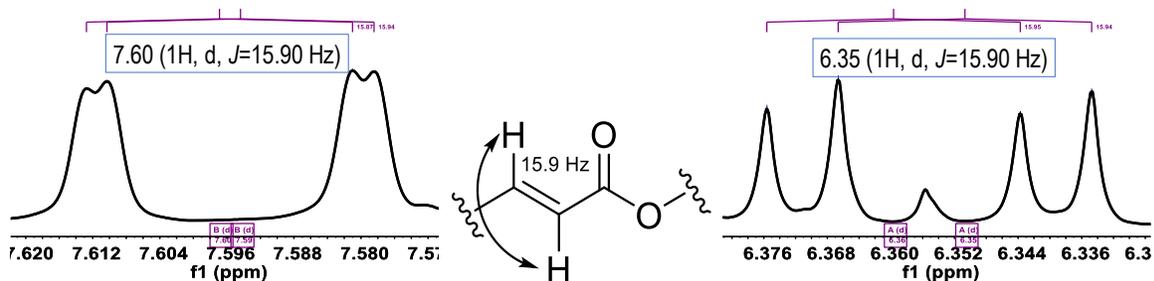
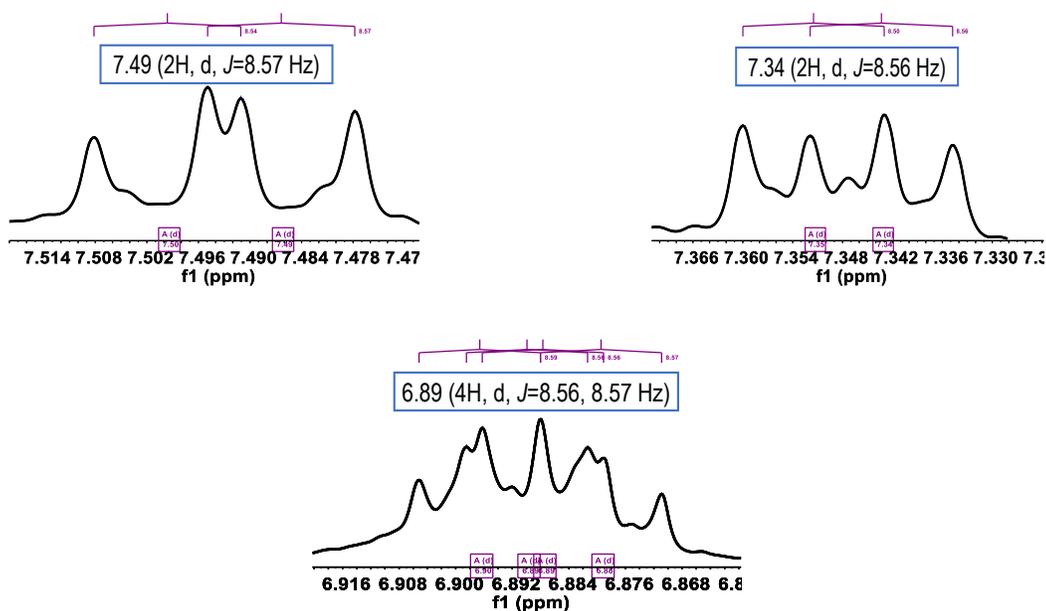


Ilustración 39. Expansión de las señales en 7.60 y 6.35 ppm del espectro 21 ¹H de RMN.

En un desplazamiento químico de 7.49 ppm se encuentra una señal doble que integra para dos hidrógenos con una constante de acoplamiento de 8.6 Hz (*orto*), en 6.89 ppm se observa una señal múltiple que integra para 4 hidrógenos, lo que indica que en este desplazamiento químico se encuentran al menos dos señales que aparecen casi a la misma frecuencia, de ella se pudo determinar que existe una señal doble que comparte la constante de acoplamiento mencionada de 8.6 Hz con la señal de 7.49 previamente descrita. Por otra parte, también se observa una señal doble con una integral de 2H en 7.34 ppm y cuya constante de acoplamiento es de 8.5 Hz, la cual se comparte con la señal compleja centrada en 6.89 ppm. Por las características que presentan estas señales se trata de dos sistemas aromáticos *para* sustituidos, es decir dos sistemas A₂B₂ en las cuales la señal en 6.89 ppm corresponde a los hidrógenos 3 y 5 para ambos sistemas aromáticos, mientras que las otras dos señales (7.49 y 7.34 ppm) corresponden a los hidrógenos 2 y 6 de los sistemas aromáticos.



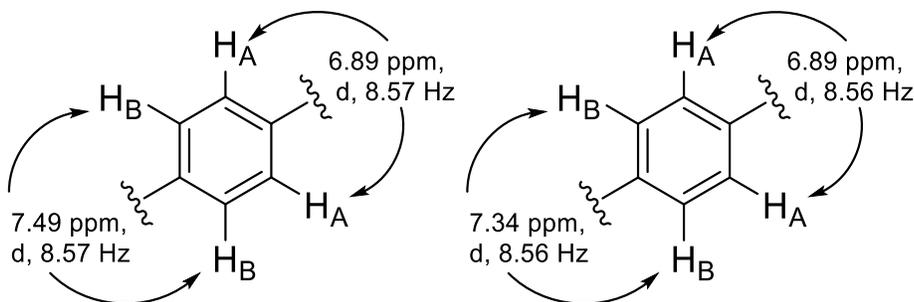


Ilustración 40. Ampliación de las señales del espectro ^1H de RMN y representación de los sistemas de espines.

Adicionalmente, se tiene una señal doble en 6.21 ppm que integra para un hidrógeno y presenta una constante de acoplamiento de 2.2 Hz lo que indica la presencia de un sistema AB en relación *meta* y su acoplamiento lo encontramos en la señal con desplazamiento químico de 6.16 ppm, una señal doble con J de 2.2 Hz. Estas señales corresponden a los hidrógenos 6 y 8 del anillo aromático **A** de un flavonoide.

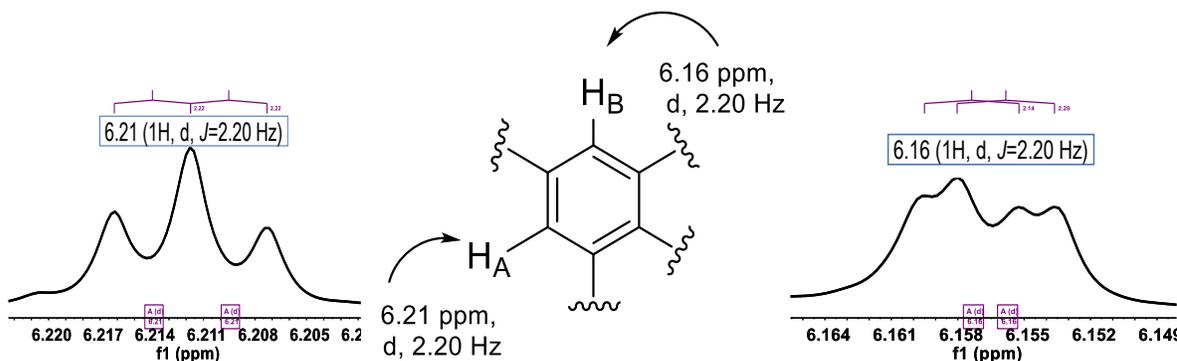


Ilustración 41. Expansión de las señales en 6.21 y 6.16 ppm correspondientes al espectro 2D RMN de ^1H , y representación de los sistemas AB.

A un desplazamiento químico de 5.44 ppm se encuentra una señal doble de doble, la cual integra para un hidrógeno y presenta las constantes de acoplamiento de 12.7 y 2.7 Hz; la constante de 12.7 Hz corresponde a un acoplamiento de tipo *axial-axial* o *anti* y este acoplamiento lo encontramos en la señal de 3.17 ppm, que es una señal doble de doble, integra para un hidrógeno y además presenta una segunda constante de acoplamiento de 17.1 Hz y que corresponde a un acoplamiento geminal con el hidrógeno en 2.75 ppm. La señal que se observa en 2.75 ppm corresponde a una señal doble de doble y presenta dos constantes de acoplamiento, una de 17.1 Hz y se acopla con el hidrógeno en 3.17 ppm, mientras que la segunda constante de acoplamiento de 2.7 Hz correspondiente al acoplamiento con el

hidrógeno en 5.44 ppm y es un acoplamiento de tipo *axial-ecuatorial* o *syn*, ya que el ángulo diedro que presentan estos dos hidrógenos es pequeño.

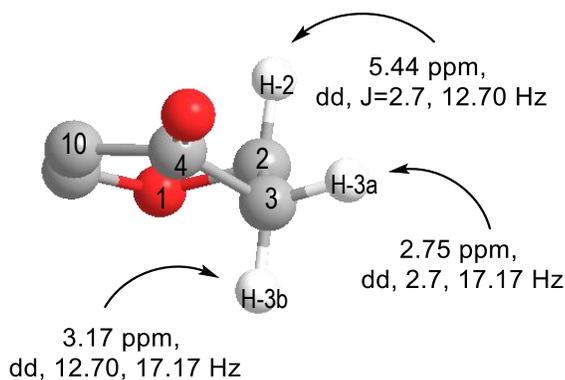
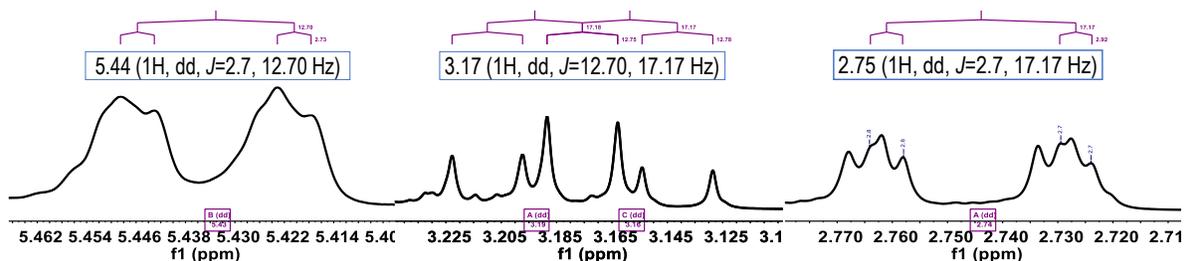


Ilustración 42. Expansión de las señales en 5.44, 3.17 y 2.75 ppm correspondientes al espectro 21 RMN ^1H y representación de un sistema de espines alifáticos.

También, se encuentran los hidrógenos base de oxígeno en un desplazamiento de 3.5 a 5.15 ppm, siendo el de desplazamiento de 5.15 ppm el hidrógeno anomérico, cuya constante de acoplamiento de 8 Hz corresponde a una relación *axial-axial* y por lo tanto corresponde a la β -D-glucosa:

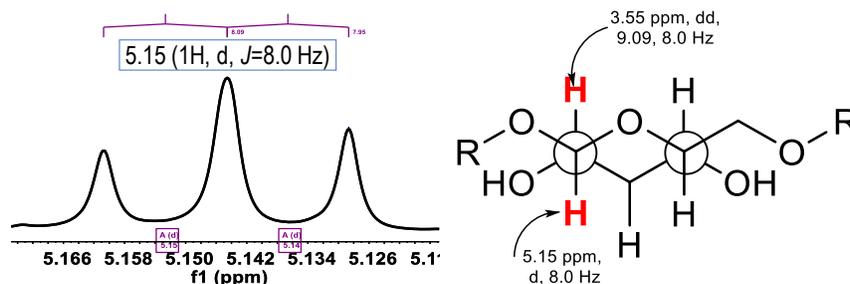
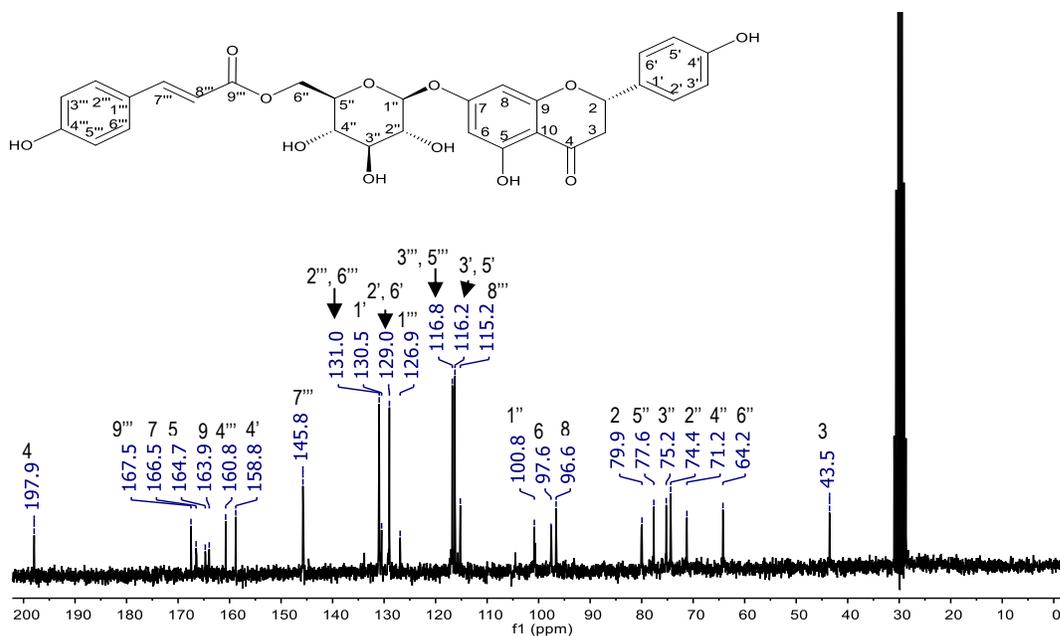


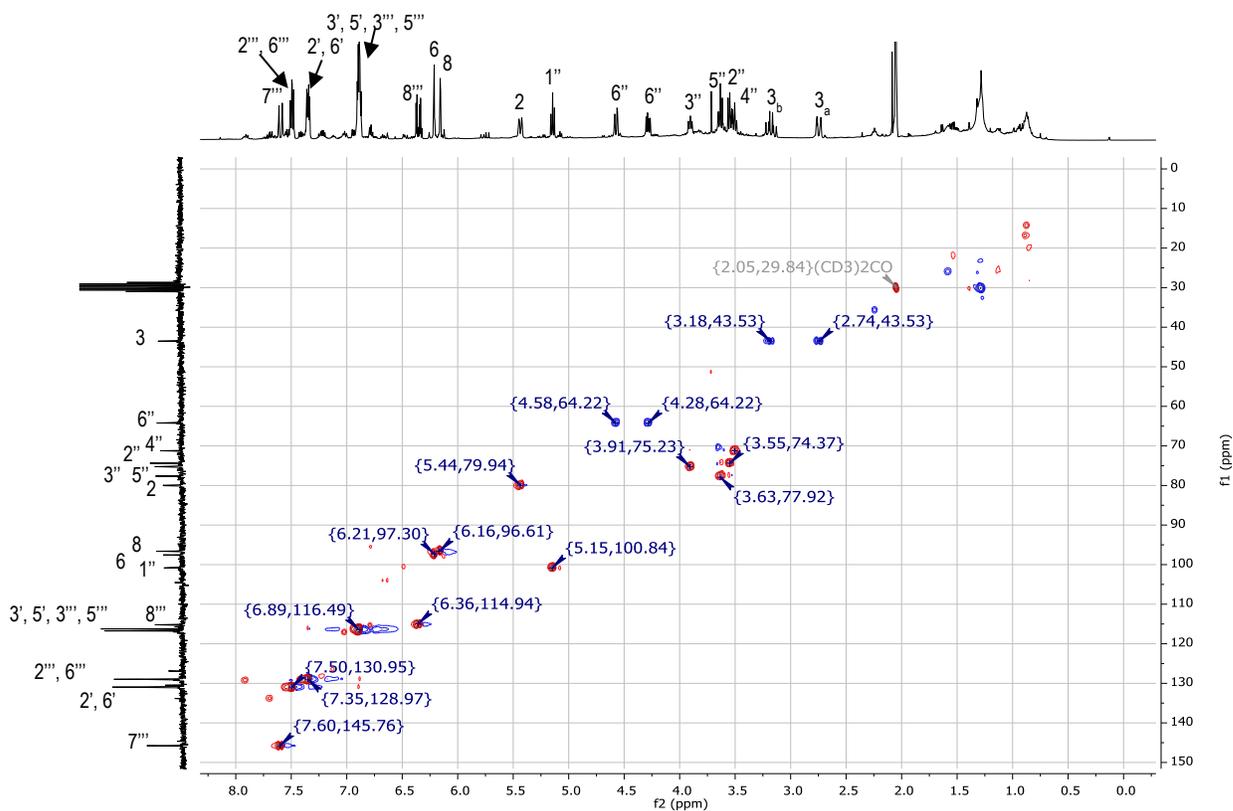
Ilustración 43. Expansión de la señal en 5.15 ppm, correspondiente a un hidrógeno bajo efecto anomérico.

En lo que respecta a los carbonos (espectro RMN 22), se observan en el espectro un total de 30 carbonos distribuidos en 26 señales, de las cuales 4 corresponden a 8 carbonos, ya que, por simetría en la molécula, específicamente en los carbonos 2, 3, 4 y 6, corresponden a dos sistemas aromáticos. Las señales características para el compuesto son la que aparece en un desplazamiento químico de 197.9 (C-4 de una flavanona), la que aparece en 100.8 ppm que es característica de un carbono que se encuentra bajo un efecto anomérico. Además, se observan 5 señales de carbonos alifáticos base de oxígeno entre 64.2 y 77.6 ppm que completan el número de carbonos para la glucosa. Otras 5 señales clave para identificar el compuesto son las que aparecen entre 158.8 y 166.5 ppm y corresponden a carbonos de un sistema aromático que son base de oxígeno.



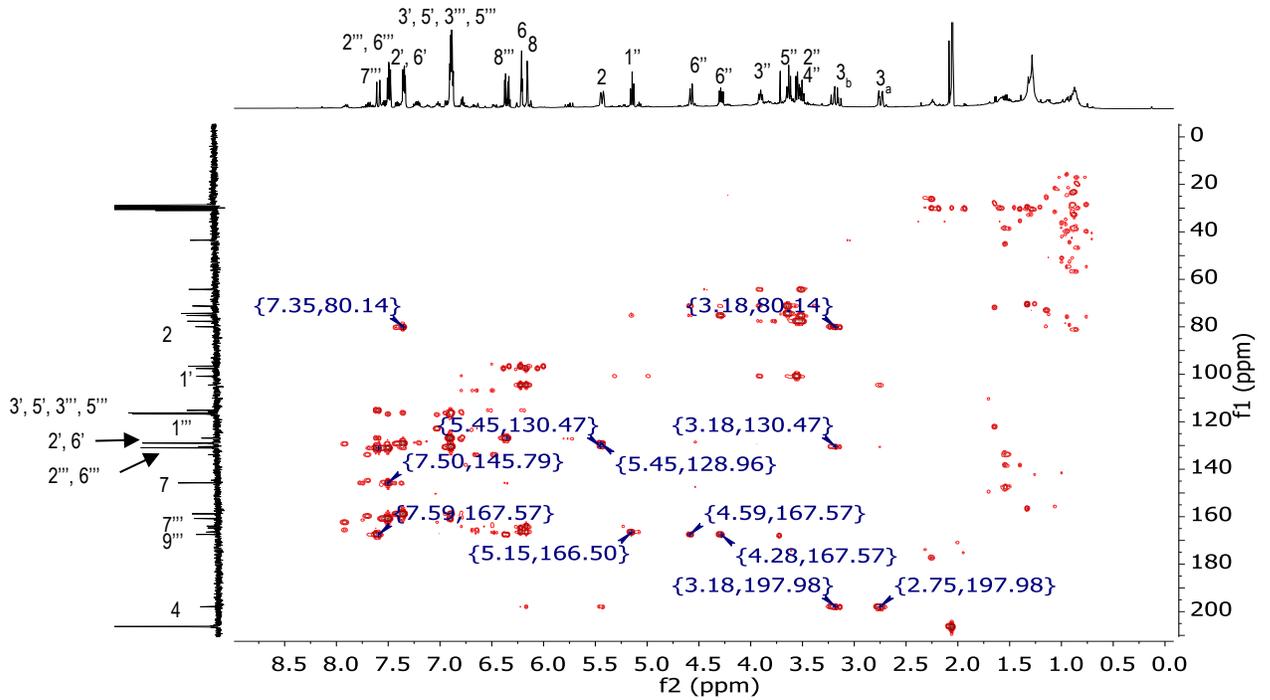
Espectro 22. RMN ^{13}C de 7-O-(6''-O-p-E-cumaroil)- β -D-glucósido de naringenina (28), 50 MHz, Acetona-d₆.

También se obtuvo el experimento HSQC que correlaciona hidrógeno-carbono a un enlace, con ello se logró identificar la unión directa de los hidrógenos y su respectivo carbono a un enlace, a continuación, se muestra el espectro:



Espectro 23. RMN HSQC de 7-O-(6''-O-*p*-E-cumaroil)-B-D-glucósido de naringenina (28), 500 MHz, Acetona-*d*₆.

Con el experimento HMBC se logró conectar las partes de la molécula las cuales corresponden a un ácido *p*-cumárico, una glucosa y la flavanona naringenina. Por medio de la correlación a 3 enlaces de los hidrógenos del CH₂ de la glucosa se establece que se encuentra unido al carbonilo con desplazamiento en 167.5 ppm del ácido *p*-cumárico. Por otra parte, por una correlación a 3 enlaces del hidrógeno anomérico de la glucosa se observa la interacción con el C-7 de la flavanona naringenina con desplazamiento químico en 164.7 ppm, esto se puede observar en el espectro HMBC 24.



Espectro 24. RMN HMBC de 7-O-(6''-O-p-E-cumaroil)-β-D-glucósido de naringenina (28), 500 MHz, Acetona-d₆.

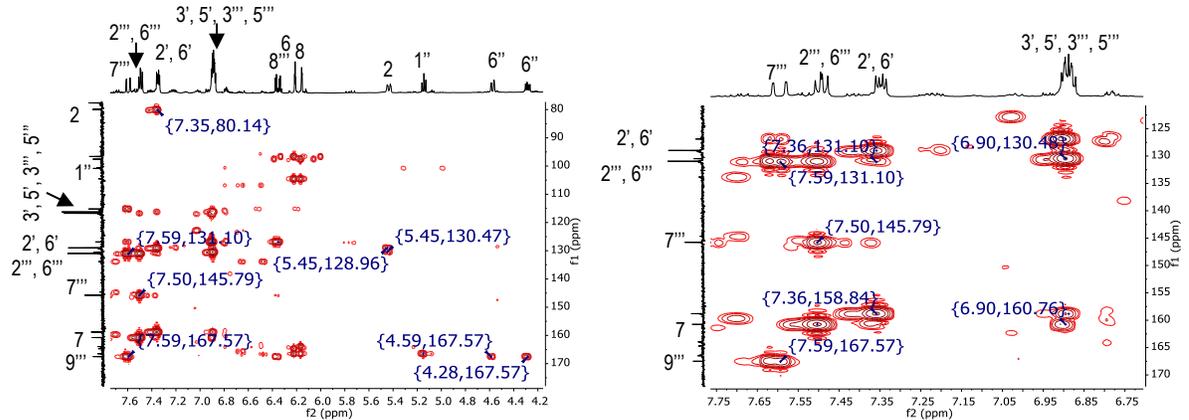
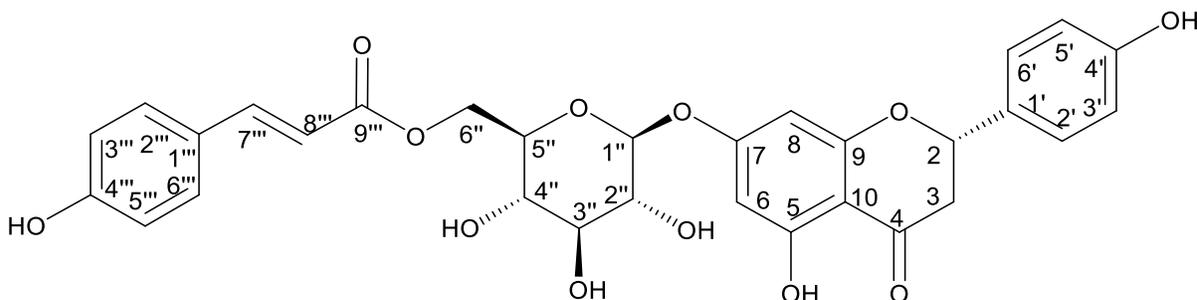


Ilustración 44. Expansiones del espectro en dos dimensiones HMBC 24, donde se pueden apreciar mejor las correlaciones de los hidrógenos de los sistemas aromáticos.

Tabla 26. Datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear para 7-O-(6''-O-p-E-cumaroil)-β-D-glucósido de naringenina (28).

