



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

“Estudio químico de *Mimosa rosei* y *Mimosa spirocarpa*, y actividad biológica de metabolitos mayoritarios”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS

Presenta:

M.C. Lirenny Quevedo Tinoco

Director de Tesis:

D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

Morelia, Michoacán. Septiembre, 2020

“Nada en este mundo debe ser temido, sólo entendido. Ahora es el momento de comprender más, para que podamos temer menos”

Marie Curie

Dedicatoria

Para mi familia, el pilar más importante de mi vida.

A Mi **mamá** por siempre apoyarme y enseñarme el mejor camino, por siempre estar ahí en todo momento y enseñarme lo que es perseverancia en la vida.

Mis hermanos **P´bell**, **Mayralin** y **Lino** mis compañeros y amigos de toda la vida, pero sobre todo mi inspiración en ser mejor cada día

A mi esposo **Lucio** por siempre apoyarme a lo largo de este viaje que se llama vida, por ese Amor incondicional, apoyo constante y motivación. Muchos logros los he compartido a tu lado, este lo dedico a ti.

A mi familia **Tinoco-Alfaro** por siempre mantener esa unidad, por su apoyo, cariño y mucho Amor.

A mi papá **Lino Quevedo** (Q.E.P.D.) y mi abuela **Olga Alfaro** (Q.E.P.D.) todos los logros y éxitos van dedicados siempre a ustedes. Gracias por enseñarme a buscar siempre la excelencia.

Agradecimientos

Dr. **Mario A. Gómez Hurtado**, por aceptarme en su grupo de trabajo, por guiarme, enseñarme y compartir su pasión por la investigación.

A mi comité sinodal: Dra. **Rosa E. del Río Torres**, Dra. **Gabriela Rodríguez García**, Dr. **J. Martín Torres Valencia**, Dr. **J. Jesús Manríquez Torres**, por su tiempo, su sugerencias y observaciones.

Las Dras. **Virginia Motilva** y **Elena Talero** profesoras de la Universidad de Sevilla, por recibirme con tanta atención durante mi estancia en su laboratorio y compartir sus conocimientos en el área de evaluación de la actividad biológica.

Mis compañeros de laboratorio del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas: **Jesy, Karen, Héctor, Toño, Kary, Donaldo, Mayra, Eli, Daniel, Ing. Héctor**, gracias por que juntos construimos una bonita familia académica; mis alumnos co-asesorados de Tesis: **Iván** y **Bulmaro** por su perseverancia para realizar su tesis. Mis amigos y colegas Dr. **Armando**, Dr. **Alejandro** y Dr. **Julio** por seguir compartiendo sus experiencias y buenos momentos. A mis compañeros del Instituto por todos los momentos compartidos en estos años.

A mis compañeros y amigos de la Universidad de Sevilla **Irene, Rocio, Manuel, Luis, Daneiva, Sara G. Sara C. Tamara, Dr. José**, por su recibirme tan amablemente y hacerme sentir en casa.

Al grupo de trabajo del Dr. **Luis Chacón** por recibirme en su laboratorio y por sus atenciones, en especial a la M.C. **Melisa Tapia**. Al personal técnico, académico y de apoyo del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH. A las profesoras **Rosa Isabel Fuentes Chávez** y **Norma Patricia Reyes Martínez** por realizar la clasificación taxonómica de las especies.

A **CONACYT** por la beca 278567 brindada para la realización del presente proyecto.

A **Dios** por permitirme tantos logros y experiencias.

ÍNDICE

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	I
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. OBJETIVOS	16
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
Obtención de extractos	17
Estudio químico de extractos de hojas de <i>M. rosei</i>	22
Estudio químico de extractos de tallos de <i>M. rosei</i>	42
Estudio químico de extractos de flores de <i>M. rosei</i>	46
Estudio químico de extractos de <i>M. spirocarpa</i>	50
Preparación de derivados de metabolitos mayoritarios aislados	50
Análisis de DCV del flavonoide 49	69
Evaluación de la actividad citotóxica	75
Actividad antioxidante	79
Actividad anti-inflamatoria	79
6. CONCLUSIONES	84

7. PARTE EXPERIMENTAL	88
Procedimientos generales	88
Material vegetal	88
Obtención de extractos	88
Obtención de derivados	93
Obtención del espectro experimental de Dicroísmo Circular Vibracional	97
Cálculos teóricos de Dicroísmo Circular Vibracional	98
Cultivos celulares	98
Ensayos citotóxicos y de selectividad	99
Actividad antioxidante con el método ABTS	100
Actividad anti-inflamatoria	100
Estudio de niveles de citocinas mediante ELISA	100
Estudio de la expresión de proteínas mediante Western blot	101
Análisis estadístico	103
8. BIBLIOGRAFÍA	104

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

δ	Desplazamiento
μM	Micromolar
[M]	Ion molecular
$[\alpha]_D$	Rotación óptica a 589 nm
μ	Micrómetro
μg	Microgramos
μL	Microlitros
Ac	Grupo acetilo
AcOEt	Acetato de etilo
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
anH	Anarmonicidad
c	Concentración
c/u	Cada uno
C+LPS	Control con estimulación de lipopolisacárido
CCD-841 CoN	Células de colon normal humano
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
C-LPS	Control sin estimulación de lipopolisacárido
cm	Centímetro
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
COSY	Correlation spectroscopy (Espectroscopia de correlación homonuclear)
d	Señal doble
DCV	Dicroísmo Circular Vibracional
dd	Señal doble de dobles
ddd	Señal doble de doble de dobles
DFT	Density Functional Theory (Teoría del funcional de la densidad)
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramos
HaCaT	Línea celular inmortalizada de queratinocitos humanos
HT-29	Línea celular inmortalizada de adenocarcinoma de colon humano
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
IL	Interleucina
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
LPS	Lipopolisacárido
m	Señal múltiple
m s.n.m.	Metros sobre nivel del mar
m/z	Relación masa/carga

MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitros
MMFF	Molecular Mechanics Force Field (mecánica molecular de campo y fuerza)
MTT	(bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
°C	Grados Celsius
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tampón fosfato salino
p.f.	Punto de fusión
pH	Potencial de iones de hidrógeno
PMA	Miristato acetato de forbol
PMNs	Polimorfonucleares
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	revoluciones por minuto
s	Señal simple
T	Temperatura
t	Señal triple
T.A.	Temperatura ambiente
THP-1	Línea celular inmortalizada de monocitos provenientes de leucemia monocítica aguda humana
TLC	Thin layer chromatography (Cromatografía en capa fina)
TMS	Tetrametilsilano
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UACC-62	Línea celular inmortalizada de melanoma maligno humano
v/v	Relación volumen/volumen

RESUMEN

El estudio químico de las partes aéreas de *M. rosei* permitió el aislamiento de crisina-7-*O*- β -D-glucósido (**45**), crisina-8-*C*- β -D-glucósido (**46**), kaempferol-7-*O*- β -D-glucósido (**47**), luteolina (**48**) y crisina-6-*C*- β -D-glucósido (**56**), así como, la mezcla de estigmasterol y β -sitosterol y sus respectivos glucósidos, lupeol y *n*-triacontanol, cuyo grupo funcional fue validado a partir de su acetato. A partir de *M. spirocarpa* fue posible aislar a los mismos metabolitos alifáticos encontrados en *M. rosei*.

La derivatización de **45** y **46** permitió la obtención de los peracetatos **49** y **50**, los carbonatos de metilo (**51**, **52**) y de etilo (**53**, **54**), respectivamente. La hidrólisis selectiva de ésteres aromáticos en glicosilflavonoides peracetilados fue ensayada de manera preliminar a partir de **49**, generando al derivado **55** en 86% de rendimiento. Adicionalmente, una estrategia para el estudio de Dicroísmo Circular Vibracional de flavonoides glucosilados fue evaluada y sugerida a partir de **49** como modelo de estudio. El potencial biológico de **45**, **46**, **49**, **50**, **53-55** fue analizado mediante estudios de viabilidad celular con células de adenocarcinoma de colon humano (HT-29) y células de melanoma maligno humano (UACC-62), así como análisis de modulación de citocinas que intervienen en procesos inflamatorios usando técnicas ELISA.

