



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Facultad de Farmacia

Tesis

Evaluación antiinflamatoria *in vitro* de los metabolitos secundarios de dos variedades de *Ageratina espinosarum*.

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN FARMACIA.

Presenta: L. en F. Lizet Díaz Peralta

Directora: Dra. Ma Yolanda Rios Gómez



CENTRO DE
INVESTIGACIONES QUÍMICAS

Junio 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Consejo Interno de Posgrado

"1919-2019: en memoria del General Emiliano Zapata Salazar"

MAESTRÍA EN FARMACIA

Cuernavaca, Morelos a 11 de abril de 2019

Folio: FF/D/SAC/ CIP /MF/024/2019

L.F. LIZET DÍAZ PERALTA
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA
P R E S E N T E

Por este medio le informo que, con base en la propuesta hecha en su solicitud, el Consejo Interno de Posgrado le asigno el siguiente jurado para evaluar la tesis **"Evaluación antiinflamatoria *in vitro* de los metabolitos secundarios de dos variedades de *Ageratina espinosarum*"**.

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

Presidente: Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez

Secretario: Dr. Germán Bernal Fernández

Vocal 1: Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama

Vocal 2: Dr. Jesús Rivera Islas

Vocal 3: Dra. Laura Patricia Álvarez Berber

Se le solicita entregar las tesis al jurado designado y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dr. Julio César Rivera Leyva.

Jefatura de Posgrado



ccp: **archivo:** Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez, Dr. Germán Bernal Fernández, Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama, Dr. Jesús Rivera Islas, Dra. Laura Patricia Álvarez Berber.

Mitv

**UA
EM**

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada No. 62306.

A la Dra. Yolanda Rios Gómez del laboratorio 323 del Centro de Investigaciones Químicas, por haberme permitido seguir siendo parte de su grupo de trabajo, no fue un camino fácil y sin embargo, nunca dejo de apoyarme siempre confiando en que las cosas se lograrían, por su valiosa aportación en la elucidación estructural de los componentes de la planta, toda mi admiración y respeto. Gracias por todo.

A la Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama del Laboratorio 211 de Centro de Investigaciones Químicas, por su apoyo incondicional y la disposición que tuvo para que este trabajo fuera más enriquecido, por su invaluable ayuda en la realización de la evaluación *in vitro* de inhibición sobre las enzimas ciclooxigenasas y sugerencias para el análisis de los resultados. Gracias por su paciencia, actitud y dedicación.

A los integrantes del comité tutorial, la Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama, al Dr. Gabriel Navarrete Vázquez y a la Dra. Yolanda Rios Gómez, por las aportaciones que cada uno realizo a este proyecto, sus comentarios y opiniones ayudaron a obtener mejores resultados. Gracias por su sinceridad.

Y finalmente a los miembros del jurado revisor de tesis: Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez, Dr. German Bernal Fernández, Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama, Dr. Jesús Rivera Islas y a la Dra. Laura Patricia Álvarez Berber. Admiro lo acertadas que fueron sus aportaciones para mejorar la estructura de este escrito, Gracias por el interés mostrado.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 323 de Química de Productos Naturales y Metabolómica del Centro de Investigaciones Químicas, IICBA (CIQ) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la dirección de la Dra. Ma Yolanda Rios Gómez, con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto de Ciencia Básica No. 241044 y la beca de posgrado No. 62306.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	i
LISTA DE FIGURAS	iiv
LISTA DE GRAFICAS	v
LISTA DE TABLAS	vi
Lista de abreviaturas y símbolos.....	viii
Resumen	xi
Abstract	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Fisiopatología de la inflamación	3
2.2. Fases de la inflamación:	4
2.3. Características generales de la ciclooxigenasa.	4
2.4. Isoformas de la COX.	5
2.4.1. Estructura de las ciclooxigenasas.	6
2.5. Inhibidores de las ciclooxigenasas.	6
2.5.1. Antiinflamatorios No Esteroideos (AINEs).....	6
2.5.1.1. AINEs No selectivos.	7
2.5.1.2. AINEs Selectivos.....	8
2.5.1.3. Efectos Adversos.....	10
2.6. <i>Docking</i> molecular.....	10
2.6.1. <i>Docking</i> “rígido”.....	12
2.6.2. <i>Docking</i> “flexible”.....	12
2.7. Familia Asteraceae.....	12
2.7.1. Antecedentes del género <i>Ageratina</i>	13
2.7.1.1. Composición química.	13
2.7.1.1.1. Ácidos grasos.	14
2.7.1.1.2. Terpenos.....	14
2.7.1.1.2.1. Monoterpenos.....	15
2.7.1.1.2.2. Sesquiterpenos.....	18
2.7.1.1.3. Diterpenos.	23
2.7.1.1.3.1. Kauranos.	23

2.7.1.1.3.2. Labdano.	26
2.7.1.1.4. Flavonoides.	28
2.7.1.1.5. Cromenos y Benzofuranos.....	30
2.7.2. Actividad antiinflamatoria y composición química.....	33
2.7.3. <i>Ageratina espinosarum</i>	35
3. JUSTIFICACION	40
4. HIPÓTESIS	41
5. OBJETIVOS	42
5.1. General.	42
5.1.1. Específicos	42
6. METODOLOGÍA	43
6.1. Recolección y obtención de los extractos de <i>Ageratina espinosarum var. sp.</i>	43
6.2. Obtención del extracto hidro-alcohólico de <i>Ageratina espinosarum var. sp.</i>	43
6.2.1. Fraccionamiento primario del extracto EAeBu de <i>Ageratina espinosarum var. sp.</i>	44
6.2.1.1. Recromatografía de la fracción 4 del grupo A.....	44
6.2.1.2. Purificación de la fracción 4 de la recromatografía de la fracción 4 del grupo A.	45
6.2.1.3. Tratamiento de la fracción 5 y la reunión 15-17.	47
6.2.1.4. Recromatografía de la reunión 25-28.	49
6.2.1.5. Recromatografía de la reunión 37-45.	50
6.2.2. Placas comparativas de los grupos de reuniones obtenidas del fraccionamiento primario del extracto EAeBu de <i>Ageratina espinosarum var. sp.</i>	50
6.2.2.1. Extracción en Fase Solida (SPE) de la fracción 2 del extracto EAeBu de <i>Ageratina espinosarum var. sp.</i>	50
6.2.2.2. Reacción de acetilación de la fracción 3-4 obtenida del fraccionamiento de la reunión 5-11 del extracto hidroalcohólico de <i>Ageratina espinosarum</i>	52
6.3. Elucidación estructural.	53
6.4. Evaluación biológica.....	54
6.4.1. Ensayo <i>in vitro</i> COX.....	54
6.4.1.1. Reacciones COX.....	54
6.4.1.2. Inmunoensayo enzimático.	55
6.5. Estudios de <i>Docking</i> molecular.	62
6.5.1. Preparación de las enzimas.....	63
6.5.2. Preparación de los ligandos.....	64
6.5.3. Validación y análisis del <i>Docking</i> molecular.	64



7.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	65
7.1.	Elucidación de la estructura molecular de los compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico de <i>Ageratina espinosarum</i>	65
7.1.1.	FLAVONOIDES	65
7.1.1.1.	Flavonas.....	65
7.1.1.2.	Flavonoles	72
7.1.2.	DITERPENOS	77
7.2.	Determinación de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> sobre COX-1 y COX-2.	86
7.3.	Acoplamiento molecular de los metabolitos secundarios sobre COX-1.	92
8.	CONCLUSIONES	101
9.	PERSPECTIVAS	104
10.	BIBLIOGRAFÍA	105
11.	ANEXOS	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Las enzimas COX catalizan el paso comprometido en la síntesis de prostaglandinas.	5
Figura 2. Estructura secundaria de la ciclooxigenasa. a) Dominios estructurales. b) Sitios activos.	6
Figura 3. Procedimiento general del acoplamiento molecular.	11
Figura 4. <i>Ageratina espinosarum</i>	36
Figura 5. Configuración de la placa para el inmunoensayo enzimático.	55
Figura 6. Mapas de interacción 2D y 3D del acoplamiento de la COX-1 (ovina) co-cristalizada con ibuprofeno.	63
Figura 7. Sistema aromático A ₂ B ₂ del anillo B.	66
Figura 8. Sistema aromático AB del anillo A.	66
Figura 9. Señal de H-3 característica de flavonas.	67
Figura 10. Señal de H-5 quelatado del flavonoide.	68
Figura 11. Correlaciones HMBC del flavonoide.	71
Figura 12. Señales de RMN ¹ H del sistema A ₂ B ₂ aromático.	72
Figura 13. Señales de RMN ¹ H del sistema AB aromático.	73
Figura 14. Señal del hidrogeno del OH-5 quelatado.	76
Figura 15. Espectro de RMN ¹ H del ácido dihidrotucumanoico (167).	78
Figura 16. Espectro de DEPTQ del ácido dihidrotucumanoico (167).	79
Figura 17. Espectro de HSQC del ácido dihidrotucumanoico (167).	80
Figura 18. Expansión del espectro de HMBC del ácido dihidrotucumanoico (167).	81
Figura 19. Espectro de HMBC de las correlaciones de los hidrógenos de los grupos metilo.	82
Figura 20. Expansión del espectro de RMN ¹ H del dihidrotucumanol.	85
Figura 21. Curva estándar de prostaglandinas para la determinación del porcentaje de inhibición de COX-1 y COX-2.	87
Figura 22. Superposición del ligando co-cristalizado y su postura de acoplamiento validada. Rojo: co-cristalizado, verde: validación.	92
Figura 23. Diagrama de interacción bidimensional de taxifolina (162) sobre COX-1.	94
Figura 24. Mapa de interacción bidimensional de 7,4'-dimetilkaempferol con COX-1.	95
Figura 25. Imagen tridimensional de la orientación de 7,4'-dimetilkaempferol en la COX-1.	95

Figura 26. Visualización en 2D del compuesto sakuranetina (97) frente a COX-1.....	96
Figura 27. Visualización en 3D del complejo sakuranetina-COX-1 (-5.7792 Kcal/mol)....	97
Figura 28. Mapa de interacción bidimensional de homoeriodictiol con COX-1.	98
Figura 29. Imagen digital en 3D del complejo homoeriodictiol-COX-1.....	98
Figura 30. Mapa de interacción bidimensional de 4'-metilsakuranetina con COX-1.	99
Figura 31. Mapa de interacción 3D del complejo 4'-metilsakuranetina-COX-1.	99

LISTA DE GRAFICAS

Graficas 1. Porcentajes de inhibición sobre COX-1 de los compuestos de dos variedades de <i>Ageratina espinosarum</i>	88
Graficas 2. Porcentajes de inhibición sobre COX-1 de los compuestos de dos variedades de <i>Ageratina espinosarum</i>	89
Graficas 3. Porcentajes de inhibición sobre COX-2 de los compuestos de dos variedades de <i>Ageratina espinosarum</i>	90
Graficas 4. Porcentajes de inhibición sobre COX-2 de los compuestos de dos variedades de <i>Ageratina espinosarum</i>	91

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales diferencias entre la inflamación aguda y crónica.	3
Tabla 2. AINEs No Selectivos de COX.	7
Tabla 3. AINEs Selectivos de COX-2.	9
Tabla 4. Cantidad en masa de los extractos orgánicos de la especie <i>Ageratina espinosarum</i> var sp.	43
Tabla 5. Resumen del fraccionamiento primario del extracto EAeBu de <i>Ageratina espinosarum</i> var. sp.	44
Tabla 6. Proceso cromatográfico de la purificación de la fracción 4 del grupo A.	45
Tabla 7. Metabolitos secundarios aislados de la fracción 4 del grupo A.	45
Tabla 8. Configuración de la plantilla para el análisis de datos de COX-1.	57
Tabla 9. Configuración de la plantilla para el análisis de datos de COX-1.	57
Tabla 10. Datos crudos de las lecturas de absorbancias.	58
Tabla 11. Datos crudos de las lecturas de absorbancias.	58
Tabla 12. Resultado de la sustracción del blanco a los datos de absorbancia.	59
Tabla 13. Resultado de la sustracción del blanco a los datos de absorbancia.	59
Tabla 14. Valores calculados del %B/Bo de la curva estándar de prostaglandinas.	59
Tabla 15. Valores calculados del %B/Bo de la curva estándar de prostaglandinas.	60
Tabla 16. Concentración de prostaglandinas producidas en el ensayo COX-1.	60
Tabla 17. Concentración de prostaglandinas producidas en el ensayo COX-1.	61
Tabla 18. Concentración de prostaglandinas promedio (pg/mL) y porcentaje de inhibición de los metabolitos secundarios de dos variedades de <i>Ageratina espinosarum</i>	62
Tabla 19. Datos espectroscópicos de RMN de Apigenina comparados con los reportados en la literatura, DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz.	67
Tabla 20. Datos espectroscópicos de RMN de 7, 4'-dimetilapigenina comparados con los reportados en la literatura, CDCl ₃ , 500 MHz.	69
Tabla 21. Correlaciones HSQC de la estructura de acetina.	70
Tabla 22. Datos espectroscópicos de RMN de Acetina comparados con los reportados en la literatura, CDCl ₃ con unas gotas de CD ₃ OD, 500 MHz.	71
Tabla 23. Datos espectroscópicos de RMN de kaempferol comparados con los reportados en la literatura, CD ₃ OD, 200 MHz.	74

Tabla 24. Datos espectroscópicos de RMN de 3, 4', 7-trimetilkaempferol comparados con los reportados en la literatura, CDCl ₃ , 500 MHz.....	75
Tabla 25. Datos espectroscópicos de RMN de 7, 4'-dimetilkaempferol comparados con los reportados en la literatura, CDCl ₃ , 500 MHz.	77
Tabla 26. Datos espectroscópicos de RMN de ácido dihidrotucumanoico comparados con los reportados en la literatura.	83
Tabla 27. Porcentajes de inhibición sobre COX-1 de los metabolitos secundarios de las dos variedades de <i>Ageratina espinosarum</i>	87
Tabla 28. Porcentajes de inhibición sobre COX-2 de los metabolitos secundarios de las dos variedades de <i>Ageratina espinosarum</i>	89
Tabla 29. Resultados del Docking realizado sobre COX-1 de los metabolitos secundarios de las dos variedades de <i>Ageratina espinosarum</i>	100
Tabla 30. Tabla comparativa de la composición química de las dos variedades de <i>Ageratina espinosarum</i>	101

Lista de abreviaturas y símbolos

ABS	Absorbancia
AcOEt	Acetato de etilo
AA	Ácido araquidónico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
Arg120	Arginina 120
Å	Armstrong
AINEs	Antiinflamatorios No Esteroideos
¹³C	Carbono trece
COX-1	Ciclooxigenasa 1
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CV	Coefficiente de Variación
IC₅₀	Concentración inhibitoria cincuenta
J	Constante de acoplamiento
COSY	<i>CORrelation SpectroscopY</i>
CDCl₃	Cloroformo
CCF	Cromatografía en capa fina
CC	Cromatografía en columna
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas
DESVEST	Desviación Estándar
δ	Desplazamiento químico
CH₂Cl₂	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfoxido

DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
2D	Dos dimensiones
SEM	Error Estándar Medio
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Blond Correlation Spectroscopy</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy</i>
IND.	Indometacina
IL-1	Interleucina 1
MHz	MegaHertz
MeOH	Metanol
μM	Micromolar
mm	Milímetros
MOE	<i>Molecular Operating Environment.</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
NO	Óxido nítrico
ppm	Partes por millón
FPP	Pirofosfato de farnesilo
PMN's	Polimorfonucleares
PG	prostaglandina
PGHS	Prostaglandina H sintetasa
1H	Protón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RE	Retículo endoplásmico
RMSD	<i>Root-Mean-Square Deviation.</i>
<i>d</i>	Señal doble
<i>dd</i>	Señal doble de doble

<i>m</i>	Señal múltiple
<i>s</i>	Señal singulete
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
Tyr355	Tirosina 355
3D	Tres dimensiones
UV	ultravioleta
RaV	Vesivirus de conejo
VHS-1	Virus del herpes simple de tipo 1
VHS-2	Virus del herpes simple de tipo 2

Resumen

La inflamación es parte del mecanismo de defensa del cuerpo. Es el proceso mediante el cual el sistema inmunológico reconoce y elimina los estímulos dañinos y comienza el proceso de curación. En general, hay dos tipos de inflamación: inflamación aguda y crónica. La inflamación crónica se ha relacionado con ciertas enfermedades, como diabetes, enfermedad cardíaca y artritis reumatoide. Las ciclooxigenasas (COX), son un tipo de enzimas oxidorreductasas que desempeñan un papel clave en la formación de moduladores biológicos como las prostaglandinas (PG); la inhibición de estas enzimas es el principal mecanismo de acción de todos los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).

En este trabajo se aislaron y caracterizaron los metabolitos secundarios de *Ageratina espinosarum* var. *sp.*; también se realizó la evaluación de la actividad antiinflamatoria de los compuestos de esta variedad y de los metabolitos secundarios previamente caracterizados de *Ageratina espinosarum* var. *espinosarum*.

Del estudio fitoquímico de *Ageratina espinosarum* var. *sp.* se identificaron los flavonoides apigenina, acetina, 7,4'-dimetilapigenina, kaempferol, 3,7,4'-trimetilkaempferol, 7,4'-dimetilkaempferol y dos diterpenos de tipo labdano, el ácido dihidrotucumanoico y el dihidrotucumanol (1,5,6,8a-tetrametil-1,2,3-naftalenotriol, decahidro-5(5-hidroxi-3-metilpentil)), que se aisló por primera vez.

El ácido dihidrotucumanoico, dihidrotucumanol y el flavonoide 7,4'-dimetilkaempferol de *Ageratina espinosarum* var. *sp.* y los compuestos sakuranetina, homoeriodictiol, taxifolina y una mezcla: 4'-metilsakuranetina y persicogenina de *Ageratina espinosarum* var. *espinosarum* fueron evaluados *in vitro* por su capacidad inhibidora frente a las ciclooxigenasas (1 y 2) a través de kit inmunoenzimático y de manera *in silico* mediante el acoplamiento molecular sobre COX-1.

La evaluación antiinflamatoria se realizó a tres concentraciones (10, 31.6 y 100 μM). Los resultados obtenidos muestran comportamientos muy similares en el porcentaje de inhibición. Sobre la COX-1, los compuestos ácido dihidrotucumanoico, 7,4'-dimetilkaempferol y taxifolina muestran un resultado dependiente de la concentración, con porcentajes de inhibición a 10 μM de 54, 51.5 y 53.2 % respectivamente, con respecto a indometacina (55.2 %) a 1.67 μM , concentración a la cual llega al valor de IC_{50} , mientras que el flavonoide homoeriodictiol es el compuesto que presenta mayor porcentaje de

inhibición a las primeras dos concentraciones, sin embargo a 100 μM la actividad decae un poco. El análisis de resultados frente a COX-2 indica que los compuestos presentan menor actividad inhibitoria sobre esta isoforma, en la mayoría de los metabolitos con porcentajes de inhibición por debajo del 50% para las tres concentraciones evaluadas. Derivado de este análisis la evaluación de la inhibición sobre ambas isoformas debería realizarse a tres concentraciones menores, para determinar con certeza el valor de su IC_{50} .

La evaluación de *Docking* mostro que los compuestos de tipo flavonoide de las dos variedades de plantas se unen al sitio catalítico de la enzima COX-1 con buenos valores de afinidad, aunque no mayores a ibuprofeno que fue el fármaco co-cristalizado en la proteína.

Abstract

Inflammation is part of the body's defense mechanism. It is the process by which the immune system recognizes and eliminates harmful stimuli and begins the healing process. In general, there are two types of inflammation: acute and chronic inflammation. Chronic inflammation has been linked to certain diseases, such as diabetes, heart disease and rheumatoid arthritis. Cyclooxygenases (COX) are a type of oxidoreductase enzymes that play a key role in the formation of biological modulators such as prostaglandins (PG); the inhibition of these enzymes is the main mechanism of action of all non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs).

In this work, secondary metabolites of *Ageratina espinosarum* var. *sp.* were isolated and characterized; thus, the evaluation of the anti-inflammatory activity of the compounds of this variety and of the previously characterized secondary metabolites of *Ageratina espinosarum* var. *espinosarum*.

From the phytochemical study of *Ageratina espinosarum* var. *sp.*, the flavonoids apigenin, acacetin, 7,4'-dimethylapigenin, kaempferol, 3,7,4'-trimethylkempferol, 7,4'-dimethylkamepferol were identified and two diterpenos of labdane type, dihydrotucumanoic acid and dihydrotucumanol (1,5,6,8a-tetramethyl-1,2,3-naphthalenetriol, decahydro-5 (5-hydroxy-3-methylpentyl)), which was isolated by first time.

The dihydrotucumanoic acid, dihydrotucumanol and the flavonoid 7,4'-dimethylkempferol of *Ageratina espinosarum* var. *sp.* and the compounds sakuranetin, homoeriodictiol, taxifolin and a mixture: 4'-methylsakuranetin and persicogenin of *Ageratina espinosarum* var. *espinosarum* were evaluated *in vitro* for their inhibitory activity against cyclooxygenases (1 and 2) through immuno-enzymatic kit and *in silico* studies using molecular docking on COX-1.

The anti-inflammatory evaluation was carried out at three concentrations (10, 31.6 and 100 μ M). The results obtained show very similar behaviors in the percentage of inhibition. On COX-1, the compounds dihydrotucumanoic acid, 7,4'-dimethylkempferol and taxifolin showed a concentration-dependent result, with percentages of inhibition at 10 μ M of 54, 51.5 and 53.2% respectively, with respect to indomethacin (55.2%). %) at 1.67 μ M, concentration at which it reaches the IC₅₀ value, while the flavonoid homoeriodictiol is the compound that presents the highest percentage of inhibition at the first two concentrations, however at 100 μ M the activity is diminished. The analysis of results against COX-2

indicates that the compounds have lower inhibitory activity on this isoform, in most of the metabolites with percentages of inhibition below 50% for the three concentrations evaluated. Derived from this analysis, the evaluation of the inhibition on both isoforms should be carried out at three lower concentrations, in order to determine with certainty the value of its IC₅₀.

The docking studies showed that the flavonoid compounds of the two plant varieties bind to the catalytic site of the COX-1 enzyme with good affinity values, although not higher than ibuprofen, which was the drug co-crystallized in the protein.

1. INTRODUCCIÓN

El estudio de la inflamación es de gran importancia desde el punto de vista fisiológico y farmacológico. Es un fenómeno complejo caracterizado por vasoconstricción, seguida de vasodilatación, disminución del flujo sanguíneo, exudación de líquido y acumulación y migración de leucocitos.¹

A medida que las características de la inflamación aguda persisten, llega a volverse crónica y este estadio de inflamación es la base de reacciones de hipersensibilidad y enfermedades inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoide, enfermedades cardiovasculares, diabetes, aterosclerosis y fibrosis pulmonar.²

Diferentes mecanismos moleculares están involucrados en la respuesta inflamatoria, la ruta del ácido araquidónico (AA) inicia una cascada metabólica fundamental en este proceso, este precursor es metabolizado principalmente por tres enzimas, las ciclooxigenasa 1 y 2 (COX) y la 5-lipoxigenasa resultando en la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos principalmente, los cuales modulan procesos fisiológicos incluidos, el dolor, la fiebre, la inflamación, la formación de coágulos sanguíneos, la contracción y relajación del músculo liso y la liberación de ácido gástrico.

Entre los tratamientos farmacológicos más utilizados para procesos inflamatorios tanto agudos como crónicos se pueden mencionar los antiinflamatorios no esteroideos (AINE's) cuyo mecanismo de acción se centra principalmente en la inhibición de las ciclooxigenasas, algunos AINES's tradicionales y una clase de inhibidores llamados "coxibs" son más selectivos inhibiendo COX-2 que a COX-1. Esta afinidad por alguna de las dos isoformas potencializara sus efectos farmacológicos, así como toxicológicos. Una de las limitantes importantes en el uso crónico de los AINEs es que producen efectos secundarios importantes, principalmente a nivel de tracto digestivo, tales como úlceras, erosiones y perforaciones en casos más graves.³ Debido a lo anterior se ha recurrido a la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas que contribuyan a encontrar nuevos agentes menos agresivos durante su consumo. Una alternativa importante en la búsqueda de estos compuestos es la fitoterapia. Así, el estudio de principios activos con propiedades terapéuticas obtenidos a partir de fuentes naturales ha cobrado gran importancia en los últimos años.⁴

El género *Ageratina* es utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de padecimientos inflamatorios, fiebre y úlceras, propiedades que han sido demostradas, adicionalmente a su actividad antibacteriana, entre otras. De acuerdo con ello, el presente proyecto propone realizar el estudio químico de *Ageratina espinosarum* var. sp. y la evaluación de los compuestos obtenidos de esta, así como la de los metabolitos previamente caracterizados de una segunda variedad de *Ageratina espinosarum*⁵ en un modelo *in vitro* de actividad antiinflamatoria basado en la inhibición de ciclooxigenasas.

De igual manera, verificar los resultados experimentales mediante un estudio de acoplamiento molecular *in silico* de los compuestos activos frente a COX-1, y así contribuir a la búsqueda de compuestos que ayuden a mejorar los actuales tratamientos para la inflamación.

2. ANTECEDENTES

2.1. Fisiopatología de la inflamación

La inflamación es la respuesta fisiológica de defensa del organismo a estímulos nocivos, como patógenos, células dañadas, traumas físicos o irritantes, entre otros. Sin embargo, es también en algunas ocasiones un proceso dañino, que puede provocar complicaciones en varias patologías como artritis reumatoide, diabetes, aterosclerosis y cáncer.⁶ Se caracteriza por los siguientes signos y síntomas: rubor (enrojecimiento o eritema), tumor (aumento de volumen, edema), calor (aumento de la temperatura local) y dolor, posteriormente se añadió un quinto signo clínico, la pérdida de la función.⁷ Este proceso presenta dos fases bien diferenciadas: aguda y crónica, las cuales se describen en la tabla 1.⁸

Tabla 1. Principales diferencias entre la inflamación aguda y crónica.

	AGUDA	CRÓNICA
Causada por:	Daño tisular debido a trauma, invasión microbiana o compuestos nocivos.	Patógenos que el cuerpo no puede eliminar, incluidos algunos tipos de virus, cuerpos extraños que permanecen en el sistema o respuestas inmunitarias hiperactivas.
Aparición:	Rápida.	Lenta.
Duración:	Algunos días	De meses a años
Resultado:	La inflamación mejora, se convierte en un absceso o se vuelve crónica.	La muerte tisular y el engrosamiento y cicatrización del tejido conectivo.

Recuperado de "Everything you need to know about inflammation", de Nordqvist, C, 24 de noviembre de 2017. Recuperado de <https://www.medicalnewstoday.com/articles/248423.php>.

La respuesta inflamatoria consiste en varios procesos fisiológicos, todos los cuales se desencadenan por la liberación de sustancias farmacológicamente activas como la histamina y la heparina. Estos mediadores químicos de inflamación aguda son liberados por los mastocitos, células sensibles que se encuentran diseminadas a través de los tejidos conectivos ordinarios y que reaccionan al daño tisular u otras alteraciones.⁹

2.2. Fases de la inflamación:

La respuesta inflamatoria puede englobarse en dos fases, cada una mediada por diferentes mecanismos:

Fase 1: Inicia tras producirse el estímulo inflamatorio. En esta fase se produce activación de factores de la coagulación, plaquetas y del sistema de contacto que libera óxido nítrico (NO), histamina, y serotonina, produciendo vasodilatación y, por último, la cascada del complemento responsable de la degradación del patógeno.¹⁰

Fase II: Se conoce como respuesta fagocítica o efectora. En ella, los leucocitos polimorfonucleares (PMN's), como los neutrófilos, contribuyen a la microcirculación, activando la agregación plaquetaria, la cascada de coagulación e inhibiendo la fibrinólisis. Además, se disminuye o cesa el flujo sanguíneo en la zona afectada. Los factores quimiotácticos que se mueven por medio de un gradiente químico difunden del foco local y activan las células endoteliales capilares, PMN's y monocitos, al unirse a receptores de membrana. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 1 (IL-1) son considerados mediadores pro-inflamatorios primarios que inducen otros mediadores pro-inflamatorios secundarios denominados quimiocinas.¹¹

2.3. Características generales de la ciclooxigenasa.

La prostaglandina H sintetasa (PGHS) conocida también como ciclooxigenasa (COX) es la enzima clave en la síntesis de las prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos. Es una enzima bifuncional, ya que posee dos actividades catalíticas distintas: ciclooxigenasa y peroxidasa.¹²

El primer paso en la formación de prostaglandinas es la liberación por hidrólisis del ácido araquidónico (AA), a través de la acción de la enzima fosfolipasa A₂ (PLA₂). Una vez liberado, la actividad ciclooxigenasa es la responsable de oxidar al AA a hidroperóxido endoperóxido (PGG₂) por introducción de dos moléculas de oxígeno, PGG₂ se difunde al sitio activo de la peroxidasa (POX) y sufre una reducción de dos electrones para formar el hidroxindoperóxido (PGH₂).¹³ La PGH₂ se transforma mediante diferentes isomerasas específicas del tejido/células (sintasas) a prostaglandinas (PGE₂, PGD₂, PGF₂ α , PGI₂) y tromboxano A₂ (TxA₂). (Figura 1)¹⁴

Las prostaglandinas realizan funciones relacionadas con la homeostasis de diversos órganos, regulando el dolor, la inflamación y el desarrollo de neoplasias.¹⁵

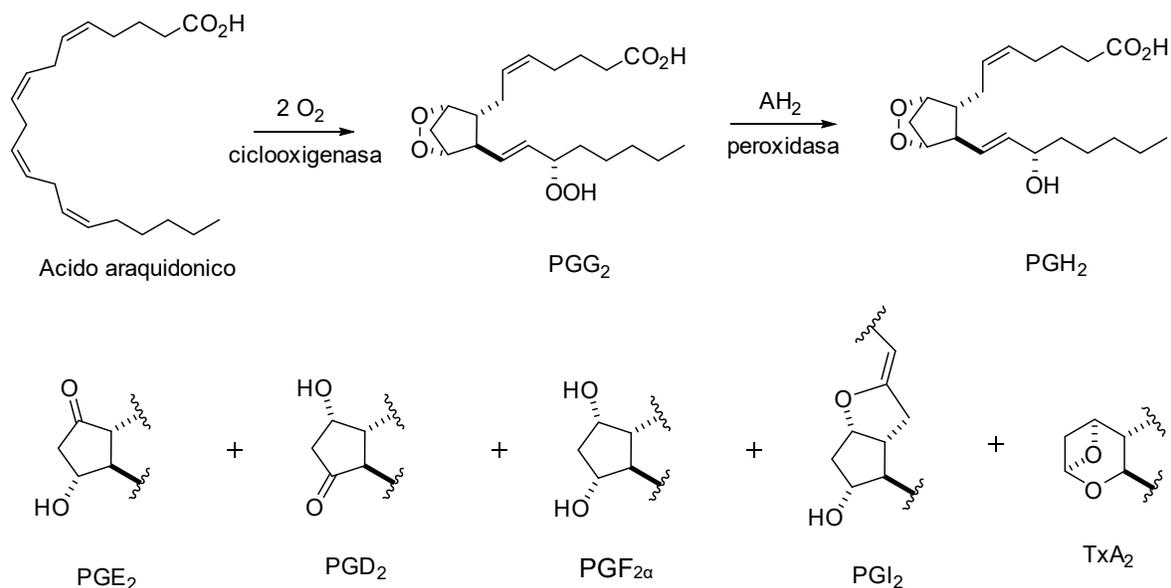


Figura 1. Las enzimas COX catalizan el paso comprometido en la síntesis de prostaglandinas. Recuperado de "Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2", de 15. García Meijide J. J. Rev Esp Reumatol, 2000, 27, 33-5.

2.4. Isoformas de la COX.

La ciclooxigenasa se encuentra en al menos dos isoformas: La COX-1 y COX-2. Aunque ambas ciclooxigenasas tienen similar afinidad por el ácido araquidónico, difieren en su patrón de expresión, regulación y distribución en los tejidos. Actualmente se ha caracterizado y clonado una forma variante de la COX-1, la COX-3, que está expresada principalmente en la corteza cerebral y corazón.¹⁶

La COX-1 se encuentra expresada de manera "constitutiva" en casi todos los tejidos, desempeña un papel importante en la síntesis de los prostanoides para propósitos fisiológicos y regula funciones como la citoprotección gastrointestinal, la homeostasis vascular, la perfusión renal y la función plaquetaria.¹⁷ La COX-2, en cambio, en situaciones normales, es indetectable en la mayoría de tejidos y células, pero se expresa en respuesta a estímulos proinflamatorios. Existen órganos como el cerebro, el riñón y el hueso, en donde la COX-2 se expresa en forma constitutiva.¹³

2.4.1. Estructura de las ciclooxigenasas.

Las isoenzimas COX son hemoproteínas hemodiméricas glicosiladas de 576 y 581 aminoácidos, respectivamente, ancladas a la membrana en el retículo endoplásmico (RE). La estructura tridimensional de la COX-1 ovina se informó por primera vez en 1994 y las estructuras cristalinas de la COX-2 humana y murina siguieron rápidamente.¹⁸

Ambas enzimas presentan una masa molecular muy similar (70 kDa). Las estructuras cristalinas son bastante homólogas estructuralmente y consistentes con una identidad de secuencia alta (aproximadamente 60 %).¹⁹ Cada monómero consiste de tres dominios estructurales (Figura 2a): un dominio corto del factor de crecimiento epidérmico *N*-terminal (EGF), un dominio α -helicoidal de unión a la membrana y un dominio catalítico *C*-terminal grande y globular, este último contiene los dos sitios activos, el ciclooxigenasa y el peroxidasa, cada uno en lados opuestos de la enzima (Figura 2b).²⁰

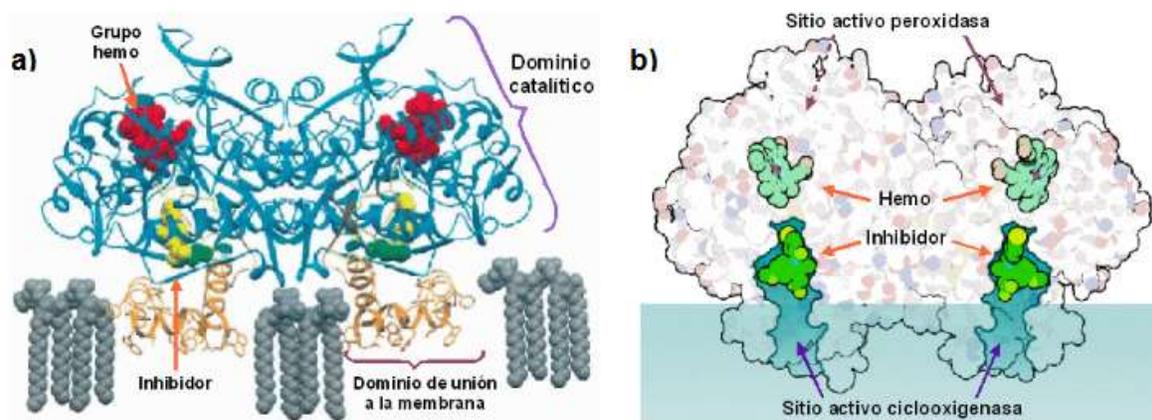


Figura 2. Estructura secundaria de la ciclooxigenasa. **a)** Dominios estructurales. **b)** Sitios activos. Recuperado de "Ciclooxigenasas: biología estructural, celular y molecular", de Smith WL, Annu Rev Biochem. 2000. 69, 145-82.

2.5. Inhibidores de las ciclooxigenasas.

2.5.1. Antiinflamatorios No Esteroideos (AINEs)

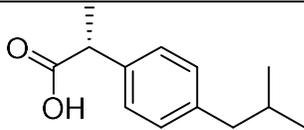
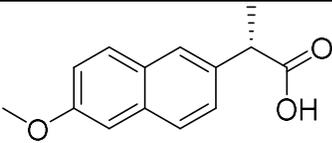
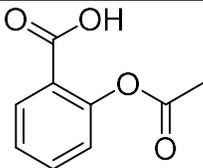
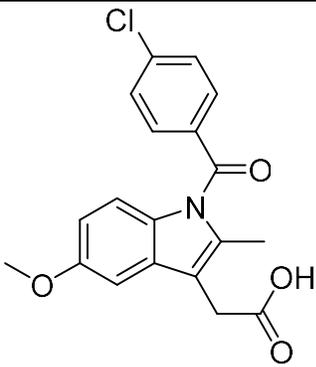
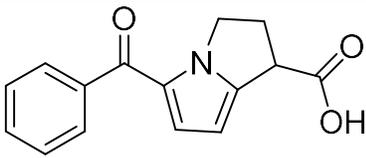
Son una amplia clase de agentes farmacológicos con propiedades analgésicas y antiinflamatorias. También son ampliamente utilizados por sus efectos antitrombóticos y son esenciales en el tratamiento de manifestaciones clínicas producidas por enfermedades de carácter inflamatorio. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de las ciclooxigenasas, imitando la interacción que protagonizaría el AA con la misma.

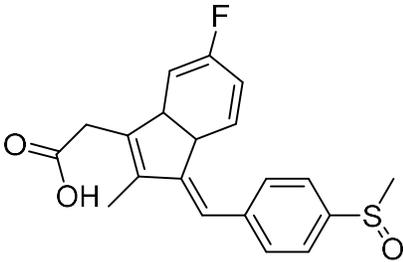
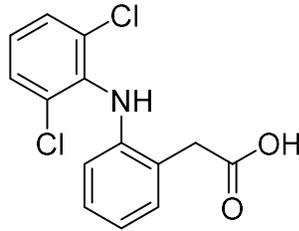
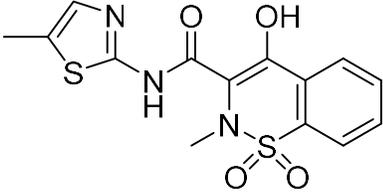
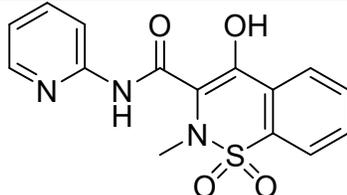
Estos fármacos se clasifican en dos tipos, los AINEs “no-selectivos” y los inhibidores selectivos de la COX-2.

2.5.1.1. AINEs No selectivos.

Estos fármacos inhiben ambos tipos de la enzima COX, ejemplos de AINEs no selectivos se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2. AINEs No Selectivos de COX.²¹

Nombre químico	Estructura
Ibuprofeno	
Naproxeno	
Ácido acetilsalicílico	
Indometacina	
Ketorolaco	

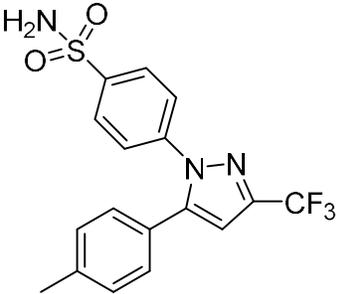
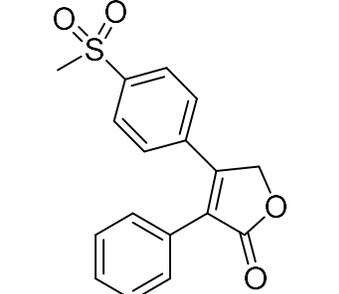
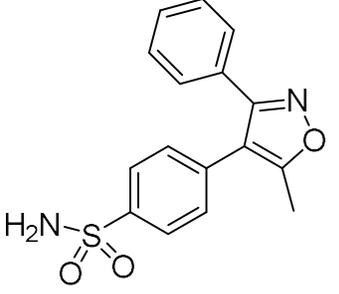
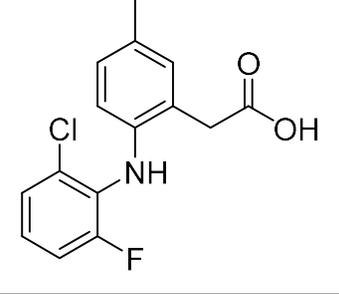
Sulindaco	
Diclofenaco	
Meloxicam	
Piroxicam	

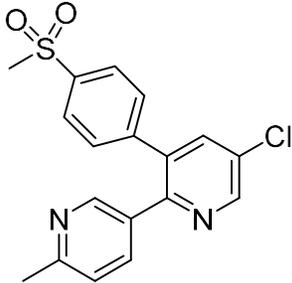
Recuperado de “*Cardiovascular Risk Associated with NSAIDs and COX-2 Inhibitors*”, de A. Perry L., *US Pharmacist*. **2014**, 39(3). 35-38.

2.5.1.2. AINEs Selectivos.

También conocidos como “Inhibidores selectivos de COX-2” inhiben, como su nombre lo indica solo la enzima COX-2, lo que permite principalmente el alivio de la fiebre, el dolor y la inflamación. Se ha informado que el uso de estos fármacos por periodos prolongados aumenta el riesgo de eventos cardiovasculares, por lo que algunos han sido retirados del mercado y otros siguen siendo monitoreados por si necesitan alguna acción regulatoria adicional.²² Ejemplos de inhibidores selectivos de COX-2 son: (Tabla 3):

Tabla 3. AINEs Selectivos de COX-2. ²³

Nombre químico	Estructura	
Celecoxib		
Rofecoxib		
Valdecoxib		
Lumiracoxib		

Etoricoxib		
------------	---	--

Recuperado de "Nonsteroidal antiinflammatory drugs", de Waller, D. G., 2018. P. 744, Elsevier.

Se ha establecido una asociación clara entre el consumo regular de AINEs (en particular de Aspirina) y una reducción en la incidencia de cáncer de colon y en los desórdenes neurodegenerativos.²⁴ La capacidad de estos compuestos para inhibir las ciclooxigenasas, les confiere sus propiedades terapéuticas, así como sus efectos secundarios característicos.²⁵

2.5.1.3. Efectos Adversos.

Los AINE's son de los fármacos más utilizados en el mundo, y por tanto se debe tener importante consideración en la prevalencia de los eventos adversos que se presenten con el uso de los mismos. La inhibición de la COX-2 es la responsable de los efectos terapéuticos, sin embargo, la inhibición de la COX-1 provoca una disminución de las PG's fisiológicas, el uso de medicamentos no selectivos conlleva a la aparición de una serie de efectos adversos, los más comunes son trastornos gastrointestinales (desde dispepsia menor hasta úlceras mayores, sangrado y perforación), daño en los riñones y efectos cardiovasculares.²⁶

Los estudios actuales han permitido conocer las bases estructurales para comprender el tipo de inhibición sobre las ciclooxigenasas y las variaciones en las interacciones de los AINEs con ambas isofórmulas y con ello contribuir a mejorar la selectividad hacia las mismas. Una de las herramientas indispensables para obtener este tipo de información es el acoplamiento molecular o *Docking*.

2.6. *Docking* molecular.

El acoplamiento molecular (conocido como *docking*) es un procedimiento de la química *in silico* ampliamente utilizado para predecir energías y modos de unión entre moléculas

pequeñas o “ligandos” y la macromolécula, proteína, DNA o RNA; esta información es de gran utilidad para el diseño y descubrimiento racional de medicamentos (Figura 3).