7-O-(6''-O-p-E-cumaroil)-β-D-glucósido de naringenina (28)					
Experimentales			Reportados ⁴⁵ DMSO-d ₆		
	Naringenina				
	¹³ C 50 MHz, Acetona- d ₆ , (ppm)	¹ H 500 MHz, Acetona-d ₆ , δ ppm (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento)	HMBC	¹³ C JEOL FX- 100(ppm)	¹ H Varían A-60A (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento)
2	79.9	5.44 (1H, dd, J=12.70, 2.7 Hz)	128.9	78.6	5.56 (1H, d, J = 12 Hz)
3	43.5	3.17 (2H, dd, J=17.17, 12.70) 2.7 5 (1H, dd, J=17.17, 2.7 Hz)	79.9, 197.9	42.0	2.70-4.15 (6H, m)
4	197.9			197.2	
5	164.7			163.0	
6	97.6	6.21 (1H, d, J=2.20 Hz)	96.6, 104.5, 164.7, 166.5	96.3	6.22 (2H, s, br)
7	166.5			165.0	6.22 (2H, s, br)
8	96.6	6.16 (1H, d, J=2.20 Hz)	97.6, 104.5, 163.9, 166.5	95.5	
9	163.9			162.6	
10	104.5			103.3	
1'	126.8			128.6	
2', 6'	128.9	7.34 (2H, d, J=8.57 Hz)	116.2, 126.8, 158.8	128.4	7.35 (d, 2H, J = 8.5 Hz)
3', 5'	116.2	6.89 (4H, m)	116.2, 126.8, 130.9, 158.8	115.1	6.83 (d, 4H, J = 9 Hz)
4'	158.8			157.7	
Glucosa					
1''	100.8	5.15 (1H, d, J=8.0 Hz)	166.5, 75.2	99.2	5.13 (1H, d, J = 6 Hz)
2''	74.4	3.55 (1H, dd, J=9.09, 8.0 Hz)	77.6, 100.8	72.9	2.70-4.15 (6H, m)
3''	75.2	3.90 (1H, ddd, J=9.09, 6.68, 1.85 Hz)	64.2, 71.2, 100.8	76.1	2.70-4.15 (6H, m)
4''	71.2	3.50 (1H, ddd, J=10.17, 8.79, 1.59 Hz)	64.2, 75.2	69.8	2.70-4.15 (6H, m)
5''	77.6	3.63 (1H, d, J=8.64 Hz)	71.2, 74.4	73.8	2.70-4.15 (6H, m)
6''	64.2	4.58 (1H, dd, J=11.90, 2.12 Hz) 4.28 (1H, dd, J=11.90, 6.65 Hz)	71.2, 167.5 71.2, 75.23	63.3	4.31 (2H, m)
Cumarato					
1'''	130.5			125.0	
2''', 6'''	130.9	7.49 (2H, d, J=8.55 Hz)	145.8, 160.7		7.55 (2 H, d, J = 9 Hz)
3''', 5'''	116.7	6.89 (4H, d, J=8.57 Hz)	115.2, 116.7, 130.9, 160.7	115.7	6.83 (4H, dJ = 9 Hz)

4'''	160.7			159.8	
7'''	145.8	7.60 (1H, d, J=15.90 Hz)	115.2, 130.9, 167.5	113.9	7.59 (H, d, J = 16 Hz)
8'''	115.2	6.35 (1H, d, J=15.90 Hz)	167.5	144.9	6.63 (1 H,d, J = 16 Hz)
9'''	167.5			166.4	



Inicialmente el compuesto aquí descrito 7-O-(6''-*p*-E-cumaroil)-β-D-glucósido de naringenina (**28**) fue identificado en la muestra BAG02-054, sin embargo, no se observó un solo compuesto al ser analizado por cromatografía de líquidos de alta resolución en el equipo analítico, sin embargo, se realizó su análisis para identificar si este compuesto efectivamente era parte de la muestra por cromatografía de líquidos acoplado con detección de masas (Líquidos-Masas QTOF) utilizando como método de ionización ESI (ionización por electrospray) en modo positivo. El compuesto se identificó utilizando el método MS-MS (masas-masas), buscando específicamente el compuesto por fórmula y peso molecular (C₃₀H₂₈O₁₂, 580.581 uma), razón por la cual el cromatograma presentado en la ilustración 4 solo presenta un pico. Adicionalmente, en el espectro de masas obtenido (Ilustración 5) se muestra que el ion molecular forma aductos con amonio, sodio y potasio, por lo que se observan los siguientes picos: [M+H]⁺. *m/z* 581.1606, [M+Na]⁺. *m/z* 603.1430 y [M+K]⁺. *m/z* 619.1153. Por lo tanto, los datos obtenidos en el espectro de masas concuerdan con el peso molecular de la estructura propuesta a partir del espectro 21 de hidrógeno y 22 de carbono para el compuesto 7-O-(6''-*p*-E-cumaroil)-β-D-glucósido de naringenina (**28**).

El espectro de masas ESI⁺ correspondiente a 7-O-(6''-*p*-E-cumaroil)-β-D-glucósido de naringenina (**39**) presenta fragmentaciones a partir de *m/z* 603 en *m/z* 483 [M+Na-CH₁₂NaO₆]⁺, *m/z* 295 [M+Na-C₁₅H₁₆O₇]⁺ y *m/z* 174 [M+Na-C₂₃H₂₄NaO₈]⁺, algunas de ellas se muestran en la siguiente ilustración:

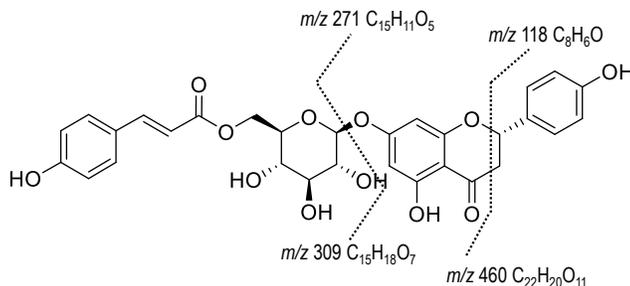
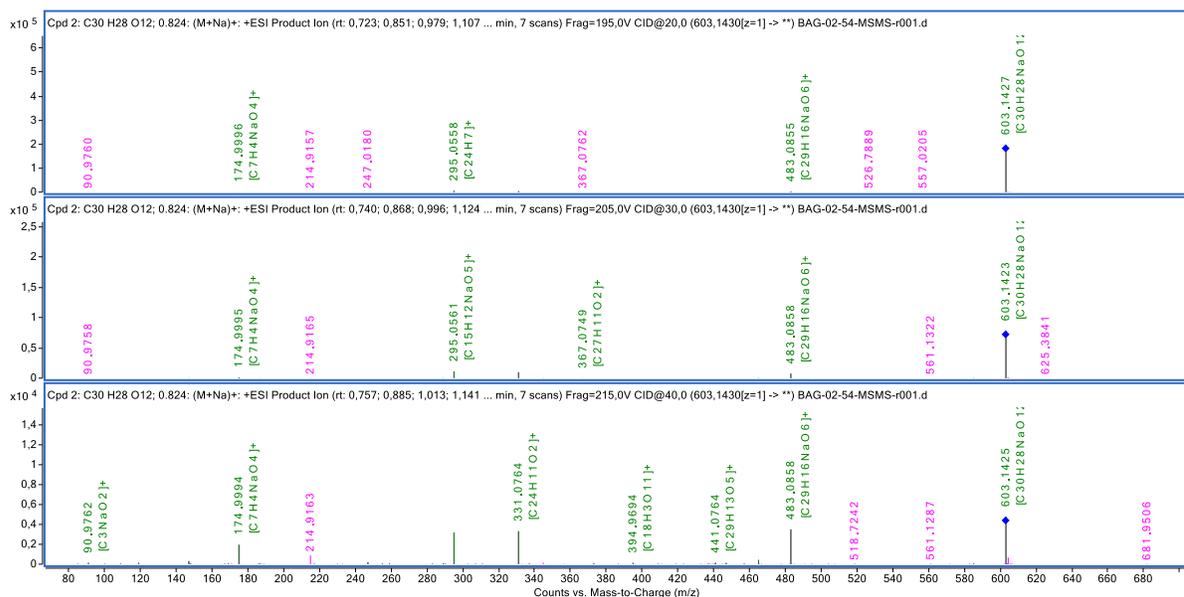


Ilustración 45. Principales fragmentaciones para 7-O-(6''-*p*-E-Cumaroil)- β -D-glucósido de naringenina (28) por ESI⁺ C₃₀H₂₆O₁₂ (masa exacta calculada 580.1581)

El pico correspondiente a m/z 483 [C₂₂H₂₀NaO₁₁]⁺ corresponde a la pérdida de 118 uma (C₈H₆O), este fragmento surge de dos rupturas en la flavanona, la primera del C-2 con el O-1, y la segunda de la ruptura entre el C-3 y el C-4. El siguiente fragmento que se logró identificar es debido a la ruptura entre el oxígeno β del monosacárido y el carbono anomérico dando lugar al fragmento de 271 uma (C₁₅H₁₁O₅), el cual en el espectro de masas es observado como [M+H+Na]⁺ con el ion m/z 295 [C₁₅H₂₂NaO₅]⁺.

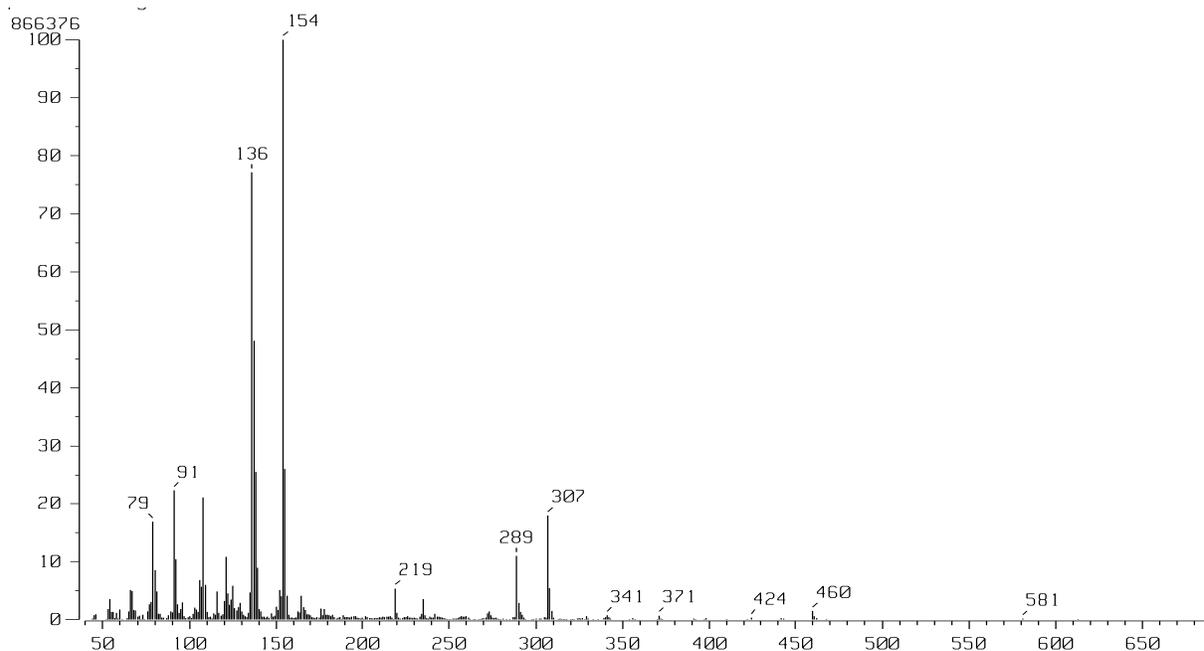


Espectro 25. ESI⁺ de 7-O-(6''-*O*-*p*-E-cumaroil)- β -D-glucósido de naringenina (28), obtenido en 3 energías de colisión 20, 30 y 40.

Adicionalmente, para corroborar la estructura, después de haber realizado la purificación por el equipo de HPLC Agilent Technologies 1260 infinity se obtuvo un espectro de masas FAB⁺ (espectro 25), en el cual se observan los siguientes datos:

El compuesto presenta un ion pseudo molecular en una relación $[M+H]^+$ m/z 581, que de acuerdo con la estructura de la molécula 7-O-(6''-*p*-*E*-cumaroil)- β -D-glucósido de naringenina (**28**), el peso molecular para este compuesto corresponde a 580 uma, sin embargo, lo que se observa en el espectro de masas es un pico en una relación m/z 581 que es explicado por el intercambio de protones entre las moléculas de la muestra.

Por lo tanto, teniendo en cuenta que para este compuesto las señales en resonancia magnética muestran una multiplicidad doble, y que el compuesto fue purificado por HPLC en cuyo cromatograma (Ilustración 14) se colectó un solo compuesto, se hace una comparación con 7-O-(6''-*p*-*E*-cumaroil)- β -D-glucósido de apigenina (**39**) en el cual no se presenta este efecto, por lo que al analizar las diferencias estructurales en los compuestos, se llegó a la conclusión que para el derivado de naringenina el centro asimétrico en el C-2 hace que la multiplicidad de las señales en RMN sean diferentes a las esperadas, es decir se encuentren duplicadas.



Espectro 26. FAB⁺ de 7-O-(6''-O-*p*-*E*-cumaroil)- β -D-glucósido de naringenina (28**).**

12.2 Actividad antiinflamatoria de *Cnidoscopus urens*.

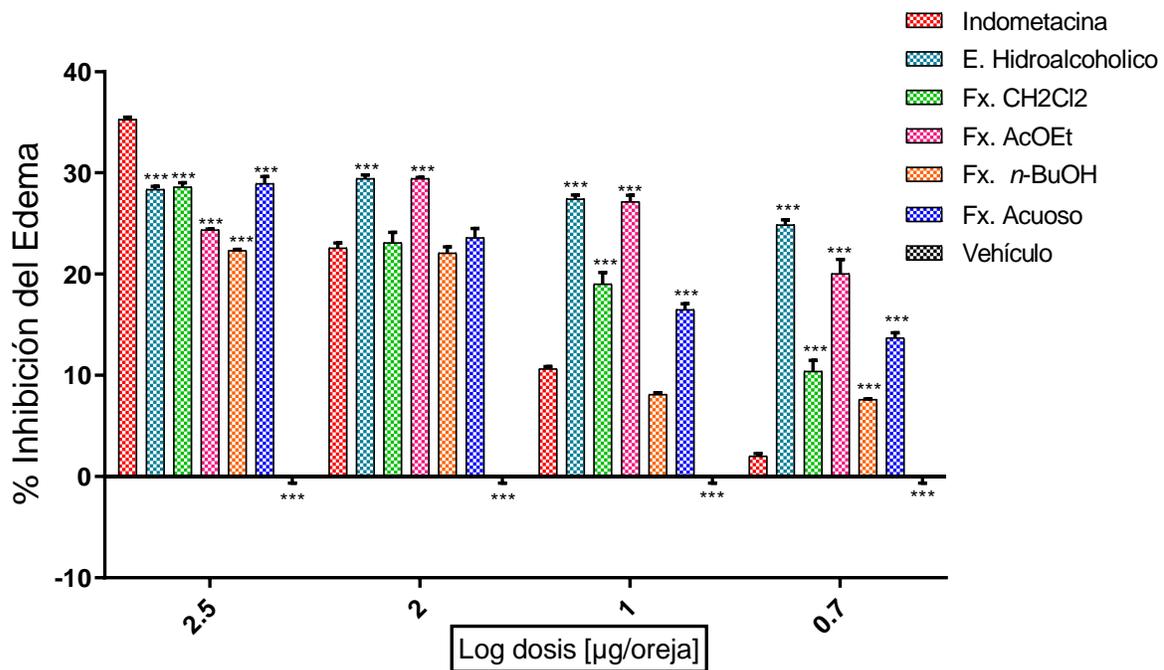


Figura 3. Porcentaje de inhibición del extracto hidroalcohólico y subfracciones posterior a la bipartición, de *Cnidoscopus urens* a dosis de 5, 10, 100 y 300 µg/oreja de ratón. El análisis estadístico se realizó por un ANOVA de dos vías, utilizando un análisis post hoc de Bonferroni (***) $p < 0.001$ estadísticamente significativos).

El ensayo *in vivo* de inducción de edema en oreja de ratón utilizando TPA (acetato de tetradecanoil forbol), es un modelo de inflamación aguda, es decir, el organismo produce una respuesta protectora ante este agente inflamatorio a corto plazo. Es por ello que hay un periodo de 10 minutos entre la aplicación del TPA y la aplicación de los extractos o fármaco de referencia. El TPA es un éster de forbol que tiene una relación estrecha con la activación de la proteína cinasa C, la cual al ser activada estimula la expresión de la ciclooxigenasa y de la lipooxigenasa dependiente de Ca^{2+} , las cuales producirán mediadores de la inflamación como prostaglandinas y leucotrienos.⁴⁶ A su vez, la liberación de estos mediadores lipídicos producen cambios en la permeabilidad de la microvasculatura, lo que incrementa el edema y la acumulación de células involucradas en la resolución de la inflamación⁴⁷ en el sitio donde se aplicó el TPA; es así como al realizar este ensayo con un fármaco de referencia después de que se ha inducido el edema nos da una idea de la actividad como antiinflamatorios de los compuestos contenidos en los extractos de *Cnidoscopus urens*.

En este ensayo se utilizó indometacina como fármaco de referencia a las mismas dosis que se prueban los extractos: 5, 10, 100 y 300 μg por oreja, también se empleó un grupo control (vehículo) y un grupo como control negativo en el que solo se aplicó TPA. En la figura 3, se puede observar que el extracto como las fracciones presentan inhibición del edema auricular al ser comparados con el vehículo y que estadísticamente, todos los tratamientos son significativos al realizar un post test de Bonferroni. Sin embargo, el nivel de significancia mostrado (** $p < 0.001$) se estableció al comparar los tratamientos con el control positivo (indometacina), esto para poder ver la capacidad de antiinflamación que presentan los tratamientos comparados con el fármaco de referencia.

Se puede observar que a la dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{oreja}$, todos los tratamientos presentan actividad antiinflamatoria comparando con indometacina, y que es estadísticamente significativo. Además, se observa que el extracto hidroalcohólico presenta la mayor actividad antiinflamatoria con un porcentaje de inhibición del edema 24.87.% mientras que el porcentaje de inhibición para indometacina, fármaco de referencia es de 4.43 %.

A la dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{oreja}$, se observa que la actividad antiinflamatoria de los tratamientos aumenta en comparación con la dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{oreja}$ y es estadísticamente significativa para el extracto y las fracciones, excepto para la fracción de *n*-butanol que, aunque presenta un porcentaje de inhibición del edema de 8.12%. su actividad antiinflamatoria no es estadísticamente significativa al comparar con indometacina.

Así mismo, se puede observar que la actividad antiinflamatoria continua a la dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{oreja}$, sin embargo, sólo el extracto hidroalcohólico y la fracción de AcOEt con porcentajes de inhibición del edema de 29.44 % cada uno, presentan diferencia significativa comparando con indometacina que posee un porcentaje de inhibición de 22.68 %. En lo que respecta a la fracción de diclorometano, *n*-butanol y el residuo acuoso presentan actividad antiinflamatoria, sin embargo, no muestra significancia estadística comparando con el fármaco de referencia.

Por último, a la dosis de 300 $\mu\text{g}/\text{oreja}$ se observa que la actividad antiinflamatoria de los tratamientos se mantiene, sin embargo, su capacidad antiinflamatoria es menor que indometacina y es una diferencia estadísticamente significativa ya que el porcentaje de inhibición del fármaco de referencia es de 35.44% y el porcentaje de inhibición de los tratamientos oscila entre 22.33 y 28.93 %.

En general se observó una ligera tendencia en cuanto a dosis-respuesta para los tratamientos probados en este modelo de antiinflamación, sin embargo, comparando los datos del porcentaje de inflamación

entre 100 y 300 $\mu\text{g}/\text{oreja}$ no se observó un aumento considerable en la actividad antiinflamatoria de los tratamientos, por lo que su actividad pudiera estar llegando a una meseta o una actividad máxima de antiinflamación, que al contrario de indometacina aumenta considerablemente la actividad antiinflamatoria con el aumento de la dosis, es decir presenta un efecto dosis-dependiente.

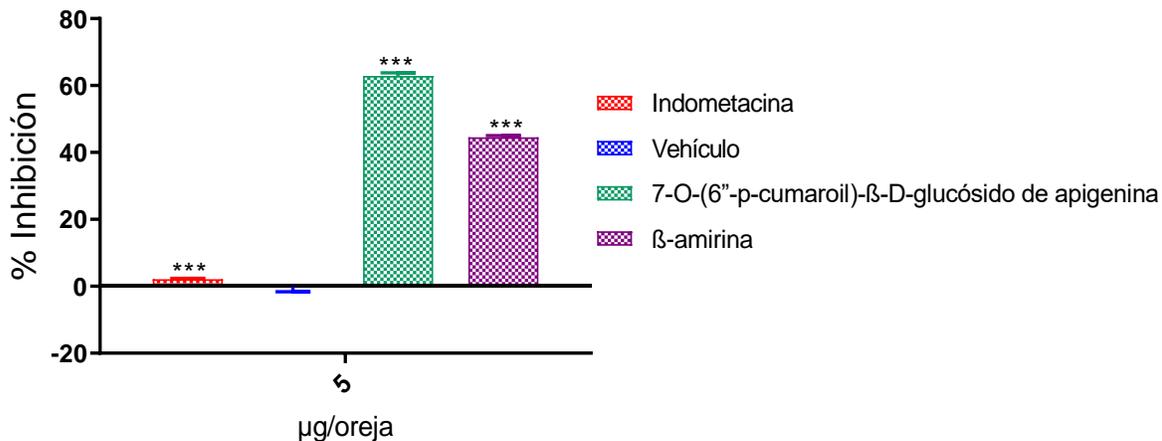


Figura 4. Porcentaje de inhibición de los compuestos aislados de *Cnidoscolus urens* a dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{oreja}$ de ratón. El análisis estadístico se realiza por un ANOVA de una vía, utilizando un análisis post hoc de Dunnet (***) $p < 0.001$ estadísticamente significativos).

Los resultados de la evaluación de algunos compuestos aislados e identificados, se muestra en la figura 4. El porcentaje de inhibición de β -amirina (**8**) y 7-O-(6''-p-E-cumaroil)- β -D-glucósido de apigenina (**39**) al ser comparados con indometacina, y de acuerdo con el análisis post hoc de Dunnet nos indica que el efecto antiinflamatorio observado es estadísticamente significativo. Esto también se puede describir en términos de eficacia ya que los compuestos evaluados a la dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{oreja}$ presentan mayor respuesta antiinflamatoria que indometacina a la misma dosis.

Adicionalmente, se puede deducir que los compuestos evaluados en este modelo, al estar presentes en el extracto y las fracciones evaluadas, son los responsables de la actividad antiinflamatoria, ya que el compuesto β -amirina (**8**) presentó un porcentaje de inhibición de 44.5 % y fue aislado de la fracción de diclorometano la cual en la figura 4, se observa que presentó actividad antiinflamatoria que es estadísticamente significativa comparado con el fármaco de referencia a las dosis de 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{oreja}$.

También, el compuesto 7-O-(6''-p-E-cumaroil)- β -D-glucósido de apigenina (**39**) presentó un porcentaje de inhibición de 66.84 %, este compuesto fue identificado tanto en la fracción de diclorometano y en mayor proporción en la fracción de acetato de etilo, lo cual corresponde a los resultados obtenidos ya que estas fracciones presentan porcentajes de actividad antiinflamatoria siendo

la que presenta porcentajes de inflamación más altos, la fracción de acetato de etilo y cuyo efecto entre las dosis de 5-300 µg/oreja es estadísticamente significativo comparado con indometacina.

Se logró observar que la actividad antiinflamatoria es mejor cuando los compuestos son evaluados en su forma pura, ya que los porcentajes de inhibición de los compuestos a la dosis de 5 µg/oreja alcanzan valores de 44.5 y 66.84 % para β-amirina (**8**) y 7-O-(6''-*p*-*E*-cumaroil)-β-D-glucósido de apigenina (**39**) respectivamente. Esto se puede verificar en la figura 3, siendo que ningún tratamiento alcanzó un porcentaje inhibición del 50%, aún en la dosis de 300 µg/oreja.

A continuación, se muestra una tabla de algunos compuestos identificados en *C. urens* que han sido probados en el modelo de inducción de edema plantar por carragenina en rata. En el caso de 7-O-(6''-*O*-*p*-*E*-cumaroil)-β-D-glucósido de apigenina (**39**) se reporta actividad antiinflamatoria a las dosis de 20, 30 y 50 mg/kg de peso, sin embargo, aparentemente no hay un efecto significativo cuando se aumenta la dosis (esto se puede ver en el volumen desplazado, donde al estar más inflamada la pata de la rata, desplaza un mayor volumen de agua y aparentemente no se observa una diferencia significativa). Por otro lado 7-O-(6''-*O*-*p*-*E*-cumaroil)-β-D-glucósido de naringenina muestra porcentajes de inhibición de 26 y 52 para las dosis de 30 y 100 mg/kg de peso. Adicionalmente, otro ensayo muestra la actividad como antiinflamatorio de la β-amirina a las dosis de 20, 50 y 100 mg/kg de peso, presentando porcentajes de inhibición de 70, 79 y 97, respectivamente, a las dosis evaluadas.

Tabla 27. Datos previamente reportados del efecto antiinflamatorio que presentan algunos compuestos aislados de *C. urens*.