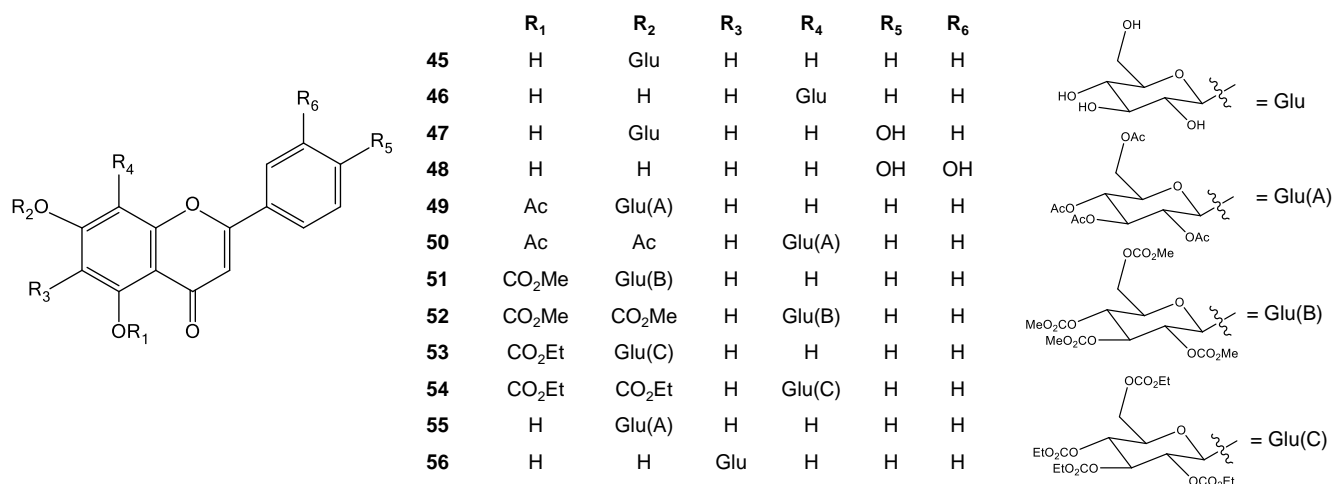
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	
45	H	Glu	H	H	H	H	
46	H	H	H	Glu	H	H	
47	H	Glu	H	H	OH	H	
48	H	H	H	H	OH	OH	
49	Ac	Glu(A)	H	H	H	H	
50	Ac	Ac	H	Glu(A)	H	H	
51	CO ₂ Me	Glu(B)	H	H	H	H	
52	CO ₂ Me	CO ₂ Me	H	Glu(B)	H	H	
53	CO ₂ Et	Glu(C)	H	H	H	H	
54	CO ₂ Et	CO ₂ Et	H	Glu(C)	H	H	
55	H	Glu(A)	H	H	H	H	
56	H	H	Glu	H	H	H	

Palabras Clave: Fabaceae, Estudio Químico, Metabolitos secundarios, Dicroísmo Circular Vibracional, Potencial Biológico.

ABSTRACT

The chemical study of the aerial parts from *M. rosei* allowed the isolation of chrysin-7-*O*- β -D-glucoside (**45**), chrysin-8-*C*- β -D-glucoside (**46**), kaempferol-7-*O*- β -D-glucoside (**47**), luteolin (**48**) and chrysin-6-*C*- β -D-glucoside (**56**), as well as, the mixture of stigmasterol and β -sitosterol, and their respective glucoside derivatives; lupeol and *n*-triacontanol, whose hydroxyl moiety was confirmed by acetylation reaction. The above-mentioned aliphatic metabolites were also isolated from *M. spirocarpa*.

Chemical derivatizations of **45** and **46** allowed to provide the respective peracetate derivatives **49** and **50**, as well as, the methyl (**51**, **52**) and the ethyl carbonate derivatives (**53**, **54**). Selective hydrolysis of aromatic esters in peracetylated glycosylflavonoids was preliminarily tested by using **49**, which yielded **55** in 86%. Additionally, a strategy for the study of Vibrational Circular Dichroism of glycosylated flavonoids was evaluated and suggested from **49** as model of study. The biological potential of **45**, **46**, **49**, **50**, **53-55** was analyzed by means of cell viability studies using human colon adenocarcinoma cells (HT-29), and human malignant melanoma cells (UACC-62), and analysis of cytokines involved in inflammatory processes was assayed by ELISA techniques.



1. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad el hombre ha aprovechado a la naturaleza para obtener compuestos que han sido utilizados con diversos fines como alimentación, textiles, pigmentos e incluso para el tratamiento de afecciones, esto debido a que las plantas son fuente de compuestos llamados metabolitos secundarios, muchos de los cuales han mostrado potenciales farmacológicos, por lo que han sido empleados como principios activos de fármacos, o modelos para la síntesis de medicamentos, incluso se ha utilizado la modificación química de los metabolitos secundarios para la obtención de moléculas más potentes o específicas. Debido a esto se continúa con el estudio de nuevas especies para conocer su quimiotaxonomía y potenciales actividades biológicas.

En México se cuenta con una amplia biodiversidad vegetal, es el quinto país con mayor número de especies y el segundo país que más utiliza las plantas en la medicina tradicional, además de que se cuenta con un alto índice de endemismo. Un ecosistema que se caracteriza por la alta concentración de especies endémicas es la selva baja caducifolia, la cual se localiza desde el sur de Sonora y el suroeste de Chihuahua hasta Chiapas. Dentro de las Familias vegetales más abundantes en este ecosistema se encuentra la Fabaceae, de la cual se desprende el género *Mimosa*, cuyas especies son importantes en la medicina tradicional, por lo que en el presente proyecto se llevó a cabo el estudio químico y biológico de *Mimosa rosei* y *M. spirocarpa*, colectadas en La Huacana, Michoacán.

Dicho estudio permitió el aislamiento de esteroides y flavonoides glucosilados como componentes mayoritarios. Los compuestos aislados fueron caracterizados mediante sus datos físicos y espectroscópicos. Una estrategia de estudio de Dicroísmo Circular Vibracional de flavonoides glucosilados fue posible establecer en este trabajo, así como el potencial anticanceroso y anti-inflamatorio tanto de flavonoides naturales, como de derivados de estos.

2. ANTECEDENTES

A nivel mundial, 71% de las muertes anuales son causadas por enfermedades no transmisibles que generalmente son crónicas, los cuatro tipos principales son las cardiovasculares, respiratorias crónicas, la diabetes y el cáncer, las cuales en conjunto causan aproximadamente 38 millones de defunciones al año (Organización Mundial de la Salud, 2018). Se estima que cada año más de 18.1 millones de personas en el mundo reciben el diagnóstico de cáncer y cerca de 9.6 millones fallecen directa o indirectamente debido a una neoplasia maligna (Ferlay, 2019). Este padecimiento no hace distinción de razas, nivel socioeconómico o sexo, aunque se observa una diferencia en los tipos de cáncer que afectan a hombres y mujeres. La Organización Mundial de la Salud (OMS) identificó que a nivel mundial, en 2015, los tumores malignos de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado fueron los más comunes entre los varones, mientras que en las mujeres fueron los de mama, colorrectal, pulmón, cuello del útero y estómago. En México en el año 2014, la incidencia de cáncer entre la población de 20 años y más concurren en 2/10 casos de cáncer en varones fueron por tumor maligno en órganos digestivos, y 3/10 mujeres con cáncer padecieron de tumor maligno de mama, siendo las principales neoplasias malignas para cada sexo en la población adulta del país (INEGI, 2017).

El cáncer o neoplasia es una enfermedad que presenta un crecimiento celular indiscriminado, autónomo y con capacidad de metástasis. Existen cerca de 200 tipos de cáncer y esta enfermedad se encuentra entre las causas de mayor mortalidad cuya incidencia ha aumentado en los últimos 50 años (Benedí, 2006). Se ha relacionado a la inflamación crónica como un factor de riesgo importante para desencadenar el cáncer, además de asma, artritis, enfermedades cardiovasculares, por mencionar algunas (Serhan, 2008). Actualmente, se sabe que la inflamación se inicia como una respuesta protectora frente a un patógeno o daño en un tejido, este proceso se caracteriza por la dilatación de los vasos sanguíneos de la zona, aumento de la permeabilidad de los capilares, incremento del flujo sanguíneo y reclutamiento de leucocitos (Savill, 2002). El proceso inflamatorio puede eliminarse mediante el catabolismo de los mediadores pro-inflamatorios, pero esta es sólo una fase del proceso de resolución de la inflamación a nivel tisular, ya que si los polimorfonucleares (PMNs), células típicas en una inflamación, no se controlan, pueden causar graves daños en el sitio de la inflamación (Serhan,

2007). Si la inflamación no tiene una resolución hacia la homeostasis puede conllevar a la destrucción mediada por neutrófilos y una inflamación crónica.

Existen diversos tratamientos para combatir las enfermedades crónico-degenerativas, pero debido a la baja selectividad y a los efectos secundarios producidos, se buscan nuevas alternativas de compuestos con potencial actividad biológica. La naturaleza ofrece una oportunidad para el descubrimiento de compuestos con diversas actividades denominados metabolitos secundarios (Simmonds, 2003), la posibilidad de encontrar sustancias químicas con potenciales efectos biológicos a partir de fuentes naturales es alta, debido a la gran biodiversidad de plantas que existe (Barreiro, 2019). Se sabe que algunos productos naturales son de los agentes anticancerosos más importantes; más del 30% de los nuevos candidatos pre-aprobados son productos naturales o derivados de estos (Newman, 2016).