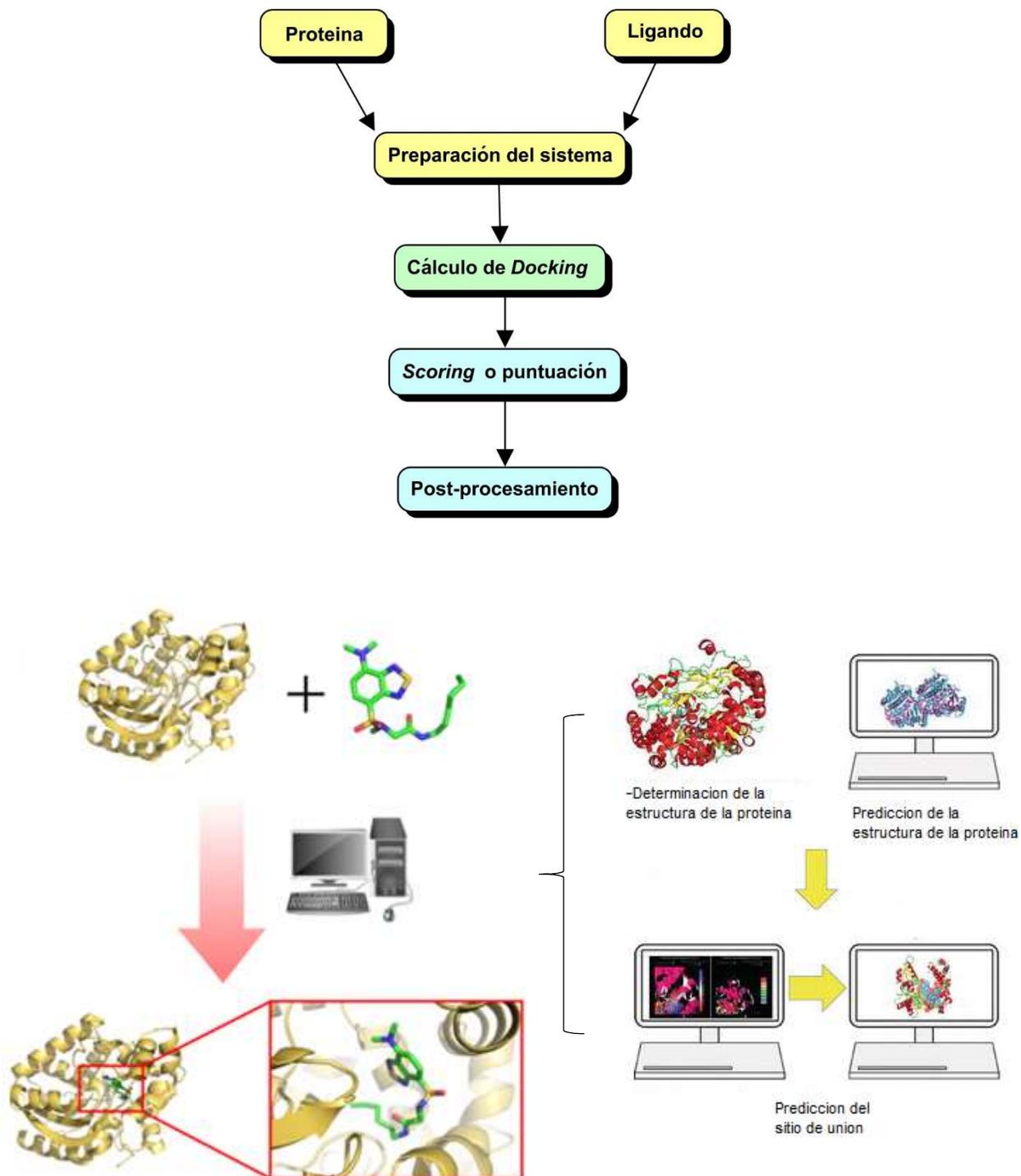


Figura 3. Procedimiento general del acoplamiento molecular.²⁷

El proceso de acoplamiento implica dos pasos básicos:

- a) La predicción de la conformación del “ligando”, así como su posición y orientación dentro de los sitios de unión del receptor (denominados posturas).
- b) La función de *scoring*, utilizada para dar una predicción precisa de la energía de interacción asociada con cada una de las conformaciones de unión.²⁸

Existe una clasificación que divide los métodos de acoplamiento según los grados de flexibilidad de las moléculas involucradas:

2.6.1. Docking “rígido”.

Esta aproximación es análoga al modelo de unión de “llave-cerradura”, los primeros estudios de acoplamiento utilizaban este método, tanto el ligando como la proteína se consideran entidades rígidas.²⁹

2.6.2. Docking “flexible”.

Es la forma más común de acoplamiento en la actualidad, se basa en el modelo “ajuste inducido”, por lo tanto el ligando como el receptor son conformacionalmente flexibles.³⁰

Los enfoques computacionales han demostrado ser exitosos en la identificación de nuevos posibles objetivos farmacológicos, diseñar nuevos fármacos y desarrollarlos para tener éxito en el proceso de desarrollo terapéutico. Los productos naturales ofrecen una fuente inagotable de compuestos para ayudar en el diseño de productos moleculares farmacológicamente importantes.

2.7. Familia Asteraceae.

Comúnmente conocida como la flor del sol, la familia de las margaritas o la familia de las compuestas (Compositae), representa la familia más grande de las plantas con flores, ya que agrupa aproximadamente 1,600 géneros y 25,000 especies que están diseminadas en casi todos los hábitats terrestres excepto en la Antártida.³¹ La familia a su vez se divide en 17 tribus y tres subfamilias.³²

Ocupa un lugar prominente en nuestra vida diaria, ya que incluye muchos cultivos alimenticios de importancia económica (girasol, lechuga, alcachofa, escarola y cártamo),

así como plantas ornamentales populares (gerbera, crisantemo, aster, dahlia, zinnia y caléndula).³³

Las especies de mayor importancia son *Baccharis trimera* (Less) DC. (tojo), *Matricaria chamomilla* L. (manzanilla), *Cynara scolimus* L. (alcachofa), *Vernonia condensata* Baker ("boldo-da-bahia") y *Arnica montana* L. (árnica). Estas son ampliamente utilizadas y comercializadas como productos herbales, lo que sugiere que las especies de la familia Asteraceae tienen un potencial significativo como fuente de compuestos con actividad farmacológica.³⁴

Estudios fitoquímicos han identificado la presencia de aceites esenciales, compuestos fenólicos, terpenoides, alcaloides, lignanos, saponinas, estilbenos, esteroides y polisacáridos. Su actividad antioxidante se atribuye generalmente a la presencia de sustancias fenólicas. Debido a sus propiedades bioactivas, se usan comúnmente para tratar diversas enfermedades, incluyendo inflamación, hipertensión, aterosclerosis, diabetes mellitus, hipercolesterolemia, fibrosis hepática, osteoporosis, asma y úlceras.³⁴

2.7.1. Antecedentes del género *Ageratina*.

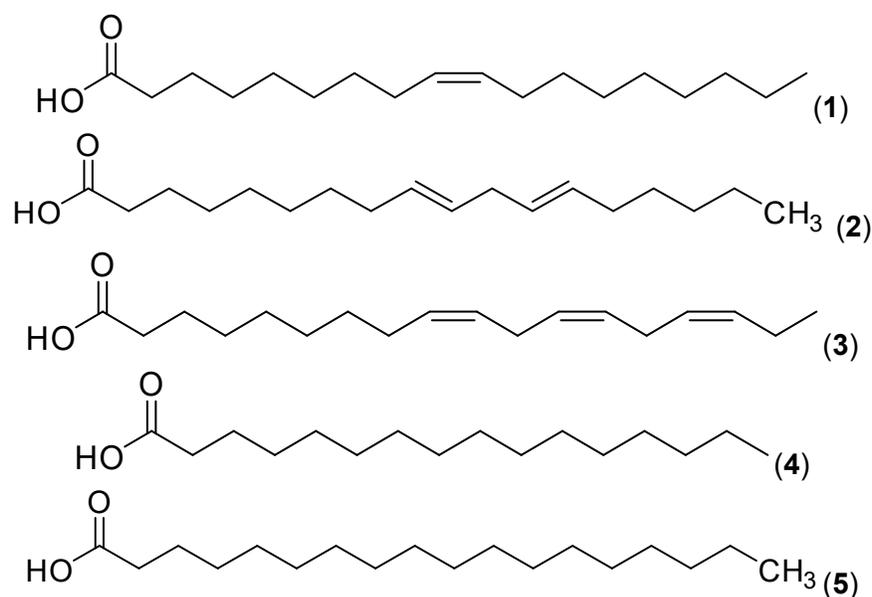
El género *Ageratina* (Syn) *Eupatorium* pertenece a la tribu Eupatorieae. Comprende aproximadamente 250-290 especies distribuidas en regiones tropicales de América, Europa, África y Asia.³⁵ Las especies de este género se usan en la medicina popular en diferentes partes del mundo, como emolientes en el tratamiento de las heridas y cortaduras leves, así como antibacterianos y anticoagulantes.³⁶ La corteza fresca de *A. adenophora* es aplicada *in situ* para tratar el dolor de las heridas abiertas, la infusión de las hojas de *A. sternerbergina* se administra por vía oral para tratar cólicos y trastornos digestivos.³⁷ Por ello han suscitado interés científico en el estudio de dichas especies y contribuir en el aislamiento de los compuestos responsables de dichas actividades.

2.7.1.1. Composición química.

Se ha investigado la composición química de los extractos alcohólicos de diferentes especies de *Ageratina* reportando flavonoides, cromenos, lactonas sesquiterpénicas, diterpenos, triterpenos, flavonas y flavanonas.⁶² A continuación se presentan ejemplos de estudios químicos del género *Ageratina* y la variedad de compuestos que se han aislado.

2.7.1.1.1. Ácidos grasos.

Algunas especies del género *Ageratina* tienen sinonimia con el género *Eupatorium*, el cual es uno de los más representativos de la familia Asteraceae. Mediante la purificación del extracto de diclorometano de *Eupatorium perfoliatum* se identificaron el ácido oleico (1), ácido linoleico (2) y ácido α -linolenico (3).³⁸ El compuesto (1) fue reportado como el constituyente mayoritario del aceite esencial de las partes aéreas frescas de *Ageratina adenophorum* así como los ácidos grasos insaturados, ácido palmítico (4) y ácido esteárico (5).³⁹



2.7.1.1.2. Terpenos.

Los terpenos representan la clase más grande de moléculas pequeñas en el planeta, tienen una estructura química que consiste en unidades de isopreno (C_5H_8).⁴⁰ Los hidrocarburos terpénicos se clasifican según el número de unidades de isopreno:

- Monoterpenos: 2 unidades de isopreno, 10 átomos de carbono.
- Sesquiterpenos: 3 unidades de isopreno, 15 átomos de carbono.
- Diterpenos: 4 unidades de isopreno, 20 átomos de carbono.
- Triterpenos: 6 unidades de isopreno, 30 átomos de carbono.

- Tetraterpenos: 8 unidades de isopreno, 40 átomos de carbono.

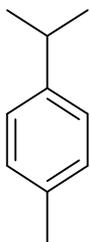
Comprenden numerosos metabolitos secundarios con actividades farmacológicas importantes, tales como antivirales, antimaláricos, antibacterianos y antiinflamatorios.⁴¹

2.7.1.1.2.1. Monoterpenos.

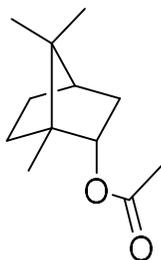
Ageratina adenofora es una planta herbácea invasora, nativa de México y Costa Rica que ha causado graves pérdidas económicas del hábitat nativo de China; el estudio del aceite esencial de las partes aéreas dio como resultado el aislamiento de monoterpenos y sesquiterpenos como son *p*-cimeno (**6**), acetato de bornilo (**7**), α -felandreno (**8**), canfeno (**9**) y δ -2-careno (**10**), los cuales fueron los componentes más abundantes. Este aceite se evaluó para determinar su actividad antibacteriana y mostró tener actividad contra *Arthrobacter protophormiae*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Rhodococcus rhodochrous* y *Staphylococcus aureus*.⁴¹⁻⁴²

En otros estudios de esta especie se encontraron tres nuevos metabolitos del extracto etanólico, uno es derivado del timol, 2 α -metoxil-3 β -metil-6-(acetil-O-metil)-2,3-dihidrobenzofurano (**11**) y dos monoterpenos de tipo careno, ácido-(1a,6a,7a)-8-hidroxi-2-careno-10-oico (**12**) y (1a,6a)-10-hidroxi-3-careno-2-ona (**13**). Los compuestos **12** y **13** fueron evaluados mediante el ensayo antifúngico de microdilución, por su parte el componente **13** tuvo actividad inhibitoria contra la germinación de la espora *Magnaporthe grisea* con valores de IC₅₀ 0.623 mM.⁴³⁻⁴⁴

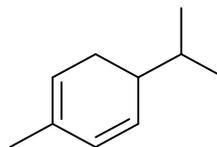
De *A. jahnii* se aislaron los monoterpenos, β -mirceno (**14**), limoneno (**15**) y α -pineno (**16**), estos fueron los metabolitos más abundantes del aceite esencial.³⁹



(6)



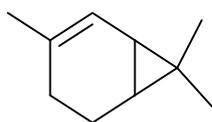
(7)



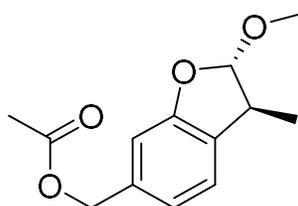
(8)



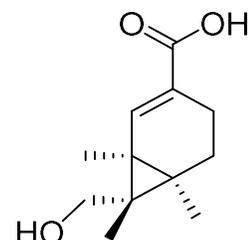
(9)



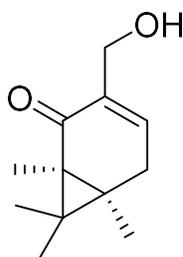
(10)



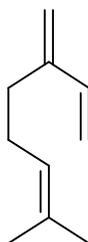
(11)



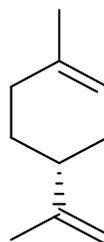
(12)



(13)



(14)



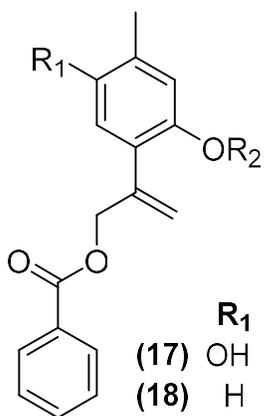
(15)



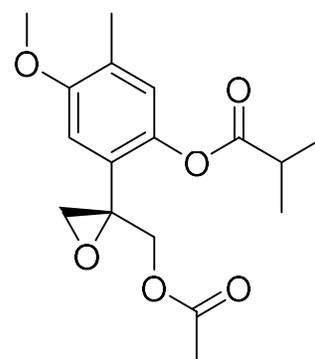
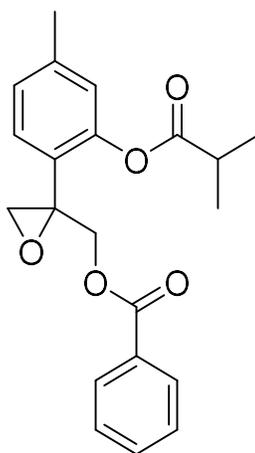
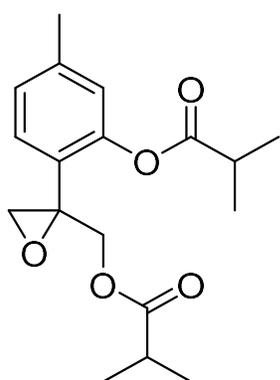
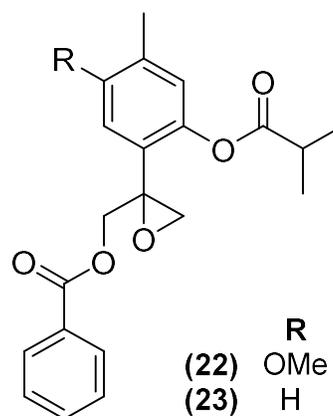
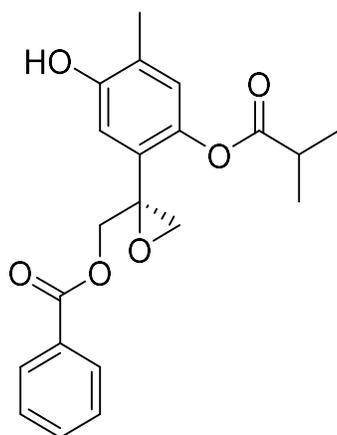
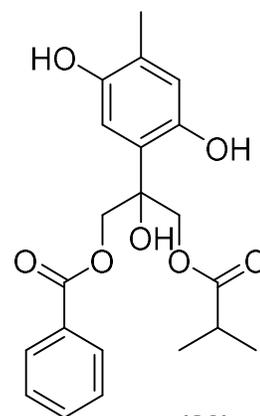
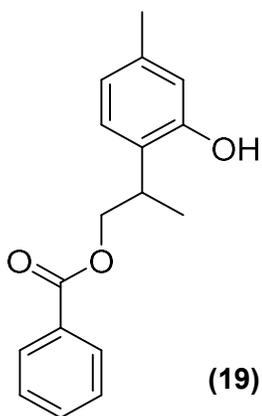
(16)

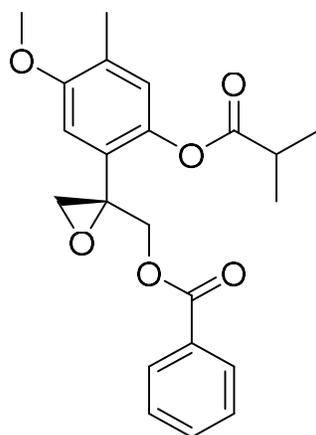
El extracto de diclorometano de las hojas de *A. glabrata* se fraccionó por CC, proporcionando un compuesto puro derivado del timol y con estructura novedosa, 10-benzoiloxi-6,8,9-trihidroxi-timol isobutirato.⁴⁵ La importancia de esta especie en la medicina tradicional mexicana está dada por su uso para tratar el dolor y los trastornos gastrointestinales asociados con infecciones bacterianas. Bustos-Brito y colaboradores en una investigación detallada, obtuvieron cuatro nuevos derivados del timol, 10-Benzoiloxi-8,9-dehidro-6-hidroxitimol isobutirato (**17**), 10-benzoiloxi-8,9-dehidro timol (**18**), 10-benzoiloxitimol (**19**) y 10-benzoiloxi-6,8-dihidroxi-9-isobutiriloxitimol (**20**), junto a (8S)-10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-hidroxitimol isobutirato (**21**) y otros dos compuestos ya conocidos identificados como: 10-benzoiloxi-8,9-epoxi-6-metoxitimol isobutirato (**22**) and 10-benzoiloxi-8,9-epoxitimol isobutirato (**23**), el compuesto **21** fue el más potente antiamebio y anti giardial, esto sugiere que este metabolito podría tener un papel importante en la actividad antidiarreica de *A. glabrata*.⁴⁶

En otra investigación, del extracto hexánico de las hojas de esta especie se aislaron derivados de epoxitimol, 10-isobutiriloxi-8,9-epoxitimol isobutirato (**24**), 10-benzoiloxi-8,9-epoxitimol isobutirato (**25**), (+)-(8S)-10-acetoxi-6-metoxi-8,9-epoxitimol isobutirato (**26**) y (+)-(8S)-10-benzoiloxi-6-metoxi-8,9-epoxitimol isobutirato (**27**).⁴⁷



R_2 i -Bu
H



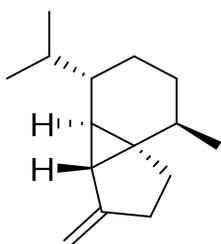


(27)

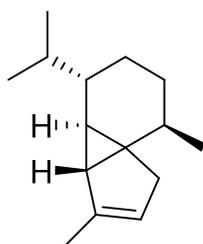
2.7.1.1.2.2. Sesquiterpenos

Los sesquiterpenos son compuestos lipofílicos incoloros, menos volátiles que los monoterpenos y tienen olores intensos. La biosíntesis proviene de tres unidades de isopreno a través del precursor pirofosfato de farnesilo (FPP). Los sesquiterpenos consisten en un esqueleto de 15 carbonos y tienen mucha diversidad estructural, sin embargo la mayoría de las formas más funcionales son cíclicas.⁴⁸⁻⁴⁹

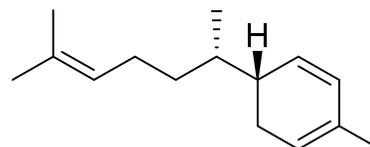
Mediante un análisis en CG-EM del aceite esencial de la especie *Ageratina dendroides* se identificaron los sesquiterpenos β -cubebeno (**28**), α -cubebeno (**29**), zingibereno (**30**), α -amorfeno (**31**), isoledeno (**32**), isolongifoleno (**33**) y aristolono (**34**).⁵⁰



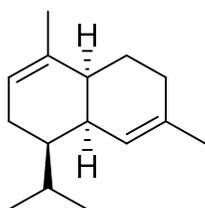
(28)



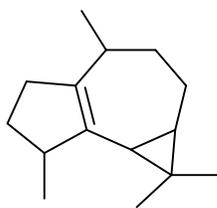
(29)



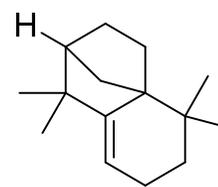
(30)



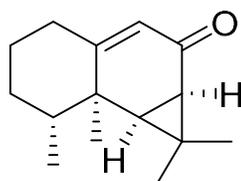
(31)



(32)

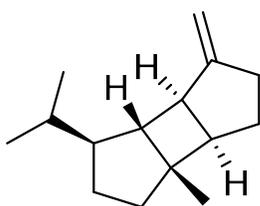


(33)

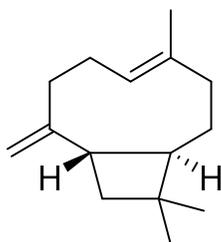


(34)

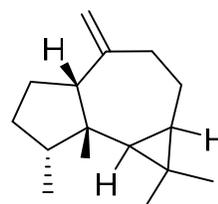
En el aceite esencial de las partes aéreas de *Ageratina jocospecana* se encontraron seis sesquiterpenos, β -bourboneno (35), β -cariofileno (36), Aloaromadendreno (37), nerolidol (38), oxido de β -cariofileno (39) y espatulenol (40). Los compuestos 39 y 40 se reportaron como constituyentes mayoritarios y fueron evaluados por su efecto repelente contra las termitas de madera seca y estos mostraron porcentajes bajos de repelencia.⁵¹



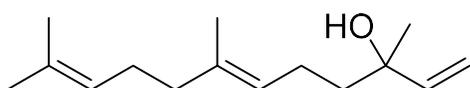
(35)



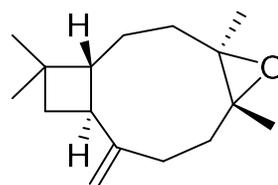
(36)



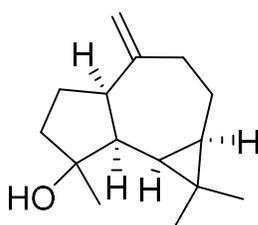
(37)



(38)



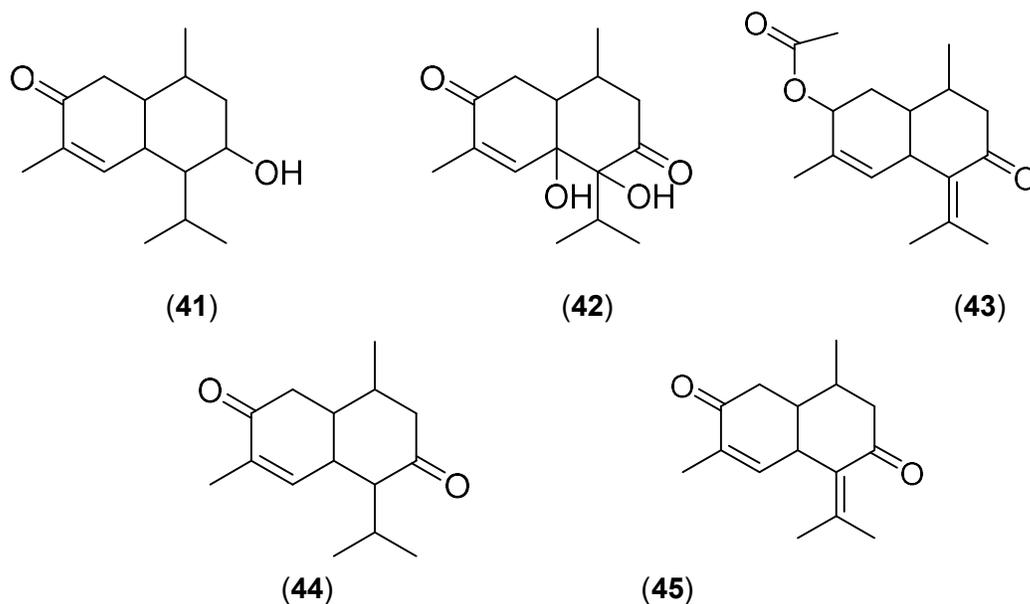
(39)



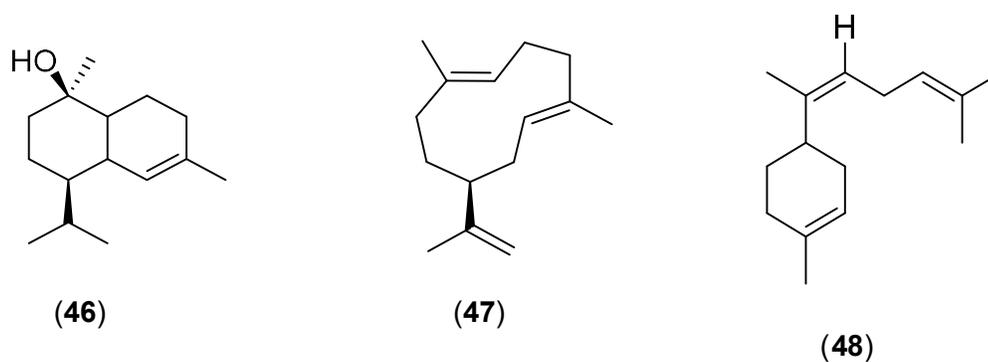
(40)

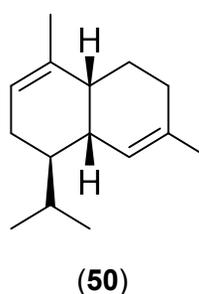
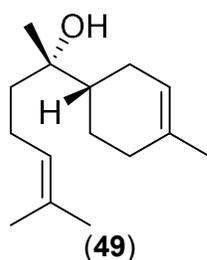
La especie *A. adenofora* ha demostrado ser una especie invasora muy agresiva en algunas partes del mundo, ha llegado a invadir pasto y causar envenenamientos en el ganado, como asma aguda, diarrea e incluso causar la muerte.⁵² El aceite esencial de la planta es conocido por poseer principalmente actividad repelente de insectos. Un numero grande de sesquiterpenos han sido aislados e identificados con esqueletos de

cadineno principalmente.⁵³ Kundu, Saha y colaboradores analizaron el aceite esencial de las hojas mediante CG-EM, el cual está constituido principalmente por sesquiterpenos de tipo cadineno, 7-hidroxicadinan-3-ene-2-ona (**41**), 5,6-dihidroxicadinan-3-ene-2,7-diona (**42**), 2-acetil-cadinan-3,6-diene-7-ona (**43**), cadinan-3-ene-2,7-diona (**44**) y cadinan-3,6-diene-2,7-diona (**45**).⁵⁴



Por su parte, en otro estudio de la misma especie se encontraron los compuestos, α -epi-cadinol (**46**), germacreno (**47**), α -bisaboleno (**48**), α -bisabolol (**49**) y muroleno (**50**).⁴⁰

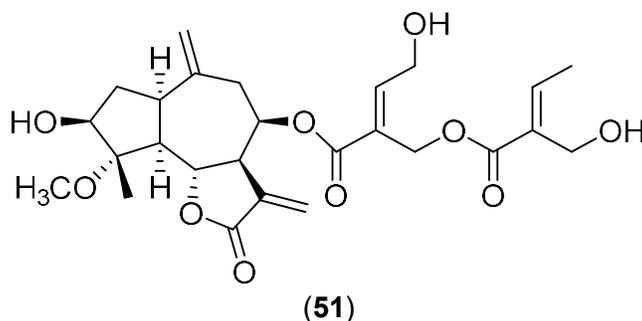


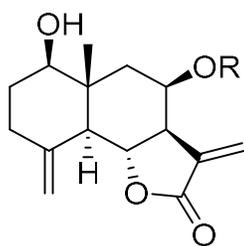


Las lactonas sesquiterpénicas (STL) son uno de los grupos más grandes de moléculas de bajo peso molecular, que se encuentran principalmente en la familia Asteraceae (Compositae).⁵⁵

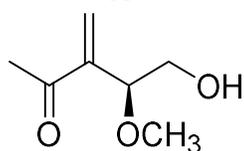
Tienen un papel muy importante, debido a su potencial para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular y el cáncer. Se forman a partir de la condensación de tres unidades de isopreno, seguidas de la ciclación y la transformación oxidativa para producir una lactona *cis* o *trans*-fusionada.⁵⁶

De la especie *A. ligustrina* se aisló una nueva lactona sesquiterpénica de tipo guaianolida, 3 β -Hidroxi-8 β -[4-hidroxi-5-(5-hidroxitigloiloxi)tigloiloxi]-4 α -metoxi-10(14), 11(13)-guaiadien-12,6-olida (**51**) además de otros compuestos ya reportados anteriormente, 4'(S)-8 β -[(2-hidroxi-metoxietil-acriloiloxi) reinosina (**52**), 4'(R)-8 β -[(2-hidroxi-metoxietil-acriloiloxi) reinosina (**53**), 8 β -[4-Hidroxi-5-(5-hidroxitigloiloxi)tigloiloxi] reinosina (**54**), 8 β -[5-Hidroxi-4-(5-hidroxitigloiloxi)tigloiloxi] reinosina (**55**), 8 β -[4-Hidroxi-5-(5-hidroxytigloiloxi)tigloiloxi] balchanina (**56**), 8 β -[5-Hidroxi-4-(5-hidroxitigloiloxi)tigloiloxi] balchanina (**57**), 8 β -[4-Hidroxi-5-(5-hidroxitigloiloxi)tigloiloxi] magnolialida (**58**). Estas lactonas sesquiterpénicas muestran actividad antiplasmódica moderada contra *P. falciparum*.⁵⁷

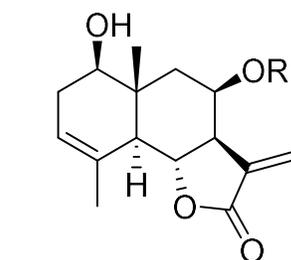




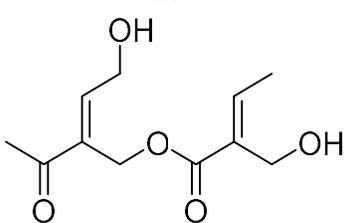
R=



(52)

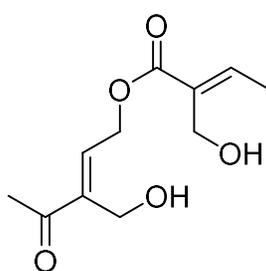


R=

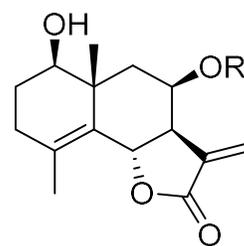


(56)

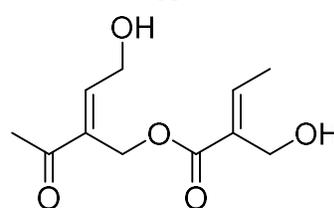
R=



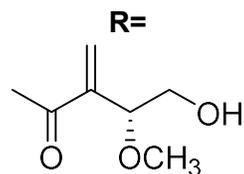
(57)



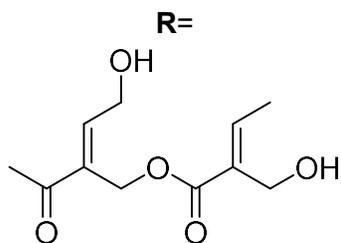
R=



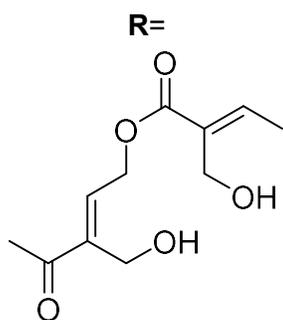
(58)



(53)



(54)



(55)

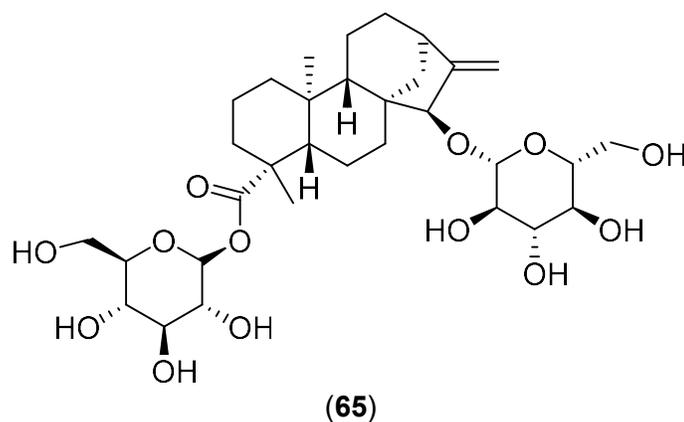
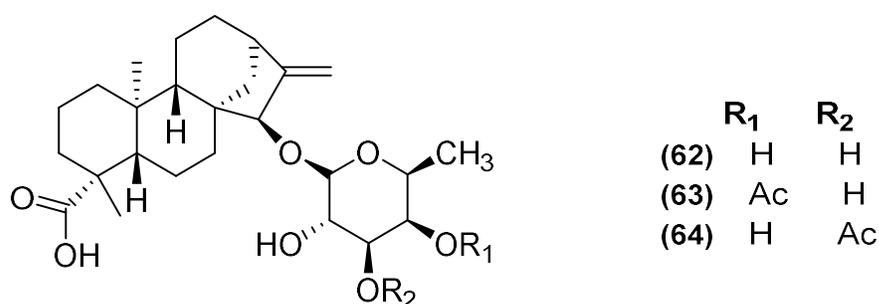
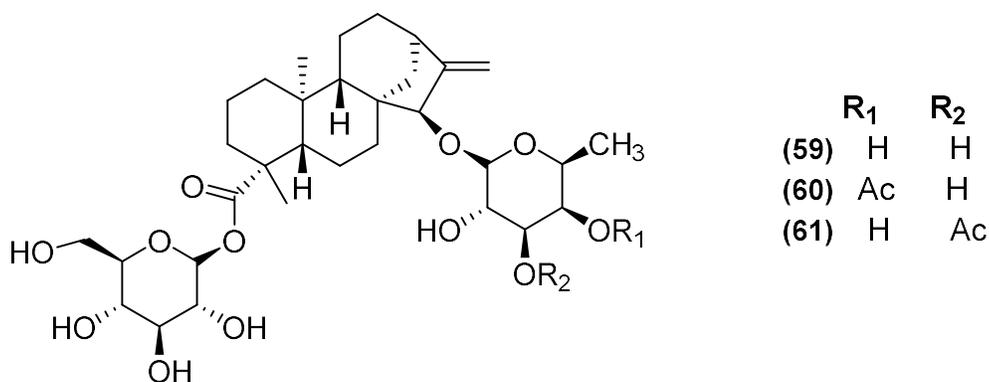
2.7.1.1.3. Diterpenos.

Son una clase de metabolitos secundarios que posee un núcleo esqueleto de 20 carbonos y son clasificados en varias categorías por su amplia diversidad en la naturaleza. Alrededor del 20% de los terpenos son diterpenos y la mayoría de estos su fuente principal de obtención son las plantas; por tal motivo han sido muy estudiados y hay una extensa cantidad de investigaciones.⁵⁸

2.7.1.1.3.1. Kauranos.

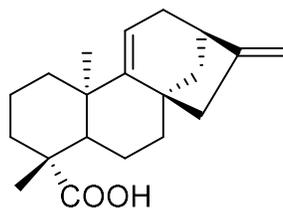
Los diterpenoides *ent*-kaureno (*ent*-kauranoides), una categoría única de la familia de diterpenoides, han ganado un importante interés debido a su diversidad y complejidad estructural. Estudios biológicos han demostrado que los *ent*-kauranos exhiben considerables actividades farmacológicas que incluyen efectos antitumorales, antibacterianos, antivirales y antiinflamatorios.⁵⁹ La familia Asteraceae es una fuente principal de compuestos de este tipo y en los últimos años ha aumentado su número en los géneros *Eupatorium* y *Ageratina*.

Del extracto acuoso de las hojas de *A. cilíndrica* se obtuvieron seis nuevos *ent*-kauranos glicosilados, el ácido-*ent*-15 β -(β -*L*-Fucosiloxi) kaur-16-*en*-19-oico- β -*D*-glucopiranosil ester (**59**), ácido-*ent*-15 β -(4-Acetoxi- β -*L*-fucosiloxi) kaur-16-*en*-19-oico- β -*D*-glucopiranosil ester (**60**), ácido-*ent*-15 β -(3-Acetoxi- β -*L*-fucosiloxi) kaur-16-*en*-19-oico- β -*D*-glucopyranosyl ester (**61**), ácido-*ent*-15 β -(β -*L*-Fucosiloxi) kaur-16-*en*-19-oico (**62**), ácido-*ent*-15 β -(4-Acetoxi- β -*L*-fucosiloxi)kaur-16-*en*-19-oico (**63**), ácido-*ent*-15 β -(3-Acetoxi- β -*L*-fucosiloxi) kaur-16-*en*-19-oico (**64**), junto al diterpeno ya conocido, Paniculoso V (**65**). Los metabolitos **59-62** se ensayaron contra trofozoitos de *Entamoeba histolitica* y *Giardia lamblia* para evaluar su actividad antiprotozoaria, los cuales presentaron actividad moderada con valores de IC₅₀ oscilando desde 43.3 a 73.5 μ M para *E. histolitica* y desde 41.9 a 98.5 μ M para *G. lamblia*.⁶⁰

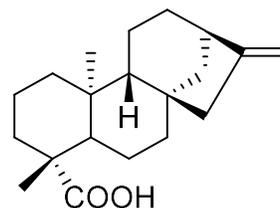


El estudio químico de *Ageratina deltoidea* produjo ácido grandiflorénico (**66**), ácido kaurenico (**67**) y ocho bencilbenzoatos (**68 - 75**), dos de ellos, el 3,5-dimetoxibencil-2,3,6-trimetoxibenzoato **70** y 4- (β -D-glucopiranosiloxi)-2,6-dimetoxibenzoato de 3-hidroxibencilo **74**, descritos por primera vez en la literatura. Además, la nueva lactona sesquiterpénica deltoidina C (**76**) y otras dos ya reportadas en la literatura, deltoidina A (**77**) y ácido-8 β -angeliloixielemacronquistianthus (**78**). Las actividades antibacterianas y antifúngicas de los compuestos **66** a **75** y **77-78** se evaluaron en *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y

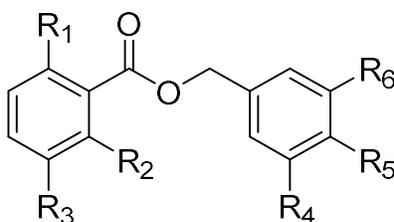
Candida albicans. El compuesto **77** fue el agente antibacteriano más activo (MIC 16.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) contra *E. coli* y los derivados *ent*-kaurenoides (**66** - **67**) mostraron actividad (MIC 31.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) contra *S. aureus*.⁶¹



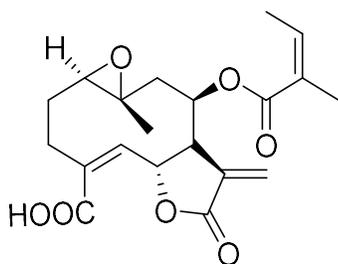
(66)



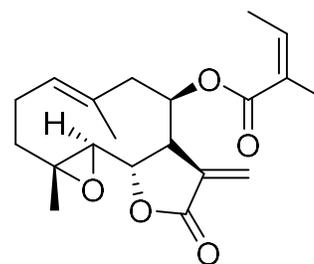
(67)



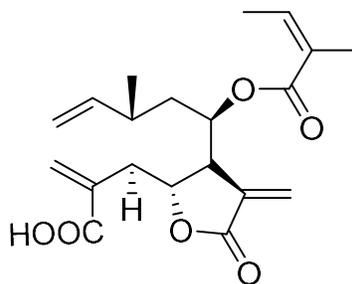
	R1	R2	R3	R4	R5	R6
(68)	OH	OMe	H	H	H	H
(69)	OMe	OMe	OMe	OMe	H	H
(70)	OMe	OMe	OMe	OMe	H	OMe
(71)	OMe	H	OMe	H	H	H
(72)	OMe	OMe	H	H	H	H
(73)	OMe	OMe	OMe	H	H	H
(74)	OMe	OMe	H	H	GlcO	OH
(75)	OH	OH	H	H	H	H



(76)



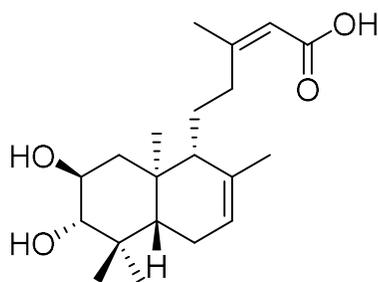
(77)



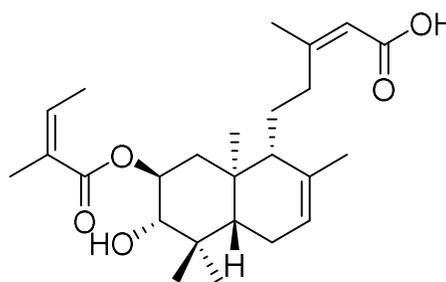
(78)

2.7.1.1.3.2. Labdano.

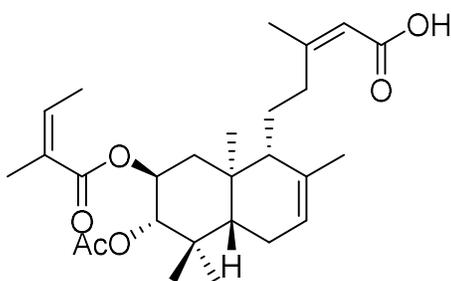
Se estudiaron las partes aéreas de dos especies de *Ageratina*: *A. dictyoneura* y *A. illita* por lo que se aislaron cuatro nuevos diterpenos de tipo labdano, dictiolabdano A (**79**), dictiolabdano B (**80**), dictiolabdano C (**81**) y dictiolabdano D (**82**), estos mostraron inhibición dosis-dependiente en la proliferación de las células U937 derivadas de leucemia mieloide humana, indicando actividad antiproliferativa. Además también se identificaron los diterpenos, 2 β , 3 α , 15-trihidroxi-*ent*-labd-7-ene (**83**) y ácido 2 β , 3 α -trihidroxi-*ent*-labd-7-en-15-oico (**84**), dos lactonas sesquiterpénicas, 8 β -hidroxi- β -ciclocostunolide (**85**) y eupatoriopicrina (**86**) seis flavonoides, ramnocitrina (**87**), quercetina 3,7-dimetileter (**88**), pinocembrina (**89**), quercetina 3-dimetileter (**90**), penduletina (**91**) y betuletol 3-metileter (**92**).⁶²



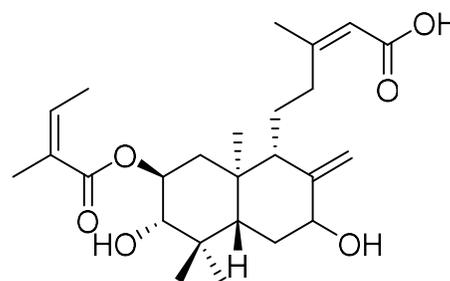
(79)



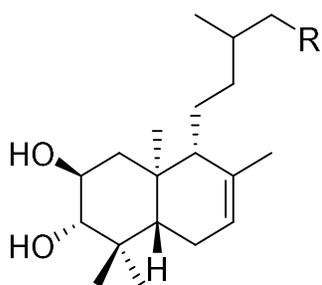
(80)



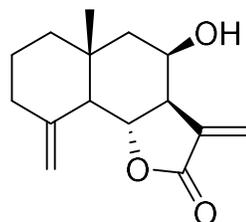
(81)



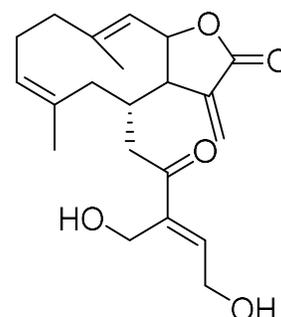
(82)

(83) R= CH₂OH

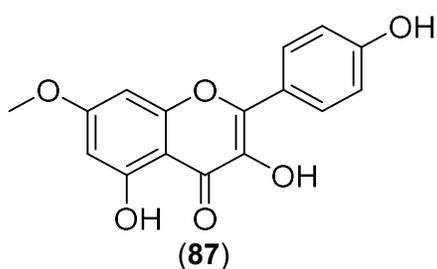
(84) R= COOH



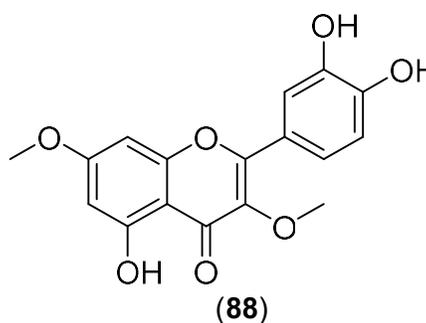
(85)



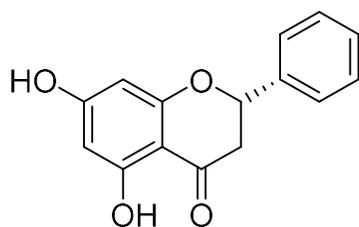
(86)



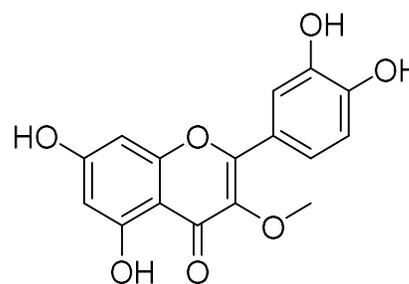
(87)



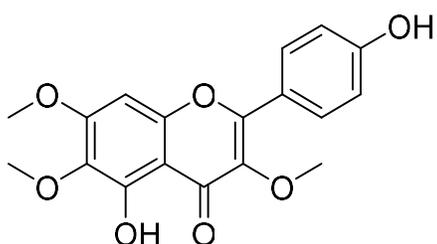
(88)



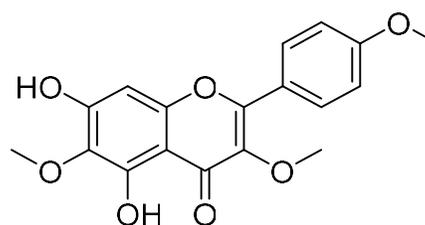
(89)



(90)

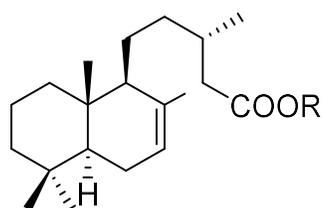


(91)