Compuesto	Dosis mg/kg	% inhibición	Referencia
7-O-(6''- <i>O</i> - <i>p</i> - <i>E</i> -cumaroil)-β-D-glucósido de apigenina (39)	20	2.01 Vol edema (mL)	Anti-inflammatory effect and isolation of phenylethanoid and acylated flavone glycosides from <i>Panzeria alaschanica</i> . ⁴⁸
	30	1.69 Vol edema (mL)	
	50	1.38 Vol edema (mL)	
7-O-(6''- <i>O</i> - <i>p</i> - <i>E</i> -cumaroil)-β-D-glucósido de naringenina (28)	30	26	Pharmacological investigation of prunin-6''- <i>O</i> - <i>p</i> -coumarate: A flavonoid glycoside. ⁴⁹
	100	52	

β-Amirina (8)	20 µg/kg	70	Anti-inflammatory potential of β-amyrin, a triterpenoid isolated from <i>Costus igneus</i> . ⁵⁰
	50 µg/kg	79	
	100 µg/kg	97	

Así, teniendo en cuenta que los compuestos presentados en la tabla anterior tienen reportes de actividad antiinflamatoria se puede esperar que en el modelo de inducción de edema auricular por TPA en ratón, los compuestos puedan ser activos, ya que el compuesto 7-O-(6''-O-p-E-cumaroil)-β-D-glucósido de apigenina (**39**) y el triterpeno β-Amirina (**8**) presentaron porcentajes de inhibición del edema de 44.5 y 66.84 % respectivamente, a la dosis de 5 µg/oreja, y que además se esperaba que al aumentar la dosis aumentará también el porcentaje de inhibición. En el caso de 7-O-(6''-O-p-E-cumaroil)-β-D-glucósido de naringenina (**28**) también se tienen reportes de su actividad antiinflamatoria y considerando que la estructura química es similar al compuesto **39** es de esperar un comportamiento parecido en el efecto antiinflamatoria por el modelo *in vivo* de inducción de edema auricular por TPA en ratón.

12.3 Toxicidad oral aguda de *Cnidoscolus urens*.

A continuación, se muestra la gráfica correspondiente a la figura 5 en la que se puede observar la variación de peso de los animales utilizados en el ensayo de toxicidad oral aguda, en rojo se puede observar la disminución de peso en los animales tratados con el extracto y en la línea azul se observa la variación de peso del grupo control al cual sólo se administró el vehículo:

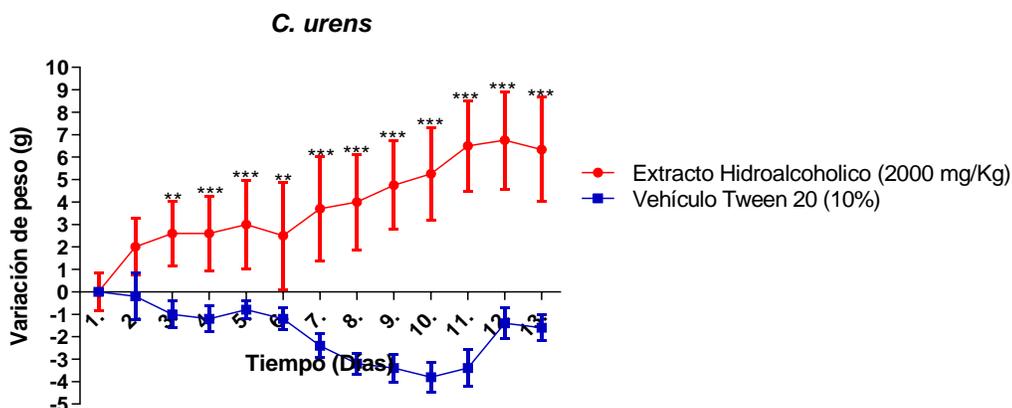


Figura 5. Variación de peso de los dos grupos experimentales. Cada grupo representa el promedio ± EE; n=5, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs vehículo, determinado mediante un ANADEVa de dos vías seguido de una prueba de Bonferroni.

Se evaluó la toxicidad oral aguda del extracto hidroalcohólico de *Cnidoscolus urens*, siguiendo las especificaciones descritas en la guía 420 de la OCDE, el cual se divide en dos etapas; la primera consiste en un estudio de observación, cuyo principal objetivo es la selección de la dosis de la sustancia de prueba, con base en los signos observados en un solo animal administrado y la segunda etapa es el estudio principal, en el cual la sustancia de prueba es administrada a la dosis establecida en el estudio de observación.

Para el estudio de observación se utilizaron dos animales, de los cuales, uno fue administrado con la dosis exploratoria de 300 mg/kg del extracto hidroalcohólico (dosis seleccionada debido a la ausencia de datos reportados sobre la toxicidad de la especie), mientras que el otro fue administrado únicamente con vehículo (Tween 20 al 10%). Los animales fueron observados durante los primeros 30 minutos después de la administración del extracto, y periódicamente las primeras 24 horas. Durante las primeras horas después de la administración, se observaron algunos signos, como piloerección, somnolencia y letargo, los cuales desaparecieron luego de 4 h, y los siguientes 14 días los animales mantuvieron un comportamiento normal. Debido a esto se decidió administrar a un segundo ratón con la dosis de 2000 mg/kg, observando los mismos signos observados a la dosis de 300 mg/kg que desaparecieron alrededor de las 4 h.

Con base en lo reportado en el estudio de observación, se inició el estudio principal, administrando a 5 animales, una dosis de 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico, y un segundo grupo fue administrado con vehículo. Durante las primeras 4 h después de la administración, los animales presentaron piloerección, somnolencia y letargo, sin embargo, estos signos desaparecieron a las 4 horas. A pesar de que los animales mostraban un comportamiento normal durante los siguientes días de observación, al final del periodo se reportaron 4 decesos, el primero ocurrido en el día 6 y los otros tres ocurrieron entre los días 13 y 14.

También se registró el peso de los animales durante los 14 días de observación, la gráfica 5 compara la variación de peso de los animales administrados con el extracto hidroalcohólico y con el vehículo; observando pérdidas de peso significativas desde el tercer día de administración, en donde los animales tratados con el extracto perdieron 2 g de peso, mientras que los animales tratados con el vehículo ganaron en promedio 1g de peso. Se observa que la pérdida de peso es constante, y es considerada significativa cuando se comparan los pesos con el grupo control. De acuerdo con lo descrito en la guía 420 de la OCDE, así como con lo reportado durante el ensayo, se puede sugerir que el extracto

hidroalcohólico de *C. urens* podría clasificarse dentro de la categoría 4 del SGA, que establece que es una sustancia **nociva en caso de ingestión** a dosis menores a 2000 mg/kg, ya que su DL₅₀ se encuentra entre 300-2000 mg/kg de peso.

Adicionalmente se evaluaron algunos compuestos identificados en *C. urens* por medio de un análisis *in silico* de toxicidad oral aguda usando los programas **ACD/Tox Suite versión 2.95**, con los módulos:

- Acute Toxicity Group 2.95

- LD₅₀ 2.95

Tabla 28. Dosis letal media de algunos de los compuestos identificados en el extracto hidroalcohólico de *C. urens* por dos vías de administración i. p (intraperitoneal) y p.o (oral).

Compuesto	DL ₅₀ (mg/kg de peso) Ratón	
	i.p.	p.o.
7-O-(6"- <i>p</i> - <i>E</i> -cumaroil)-β-D-glucósido de naringenina (28)	930	1000
7-O-(6"- <i>p</i> - <i>E</i> -cumaroil)-β-D-glucósido de apigenina (39)	800	750
Ácido <i>p</i> -cumárico (62)	1200	2400
Escopoletina (58)	900	1100

De los datos mostrados en la tabla anterior se puede clasificar a los compuestos en las categorías del sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos, quedando como sigue: en la categoría 5 cuya DL₅₀ se encuentra entre 2000 a 5000 mg/kg de peso se encuentra el ácido *p*-cumárico que es un compuesto fenólico muy común en las plantas y algunos suplementos de origen natural, por lo que se puede decir que **puede ser nocivo si se ingiere** de acuerdo al SGA; por otra parte, los demás compuestos presentan una DL₅₀ entre 300-2000 mg/kg de peso y su descripción es que son **nocivos en caso de ingestión** y pertenecen a la categoría 4 del sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos.

12.4 Compuestos identificados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es una técnica muy útil en la identificación de compuestos poco polares o volátiles, ya que permite la separación de los compuestos y la fragmentación de estos y así, identificar el patrón de fragmentación de los compuestos. El patrón de fragmentación es característico para cada compuesto por lo que el equipo realiza una comparación en la base de datos y por comparación del espectro de masas determina el grado de congruencia de ambos espectros, es decir, el obtenido de la muestra y el que se encuentra en la base de datos, los cuales deben ser muy parecidos.

Otro análisis que ayuda a corroborar la identidad de los compuestos identificados en CG es el índice de retención lineal. Una de las ventajas que tiene esta técnica es que por medio de un estándar de *n*-alcanos que va de 8 a 40 átomos de carbono se puede hacer una relación entre el tiempo de retención de los compuestos y la serie de *n*-alcanos empleada como estándar. Esta relación se conoce como índice de retención lineal el cuál es un cálculo cuyo resultado debe ser parecido o con una ligera diferencia entre un compuesto específico, este puede variar de acuerdo con ciertas condiciones como la elución de las muestras, características de la columna y condiciones del equipo, los índices de retención aquí descritos fueron obtenidos mediante la siguiente formula, la cual fue propuesta por H. van den Dool y D.J. Kratz:

$$IRL = 100x_n + 100 \frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}}$$

Donde *n* es el número de átomos de carbono en el *n*-alcano que eluye antes del compuesto de interés cuyo tiempo de retención es t_{RX} ; t_{RN} y t_{Rn} son tiempos de retención de los *n*-alcanos con los números de átomos de carbono *n* y *N*, respectivamente, que eluyen inmediatamente antes y después de nuestro compuesto de interés.⁵¹

Así, obteniendo el IRL de los compuestos identificados se puede comparar con el IRL reportado en bases de datos, en este caso se usa NIST (National Institute of Standards and Technology) y la diferencia entre el compuesto reportado y el IRL obtenido debe ser mínima para corroborar su identidad. En los análisis realizados por CG-EM para cada apartado se muestra una tabla en la cual se hace una comparación entre el valor del índice de retención lineal (IRL) calculado con los datos experimentales y los valores reportados en la base de datos.

En algunos de los casos, los valores para el índice de retención no se encuentran reportados, sin embargo, aquellos casos en los que si se encontró el valor, hay ligeras diferencias entre el valor obtenido y el valor reportado, esto debido a las condiciones en las que son procesadas las muestras, por lo que para obtener los valores similares se deben tener en cuenta todas las condiciones experimentales en que fueron procesados los compuestos de referencia o en este caso los valores de índice de retención líneal.

CONCLUSIONES

13 CONCLUSIONES.

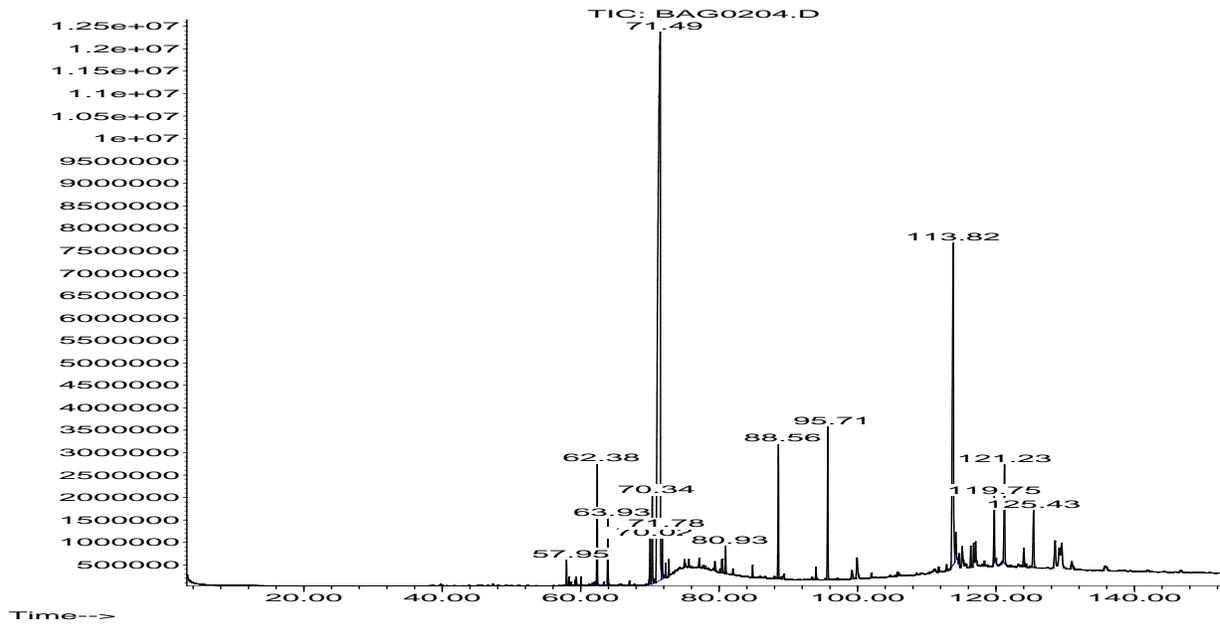
- ❖ El extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *Cnidoscopus urens*, así como las fracciones de diclorometano, acetato de etilo, *n*-butanol y el residuo acuoso presentan actividad antiinflamatoria significativa comparadas con Indometacina, fármaco de referencia para disminuir la inflamación.
- ❖ *Cnidoscopus urens* biosintetiza distintos compuestos, entre los que se identificaron y aislaron compuestos fenólicos, triterpenos, esteroides, flavonoides, así como polioles, entre ellos gran parte son azúcares que también forman compuestos glicosilados.
- ❖ Algunos de los compuestos aislados de *C. urens* se encuentran reportados en la literatura con efecto antiinflamatorio, adicionalmente se comprobó en este estudio que los compuestos β -Amirina (**8**) y 7-O-(6''-*p*-E-cumaroil)- β -D-glucósido de apigenina (**39**) presentan un efecto antiinflamatorio más eficaz a la dosis de 5 μ g/oreja comparado con indometacina y que es estadísticamente significativo.
- ❖ De acuerdo con la literatura las especies del género *Cnidoscopus* presentan una serie de compuestos característicos, entre ellos está 7-O-(6''-*p*-E-cumaroil)- β -D-glucósido de naringenina (**28**), información que es corroborada para la especie objeto de este estudio colectada en el estado de Morelos.
- ❖ *Cnidoscopus urens* es una especie vegetal que es utilizada en medicina tradicional, su uso debe ser controlado ya que por medio del estudio de TOA del extracto hidroalcohólico se determinó que se clasifica dentro de la categoría 4 del SGA, que establece que es una sustancia **nociva en caso de ingestión** a dosis menores a 2000 mg/kg.
- ❖ Algunos de los compuestos identificados en la categoría 5, cuya DL₅₀ se encuentra entre 2000 a 5000 mg/kg de peso, es el ácido *p*-cumárico (**62**) **puede ser nocivo si se ingiere** de acuerdo con el SGA; por otra parte, los demás compuestos 7-O-(6''-*p*-E-cumaroil)- β -D-glucósido de naringenina (**28**), 7-O-(6''-*p*-E-cumaroil)- β -D-glucósido de apigenina (**39**) y Escopoletina (**58**) su DL₅₀ se encuentran entre 300 a 2000 mg/kg de peso y su descripción es que son **nocivos en caso de ingestión** de acuerdo al análisis *in silico* obtenido del programa **Acute Toxicity Group 2.95**.

ANEXOS

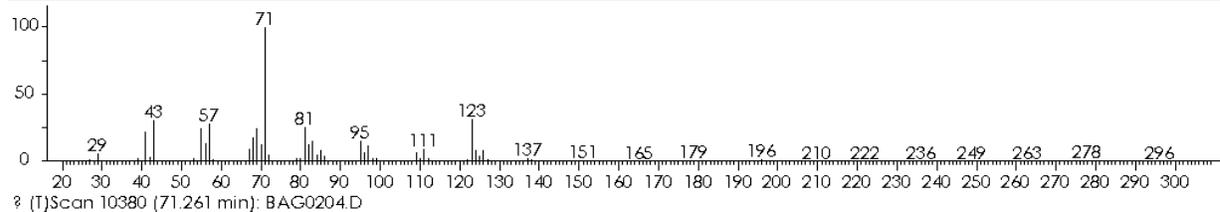
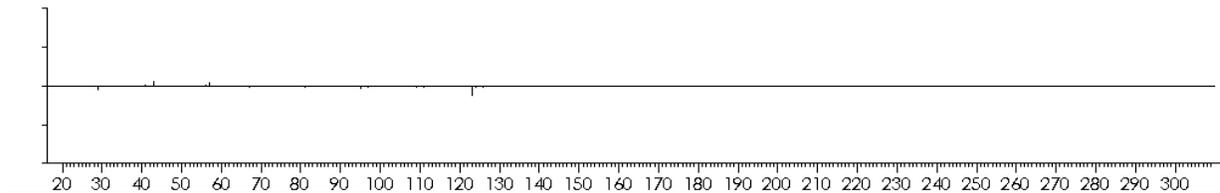
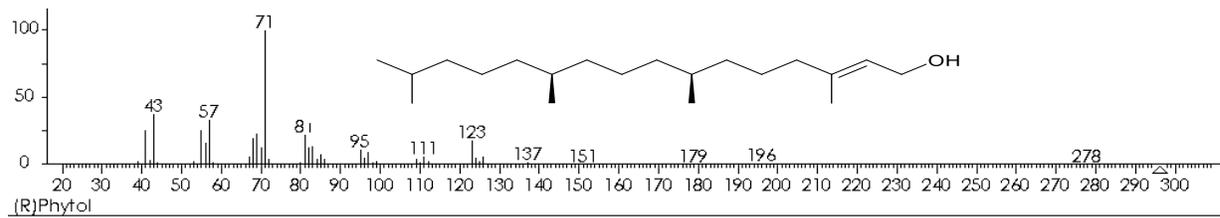
14 ANEXOS.

14.1 Cromatogramas y espectros de masas.

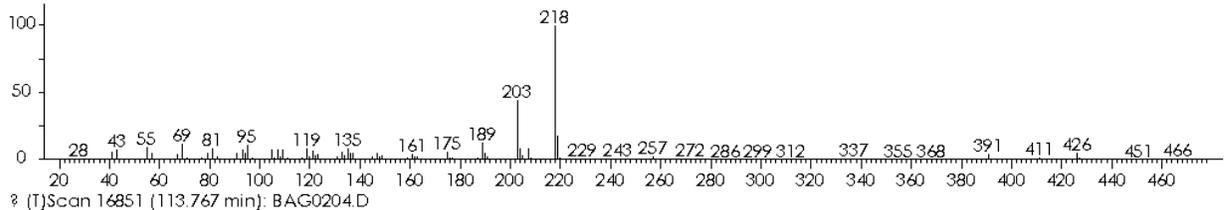
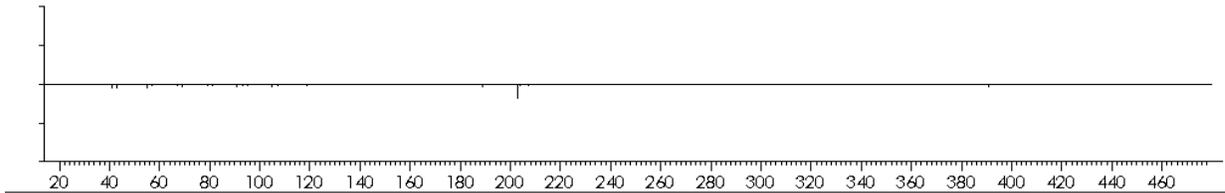
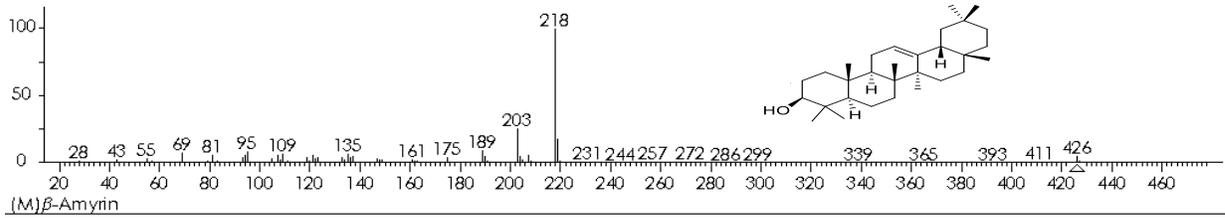
Abundance



Cromatograma 1. Correspondiente a la muestra BAG02-004 con los compuestos mayoritarios y Fitol (40) $t_R=71.261$ y β -Amirina (8) $t_R=113.819$ min.

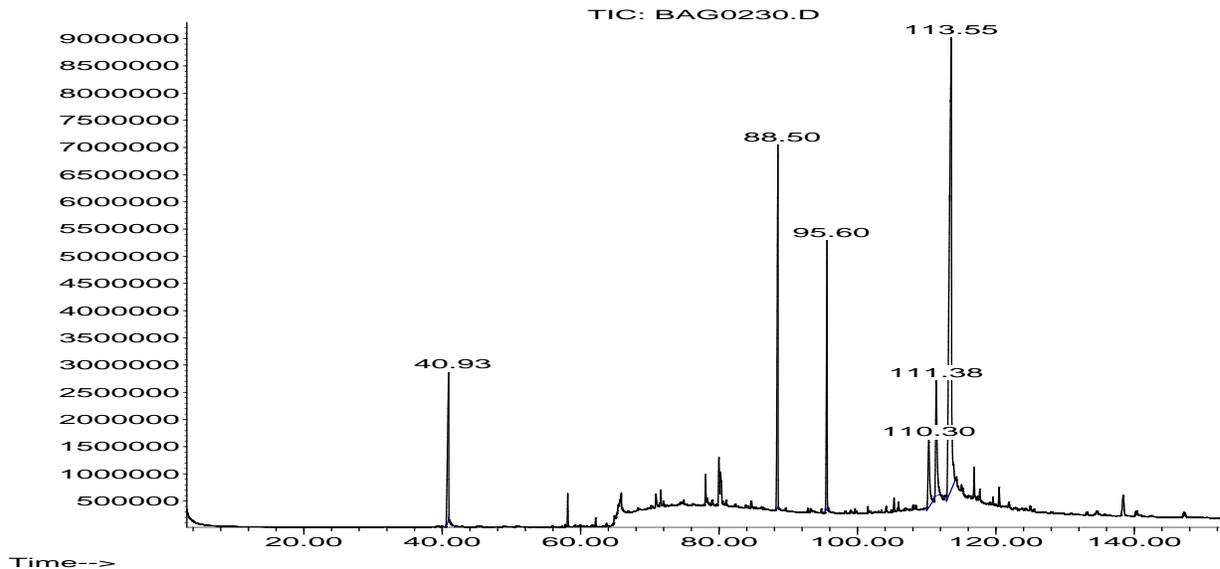


Espectro de masas 1. Correspondiente al Fitol (35) $[M]^+$ m/z 296, $t_R=71.26$ min identificado en la muestra BAG02-004.

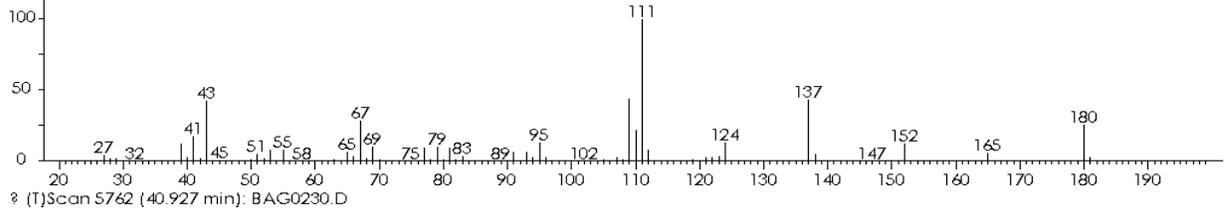
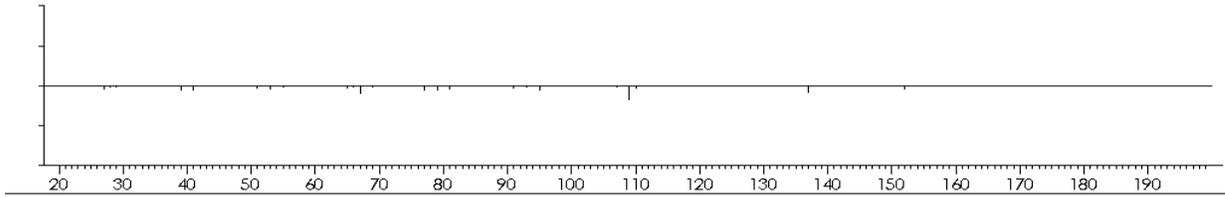
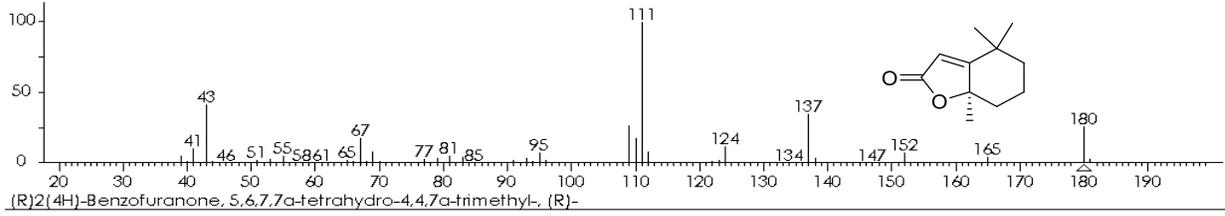


Espectro de masas 2. Correspondiente a β-Amirina (8) [M]⁺ m/z 426, t_R=113.819 min identificado en la muestra BAG02-004.