- **Metabolitos secundarios de Plantas**

La medicina tradicional ha sido reconocida como un recurso fundamental para la salud de los seres humanos, siendo las plantas medicinales las protagonistas de los tratamientos. Se estima que el 80% de los habitantes de países en desarrollo dependen de la medicina tradicional, por lo que ha renacido en todo el mundo el interés por el uso de esta (Farnsworth, 1991). Las plantas son una fuente de importantes metabolitos de interés para los seres humanos. En adición a los nutrientes básicos que nos brindan, como las proteínas, grasas y carbohidratos, también son una fuente de compuestos conocidos como metabolitos secundarios (Vasconsuelos, 2007), los cuales son de bajo peso molecular, difieren de los metabolitos primarios por su distribución restringida en el reino vegetal, es decir, que se puede encontrar un metabolito secundario determinado solo en una especie vegetal o grupo de especies relacionadas, mientras que los primarios se encuentran en todo el reino vegetal (Taiz, 2006). Tienen importancia ecológica por su participación en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, que incluye la simbiosis con otros organismos, la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y como protección (Sepúlveda, 2004). Algunas funciones que se les atribuyen a estos son: como reserva de energía, precursores de compuestos orgánicos e incluso como fuentes de nitrógeno (Seigler, 1995). También se les ha atribuido funciones como protectores de las plantas ante el ataque de depredadores y

fitopatógenos, así como atrayentes de la polinización (Taiz, 2006). Para su estudio pueden dividirse en tres grandes grupos: terpenos, compuestos nitrogenados y polifenoles.

Terpenos. Comprenden una amplia y diversa familia de productos que derivan de bloques de construcción de cinco átomos de carbono (Figura 2.1), dependiendo de la cantidad de bloques de construcción pueden clasificarse en hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}) y tetraterpenos (C_{40}). Los terpenos pueden derivar de la ruta del ácido mevalónico o de la ruta del metil eritritol fosfato (Dewick, 2009). Dentro de las funciones que desempeñan en la planta se encuentran: como aceites esenciales que repelen depredadores herbívoros e insectos (Cseke, 2006) u hormonas de polinización (Marcano, 2002).

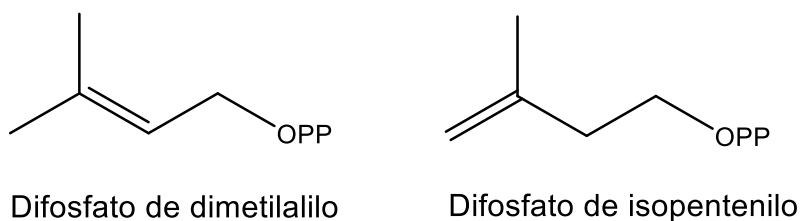


Figura 2.1. Estructuras químicas de los bloques de construcción de los terpenos.

Compuestos Nitrogenados. En este grupo se incluyen los alcaloides y los glicósidos cianogénicos, los cuales son de interés debido a las propiedades farmacológicas que presentan. Estos metabolitos nitrogenados se biosintetizan a partir de aminoácidos (Taiz, 2006). Los alcaloides son compuestos que contienen uno o más nitrógenos heterocíclicos. En las plantas tienen funciones como agentes antihervíboros o como reguladores de crecimiento. Las personas los han empleado como veneno, narcóticos, estimulantes y medicinas por varios miles de años (Cseke, 2006). Generalmente, los alcaloides se clasifican de acuerdo a la naturaleza de la estructura que contiene al nitrógeno (Figura 2.2) en pirrolidinas, piperidina, quinolinas, isoquinolinas, indólicos, entre otros (Dewick, 2009).

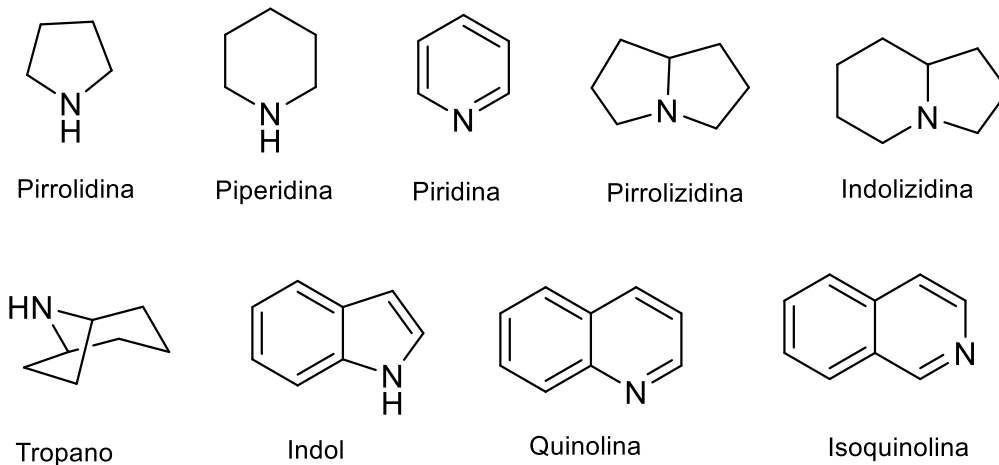


Figura 2.2. Tipos de alcaloides en base a su estructura química.

Polifenoles. Son biosintetizados en diferentes rutas por lo que se consideran heterogéneos desde el punto de vista metabólico. Las rutas implicadas son: la ruta del ácido shikímico y de la acetil coenzima A (Taiz, 2006). De este grupo de compuesto se derivan los flavonoides, que corresponden a esqueletos provenientes de ambas rutas. Sus funciones incluyen proporcionar el color a las flores, lo que está relacionado con la polinización, dan protección contra la radiación UV y fitopatógenos, son señalizadores durante la nodulación y transportadores de auxinas (Harborne, 1999). Las estructuras químicas de estos compuestos constan de dos anillos de benceno unidos entre sí por una unidad propanoide (Chalconas) que pueden cerrarse y formar una estructura de tipo benzopirano (Cseke, 2006) (Figura 2.3).

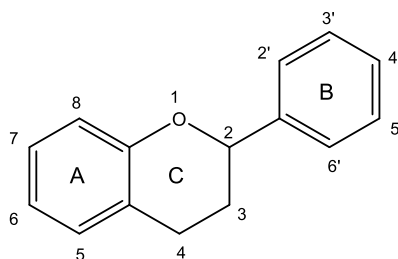


Figura 2.3. Esqueleto de flavonoide y numeración de los anillos.

Los flavonoides a su vez pueden dividirse en 6 grupos: chalconas, flavonas, flavonoles, flavandioles, antocianidinas, catequinas y taninos condensados. También se pueden encontrar flavanonas e isoflavonoides (Figura 2.4) (Falcone, 2012), además de neoflavonas y pterocarpanos (Harborne, 1999).

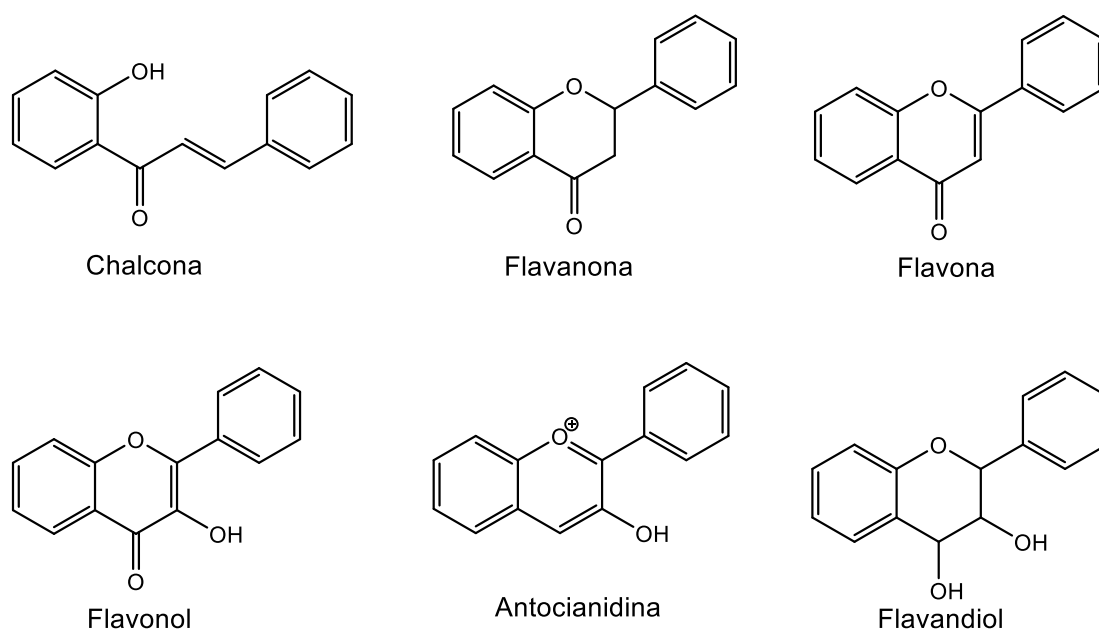


Figura 2.4. Estructuras base de algunos tipos de flavonoides encontrados en las plantas.

Los flavonoides pueden estar conjugados con azúcares ya sea mediante enlaces C-C (C-glicósidos) o C-O (O-glicósidos), siendo estos últimos los más abundantes. Los azúcares más comunes que forman estos compuestos son: glucosa, arabinosa, galactosa, ramnosa y xilosa (Marcano, 2002).