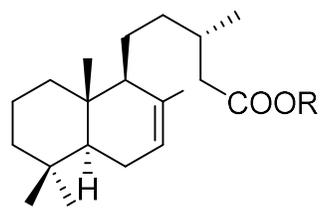


(92)

Varios compuestos han sido aislados de las partes aéreas de *A. jocospecana*, García Sánchez y colaboradores purificaron de las flores y hojas cuatro diterpenos llamados, ácido (-)-(5S,9S,10S,13S)-labd-7-en-15-oico (**93**), metil (-)-(5S, 9S, 10S, 13S)-labd-7-en-15-oato (**94**), ácido (+)-(5S,8R,9R,10S,13R)-8-hidroxiabdan-15-oico (**95**) y el ácido (-)-(5S,9S,10S,13Z)-labda-7,13-dien-15-oico (**96**).⁶³



(**93**) R= H
(**94**) R= CH₃



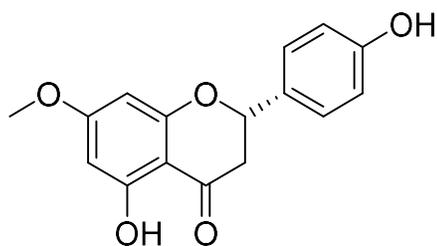
(**95**) R= H
(**96**) R= CH₃

2.7.1.1.4. Flavonoides.

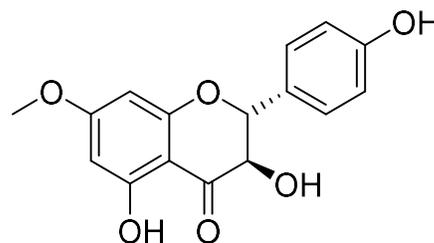
Los flavonoides son una clase importante de metabolitos secundarios que tienen una alta popularidad como nutraceuticos.⁶⁴ Se ha demostrado que muchos flavonoides tienen actividad antioxidante, capacidad de eliminación de radicales libres, prevención de enfermedades coronarias, hepatoprotectoras, antiinflamatorias y anticancerígenas, algunos flavonoides exhiben actividades antivirales potenciales.⁶⁵

Fueron evaluados por su actividad antiviral los extractos n-BuOH y AcOEt obtenidos de *Ageratina havanensis* contra vesivirus de conejo (RaV) (Caliciviridae) y virus del herpes simple humano tipo 1 y 2 (VHS-1, VHS-2), el extracto AcOEt fue el que presentó actividad contra el vesivirus de conejo, el fraccionamiento del mismo aisló cuatro flavonoides que fueron identificados como: 5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavanona (sakuranetina) (**97**), 3,5,4'-trihidroxi-7-metoxiflavanona (7-methoxiaromadendrina) (**98**), 4'-O-β-D-glucosil-5,3'-dihidroxi-7-metoxiflavanona (4'-O-β-D-glucosil-7-metoxi-eriodictiol) (**99**) y 4'-O-β-D-glucosil-5-hidroxi-7-metoxiflavanona (4'-O-β-D-glucosilsakuranetina) (**100**).⁶⁶ Morán-Pinzón y colaboradores aislaron y caracterizaron de las partes aéreas de *Ageratina stevioides* el compuesto **97**, así mismo se demostró que tiene actividad vasorrelajante dependiente de endotelio en un modelo *ex vivo* con anillos de aorta de rata.⁶⁷

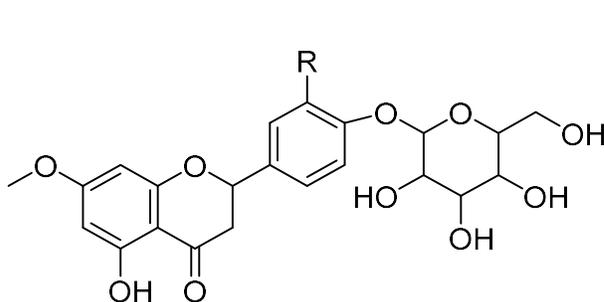
Un segundo estudio más reciente de esta misma especie, recolectada en temporada no reproductiva, condujo al aislamiento de los cuatro flavonoides previamente caracterizados junto a 3-O- β -D-glucosil-7-metoxiaromadendrina (**101**), 7-O- β -D-glucosil-4'-dihidroxi-5-metoxiflavanona (**102**) y 5-O- β -D-glucosilsakuranetina (**103**).⁶⁸



(97)

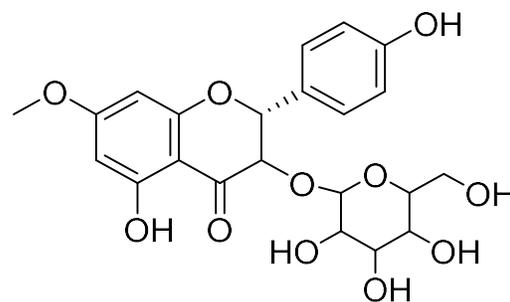


(98)

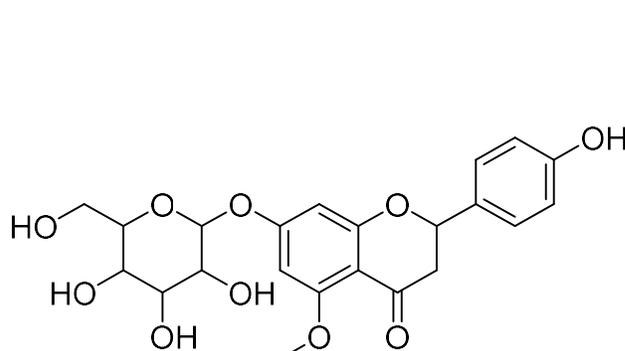


(99) R= OH

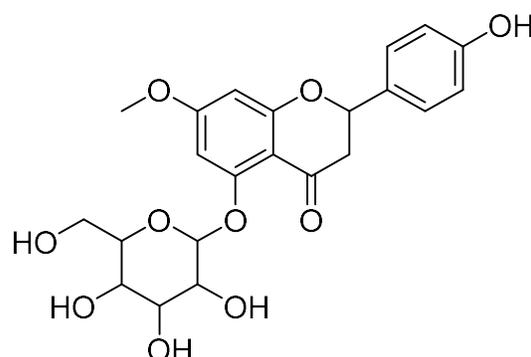
(100) R= H



(101)

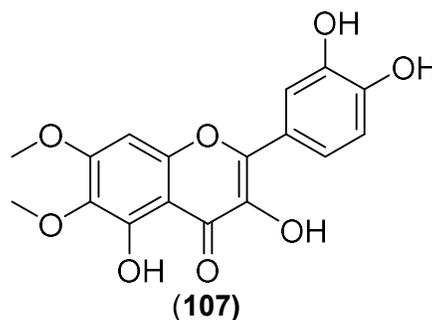
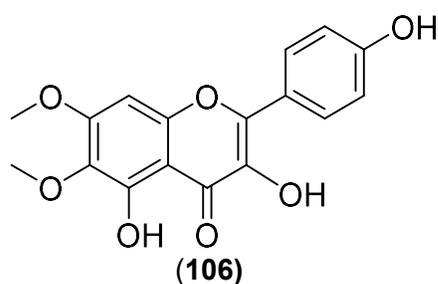
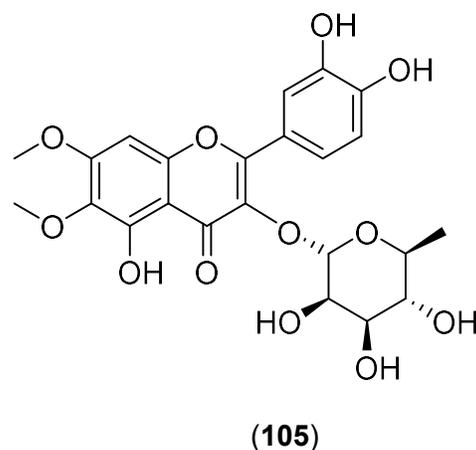
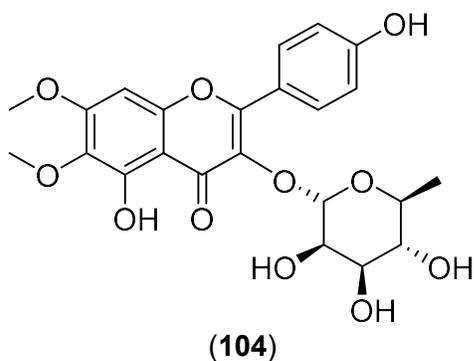


(102)



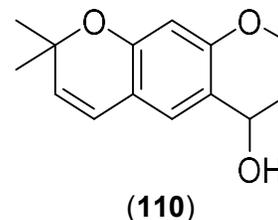
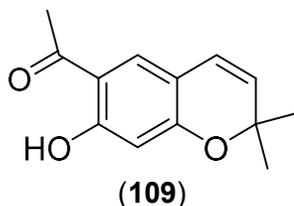
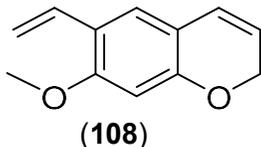
(103)

Del extracto metánolico de *A. brevipes* se caracterizaron dos flavonoides, eupalina (**104**) y eupatolina (**105**), estos flavonoides fueron reportados por primera vez en la especie *A. lingustrinum*. Otros de los flavonoides encontrados en este mismo estudio fueron las agliconas eupalitina (**106**) y eupatolitina (**107**).⁶⁹

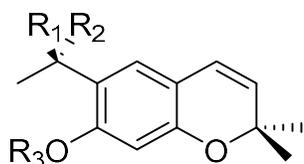


2.7.1.1.5. Cromenos y Benzofuranos.

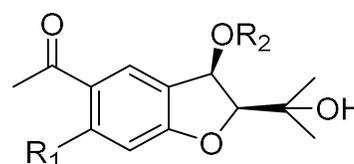
Los aceites esenciales de diversas especies han sido investigados, un estudio del aceite esencial de las hojas frescas de *Ageratina pichinchensis* fue evaluado y mostro actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *E. faecalis*. Un análisis fitoquímico mediante la técnica de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) del aceite esencial identificó cromenos como constituyentes mayoritarios, el androencecalinol (**108**), eupatoriocromeno (**109**) y enecalol (**110**).⁷⁰

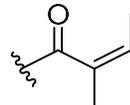
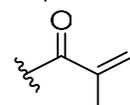


En otro estudio de *A. pichinchensis* var. *bustamenta* se llegó al aislamiento de varios metabolitos secundarios, entre los constituyentes mayoritarios se identificaron los cromenos, encecalinol (**111**), *O*-metilencecalinol (**112**), encecalina (**113**) y sonorol (**114**), junto a los compuestos 5-acetil-3-β-angeloiloxi-2 β-(1-hidroxiisopropil)-2,3-dihidrobenzofurano (**115**), 5-acetil-3 β-angeloiloxi-2 β-(1-hidroxiisopropil)-6-metoxi-2,3-dihidrobenzofurano (**116**).⁷¹



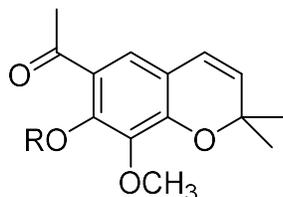
- (111) R₁=OH, R₂= H, R₃= CH₃
 (112) R₁=OCH₃, R₂= H, R₃= CH₃
 (113) R₁=R₂= O, R₃= CH₃
 (114) R₁=OCH₃, R₂= H, R₃= CH₃



- (115) R₁= H, R₂= 
 (116) R₁= OCH₃, R₂= 

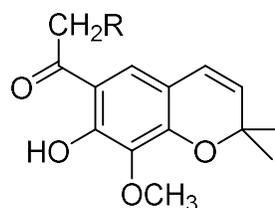
Ageratina riparia es una maleza problemática que se ha convertido en un invasor nocivo de ecosistemas naturales y artificiales, el análisis de los componentes químicos de las malezas invasoras también podría indicar sus posibles usos comerciales. Varios grupos de investigación han estudiado esta especie, la cual es rica en compuestos de tipo cromenos que están muy difundidos en el género.⁷²

El extracto metanólico de las partes aéreas de *A. riparia* mostró actividad antifúngica, y el fraccionamiento del mismo permitió el aislamiento de seis cromenos, Metilripariocromeno A (**117**), ripariocromeno A (**118**), ripariocromeno B (**119**), ripariocromeno C (**120**) and eupatoriocromeno (**121**) y acetovanillocromeno (**122**). El compuesto **117** fue el componente mayoritario del extracto y mostró actividad contra *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Collectrichum gloeosporioides* and *Cercospora nicotianae*.⁷³



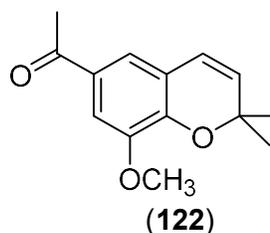
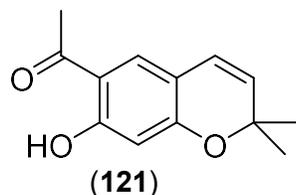
(117) R = CH₃

(118) R = H



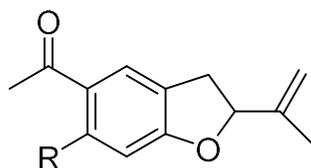
(119) R = OCOCH₃

(120) R = OCH₂CH(CH₃)₂

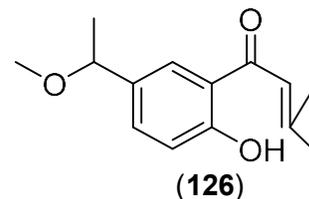
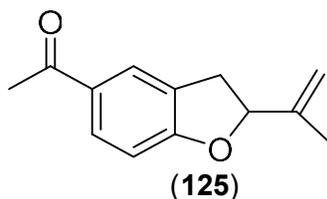


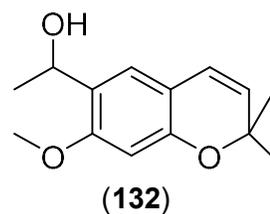
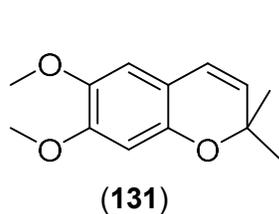
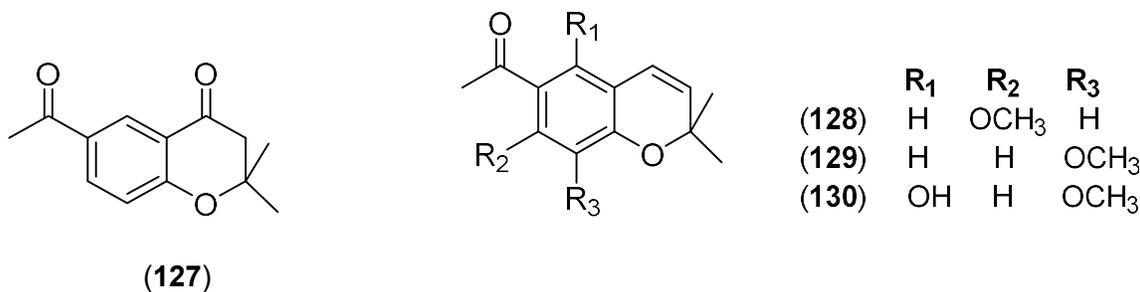
Ageratina altissima es una especie conocida como “raíz de serpiente blanca” de la cual se han reportado casos de intoxicación en animales que se exponen a la planta, contiene toxinas denominadas colectivamente como “Tremetol”. Los signos clínicos de envenenamiento pueden ocurrir después de la ingestión de 1 a 15% de peso corporal durante un período de 1 a 3 semanas.⁷⁴ Se presenta pérdida de peso, apatía, reticencia a moverse, temblores musculares, estreñimiento y rigidez aparente de la articulación.

El tremetol es una mezcla compleja de varios componentes, tremetona (**123**), 6-hidroxitremetona (**124**) y dehidrotremetona (**125**) son de los constituyentes principales y que se han aislados de esta especie, junto a otros metabolitos, 2-senecioil-4-(1-metoxietil) fenol (**126**), 6-acetil-2,2-dimetilcroman-4-ona (**127**), 6-acetil-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno (**128**), 6-acetil-8-metoxi-2,2-dimetilcromeno (**129**), 6-acetil-5-hidroxi-8-metoxi-2,2-dimetilcromeno (**130**), 6,7-dimetoxi-2,2-dimetilcromeno (**131**) y 6-(1-hidroxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno (**132**).⁷⁵⁻⁷⁶



R
(123) H
(124) OH





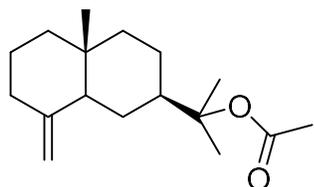
2.7.2. Actividad antiinflamatoria y composición química.

Hay pocos reportes de especies de *Ageratina* que han sido evaluadas por su actividad antiinflamatoria. En un estudio se determinó la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de los tallos de *A. sternbergiana* con el método del edema subplantar inducido por albúmina. En el análisis fitoquímico se encontró un alto contenido de flavonoides, algunos alcaloides, taninos y azúcares.⁷⁷ Se encuentra reportado también el estudio del extracto etanólico de hojas de *A. adenophora*, el que se evaluó mediante el modelo de edema plantar inducido por carragenina, mostrando ser activo.⁷⁸

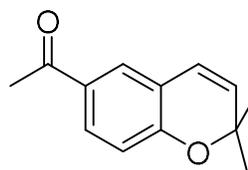
Ageratina pichinchensis ha sido utilizada por muchos años en la medicina tradicional para el tratamiento de heridas en la piel, principalmente aquellas relacionadas por infecciones por hongos.⁷⁹

Sánchez-Ramos y colaboradores estudiaron el extracto de AcOEt obtenido de un cultivo de callos de esta especie, y el cual mostró tener efecto antiinflamatorio al evaluarlo en un modelo *in vivo* de edema auricular inducido por TPA. Del extracto bioactivo se aislaron diez compuestos acetato de (+)- β -eudesmol (**133**), desmetoxiencecalina (**134**), la mezcla de β -sitosterol (**135**) y estigmasterol (**136**), (2*S*,3*R*)-5-acetil-7,3-dihidroxi-2-(1-isopropenil)-2,3-dihydrobenzofurano(**137**), β -amirina (**138**), 3-epilupeol (**139**), glucosido de estigmasterol

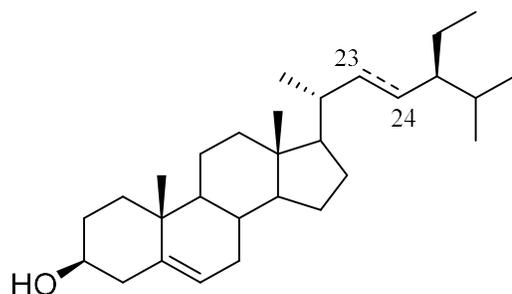
(140) y campesterol (141). Los compuestos 137 y 139 mostraron importante actividad antiinflamatoria.⁸⁰



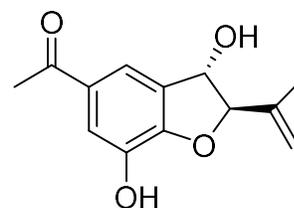
(133)



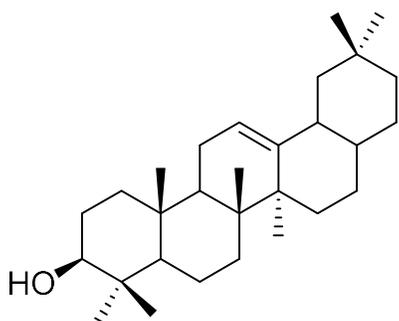
(134)



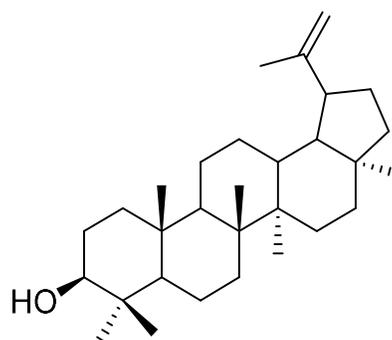
	23	24
(135)	CH ₂	CH ₂
(136)	H	H



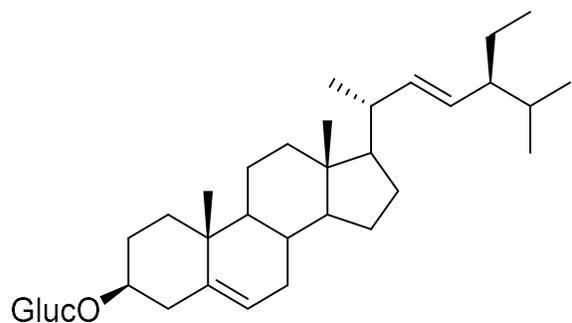
(137)



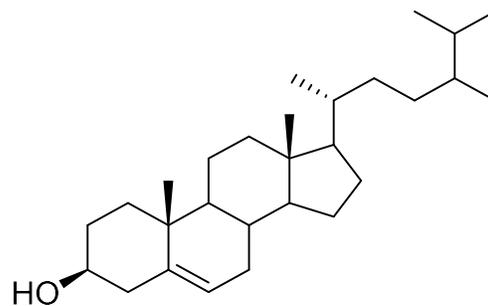
(138)



(139)



(140)



(141)

2.7.3. *Ageratina espinosarum*

Ageratina espinosarum var. *espinosarum* (A.Gray) R.M.King & H.Rob. [*Eupatorium espinosarum* A. Gray var. *espinosarum*], es un arbusto de 1 a 2 metros de altura, hojas opuestas, pecioladas, subcoriáceas o membranosas, triangular-ovadas o rómbico-ovadas de 2 a 4 cm de largo por 1 a 2.5 de ancho; en la cara superior de color verde brillante y en la inferior pálido, finamente reticuladas; pecíolos de 5 a 10 mm, corimbos densos y numerosos, de 4 a 5 cm. de ancho, convexos; cabezuelas de 13 flores; brácteas oblongas o elípticas, a veces amarillentas, resinosas o pegajosas (figura 4).⁸¹

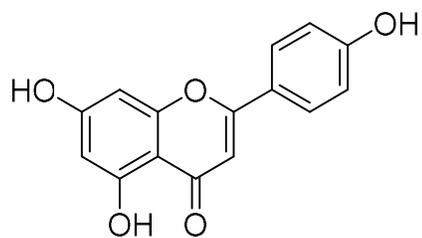


Figura 4. *Ageratina espinosarum*.

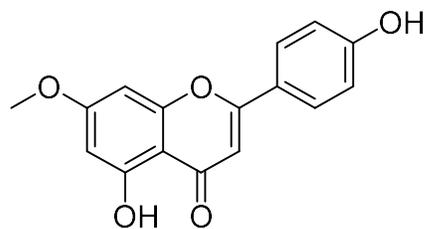
Numerosas agliconas de flavonoides están presentes en esta planta, en una investigación de las partes aéreas de esta especie recolectada en el estado de Oaxaca, se aislaron los compuestos: apigenina (**142**), apigenina-7-metil-eter (**143**), luteolina (**144**), crisoeriol (**145**), kaempferol (**146**), kaempferol-6-metil-eter (**147**) y tres flavanonas, sakuranetina (**97**), eriodictiol (**148**) y 7,3'-dimetileriodictiol (**149**).⁸²

En otro estudio de las raíces de *A. espinosarum* se encontraron compuestos derivados del timol, 2,5-dimetoxi-4-(1-metiletil)-benzenometanol (**150**), acetato-2,5-dimetoxi-4-(1-metiletil)-benzenometanol (**151**) y 2,5-dimetoxi-6-metil-3-(1-metiletil) fenol (**152**). Así mismo en las partes aéreas de los extractos polares se aislaron, kaempferol 3,4'-dimetil eter (**153**), quercetina (**154**), quercetina 3,3'-dimetil éter (**155**) y naringenina (**156**).⁸³

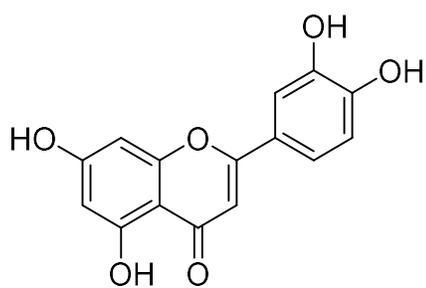
Un estudio químico reciente de *A. espinosarum* mostró un contenido químico rico en flavonoides. De su extracto hidro-alcohólico se caracterizaron sakuranetina (**97**), 4'-metilsakuranetina (**157**), persicogenina (**158**), 4'-metilcrisoeriol (**159**), alisifolinona (**160**), homoeriodictiol (**161**), naringenina (**156**), taxifolina (**162**), y apigenina (**142**).⁵



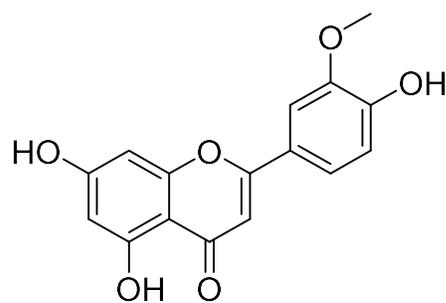
(142)



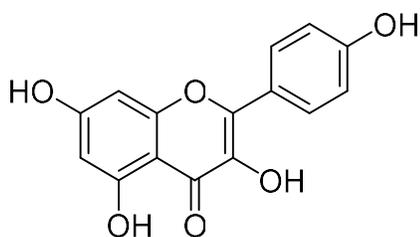
(143)



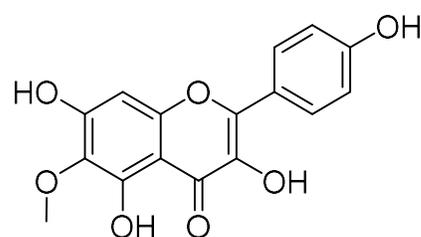
(144)



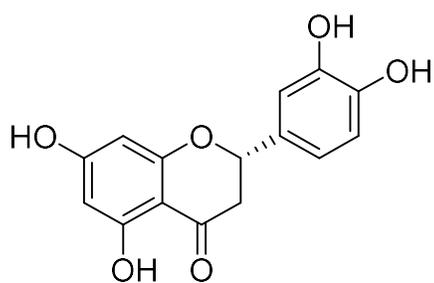
(145)



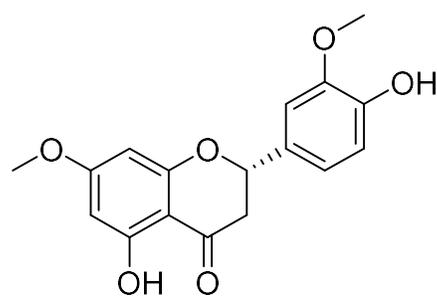
(146)



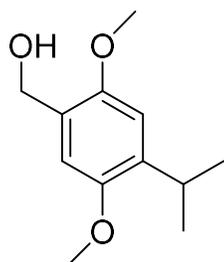
(147)



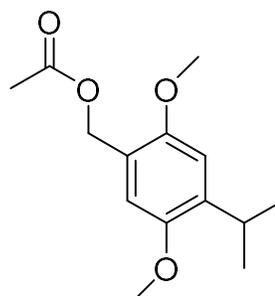
(148)



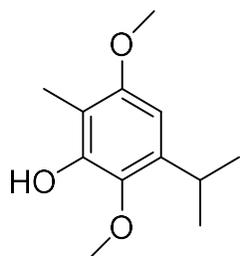
(149)



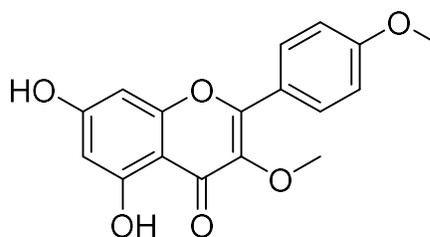
(150)



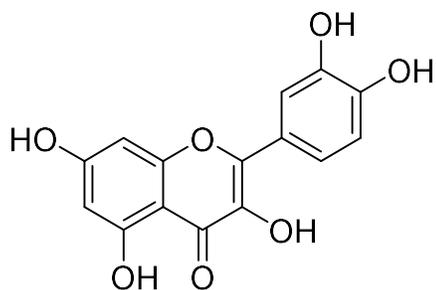
(151)



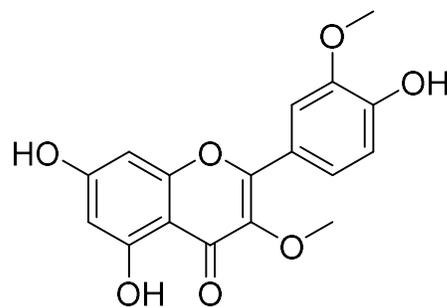
(152)



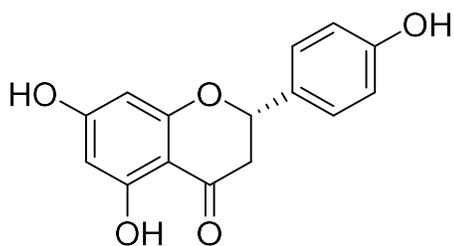
(153)



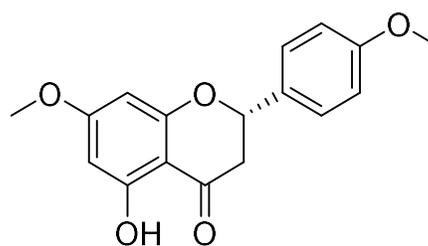
(154)



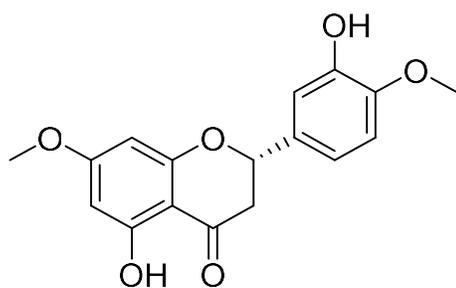
(155)



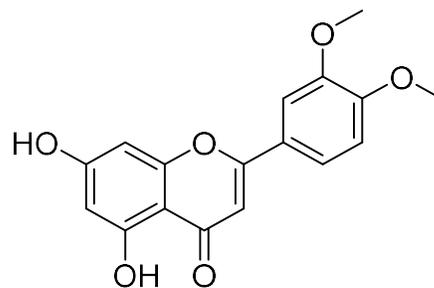
(156)



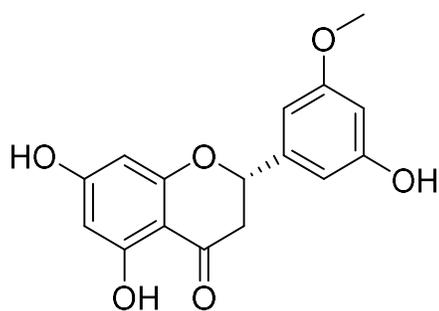
(157)



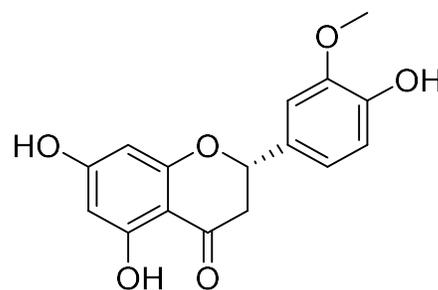
(158)



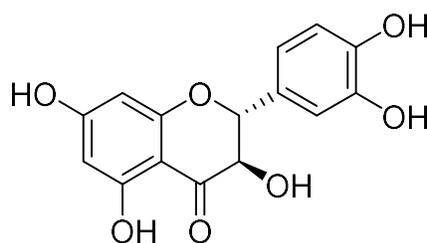
(159)



(160)



(161)



(162)

3. JUSTIFICACION

La inflamación es un fenómeno desagradable y doloroso, cuyo tratamiento farmacológico convencional incluye el uso de fármacos antiinflamatorios, que en su uso prolongado han provocado reacciones adversas severas. Las plantas medicinales son una fuente importante de metabolitos secundarios con propiedades biológicas diversas, entre las que se incluye la actividad antiinflamatoria, la cual ha generado gran interés y ha conducido a realizar investigaciones para la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos que ayuden a resolver la problemática de los tratamientos actuales. El género *Ageratina* es utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de trastornos inflamatorios, sin embargo, hay pocos estudios de estas especies dirigidos a probar esta actividad. Existen algunos estudios de la composición química de este género, en los cuales se han aislado compuestos de tipo flavonoide. Estos metabolitos han demostrado poseer actividad antioxidante y antiinflamatoria, por tanto, el estudio químico de *Ageratina espinosarum var. sp.* recolectada en Puebla y la evaluación de los metabolitos secundarios que se obtengan en ella, así como de los compuestos aislados de *Ageratina espinosarum var espinosarum* recolectada en Hidalgo permitirán proponer nuevos agentes terapéuticos antiinflamatorios.

4. HIPÓTESIS

Antecedentes etnomédicos y farmacológicos de otras especies del género *Ageratina* demuestran su actividad antiinflamatoria. Los reportes en la literatura indican que algunos metabolitos aislados de estas especies son potenciales compuestos antiinflamatorios. Por lo tanto, la evaluación de los metabolitos secundarios de dos variedades de *Ageratina espinosarum*, conducirá a compuestos con posible actividad antiinflamatoria.

5. OBJETIVOS

5.1. General.

Realizar el estudio fitoquímico de una nueva variedad de *Ageratina espinosarum* var. sp. y compararla con un estudio previo de *Ageratina espinosarum* var. *espinosarum*, así como evaluar la actividad antiinflamatoria de los compuestos obtenidos de ambas variedades en un modelo *in vitro* de inhibición de las ciclooxigenasas.

5.1.1. Específicos

1. Preparar el extracto hidro-alcohólico de *Ageratina espinosarum* var. sp. recolectada en Tepeji de Rodríguez en el estado de Puebla.
2. Obtener diferentes extractos orgánicos (hexano, acetato de etilo, butanol y agua) a partir del extracto hidro-alcohólico.
3. Fraccionar estos extractos orgánicos mediante diferentes técnicas cromatográficas.
4. Caracterizar los compuestos presentes en las fracciones obtenidas utilizando técnicas espectroscópicas de RMN ^1H y ^{13}C y experimentos bidimensionales HSQC, HMBC, DEPT y COSY.
5. Evaluar la actividad antiinflamatoria de los compuestos de las dos variedades de *Ageratina espinosarum* mediante un modelo *in vitro* frente a las enzimas COX-1 y COX-2.
6. Realizar un estudio de acoplamiento molecular *in silico* de los metabolitos secundarios que presenten actividad sobre COX-1 y COX-2.

6. METODOLOGÍA

6.1. Recolección y obtención de los extractos de *Ageratina espinosarum* var. *sp.*

La recolecta de la especie vegetal se llevó a cabo en Tepeji de Rodríguez en el estado de Puebla el 27 de julio de 2014 con el número de colecta # 1434, por el M. en C. Ramiro Ríos Gómez de la Facultad de Estudios Superiores (FEZA) Zaragoza, UNAM. Una muestra de la especie se encuentra depositada en el Herbario de la institución y registrada con el número de herbario FEZA-15059.

6.2. Obtención del extracto hidro-alcohólico de *Ageratina espinosarum* var. *sp.*

Las partes aéreas de la planta se secaron a temperatura ambiente, posteriormente se trituraron con ayuda de un mortero. El material obtenido se colocó en un garrafón de vidrio y se sometió a un proceso de maceración, en este se cubrió el contenido con una mezcla 85:15 MeOH/H₂O. Este procedimiento se realizó por triplicado por 72 horas. El macerado se filtró y el líquido recuperado se vertió en un matraz para llevarse a destilación a vacío con ayuda de un rotaevaporador. Del extracto crudo se obtuvo en total 32.3 g.

Posteriormente se sometió a un proceso de bipartición con disolventes de polaridad creciente (hexano, acetato de etilo, butanol y agua), esto con la finalidad separar los componentes del extracto hidro-alcoholico. Las cantidades obtenidas de los extractos orgánicos totales se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 4. Cantidad en masa de los extractos orgánicos de la especie *Ageratina espinosarum* var. *sp.*

Extracto	Clave	Peso del extracto	
Hidroalcohólico	EHA	32.2 g	
Hexano	EH	5.4 g	
Acetato de etilo	EAe	8 g	Clave: EAeBu
Butanol	EBu	12.3 g	
Agua	EA	6.5 g	

Por medio de CCF se realizaron placas comparativas de los extractos obtenidos por bipartición y se eluyeron con un sistema 9:1 CH₂Cl₂/MeOH. Se decidió reunir el extracto de acetato de etilo y el de butanol debido a que contenían prácticamente la misma composición metabólica observada en la placa. La reunión resultante se identificó con la clave: **EAeBu**.

Se llevó a cabo el fraccionamiento primario del extracto mediante cromatografía en columna abierta para la identificación de los metabolitos secundarios presentes.

6.2.1. Fraccionamiento primario del extracto EAeBu de *Ageratina espinosarum* var. *sp.*

La cantidad total del extracto EAeBu fue 17.125 g, sin embargo se guardaron 2.125 g para evaluaciones biológicas posteriores. Se colocaron los 15 g restantes en una columna de 5 cm de diámetro previamente empaquetada con 7" de sílica flash (sílica gel, malla 0.040-0.063 mm) y humedecida con una mezcla de disolventes 95:5 AcOEt/MeOH, la cual fue el sistema de elución inicial. Este proceso fue monitoreado por cromatografía en placa fina (CCF). Las placas cromatográficas se observaron en una lámpara ultra violeta (UV), Entela® y el revelado se hizo aplicando a las mismas una solución de sulfato cérico amoniacal al 1% en H₂SO₄ 2N y calentándolas. Se obtuvieron 98 fracciones. Del fraccionamiento se reunieron aquellas fracciones que mostraban similitud cromatográfica observada en las placas de CCF, de esta manera se generaron un total de 14 reuniones las cuales se agruparon de acuerdo a la homogeneidad observada en CCF como se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Resumen del fraccionamiento primario del extracto EAeBu de *Ageratina espinosarum* var. *sp.*

FRACCIONES	POLARIDAD	REUNIONES	GRUPOS
1-20	95:5 AcOEt/MeOH	1,2,3,4,5,6-7,8-11,12-21	A
21-34	85:15 AcOEt/MeOH	22, 23-32	B
35-49	80:20 AcOEt/MeOH	33-49	C
50-63	70:30 AcOEt/MeOH	50-67,68-96	D
64-75	60:40 AcOEt/MeOH		
76-86	50:50 AcOEt/MeOH		
87-96	30:70 AcOEt/MeOH		
97	100 % MeOH	97	E
98	H ₂ O	98	F

6.2.1.1. Recromatografía de la fracción 4 del grupo A.

Se obtuvieron 2.5g de la fracción 4 del grupo A, los cuales se llevaron a un fraccionamiento secundario en una columna de 2.5 cm de diámetro, previamente empacada con 7" de gel de sílice flash (sílica gel, malla 0.040-0.063 mm), humedecida con un sistema 9:1 CH₂Cl₂/acetona, mismo con el que se inició el proceso de elución. Se realizaron gradientes de polaridad mediante adición de acetona, hasta finalizar con 100 % del mismo. Se llevó a

cabo un lavado con MeOH. Se colectó un total de 84 fracciones, las cuales se reunieron en grupos de acuerdo con su similitud en cromatografía en capa fina. El proceso cromatográfico se muestra en la siguiente tabla (Tabla 6)

Tabla 6. Proceso cromatográfico de la purificación de la fracción 4 del grupo A.

FRACCIONES	POLARIDAD	REUNIONES
1-16	90:10 CH ₂ Cl ₂ /acetona	1,2,3,4,5-6,7,8-14,15-17
17-29	88:12 CH ₂ Cl ₂ /acetona	18-20, 21-24, 25-28
30-40	85:15 CH ₂ Cl ₂ /acetona	29-31, 32, 33-36
41-51	80:20 CH ₂ Cl ₂ /acetona	37-45, 46-49
52-71	70:30 CH ₂ Cl ₂ /acetona	50-56, 57-62, 63-70
72-82	50:50 CH ₂ Cl ₂ /acetona	71-75, 76-82
83	100 % acetona	83

6.2.1.2. Purificación de la fracción 4 de la recromatografía de la fracción 4 del grupo A.

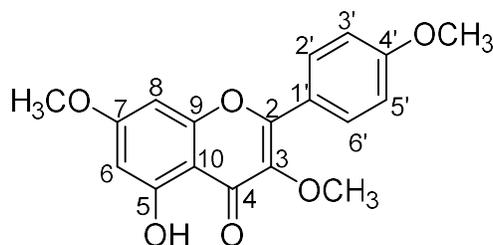
De la fracción 4 de este proceso cromatográfico se realizó nuevamente una recromatografía en columna abierta eluida con una mezcla de los disolventes diclorometano y metanol. Se colectaron un total de 37 fracciones. Se monitoreó mediante placas de CCF y las fracciones 2, 3 y 7 se enviaron RMN de ¹H para su elucidación estructural. Mediante la interpretación de sus espectros, se logró la obtención de los siguientes flavonoides, para la fracción 2 y 3 los compuestos se caracterizaron en mezcla (Tabla 7).

Tabla 7. Metabolitos secundarios aislados de la fracción 4 del grupo A.

Fracción	Compuesto
2	3, 4', 7-trimetilkaempferol (163)
	7, 4'-dimetilapigenina (164)
3	7, 4'-dimetilkaempferol (165)
	7, 4'-dimetilapigenina (164)
7	7, 4'-dimetilkaempferol (165)
8-14	kaempferol (146)

A continuación se enlistan los datos espectroscópicos de los compuestos obtenidos, cabe mencionar que algunos se encontraban en mezcla y así fueron identificados.

3, 4', 7-trimetilkaempferol.

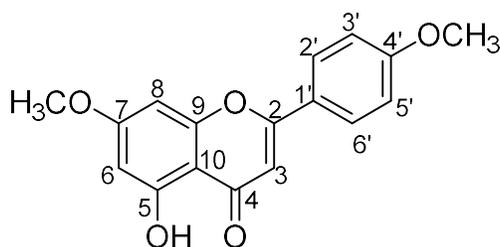


(163)

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, espectro 1), δ (integración, multiplicidad, *J*, asignación):

13.08 (1H, s, 5-OH), 8.1 (2H, d, *J*= 9.0 Hz, H-2' y H-6'), 7.12 (2H, d, *J*= 9.0 Hz, H-3' y H-5'), 6.59 (1H, d, *J*=4.0 Hz, H-6), 6.57 (1H, d, *J*=4.0 Hz, H-8), 4.03 (3H, s, 3-OCH₃), 3.89 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.85 (3H, s, 7-OCH₃).

7, 4'-dimetilapigenina.

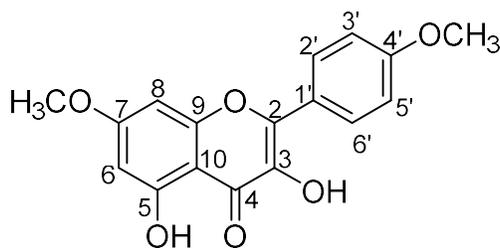


(164)

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, espectro 2), δ (integración, multiplicidad, *J*, asignación):

12.92 (1H, s, 5-OH), 7.83 (2H, d, *J*= 9.0 Hz, H-3' y H-5'), 7.20 (2H, d, *J*= 9.0 Hz, H-2' y H-6'), 6.59 (1H, d, *J*=4.0 Hz, H-6), 6.57 (1H, d, *J*=4.0 Hz, H-8), 6.55 (1H, s, H-3), 4.04 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.89 (3H, s, 7-OCH₃).

7, 4'-dimetilkaempferol.

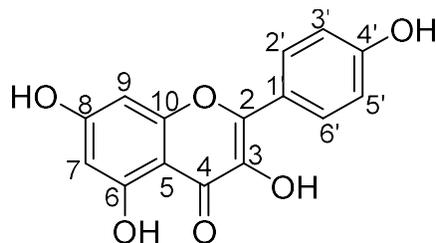


(165)

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, espectro 3), δ (integración, multiplicidad, *J*, asignación):

12.66 (1H, s, 5-OH), 8.03 (2H, d, *J*= 9.2 Hz, H-2' y H-6'), 6.98 (2H, d, *J*= 9.2 Hz, H-3' y H-5'), 6.37 (1H, d, *J*=2.4 Hz, H-6), 6.24 (1H, d, *J*=2.4 Hz, H-8), 3.79 (3H, s, 7-OCH₃), 3.86 (3H, s, 4'-OCH₃).

Kaempferol



(146)

¹H RMN (200 MHz, CD₃OD, espectro 4), δ (integración, multiplicidad, *J*, asignación):

8.08 (2H, d, *J*= 9.1 Hz, H-2' y H-6'), 6.90 (2H, d, *J*= 9.1 Hz, H-3' y H-5'), 6.39 (1H, d, *J*=2.1 Hz, H-6), 6.18 (1H, d, *J*=2.1 Hz, H-8).

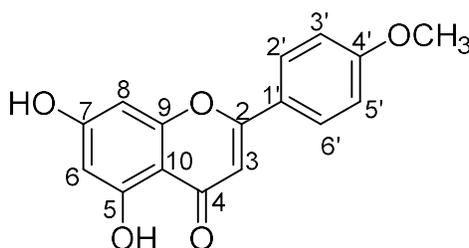
6.2.1.3. Tratamiento de la fracción 5 y la reunión 15-17.

Se realizaron lavados sucesivos de la fracción 5, ya que esta presentaba cristales en forma de aguja de color amarillo y en CCF también revelaba con sulfato cérico amoniacal el mismo color. Inicialmente se hizo un lavado con diclorometano y posteriormente con acetona hasta dejar el sólido lo más limpio posible, se decantaron las aguas madres y se reunieron en otro vial previamente pesado. El sólido seco y sus aguas madres se mandaron a un análisis

espectroscópico por RMN ^1H . El análisis de los datos espectroscópicos permitió la caracterización del compuesto conocido como acacetina (**166**).