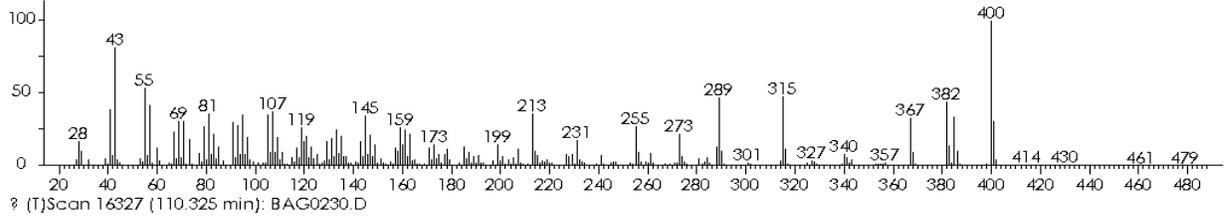
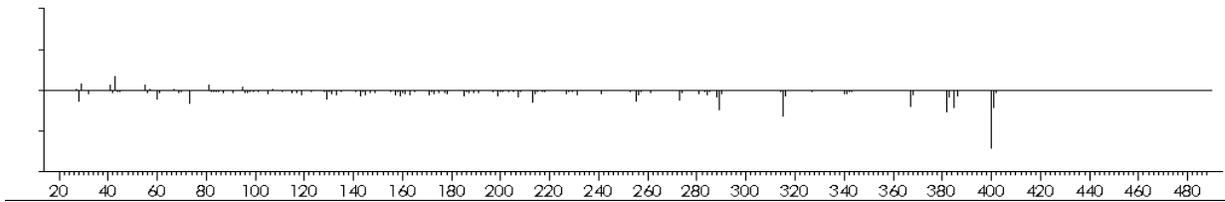
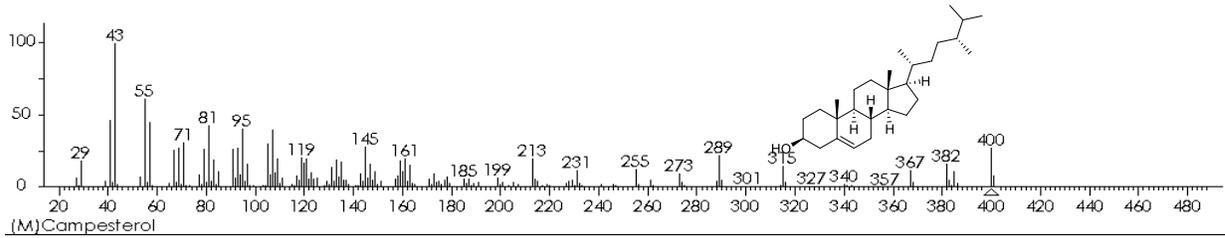
Abundance



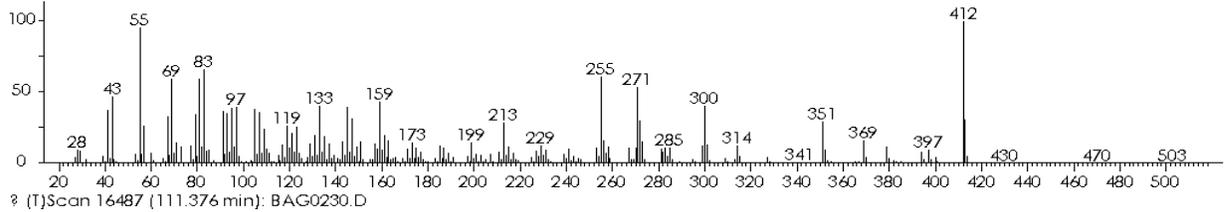
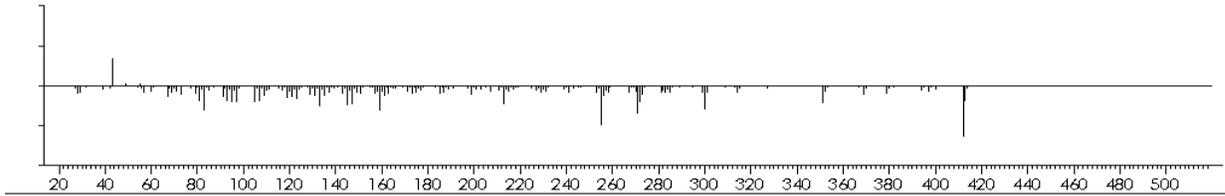
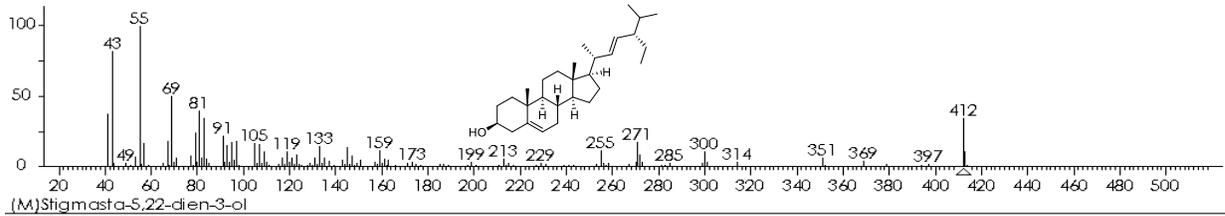
Cromatograma 2. Correspondiente a la muestra BAG02-030 con los compuestos mayoritarios Dihidroactinidiolido (41) t_R=40.93, Campesterol (42) t_R=110.3, Estigmasterol (43) t_R=111.38 y γ-Sitosterol (44) t_R=113.55.



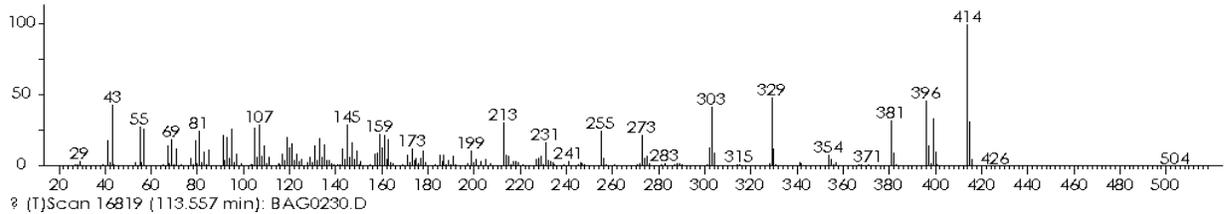
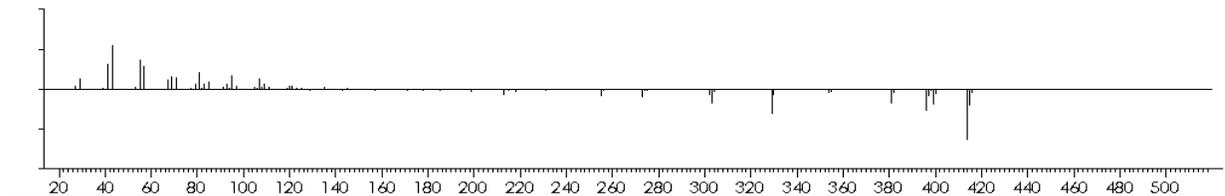
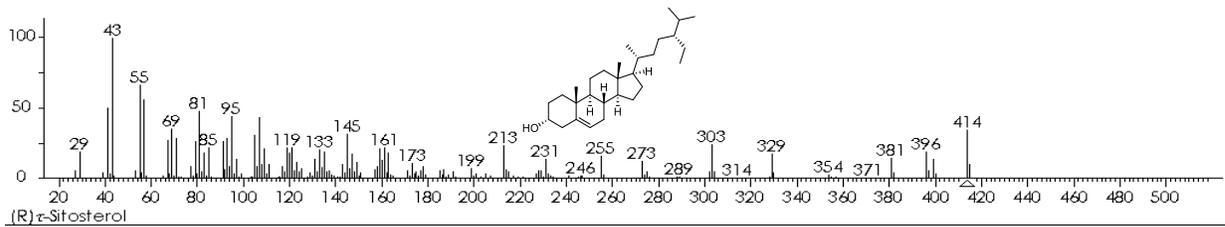
Espectro de masas 3. Correspondiente a Dihydroactinidiolido (41) [M]⁺ m/z 180, t_R=40.93 min identificado en la muestra BAG02-030



Espectro de masas 4. Correspondiente Campesterol (42) [M]⁺ m/z 400, t_R=110.3 min, identificado en la muestra BAG02-030.

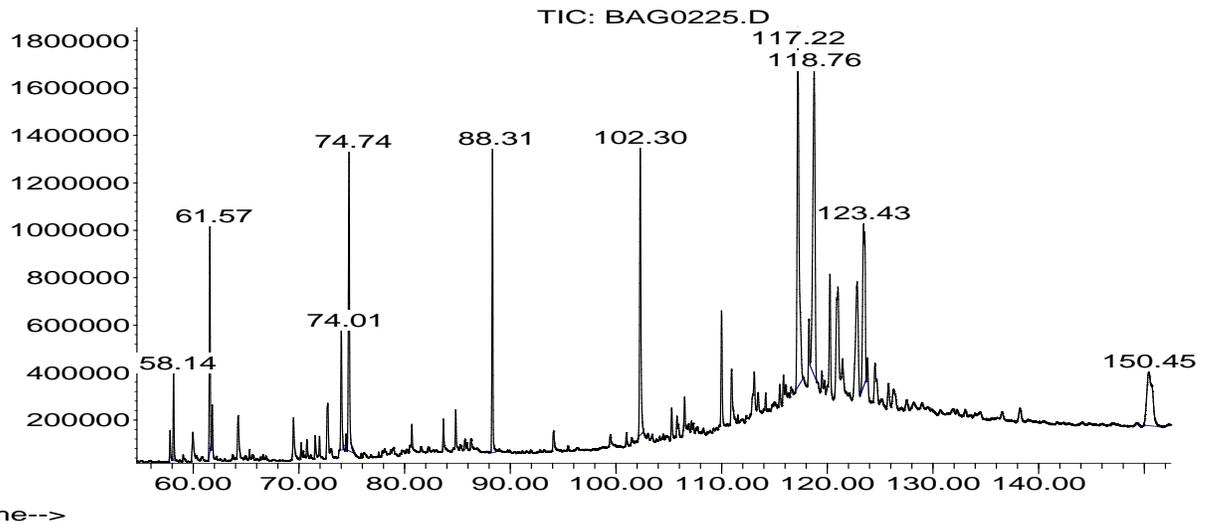


Espectro de masas 5. Correspondiente a Estigmasterol (43) [M]⁺. m/z 412, t_R =111.38 min, identificado en la muestra BAG02-030.

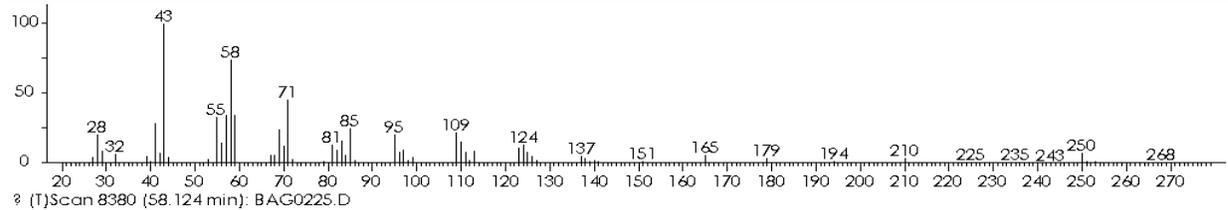
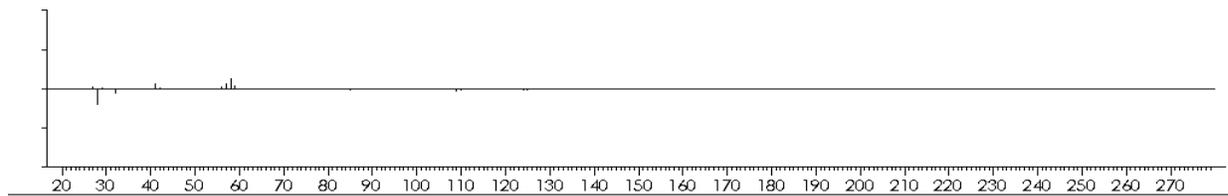
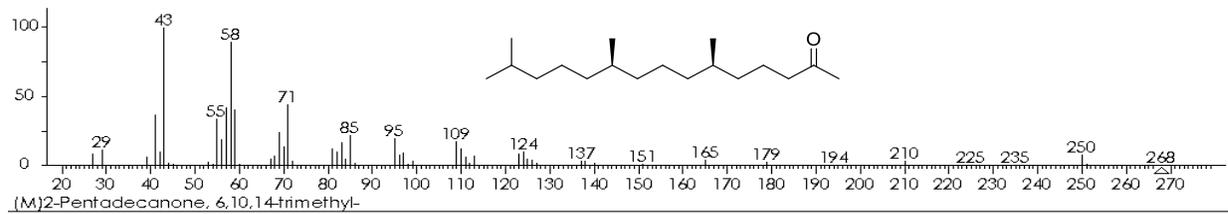


Espectro de masas 6. Correspondiente a α-Sitosterol (44) [M]⁺. m/z 414, t_R =113.55 min, identificado en la muestra BAG02-030.

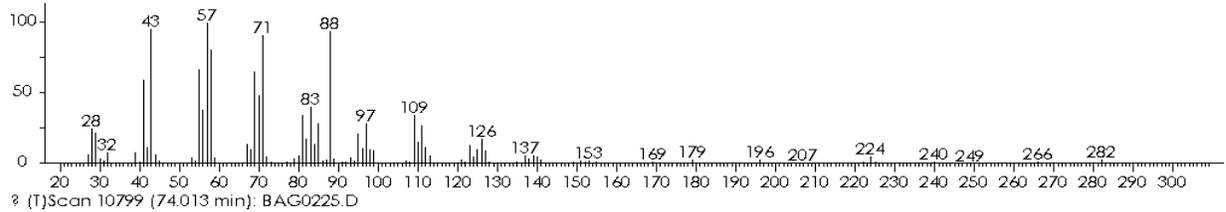
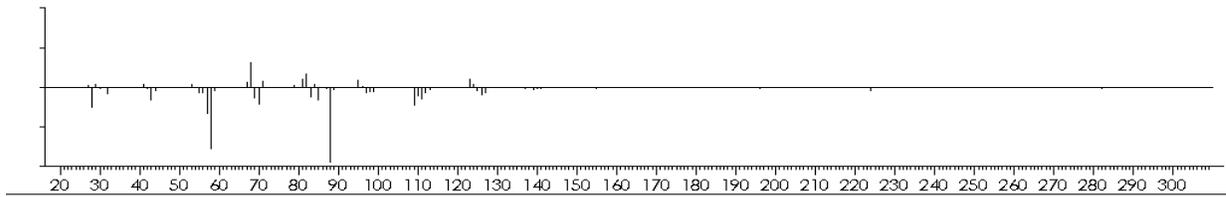
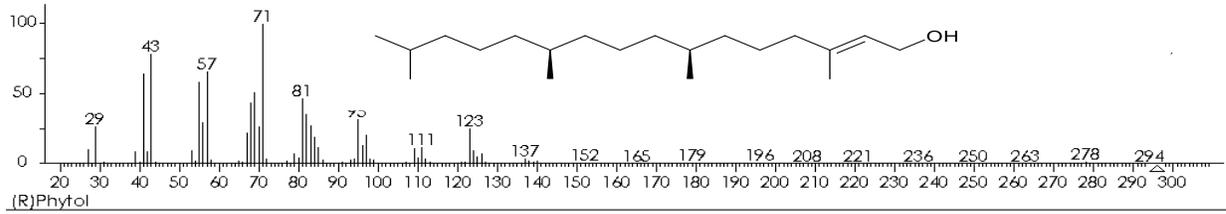
Abundance



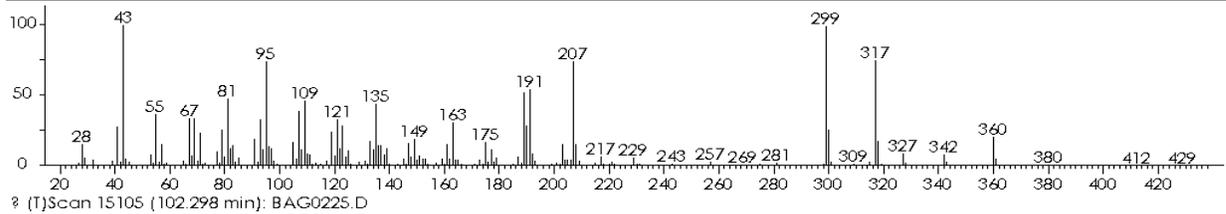
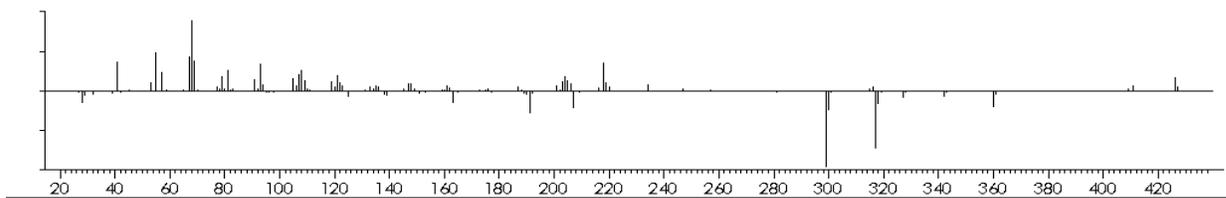
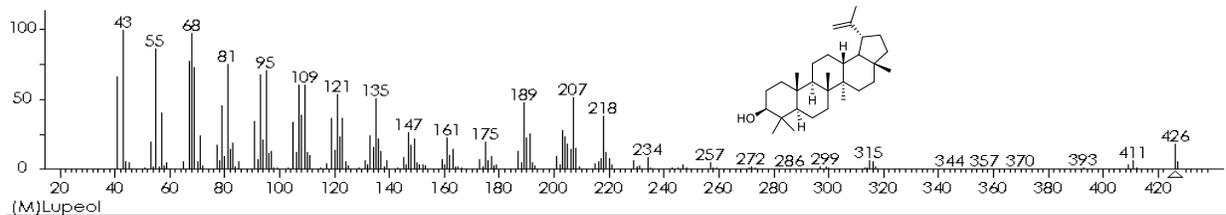
Cromatograma 3. Correspondiente a la muestra BAG02-025 con los compuestos mayoritarios 6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona (45) $t_R=58.14$, 61.57, 74.74, Fitol (40) $t_R=74.01$ y Lupeol (46) $t_R=102.3$.



Espectro de masas 7. Correspondiente a 6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona (45) $[M]^+$ m/z 268, $t_R = 58.14$, 61.57, 74.74 min de la muestra BAG02-025.

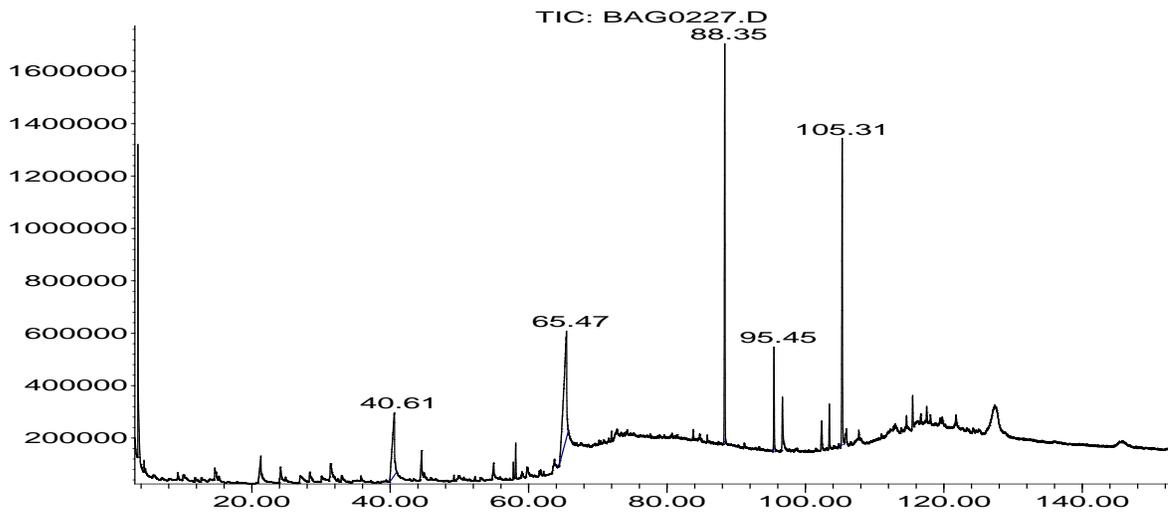


Espectro de masas 8. Correspondiente a Fitol (40) [M]⁺ m/z 196, t_R =74.01 min de la muestra BAG02-025.



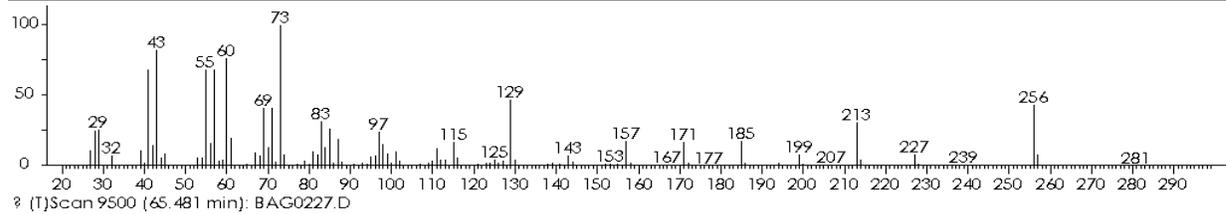
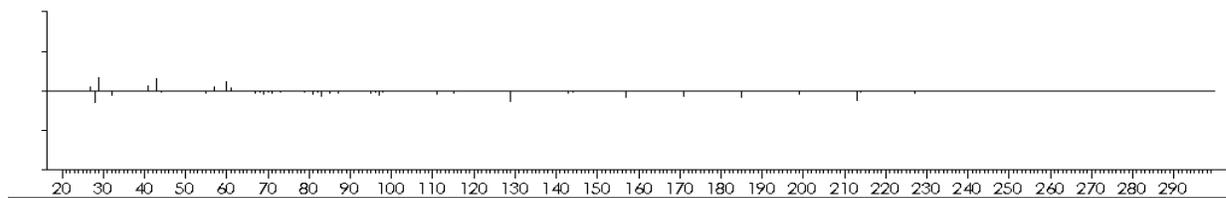
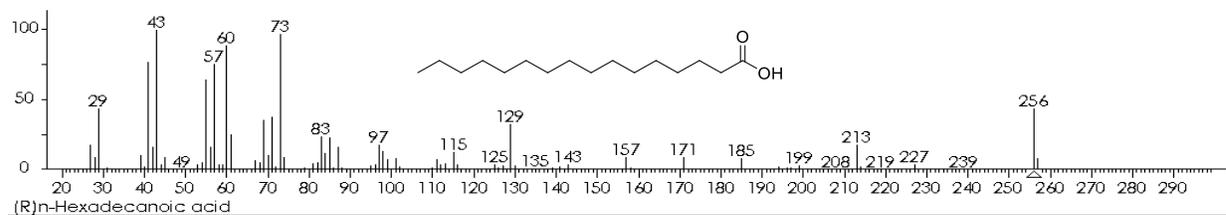
Espectro de masas 9. Correspondiente a Lupeol (46) [M]⁺ m/z 426, t_R =102.3 min de la muestra BAG02-025.

Abundance

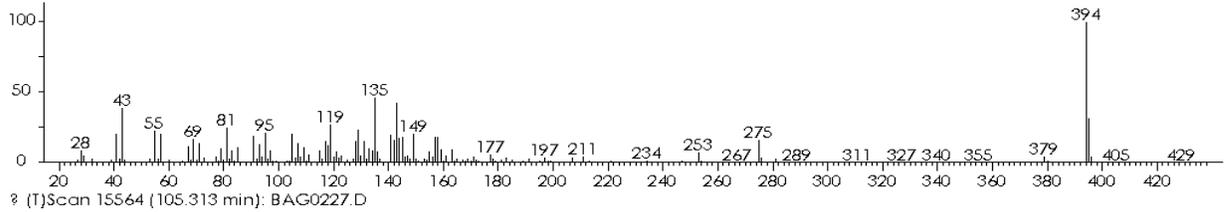
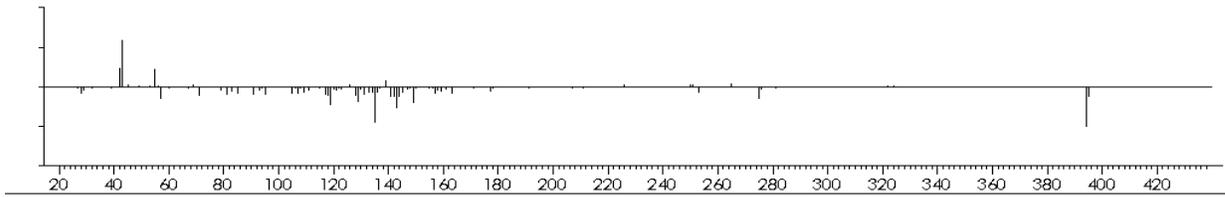
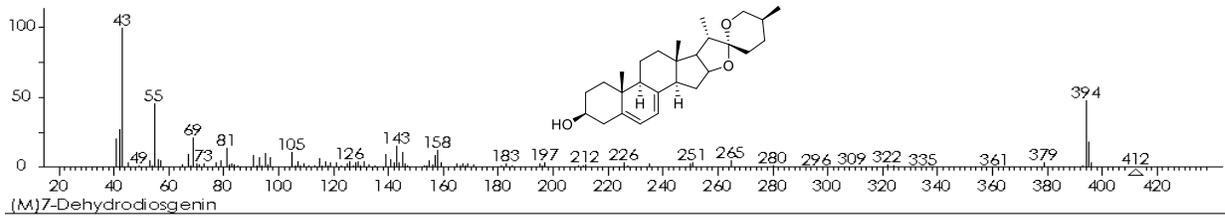


Time-->

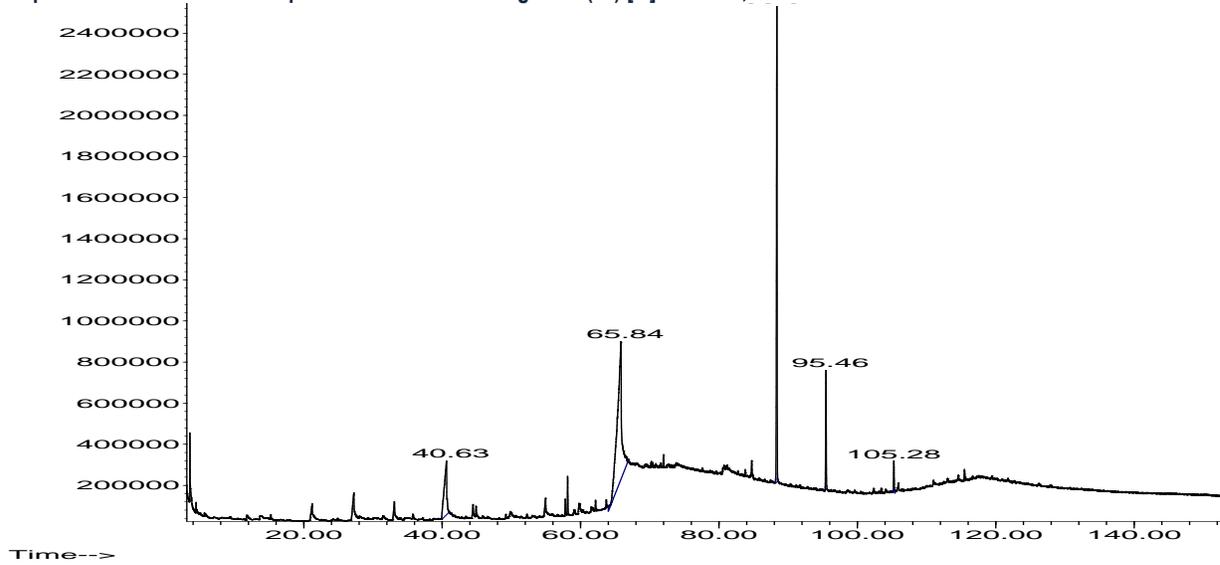
Cromatograma 4. Correspondiente a la muestra BAG02-027 con los compuestos ácido Palmítico (48) $t_R=65.47$ y Dehidrodiosgenina (49) $t_R=105.31$.