Metabolitos secundarios extraídos de diversas fuentes naturales han sido empleados por el hombre como cosméticos, pigmentos, saborizantes, insecticidas y como fármacos (Vasconsuelos, 2007). El uso de estos compuestos o de sus derivados como fármacos, ha ido en aumento en las últimas décadas, ya que actualmente el 23.5% de los medicamentos aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) son de origen natural (Newman, 2020).

Se conoce que la mayoría de los compuestos aislados de plantas presentan algún tipo de aplicación benéfica para el hombre; además, se ha explorado en la preparación de derivados a partir de productos naturales con la finalidad de obtener nuevas moléculas con potencial actividad biológica. Como ejemplo, se tiene que los derivados del taxol han demostrado mejor actividad anticancerosa o ser más selectivos para ciertas líneas celulares; la preparación de benzoatos en el carbono-2 del taxol condujo a la obtención de moléculas más potentes contra líneas celulares de melanoma B16 (Kingston, 2002), los derivados metil y etil carbonato del paclitaxel mostraron mayor actividad contra líneas celulares HCT-116 (Chen, 1995). De la misma manera el derivado cabazitaxel, mostró ser eficaz en el tratamiento contra cáncer de próstata (Paller, 2011). Debido a esto surge el interés por el estudio de nuevas especies vegetales en la búsqueda de moléculas con potenciales aplicaciones biológicas.

- **Biodiversidad vegetal en México**

En México existe una extensa variedad de tratamientos fitoterapéuticos (Martínez, 1996), además, es uno de los países de mayor riqueza florística, ocupa el quinto lugar mundial en cuanto a variedad de especies de plantas; en su territorio crecen unas 30,000 especies vegetales, que representan alrededor del 10% de la flora del mundo (Villaseñor, 2003). Del total de las especies vegetales que crecen en el País, solo se tiene registro del uso y manejo tradicional de unas 5,000 especies vegetales (Toledo, 1995). Esta diversidad vegetal está relacionada a la gran variedad de climas y ecosistemas, lo que se traduce a su vez en riqueza de metabolitos secundarios; un ecosistema importante es la selva baja caducifolia llamada también bosque tropical deciduo, selva baja decidua o selva subhúmeda (CONABIO), son regiones de clima cálido y dominados por especies arborescentes que pierden sus hojas en la época seca del año durante un lapso variable, pero que por lo general oscila alrededor de seis meses. En cuanto a su distribución geográfica en nuestro país, es particularmente característica de la vertiente pacífica de México, donde cubre grandes extensiones desde el sur de Sonora y el suroeste de Chihuahua hasta Chiapas y se continúa a Centroamérica (Figura 2.5). En cuanto a la altitud, se desarrolla en México entre 0 y 1900 m s.n.m. más frecuentemente por debajo de los 1500 m. Entre los declives del Golfo de México (exceptuando la depresión en Chiapas) no se le ha observado por arriba de 800 m s.n.m. (Museo de las Ciencias Biológicas Iztacala, 2018).

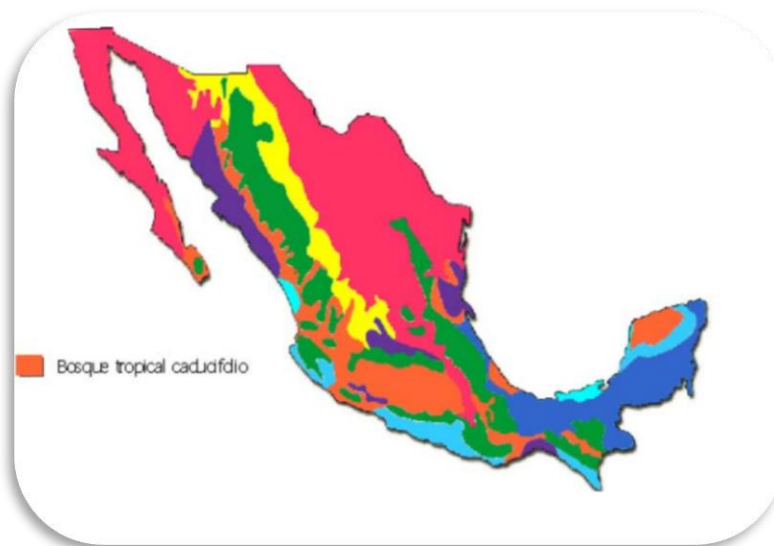


Figura 2.5. Distribución del Bosque tropical caducifolio o selva baja caducifolia en México.

Los rangos de temperatura que presenta este ecosistema van desde una temperatura mínima extrema de 0 °C en los días más fríos, hasta un promedio 20 a 29 °C. La precipitación varía entre los 300 y 1,200 mm (1,800 como máximo) de lluvia con 5 a 8 meses secos entre diciembre y mayo. En las selvas secas viven alrededor de 6,000 especies de plantas; casi el 40% de sus especies son endémicas y están adaptadas a la sequía. Entre las especies que la habitan hay una gran variedad de copales y también se pueden encontrar una amplia diversidad de especies de fabáceas (CONABIO).

Entre los Estados más ricos en biodiversidad se encuentra Michoacán, ocupa el quinto lugar en riqueza florística albergando 4,672 especies nativas, de las cuales predominan aquellas de la familia Asteraceae y Fabaceae (Heinrich, 1998). Las leguminosas o fabáceas son consideradas, después de las asteráceas y las orquidáceas, el grupo más diversificado entre las plantas con flor, reconociéndose en la actualidad cerca de 650 géneros y 18,000 especies (Dhillion, 2004), se caracterizan por su fruto en forma de vaina y sus hojas compuestas y estipuladas (Judd, 2002). Están presentes en todos los hábitats, en zonas áridas y semiáridas, en áreas templadas y frías, pero son más numerosas en las zonas tropicales; gran parte de su diversidad se concentra en áreas de topografía variada y con climas de estaciones marcadas. Esta familia se constituye por tres subfamilias que presentan distribución cosmopolita

(Fabaceae, Caesalpiniaceae y Mimosaceae) (Camargo, 2000) y casi un tercio de las especies están contenidas en seis géneros: *Acacia*, *Astragalus*, *Cassia*, *Crotalaria*, *Indigofera* y *Mimosa* (Grether, 1996). Poseen una gama variada de formas vegetales, incluyendo enredaderas, herbáceas, arbustos y árboles. Particularmente, la familia de las fabáceas ocupa un lugar importante como fuente de recursos vegetales que el hombre ha usado en su desarrollo, como alimento, forraje, medicina, perfumería, madera, entre otros (Rzedowski, 2005).

Mimosa es un género que pertenece a la familia Fabaceae, subfamilia Mimosoideae (Sosa, 1994). El 90% de sus especies se distribuyen desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina, el resto se encuentran en África, Asia y Australia. En México, *Mimosa* es el género más representativo de la subfamilia Mimosoideae, con 110 especies de las cuales el 60% son endémicas, lo que coloca a nuestro país como el segundo centro de distribución del género, después de Brasil (Grether, 1988).

En nuestro país, las mimosas presentan diversas formas biológicas, predominando los arbustos y árboles, otras se desarrollan como herbáceas, bejucos o trepadoras (Figura 2.6). La mayoría crecen en regiones tropicales, áridas o semiáridas. Sus usos como cerca viva, combustible (leña/carbón), alimento, forraje para ganado, material para construcción, medicinal, melífera, ornamental, peletería debido a su alto contenido de taninos y como implemento agrícola son descritos (Tabla 2.1) (Camargo, 2001).



Figura 2.6. Especies del género *Mimosa* que cuentan con estudios químicos y biológicos.

Tabla 2.1. Especies de *Mimosa* y sus usos en México.

Especie	Usos*								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>M. acantholoba</i>	X	X		X					
<i>M. aculeaticarpa</i>	X			X					
<i>M. affinis</i>						X			
<i>M. albida</i>				X		X		X	
<i>M. arenosa</i>	X	X							
<i>M. bahamensis</i>	X	X			X	X	X		
<i>M. benthamii</i>					X		X		
<i>M. biuncifera</i>	X	X		X	X				X
<i>M. calcícola</i>		X		X					
<i>M. depauperata</i>		X		X					
<i>M. diplotricha</i>						X			
<i>M. distachya</i>	X	X		X		X			
<i>M. egregia</i>		X							
<i>M. galeottii</i>					X				
<i>M. guatemalensis</i>	X								
<i>M. lacerata</i>		X		X		X			
<i>M. leucaenoides</i>									
<i>M. Luisana</i>	X	X		X	X				
<i>M. malacophylla</i>				X		X			
<i>M. mollis</i>				X				X	
<i>M. monancistra</i>		X		X	X				
<i>M. palmeri</i>						X			
<i>M. pigra</i>		X				X	X		
<i>M. platycrapa</i>	X					X			
<i>M. polyantha</i>	X	X		X					
<i>M. púdica</i>						X	X		
<i>M. similis</i>				X					
<i>M. spirocarpa</i>							X		
<i>M. tenuiflora</i>	X	X				X			
<i>M. texana</i>		X	X	X		X			
<i>M. tricephala</i>						X			
<i>M. watsonii</i>			X			X			

*Usos: 1=Cerca viva, 2=Combustible, 3=Comestible, 4=Forraje, 5=Construcción, 6=Medicinal, 7=Melífera, 8=Ornamental, 9=Agrícola.