El mismo protocolo de lavado se realizó para la reunión 15-17. Del recuperado y las aguas madres de esta fracción se logró obtener el flavonoide conocido con el nombre de apigenina (**142**). Los datos espectroscópicos de ambos compuestos se presentan a continuación:

4'-metilapigenina (Acacetina).



(166)

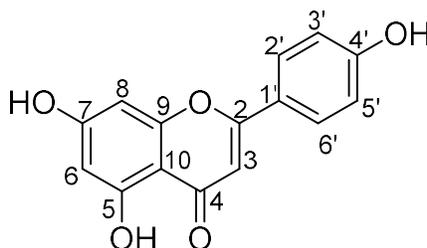
^1H RMN (400 MHz, 80:20 $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, espectro 5), δ (integración, multiplicidad, J , asignación):

7.81 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-2' y H-6'), 6.98 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-3' y H-5'), 6.52 (1H, s, H-3), 6.43 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-8), 6.23 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-6), 3.85 (3H, s, 4'- OCH_3).

^{13}C RMN (400 MHz, 80:20 $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$), δ (multiplicidad, asignación):

164.6 (C, -4), 163.2 (C, C-4'), 128.2 (CH, C-2' y C-6'), 123.5 (C, C-1'), 104.5 (C, C-10), 114.6 (CH, C-3' y C-5'), 103.9 (CH, C-3), 99.4 (CH, C-6), 94.5 (CH, C-8), 55.9 (OCH_3 , C-4').

Apigenina.



(142)

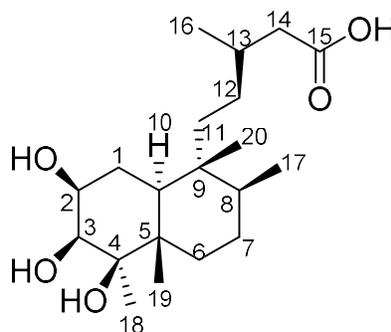
¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆, espectro 7), δ (integración, multiplicidad, J, asignación):

12.97 (1H, s, 5-OH), 7.93 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-2' y H-6'), 6.92 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3' y H-5'), 6.79 (1H, s, H-3), 6.48 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-8), 6.23 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, H-6).

6.2.1.4. Recromatografía de la reunión 25-28.

La reunión 25-28 de la recromatografía de la fracción 4 del grupo A se purificó en columna abierta. La cantidad de 75mg de la fracción fue adsorbida en 70mg de sílica flash, una vez adsorbida se colocó en una columna de 1cm de diámetro empacada con 7'' de sílica (sílica gel, malla 0.040-0.063 mm). El proceso de elución comenzó con 100% diclorometano. Se establecieron mezclas de gradientes de polaridad creciente con metanol. Se colectaron 77 fracciones. De las fracciones 9 y 11 se obtuvo el metabolito conocido como ácido dihidrotucumanoico (**167**), el cual también se aisló de reuniones posteriores en el extracto total. Los datos espectroscópicos que condujeron a su identificación son los siguientes:

Ácido dihidrotucumanoico.



(**167**)

¹H RMN (500 MHz, CD₃COCD₃, espectro 8), δ (integración, multiplicidad, J, asignación):

1.49 (1H, m, H-1), 1.62 (1H, m, H-1a), 3.96 (1H, *ddd*, *J* = 10.0, 7.0, 3.7 Hz, H-2), 3.51 (1H, *d*, *J* = 3.7 Hz, H-3), 1.85 (2H, *m*, H-7), 1.41 (1H, *m*, H-8), 1.96 (1H, *m*, H-13), 2.32 (1H, *dd*, *J* = 15.1, 6.0 Hz, H-14), 2.1 (1H, *dd*, *J* = 15.1, 6.0 Hz, H-14a), 0.97 (3H, *d*, *J* = 7.6 Hz, CH₃-16), 0.79 (3H, *d*, *J* = 6.3 Hz, CH₃-17), 1.22 (3H, *s*, CH₃-18), 1.09 (3H, *s*, CH₃-19), 0.74 (3H, *s*, CH₃-20).

^{13}C RMN (500 MHz, CD_3COCD_3 , espectro 9), δ (multiplicidad, asignación):

167.6 (C, C-15), 79.3 (CH, C-3), 76.6 (C, C-4), 69.5 (CH, C-2), 41.9 (CH_2 , C-14), 41.5 (C, C-5), 39.2 (CH, C-10), 36.9 (CH, C-8), 36.8 (CH_2 , C-11), 36.3 (C, C-9), 33.1 (CH_2 , C-6), 31.7 (CH, C-13), 29.9 (CH_2 , C-12), 27.6 (CH_2 , C-7), 26.7 (CH_2 , C-1), 21.8 (CH_3 , C-18), 20.3 (CH_3 , C-16), 19.1 (CH_3 , C-20), 17.8 (CH_3 , C-19), 16.4 (CH_3 , C-17).

6.2.1.5. Recromatografía de la reunión 37-45.

Los 170 mg de esta reunión, previamente adsorbidos en 160 mg de silica flash, se sometieron a cromatografía en columna, se utilizó una columna de 1cm de diámetro que contenía 7" de gel de silica flash. La fase móvil inicial del proceso de elución fue un sistema 95:5 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. Para finalizar el proceso se hizo un lavado con MeOH 100% y en total se colectaron 36 fracciones. Se enviaron a RMN ^1H y ^{13}C las fracciones 2, 4 y 5, el análisis de los datos espectroscópicos identificó en las tres muestras al compuesto ácido dihidrotucumanoico (**167**), el cual ya había sido previamente caracterizado en fracciones precedentes.

6.2.2. Placas comparativas de los grupos de reuniones obtenidas del fraccionamiento primario del extracto EAeBu de *Ageratina espinosarum* var. sp.

Se realizaron placas comparativas de las reuniones del fraccionamiento total, Se usaron cromatofolios de fase reversa (RP-18 F_{254s}, Merck®). Las placas se eluyeron en un sistema 2:8 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$.

Con base en las características polares de las fracciones, se continuó la purificación de las mismas mediante la técnica de Extracción en Fase Solida (SPE).

6.2.2.1. Extracción en Fase Solida (SPE) de la fracción 2 del extracto EAeBu de *Ageratina espinosarum* var. sp.

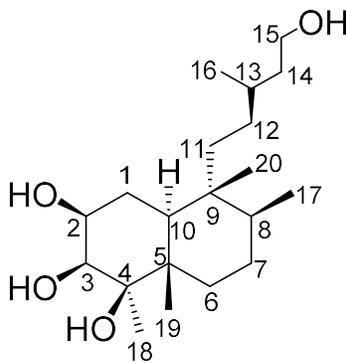
Para la purificación de la fracción se utilizaron cartuchos con capacidad para 500 mg de muestra (Sep-Pak®, Vac 3cc) empacados con silica gel de fase reversa C₁₈.

Procedimiento:

1. Se disolvieron 304 mg de la fracción en máximo 1 mL del sistema 4:6 H₂O/MeOH, esta solución se empleó como fase móvil inicial.
2. Se realizó un acondicionamiento previo al cartucho antes de ser utilizado. Inicialmente se hacen pasar 3 mL de MeOH 100% y enseguida 3 mL de H₂O, posteriormente se adicionaron 3mL del sistema de elución inicial. Este paso se realizó por duplicado y se desechó el disolvente empleado.
3. La muestra se adicionó al cartucho. Se eluyeron dos fracciones de 3 mL por cada fase móvil.
4. Se realizaron cambios de polaridad con los siguientes sistemas de elución: 3:7, 2:8, 1:9 H₂O/MeOH y finalmente se hicieron dos lavados, el primero con 100% MeOH y por ultimo 100% isopropanol.

El proceso se monitoreo por CCF usando cromatofolios que soportan gel de sílice de fase reversa C₁₈ (RP-18 F_{254s}, Merck®). Las placas se observaron en una lámpara UV y se revelaron con sulfato cérico amoniacal. Las fracciones eluidas con la polaridad 3:7 H₂O/MeOH se reunieron y fue sujeta a una recromatografía mediante extracción en fase solida siguiendo el protocolo anterior hasta la obtención de los compuestos puros. A partir de la purificación de esta fracción se aisló un compuesto aparentemente puro observado en placa, por esta razón se envió a RMN de 1D ¹H y ¹³C y 2D para los experimentos de HSQC, HMBC, COSY y NOESY. Mediante el análisis de sus datos espectroscópicos, se trata de un compuesto nuevo.

Dihidrotucumanol



(168)

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, espectro 12), δ (integración, multiplicidad, J, asignación):

1.52 (1H, m, H-1), 4.02 (1H, ddd, J= 9.1, 7.0, 4.5 Hz, H-2), 3.58 (1H, d, J= 4.5 Hz, H-3), 1.47 (1H, m, H-6), 1.36 (1H, m, H-6'), 1.26 (1H, m, H-7), 1.13 (1H, m, H-7'), 1.31 (1H, m, H-8), 1.73 (1H, m, H-10), 1.41 (2H, m, H- 11), 1.61 (2H, m, H- 12), 1.86 (1H, m, H- 13), 2.32 (1H, dd, J= 14.7, 6.2 Hz, H-14), 2.12 (1H, dd, J= 14.7, 8.0 Hz, H-14'), 4.07 (2H, dd, J= 6.7, 6.7 Hz, H-15), 0.94 (3H, d, 7.0 Hz, CH₃-16), 0.77 (3H, d, J=6.1 Hz, CH₃-17), 1.28 (3H, s, CH₃-18), 1.08 (3H, s, CH₃-19), 0.73 (3H, s, CH₃-20).

¹³C RMN (500 MHz, CDCl₃, espectro 13), δ (multiplicidad, asignación):

78.5 (CH, C-3), 77.4 (C, C-4), 69.7 (CH, C-2), 64.3 (CH₂, C-15), 42 (CH₂, C-14), 40.7 (C, C-5), 38.7 (CH, C-10), 36.3 (CH, C-9), 36 (CH, C-8), 32.4 (CH₂, C-6), 31.2 (CH, C-13), 30.9 (CH₂, C-12), 29.7 (CH₂, C-7), 26.7 (CH₂, C-11), 25.9 (CH₂, C-1), 22.1 (CH₃, C-18), 18.8 (CH₃, C-20), 17.4 (CH₃, C-19), 16.1 (CH₃, C-17), 13.9 (CH₃, C-16).

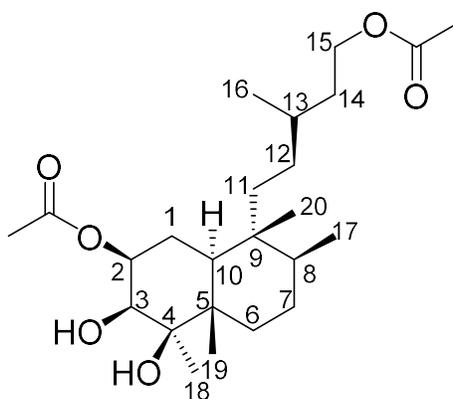
Las reuniones 5-11, 12-32, 33-49 y 50-67 obtenidas del fraccionamiento primario del extracto hidroalcohólico fueron sometidas a un fraccionamiento secundario por la técnica de extracción en fase sólida. Dada la difícil separación de los componentes de las reuniones, se procedió a realizar una reacción de derivatización (acetilación) con la finalidad de disminuir la polaridad de las fracciones para facilitar su purificación.

6.2.2.2. Reacción de acetilación de la fracción 3-4 obtenida del fraccionamiento de la reunión 5-11 del extracto hidroalcohólico de *Ageratina espinosarum*.

Se colocaron 50 mg de la fracción en un vaso de precipitados limpio y previamente pesado, enseguida se le adicionó 1 mL de piridina y 3 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó en agitación por un periodo de 24 h. Transcurrido el tiempo, se vertieron 10 mL de agua destilada y se dejó en agitación por 2 h. La mezcla de reacción se pasó a un embudo de separación de 50 mL y a continuación se realizaron extracciones con diclorometano (3X5 mL) recuperando la fase orgánica en todos los casos. Posteriormente se continuaron las extracciones pero ahora con HCl al 10% (3X5 mL) y se recuperó nuevamente la fase orgánica. La mezcla se neutralizó con solución saturada de NaHCO₃ y finalmente a la fase orgánica recuperada se le adicionó sulfato de sodio anhídrido para quitar los restos de agua.

Con ayuda de un rotaevaporador se concentró la muestra para evaporar el resto de disolvente. El resultado final de la reacción se monitoreo mediante CCF. El crudo de reacción se sometió a purificación por columna abierta iniciando la elución con una fase móvil 9:1 Hex/AcOEt. De las fracciones 7-12 y 23-30 revelaban con sulfato cérico amoniacal un solo punto en CCF, por esta razón se llevaron a RMN ^1H , se logró purificar el producto de acetilación de un compuesto que no ha sido reportado en la literatura. Los resultados que permitieron establecer su estructura se describen a continuación.

dihidrotucumanol (diacetilado)



(169)

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 , espectro 16), δ (integración, multiplicidad, J , asignación):

5.13 (1H, ddd, $J= 3.6, 6.5, 10.0$ Hz, H-2), 4.11 (2H, m, H-15), 3.6 (1H, d, $J= 3.6$ Hz, H-3), 2.08 (3H, s, 2-AcOMe), 2.05 (3H, s, 15-AcOMe), 1.28 (3H, s, CH_3 -18), 1.10 (3H, s, CH_3 -19), 0.92 (1H, d, $J= 6.4$ Hz, H-16), 0.78 (3H, d, $J= 6.2$ Hz, H-17), 0.72 (3H, s, H-20).

6.3. Elucidación estructural.

Después de recromatografías sucesivas y la obtención de los productos en forma pura o en mezcla, se llevó a cabo la elucidación de la estructura molecular de los compuestos mediante el análisis de sus espectros y cromatogramas obtenidos por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas. De las muestras se obtuvieron espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H), de carbono trece (RMN ^{13}C) y

experimentos bidimensionales (HSQC, HMBC, DEPT, COSY, DEPTQ). Los espectros de RMN fueron adquiridos en un equipo Varian de 200 MegaHertz (MHz) y Varian-Unity de 400 MHz para ^1H y para ^{13}C a 50 MHz.

6.4. Evaluación biológica.

Se realizó una revisión bibliográfica de los metabolitos secundarios aislados de las dos variedades de *Ageratina espinosarum* con la finalidad de definir cuales compuestos no han sido evaluados por su actividad antiinflamatoria. De la planta recolectada en el estado de Puebla se evaluaron los siguientes compuestos: el ácido dihidrotucumanoico (**167**), dihidrotucumanol (**168**) y el flavonoide 7,4'-dimetilkaempferol (**165**), y de la *Ageratina espinosarum* previamente estudiada fueron sakuranetina (**97**), homoeriodictiol (**161**), taxifolina (**162**) y una mezcla: 4'-metilsakuranetina (**157**) y persicogenina (**158**). Todos los compuestos se evaluaron por su capacidad inhibidora frente a dos enzimas, COX-1 y COX-2 (ciclooxigenasa 1 y 2), las enzimas y los reactivos se adquirieron del kit comercial de Cayman Chemical®. Los disolventes orgánicos fueron grado HPLC (CALEDON). Y se utilizó agua ultra-purificada para la preparación y dilución de los reactivos (Sigma-Aldrich, HPLC Plus).

6.4.1. Ensayo *in vitro* COX.

Las actividad inhibitoria de cada ligando sobre las enzimas COX, se determinó utilizando un kit enzimático con número de catálogo 560131 provisto por Cayman Chemical. El procedimiento general de este ensayo está dividido en dos partes, la reacción de la ciclooxigenasa y el inmunoensayo para la cuantificación de PG.⁸⁴

Previo a comenzar el ensayo, se prepararon los reactivos siguiendo las instrucciones del proveedor. Las muestras se evaluaron a tres concentraciones cada una (10, 31.6 y 100 μM). El paso inicial fue llevar a cabo la reacción COX. A continuación se describe de manera general.

6.4.1.1. Reacciones COX.

1. Se usaron tubos eppendorf de 1ml para llevar a cabo las reacciones. A todos los tubos de reacción se agregaron 160 μL de buffer de reacción, 10 μL de hemo y 10 μL de la enzima. Para los tubos de 0% actividad inicial se usó la enzima inactiva.

2. Se agregó 10 μL del compuesto prueba a los tubos inhibidores y finalmente a los tubos de 0 y 100% actividad se adicionaron 10 μL de vehículo, que es el disolvente en el cual se disolvieron los compuestos.
3. Todos los tubos se incubaron durante 10 minutos a 37°C.
4. Para llevar a cabo la reacción se adicionó 10 μL de ácido araquidónico a todos los tubos, posteriormente se agitaron e incubaron por exactamente dos minutos.
5. Transcurrido el tiempo se agregaron 30 μL de la solución saturada de cloruro de estaño para detener la catálisis enzimática. Los tubos se retiraron del baño María, se agitaron y se mantuvieron en reposo durante 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Terminada la reacción, se cuantificaron las prostaglandinas producidas mediante el inmunoensayo enzimático.

6.4.1.2. Inmunoensayo enzimático.

Para la segunda parte del ensayo, se prepararon los reactivos específicos del mismo. Se hicieron diluciones de las reacciones realizadas previamente debido a que la concentración es muy alta para su cuantificación, la reacción de 0% actividad se diluye 1:100, las reacciones de 100% actividad y de los compuestos prueba se diluyen 1:2000 y 1:4000 con una solución buffer de ELISA provista por el kit. El procedimiento se realizó en placas de 96 pozos, las cuales se configuraron de la siguiente manera (Figura 4):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	S1	S1	BC ₁	BC ₂	*	*	*	*	*	*	*
B	Blk	S2	S2	BC ₁	BC ₂	*	*	*	*	*	*	*
C	NSB	S3	S3	≠	≠	*	*	*	*	*	*	*
D	NSB	S4	S4	≠	≠	*	*	*	*	*	*	*
E	B ₀	S5	S5	≠	≠	*	*	*	*	*	*	*
F	B ₀	S6	S6	≠	≠	*	*	*	*	*	*	*
G	B ₀	S7	S7	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H	TA	S8	S8	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Figura 5. Configuración de la placa para el inmunoensayo enzimático.

Blk: Blanco, ABS causada por reactivo de Ellman's

NSB: Unión no específica del trazador al pozo.

B₀: (máxima unión), máxima cantidad del trazador que se une al antisuero en ausencia de PG's.

TA: Actividad total

S1-S8: Estándares de PG's.

BC1: background COX-1

BC2: background de COX-2

≠: Actividad inicial 100% (IA2, IA3)

*****: Muestras de los inhibidores

1. Se agregaron 100 μL de buffer ELISA a los pocillos NSB y 50 μL a los pocillos B₀. Enseguida se añadieron 50 μL de las reacciones a los pozos correspondientes a estándares de PG's (S1-S8), 0% actividad (BC₁ y BC₂), 100% actividad (\neq) y muestras de inhibidores (*).
2. Posteriormente se adicionaron 50 μL de trazador de PG's a todos los pocillos excepto a los pozos de actividad total (TA) y blanco (Blk) y 50 μL de antisuero a cada pocillo, a excepción de los pozos actividad total (TA), NSB y blanco.
3. La placa se cubrió con una película de plástico e incubó durante 18 horas a temperatura ambiente en agitación constante.
4. Transcurrido el tiempo, se vaciaron los pocillos y se enjuagaron 5 veces con el buffer de lavado, posteriormente se agregaron 200 μL de reactivo de Ellman's a cada pocillo y 5 μL de trazador al pozo de actividad total (TA). La placa se cubrió con una película plástica, se agitó y se dejó en reposo hasta que la absorbancia B₀ menos la absorbancia del blanco se encontrara en un rango de 0.3 a 0.8 UA. Se realizaron lecturas a los 60, 70 y 90 minutos a una longitud de onda de 420 nm.
5. Los valores de absorbancia obtenidos de las lecturas tanto en el ensayo de COX-1 y COX-2, se procesaron en una hoja de cálculo de Excel "ELISATriple" que se descargó del siguiente enlace: <https://www.caymanchem.com/analysisTools/elisa>. A continuación se describe como se realizó el análisis de datos para determinar el porcentaje de inhibición sobre COX-1, el mismo procedimiento de análisis se realizó para COX-2 (Anexos).

En la tabla 8 y 9 se describe el nombre de las muestras asociado al factor de dilución determinado, por plantilla se analizaron por triplicado siete compuestos, a tres concentraciones.

Tabla 8

LAYOUT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Std01	Std01	S 10C2	2		H 31.6C2	2		T 100C2	2	
B	Blank	Std02	Std02	S 10C3	4		H 31.6C3	4		T 100C3	4	
C	NSB	Std03	Std03	S 31.6C2	2		H 100C2	2		DK 10C2	2	
D	NSB	Std04	Std04	S 31.6C3	4		H 100C3	4		DK 10C3	4	
E	Bo	Std05	Std05	S 100C2	2		T 10C2	2		DK 31.6C2	2	
F	Bo	Std06	Std06	S 100C3	4		T 10C3	4		DK 31.6C3	4	
G	Bo	Std07	Std07	H 10C2	2		T 31.6C2	2		DK 100C2	2	
H	TA	Std08	Std08	H 10C3	4		T 31.6C3	4		DK 100C3	4	

Tabla 8. Configuración de la plantilla para el análisis de datos de COX-1.

Tabla 9

LAYOUT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Std01	Std01	AD 10C2	2		DT 31.6C2	2		MS y P 100C2	2	
B	Blank	Std02	Std02	AD 10C3	4		DT 31.6C3	4		MS y P 100C3	4	
C	NSB	Std03	Std03	AD 31.6C2	2		DT 100C2	2		IND 1.67 C2	2	
D	NSB	Std04	Std04	AD 31.6C3	4		DT 100C3	4		IND 1.67 C3	4	
E	Bo	Std05	Std05	AD 100C2	2		MS y P 10C2	2				
F	Bo	Std06	Std06	AD 100C3	4		MS y P 10C3	4				
G	Bo	Std07	Std07	DT 10C2	2		MS y P 31.6C2	2				
H	TA	Std08	Std08	DT 10C3	4		MS y P 31.6C3	4				

Tabla 9. Configuración de la plantilla para el análisis de datos de COX-1.

S=sakuranetina; H=homoeriodictiol; T=taxifolina; DK= 7,4'-dimetilkaempferol; AD=ácido dihidrotucumanoico; DT= dihidrotucumanol; MS y P= 4'-metilsakuranetina y persicogenina y IND= indometacina.

Se leyó la absorbancia por triplicado de cada muestra y los valores obtenidos se enlistan en las tablas 10 y 11. Se obtuvo el promedio del blanco.

Tabla 10

RAW DATA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.089	0.219	0.220	0.299	0.298	0.294	0.337	0.336	0.312	0.321	0.309	0.318
B	0.093	0.245	0.246	0.329	0.330	0.347	0.389	0.387	0.353	0.381	0.328	0.340
C	0.093	0.273	0.271	0.276	0.273	0.301	0.314	0.332	0.326	0.293	0.300	0.273
D	0.090	0.309	0.318	0.297	0.323	0.345	0.348	0.352	0.341	0.320	0.333	0.352
E	0.480	0.353	0.353	0.305	0.290	0.299	0.311	0.285	0.290	0.284	0.102	0.303
F	0.484	0.429	0.396	0.367	0.351	0.346	0.316	0.328	0.348	0.324	0.345	0.306
G	0.459	0.416	0.395	0.311	0.303	0.308	0.314	0.311	0.304	0.350	0.343	0.331
H	4.748	0.439	0.408	0.333	0.332	0.311	0.313	0.349	0.337	0.353	0.352	0.361

AvgRawBlnk= 0.0910

Tabla 10. Datos crudos de las lecturas de absorbancias.

Tabla 11

RAW DATA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.089	0.219	0.220	0.280	0.309	0.306	0.291	0.268	0.281	0.274	0.301	0.270
B	0.093	0.245	0.246	0.350	0.334	0.364	0.355	0.302	0.302	0.357	0.334	0.283
C	0.093	0.273	0.271	0.301	0.314	0.330	0.316	0.293	0.306	0.321	0.300	0.288
D	0.090	0.309	0.318	0.341	0.354	0.366	0.342	0.316	0.312	0.298	0.301	0.265
E	0.480	0.353	0.353	0.328	0.319	0.338	0.263	0.286	0.325			
F	0.484	0.429	0.396	0.345	0.346	0.351	0.293	0.318	0.323			
G	0.459	0.416	0.395	0.298	0.286	0.295	0.310	0.314	0.324			
H	4.748	0.439	0.408	0.373	0.312	0.343	0.324	0.321	0.332			

Tabla 11. Datos crudos de las lecturas de absorbancias.

El promedio del blanco se restó de cada dato y los valores obtenidos se muestran en las tablas 12 y 13.

Tabla 12

SUBTRACTED	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-0.002	0.128	0.129	0.208	0.207	0.203	0.246	0.245	0.221	0.230	0.218	0.227
B	0.002	0.154	0.155	0.238	0.239	0.256	0.298	0.296	0.262	0.290	0.237	0.249
C	0.002	0.182	0.180	0.185	0.182	0.210	0.223	0.241	0.235	0.202	0.209	0.182
D	-0.001	0.218	0.227	0.206	0.232	0.254	0.257	0.261	0.250	0.229	0.242	0.261
E	0.389	0.262	0.262	0.214	0.199	0.208	0.220	0.194	0.199	0.193	0.011	0.212
F	0.393	0.338	0.305	0.276	0.260	0.255	0.225	0.237	0.257	0.233	0.254	0.215
G	0.368	0.325	0.304	0.220	0.212	0.217	0.223	0.220	0.213	0.259	0.252	0.240
H	4.657	0.348	0.317	0.242	0.241	0.220	0.222	0.258	0.246	0.262	0.261	0.270

Tabla 12. Resultado de la sustracción del blanco a los datos de absorbancia.

Tabla 13

SUBTRACTED	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-0.002	0.128	0.129	0.189	0.218	0.215	0.200	0.177	0.190	0.183	0.210	0.179
B	0.002	0.154	0.155	0.259	0.243	0.273	0.264	0.211	0.211	0.266	0.243	0.192
C	0.002	0.182	0.180	0.210	0.223	0.239	0.225	0.202	0.215	0.230	0.209	0.197
D	-0.001	0.218	0.227	0.250	0.263	0.275	0.251	0.225	0.221	0.207	0.210	0.174
E	0.389	0.262	0.262	0.237	0.228	0.247	0.172	0.195	0.234			
F	0.393	0.338	0.305	0.254	0.255	0.260	0.202	0.227	0.232			
G	0.368	0.325	0.304	0.207	0.195	0.204	0.219	0.223	0.233			
H	4.657	0.348	0.317	0.282	0.221	0.252	0.233	0.230	0.241			

Tabla 13. Resultado de la sustracción del blanco a los datos de absorbancia.

Los valores que se encuentran dentro del rango 20-80% B/Bo de la curva estándar se muestran en las tablas 14 y 15.

Tabla 14

B/Bo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		0.333	0.336	0.542	0.539	0.529	0.641	0.639	0.576	0.599	0.568	0.592
B		0.401	0.404	0.620	0.623	0.667	0.777	0.772	0.683	0.756	0.618	0.649
C		0.474	0.469	0.482	0.474	0.547	0.581	0.628	0.613	0.526	0.545	0.474
D		0.568	0.592	0.537	0.605	0.662	0.670	0.680	0.652	0.597	0.631	0.680
E		0.683	0.683	0.558	0.519	0.542	0.573	0.505	0.519	0.503		0.552
F		0.882	0.795	0.720	0.678	0.665	0.586	0.618	0.670	0.607	0.662	0.560
G		0.848	0.793	0.573	0.552	0.566	0.581	0.573	0.555	0.675	0.657	0.626
H		0.908	0.827	0.631	0.628	0.573	0.579	0.673	0.641	0.683	0.680	0.704

>80% B/Bo
 <20% B/Bo

Tabla 14. Valores calculados del %B/Bo de la curva estándar de prostaglandinas.

Tabla 15

B/Bo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		0.333	0.336	0.492	0.568	0.560	0.521	0.461	0.495	0.477	0.547	0.466
B		0.401	0.404	0.675	0.633	0.712	0.688	0.550	0.550	0.694	0.633	0.500
C		0.474	0.469	0.547	0.581	0.623	0.586	0.526	0.560	0.599	0.545	0.513
D		0.568	0.592	0.652	0.686	0.717	0.654	0.586	0.576	0.539	0.547	0.453
E		0.683	0.683	0.618	0.594	0.644	0.448	0.508	0.610			
F		0.882	0.795	0.662	0.665	0.678	0.526	0.592	0.605			
G		0.848	0.793	0.539	0.508	0.532	0.571	0.581	0.607			
H		0.908	0.827	0.735	0.576	0.657	0.607	0.599	0.628			

Tabla 15. Valores calculados del %B/Bo de la curva estándar de prostaglandinas.

Con la curva estándar se calculó la concentración de prostaglandinas por triplicado para cada muestra, y estos valores se muestran en las tablas 16 y 17 para todos los compuestos.

Tabla 16

CONC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				193.7	197.3	212.4	94.1	96.0	152.2	128.4	161.0	135.9
B				220.2	216.0	153.7	58.4	61.6	135.6	71.7	224.5	177.2
C				295.3	312.0	186.7	146.6	103.8	116.7	216.3	190.2	312.0
D				402.0	247.2	160.2	150.6	138.5	173.7	261.7	203.7	138.5
E				173.4	228.5	193.7	155.1	250.4	228.5	255.1	260.2	179.9
F				99.9	141.5	156.9	282.3	224.5	150.6	242.5	160.2	340.4
G				155.1	179.9	164.0	146.6	155.1	176.6	72.2	83.4	105.9
H				203.7	207.7	310.1	298.7	147.5	188.2	135.6	138.5	114.2

Tabla 16. Concentración de prostaglandinas producidas en el ensayo COX-1.

Tabla 17

CONC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				274.4	161.0	170.2	224.4	342.0	269.4	306.3	186.7	329.6
B				144.4	199.7	106.8	130.0	366.6	366.6	124.5	199.7	519.5
C				186.7	146.6	108.0	141.2	216.3	170.2	289.9	279.5	289.9
D				173.7	132.8	102.2	170.2	282.3	304.4	359.9	277.1	293.2
E				112.3	133.4	92.2	375.0	245.9	118.9	173.4	289.9	255.1
F				160.2	156.9	141.5	432.6	271.9	247.2	216.0	304.4	293.2
G				197.3	245.9	208.5	158.0	146.6	121.3	149.4	295.3	241.4
H				87.0	304.4	166.8	242.5	256.8	207.7	170.2	380.4	298.7

Tabla 17. Concentración de prostaglandinas producidas en el ensayo COX-1.

STANDARDS	Conc	Prom.	B/Bo	Logit	Recalc
Std01	500.00	0.128	0.334	-0.689	434
Std02	250.00	0.154	0.402	-0.396	260.24
Std03	125.00	0.181	0.471	-0.114	158.87
Std04	62.50	0.222	0.580	0.322	73.98
Std05	31.25	0.262	0.683	0.768	33.91
Std06	15.63	0.321	0.838	1.647	7.28
Std07	7.81	0.314	0.820	1.518	9.12
Std08	3.91	0.332	0.867	1.877	4.87

CURVE	Valor	%B/Bo	Logit
IC20=	1473.55	20.00	-1.3863
IC50=	130.08	50.00	0.0000
IC80=	11.48	80.00	1.3863

STATS	y-int=	2.7804
	slope=	-0.5711
	R ² =	0.9632

En la tabla 18 se muestra la concentración de prostaglandinas promedio (pg/mL) para todos los compuestos, así como el porcentaje de inhibición que es representado como %B/Bo.

Tabla 18.

Compuesto	PGF2 α (pg/mL)	%B/Bo	Dilution	StdDev	%CV	SEM
S(10 μ M)	201.13	53.7	2	9.9	4.9	5.7
S(31.6 μ M)	264.65	50.1	2	68.0	25.7	39.3
S(100 μ M)	198.54	53.9	2	27.9	14.0	16.1
H(10 μ M)	166.33	56.4	2	12.6	7.6	7.3
H(31.6 μ M)	114.08	61.9	2	33.0	28.9	19.1
H(100 μ M)	122.37	60.7	2	21.9	17.9	12.7
T(10 μ M)	211.34	53.2	2	50.0	23.6	28.8
T(31.6 μ M)	159.42	57.0	2	15.5	9.7	8.9
T(100 μ M)	141.77	58.6	2	17.0	12.0	9.8
AD(10 μ M)	201.86	54.0	2	63.0	31.2	36.4
AD(31.6 μ M)	147.09	58.4	2	39.4	26.8	22.7
AD(100 μ M)	112.62	61.9	2	20.6	18.3	11.9
DT(10 μ M)	217.24	52.6	2	25.4	11.7	14.7
DT(31.6 μ M)	278.60	49.2	2	59.3	21.3	34.3
DT(100 μ M)	175.89	55.8	2	37.9	21.5	21.9
MS y P(10 μ M)	246.62	52.2	2	128.0	51.9	73.9
MS y P(31.6 μ M)	141.94	58.6	2	18.8	13.2	10.9
MS y P	274.21	49.7	2	76.7	28.0	44.3
DK(10 μ M)	239.48	51.5	2	64.1	26.8	37.0
DK (31.6 μ M)	231.72	52.8	2	44.9	19.4	25.9
DK(100 μ M)	87.18	65.3	2	17.1	19.7	9.9

Tabla 18. Concentración de prostaglandinas promedio (pg/mL) y porcentaje de inhibición de los metabolitos secundarios de dos variedades de *Ageratina espinosarum*.

6.5. Estudios de *Docking* molecular.

El acoplamiento molecular de los compuestos sobre COX-1 se realizó en colaboración con el Dr. Gabriel Navarrete Vázquez de la Facultad de Farmacia, UAEM.

Todos los cálculos *in silico* se realizaron con la licencia del programa MOE (Molecular Operating Environment) versión 2018.01. El procedimiento general consiste en preparar las estructuras de las enzimas y de los ligandos, así como algunos parámetros que utiliza el programa.

6.5.1. Preparación de las enzimas.

La estructura cristalina de la ciclooxigenasa 1 que se usó para realizar el *Docking* se obtuvo del Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>). La ciclooxigenasa es un dímero con monómeros idénticos, por lo que se extrajo uno de los monómeros de la proteína completa, incluyendo el grupo prostético. Todas las moléculas de agua se eliminaron, y los átomos y cargas de los hidrógenos se ajustaron con el campo de fuerza MMFF94 de la suite de MOE (Chemical Computing Group Inc. <http://www.chemcomp.com>). Las estructuras 3D fueron construidas y minimizadas en MOE, utilizando el mismo campo de fuerza mencionado anteriormente. Se usó la COX-1 acoplada con ibuprofeno (1EQG) a una resolución de 2,61 Å. Se eligieron estas estructuras cristalográficas debido a que presentan las interacciones indispensables con los residuos de aminoácidos para la inhibición de las enzimas. El ligando cocrystalizado ibuprofeno (IBP) muestra varias interacciones con la COX-1, principalmente por fuerzas electrostáticas entre el grupo carboxílico ionizado y Arg120, y forma puentes de hidrógeno con Tyr355. Además, el bolsillo está formado por varios aminoácidos que se muestran en la figura 6.

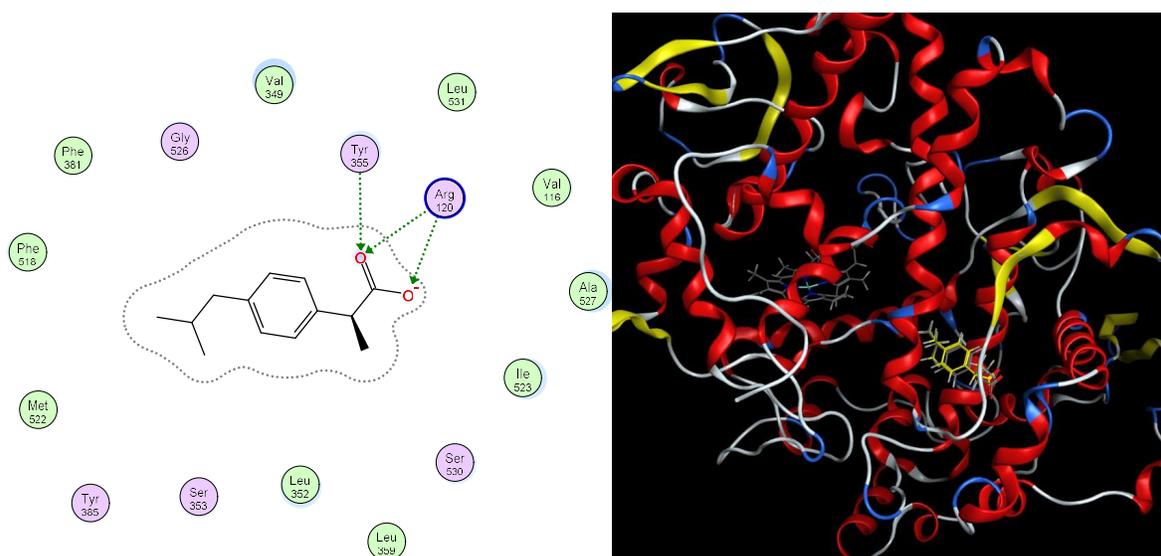


Figura 6. Mapas de interacción 2D y 3D del acoplamiento de la COX-1 (ovina) co-cristalizada con ibuprofeno.

6.5.2. Preparación de los ligandos.

Se utilizó el programa ChemBioDraw Ultra 13.0 para la construcción de las moléculas y se convirtieron en formato MDL SDfile (.sdf). Las estructuras 3D fueron construidas y minimizadas en MOE, utilizando el campo de fuerza MMFF94.

6.5.3. Validación y análisis del *Docking* molecular.

El acoplamiento se realizó considerando todos los residuos dentro de una esfera de 4,5 Å centrada en los átomos del ligando cocrystalizado. Como una función de colocación, se seleccionó el triángulo alfa y las puntuaciones se calcularon con la función de afinidad DG, que mide la contribución entálpica a la energía libre de unión (MOE). Para el procedimiento de validación se reprodujo mediante acoplamiento, la misma postura del ligando cocrystalizado en la estructura cristalina de la proteína, la predicción del modo de unión fue un éxito con un RMSD = 0.1528 Å y una puntuación de -7.48 kcal / mol. Para que la validación se considere aceptable el valor del RMSD debe ser <2 Å. Para cada ligando se generaron 10 conformaciones y se seleccionó la conformación mejor clasificada basada en la puntuación de acoplamiento para estudios adicionales en acoplamiento molecular. Después del acoplamiento molecular, analizamos las mejores posturas de unión calculadas y las representaciones gráficas se realizaron mediante Surface Maps y Ligand Interaction del software MOE.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1. Elucidación de la estructura molecular de los compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico de *Ageratina espinosarum*.

El estudio fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *Ageratina espinosarum*, condujo al aislamiento de dos clases de metabolitos secundarios, siete flavonoides de los cuales tres fueron de tipo flavonas: apigenina (**142**), 7, 4'-dimetilapigenina (**164**) y acacetina (**166**) y cuatro de tipo flavonoles: kaempferol (**146**), 3, 4', 7-trimetilkaempferol (**163**), 7, 4'-dimetilkaempferol (**165**).

Por otro lado también se aislaron compuestos de naturaleza terpenoide, específicamente dos diterpenos de tipo labdano: el ácido dihidrotucumanoico (**167**) y un tetraol que no tiene reportes en la literatura, de manera que se trata de un metabolito nuevo, identificado como dihidrotucumanol (**168**). Así mismo mediante el procedimiento de derivatización por reacción de acetilación, se obtuvo el dihidrotucumanol diacetilado que de igual forma no existe documentación del mismo. Algunos compuestos fueron purificados y otros se obtuvieron en mezcla y fueron identificados de acuerdo a las siguientes evidencias espectroscópicas obtenidas en RMN.

7.1.1. FLAVONOIDES

7.1.1.1. Flavonas

Apigenina (**142**)

De la recromatografía de la fracción 4 del extracto hidroalcohólico se obtuvo un metabolito que revelaba color amarillo con sulfato cérico amoniacal. El espectro de ¹H RMN presenta señales en la zona de hidrógenos aromáticos y una señal en 12.97 ppm que integra para un protón y representa el desplazamiento de protones de grupos hidroxilos que se encuentran formando puentes de hidrogeno con un carbonilo.

Mediante el análisis de los protones aromáticos, existe un sistema A₂B₂ que se representa con dos señales dobles que integran para dos hidrógenos cada una, la primera en 7.93 ppm y tiene una constante de acoplamiento de $J = 8.6$ Hz que comparte con una segunda señal

en 6.92 ppm. Estas dos señales conforman el anillo B y guardan una relación *orto* entre sí. (Figura 7)

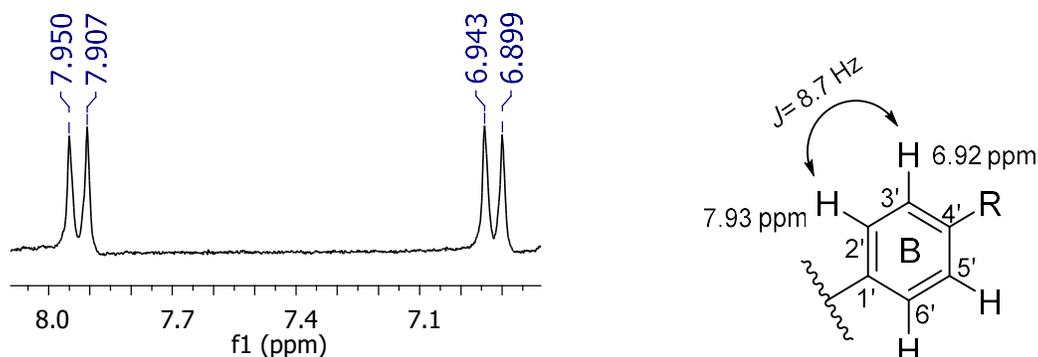


Figura 7. Sistema aromático A₂B₂ del anillo B.

Un segundo sistema aromático AB se evidencia por dos señales dobles que integran para 1 hidrógeno cada una, la primera en 6.48 ppm con una $J = 1.6$ Hz y la segunda en 6.23 ppm con una constante de acoplamiento de 1.4 Hz. Estos hidrógenos presentan una relación *meta* y conforman el anillo aromático A de un compuesto de tipo flavonoide. (Figura 8)

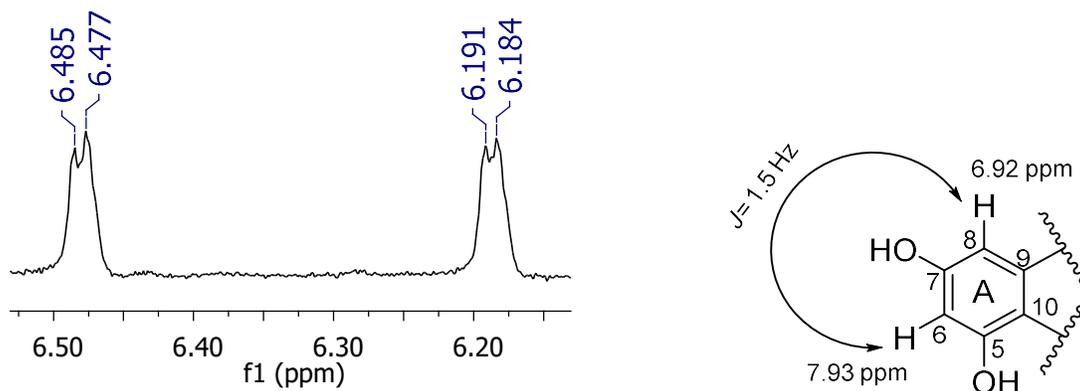


Figura 8. Sistema aromático AB del anillo A

En 6.79 ppm se observa una señal simple que integra para 1 hidrógeno y es característica de hidrógenos sobre enlace doble y pertenece al protón en posición 3 de la estructura (Figura 9).

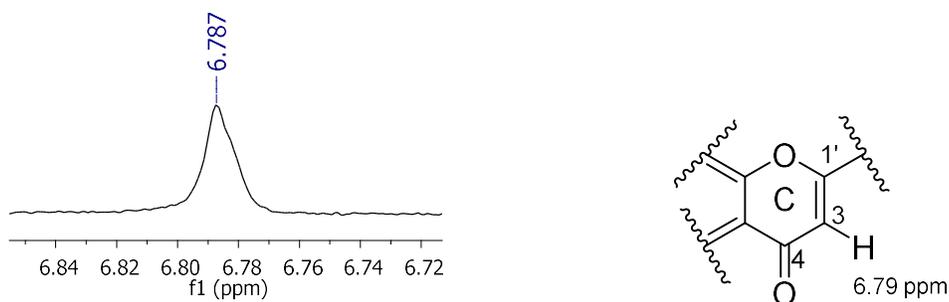


Figura 9. Señal de H-3 característica de flavonas

Estos datos espectroscópicos permiten establecer la estructura de un compuesto de tipo flavona, y se trata de la apigenina (**142**), la cual fue confirmada por comparación con datos reportados en la literatura para este compuesto (Tabla 19).