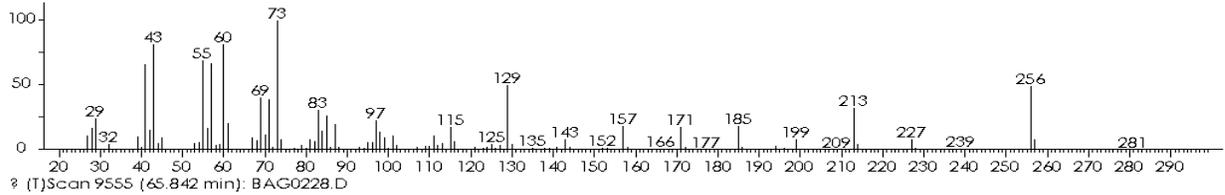
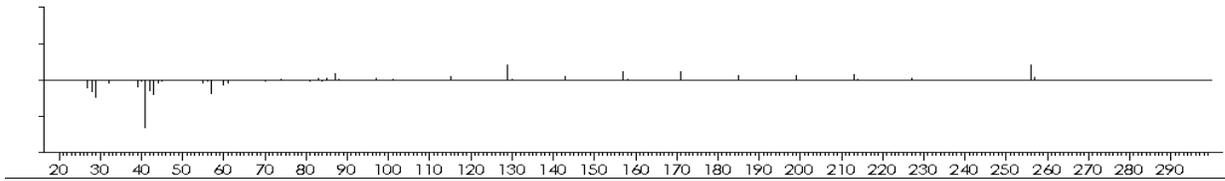
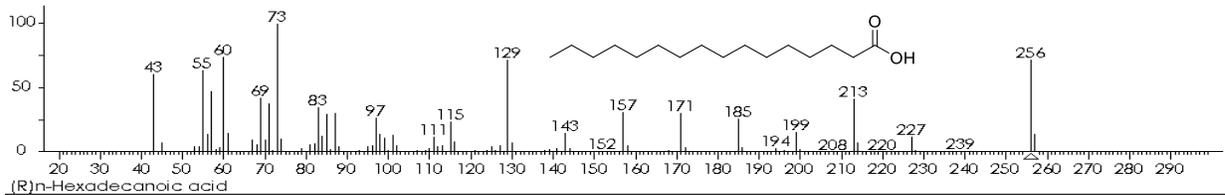
Espectro de masas 10. Correspondiente a ácido Palmítico (48) $[M]^+$ m/z 296, $t_R=65.47$ min de la muestra BAG02-027.



Espectro de masas 11. Correspondiente a Dehidrodiosgenina (49) [M]⁺ m/z 412, t_R=105.31 min de la muestra BAG02-027.

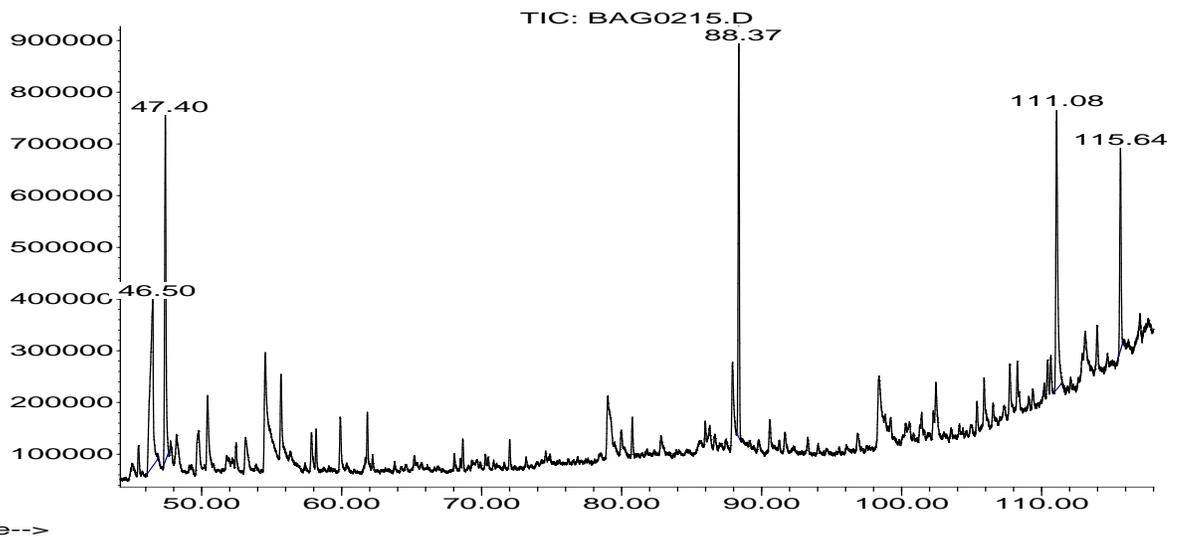


Cromatograma 5. Correspondiente a la muestra BAG02-028 con el compuesto ácido Palmítico (48) t_R=65.54.



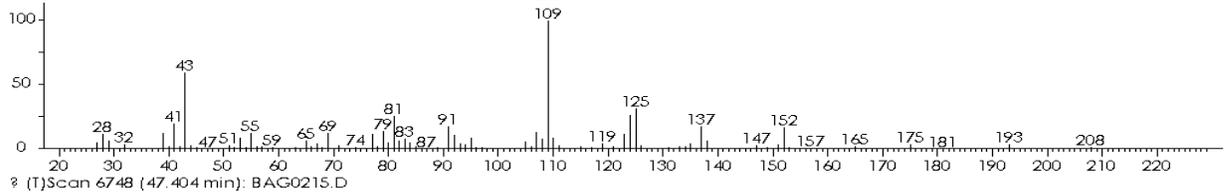
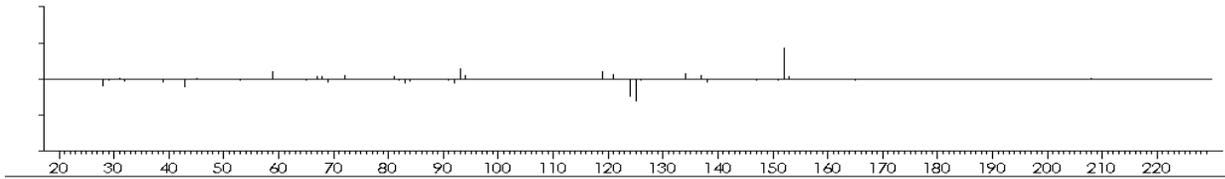
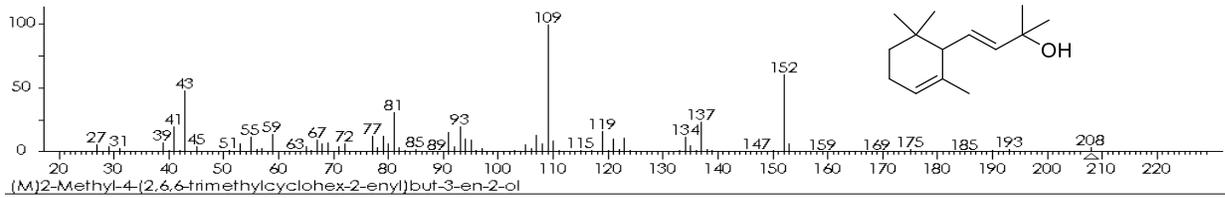
Espectro de masas 12. Correspondiente a ácido Palmítico (48) [M]⁺ m/z 296, t_R=65.47 min de la muestra BAG02-028.

Abundance

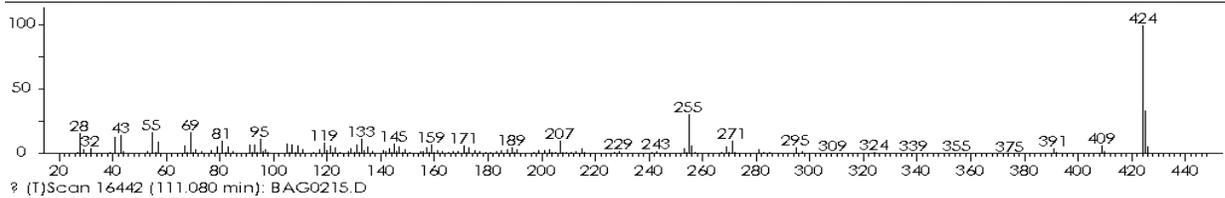
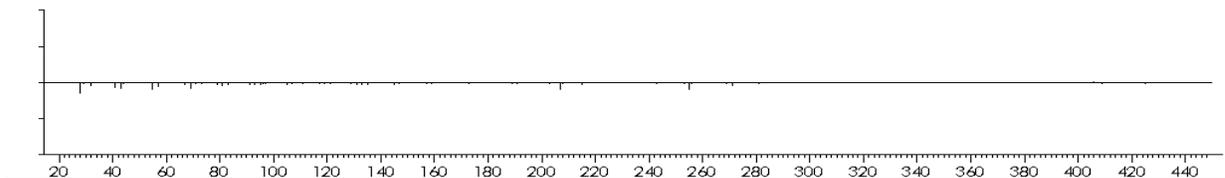
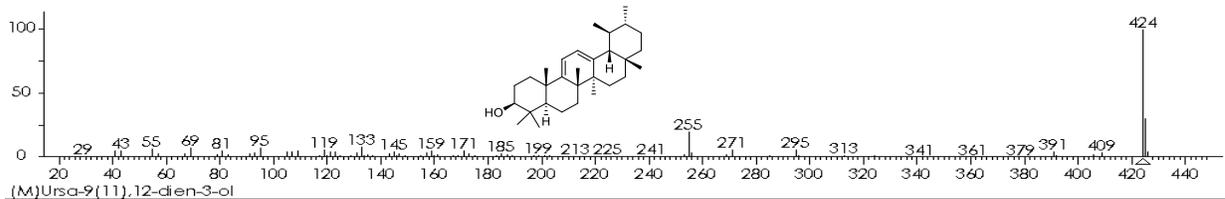


Time-->

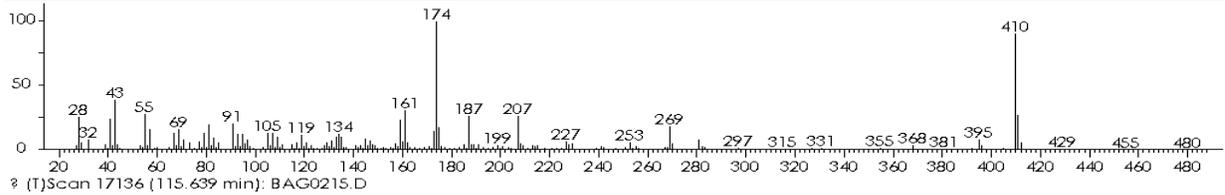
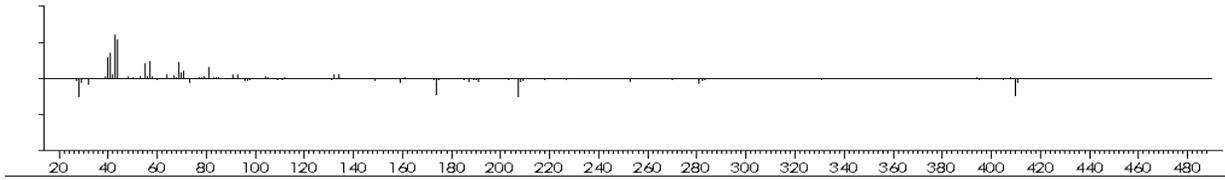
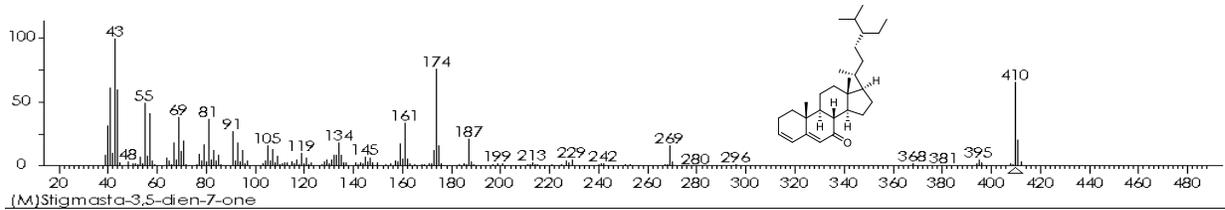
Cromatograma 6. Correspondiente a la muestra BAG02-015 con los compuestos 2-metil-4-(2,6,6-trimetil ciclohex-2-enil)-3-buten-2-ol (51) t_R=47.40, Ursa-9-12-dien-3-ol (52) t_R=111.08 y Tremulona (53) t_R=115.63.



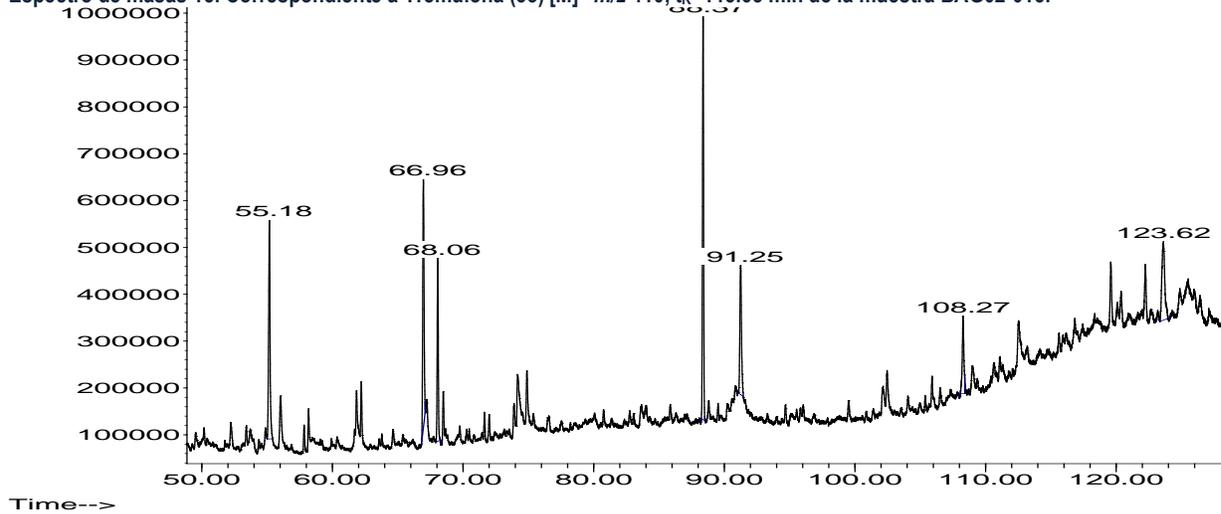
Espectro de masas 13. Correspondiente a 2-Metil-4-(2,6 6-trimetil ciclohex-2-enil)-3-buten-2-ol (51) [M]⁺ m/z 208, t_R=47.40 min, de la muestra BAG02-015.



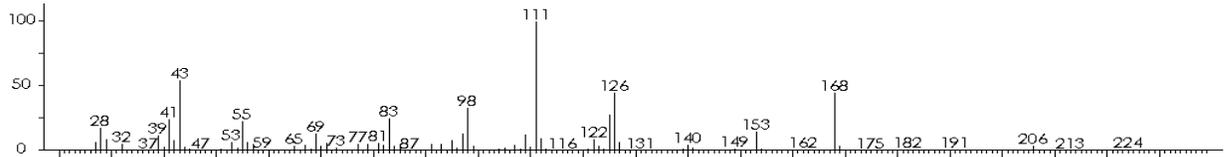
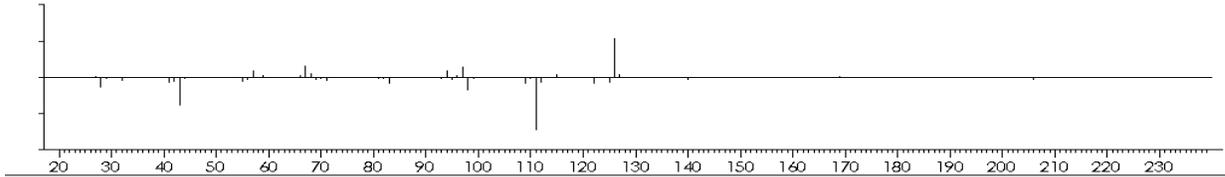
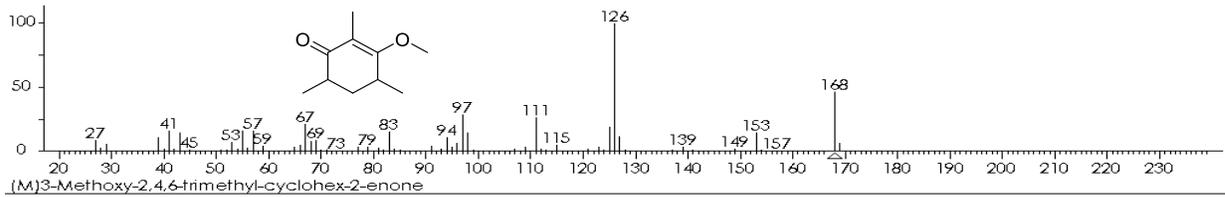
Espectro de masas 14. Correspondiente a Ursa-9-12-dien-3-ol (52) [M]⁺ m/z 424, t_R=111.08 min de la muestra BAG02-015.



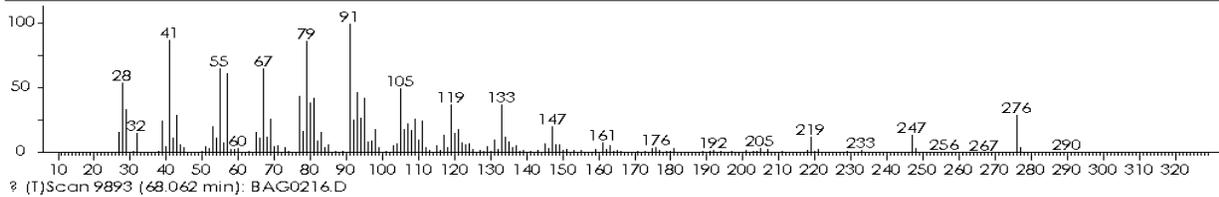
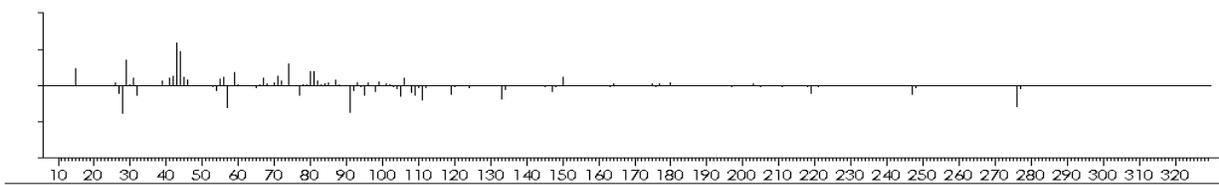
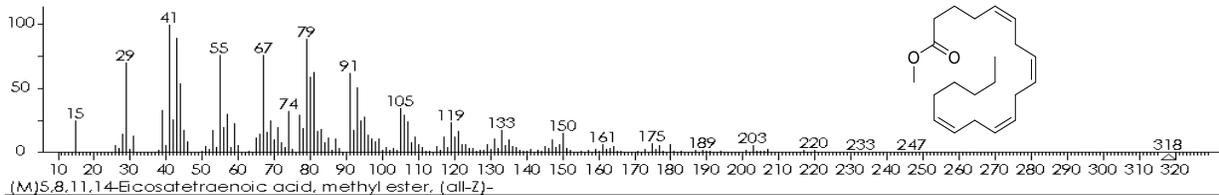
Espectro de masas 15. Correspondiente a Tremulona (53) [M]⁺ m/z 410, t_R=115.63 min de la muestra BAG02-015.



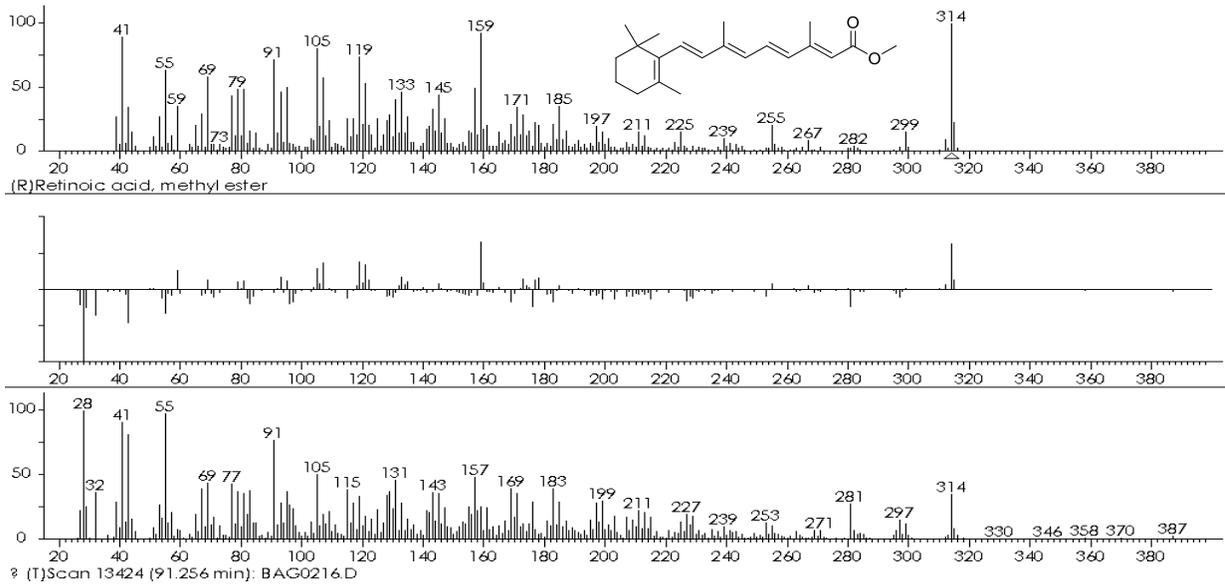
Cromatograma 7. Correspondiente a la muestra BAG02-016 con los compuestos mayoritarios 3-Metoxi-2,4,6-trimetil-2-ciclohexenona (54) t_R=55.18, éster metílico del ácido 5,8,11,14-Eicotetraenoico (z) (55) t_R=68.06, éster metílico del ácido Retinoico (56) t_R=91.26.