Dentro de los estudios químicos y biológicos de este género, se ha reportado el uso de *M. caesalpinifolia* para el tratamiento de tos y gastritis (Aguiar, 2012), el extracto metanólico de hojas mostró actividad antimicrobiana y antioxidante (Silva, 2012). Los estudios químicos que se han realizado en esta especie han demostrado la presencia de compuestos triterpénicos aislados de la corteza, e incluyen esteroides (1-7), derivados de oleanano (8-10) y lupanos (11-13) (Figura 2.7) (Nery, 2015).

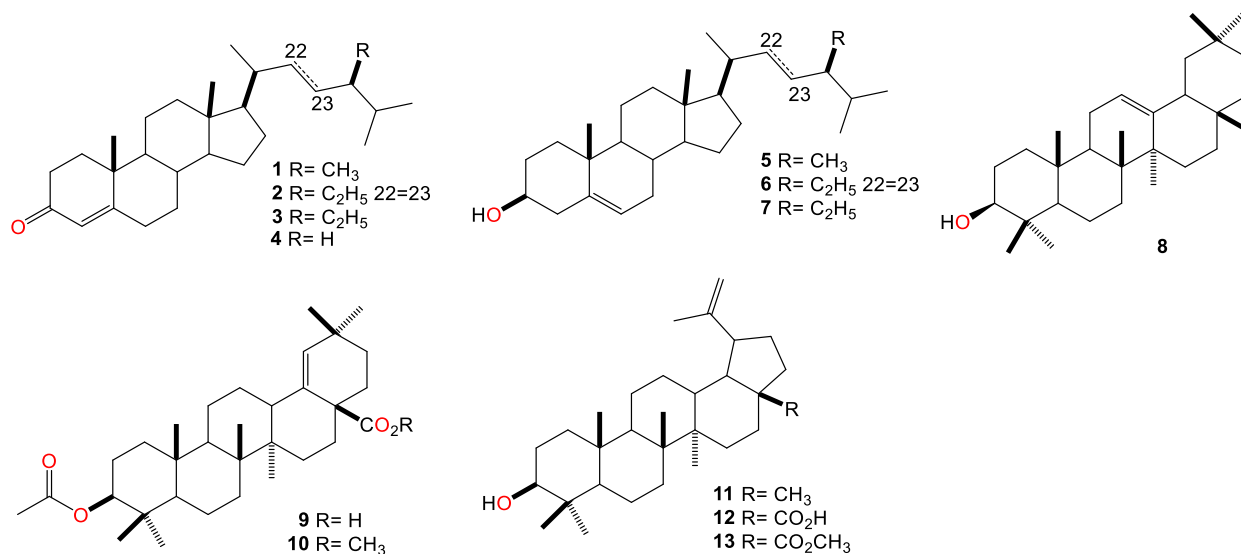


Figura 2.7. Terpenoides aislados del extracto hexánico de la corteza de *Mimosa caesalpinifolia*.

Las raíces de *M. diplotricha* se emplean como analgésico, en remedios contra el cáncer, como agente hemostático y tranquilizante (Chiu, 1998). A partir del extracto CHCl₃ de las partes aéreas se han descrito cinco flavonoides (14-18), de los cuales 15 y 18 mostraron potente actividad antiproliferativa de líneas celulares de cáncer (Figura 2.8) (Lin, 2011).

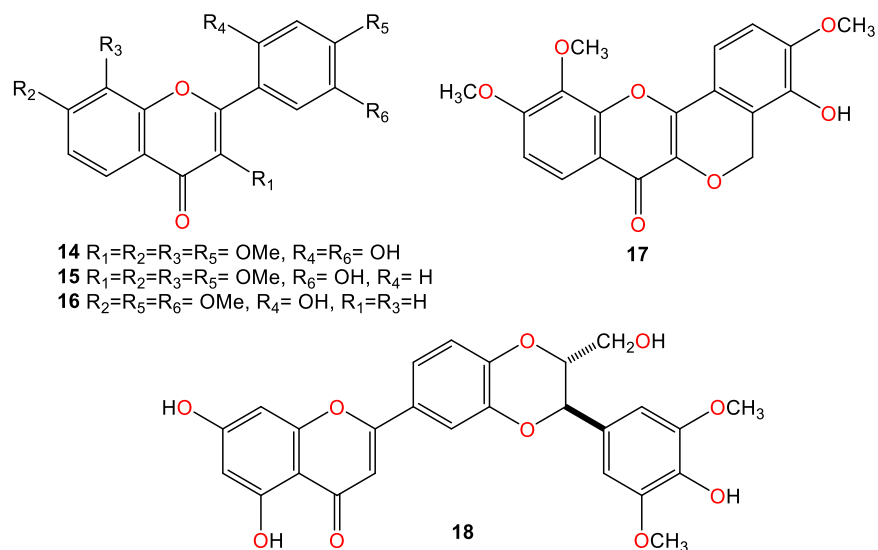


Figura 2.8. Flavonoides aislados de *M. diplotricha*.

La especie *M. hamata* es muy utilizada en India para tratar afecciones urinarias (Katewa, 2005). El extracto alcohólico de las partes aéreas presentó actividad antibacteriana, mientras que el extracto metanólico de las raíces demostró actividad antiviral (Jain, 1991). Los estudios químicos han arrojado la presencia de ácido gálico (**19**) y galato de etilo (**20**) en hojas (Mehta, 1988) y el aislamiento de los mimonósidos A (**21**), B (**22**) y C (**23**) de raíces (Jain, 1997) (Figura 2.9).

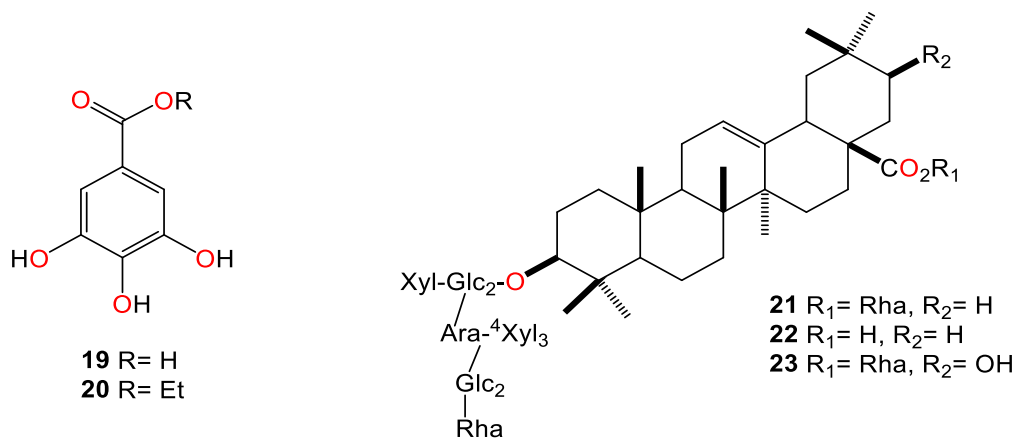


Figura 2.9. Compuestos aislados de *M. hamata*.

Se ha descrito el uso de la corteza de *M. tenuiflora* para el tratamiento de quemaduras y como antiinflamatorio. De esta se aislaron las chalconas denominadas kukulkaninas A (**24**) y B (**25**) (Domínguez, 1989). Además, se ha reportado la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de la corteza (Meckes, 1990), así como el efecto alucinógeno, que es debido a la presencia de los alcaloides yuremina (**26**) y N,N-dimetiltriptamina (**27**) (Sampaio, 2008). También se aislaron compuestos polifenólicos como las fenoxicromonas tenuiflorinas A (**28**), B (**29**) y C (**30**) (León, 2004); y los flavonoides, 6-metoxi-4'-O-metilnaringenina (**31**) y 6-metoxinaringenina (**32**), santina (**33**), 5,7,4'-trihidroxi-3,6-dimetoxiflavona (**34**) y 6-metoxikaempferol (**35**) (Figura 2.10). Los flavonoides **31** a **35** presentaron moderada actividad antiprotozoaria contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* (Bautista, 2011).