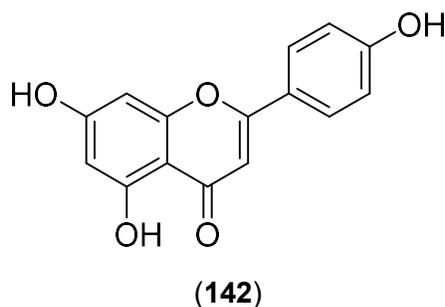


Tabla 19. Datos espectroscópicos de RMN de Apigenina comparados con los reportados en la literatura, DMSO- d_6 , 500 MHz.

Apigenina (142)		Referencia ⁸⁵	
Asignación	¹ H	¹ H	¹³ C
2			163.72
3	6.79 (1H, s)	6.78 (1H, s)	102.82
4			181.75
5			161.46
6	6.23 (1H, d, $J=1.4$ Hz)	6.19 (d, $J= 2.0$ Hz)	98.87
7			164.29
8	6.48 (1H, d, $J=1.6$ Hz)	6.48 (d, $J= 2.0$ Hz)	93.99
9			157.33
10			103.65

Continuación de la tabla 19

1'			121.17
2' y 6'	7.93 (2H, d, $J= 8.6$ Hz)	7.93 (d, $J= 8.8$ Hz)	128.48
3' y 5'	6.92 (2H, d, $J= 8.8$ Hz)	6.93 (d, $J= 8.8$ Hz)	115.97
4'			161.20
5-OH	12.97 (1H, s)	12.97 (1H, s)	

7, 4'-dimetilapigenina (164).

De la recromatografía de la fracción 4 del extracto hidroalcohólico, se logró caracterizar un segundo compuesto que revelaba color amarillo en CCF. Mediante el análisis del espectro de RMN ^1H se observa que existe similitud al del flavonoide apigenina, con un desplazamiento en 12.92 ppm se observa una señal que integra para un hidrogeno y que corresponde al hidrogeno quelatado característico de compuestos de tipo flavonoide (Figura 10).

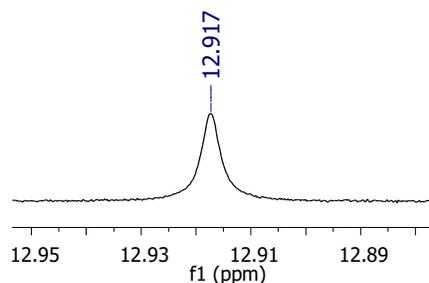


Figura 10. Señal de H-5 quelatado del flavonoide.

Adicionalmente en el espectro se observa para la zona de hidrógenos aromáticos el mismo patrón de sustitución tipo A_2B_2 para los hidrógenos en 7.84 y 7.02 ppm, los cuales llevan una relación *orto* y conforman el anillo B, así mismo el sistema AB *meta* para el anillo A en 6.59 y 6.57 ppm. Además se observa la señal perteneciente al H-3 en 6.55 ppm.

La diferencia estructural entre este compuesto y apigenina se deba a la presencia de dos señales simple en 4.05 y 3.89 ppm que integran para tres hidrógenos cada una, evidenciando la presencia de dos grupos metoxilo que de acuerdo a su origen biosintético se encuentran en las posiciones 4' y 7 respectivamente. Se compararon sus datos

espectroscópicos con los encontrados en la literatura (Tabla 20) y de esta manera se estableció la estructura de esta flavona como 7, 4'-dimetilapigenina (**164**).

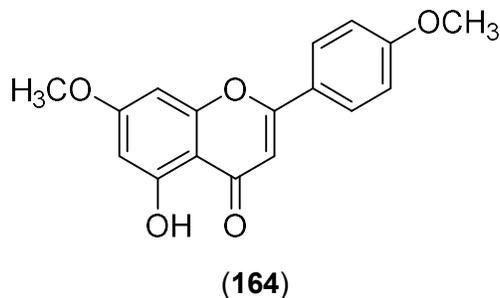


Tabla 20. Datos espectroscópicos de RMN de 7, 4'-dimetilapigenina comparados con los reportados en la literatura, CDCl₃, 500 MHz.

7, 4'-dimetilapigenina (164)		Referencia ⁸⁶	
Asignación	¹ H	¹ H	¹³ C
2			162.6
3	6.55 (1H, s)	6.55 (1H, s)	104.33
4			182.5
5			164.0
6	6.59 (1H, d, J=4.0 Hz)	6.34 (1H, d, J=2.1 Hz)	98.1
7			165.4
8	6.57 (1H, d, J=4.0 Hz)	6.45 (1H, d, J= 2.1 Hz)	92.6
9			157.7
10			157.7
1'			123.5
2' y 6'	7.02 (2H, d, J= 9.2 Hz)	7.00 (2H, d, J= 9.1Hz)	128.0
3' y 5'	7.84 (2H, d, J= 9.2 Hz)	7.82 (2H, d, J=9.1 Hz)	114.5
4'			162.2
5-OH	12.92 (1H, s)	10.50 (1H, s)	
7- OMe	3.89 (3H, s)	3.88 (3H, s)	55.8
4'-OMe	4.03 (3H, s)	3.87 (3H, s)	55.6

4'-metilapigenina (Acacetina) (166).

Este compuesto se purificó por precipitación de la fracción 5 obtenida de la cromatografía de la fracción 4 del extracto hidroalcohólico. Fue aislado puro como un sólido en forma de cristales de color amarillo y por este motivo se envió a analizar mediante RMN de 1D de ^1H y experimentos bidimensionales HSQC, HMBC y COSY. El espectro presentó al compararlo con el de apigenina los mismos sistemas A_2B_2 y AB en zona de hidrógenos aromáticos y una señal en 6.52 ppm que pertenece al H-3 sobre anillo aromático.

En 3.85 ppm se observa una señal simple que integra para 3H asignable a un grupo metoxilo presente en la estructura. La posición del grupo metoxilo se confirmó mediante el estudio de los experimentos bidimensionales heteronucleares (HSQC y HMBC). Como correlaciones más significativas en el espectro HSQC (**ANEXOS: Espectro 6**), los hidrógenos del grupo metoxilo tienen correlación con el carbono (δ_{CH_3} 55.6). Por otro lado, para el sistema A_2B_2 . La correlación de H-2' y H-6' con el carbono en 128.2 ppm y para los hidrógenos H-3' y H-5' con el carbono en 114.6 ppm respectivamente. Para el protón sobre anillo aromático H-3 (δ_{H} 6.52) con el carbono 103.9 ppm y finalmente los hidrógenos que conforman el sistema AB aromático, la señal de H-8 en 6.43 ppm con C-8 (δ_{C} 94.5) y H-6 en 6.23 ppm con C-6 (δ_{C} 99.4) (Tabla 21).

Tabla 21. Correlaciones HSQC de la estructura de acacetina

Posición	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
H-2' y H-6'	7.81 (2H, d, J= 9.0 Hz)	128.2
H-3' y H-5'	6.98 (2H, d, J= 9.0 Hz)	114.6
H-3	6.52 (1H, s)	103.9
H-8	6.43 (1H, d, J=2.2 Hz)	94.5
H-6	6.23 (1H, d, J=2.2 Hz)	99.4
4'-OMe	3.85 (3H, s)	55.6

En el experimento HMBC podemos confirmar la posición del grupo metoxilo al observar las correlaciones de los protones (δ_{H} 3.85) con el C-4' (δ_{C} 162.7) en el anillo B, en esta misma región se observan las correlaciones de los protones del sistema A_2B_2 *orto* con su carbono y con el carbono C-4' y el carbono C-1'. Por último H-3 presentó una correlación débil con el

carbono C-1' y una correlación fuerte con el C-4 que pertenece al grupo carbonilo en esa posición (Figura 10).

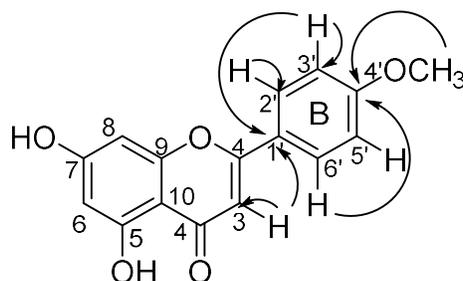
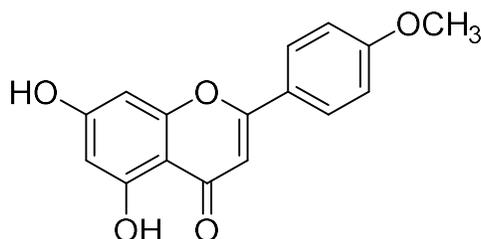


Figura 11. Correlaciones HMBC del flavonoide.

El análisis de los datos espectroscópicos, y una vez establecida la posición del grupo metoxilo en el C-4', nos permitió asignar la estructura con el nombre de Acacetina (4'-metilapigenina) (**166**), los cuales también fueron comparados con los reportados en la literatura (Tabla 22).



(166)

Tabla 22. Datos espectroscópicos de RMN de Acacetina comparados con los reportados en la literatura, CDCl_3 con unas gotas de CD_3OD , 500 MHz.

Acacetina (166)		Referencia ⁸⁷	
Asignación	¹ H	¹ H	¹³ C
2			164.0
3	6.52 (1H, s)	6.43 (1H, s)	103.6
4			182.3
5			161.4

Continuación de la tabla 22

6	6.23 (1H, d, J=2.2 Hz)	6.15 (1H, d, J = 2.0 Hz)	99.13
7			163.9
8	6.43 (1H, d, J=2.2 Hz)	6.32 (1H, d, J = 2 Hz)	94.1
9			157.8
10			104.4
1'			123.3
2' y 6'	7.81 (2H, d, J= 9.0 Hz)	7.72 (2H, d, J = 9.0 Hz)	127.9
3' y 5'	6.98 (2H, d, J= 9.0 Hz)	6.89 (2H, d, J = 9.0 Hz)	114.3
4'-OMe	3.85 (3H, s)	3.76 (3H, s)	55.3
4'			162.5

7.1.1.2. Flavonoles

Kaempferol (146).

Este metabolito no se logró purificar y se identificó de una alícuota del crudo de flavonoides que se envió a RMN y se comparó con una muestra autentica del compuesto. El espectro de RMN ^1H de este compuesto, evidencia el patrón de sustitución para el anillo B con dos señales dobles que integran para dos protones cada una, en 8.1 ppm (δ_{C} 130.7) la señal de H-2' y H-6' la cual comparte una constante de acoplamiento *orto* de 9.2 Hz con una señal en 6.91 ppm (δ_{C} 116.3) (Figura 12).

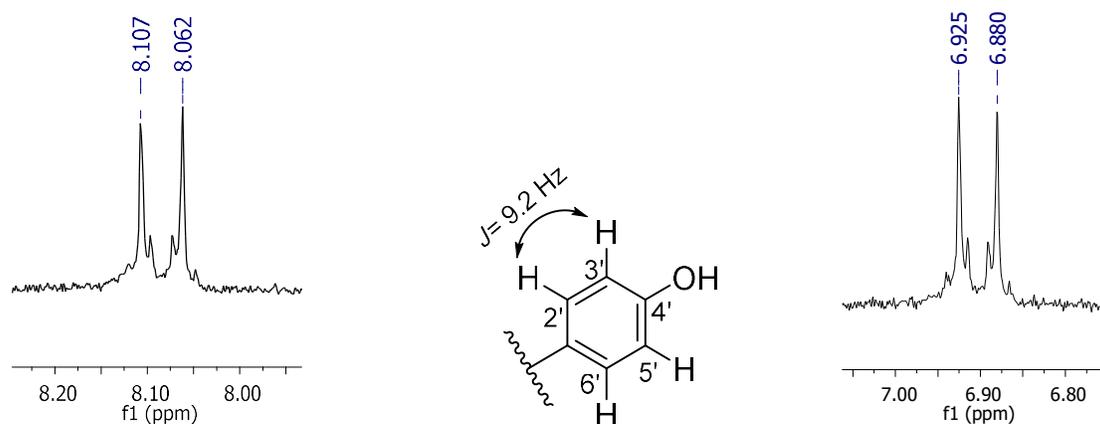


Figura 12. Señales de RMN ^1H del sistema A_2B_2 aromático.

El sistema aromático AB se observa por las dos señales dobles que integran para un proton, la primera en 6.19 ppm (δ_c 99.3) asignado al H-6 y la segunda en 6.40 ppm (δ_c 94.5) para H-8, ambas con una constante de acoplamiento de 2.1 Hz, indicando que tienen una relación *meta* (figura 13).

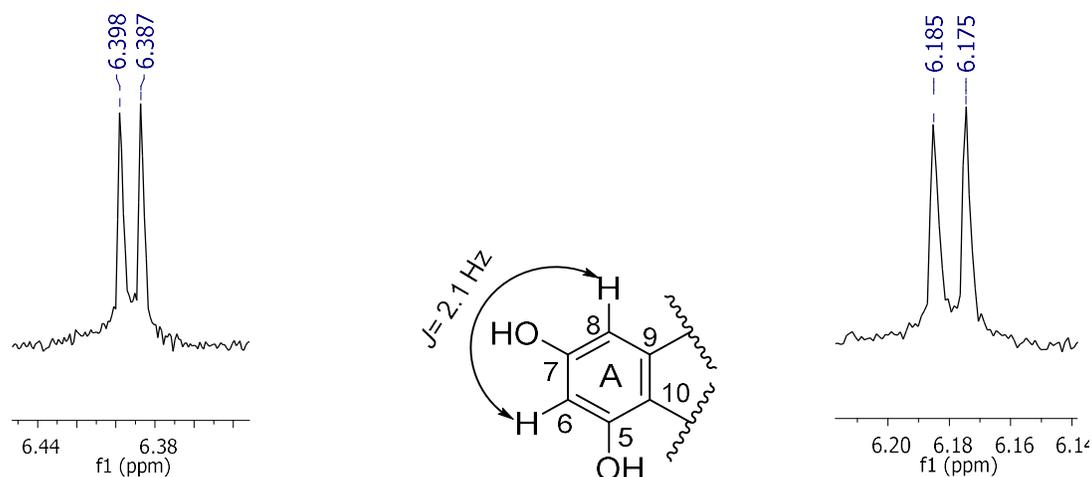


Figura 13. Señales de RMN ^1H del sistema AB aromático.

La diferencia fundamental en la estructura de este flavonoide con respecto a los anteriores es la presencia de un grupo hidroxilo en posición 3 del anillo C característico de flavonoides de tipo flavonol. Con base al análisis de los datos y su comparación con los encontrados en la literatura fue posible identificar este metabolito como kaempferol (**146**).

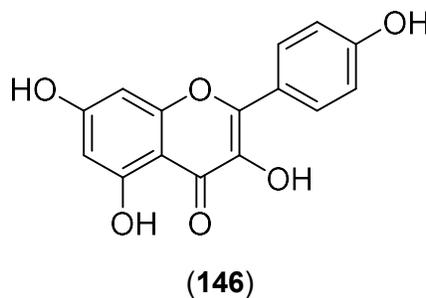
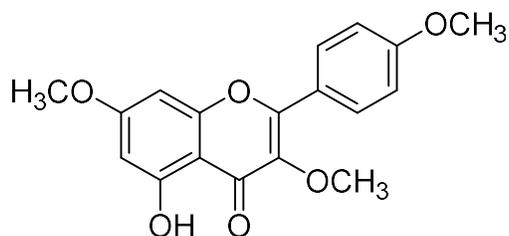


Tabla 23. Datos espectroscópicos de RMN de kaempferol comparados con los reportados en la literatura, CD₃OD, 200 MHz.

Kaempferol (146)		Referencia ⁸⁸	
Asignación	¹ H	¹ H	¹³ C
2			146.3
3			135.2
4			175.2
5			160.4
6	6.19 (1H, d, <i>J</i> = 2.1)	6.19 (1H, d, <i>J</i> = 1.8 Hz)	98.4
7			163.7
8	6.40 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	6.43 (1H, d, <i>J</i> = 1.8 Hz)	93.8
9			156.7
10			103.1
1'			122.1
2' y 6'	8.1 (2H, d, <i>J</i> = 9.2 Hz)	8.09 (2H, d, <i>J</i> = 8.7 Hz)	129.4
3' y 5'	6.91 (2H, d, <i>J</i> = 9.2 Hz)	6.91 (2H, d, <i>J</i> = 8.7 Hz)	115.3
4'			158.7

3, 4', 7-trimetilkaempferol (**163**).

Este compuesto se identificó en mezcla con la 7,4'-dimetilapigenina de la recromatografía de la fracción 4 del extracto hidroalcohólico como un sólido de color amarillo. La estructura de este compuesto se estableció mediante el análisis de su espectro de RMN ¹H. En 13.08 ppm se observa una señal simple que integra para un hidrogeno, y corresponde al protón H-5 que se encuentra formando puente de hidrogeno con el carbonilo de la estructura. Con base en el estudio de los datos espectroscópicos, indicaron que este metabolito es un derivado del kaempferol, sin embargo este se encuentra trisustituido, debido a que en el espectro se observan tres señales simple en 4.04, 3.89 y 3.85 ppm, las cuales integran para 3H cada una. Las posiciones de los metoxilos presentes en la molécula se asignaron de acuerdo a la biosíntesis de estos metabolitos en las posiciones 4', 3 y 7. De este modo comparando sus datos con los establecidos en la literatura, se determinó la estructura de este flavonol como 3, 4', 7-trimetilkaempferol (**163**) (Tabla 24).



(163)

Tabla 24. Datos espectroscópicos de RMN de 3, 4', 7-trimetilkaempferol comparados con los reportados en la literatura, CDCl₃, 500 MHz.

3, 4', 7-trimetilkaempferol (163)		Referencia ⁸⁹	
Asignación	¹ H	¹ H	¹³ C
2			155.8
3			138.7
4			178.7
5			161.8
6	6.59 (1H, d, J=4.0 Hz)	6.32 (1H, d, J = 2Hz)	92.0
7			165.3
8	6.57 (1H, d, J=4.0 Hz)	6.42 (1H, d, J = 2.0 Hz)	97.7
9			156.6
10			105.9
1'			122.7
2' y 6'	7.84 (2H, d, J= 9.0 Hz)	8.06 (2H, d, J = 9.0 Hz)	130.1
3' y 5'	7.01 (2H, d, J= 9.0 Hz)	7.01 (2H, d, J = 9Hz)	113.9
4'			161.6
5-OH	13.08 (1H, s)	12.65 (1H, s)	
3-OMe	4.04 (3H, s)	3.86 (3H, s)	60.0
7-OMe	3.85 (3H, s)	3.86 (3H, s)	53.3
4'-OMe	3.89 (3H, s)	3.90 (3H,s)	55.7

7, 4'-dimetilkaempferol (**165**).

Este compuesto se obtuvo puro de la recromatografía de la fracción 4 del extracto original como un sólido amarillo que revelaba con sulfato cérico amoniacal un solo punto que absorbía a la luz UV. Dadas las características físicas y con base en los metabolitos aislados anteriormente del extracto, se trata de un compuesto de tipo flavonoide, por esta razón se envió a experimentos de RMN ^1H para confirmar la estructura. El espectro presentó la señal característica en 12.7 ppm del hidrogeno del grupo OH en posición 5 (Figura 14).

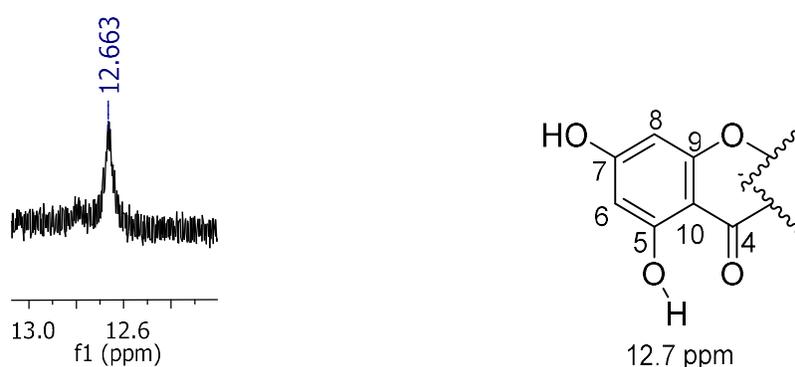


Figura 14. Señal del hidrogeno del OH-5 quelatado.

Comparando sus datos espectroscópicos con los del compuesto 3, 4', 7-trimetilkaempferol, la única diferencia que se observa es la presencia de solo dos señales simples que integran para 3H cada una en 3.79 y 3.86 ppm correspondientes a dos grupos metoxilo en posición 7 y 4', de este modo se estableció que el metabolito aislado se trataba de 7, 4'-dimetilkaempferol (**165**). Ya existen reportes en la literatura para este compuesto y fueron analizados con los obtenidos en este estudio (Tabla 25).

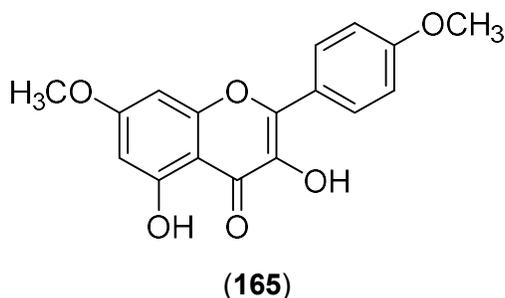


Tabla 25. Datos espectroscópicos de RMN de 7, 4'-dimetilkaempferol comparados con los reportados en la literatura, CDCl_3 , 500 MHz.

7, 4'-dimetilkaempferol (165)		Referencia ⁹⁰	
Asignación	¹ H	¹ H	¹³ C
2			145.7
3			135.6
4			178.7
5			160.8
6	6.37 (1H, d, J=2.4 Hz)	6.35 (d, 1H, J=2.1 Hz)	97.9
7			165.7
8	6.24 (1H, d, J=2.4 Hz)	6.46 (d, 1H, J=2.1 Hz)	92.2
9			156.8
10			103.9
1'			123.1
2' y 6'	8.03 (2H, d, J= 9.2 Hz)	8.14 (d, 2H, J=9 Hz)	128.8
3' y 5'	6.98 (2H, d, J= 9.2 Hz)	7.00 (d, 2H, J=9 Hz)	114.0
4'			161.1
5-OH	12.66 (1H, s)	11.7 (1H, s)	
7-OMe	3.79 (3H, s)	3.79 (3H, s)	55.4
4'-OMe	3.86 (3H, s)	3.86 (3H, s)	55.8

7.1.2. DITERPENOS

Ácido dihidrotucumanoico (167).

Se aisló de la reunión 25-28 de la recromatografía de la fracción 4 del extracto hidroalcohólico un compuesto que reveló color café con sulfato cérico amoniacal. Fue caracterizado por RMN de 1D y 2D. A continuación se describen las señales principales que fueron indispensables para la elucidación de la molécula.

En el espectro de RMN ¹H se observan 9 señales de las cuales aquellas en desplazamientos de 0.97, 0.79, 1.22, 1.09 y 0.74 ppm corresponden a grupos metilo

presentes en la estructura, esto nos da un indicio que se trata de compuestos de naturaleza terpenoide. Se observan dos señales que integran para un protón cada una, la primera un doble en 3.51 ppm con constante de acoplamiento de 3.7 Hz que comparte con la segunda señal en 3.96 ppm doble de doble de doble con constantes de acoplamiento de 10.0, 7.0, 3.7 Hz. Estos desplazamientos químicos son característicos de hidrógenos base de oxígeno. Por último se observan dos señales doble de doble que integran para un protón en 2.1 y 2.32 ppm las cuales se acoplan entre sí compartiendo constantes de acoplamiento de 15.1 y 6.0 Hz y se asignan a hidrógenos diasterotópicos de un grupo metileno que se encuentra en posición alfa al grupo carbonilo. (Figura 15)

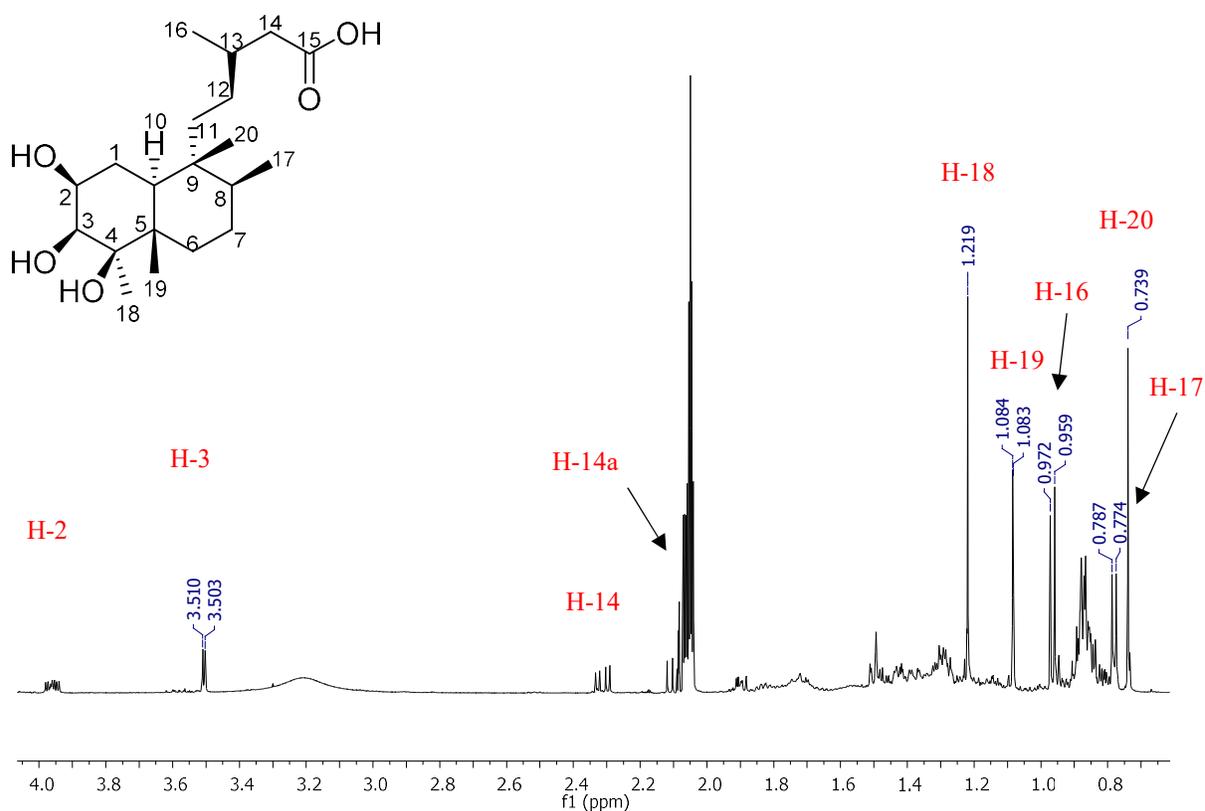


Figura 15. Espectro de RMN ¹H del ácido dihidrotucumanoico (167).

El espectro de DEPTQ presenta en total 20 señales para los carbonos que constituyen este metabolito (Figura 16) de las cuales cinco se asignaron a grupos metilo (-CH₃), cinco metinos (-CH), seis metilenos (-CH₂) y tres carbonos cuaternarios, destacando una señal

características de un carbono de grupo carbonilo a δ_C 174.1 ppm. Los datos espectroscópicos sugieren una estructura diterpénica bicíclica.

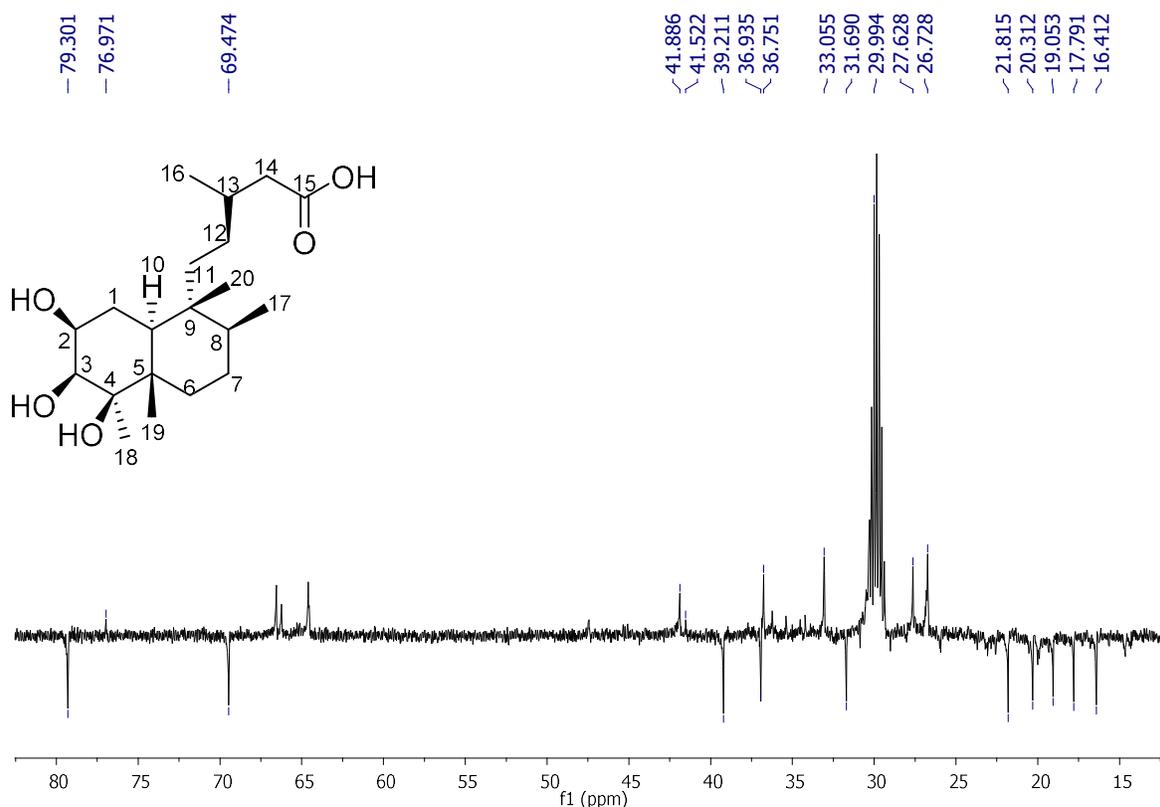


Figura 16. Espectro de DEPTQ del ácido dihidrotucumanoico (**167**).

El estudio de los experimentos bidimensionales heteronucleares (HSQC y HMBC) permitieron establecer la posición de los diferentes grupos funcionales en la molécula y correlacionar cada átomo de hidrogeno con sus respectivos carbonos. Así, en el experimento HSQC se observa que los protones base de oxígeno en (H-3) 3.51 y (H-2) 3.96 ppm correlacionan con los carbonos en δ 79.3 y 69.5 ppm respectivamente. Hacia la zona de señales de protones alifáticos, los hidrógenos de los grupos metilo en 0.97, 0.79, 1.22, 1.09 y 0.74 ppm correlacionan con los carbonos en δ_C 20.3, 16.4, 21.8, 17.8 y 19.1 ppm respectivamente. Las señales de los hidrógenos (δ_H 2.32 y 2.1) correlacionan con el mismo carbono en 41.9 ppm, reafirmando que los protones de este metileno son diastereotópicos (Figura 17).

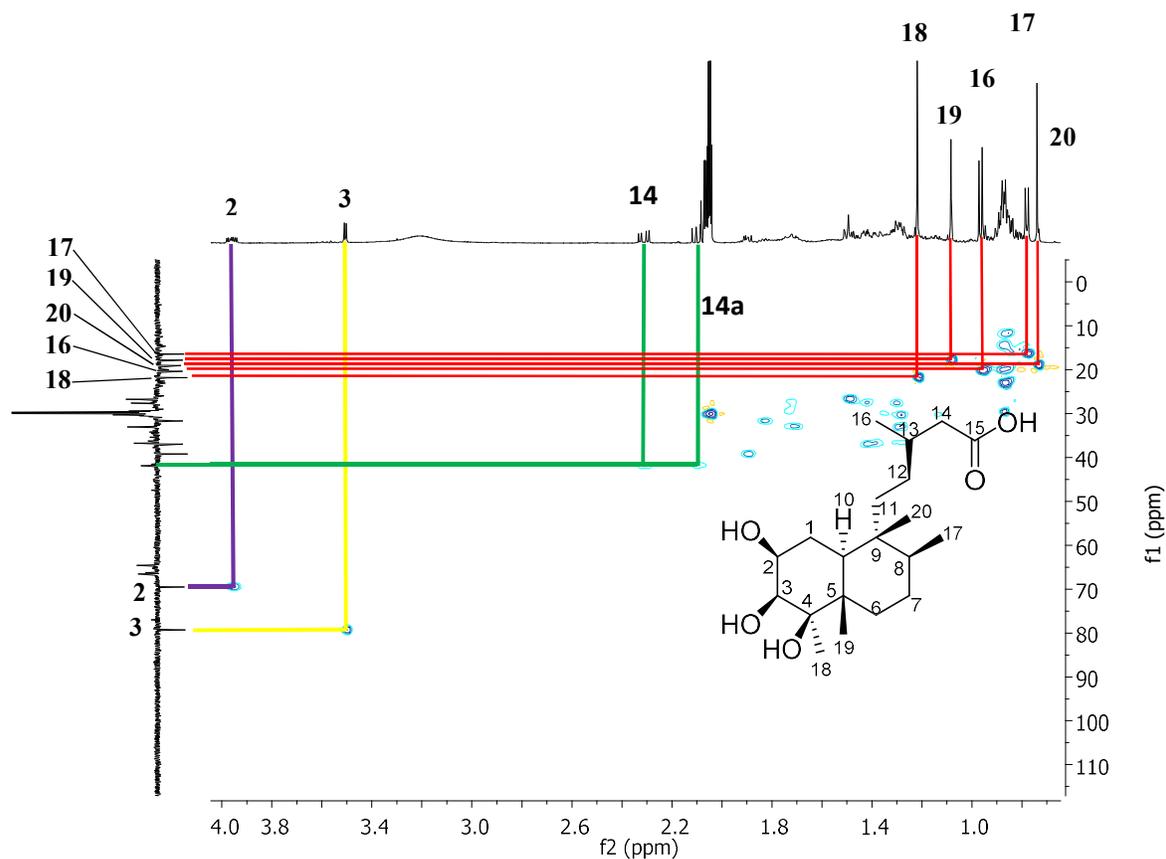


Figura 17. Espectro de HSQC del ácido dihidrotucumanoico (**167**).

La localización y asignación de los metinos, metilenos, metilos y carbonos cuaternarios restantes se determinó mediante el experimento de HMBC, el cual indica correlación entre los hidrógenos y sus carbonos a 2 y 3 enlaces σ . Se observa correlación del protón base de oxígeno H-3 (δ 3.51) con los carbonos C-1 (δ 26.7), C-2 (δ 69.5), C-4 (δ 77.0), C-5 (δ 41.5) y una correlación débil con el carbono del CH₃-18 en δ 21.8 ppm, mientras que el H-1 (δ 1.49) presenta correlación con los carbonos C-2, C-3 (δ 79.3), C-5 y C-10 (δ 39.2) y por último H-10 (δ 1.89) con los carbonos C-1, C-2, C-5 y con el carbono del CH₃-20. Las correlaciones de los hidrógenos diastereotópicos del metileno en H-14 (δ 2.32) se observan con C-13 (δ 31.7) y C-15 (δ 167.6) y para H-14a (δ 2.1) correlaciona con los carbonos C-13, C-15 y CH₃-16 (Figura 18).

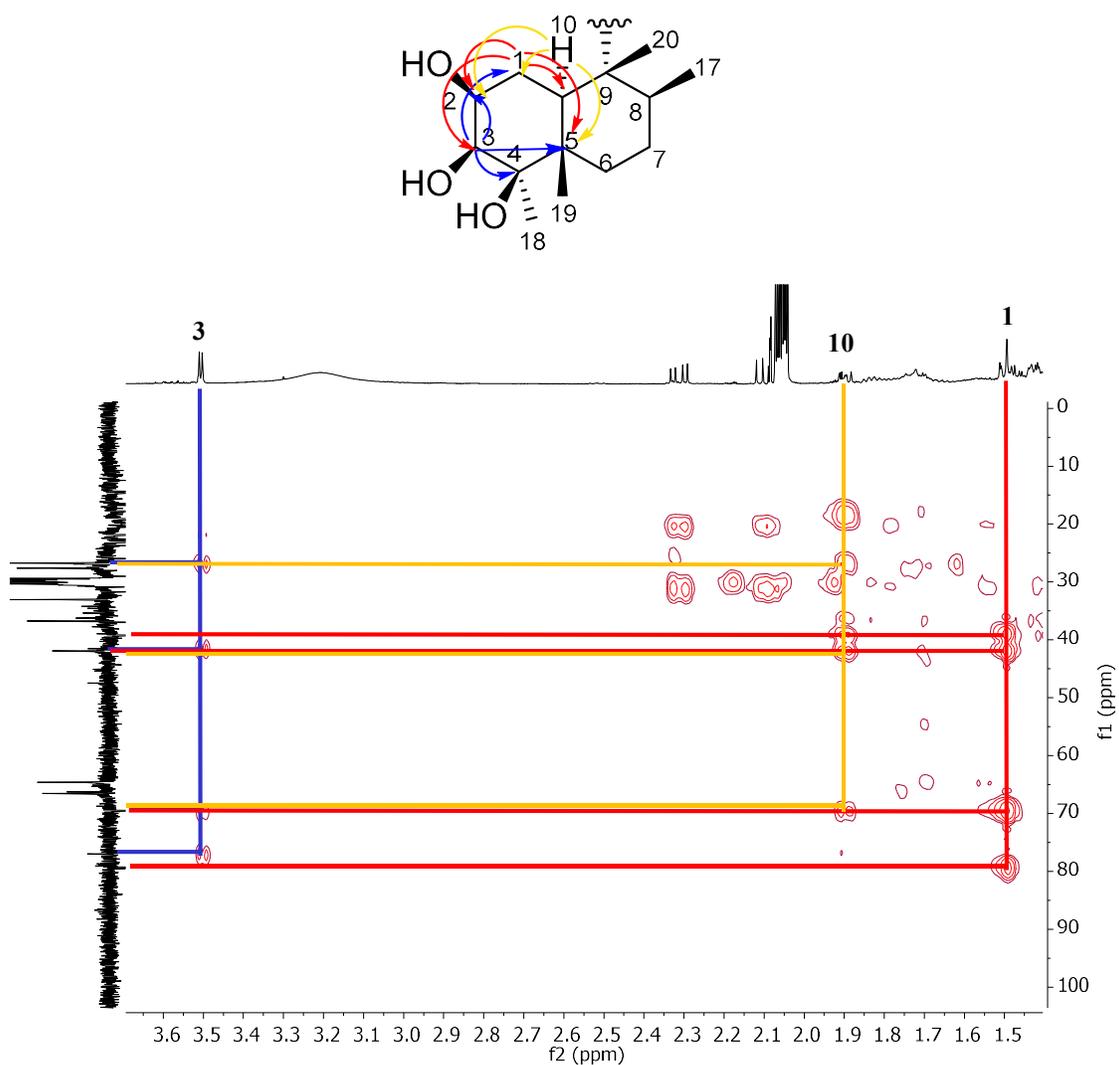


Figura 18. Expansión del espectro de HMBC del ácido dihidrotucumanoico (**167**).

Si siguiendo el análisis de las correlaciones en HMBC, los protones del grupo metilo (δ 0.97) en posición 16 correlaciona con los carbonos C-13 y C-14, correlación del metilo a δ 0.79 (CH_3 -17) con los carbonos C-7 y C-8, el otro grupo metilo en posición 18 (δ 1.22) correlaciona con C-3, C-4, C-5 y el CH_3 -19, este último se desplaza a δ 1.09 ppm y mantiene correlación con C-4, C-5, C-6 y C-10 (Figura 19). Finalmente correlaciones del metilo en δ 0.74 ppm (CH_3 -20) con C-10 y C-8.

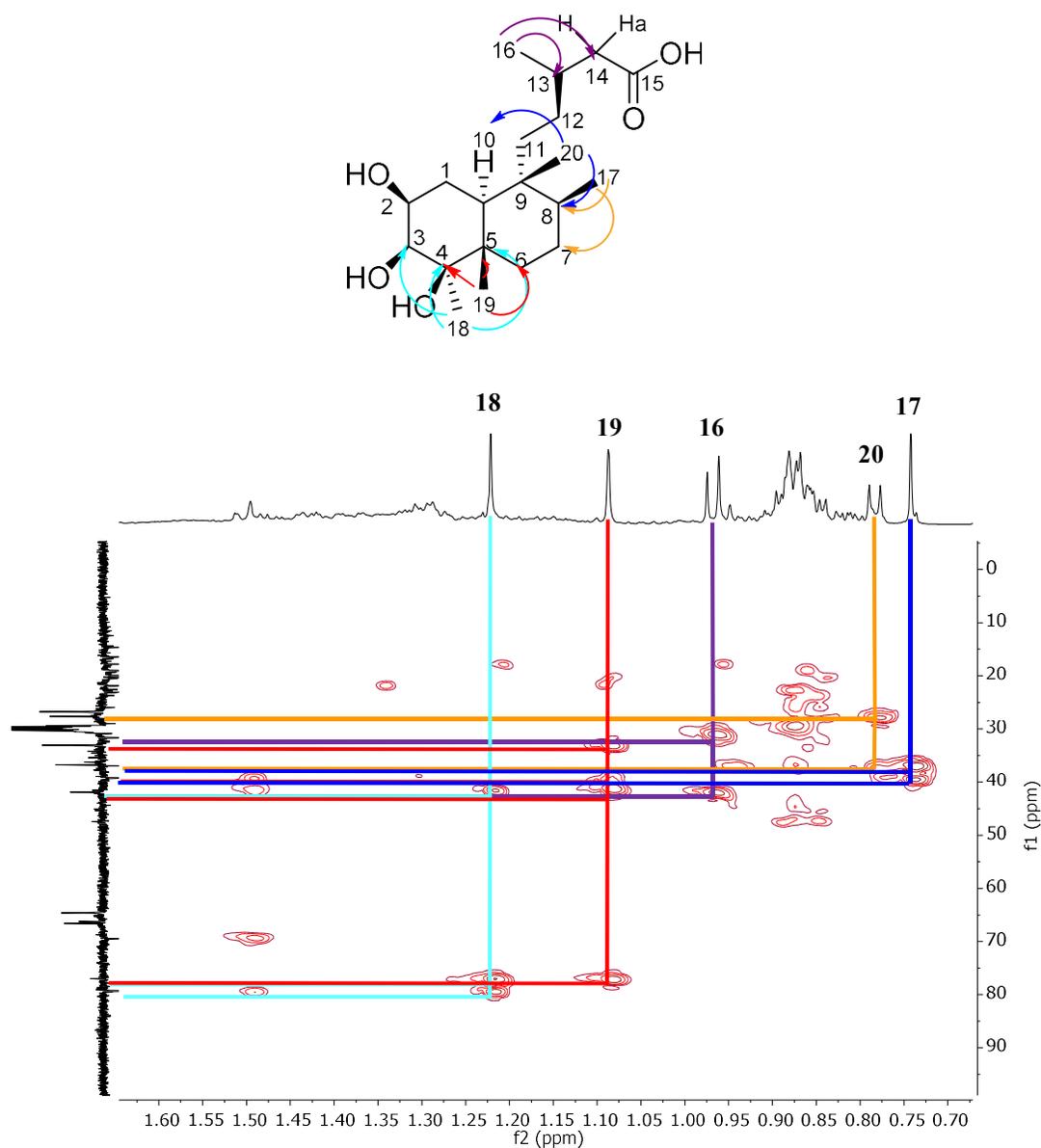
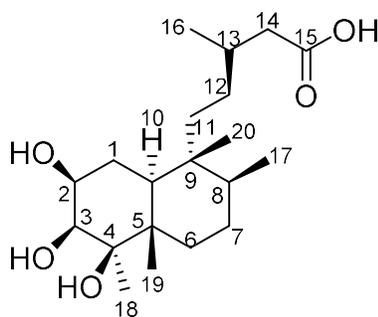


Figura 19. Espectro de HMBC de las correlaciones de los hidrógenos de los grupos metilo.

Estos datos permitieron establecer de forma inequívoca la estructura de este metabolito y comparados con los establecidos en la literatura se trata del diterpeno de tipo labdano de nombre ácido dihidrotucumanoico (**167**).



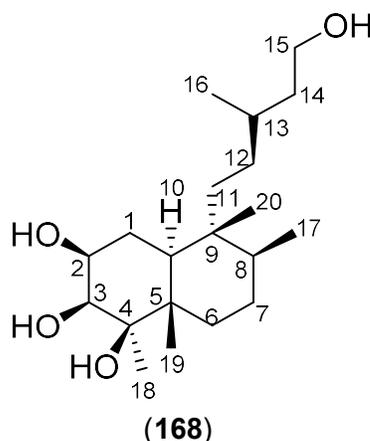
(167)

Tabla 26. Datos espectroscópicos de RMN de ácido dihidrotucumanoico comparados con los reportados en la literatura.