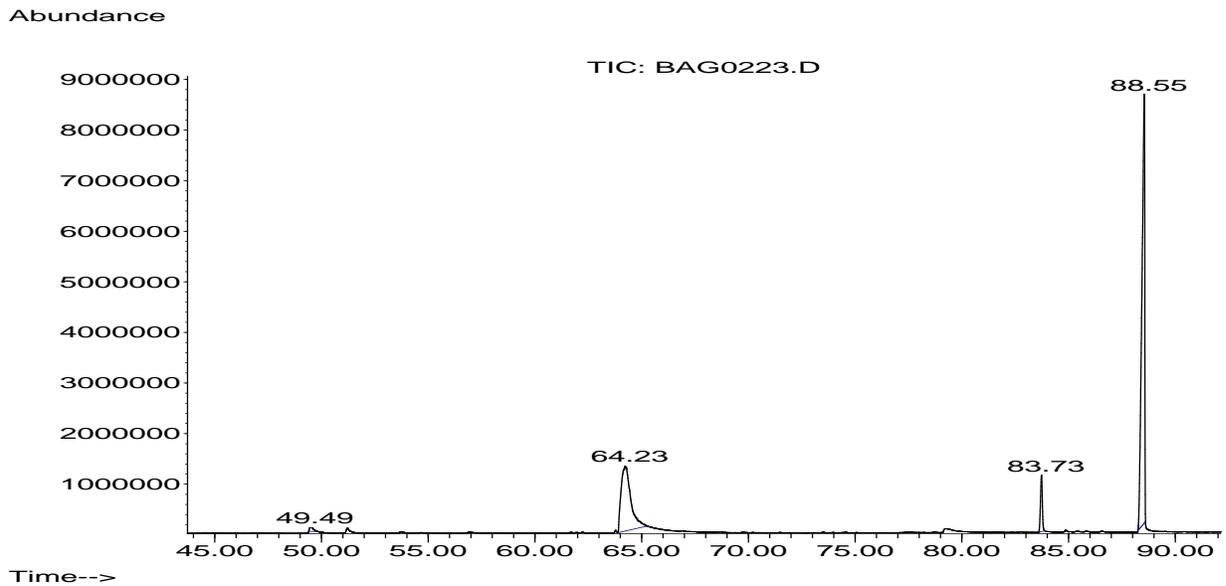
Espectro de masas 16. Correspondiente a 3-Metoxi-2,4,6-trimetil-2-ciclohexenona (50) [M]⁺ m/z 168, t_R=55.18 min de la muestra BAG02-016.



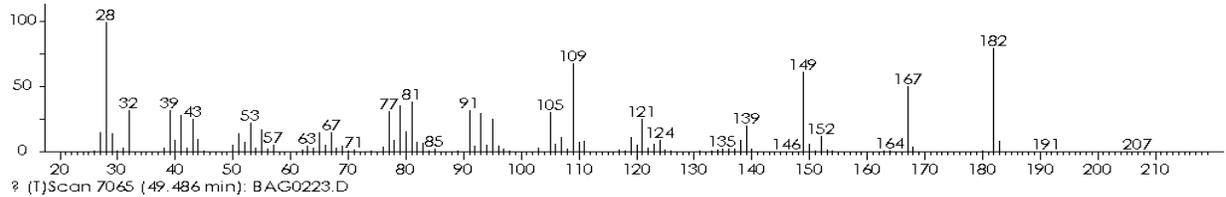
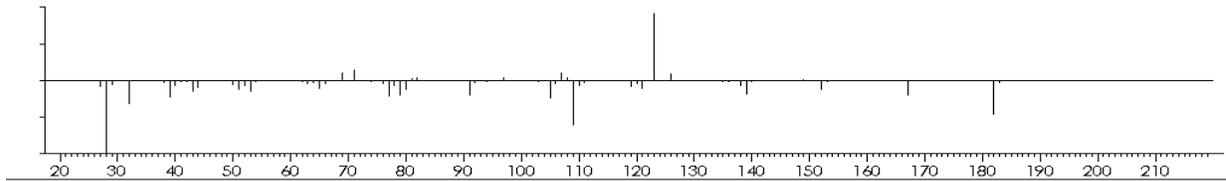
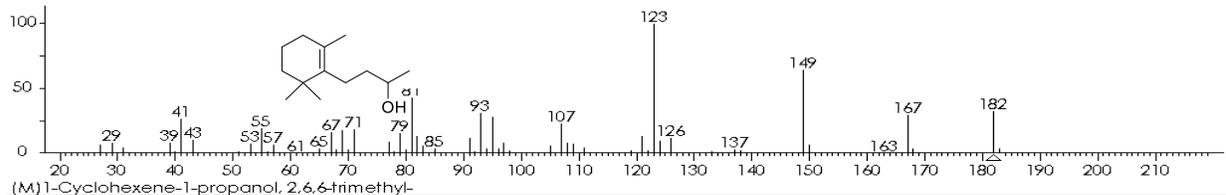
Espectro de masas 4. Correspondiente al éster metílico del ácido 5,8,11,14-Eicotetraenoico (z) (55) [M]⁺ m/z 318, t_R=68.06 min de la muestra BAG02-016.



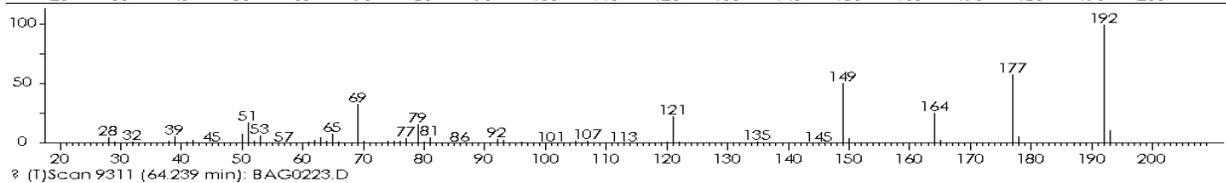
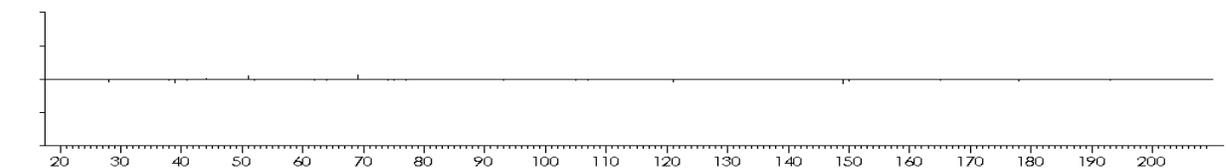
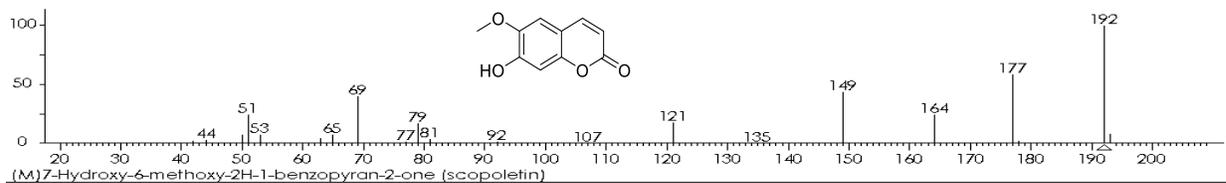
Espectro de masas 18 correspondiente al éster metílico del ácido Retinoico (56) $[M]^+$ m/z 314, $t_R=91.26$ min de la muestra BAG02-016.



Cromatograma 8. Correspondiente a la muestra BAG02-023 con los compuestos β -Dihidroionol (57) $t_R=49.49$ y Escopoletina (58) $t_R=64.23$.

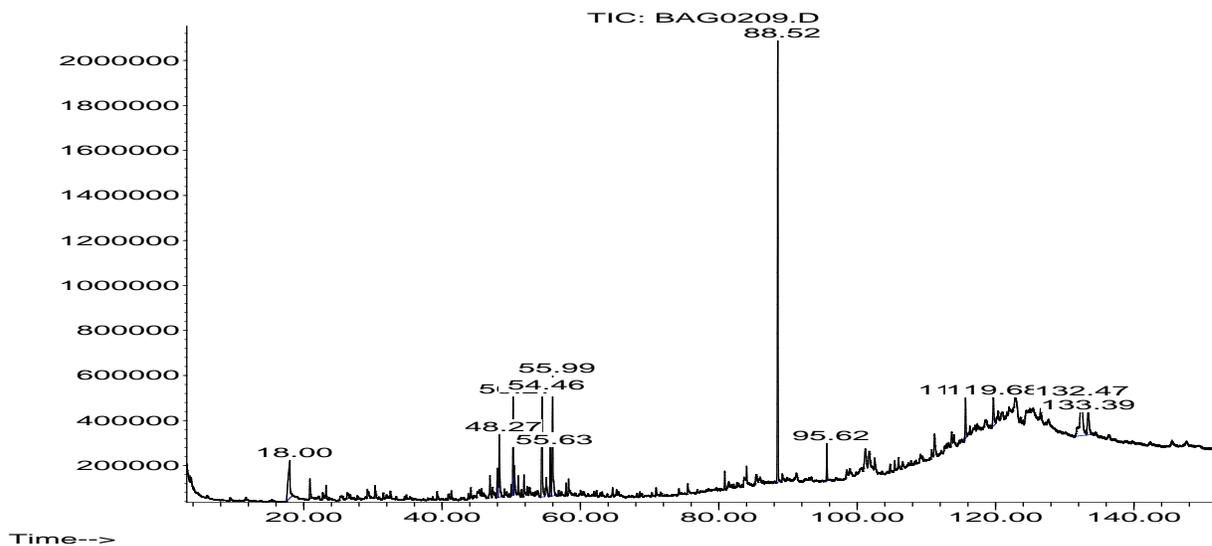


Espectro de masas 19. Correspondiente a β -Dihidroionol (57) [M]⁺ m/z 182, t_R=49.49 min de la muestra BAG02-023

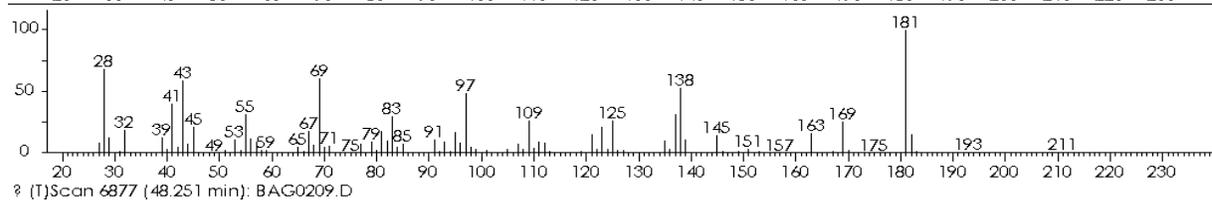
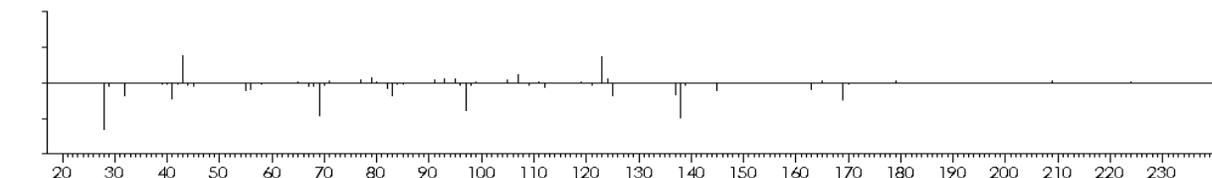
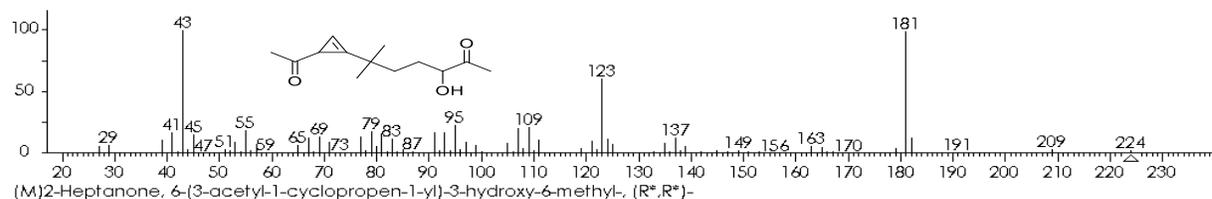


Espectro de masas 20. Correspondiente a Escopoletina I (58) [M]⁺ m/z 192, t_R=64.23 min de la muestra BAG02-023

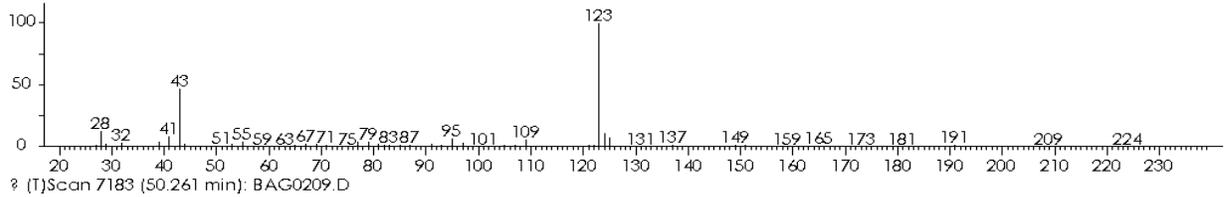
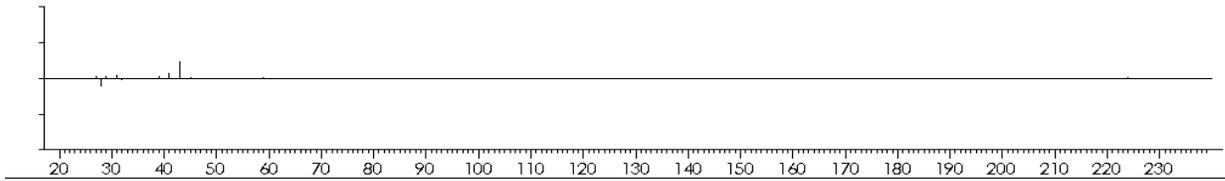
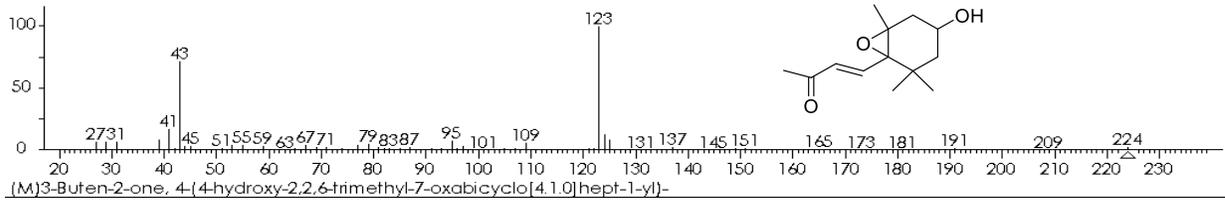
Abundance



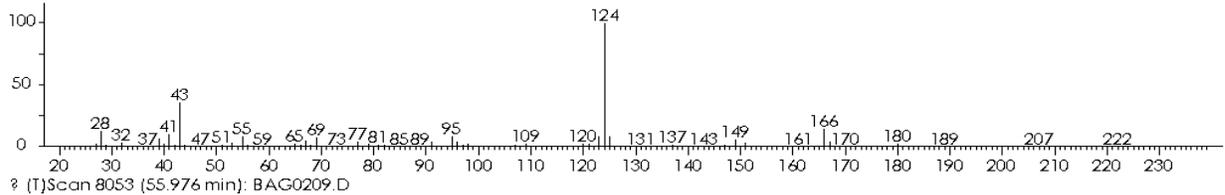
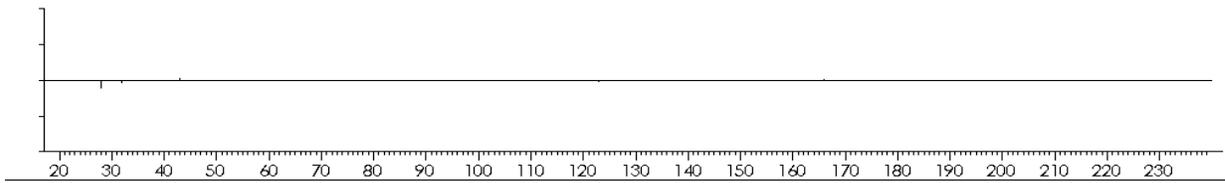
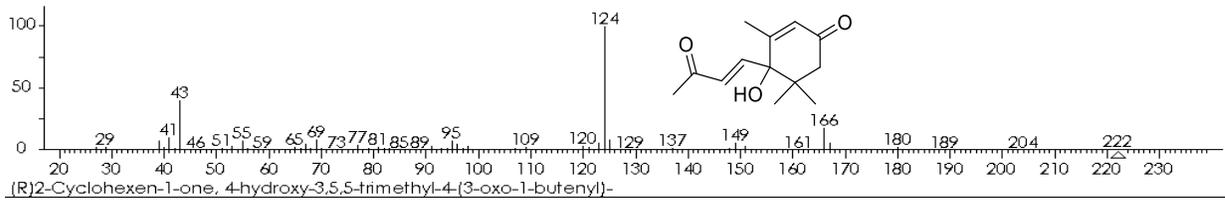
Cromatograma 8. Correspondiente a la muestra BAG02-009 con los compuestos 6-(3-Acetilcicloprop-1-en-1-il)-3-hidroxi-6-metilheptan-2-ona (59) $t_R=48.25$, 3-Hidroxi-5,6-epoxi-beta-ionona (60) $t_R=50.26$ y Dehidrovomifolol (51) $t_R=55.98$.



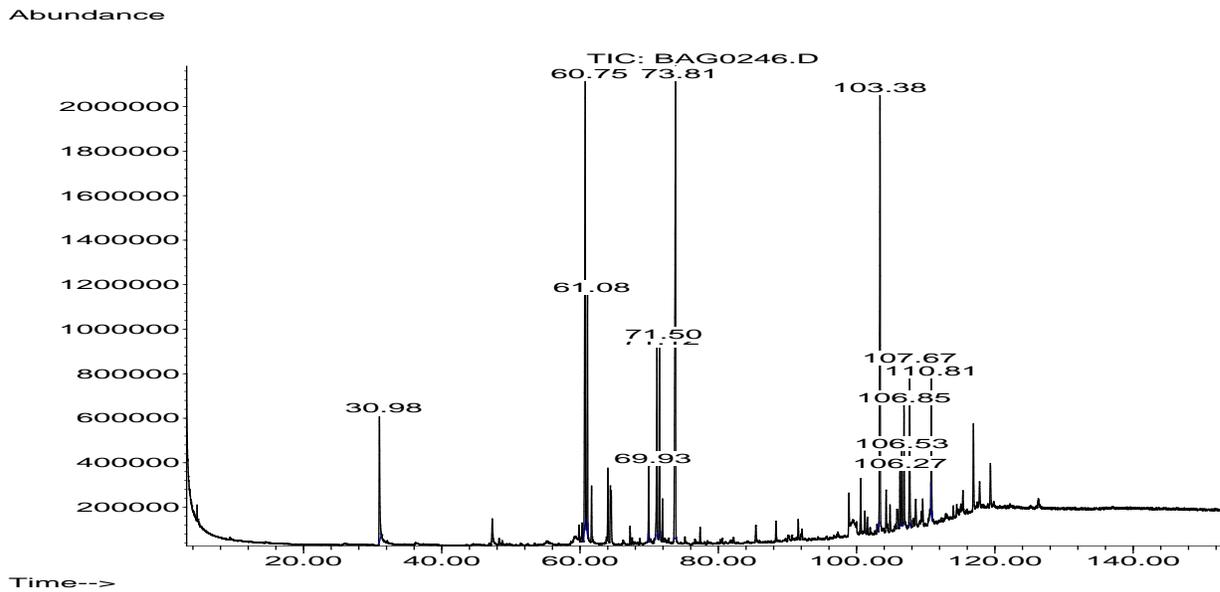
Espectro de masas 21. Correspondiente a 6-(3-Acetilcicloprop-1-en-1-il)-3-hidroxi-6-metilheptan-2-ona (59) $[M]^+$: m/z 224, $t_R=48.25$ min de la muestra BAG02-009.



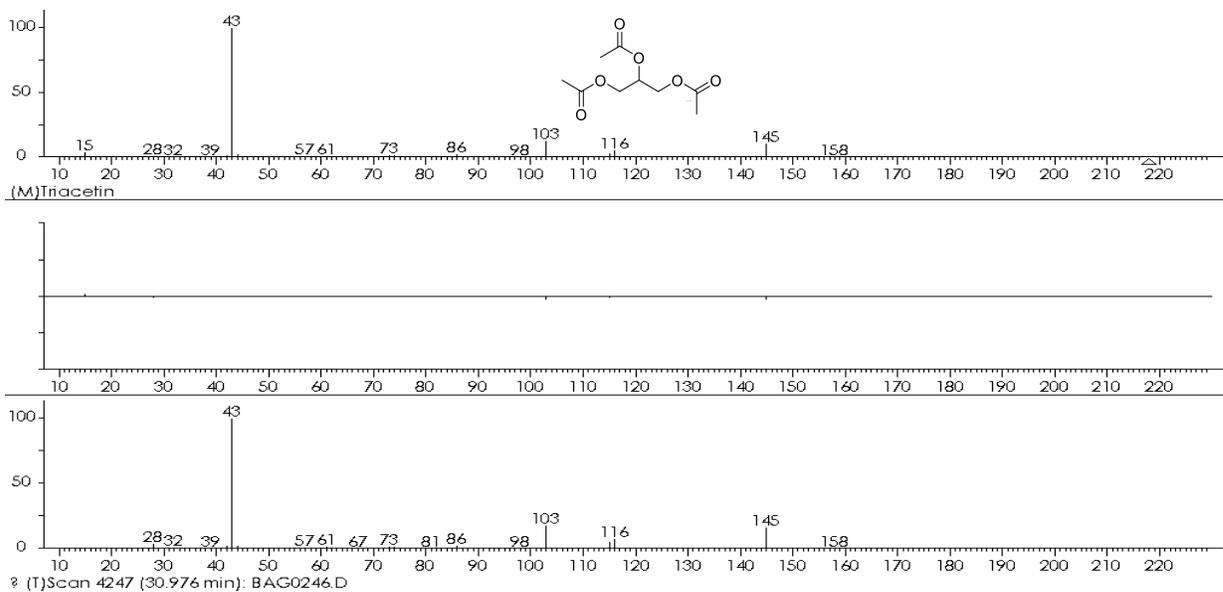
Espectro de masas 22. Correspondiente a 3-Hidroxi-5,6-epoxi-beta-ionona (60) [M]⁺ m/z 224, t_R=50.26 min de la muestra BAG02-009.



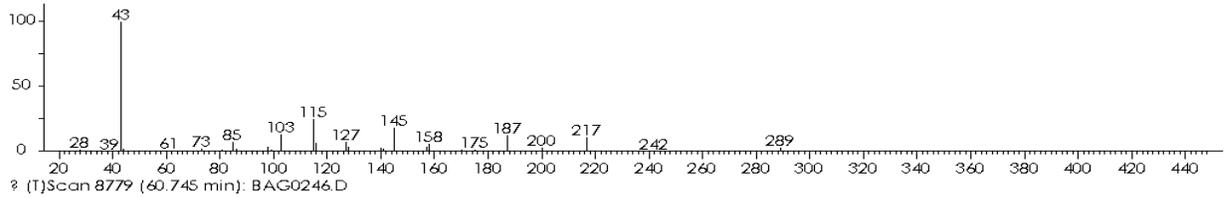
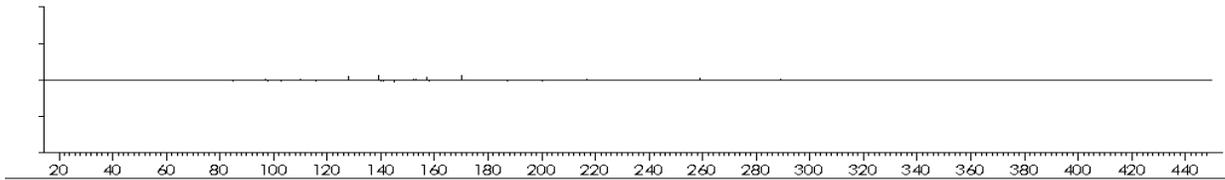
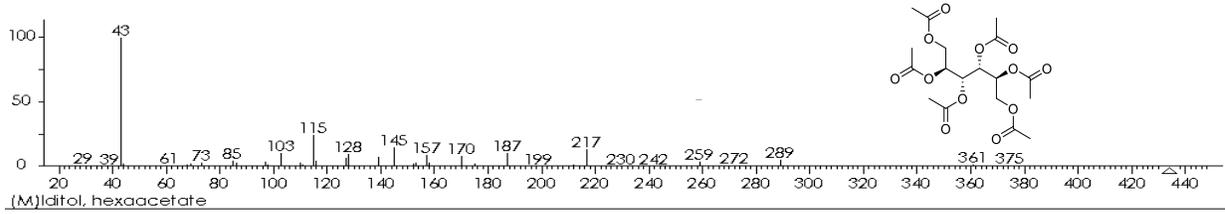
Espectro de masas 23. Correspondiente a Dehidrovomifoliol (61) [M]⁺ m/z 222, t_R=55.98 min de la muestra BAG02-009.