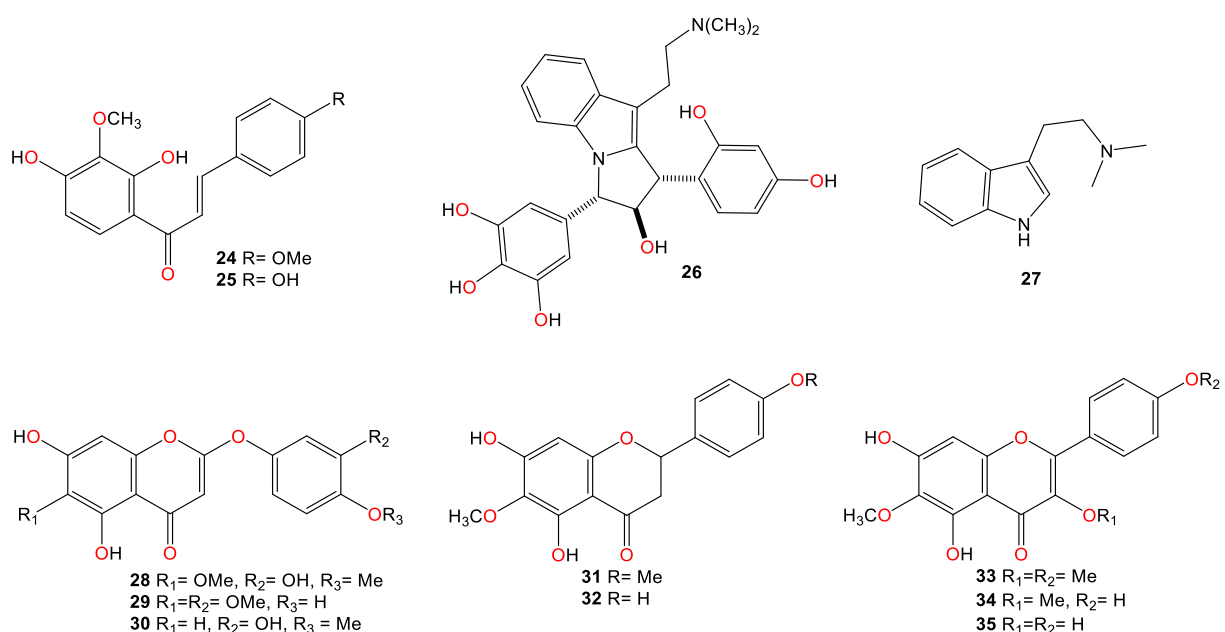


Figura 2.10. Compuestos aislados de *M. tenuiflora*.

Una de las especies más estudiadas es *M. pudica*, a la cual se le han atribuido actividad antidiabética, anticonvulsinante, antioxidante, antitumoral, antimicrobiana, capacidad de favorecer la cicatrización (Zaware, 2014), actividad diurética, astringente y antiespasmódica (Ghani, 2003). A partir del extracto etanólico de la planta se reportó el aislamiento de isorientina (**36**) orientina (**37**) isovitexina (**38**) y vitexina (**39**), los cuales presentan actividad antioxidante significativa (Zhang, 2011). En otro estudio se describió el aislamiento del alcaloide mimosina (**40**) (Figura 2.11) (Kirkr, 2003).

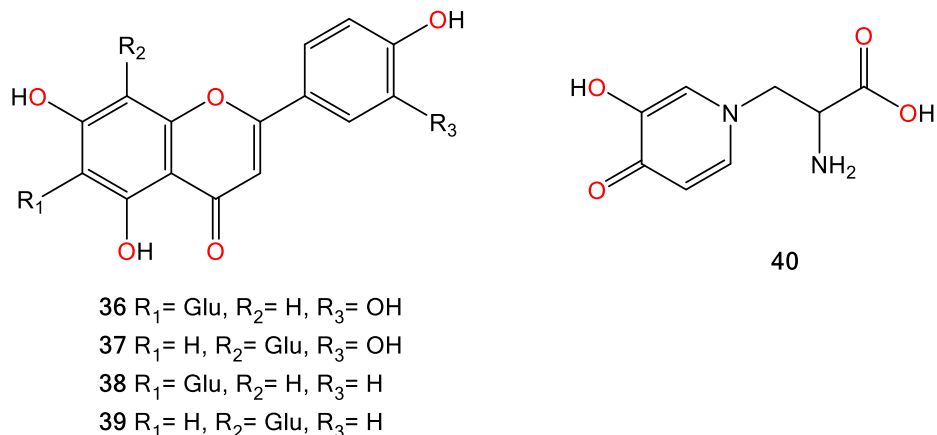


Figura 2.11. Metabolitos aislados de *M. pudica*.

Dentro de la Selva baja caducifolia del estado de Michoacán se puede encontrar las especies *Mimosa rosei* y *Mimosa spirocarpa*, ambas endémicas de México, la primera encontrada en los estados de Michoacán, Guerrero, Colima, Guanajuato, Jalisco, Nayarit y Zacatecas (CONABIO, 2009), mientras que la segunda especie se localiza en los estados de Chihuahua, Sinaloa, Colima, Michoacán y Guerrero (Camargo, 2001), estas especies no cuentan con estudios químico ni biológicos reportados, por lo que fueron el objeto de estudio del presente proyecto.

3. JUSTIFICACIÓN

Algunas especies del género *Mimosa* cuentan con reportes de usos medicinales, estudios químicos y/o biológicos. Estos antecedentes dan la guía para conocer el tipo de estructuras químicas y potencial biológico que se pueden encontrar en especies de este género. La ausencia de antecedentes químicos o biológicos de especies vegetales como *M. rosei* y *M. spirocarpa*, abre la oportunidad de realizar un estudio detallado de los metabolitos secundarios presentes y la búsqueda de la actividad biológica que puedan llegar a presentar dichos metabolitos.

Con el presente trabajo se busca contribuir con la fitoquímica de especies de fabáceas de la región de la Selva baja caducifolia del Estado de Michoacán, que a nivel nacional ocupa el 5° lugar en riqueza de especies vegetales.

4. OBJETIVOS

Realizar el estudio químico de las especies *Mimosa rosei* y *Mimosa spirocarpa* mediante técnicas cromatográficas, para contribuir con la quimiotaxonomía del género, y evaluar la actividad biológica *in vitro* de los metabolitos mayoritarios para ampliar el conocimiento de compuestos con potencial aplicación contra el cáncer e inflamación.

Objetivos específicos

- Realizar la colecta de las especies *M. rosei* y *M. spirocarpa*.
- Obtener los extractos hexánicos, CH₂Cl₂ y metanólicos de las partes aéreas (hojas, flores y tallos).
- Aislar los metabolitos secundarios mediante técnicas cromatográficas y caracterizarlos por medio de métodos físicos y espectroscópicos.
- Preparar derivados acetilados y carbonatados de los metabolitos mayoritarios.
- Evaluar la actividad citotóxica, antioxidante y antiinflamatoria de los compuestos mayoritarios, así como de los derivados preparados.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

• Obtención de Extractos

Se obtuvieron extractos con hexanos, CH₂Cl₂ y MeOH de hojas, tallos y flores de la especie *M. rosei*, mientras que de la especie *M. spirocarpa* sólo se obtuvieron extractos de hojas y tallos. Las hojas y flores se sometieron por separado a maceraciones sucesivas, mientras que los tallos se sometieron a reflujo por 6 h. Los rendimientos de los extractos se muestran en la Tabla 5.1. Cada extracto se analizó mediante TLC y RMN de ¹H para determinar la abundancia y naturaleza de los componentes (Figuras 5.1-5.5).

Tabla 5.1. Rendimientos de extractos obtenidos a partir de las partes aéreas de las especies *Mimosa rosei* y *Mimosa spirocarpa*.

Especie	Parte	Extracto	Peso (g)	Porcentaje (%)
<i>M. rosei</i>	Hojas (255 g)	Hexanos	10.1	3.9
		CH ₂ Cl ₂	3.3	1.3
		MeOH	40.8	16.0
	Tallos (250 g)	Hexanos	3.8	1.5
		CH ₂ Cl ₂	1.7	0.6
		MeOH	40.0	16.0
	Flores (110 g)	Hexanos	0.7	0.7
		CH ₂ Cl ₂	0.7	0.6
		MeOH	13.5	12.3
<i>M. spirocarpa</i>	Hojas (300 g)	Hexanos	11.2	3.7
		CH ₂ Cl ₂	4.4	1.4
		MeOH	45.6	15.2
	Tallos (200 g)	Hexanos	3.0	1.5
		CH ₂ Cl ₂	2.3	1.1
		MeOH	39.2	19.6

En los espectros de RMN de ¹H de los extractos hexánicos (Figura 5.1a) y CH₂Cl₂ (Figura 5.1b) de hojas de *M. rosei*, se observó un patrón similar en la región de los hidrógenos vinílicos (5.50-4.55 ppm) y alifáticos (2.51-1.00 ppm). Adicionalmente, en el espectro de RMN de ¹H del extracto de CH₂Cl₂ (Figura 5.1b) se observaron alrededor de 9.00 y 3.50 ppm las señales simples características de clorofilas. Por su parte, el espectro del extracto de MeOH mostró

señales de hidrógenos base de heteroátomo entre 4.50 y 3.10 ppm, además de presentar señales en la región de los hidrógenos aromáticos entre 8.20 y 6.30 ppm (Figura 5.1c).