Ácido dihidrotucumanoico (167)			Referencia (DMSO- <i>d</i> ₆ , 200MHz) ⁹¹	
Asignación	¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz)	¹³ C		¹³ C
1	1.49 (1H, m)	26.7		25.9
1a	1.62 (1H, m)			
2	3.96 (1H, ddd, <i>J</i> = 10.0, 7.0, 3.7 Hz)	69.5	3.92 (1H, ddd, <i>J</i> = 1.7 Hz)	68.1
3	3.51 (1H, d, <i>J</i> = 3.7 Hz)	79.3	3.48 (1H, d, <i>J</i> = 3.5 Hz)	74.4
4		77.0		75.8
5		41.5		39.8
6		33.1		28.6
7		27.6		24.9
8	1.41 (1H, m)	36.9		35.2
9				37.5
10		39.2		37.6
11		36.8		35.2
12		29.9		31.3
13	1.96 (1H, m)	31.7		30.1
14	2.32 (1H, dd, <i>J</i> = 15.1, 6.0 Hz)	41.9	2.10 (1H, dd, <i>J</i> = 15.0 y 8.0 Hz)	41.0
14a	2.1 (1H, dd, <i>J</i> = 15.1, 6.0 Hz)		2.35 (1H, dd, <i>J</i> = 15.0 y 6.0 Hz)	
15		167.6		174.4
16	0.97 (3H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz)	20.3	0.94 (3H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz)	17.8
17	0.79 (3H, d, <i>J</i> = 6.3 Hz)	16.4	0.74 (3H, d, <i>J</i> = 5.0 Hz)	15.2
18	1.22 (3H, s)	21.8	1.22 (3H, s)	20.8
19	1.09 (3H, s)	17.8	1.04 (3H, s)	19.3
20	0.74 (3H, s)	19.1	0.70 (3H, s)	16.4

dihidrotucumanol (168)

La estructura del diterpeno (**168**) se encuentra reportada en la literatura pero sus datos espectroscópicos aún no han sido descritos, por lo que a continuación se presenta un análisis estructural de la molécula.



La estructura se estableció mediante el análisis de sus datos espectroscópicos de RMN ^1H , ^{13}C y experimentos bidimensionales, tal como se describe a continuación. Mediante el estudio de las señales mostradas en el espectro se observó que este metabolito tiene gran similitud con el ácido dihidrotucumanoico. En el espectro de RMN ^1H se observan los hidrógenos base de oxígeno en δ 4.02 (H-2) y 3.58 ppm (H-3), así mismo en δ 2.32 y 2.12 la presencia de las señales de los protones diasterotópicos en la posición 14, las cuales tienen multiplicidad doble de doble y comparten la constante de acoplamiento *gem* de 14.7 Hz. En la región de protones alifáticos se observa, al igual que en el espectro del compuesto (**167**) las señales de los cinco metilos, en δ 0.94 y 0.77 (señal doble para cada una con $J=$ 7.0 y 6.1 Hz respectivamente, correspondientes a H-16 y H-17), así como las señales de los tres metilos singulete H-18, H-19 y H-20, en desplazamientos químicos 1.28, 1.08 y 0.73 ppm.

La diferencia estructural de este metabolito en comparación con el ácido dihidrotucumanoico es en la ausencia del grupo ácido carboxilo en la posición 15, y en su lugar, la presencia de un grupo OH, lo que se ve reflejado en el espectro 12 (**Anexos**), donde se muestra una señal en 4.07 ppm que se encuentra desplazada a campo bajo

debido a la desprotección generada por un grupo electronegativo y se atribuye a los protones de un metileno base de oxígeno que se encuentra en posición 15 (Figura 20).

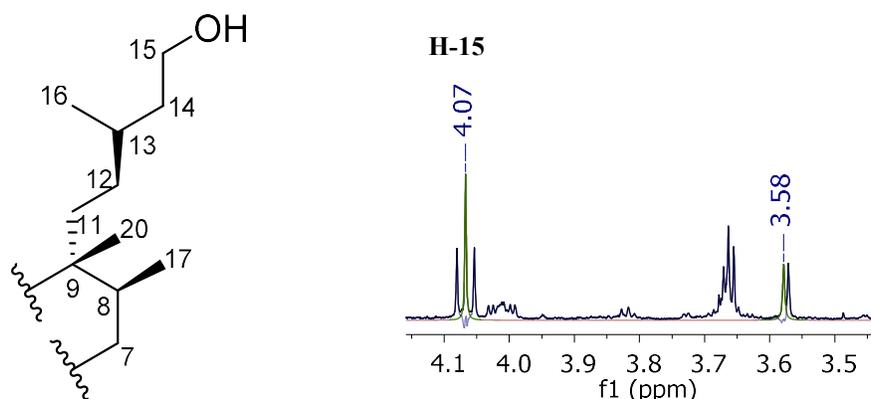


Figura 20. Expansión del espectro de RMN ^1H del dihidrotucumanol.

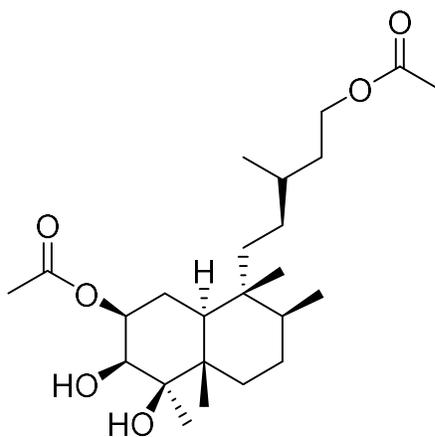
En concordancia con la estructura propuesta, el espectro de RMN ^{13}C (**espectro 13**) confirma que este metabolito es estructuralmente muy similar a **167**. En él se observan 20 señales que hacen referencia a que este compuesto también es de tipo diterpeno. El diterpeno **168** difiere de **167** solo en la señal que se encuentra desplazada a campo bajo (64.3 ppm). Estas evidencias son confirmadas con experimentos de RMN de dos dimensiones (**Anexos:** Espectros 14 y 15). Como se mencionó anteriormente, la estructura de este producto natural se encuentra reportada sin datos, por lo que esta constituye la primera fuente bibliográfica que los reporta.

dihidrotucumanol (diacetilado) (169)

El compuesto fue obtenido mediante la recromatografía del crudo de reacción de acetilación de la reunión 5-11 del extracto hidro-alcohólico. Mediante el análisis del espectro de RMN ^1H , este metabolito tiene la misma estructura que el dihidrotucumanol (**168**). Presenta 5 señales alifáticas que pertenecen a los grupos metilo en posición 16, 17, 18, 19 y 20. En 2.08 y 2.05 ppm se observan dos señales simples que integran para tres hidrógenos cada una y pertenecen a los grupos acetilos, lo que nos indica que la molécula está diacetilada. Así mismo, se observan dos señales que integran para un hidrogeno cada una, la primera en 5.13 ppm y se asigna al H-2, sin embargo, a diferencia del compuesto **168** se encuentra desplazada hacia campo bajo, lo que confirma la presencia de un grupo acetilo en esta

posición. De igual manera para la segunda señal en 4.11 ppm que pertenece al H-15 se observa su desplazamiento ligeramente a campo bajo comparado con el compuesto **168**, esto indica que el grupo hidroxilo presente en esta posición se acetilo en el proceso.

Estas evidencias fueron suficientes para confirmar la estructura y por lo tanto este compuesto corresponde al producto natural diacetilado (**169**).



(169)

Tiempos de reacción mayores a 48 horas aseguran la obtención del producto triacetilado en las posiciones C-2, C-3 y C-15.

7.2. Determinación de la actividad antiinflamatoria *in vitro* sobre COX-1 y COX-2.

Se evaluó la capacidad inhibitoria sobre COX-1 y COX-2 de los metabolitos secundarios de dos variedades de *Ageratina espinosarum* recolectadas en diferentes estados y temporada. El cálculo del porcentaje de inhibición se determinó de manera indirecta mediante la cuantificación de la producción de prostaglandinas, haciendo uso de la curva estándar generada, misma que se muestra a continuación:

Standard Curve

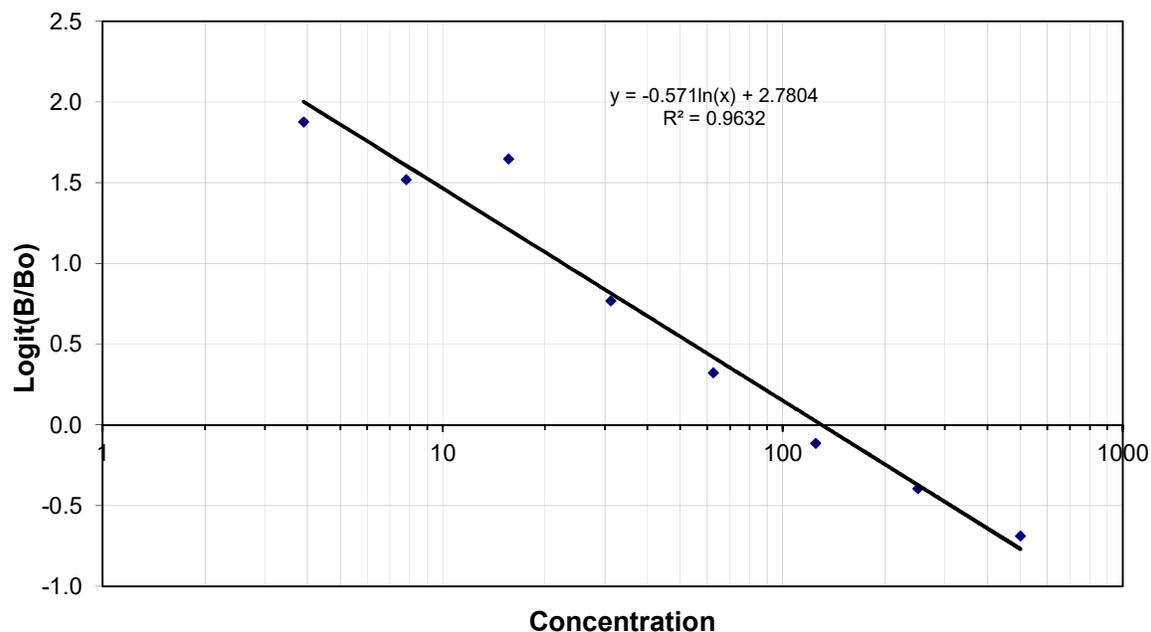


Figura 21. Curva estándar de prostaglandinas para la determinación del porcentaje de inhibición de COX-1 y COX-2.

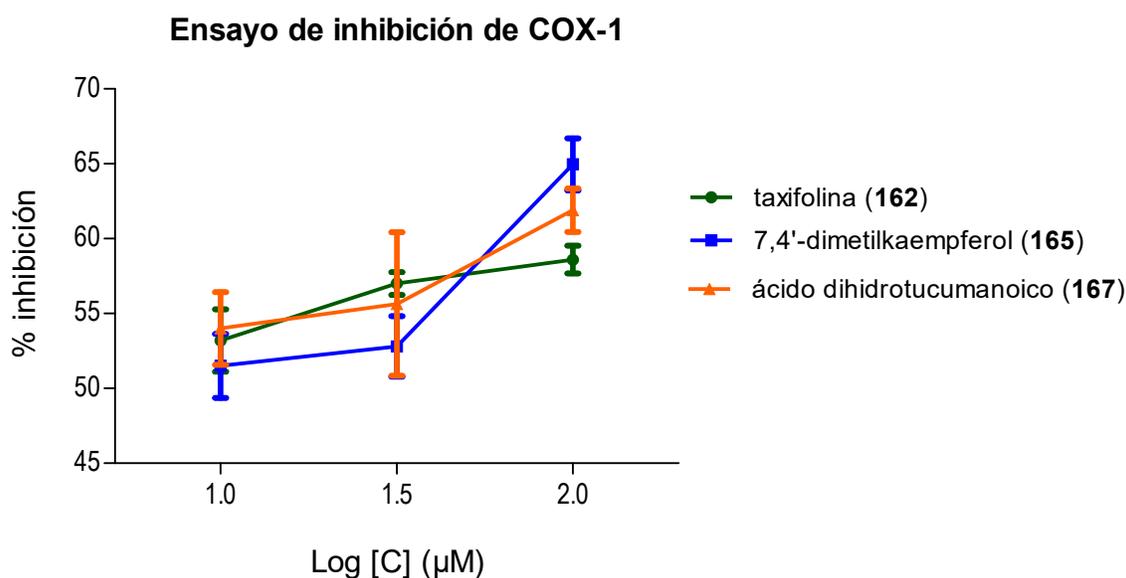
Con la extrapolación de los datos de absorbancia de cada compuesto se obtuvieron los porcentajes de inhibición a las diferentes concentraciones evaluadas (10, 31.6 y 100 μM) para el ensayo sobre COX-1, mismos que se muestran en la tabla 27.

Tabla 27. Porcentajes de inhibición sobre COX-1 de los metabolitos secundarios de las dos variedades de *Ageratina espinosarum*.

Compuesto	% INHIBICIÓN DE COX-1		
	10 μM	31.6 μM	100 μM
Taxifolina (162)	53.2 \pm 3.6	57.0 \pm 1.3	58.6 \pm 1.6
7,4'-dimetilkaempferol (165)	51.5 \pm 3.7	52.8 \pm 3.5	65.3 \pm 2.5
ácido dihidrotucumanoico (167)	54.0 \pm 4.2	58.4 \pm 3.8	61.9 \pm 2.5
Sakuranetina (97)	53.7 \pm 0.7	50.1 \pm 4.0	53.9 \pm 2.0
Homoeriodictiol (161)	56.4 \pm 1.1	61.9 \pm 3.7	60.7 \pm 2.4
4'-metilsakuranetina (157) y persicogenina (158)	52.2 \pm 8.2	58.6 \pm 1.9	49.7 \pm 4.4
dihidrotucumanol (168)	52.6 \pm 1.6	49.2 \pm 3.0	55.8 \pm 3.0

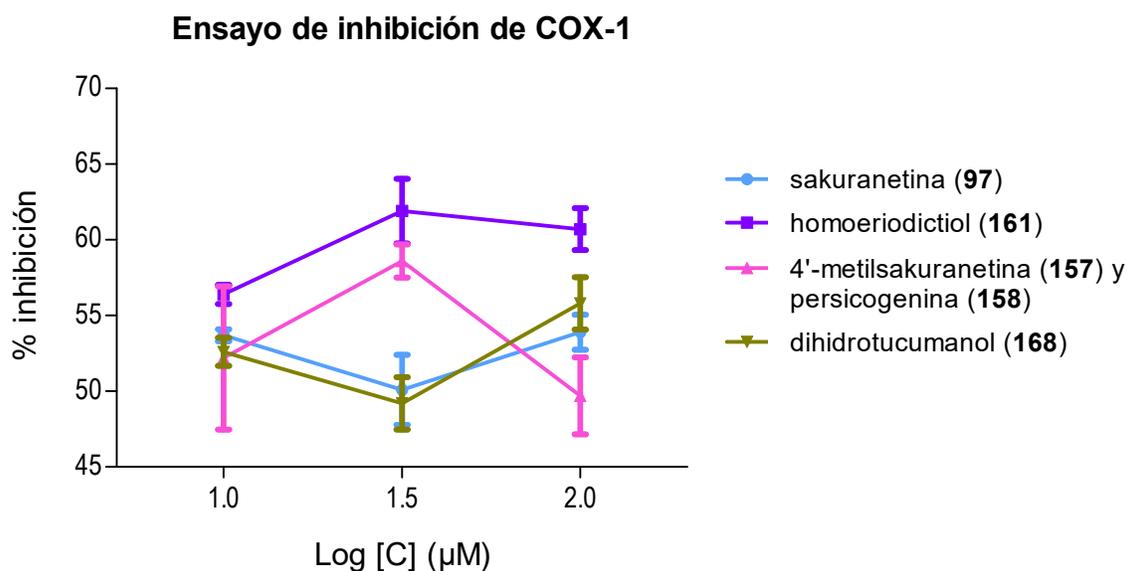
Los resultados obtenidos muestran comportamientos muy similares, todos los compuestos resultaron buenos inhibidores de COX-1, sin embargo existe una diferencia mínima entre los porcentajes obtenidos para cada compuesto. Estos datos también reflejan que la IC₅₀ para todos los compuestos se alcanzó a la mínima concentración evaluada, es decir, a 10 μM, este señalamiento indica que se trata de compuestos inhibidores potentes de esta isoforma, cuando son comparados con el fármaco antiinflamatorio indometacina, utilizado como control positivo, y ensayado a 1.67 μM, concentración a la que mostro un porcentaje de inhibición de 55.2 %, prácticamente idéntico a nuestros compuestos analizados. Derivado de este análisis general, se deduce que estos metabolitos secundarios deberían ser evaluados a tres concentraciones menores, para determinar con certeza el valor de su IC₅₀.

Los compuestos **162**, **165** y **167** muestran un comportamiento dependiente de la concentración (Grafica 1). Los compuestos **162** y **167** siguen una tendencia similar en cuanto a la inhibición de COX-1, mientras que **165** es menos potente a las concentraciones 10 y 31.5 μM, sin embargo a 100 μM su efecto se potencializa, alcanzando mayor inhibición (65%) que **162** y **167**.



Graficas 1. Porcentajes de inhibición sobre COX-1 de los compuestos de dos variedades de *Ageratina espinosarum*.

En la gráfica 2 se muestran los porcentajes de inhibición de COX-1 para el resto de los compuestos, quienes en todos los casos exhiben una actividad no dependiente de la concentración. Los metabolitos **97** y **168** muestran capacidad inhibitoria para la enzima con un comportamiento muy similar. Los compuestos **161** y la mezcla de **157-158** se comportan de manera lineal hasta una concentración de 31.5 μM , mientras que a concentraciones mayores muestran disminución del porcentaje de inhibición, posiblemente debido a la saturación de la enzima. Para el cálculo de IC_{50} , de la misma manera que para los compuestos **162**, **165** y **167**, deben ensayarse concentraciones por debajo de 10 μM .

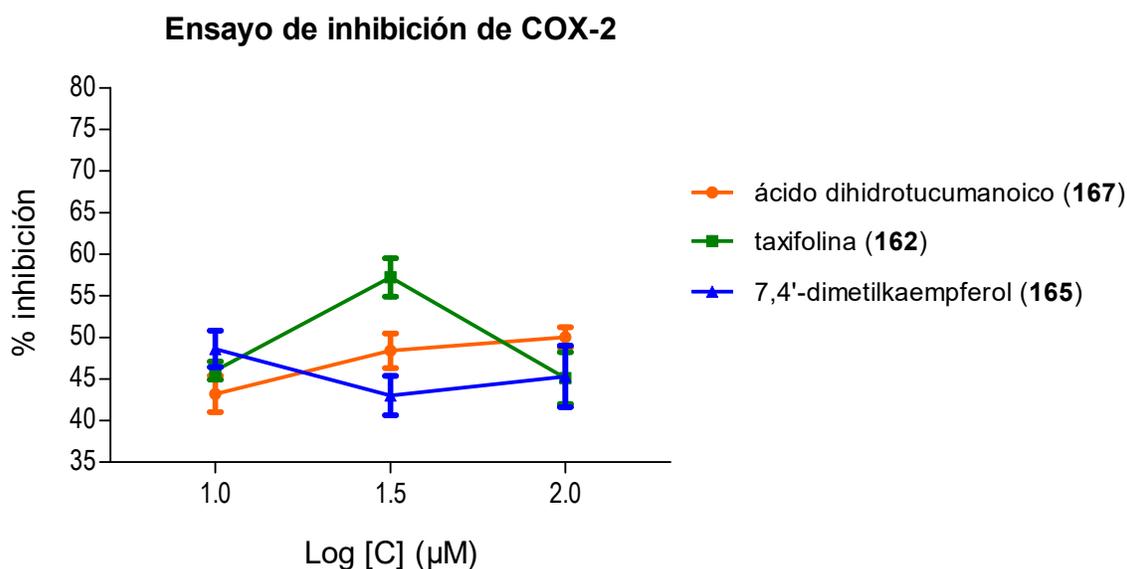


Graficas 2. Porcentajes de inhibición sobre COX-1 de los compuestos de dos variedades de *Ageratina espinosarum*.

Tabla 28. Porcentajes de inhibición sobre COX-2 de los metabolitos secundarios de las dos variedades de *Ageratina espinosarum*.

Compuesto	% INHIBICIÓN DE COX-2		
	10 μM	31.6 μM	100 μM
Taxifolina (162)	46.0 \pm 1.9	57.2 \pm 4.0	45.1 \pm 5.4
7,4'-dimetilkaempferol (165)	48.6 \pm 3.8	43.0 \pm 4.1	45.3 \pm 6.4
ácido dihidrotucumanoico (167)	43.2 \pm 3.8	48.4 \pm 3.6	50.0 \pm 2.1
Sakuranetina (97)	58.1 \pm 6.2	58.0 \pm 5.7	44.4 \pm 4.7
Homoeriodictiol (161)	44.3 \pm 4.1	51.5 \pm 3.1	41.5 \pm 1.7
4'-metilsakuranetina (157) y persicogenina (158)	54.6 \pm 4.5	72.4 \pm 7.2	52.9 \pm 2.6
dihidrotucumanol (168)	51.2 \pm 1.9	52.7 \pm 5.9	52.5 \pm 2.6

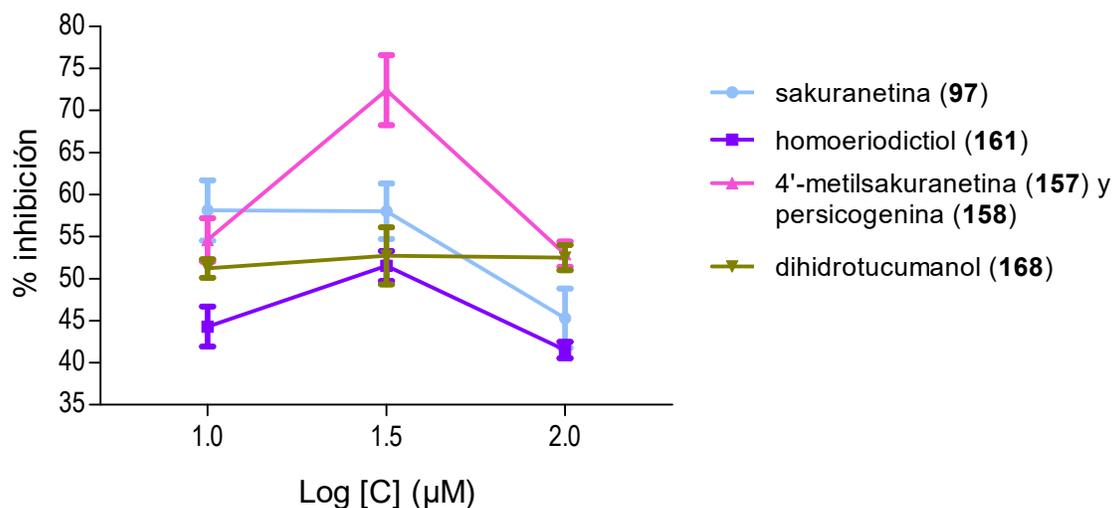
Los valores del porcentaje de inhibición de estos compuestos sobre la enzima COX-2 se presentan en la tabla 28. Cabe señalar que la mayoría de estos metabolitos es menos selectivo para esta enzima y sigue un comportamiento no dependiente de la concentración.



Graficas 3. Porcentajes de inhibición sobre COX-2 de los compuestos de dos variedades de *Ageratina espinosarum*.

El ácido dihidrotucumanoico (**167**) y taxifolina (**162**) muestran actividad inhibitoria para COX-2 (Gráfica 3). Sin embargo el compuesto **167** es más potente para COX-1 ya que mostró un porcentaje de inhibición del 54% a la mínima concentración (10 μM), mientras que frente a COX-2 fue de 43.2 % respectivamente. Taxifolina de igual manera presenta mayor actividad sobre COX-1 que en COX-2 con un comportamiento que depende de la concentración.

Ensayo de inhibición de COX-2



Graficas 4. Porcentajes de inhibición sobre COX-2 de los compuestos de dos variedades de *Ageratina espinosarum*.

La mezcla de flavonoides 4'-metilsakuranetina y persicogenina (**157-158**) y sakuranetina (**97**) exhiben mayor porcentaje de inhibición hacia COX-2 que a COX-1, sin embargo a la concentración 100 μM, la actividad se ve disminuida, observándose que para el resto de los metabolitos ocurre lo mismo a esa concentración por lo que no se pudo determinar la IC₅₀ de los compuestos. Para el dihidrotucumanol (**168**) que es el compuesto novedoso, se observa que la actividad se mantiene constante con el incremento de la concentración (grafica 4), por lo que para el cálculo del valor de la IC₅₀ se tiene que ensayar a concentraciones por debajo de 10 μM.

Los resultados demuestran que los compuestos son inhibidores de ambas isoformas, sin embargo son más activos sobre COX-1, esta aseveración es significativa en términos de actividad biológica, ya que se demuestra el efecto antiinflamatorio de los compuestos contenidos en *A. espinosarum*, lo que valida el uso de esta especie para el tratamiento de padecimientos relacionados con la inflamación.

7.3. Acoplamiento molecular de los metabolitos secundarios sobre COX-1.

Los resultados del ensayo *in vitro* derivaron algunas hipótesis. Debido a que los compuestos mostraron mejor actividad sobre COX-1 se decidió realizar el acoplamiento molecular solo sobre esta isoforma con el propósito de explicar el comportamiento de los productos naturales frente a esta actividad enzimática *in vitro*.

En la figura 22 se muestra el diagrama bidimensional (visualizado en MOE 2009) del sobreposicionamiento de la pose del ibuprofeno generada en la validación del Docking y de la estructura co-cristalizada de este fármaco en la enzima. En la imagen se observa que la disposición espacial de los átomos de las dos estructuras es muy similar, lo cual se verifica con el valor generado de la desviación media de la raíz cuadrática (**RMSD** por sus siglas en inglés), que nos ayuda a determinar la medida de la distancia promedio entre los átomos de dos estructuras. El resultado de este parámetro fue de 0.1528 Å, indicando que la conformación que adoptan ambas estructuras es muy semejante, ya que entre más pequeño es el valor de RMSD mayor es la similitud conformacional. Como se puede observar, se presentan interacciones importantes de la estructura con el sitio catalítico de COX-1: el Bolsillo lateral (LP: Ala527, Leu531, Ser530 y Val349), Canal de constricción (CC: Arg120, Glu524 y Tyr355), Bolsillo lipófilo (LiP: Ile 523), y con Arg513 y His90.⁹³

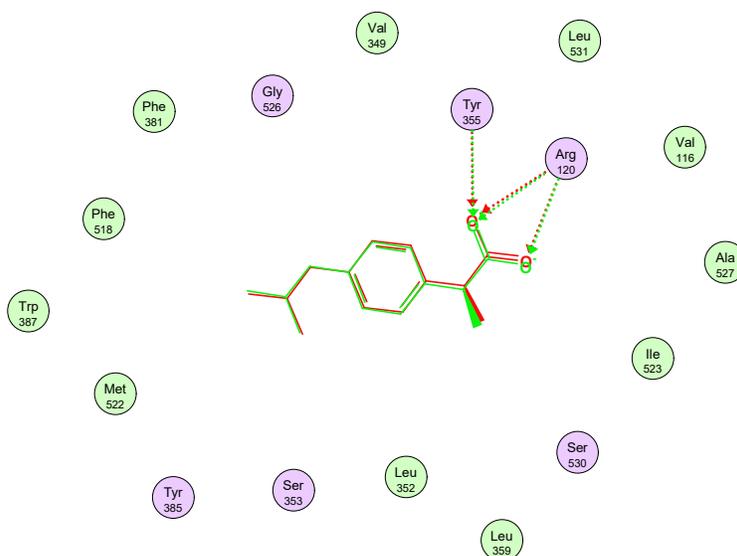


Figura 22. Superposición del ligando co-cristalizado y su postura de acoplamiento validada. Rojo: co-cristalizado, verde: validación.

Lo anterior es importante para definir los sitios de contacto que deben ser considerados importantes en la interacción de nuestros compuestos con la estructura de la enzima COX-1 en el análisis de su actividad mediante Docking molecular.

Se analizó el metabolito taxifolina (**162**). Este flavonol, como su nombre lo indica, tiene como principal característica un grupo alcohol en posición C-3 y por consiguiente la presencia de dos centros quirales (C-2 y C-3), lo que hace que pueda existir como 4 estereoisómeros, de los cuales, aquel con el anillo B en *alfa* y el hidroxilo en *beta* corresponde a nuestro producto natural. Como se observa en la figura 23, la molécula se encuentra internalizada dentro del sitio catalítico de COX-1. La interacción más importante que se observa es el contacto polar con Arg120 a través del hidroxilo en C-7, ya que se ha postulado que los AINE's bloquean a la COX al formar puentes de hidrogeno con este aminoácido, mismo que conforma el canal de constricción junto con Tyr355, donde la taxifolina también tuvo contacto a través de su hidroxilo sobre C-4'. Otro aminoácido clave en COX-1 es Ser530, este residuo se encuentra ubicado en medio del canal hidrófobo y se sabe que es el sitio de acetilación de la aspirina, se muestra que taxifolina tiene interacción a través del hidroxilo en C-3. Los resultados de este acoplamiento molecular *in silico* establecen una energía de unión de -6.4609 kcal/mol y fundamentan los resultados del ensayo *in vitro*, donde este compuesto presenta una inhibición enzimática de 53.2% a 10 μ M.

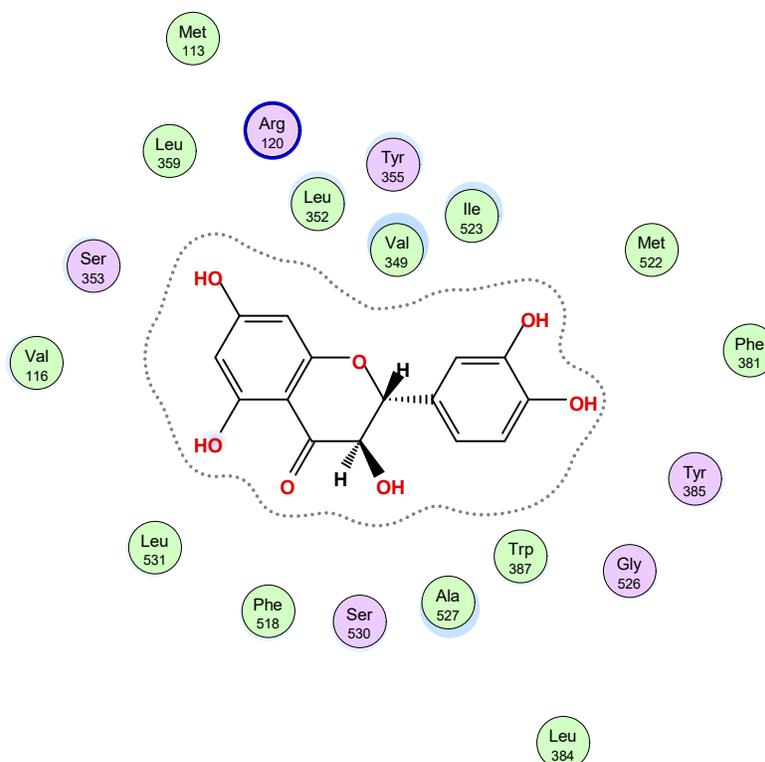


Figura 23. Diagrama de interacción bidimensional de taxifolina (162) sobre COX-1.

El 7,4'-dimetilkaempferol (**165**) no contiene centros quirales. A pesar de ello, su estructura también se encuentra embebida en el sitio catalítico (figura 24), el esqueleto de este compuesto también pertenece a la clase de los flavonoles, que los caracteriza por presentar un grupo alcohol en C-3 del anillo C y con esto favorecer las interacciones polares, principalmente con los residuos que conforman el canal de constricción de la enzima. Se observa como interacción importante el contacto polar con Arg120 a través del hidroxilo en C-5, así mismo con Tyr355 y el metoxilo en C-7, este análisis nos da un indicio que el compuesto estaría bloqueando el sitio de entrada del ácido araquidónico para llevarse a cabo la catálisis enzimática.

Una de las principales diferencias entre COX-1 y COX-2, es la sustitución del residuo Ile523 en COX-1 por Val523 en COX-2, y se sabe que los compuestos que se unan en esta región tendrán una mayor posibilidad de ser más selectivos por alguna de las enzima, en el acoplamiento se observa que el metabolito tiene interacción hidrofóbica directa con Ile523 en el bolsillo lipofílico y el cálculo de la energía de unión fue de -5.91 kcal/mol (figura 25),

probablemente a esto se deba el aumento de la actividad inhibitoria en el ensayo *in vitro* sobre COX-1.

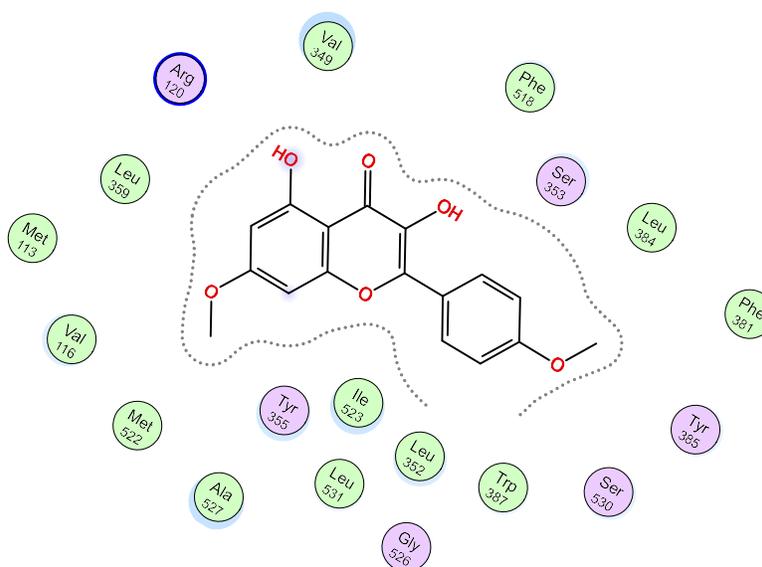


Figura 24. Mapa de interacción bidimensional de 7,4'-dimetilkaempferol con COX-1.

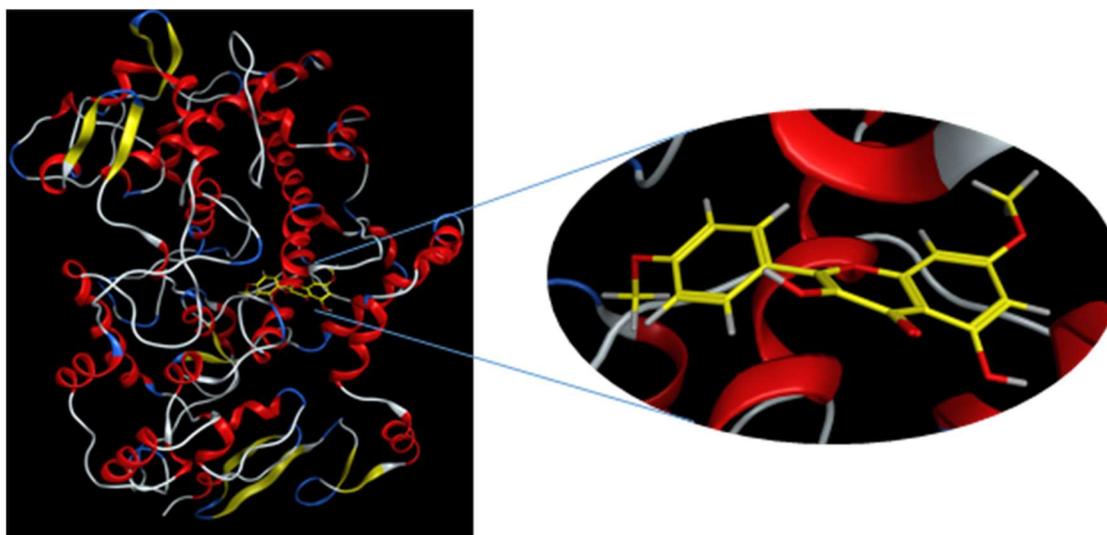


Figura 25. Imagen tridimensional de la orientación de 7,4'-dimetilkaempferol en la COX-1.

El compuesto sakuranetina (**97**) mostró menos interacciones con la cavidad catalítica de la enzima a pesar de estar internalizada en esta (Figura 26), pese a tener un esqueleto base

de un flavonoide, la diferencia estructural con respecto a los anteriores es la ausencia del grupo alcohol en C-3, que si bien, se ha mencionado, ha sido relevante para mejorar las interacciones con la enzima.

Se observa la interacción polar con Tyr355, un residuo que forma el canal de constricción y esta ocurre con el metoxilo en C-7 del anillo A, a diferencia de los compuestos anteriores que lo hacen con el hidroxilo o en su caso un metoxilo presente en el anillo C. La interacción con el residuo polar Arg120 se pierde y como consecuencia de esto existiría una alta probabilidad de que la actividad inhibitoria se viera disminuida ya que esta interacción es fundamental para realizarse la inhibición enzimática, es así como, junto con este análisis permite entender porque no manifestó buena actividad inhibitoria en el ensayo *in vitro*.

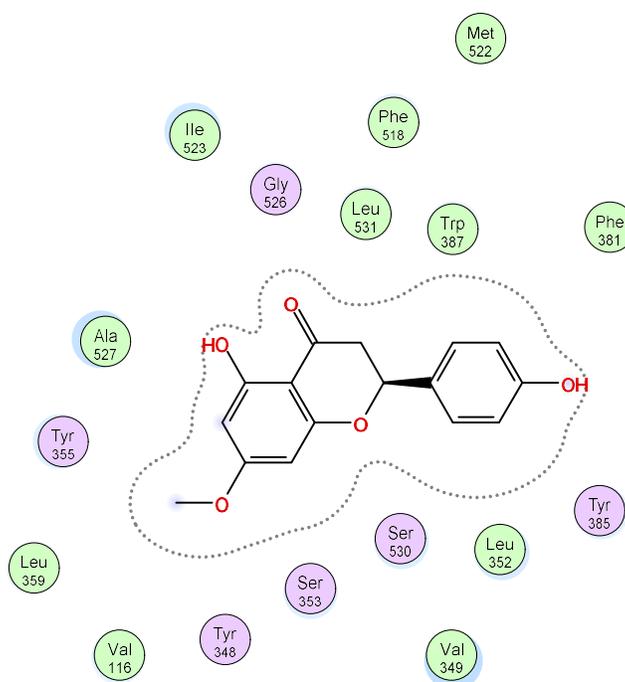


Figura 26. Visualización en 2D del compuesto sakuranetina (97) frente a COX-1.

Sin embargo, se muestran otras interacciones de naturaleza hidrófoba con residuos del bolsillo lateral de COX-1 (Ser530, Leu531, Val349) que si bien, no son químicamente fuertes pero ayudan a verificar que el compuesto sakuranetina (**97**) en realidad esta embebido en el sitio activo (figura 27) y siendo así interfiere para que se lleve a cabo la catálisis enzimática.

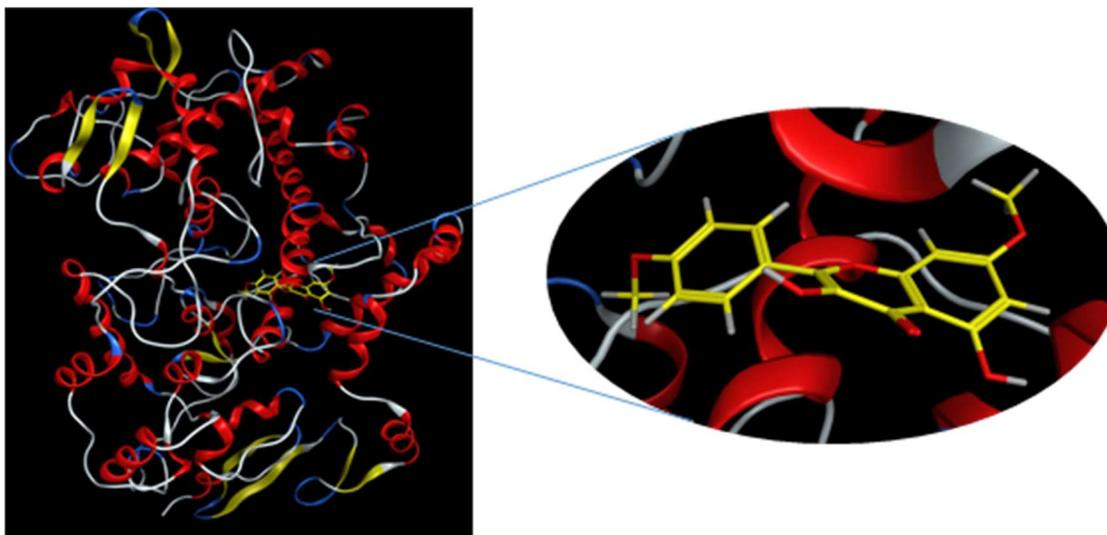


Figura 27. Visualización en 3D del complejo sakuranetina-COX-1 (-5.7792 Kcal/mol).

Se estudió la interacción de la flavanona homoeiodictiol (**161**) con la enzima COX-1, este flavonoide y el flavonol taxifolina tienen como característica principal la presencia de varios grupos alcohol en su estructura favoreciendo con ello la interacción con residuos polares de la enzima. La energía de unión calculada con el sitio activo de la enzima es -5.6717 Kcal/mol, el compuesto se encuentra embebido en la cavidad catalítica (figura 28), formando interacciones con los residuos que conforman el bolsillo lateral (Leu531, Ser530 y Val349) y el canal de constricción (Tyr355), como se observa en la figura 26, se recupera la interacción polar con Arg120 y el grupo alcohol en la posición C-7, este residuo de aminoácido está presente en el canal de apertura del sitio activo de COX-1 y es fundamental para la interacción con el ácido araquidónico y pueda llevarse a cabo la cascada de señalización para la síntesis de prostaglandinas. Con estos resultados se esperaría que la actividad inhibitoria estuviera presente y en cuyo caso así fue ya que en el estudio *in vitro* el metabolito presentó actividad intrínseca.

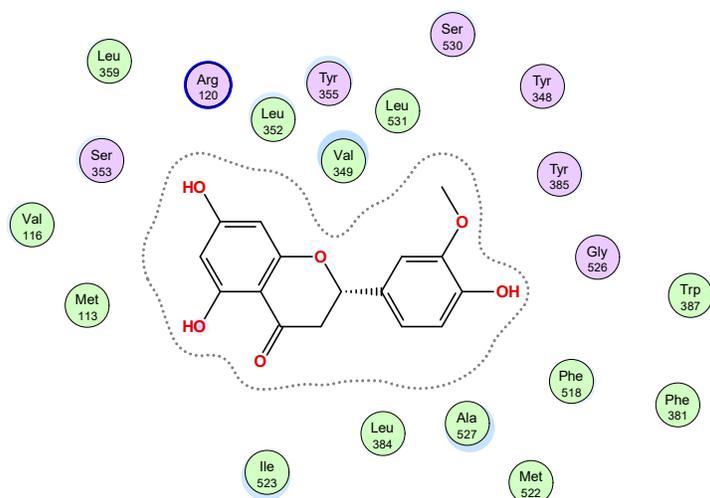


Figura 28. Mapa de interacción bidimensional de homoeriodictiol con COX-1.

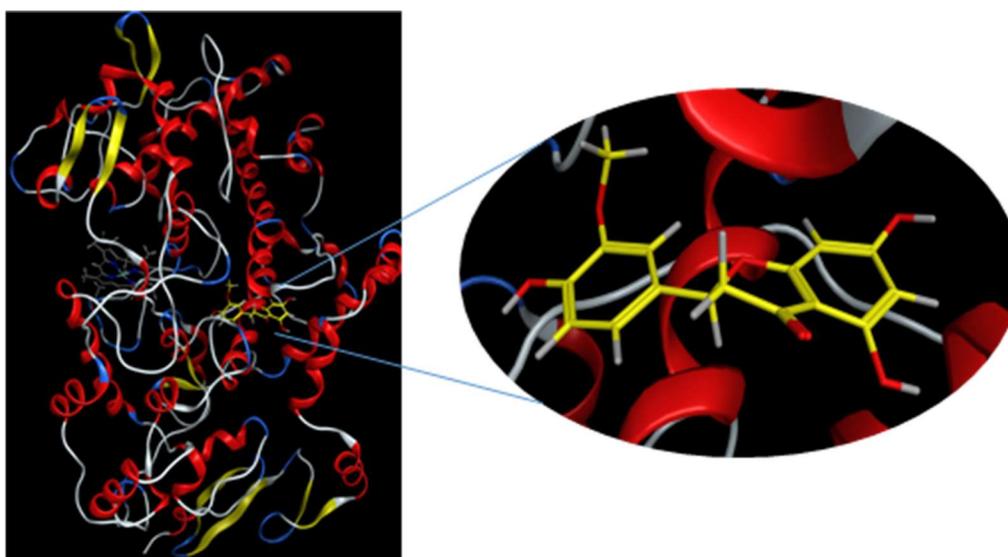


Figura 29. Imagen digital en 3D del complejo homoeriodictiol-COX-1.

En la figura 30 se muestra el diagrama en 2D para el producto natural 4'-metilsakuranetina (**157**), se observan interacciones conservadas, principalmente con residuos importantes que conforman el sitio activo de la enzima, se presenta una interacción polar básica importante con Arg120 y el grupo OH en posición 5, de igual forma con Tyr355 y Ser530. Es importante notar el contacto extra polar con Met522 a través del enlace de hidrógeno.