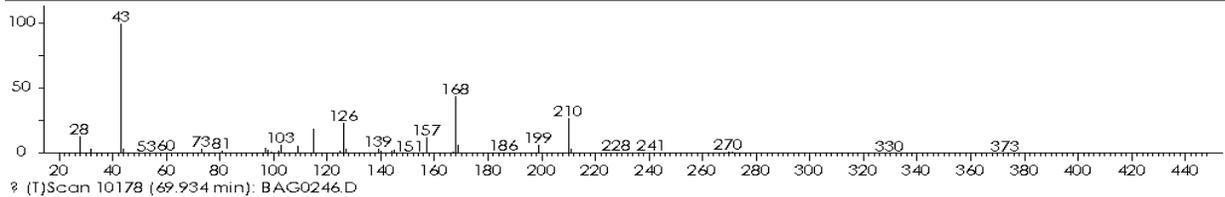
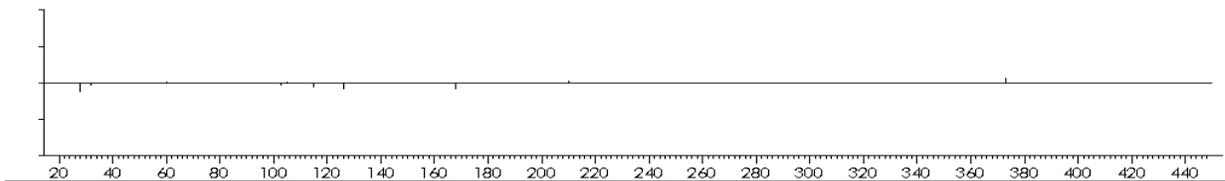
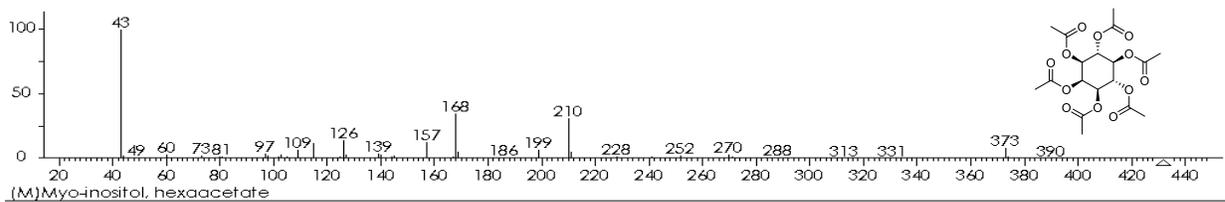
Cromatograma 10. Correspondiente a la muestra BAG02-046 en donde se encuentran los siguientes compuestos: Triacetato de glicerol (63) $t_R=30.97$, Hexaacetato de iditol (64) $t_R=60.74$, Hexaacetato de *myo* Inositol (65) $t_R=69.93$, Hexaacetato de Inositol *cis* (66) $t_R=71.19$, Hexaacetato de Galactitol (67) $t_R=71.49$, Octaacetato de Sucrosa (68) $t_R=106.85$, Octaacetato de Trealosa (69) $t_R=107.67$.



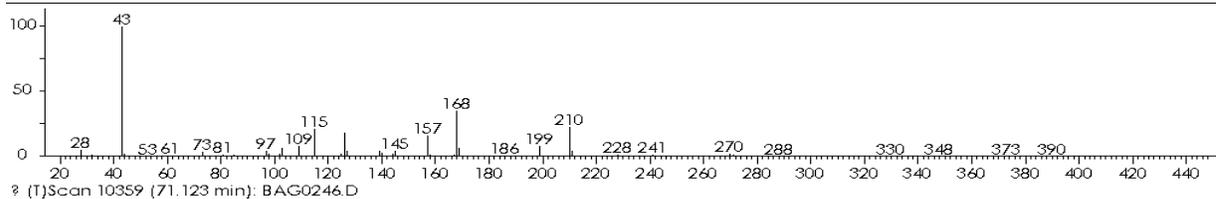
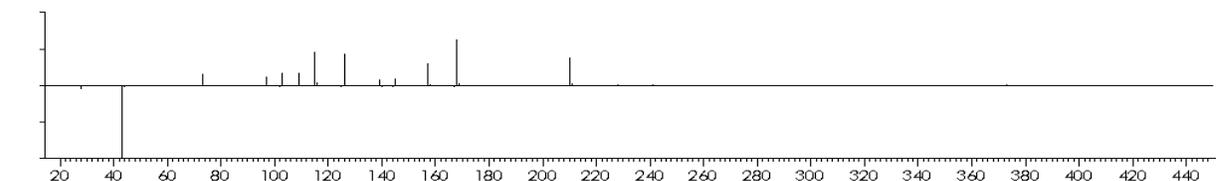
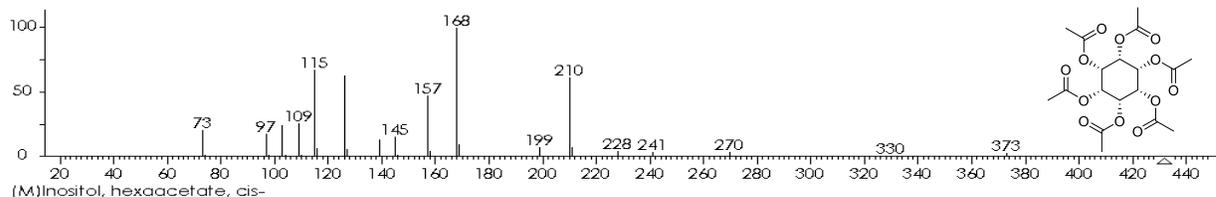
Espectro de masas 24. Corresponde a Triacetato de Glicerol (63) $[M]^+$ m/z 218, $t_R=30.97$ min de la muestra BAG02-046.



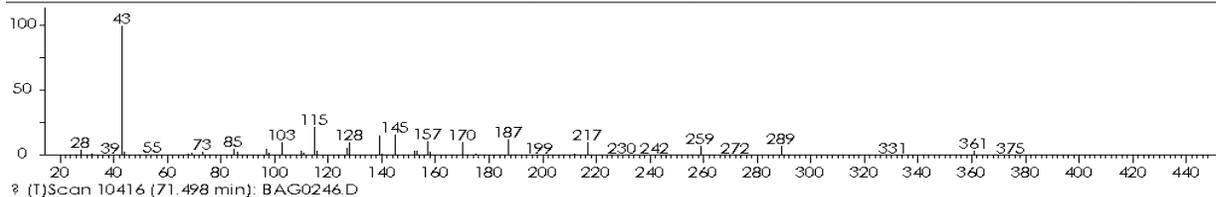
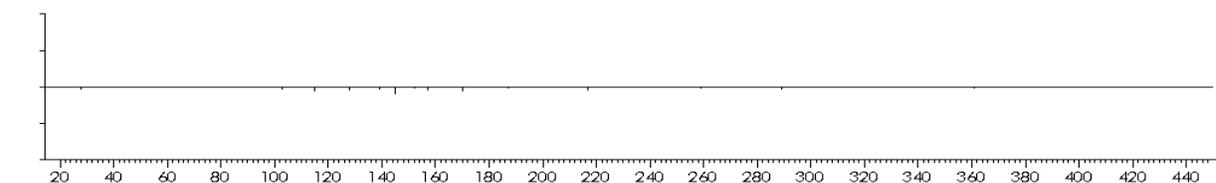
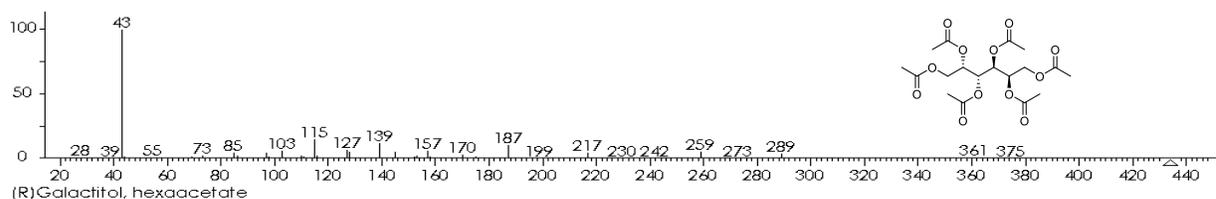
Espectro de masas 25. Corresponde a Hexaacetato de Iditol (64) [M]⁺ m/z 414, t_R=60.74 min de la muestra BAG02-046.



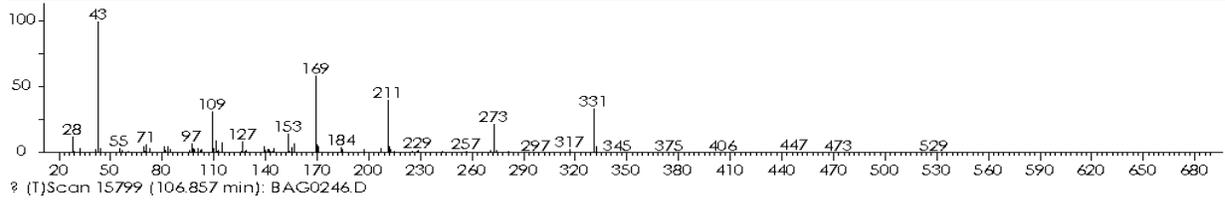
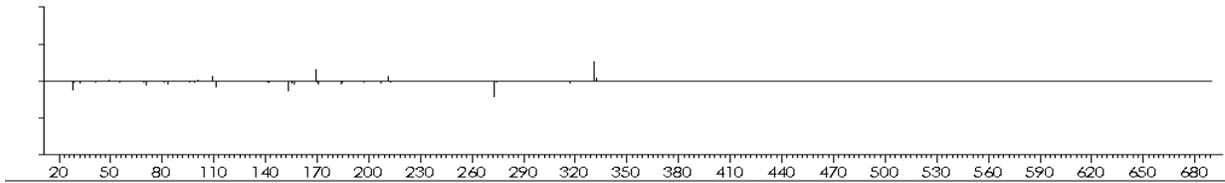
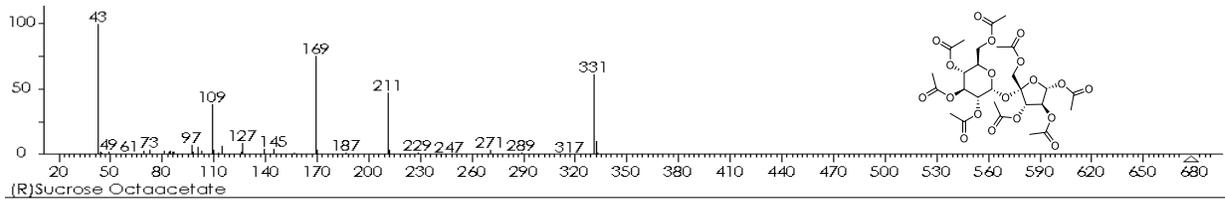
Espectro de masas 26. Corresponde a Hexaacetato de myo Inositol (65) [M]⁺ m/z 432, t_R=69.93 min de la muestra BAG02-046.



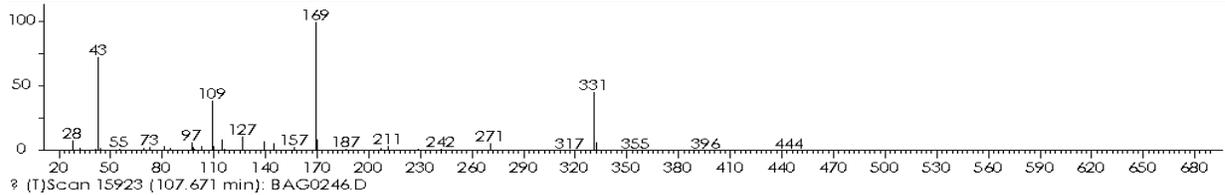
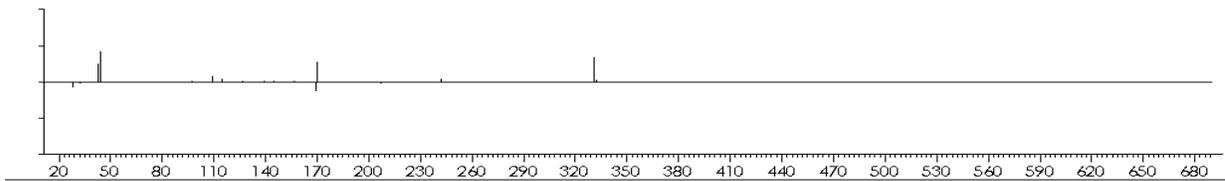
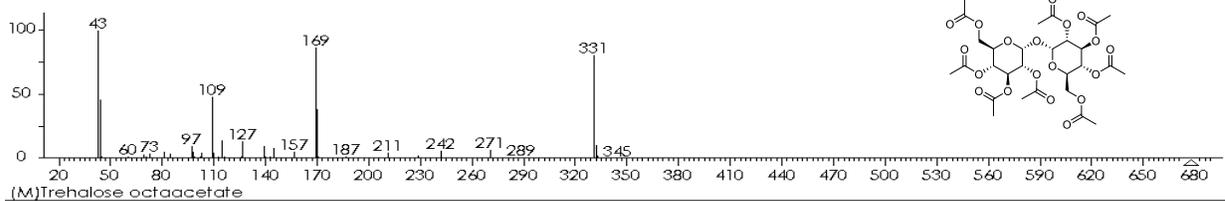
Espectro de masas 27. Correspondiente a Hexaacetato de Inositol *cis* (66) [M]⁺ m/z 432, t_R=71.19 de la muestra BAG02-046.



Espectro de masas 28. Correspondiente a Hexaacetato de Galactitol (67) [M]⁺ m/z 434, t_R=71.49 min de la muestra BAG02-046.

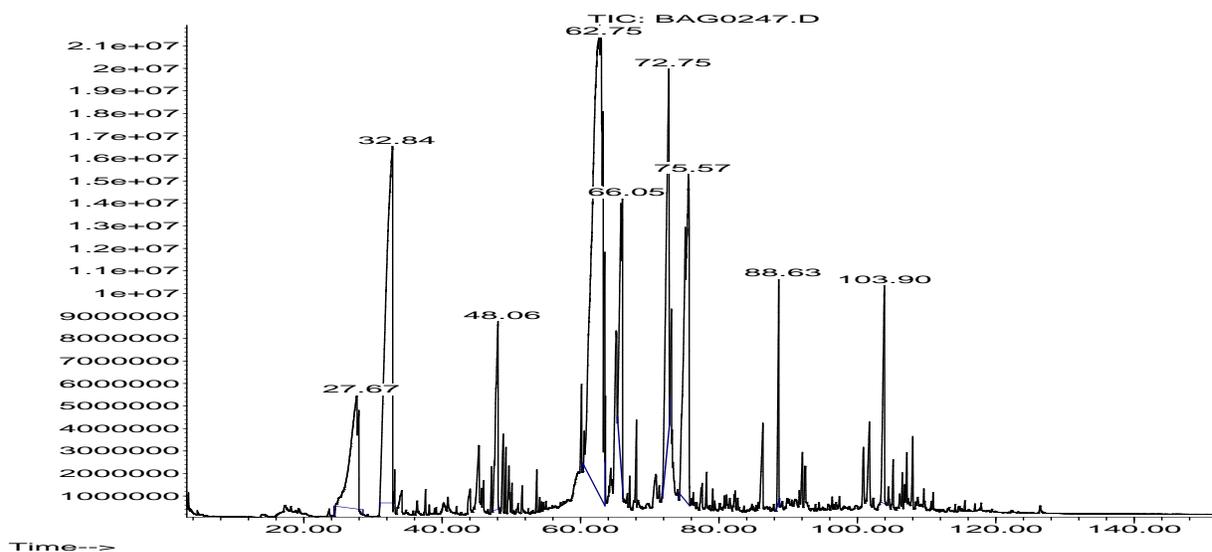


Espectro de masas 29. Correspondiente a Octaacetato de Sucrosa (67) [M]⁺: m/z 664, t_R=106.86 min de la muestra BAG02-046.

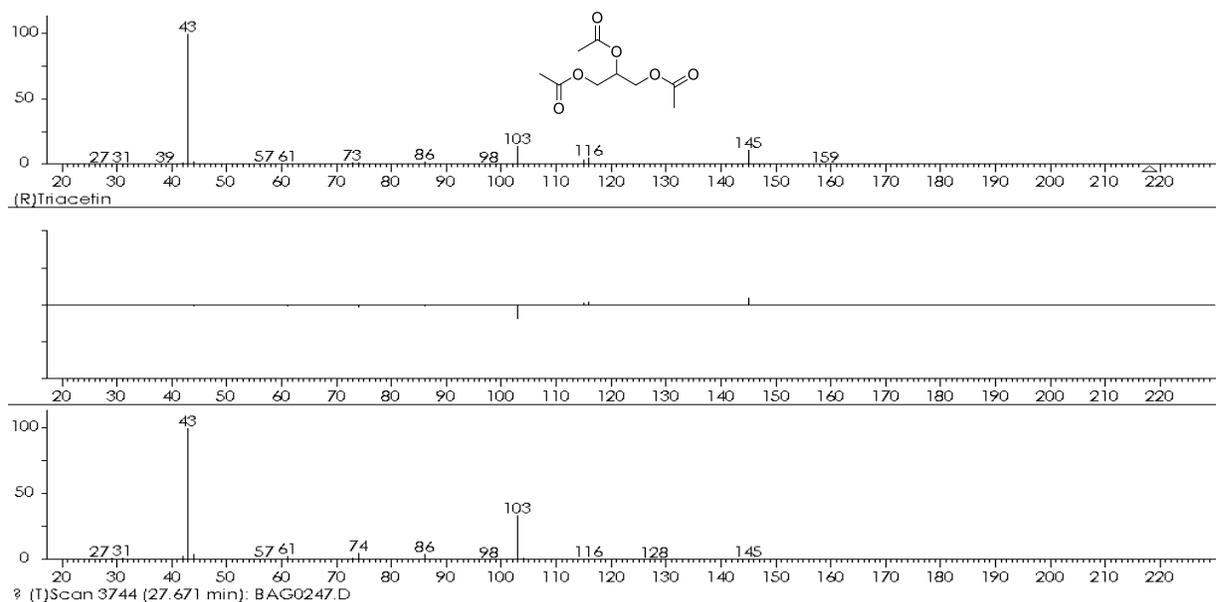


Espectro de masas 30. Corresponde a Octaacetato de Trealosa (69) [M]⁺: m/z 678, t_R=107.67 min de la muestra BAG02-046.

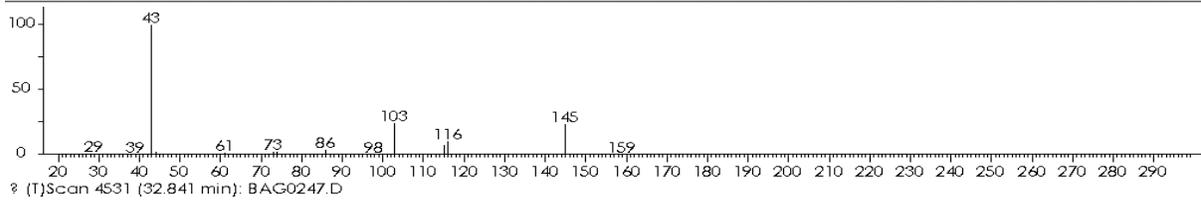
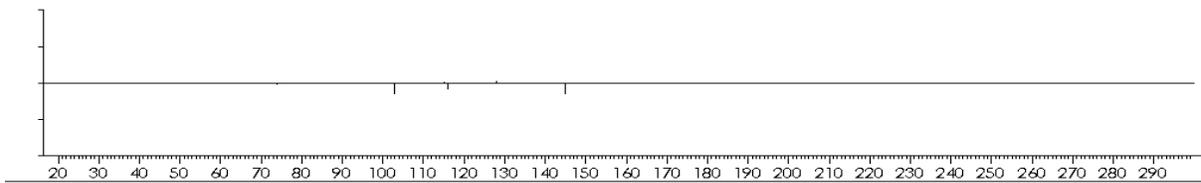
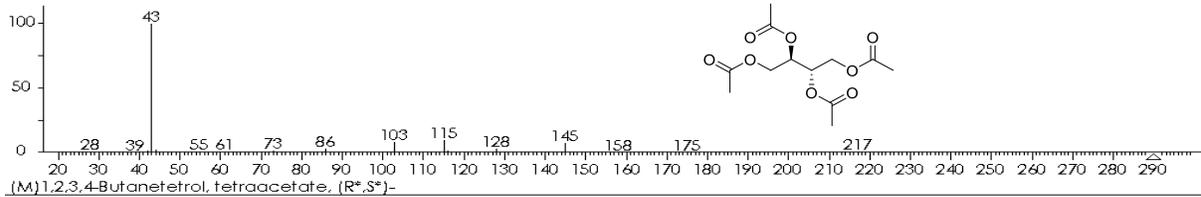
Abundance



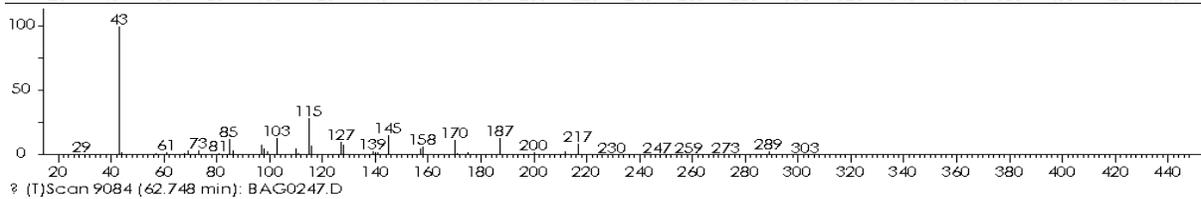
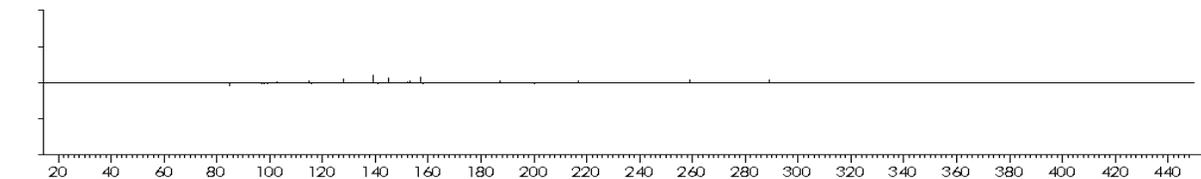
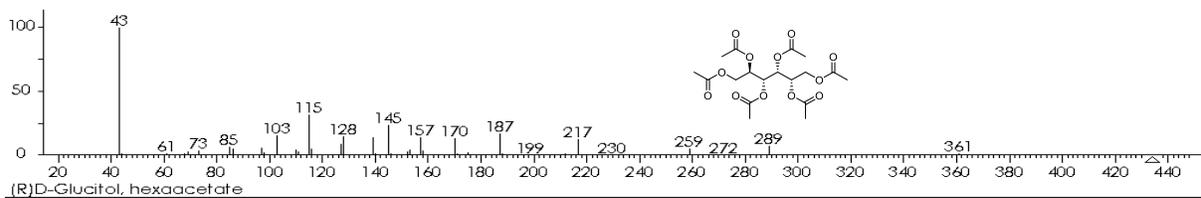
Cromatograma 11. Correspondiente a la muestra BAG02-047 en donde se encuentran los siguientes compuestos: Triacetato de Glicerol (63) $t_R=27.67$, R-S-Tetraacetato de 1,2,3,4-Butanotetrol (70) $t_R=32.84$, Hexaacetato de *D*-Glucitol (71) $t_R=62.75$, Hexaacetato de Galactitol (67) $t_R=72.74$, Tetraacetato de 1-propil- β -*D*-Glucosa (72) $t_R=75.57$.



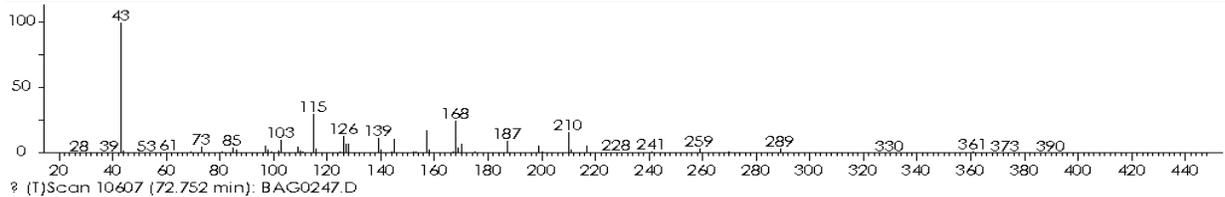
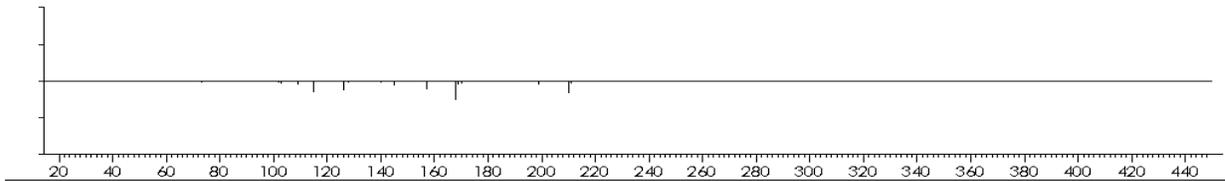
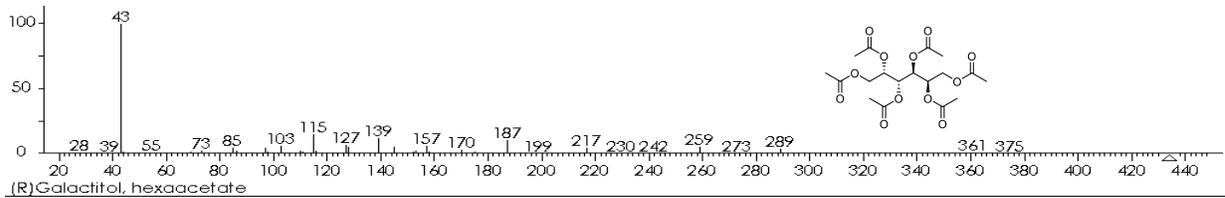
Espectro de masas 31. Correspondiente a Triacetato de Glicerol (63) $[M]^+$ m/z 218, $t_R=27.67$ de la muestra BAG02-047.