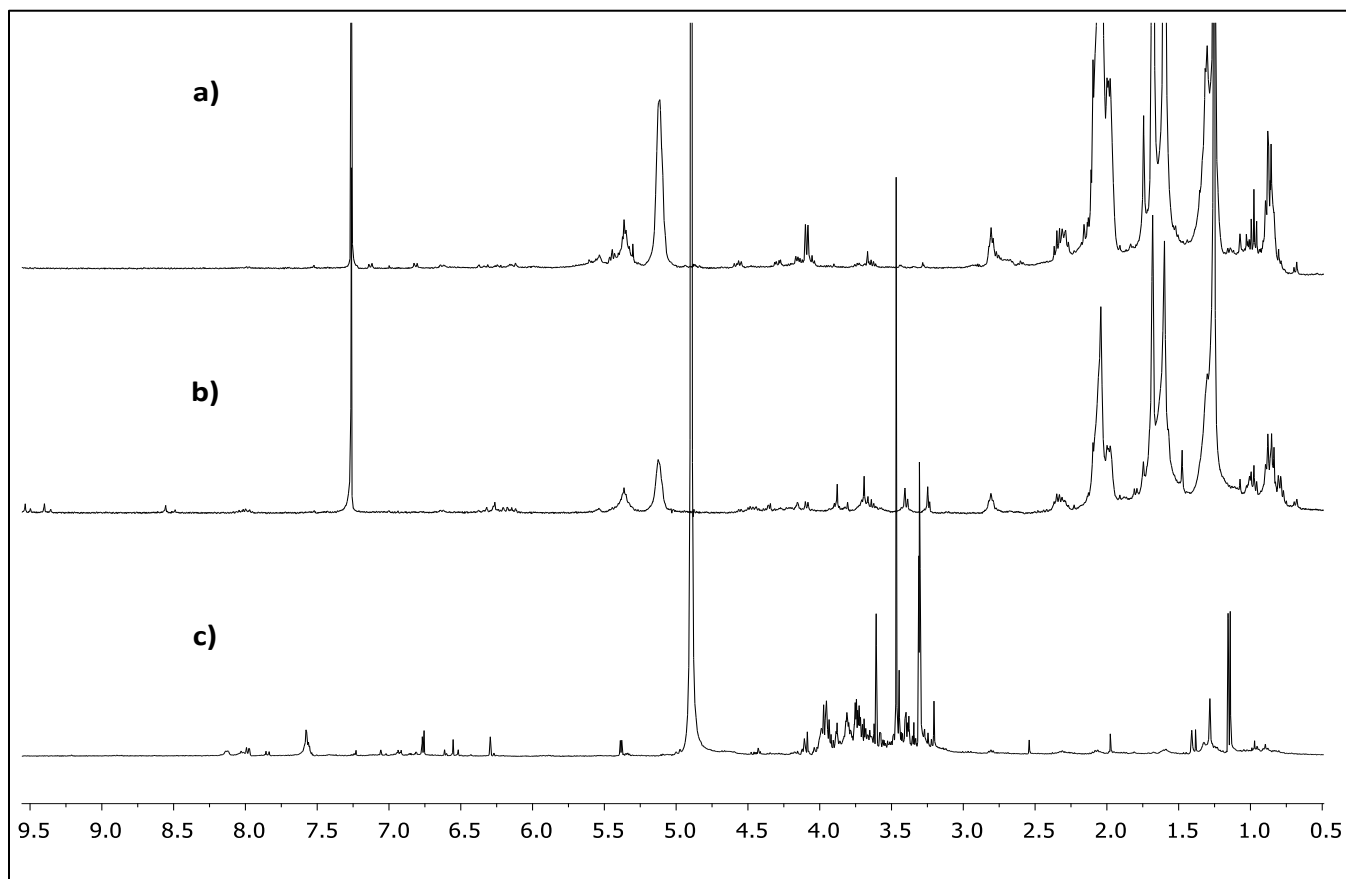


Figura 5.1. Espectros de RMN de ^1H de los extractos obtenidos de hojas de *Mimosa rosei*: a) hexánico, b) CH_2Cl_2 y c) metanólico.

Por otro lado, los espectros de RMN de ^1H de los extractos hexánicos y CH_2Cl_2 de hojas de *M. spirocarpa*, mostraron patrón de señales similares, ubicándose señales de hidrógenos alifáticos (2.50-0.50 ppm) y vinílicos (5.50-5.00 ppm) (Figuras 5.2a y 5.2b); en el espectro del extracto metanólico se identificaron entre 4.50 y 3.00 ppm las señales características de la presencia de azúcares como los componentes mayoritarios, además de señales en la región de los hidrógenos aromáticos entre 8.00 y 6.50 ppm (Figura 5.2c).

El análisis por RMN de ^1H de los extractos de hexanos y CH_2Cl_2 de tallos de *M. rosei* mostró hidrógenos vinílicos entre 5.50 y 4.50 ppm, además de señales de hidrógenos alifáticos entre 2.50 y 0.20 ppm (Figuras 5.3a y 5.3b). En el espectro del extracto obtenido con MeOH se observaron señales en la región de los hidrógenos base de heteroátomo entre 4.20 y 3.00 ppm característico de azúcares (Figura 5.3c).

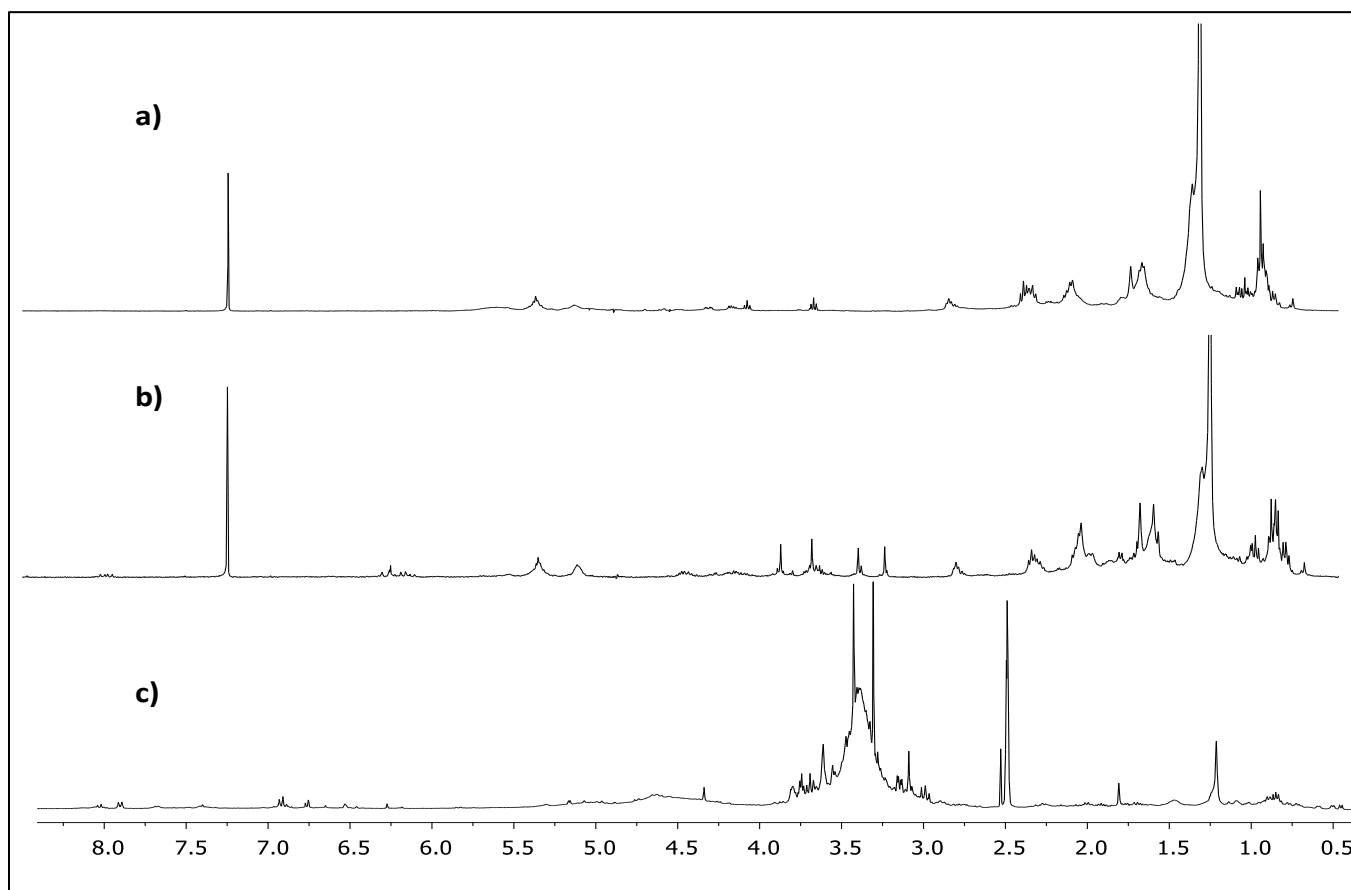


Figura 5.2. Espectros de RMN de ^1H de los extractos obtenidos de hojas de *Mimosa spirocarpa*: a) hexánico, b) CH_2Cl_2 y c) metanólico.