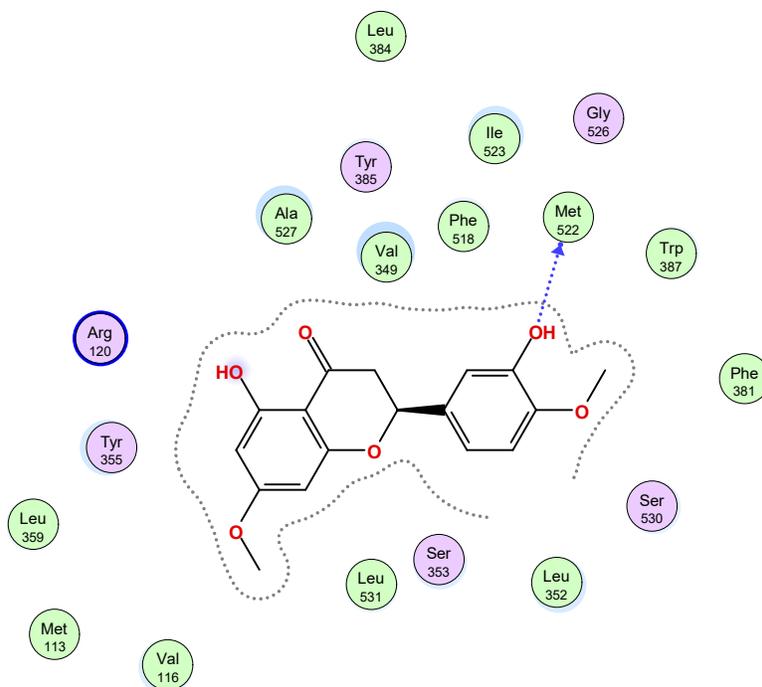


Figura 30. Mapa de interacción bidimensional de 4'-metilsakuranetina con COX-1.

A continuación se muestra la visualización tridimensional (figura 31) de complejo inhibidor-enzima, encontrándose que la energía de acoplamiento era de -5.49 Kcal / mol.

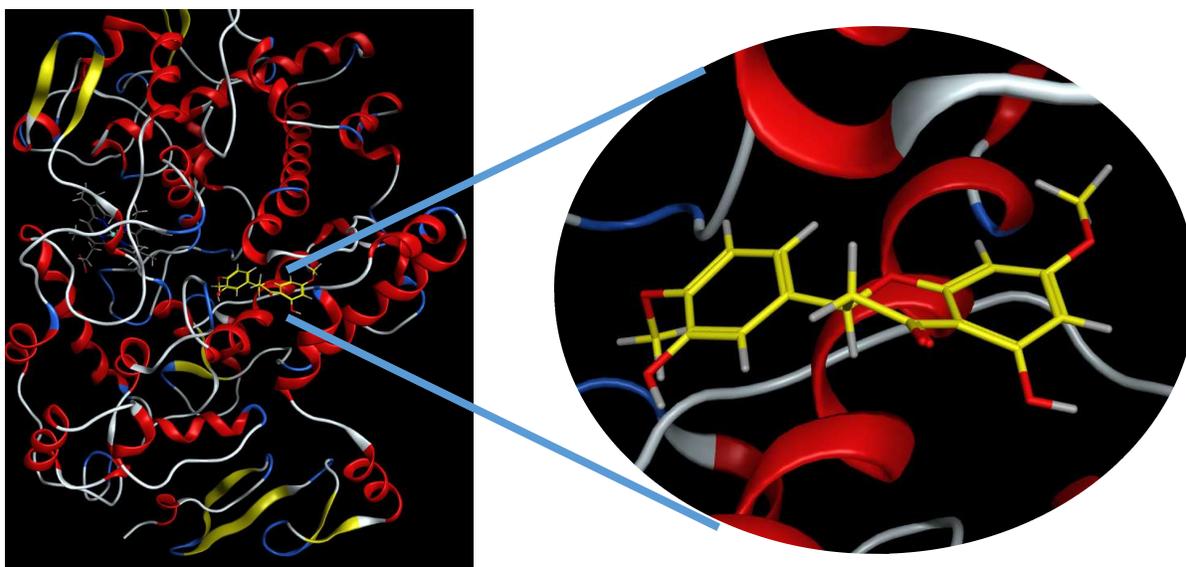


Figura 31. Mapa de interacción 3D del complejo 4'-metilsakuranetina-COX-1.

Siguiendo con el análisis de las interacciones del compuesto con los residuos en el sitio catalítico de COX-1, es destacado mencionar que la presencia del puente de hidrogeno con Met522 no es muy relevante para la selectividad hacia esta isoforma, sin embargo al encontrarse en el sitio alósterico de la enzima no se puede llevar a cabo la catálisis de la misma con el ácido araquidónico para posteriormente realizarse la síntesis de prostaglandinas, cabe mencionar que en el ensayo *in vitro* se evaluó en mezcla junto con persicogenina (**158**) y mostraron tener buena actividad intrínseca a 31.6 μM lo que nos podría hablar de un comportamiento sinérgico.

Finalmente se realizó el docking para los diterpenos aislados de *Ageratina espinosarum* recolectada en el estado de Puebla, el ácido dihidrotucumanoico (**167**) y dihidrotucumanol (**168**), sin embargo no mostraron buenas afinidades para la COX-1 y se eliminaron de las simulaciones de acoplamiento molecular.

A continuación se presenta en la tabla 29 un resumen de los resultados del acoplamiento molecular sobre COX-1.

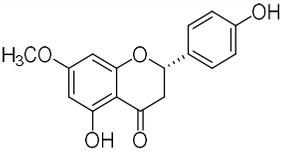
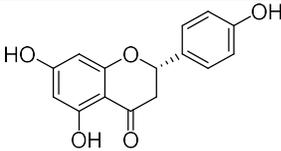
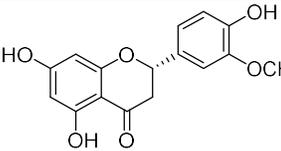
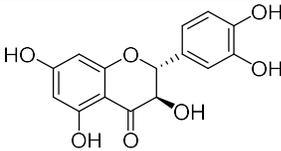
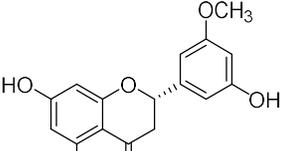
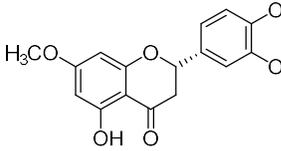
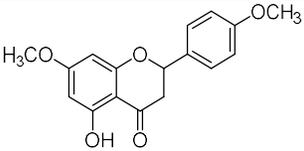
Tabla 29. Resultados del *Docking* realizado sobre COX-1 de los metabolitos secundarios de las dos variedades de *Ageratina espinosarum*.

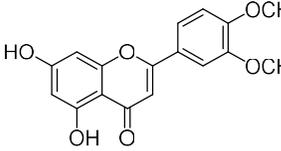
Compuesto	$\Delta G = \text{Kcal/mol}$	# de grupos OH ⁻	Interacción con Arg120 y Tyr355	Ranking
taxifolina (162)	-6.4609	5	Si	1
7,4'-dimetilkaempferol (165)	-5.910	2	Si	2
sakuranetina (97)	-5.7792	2	Solo con Tyr355	3
homoeriodictiol (161)	-5.6717	3	Si	4
4'-metilsakuranetina (157)	-5.49	1	Si	5
Ibuprofeno	-7.480	ácido carboxílico	Si	Co-cristal

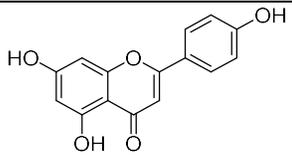
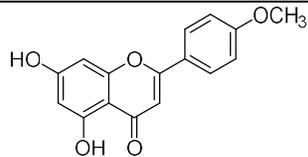
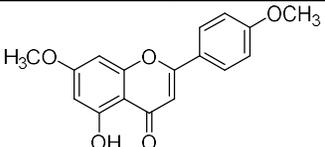
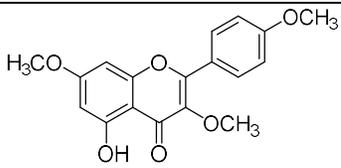
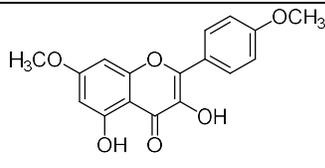
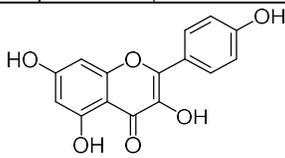
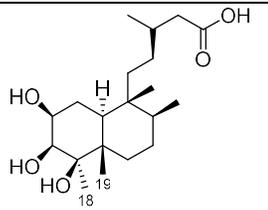
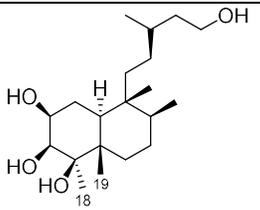
8. CONCLUSIONES

1. La composición química de los extractos de las dos variedades de *Ageratina espinosarum* fue diferente, posiblemente influenciada por factores ambientales, la temporada, el sitio y año de colecta. En la tabla 30 se hace un comparativo de los metabolitos secundarios aislados de ambas plantas.

Tabla 30. Tabla comparativa de la composición química de las dos variedades de *Ageratina espinosarum*.

<i>Ageratina espinosarum</i> var. <i>espinosarum</i>	
Flavanonas:	
 <p>sakuranetina</p>	 <p>naringenina</p>
 <p>homoeriodictiol</p>	 <p>taxifolina</p>
 <p>alisifolinona</p>	 <p>persicogenina</p>
 <p>4'-metilsakuranetina</p>	

Flavonas:	
 <p>apigenina</p>	 <p>4'-metilcrisoeriol</p>

<i>Ageratina espinosarum</i> var. <i>sp.</i>	
Flavonas:	
 <p>apigenina</p>	 <p>acacetina</p>
 <p>7,4'-dimetilapigenina</p>	
Flavonoles:	
 <p>3,7,4'-trimetilkaempferol</p>	 <p>7,4'-dimetilkaempferol</p>
 <p>Kaempferol</p>	
Diterpenos:	
 <p>ácido dihidrotucumanoico</p>	 <p>dihidrotucumanol</p>

-
2. El tipo de inhibición y su potencia no depende de la naturaleza del compuesto ya que no se observaron cambios significativos en el porcentaje de inhibición *in vitro* de los metabolitos secundarios sobre las ciclooxigenasas (COX-1 y 2), no obstante, mostraron ser más activos frente a COX-1, sin embargo, la inhibición de esta enzima ha sido la principal causa de los efectos secundarios de los fármacos comerciales.
 3. Por otro lado, en el estudio de acoplamiento molecular, la actividad depende directamente del tipo de compuesto y las características de las sustituciones de los grupos alcohol en la estructura, ya que la presencia de estos sustituyentes en las posiciones C-7 y C-4' mejora la capacidad de inhibir la enzima COX-1 ya que forma interacciones con los residuos Arg120 y Tyr355 presentes en la cavidad catalítica e impidiendo llevarse a cabo la síntesis de prostaglandinas.

9. PERSPECTIVAS

1. Realizar el acoplamiento molecular frente a COX-2 de los metabolitos secundarios de las dos variedades de *Ageratina espinosarum*.
2. Evaluar los compuestos a concentraciones por debajo de 10 μM para calcular el valor de IC_{50} en el ensayo *in vitro* sobre las ciclooxigenasas.
3. Obtener en mayor cantidad los compuestos aislados de *Ageratina espinosarum var. sp.* recoletada en Puebla.
4. Para el compuesto **162** deberá seguir siendo analizado para obtener la caracterización completa mediante experimentos de RMN, IR, UV, entre otros.
5. Evaluar los metabolitos secundarios de las dos variedades de *Ageratina espinosarum* en modelos *in vivo* de inflamación.
6. Realizar estudios farmacológicos para proponer el posible mecanismo de acción de los metabolitos secundarios.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Regalado Veloz A. I, Sánchez Perera L. M., *Revista Cubana Farmacología*, **2015**, 49 (1), 156-164.
2. Enciso E., Arroyo J., *Anales de la Facultad de Medicina*. **2011**, 72(4), 231-7
3. Rainsford K.D. Inflammation in the Pathogenesis of Chronic Diseases, 2007, 3–27.
4. Barzaga Fernández P., Núñez Figueredo Y., Carrillo Domínguez C., Chávez Hernández I., González Sanabria M. L. González R., Echevarría M., *Acta Farm. Bonaerense*, 2004, 23(4): 492-7.
5. Acuña Ocampo Y. D. Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de *Ageratina spinosarum*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Centro de Investigaciones Químicas. 2017. 90p.
6. Franco Ospina L. A., Castro Guerrero J. P., Ocampo Buendía Y. C., Pájaro Bolívar I. B., Díaz Castillo F., *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, **2013**, 18 (1), 34-46.
7. GÓMEZ ESTRADA, H. A.; GONZÁLEZ RUIZ, K. N.; Domingo MEDINA, J., *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, **2011**, 10(3), 182-217.
8. Nordqvist, C. (2017, November 24). "Everything you need to know about inflammation." *Medical News Today*. Recuperado de <https://www.medicalnewstoday.com/articles/248423.php>.
9. Harizi H., *Hindawi Publishing Corporation*, **2015**. 841097. 1-9.
10. A. Dinarello C., *Cell*, **2010**, 140, 935–950.
11. Libby P.; *International Life Sciences Institute*. **2007**. 2; 140-146.
12. Ma. Teresa Robles Rodríguez. (2017). Diseño y síntesis de inhibidores de COX en la enfermedad de Alzheimer. (tesis de pregrado). Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid, España.
13. Goetz Moro M., Vargas Sánchez P. K., Lupepsa A. C., Baller E. M., Noble Franco G. C., *Revista Colombiana de Nefrología*, **2017**. 4 (1), 27 – 37.
14. L. Blobaum A., J. Marnett L., *Journal of Medicinal Chemistry*, **2007**, 50 (7); 1426-1440.
15. García Mejjidea J. A., Gómez-Reino Carnota J., *Revista Española de Reumatología*, **2000**, 27, 33-5.

16. Olga Cruz López, (2005). Diseño, síntesis y evaluación biológica de N-Fenilindoles como inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa 2. (Tesis Doctoral). Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, Universidad de Granada. Granada, España.
17. Blobaum A. L., Marnett L. J., *Journal of Medicinal Chemistry*, **2007**, 50 (7), 1426-1440.
18. Marta Lopez Parra. (2010). Efectos Renales de los inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2 en la cirrosis. Estudios in vivo en ratas inducidas a cirrosis y estudios in vitro en las células mesangiales. (Tesis Doctoral). Departamento de medicina, Universidad de Barcelona. Barcelona, España.
19. Rouzer C. A., Marnett L. J., *Journal of Lipid Research*, **2009**, 50, S29-S34.
20. Smith W. L., DeWitt D. L., Garavito R. M., *Annual Review of Biochemistry*. **2000**. 69, 145–82.
21. A. Perry L., Mosler C., Atkins A., Minehart M., *US Pharmacist*. **2014**, 39(3). 35-38.
22. Singh G., *British Medical Journal*. **2006**, 332, 1302.
23. Waller, D. G., y Sampson, A. P. (2018). Nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Medical Pharmacology and Therapeutics*, 363–372.
24. Zarghi A., Arfaei S., *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **2011**, 10 (4). 655-683.
25. E. Coutinho A., E. Chapman K., *Molecular and Cellular Endocrinology*. **2011**, 335(1), 2–13.
26. Rainsford K.D. *Inflammation in the Pathogenesis of Chronic Diseases*, **2007**, 3–27.
27. G. Ferreira L., N. dos Santos R., Oliva G. y D. Andricopulo A., *Molecules*, **2015**, 20, 13384-13421.
28. Salmaso V. y Moro S., *Frontiers in Pharmacology*. **2018**, 9, 923.
29. Tripathi A., A. Bankaitis V. *Journal of Molecular Medicine and Clinical Applications*. **2017**, 2(1). 10.16966/2575-0305.106.
30. Ekow Thomford N., Alice Senthebane D., Rowe A., Munro D., Seele P., Maroyi. A., Dzobo K, *International Journal and Molecular Science*. **2018**, 19, 157.
31. Gómez H. et. al. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, **2011**. 10(3), 182 – 217.
32. Villaseñor J. L., *Botanical Sciences*. **2018**. 96 (2): 332-358
33. Bisht V. K., Purohit V., *Nature and Science of Sleep*, **2010**, 8(3): 121-128.
34. García Sanchez C. A., Sanchez Gonzalez A., Villaseñor J. L., *Acta Botanica Mexicana*, **2014**, 106, 97-116.

35. Porras Ramirez J., AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE DERIVADOS DE TIMOL, OBTENIDOS DE LA PLANTA *Ageratina cylindrica*. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana, Mexico. Facultad de Ciencias Químicas. 2011. 60p.
36. Hernández Arias J. M., (2014). Diterpenos de *Ageratina vacciniaefolia*, *Conyza trihecatactis*, *Gnaphalium graveolens* y evaluación del efecto antiinflamatorio y citotóxico. (Tesis de maestría). Departamento de Química, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Recuperado de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/15449/HernandezAriasJoseMilton2014.pdf?sequence=1>.
37. Adebisi O., Dolma S. K., Verma P. K., Singh B., Eswara Reddy S. G., *Toxin Reviews*, **2018**; 2-8.
38. Hensela A., Maasa M., Sendkera J., Lechtenberga M., Petereita F., Detersa A., Schmidta T., Starkb T., *Journal of Ethnopharmacology*, **2011**.138; 641– 651.
39. Blanco A., Blanco G. (2017). *Medical Biochemistry*. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128035504000057>.
40. Subba B. y Kandel R. C., *Journal of Nepal Chemical Society*, **2012**, 30.
41. Olonisakin A., Shudh K. D., Praveen K. V., Bikram S. y S. G. E. R. *Toxin Reviews*. **2019**, 38 (2), 143-150.
42. Kurade N. P., Jaitak V., Kaul V. K., Sharma O. P., *Pharmaceutical Biology*, **2010**, 48(5): 539–544.
43. Bi L., Li-Mei D., Qiao-Lin X., Xu X., Qiang Z., Wen-Bin L., Jian-Wen T., *Phytochemistry Letters*. **2018**. 24; 67–70.
44. Qiao-Lin X., Mei Z., Zhong-Yu Z., Wan-Xue L., Fang-Hao W., Hong-Feng W., Jian-Wen T., *Phytochemistry Letters*. **2014**, 710, 1-4.
45. García G., García E., Martínez I., F. Scior T. R., Salvador J. L., M Martínez M., E. del Río R., *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*. **2011**. 21(5); 928-935.
46. Bustos-Brito C., J. Vázquez-Heredia V., Calzada F., Yépez-Mulia L., S. Calderón J., Hernández-Ortega S., Esquivel B., García-Hernández N. y Quijano L. *Molecules* **2016**, 21, 1132.
47. Arreaga-González H. M., Pardo-Novoa J.C., del Río R. E.,Rodríguez-García G., Torres-Valencia JJ. M., Manríquez-Torres J., Cerda-García-Rojas J. M., Joseph-Nathan P. Gómez-Hurtado M. A., *Journal Natural Products*. **2018**, 81, 63–71.

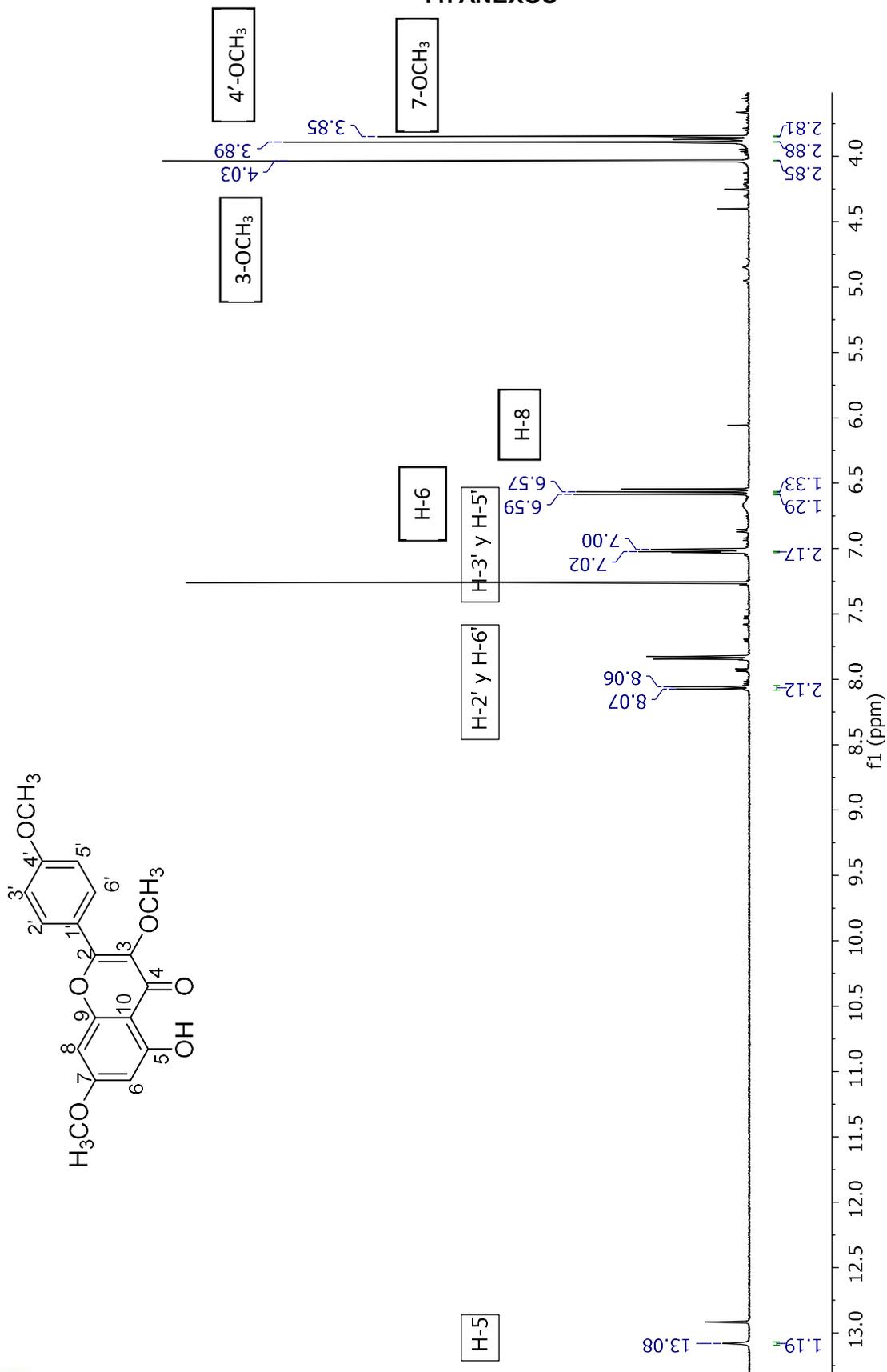
48. Chadwick M., Trewin H., Gawthrop F. y Wagstaff C. *International Journal of Molecular Sciences*. **2013**, 14; 12780-12805.
49. Buckle, J., (2015). *Clinical Aromatherapy. Essential Oils in Healthcare*, London, UK: ELSEVIER. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/283914717_Basic_Plant_Taxonomy_Basic_Essential_Oil_Chemistry_Extraction_Biosynthesis_and_Analysis.
50. Aguilera Sarmiento R. J., (2018). Determinación de las propiedades físico-químicas de los aceites esenciales de cuatro especies de la familia Asteraceae: *Ageratina dendroides*, *Ageratina pichinchensis*, *Coreopsis venusta* Kunth y *Gynoxys verrucosa* Weed de la provincia de Loja. (Tesis de Licenciatura). Escuela de Ingeniería en industrias agropecuarias, Universidad Técnica Particular de Loja. Loja, Ecuador. Recuperado de <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/1720>.
51. Ramírez-López, C. B., García-Sánchez, E., Martínez-Muñoz, R. E., Del Río, R. E., Martínez-Pacheco, M. M., *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, **2016**. 15 (1); 53 – 60.
52. Sun W., Zeng C., Liu S., Fu J., Hu L., Shi Z., Yue D., Ren Z., Zhong Z., Zuo Z., Cao S., Peng G., Deng J., Hu Y., *Nature*, **2018**. 8; 16032.
53. Kundua A., Saha S., Walia S., Ahluwalia V. y Kaur C., *Toxicological & Environmental Chemistry*, **2013**. 95(1); 127–137.
54. Kundu A., Saha S., Ahluwalia V., Walia S., *Journal of Applied Botany and Food Quality*. **2013**. 86, 33 – 36.
55. R. Amorim M. H., Gil da Costa R. M., Lopes C., M. S M., Bastos M., *Critical Reviews in Toxicology*. **2013**. 43(7); 559–579.
56. Ivanescu B., Miron A., Corciova A., *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. **2015**. 2015; 247685.
57. Langa G., M. Passreitera C., W. Wrightb C., H. Filipowicz N., Addae-Kyeremeb J., E. Medinillac B., Castillo J. J., *Zeitschrift fur Naturforschung*, **2002**. 57 (3-4), 282-6.
58. Wenting L., Xinxin F., Yingying Z., Chun-Hsiang H., Chiaki N., Tsutomu H., Shannon B., Tzu-Ping K., Chun-Chi C., Yunfeng C., Jian L., Iren W., Shang-Te D. H., Oldfield E. y Rey-Ting G. *Scientific Reports*, **2014**. 4 (6214).
59. Ding C., Ding Y., Chen H. y Zhou J. (2017). *Studies in Natural Products Chemistry*. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978044463929500005X>.

60. Bustos-Brito C., Sánchez-Castellanos M., Esquivel B., S. Calderón J., Calzada F., Yépez-Mulia L., Joseph-Nathan P., Cuevas G. y Quijano L. *Journal of Natural Products*. **2015**, 78 (11); 2580–2587.
61. Arciniegas A., Perez-Castorena A., Melendez-Aguirre M., Avila J. G., Garcia-Bores A. M., Villaseñor J. L. y Romo de Vivar A. *Chemistry Biodiversity*. **2018**, 15. e1700529.
62. Eiroa J. L., Triana J., J. Pérez F., A. Castillo Q., Brouard I., Quintana J., Estévez F., León F., *Medicinal Chemistry Research*. **2018**. 27; 1792–1799.
63. García-Sánchez E., B. Ramírez-López C., Talavera-Alemán A., León-Hernández A., E. Martínez-Muñoz R., M. Martínez-Pacheco M., Gómez-Hurtado M. A., Cerda-García-Rojas C. M., Joseph-Nathan P. y E. del Río R. *Journal of Natural Products*. **2014**, 77; 1005–1012.
64. Kumar S., K. Pandey A. *The Scientific World Journal*. **2013**, 2013; 162750.
65. Gonçalves J. L., Leitão S. G, Monache F. D, Miranda M. M, Santos M. G, Romanos M. T y Wigg M. D. *Phytomedicine*. **2001**. 8(6); 477-80.
66. Del Barrio G., Spengler I., García T., Roque A., L. Álvarez A., Calderón J. S., Parra F. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*. **2011**. 21(5); 915-920.
67. Morán-Pinzón J., Mondolis E., Abad A., Amaro-Luis J. M., Sevilla M. A., Montero M. J., López-Pérez J. L. y Guerrero De León E. *European Journal of Medicinal Plants*. **2017**. 18(2); 1-10.
68. García, T. H., da Rocha, C. Q., Dias, M. J., Pino, L. L., del Barrio G., Roque A., Pérez, C. E. ; dos Santos, L. C. Spengler, I. y Vilegas, W. *Natural product communications*. **2017**. 12 (1) .31 – 34.
69. Silva-Sánchez B., Gómez-Hurtado M. A., Beiza-Granados L., del Río R. E., Rodríguez-García G., *Ciencia Nicolaita*. **2017**. 70; 94-103.
70. Torres-Barajas L., Rojas-Vera J., Morales-Méndez A., Rojas-Fermín L., Lucena M., Buitrago A., *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, **2013**. 12(1): 92 – 98.
71. Aguilar-Guadarrama B., Navarro V., León-Rivera I., *Natural Product Research*. **2009**. 23(16); 1559–1565.
72. Thomas N., Zachariah S. M. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. **2013**. 6 (2); 11-15.

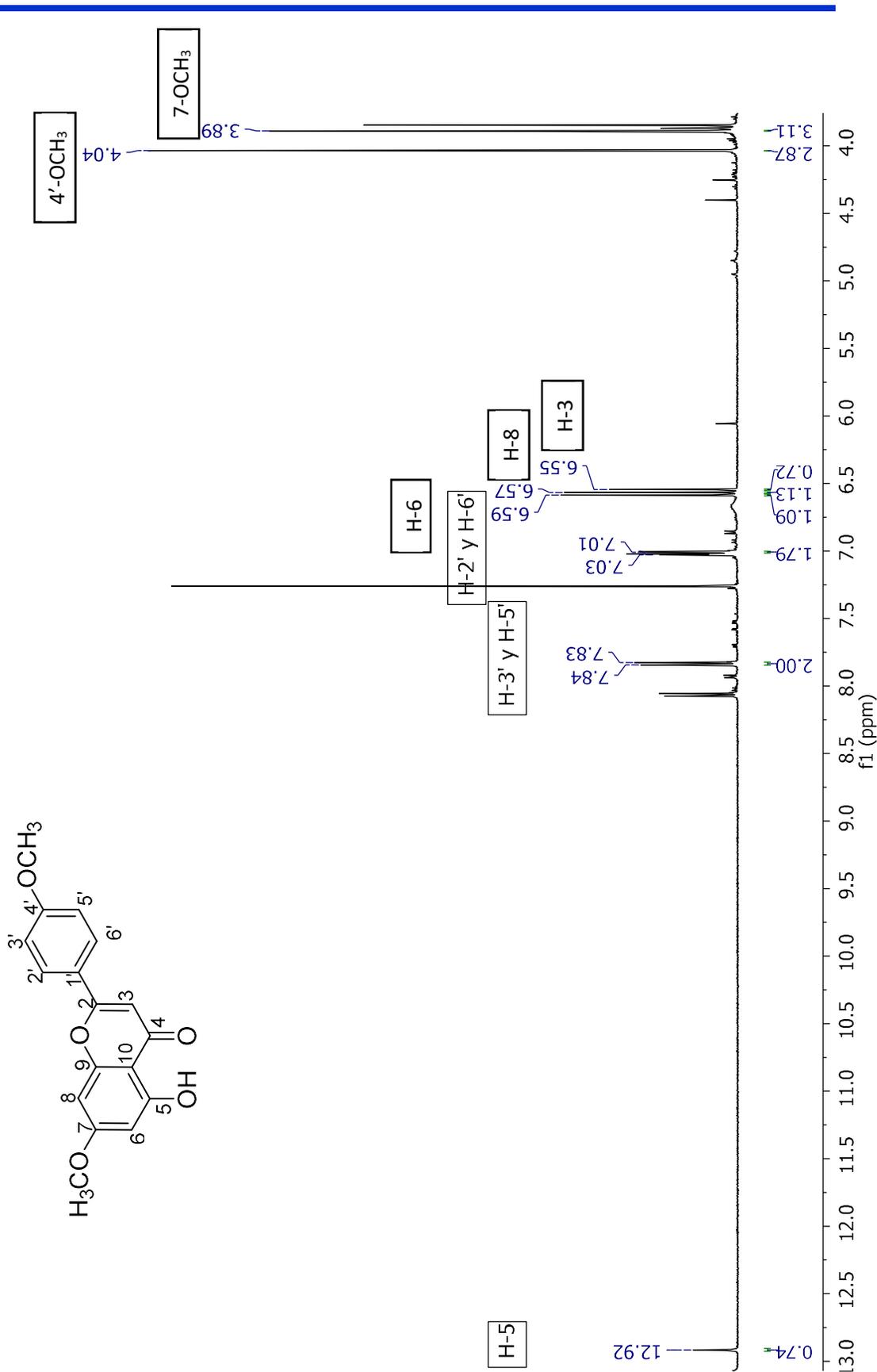
73. Ratnayake R.M.N.D., Bandara B.M.R., Adikaram N.K.B., Wijesundara D.S.A y Karunaratne V. *Ceylon Journal of Science*. **2018**. 47(3); 287-291.
74. E. Panter K. D Welch K., R. Gardner D., T. Lee S., T. Green B., A. Pfister J., Daniel Cook D., Z. Davis T., L. Stegelmeier B. (2018). *Veterinary Toxicology*. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128114100000611>.
75. T. Lee S., T. Davis Z., R. Gardner D., M. Colegate S., Cook D., T. Green B., A. Meyerholtz K., R. Wilson C., L. Stegelmeier B. y J. Evans T. *Journal Agricultural Food Chemistry*. **2010**, 58; 8560–8565.
76. T. Zane D., Stephen T. L., Mark G. C., Bryan L. S., Benedict T. G., Steven R. B. y James A. P. *Journal Agricultural Food Chemistry*. **2015**, 63; 2092–2097.
77. León S. N., Felix V. L., Chávez F. J., Quispe F. P., *ECIPERU*. **2011**. 8 (2), 245-252.
78. K. Chakravarty A., Mazumder T., N. Chatterjee S., *Hindawi Publishing Corporation*, **2011**. 10p.
79. Romero-Cerecero O., Islas-Garduño A. N., Zamilpa A., Tortoriello J., *Phytotherapy Research*. **2017**. 31(6); 885-890.
80. Sánchez-Ramos M., Marquina Bahena S., Romero-Estrada A., Bernabé-Antonio A., Cruz-Sosa F., González-Christen J., Acevedo-Fernández J. J., Perea-Arango I. y Álvarez L. *Molecules*, **2018**, 23; 1258.
81. Wollenweber E., Dörr M., Fritz H., Papendieck S., Yatskievych G. y N. Roitman J. *Z. Naturforsch.* **1997**. 52c, 301 -307.
82. Bohlmann F., Jakupovic J. y Lonitz M. *Chemische Berichte*. **1977**. 110, 301 -314.
83. Paray L. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. **1956**. 19: 1-15.
84. Aguilar Guadarrama A. B. Búsqueda de metabolitos secundarios con actividad antiinflamatoria en dos especies de Euphorbiaceae: *Croton arboreous* y *C. ciliatoglandulosus*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Centro de Investigaciones Químicas. 2004. 123 p.
85. A. Alwahsh M. A., Khairuddean M. y Chong W. K., *Records of Natural Products*, **2015**, 9 (1), 159-163.
86. Jinyoung K., Kwang-Su P., Chaewoon L. y Youhoon C., *Bulletin of The Korean Chemical Society*, **2007**, 28 (12).
87. A. Gomes R., R. A. Ramírez R., da S. Maciel J. K., Agra M. F. y Vanderlei de Souza M. F., *Química Nova*, **2011**, 34 (8), 1385-1388.
88. Sikorska M. y Matlawska I., *Drug Research*, **2001**, 58(4), 269-272.

-
89. Sutthanut K., Sripanidkulchai B., Yenjai C. y Jayd M., *Journal of Chromatography*, **2007**, 1143, 227–233.
 90. Ossi M. E., Yoshida M. y Soares Maia J. G., *Phytochemistry*, **1997**, 45 (6), 1263-1269.
 91. San-Martín A., Astudillo L., Gutiérrez M., Chamy M. C., Orejarena S., Rivera P. y Vergara K., *Journal of the Chilean Chemical Society*, **2010**, 55 (1).
 92. Scifinder search marzo 2019.
 93. Perez D. J., Sarabia O., García M.V., Pineda-Urbina K., Ramos-Organillo A., Gonzalez-Gonzalez J., Gómez-Sandoval Z., Razo-Hernández R. S., *Comptes Rendus Chimie*, **2017**, 20 (2). 169-180.

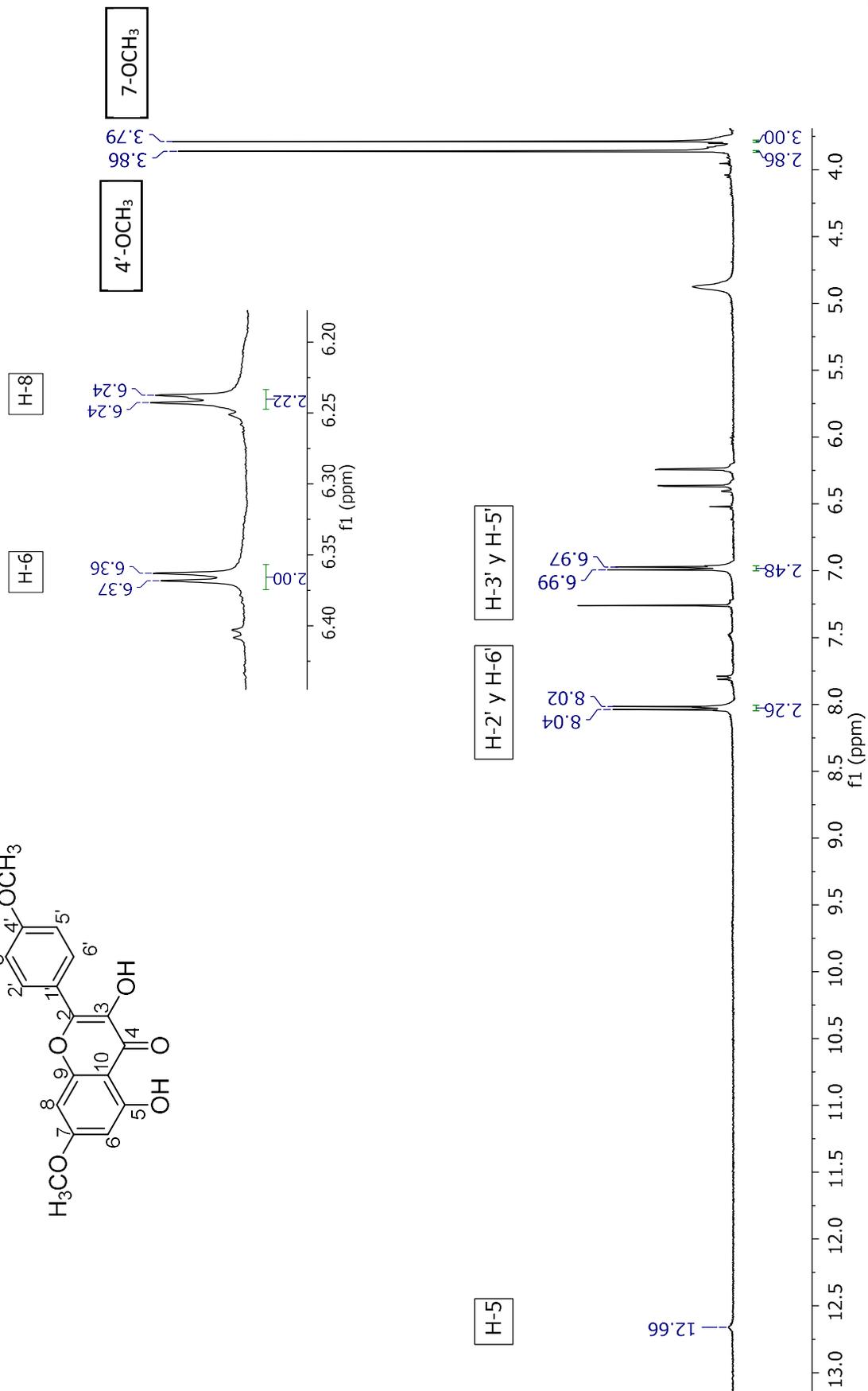
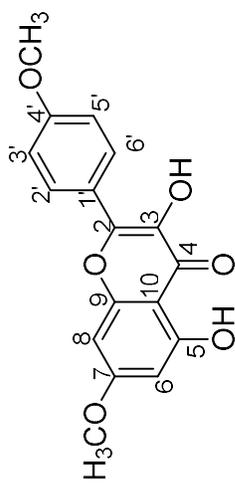
11. ANEXOS



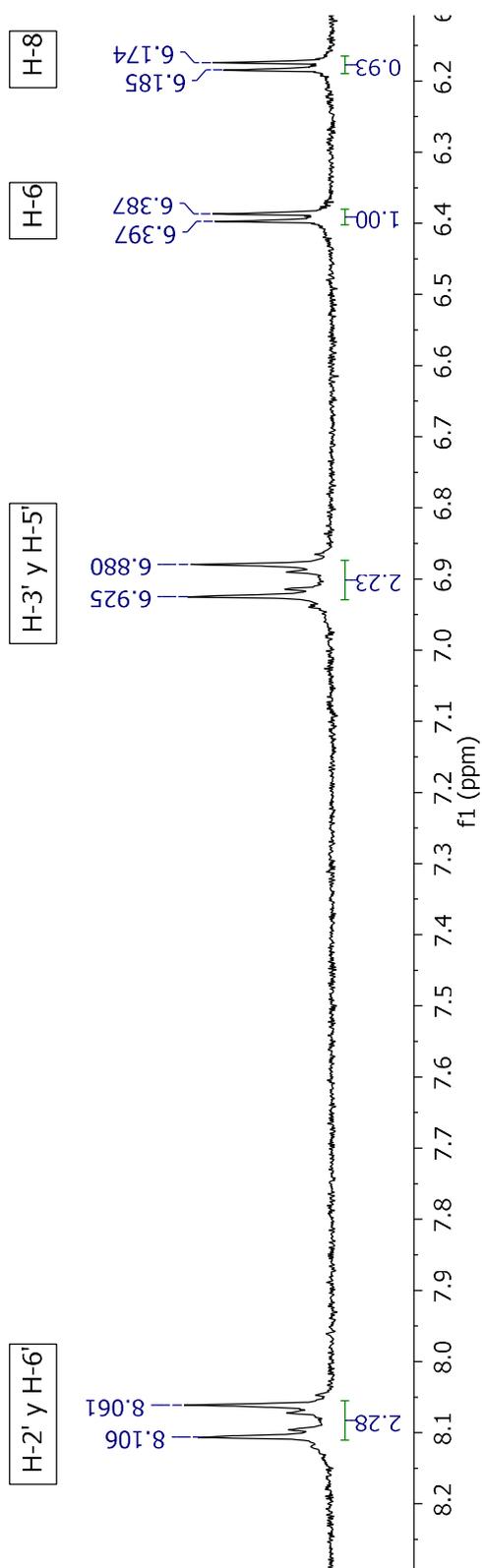
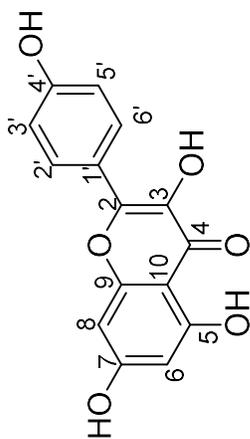
Espectro 1. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) de 3,7, 4'-trimetilkaempferol (163).