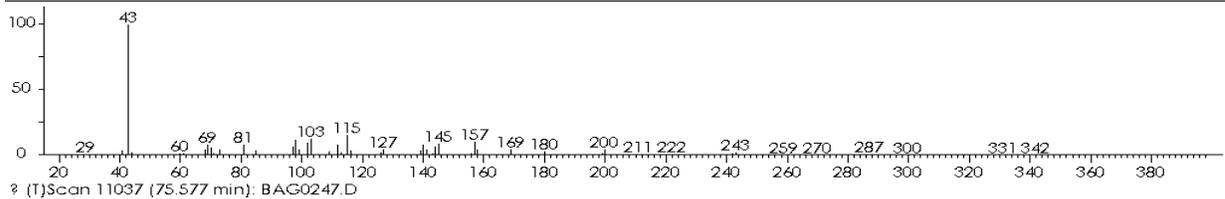
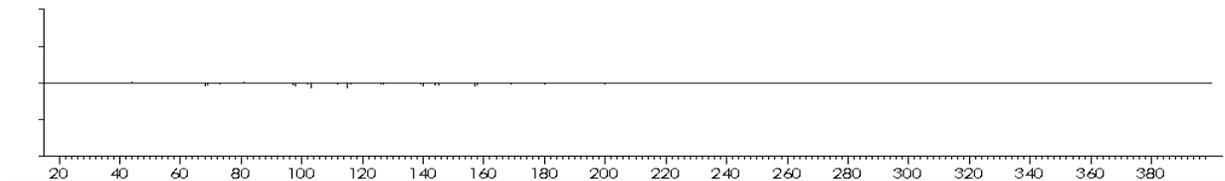
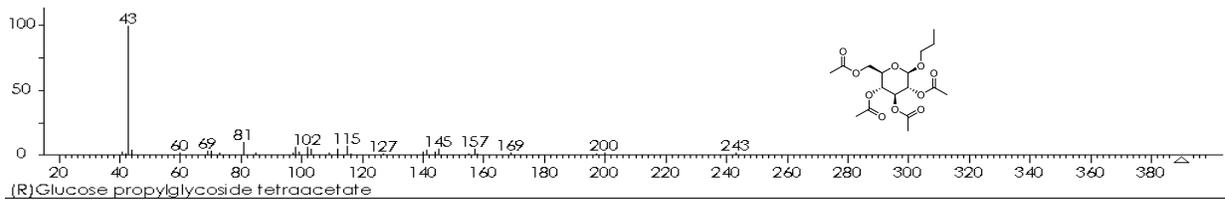
Espectro de masas 32. Corresponde a acetato de R-S-Tetraacetato de 1, 2, 3, 4-Butanotetrol (70) [M]⁺ m/z 290, t_R=32.84 min de la muestra BAG02-047



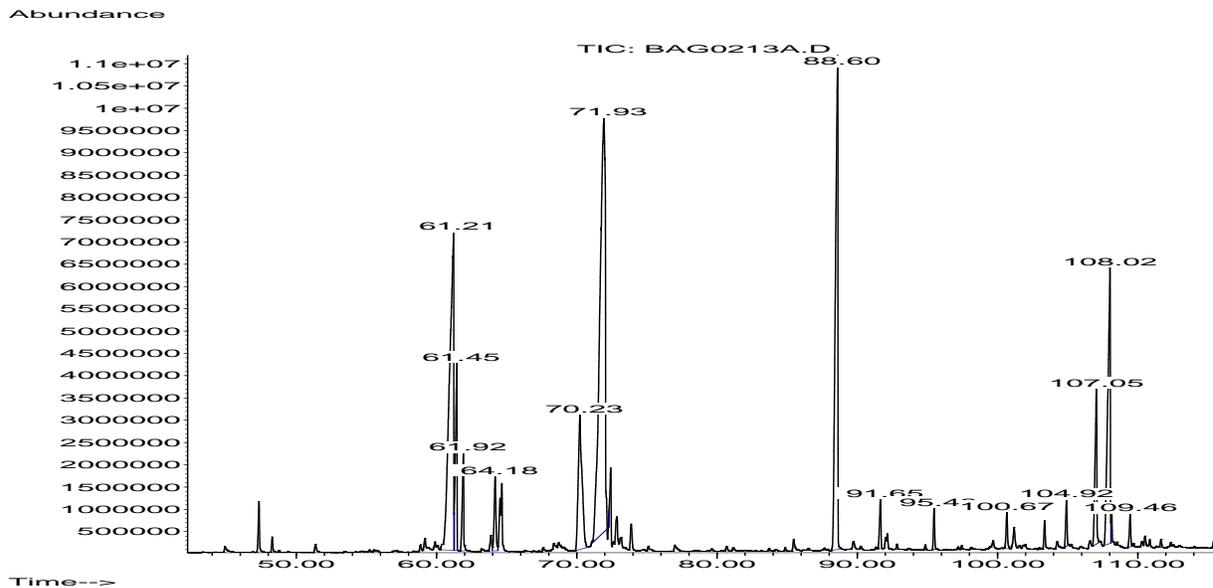
Espectro de masas 33. Corresponde a Hexaacetato de D-Glucitol (71) [M]⁺ m/z 434, t_R=62.75 min de la muestra BAG02-047.



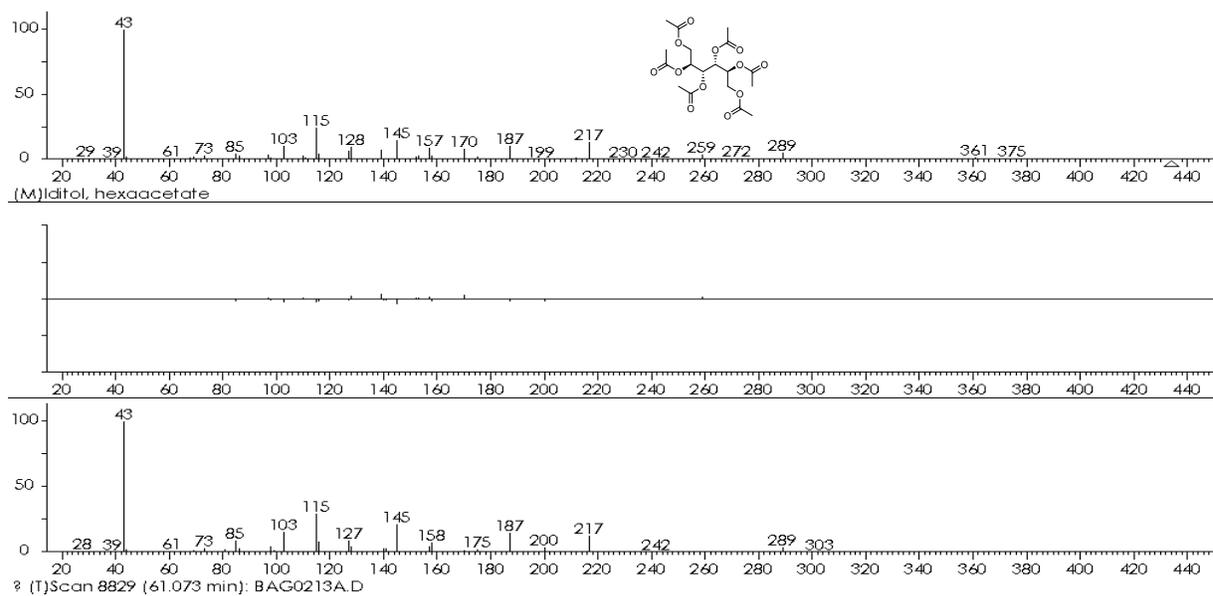
Espectro de masas 34. Corresponde a Hexaacetato de Galactitol (67) [M]⁺ m/z 434, t_R=72.74 min de la muestra BAG02-047.



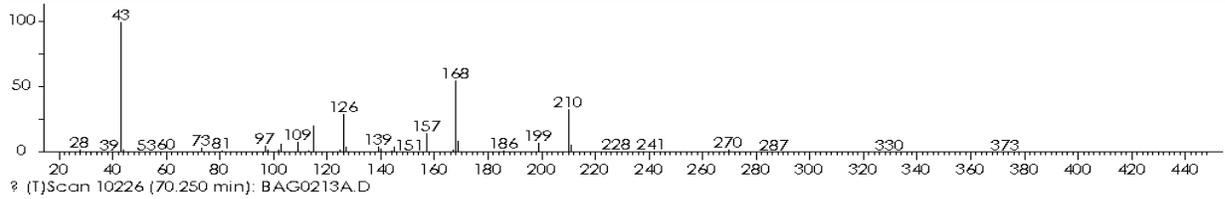
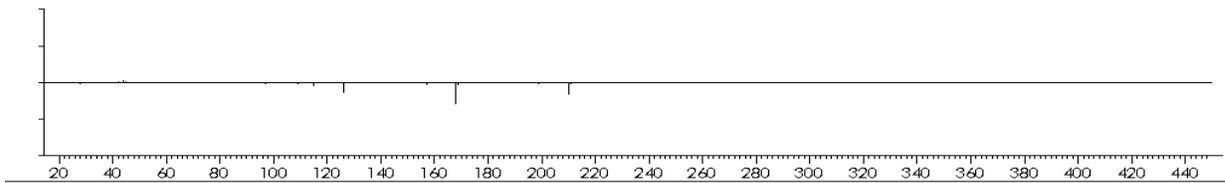
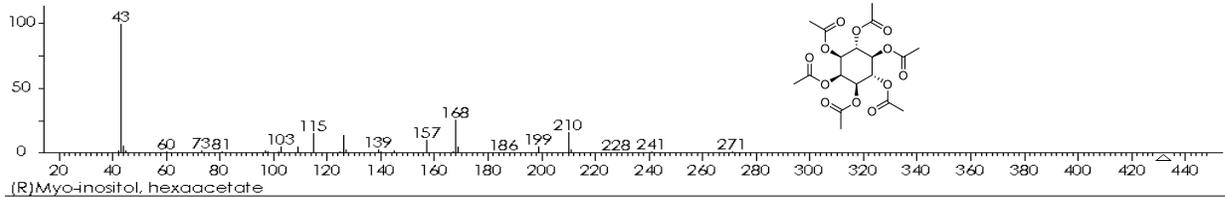
Espectro de masas 35. Corresponde a Tetraacetato de 1-Propil-β-D-glucosa (72) [M]⁺ m/z 390, t_R=75.57 min de la muestra BAG02-047.



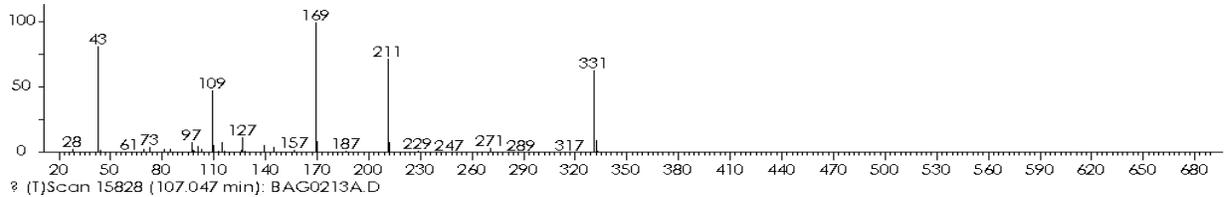
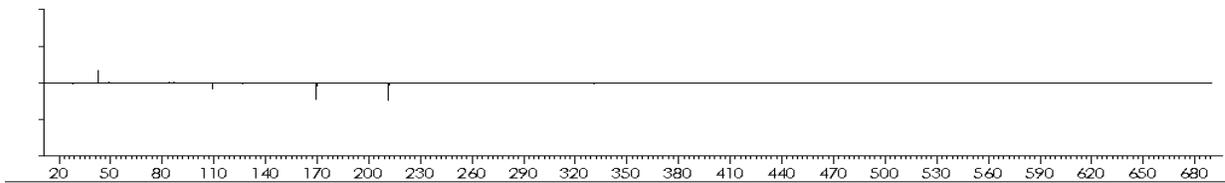
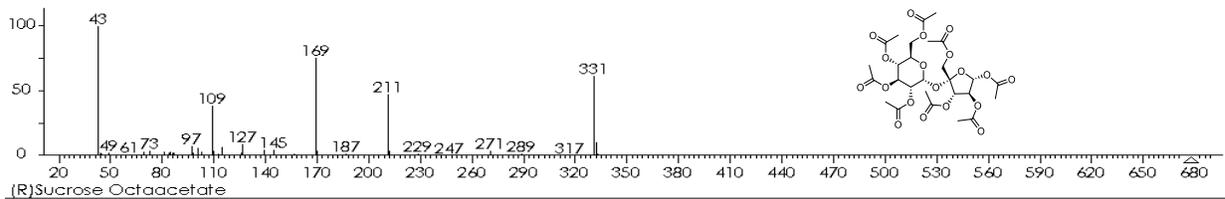
Cromatograma 12. Correspondiente a la muestra BAG02-013 en donde se encuentran los siguientes compuestos: hexaacetato de iditol (64) $t_R=61.21, 61.86$, Hexaacetato de myo Inositol (65) $t_R=70.25, 71.93$, Octaacetato de Sucrosa (68) $t_R=107.05$, Octaacetato de Trealosa (69) $t_R=108.02$.



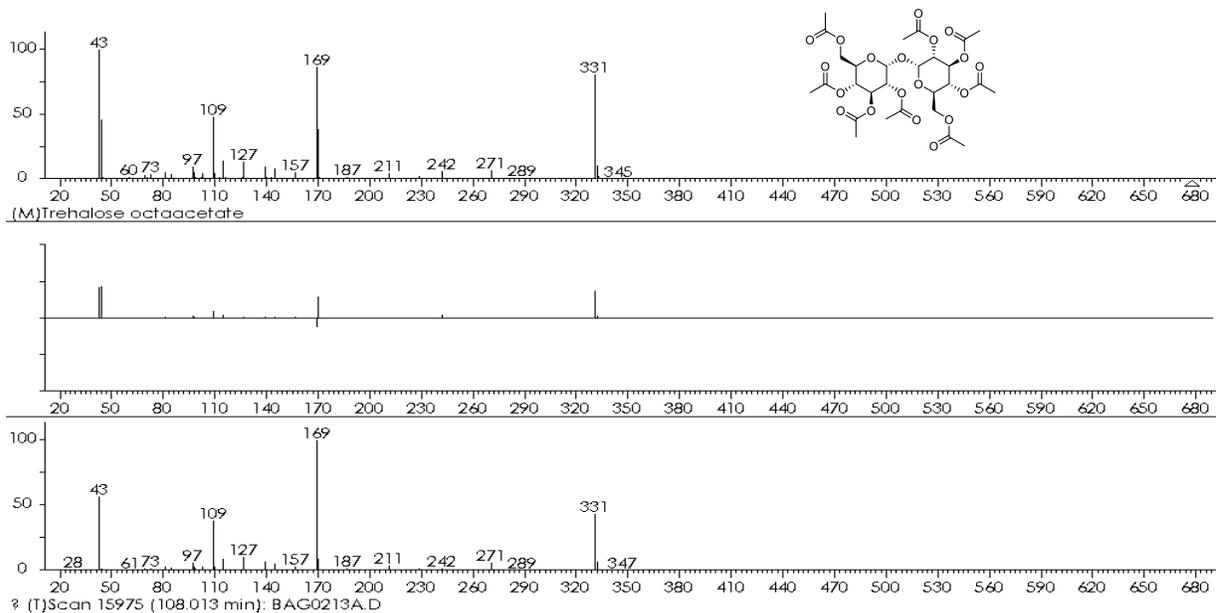
Espectro de masas 36. Correspondiente a Hexaacetato de Iditol (64) $[M]^+ m/z 414$, $t_R=61.21, 61.86$ min de la muestra BAG02-013.



Espectro de masas 37. Hexaacetato de myo Inositol (65) [M]⁺ m/z 432, t_R=70.25, 71.93 de la muestra BAG02-013.



Espectro de masas 38. Corresponde a Octaacetato de Sucrosa (68) [M]⁺ m/z 664, t_R=107.05 de la muestra BAG02-013.



Espectro de masas 39. Corresponde a Octaacetato de Trealosa (69) [M]⁺. m/z 678, t_R=108.02 min de la muestra BAG02-013.

BIBLIOGRAFÍA

15 BIBLIOGRAFÍA.

1. Guo, Z. The modification of natural products for medical use. *Acta Pharm. Sin. B* **7**, 119–136 (2017).
2. Dewick, P. M. & Wiley, J. *Medicinal Natural Products Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach 3rd Edition*. (2009).
3. Dar, R. A., Shahnawaz, M., Rasool, S., Qazi, P. H. & Qazi, H. Natural product medicines: A literature update. *J. Phytopharm.* **6**, 340–342 (2017).
4. Newman, D. J., Cragg, G. M. & Snader, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* **17**, 215–234 (2000).
5. Koehn, F. E. & Carter, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 206–220 (2005).
6. Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **75**, 311–355 (2012).
7. Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M. S. & Hoyer, D. An analysis of FDA-approved drugs: Natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today* vol. 21 204–207 (2016).
8. José de Sousa Trindade, M. & Alves Lameira, O. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. *Rev. Cuba. Plantas Med.* **19**, 292–309 (2014).
9. Webster, G. L. Classification of the Euphorbiaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **81**, 3–32 (1994).
10. Mabberley, D. J. *The plant-book : a portable dictionary of the higher plants*. (Cambridge University Press, 1987).
11. Oldfield, S. *Cactus and succulent plants : status survey and conservation action plan*. (1997).
12. Gordillo, M. M. *et al.* Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. *Ser. Botánica* **73**, 155–281 (2002).
13. Torres-González, D. & García-Guzmán, G. Análisis del papel de los caracteres foliares de *Cnidoscolus* (Euphorbiaceae) en la defensa contra herbívoros y patógenos. *TIP Rev. Espec. en*

- Ciencias Químico-Biológicas* **17**, 126–134 (2014).
14. Jiménez-Arellanes, M. A., García-Martínez, I. & Rojas-Tomé, S. Potencial biológico de especies medicinales del género *Cnidoscolus* (Euphorbiaceae). *Rev. Mex. Ciencias Farm.* **45**, 1–6 (2014).
 15. Agra, M. de F., Silva, K. N., Basílio, I. J. L. D., Freitas, P. F. de & Barbosa-Filho, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* **18**, 472–508 (2008).
 16. de Oliveira-Júnior, R. G. *et al.* Phytochemical and pharmacological aspects of *Cnidoscolus* Pohl species: a systematic review. *Phytomedicine* **50**, 137–147 (2017).
 17. De Melo, J. G., Santos, A. G., De Amorim, E. L. C., Nascimento, S. C. Do & De Albuquerque, U. P. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: An ethnobotanical approach. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* vol. 2011 1–14 (2011).
 18. De Albuquerque, U. P. D. The use of medicinal plants by the cultural descendants of African people in Brazil. *Acta Farm. Bonaer.* **20**, 139–144 (2001).
 19. de Albuquerque, U. P. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: A study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **2**, 1–10 (2006).
 20. de Albuquerque, U. P., Monteiro, J. M., Ramos, M. A. & de Amorim, E. L. C. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. *J. Ethnopharmacol.* **110**, 76–91 (2007).
 21. José, T., Silva, D., Sobrinho, P. & Gonçalves-Silva, T. Antiproliferative activity of species of the genus *Cnidoscolus* against HT-29, Hep-2 and NCI-H292 cells. *Mol. Clin. Pharmacol.* **3**, 55–61 (2012).
 22. Kolterman, D. A., Breckon, G. J. & Kowal, R. R. Chemotaxonomic Studies in *Cnidoscolus* (Euphorbiaceae). II. Flavonoids of *C. aconitifolius*, *C. souzae*, and *C. spinosus*. *J. Complement. Altern. Med. Res.* **5**, 1–9 (1984).
 23. Ikechukwu lyke, W. *et al.* Investigation of Phytocomponents and Hypoglycaemic Effect of Hydro-methanolic Leaf Extract of *Cnidoscolus aconitifolius*(Spinach Tree) in Streptozotocin Induced - Diabetic Wistar Rats. *J. Complement. Altern. Med. Res.* **5**, 1–9 (2018).
 24. Abayomi, O., Olorunfemi, E. O. & Mikailu, S. Phytochemical analysis of *cnidoscolus aconitifolius*

- (Euphorbiaceae) leaf with spectrometric techniques. *Niger. J. Pharm. Appl. Sci. Res.* **3**, 38–49 (2014).
25. Chukwunonye, U. C. E., Gaza, A. S. P., Obisike, C. V., Nweze, A. & Obioma, D. E. Pharmacognostic studies of the leaf of *cnidoscolus aconitifolius*. *Indo Am. J. Pharm. Sci.* **4**, 496–506 (2017).
 26. Paredes, P. F. M. *et al.* Screening of Bioactivities and Toxicity of *Cnidoscolus quercifolius* Pohl. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2016**, 1–9 (2016).
 27. da Silva Peixoto Sobrinho, T. J. *et al.* Phytochemical screening and antibacterial activity of four *Cnidoscolus* species (Euphorbiaceae) against standard strains and clinical isolates. *J. Med. Plants Res.* **6**, 3742–3748 (2012).
 28. Yuan, W. *et al.* Flavonoids, Coumarins and Triterpenes from the Aerial Parts of *Cnidoscolus texanus*. *Planta Med.* **73**, 1304–1308 (2007).
 29. Dominguez, X. A. *et al.* Isolation and Identification of Xochitloldione and Isoxochitlolone from *Cnidosculus urens*. *J. Nat. Prod.* **55**, 221–224 (1992).
 30. Medzhitov, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell* **140**, 771–776 (2010).
 31. Robbins, S. L. (Stanley L., Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. & Mitchell, R. N. *Patología humana*. (Elsevier España, 2008).
 32. Uribe Juana Ángel., Rugeles López, M. T., Patiño Pablo Javier & Montoya Guarín, C. J. *Inmunología una ciencia activa*. (Editorial Universidad de Antioquia, 2009).
 33. Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., Kuby, J. & Palacios Martínez, R. *Inmunología de Kuby*. (McGraw-Hill Interamericana, 2007).
 34. Lorenzo-Velázquez, B. 1901-1985. & Lorenzo Fernández, P. de. *Farmacología básica y clínica*. (Médica Panamericana, 2008).
 35. Inflamacion, S. *Sociedad Cubana de Farmacología*. (2001).
 36. García-argüez, A. N., Apan, T. O. R., Delgado, H. P. & Velázquez, G. Anti-Inflammatory Activity of Coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA Ear Mice Model. *Planta Med.* **66**, 279–281 (2000).

37. OECD/OCDE. *OECD/OCDE 420 OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure INTRODUCTION*. https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl420.pdf (2001).
38. Ohyama, K., Suzuki, M., Masuda, K., Yoshida, S. & Muranaka, T. Chemical Phenotypes of the hmg1 and hmg2 Mutants of Arabidopsis Demonstrate the In-planta Role of HMG-CoA Reductase in Triterpene Biosynthesis. *Chem. Pharm. Bull.* **55**, 1518–1521 (2007).
39. Ibrahim, A. R. S., Galal, A. M., Ahmed, M. S. & Mossa, G. S. O-demethylation and sulfation of 7-methoxylated flavanones by *Cunninghamella elegans*. *Chem. Pharm. Bull.* **51**, 203–206 (2003).
40. Maldonado, E. M., Salamanca, E., Giménez, A. & Sterner, O. Antileishmanial metabolites from *Lantana balansae*. *Brazilian J. Pharmacogn.* **26**, 180–183 (2016).
41. Forino, M., Tartaglione, L., Dell'Aversano, C. & Ciminiello, P. NMR-based identification of the phenolic profile of fruits of *Lycium barbarum* (goji berries). Isolation and structural determination of a novel N-feruloyl tyramine dimer as the most abundant antioxidant polyphenol of goji berries. *Food Chem.* **194**, 1254–1259 (2016).
42. Khan, M. S. H. and N. M. M. U. Scopoletin and β -sitosterol glucoside from roots of *Ipomoea digitata*. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **4**, 5–7 (2015).
43. Swisłocka, R., Kowczyk-sadowy, M. & Kalinowska, M. Spectroscopic (FT-IR , FT-Raman , ^1H and ^{13}C NMR) and theoretical studies of p-coumaric acid and alkali metal p-coumarates. *J. Spectrosc.* **27**, 35–48 (2012).
44. Itokawa, H., Suto, K. & Takeya, K. Studies on a novel p-coumaroyl glucoside of apigenin and on other flavonoids isolated from patchouli (*Labiatae*). *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 254–256 (1981).
45. Rahman, W. *et al.* Prunin-6"-O-p-coumarate, a new acylated flavanone glycoside from *Anacardium occidentale*. *J. Phytochem.* **17**, 1064–1065 (1968).
46. Fernández, M. A., de las Heras, B., García, M. D., Sáenz, M. T. & Villar, A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *J. Pharm. Pharmacol.* **53**, 1533–1539 (2001).
47. Del Carmen Susunaga-Notario, A. *et al.* Bioassay-guided chemical study of the anti-inflammatory effect of senna villosa (Miller) H.S. Irwin & Barneby (*Leguminosae*) in TPA-induced ear edema.

Molecules **19**, 10261–10268 (2014).

48. Wang, Q., Wu, J., Wu, R., Han, N. & Dai, N. Anti-inflammatory effect and isolation of phenylethanoid and acylated flavone glycosides from *Panzeria alaschanica*. *Zeitschrift fur Naturforsch. - J. Chem. Sci.* **70**, 379–384 (2015).
49. D. Harikrishna, A. V. N. Appa Rao, M. C. P. Pharmacological investigation of prunin-6 " -O-p-coumarate : A flavonoid glycoside. *Indian J. Pharmacol.* **36**, 244–245 (2004).
50. Krishnan, K., Mathew, L. E., Vijayalakshmi, N. R. & Helen, A. Anti-inflammatory potential of β -amyryn, a triterpenoid isolated from *Costus igneus*. *Inflammopharmacology* **22**, 373–385 (2014).
51. Stashenko, E. E. & Martínez, J. R. Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Sci. Chromatogr.* **2**, 29–47 (2010).