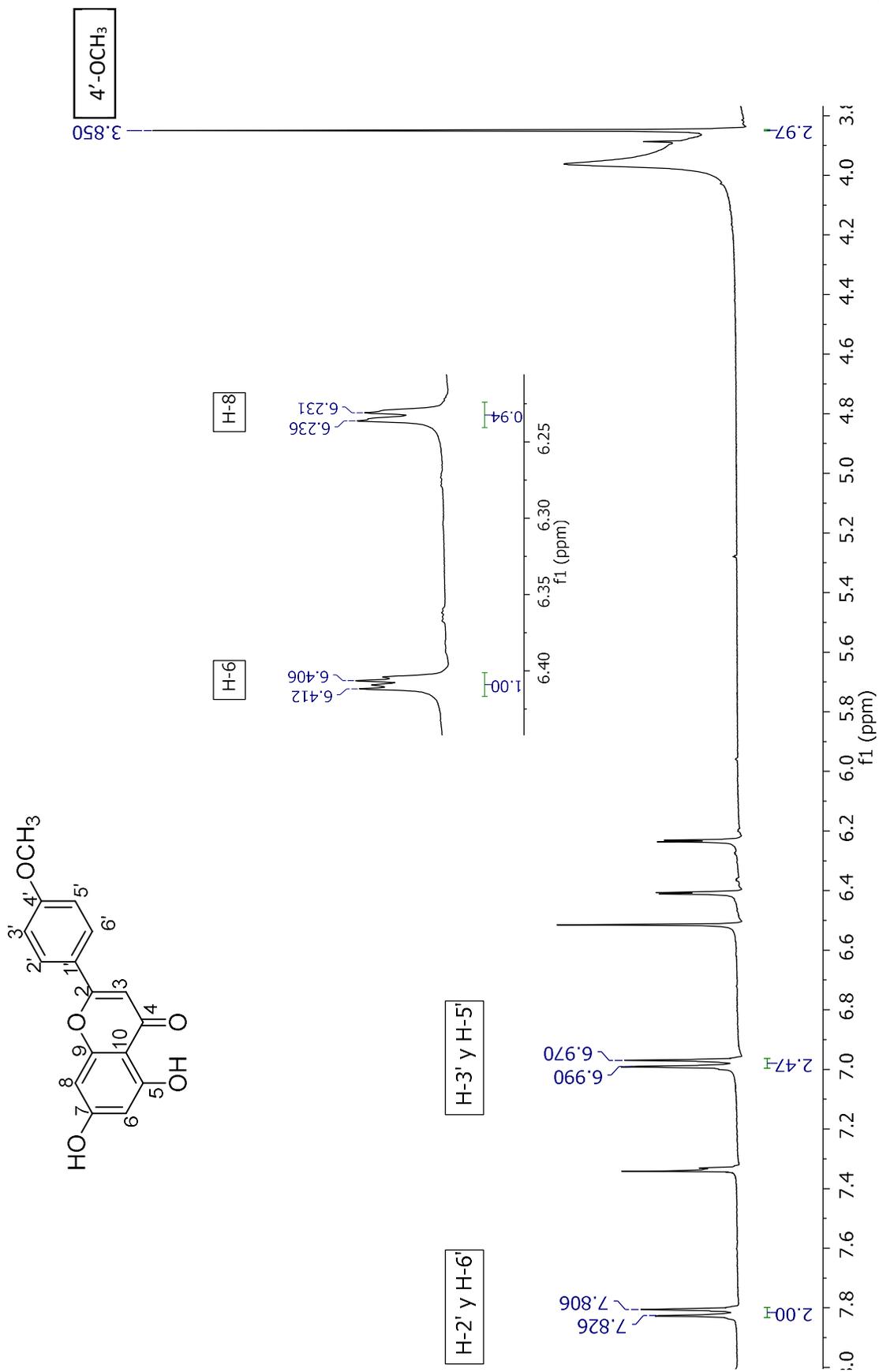
Espectro 2. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de 7, 4'-dimetilapigenina (164)



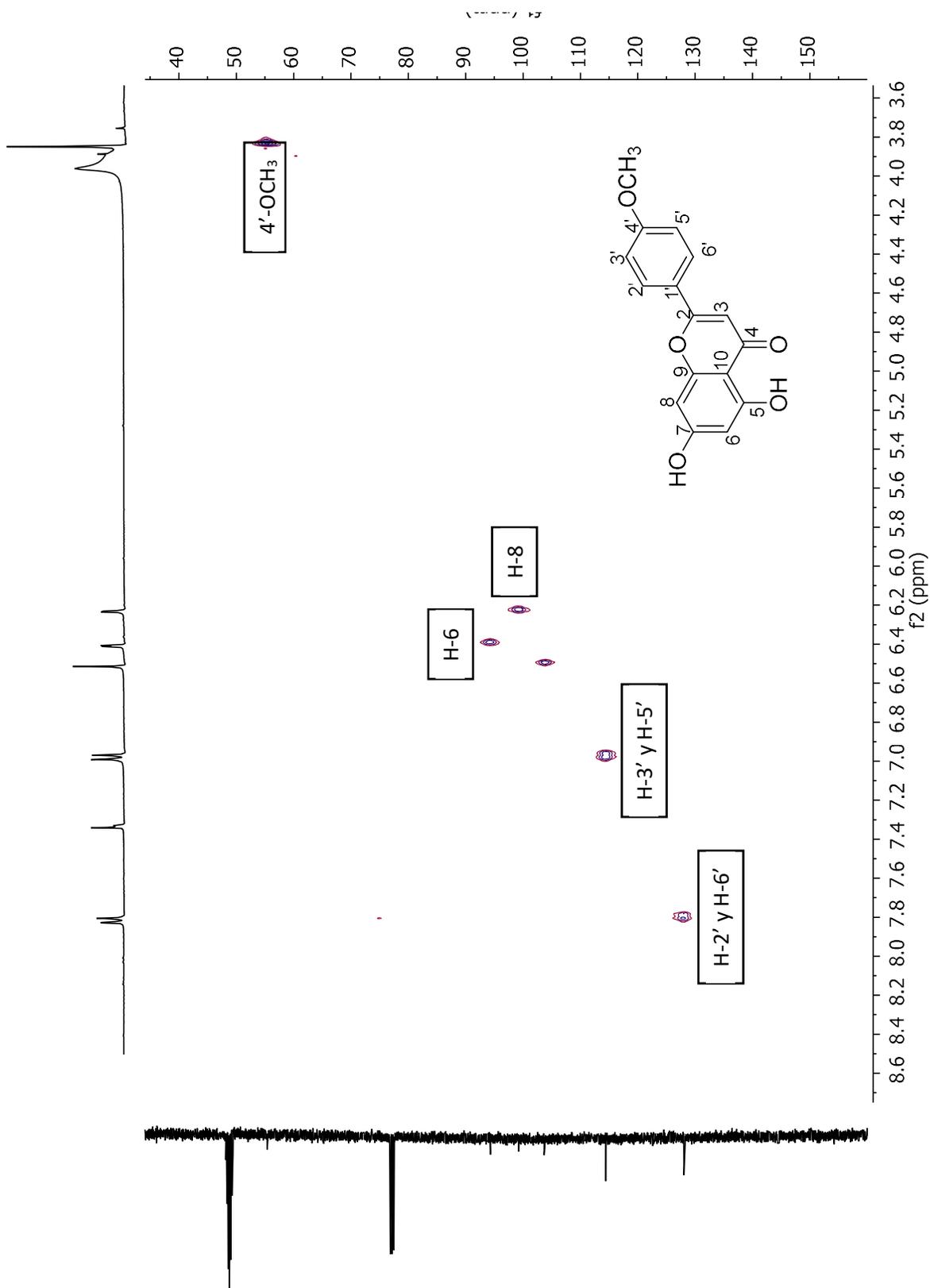
Espectro 3. ¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) de 7, 4'-dimetilkaempferol (165).



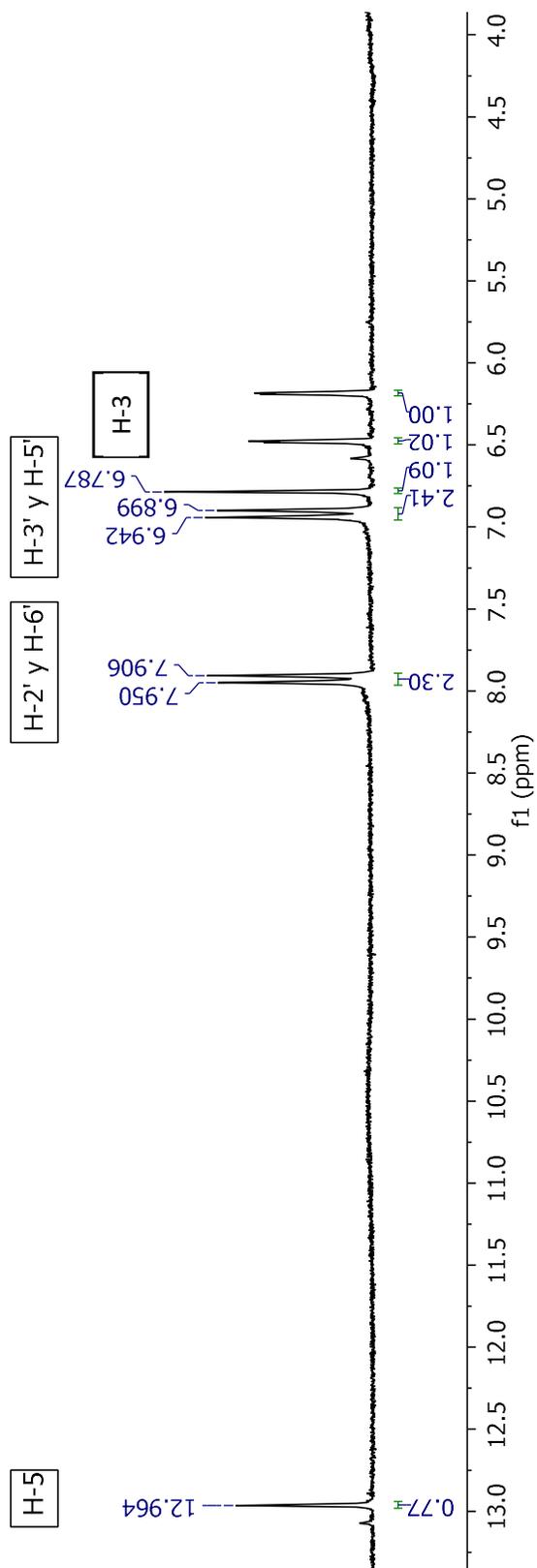
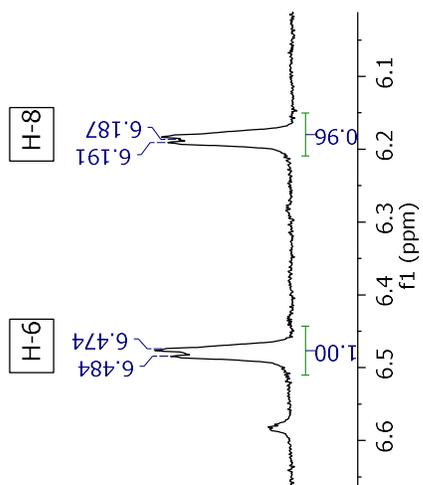
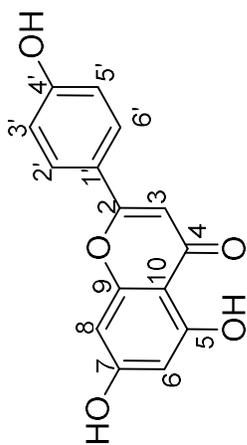
Espectro 4. RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) de kaempferol (146).



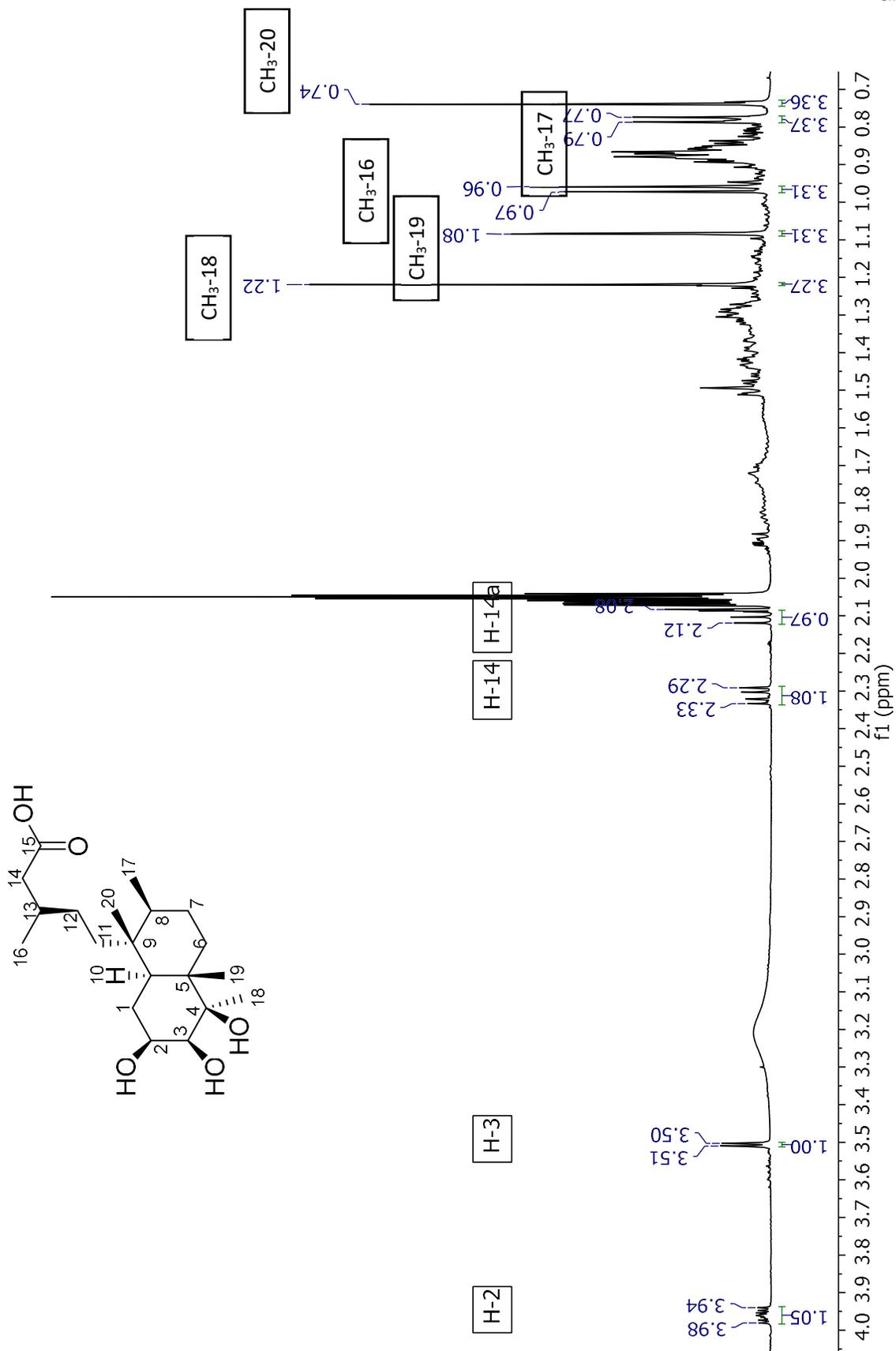
Espectro 5. RMN ¹H (400 MHz, 80:20 CDCl₃/CD₃OD) de acetina (166).



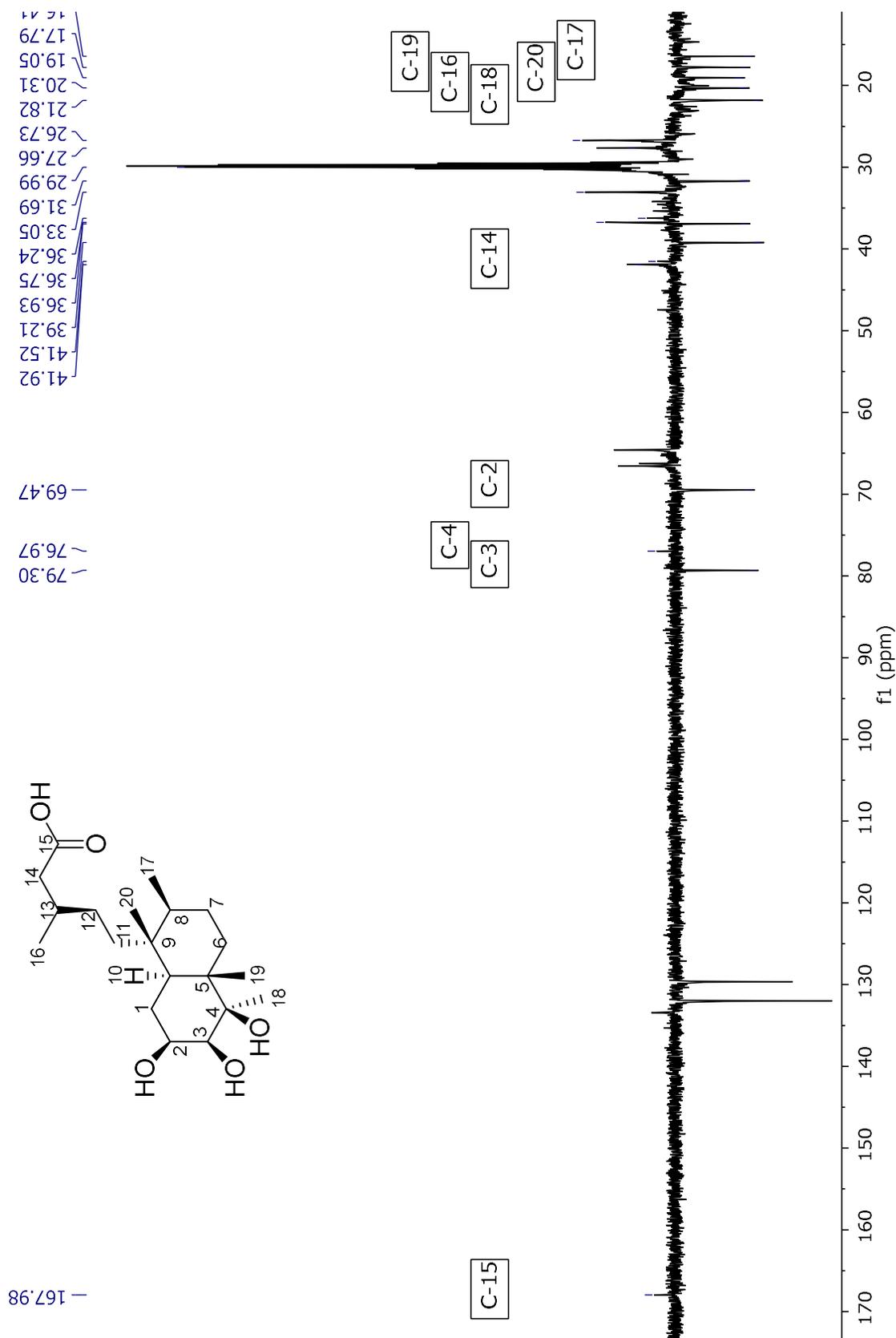
Espectro 6. HSQC (400 MHz, 80:20 CDCl₃/CD₃OD) de acetina (166)



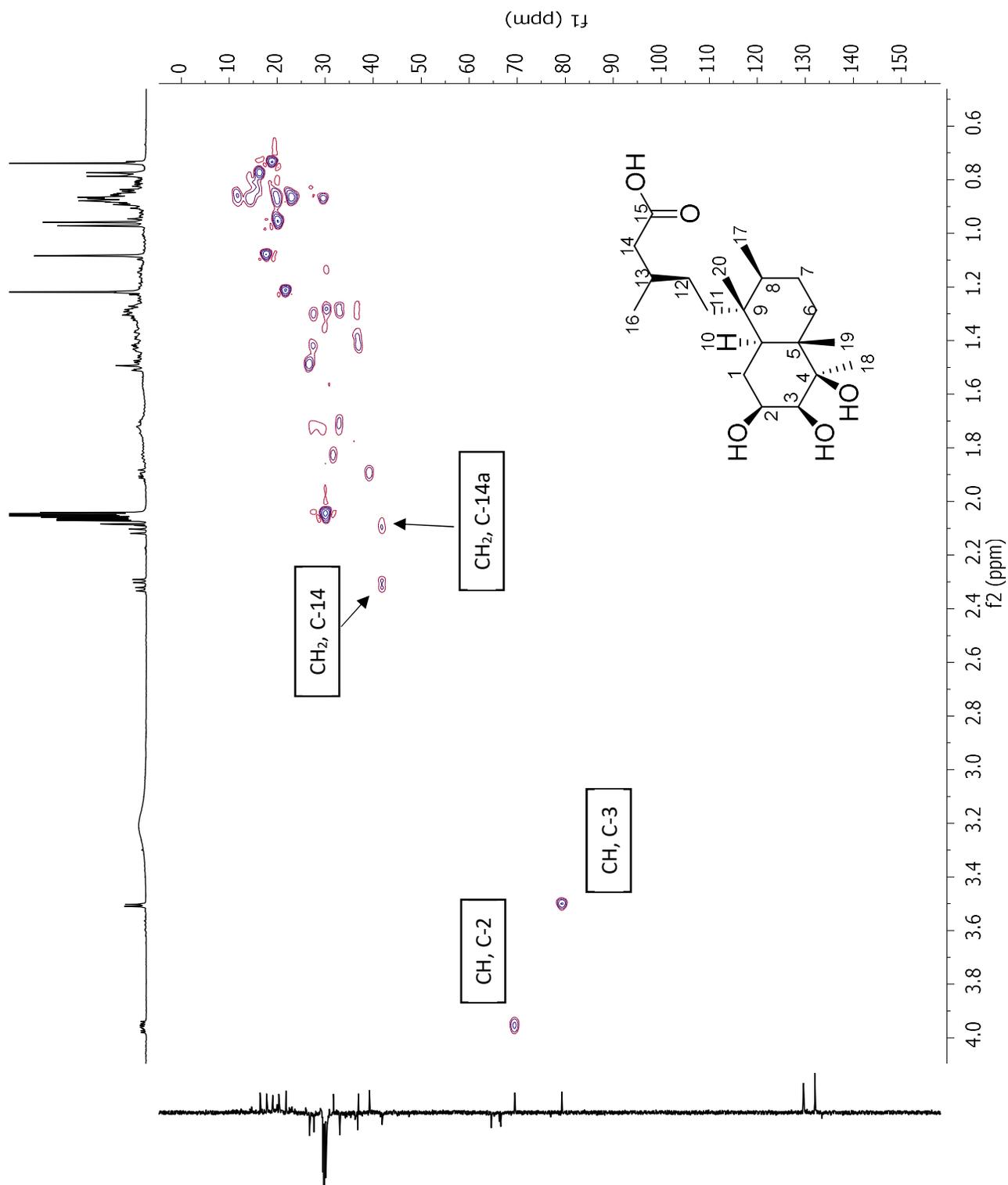
Espectro 7. RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) de apigenina (142)



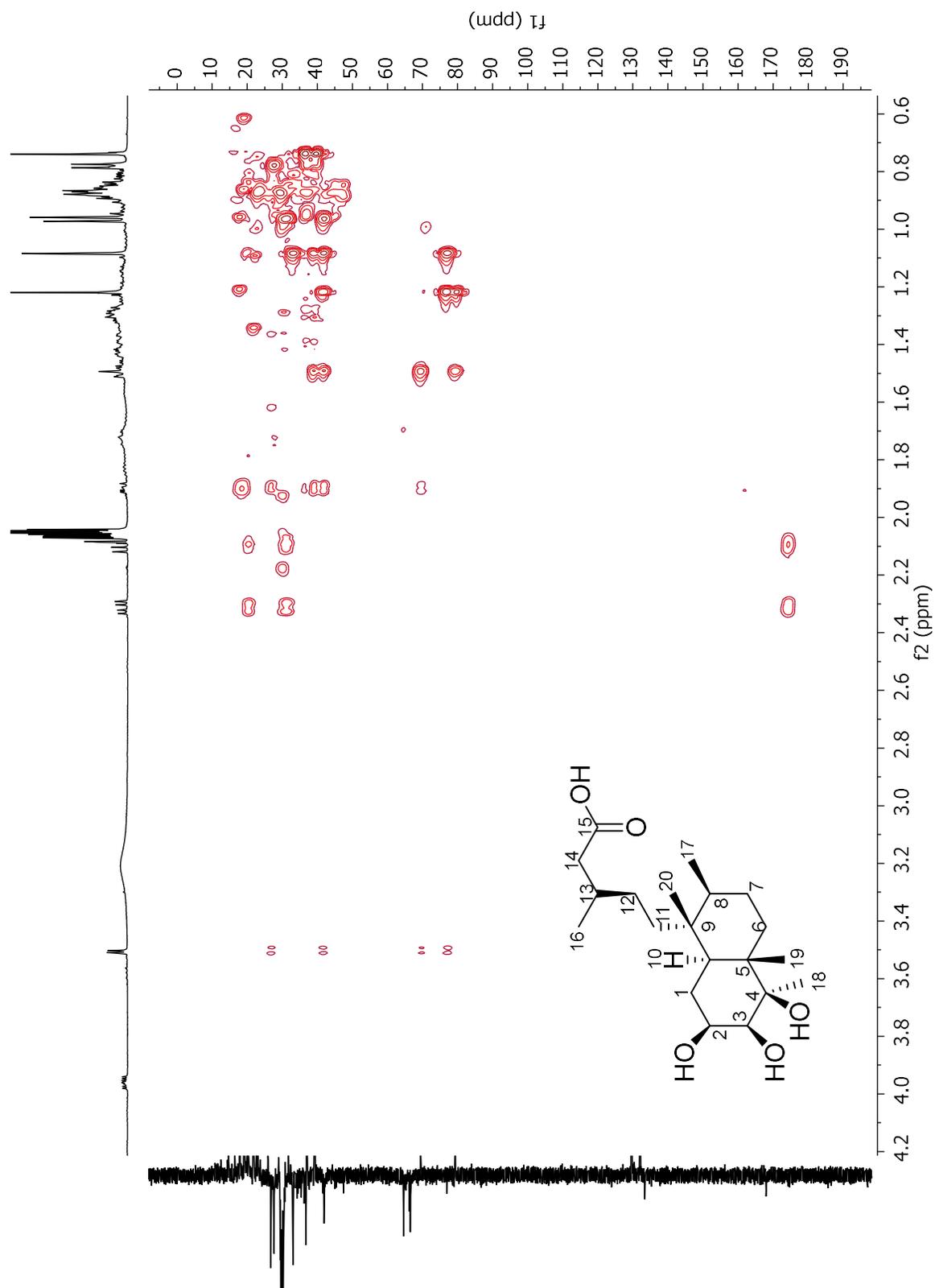
Espectro 8. ¹H RMN (500 MHz, CD₃COCD₃) del ácido dihidrotucumanoico (167).



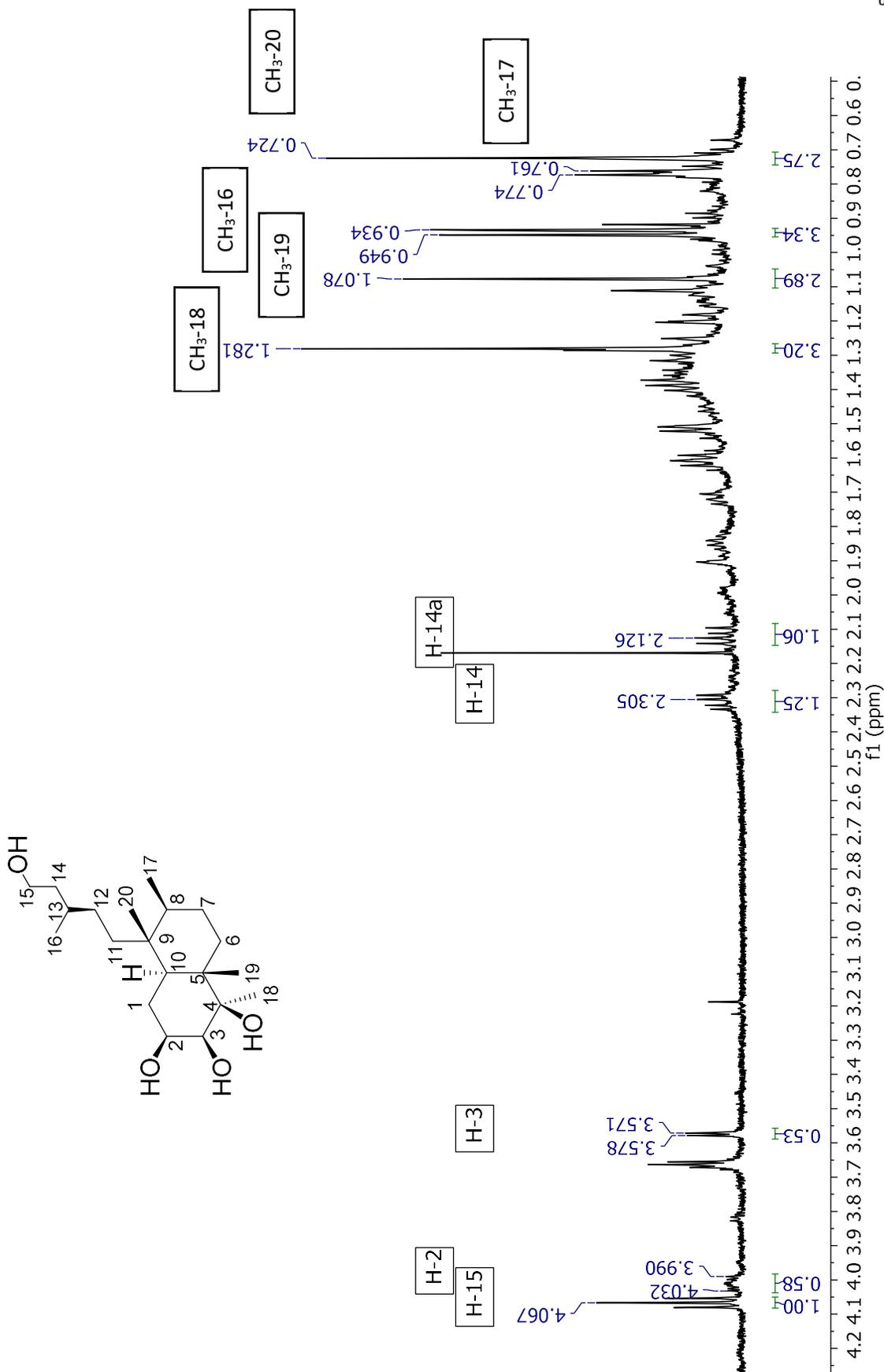
Espectro 9. Experimento DEPT (400 MHz, CD₃COCD₃) del ácido dihidrotucumanoico (167).



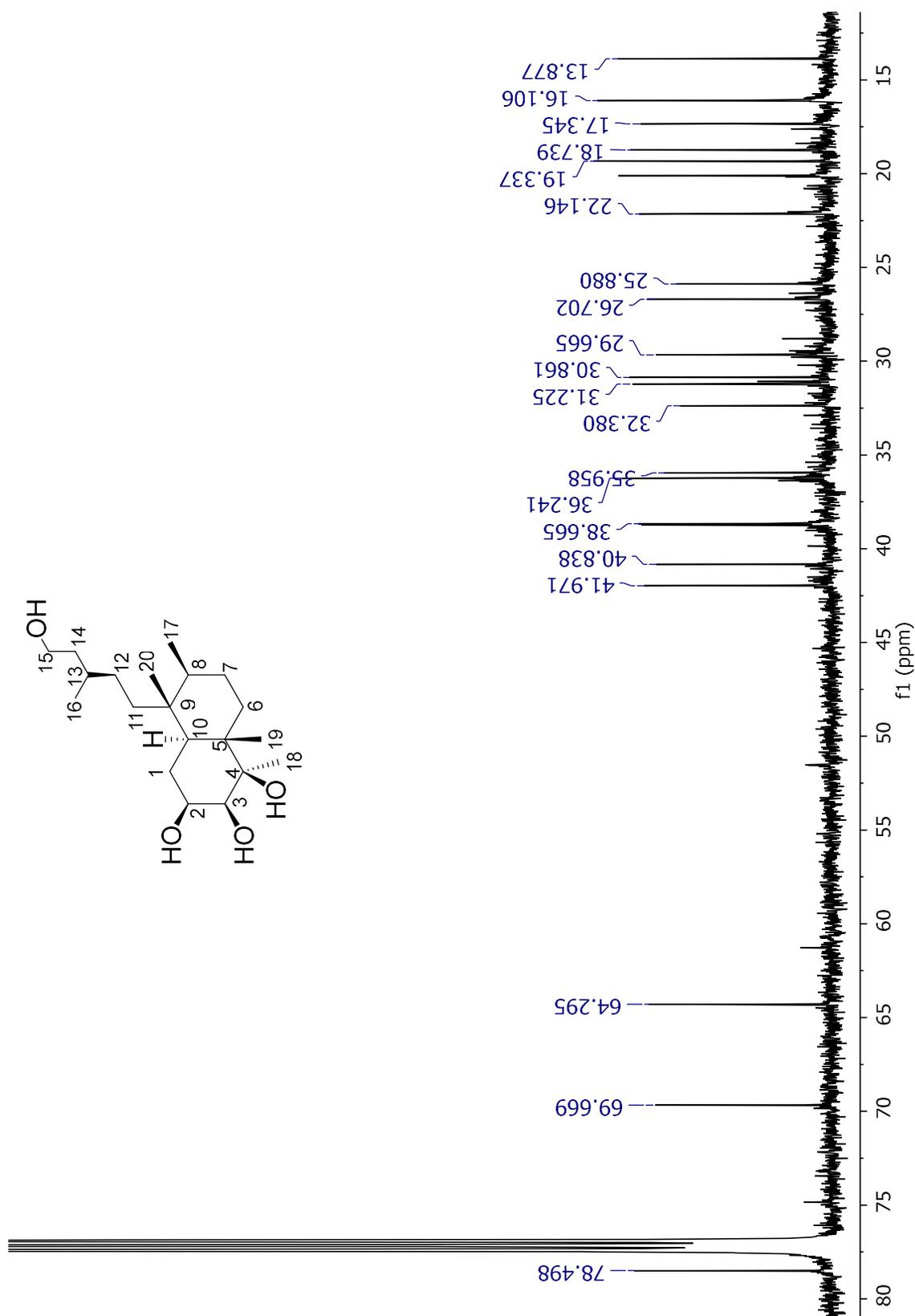
Espectro 10. HSQC (400 MHz, CD_3COCD_3) del ácido dihidrotucumanoico (167).



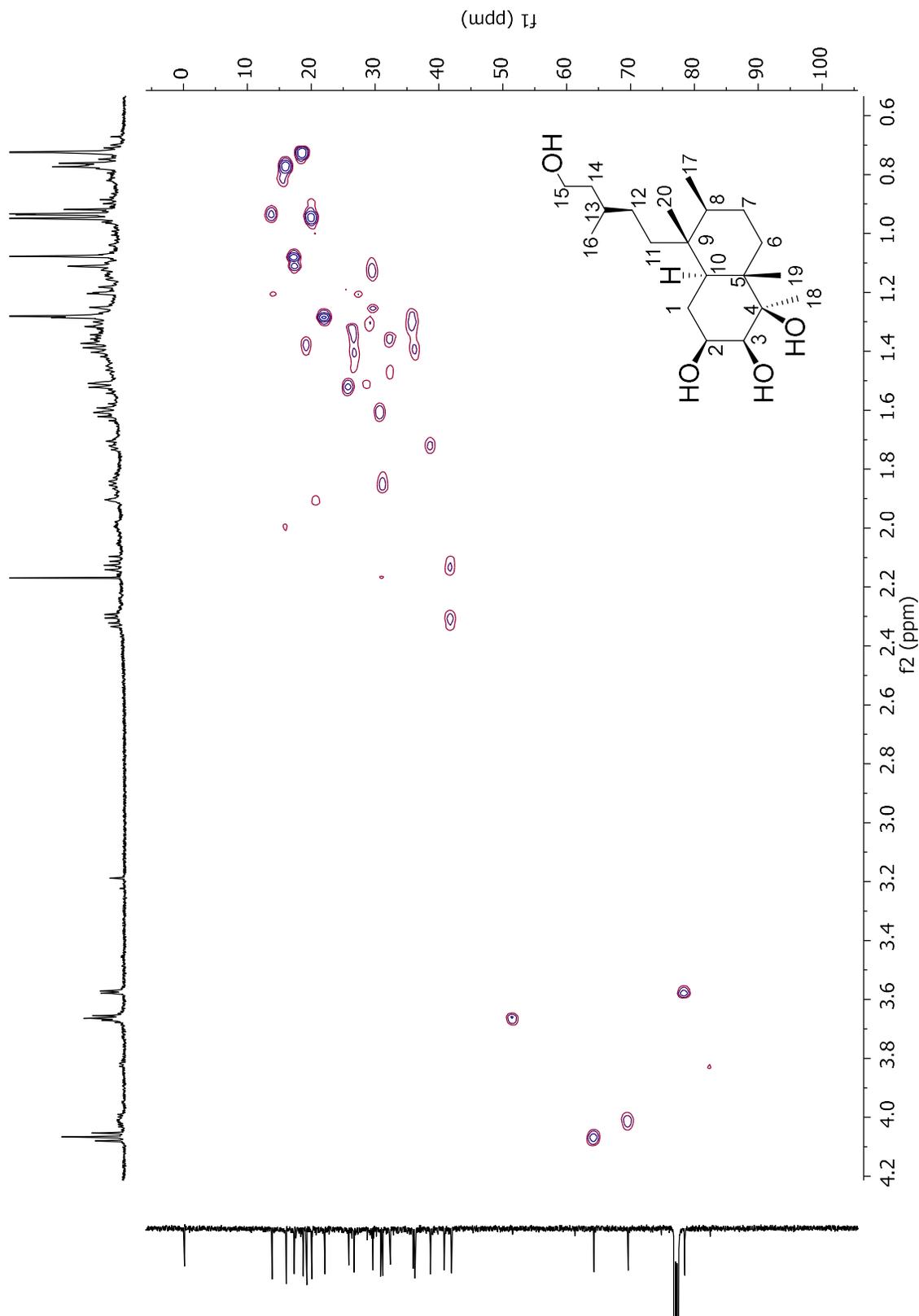
Espectro 11. HMBC (400 MHz, CD_3COCD_3) del ácido dihidrotucumanoico (**167**).



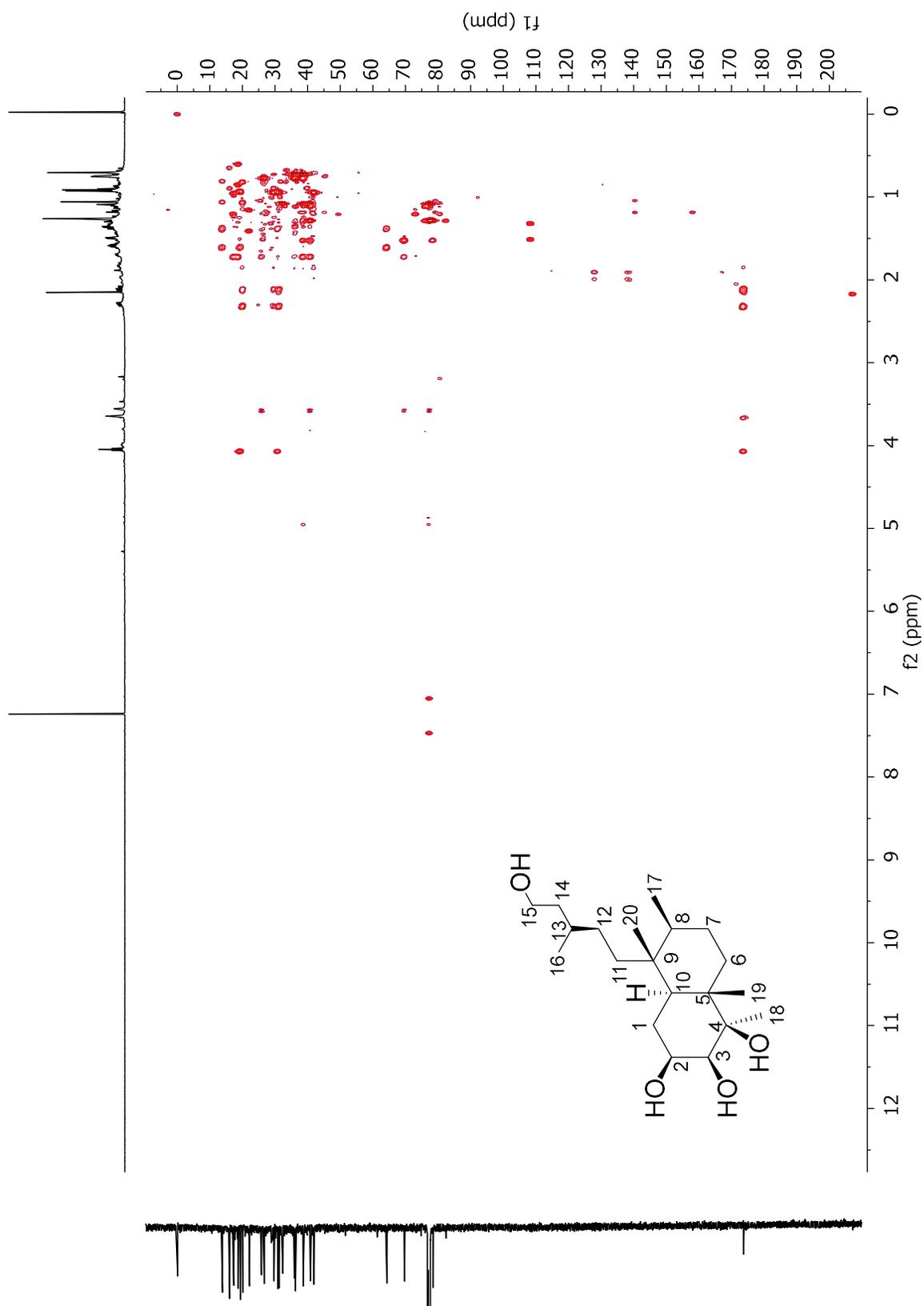
Espectro 12. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) del dihidrotucumanol (**168**).



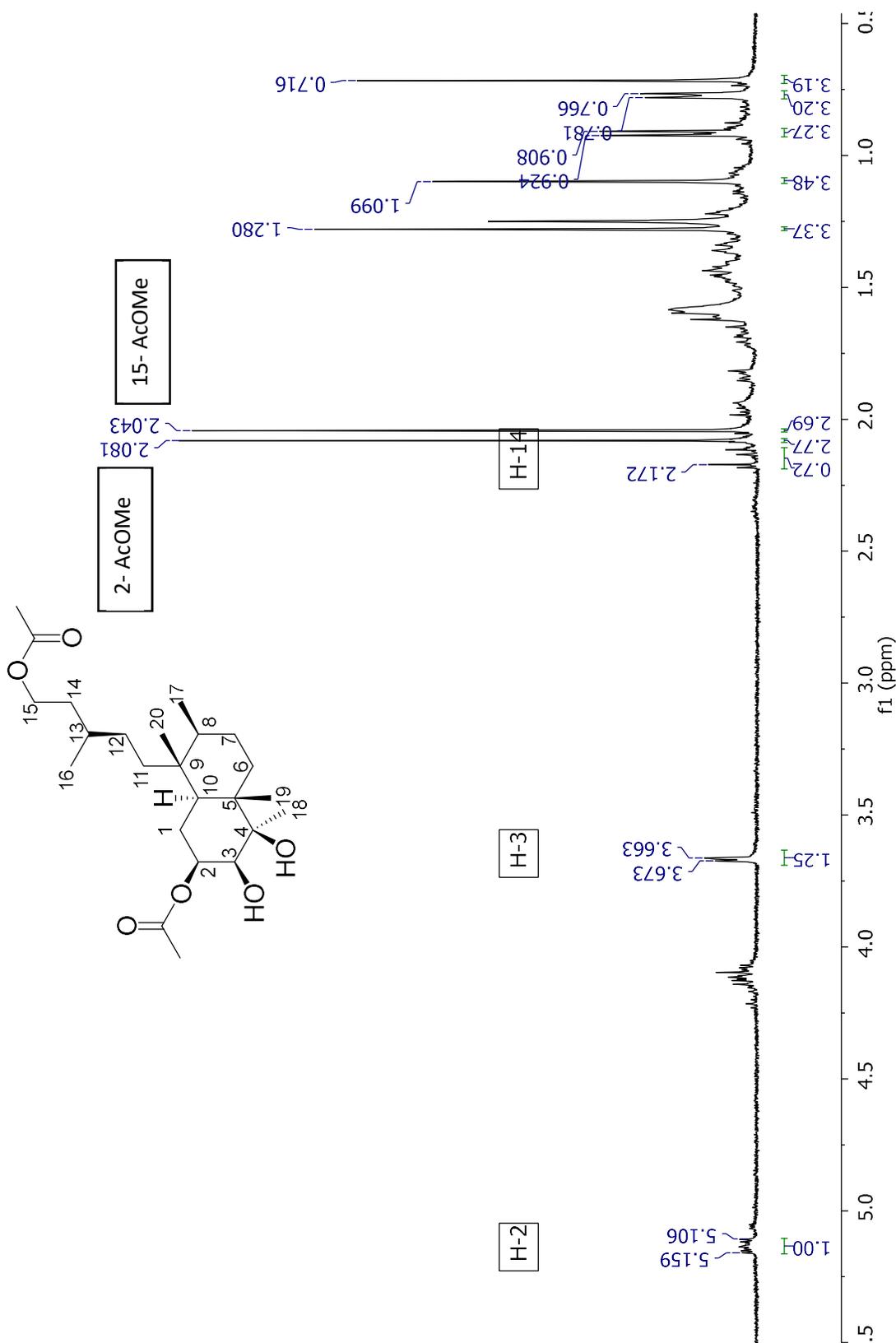
Espectro 13. ¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃) del dihidrotucumanol (168).



Espectro 14. HSQC (500 MHz, $CDCl_3$) del dihidrotucumanol (168).



Espectro 15. HMBC (500 MHz, CDCl₃) del dihidrotucumanol (**168**).



Espectro 16. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) del dihidrotucumanol (diacetilado). (169)

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA, UAEM**

Nombre del alumno: Lizet Díaz Peralta

Título de la tesis: "Evaluación antiinflamatoria *in vitro* de los metabolitos secundarios de dos variedades de *Ageratina espinosarum*"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Jesús Rivera Islas.

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):


Dr. Jesús Rivera Islas
Firma del miembro del jurado

9-mayo-2019
Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA, UAEM**

Nombre del alumno: Lizet Díaz Peralta

Título de la tesis: "Evaluación antiinflamatoria *in vitro* de los metabolitos secundarios de dos variedades de *Ageratina espinosarum*"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez.

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):


Firma del miembro del jurado

16/Mayo/2019
Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA, UAEM**

Nombre del alumno: Lizet Díaz Peralta

Título de la tesis: "Evaluación antiinflamatoria *in vitro* de los metabolitos secundarios de dos variedades de *Ageratina espinosarum*"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

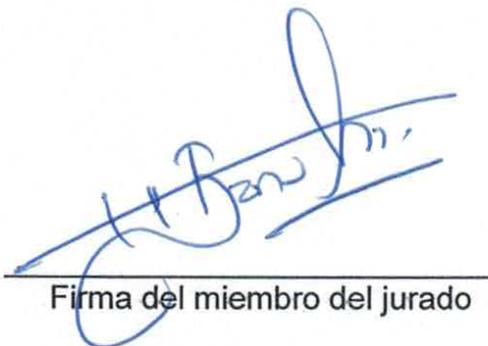
Miembro del jurado: Dr. Gérman Bernal Fernández.

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):


Firma del miembro del jurado

16/05/2019
Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA, UAEM**

Nombre del alumno: Lizet Díaz Peralta

Título de la tesis: "Evaluación antiinflamatoria *in vitro* de los metabolitos secundarios de dos variedades de *Ageratina espinosarum*"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

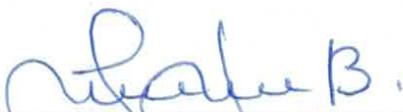
Miembro del jurado: Dra. Laura Patricia Álvarez Berber.

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):



Firma del miembro del jurado

17/Mayo/2019

Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA, UAEM**

Nombre del alumno: Lizet Díaz Peralta

Título de la tesis: "Evaluación antiinflamatoria *in vitro* de los metabolitos secundarios de dos variedades de *Ageratina espinosarum*"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra Angélica Berenice Aguilar Guadarrama.

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):



Firma del miembro del jurado

09. Mayo. 2019
Fecha