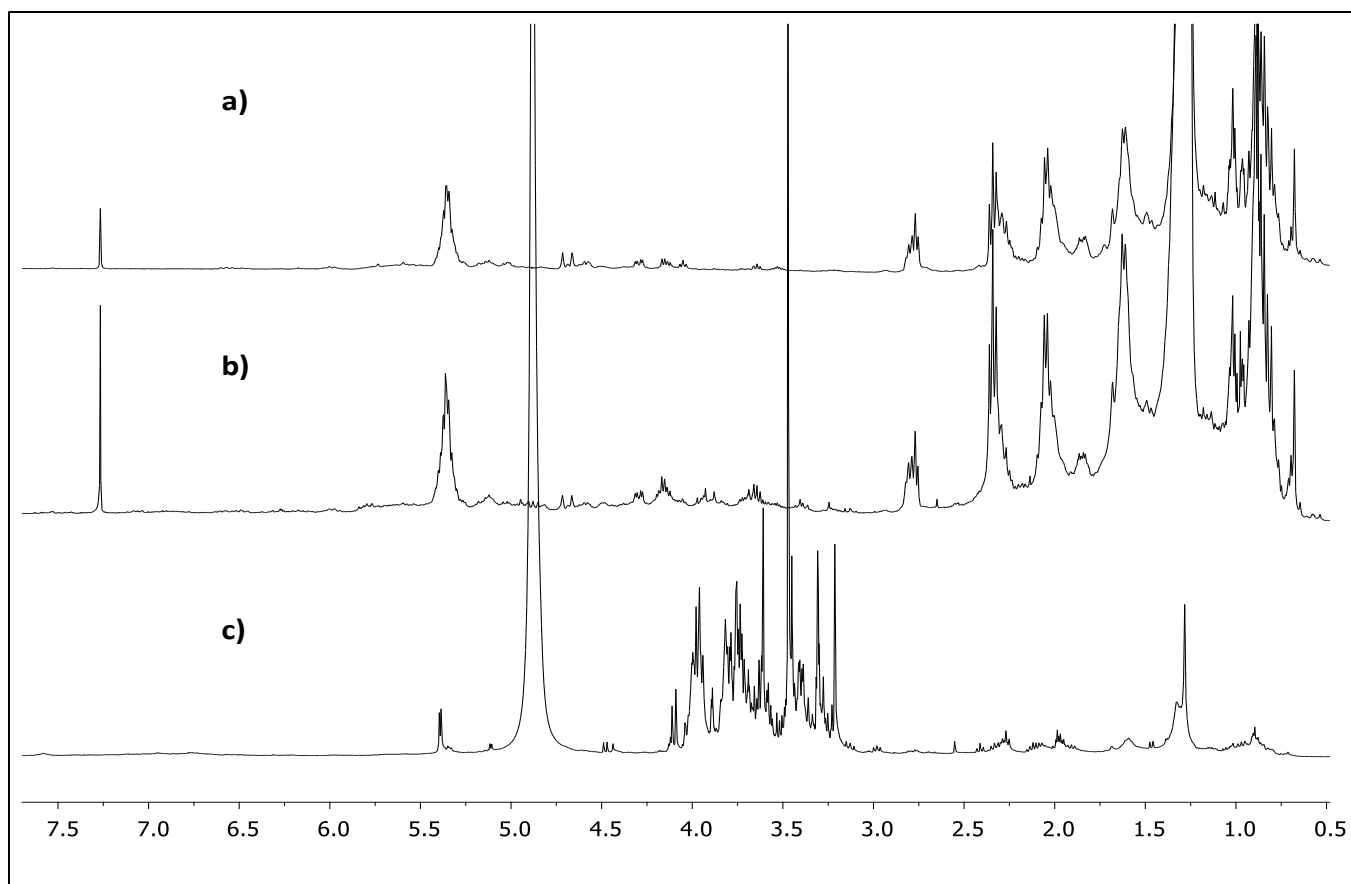


Figura 5.3. Espectros de RMN de ^1H de los extractos obtenidos de tallos de *Mimosa rosei*: a) hexánico, b) CH_2Cl_2 y c) metanol.

Los espectros de RMN de ^1H de los extractos de hexanos y CH_2Cl_2 de tallos de *M. spirocarpa* mostraron patrones parecidos de señales de hidrógenos vinílicos (6.00-5.00 ppm) e hidrógenos alifáticos (2.50-0.50 ppm) como los mayoritarios (Figuras 5.4a y 5.4b), el espectro de RMN de ^1H del extracto metanólico mostró señales de azúcares entre 5.50 y 3.00 ppm (Figura 5.4c).

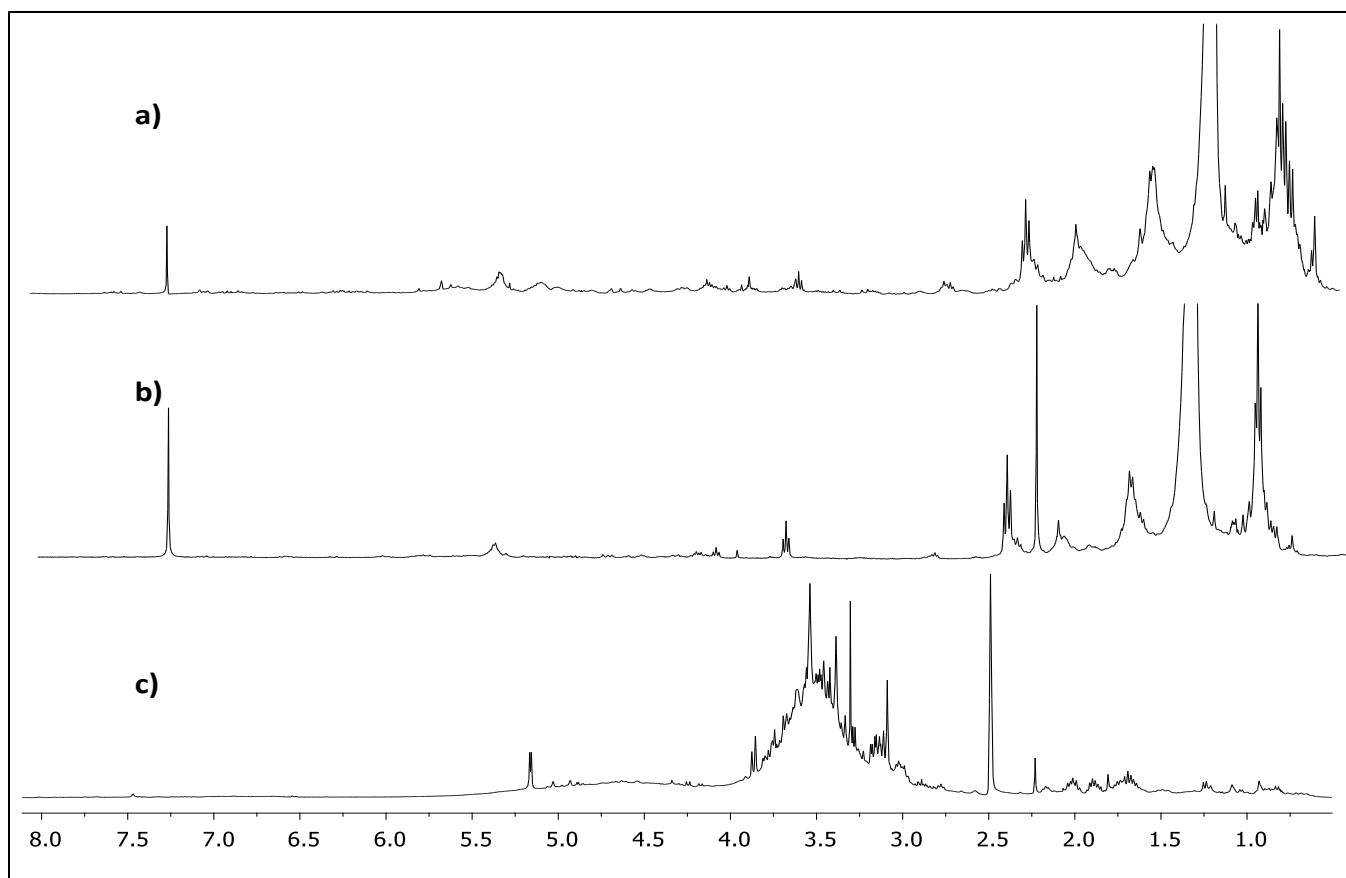


Figura 5.4. Espectros de RMN de ^1H de los extractos obtenidos de tallos de *Mimosa spirocarpa*: a) hexánico, b) CH_2Cl_2 y c) metanol.

El espectro de RMN de ^1H del extracto hexánico de flores de *M. rosei* (Figura 5.5a) mostró en 4.05 y 3.64 ppm dos señales triples base de heteroátomo, así como señales en 2.31, 1.61, 1.27 y 0.88 ppm características de compuestos alifáticos de cadena larga. El extracto de CH_2Cl_2 (Figura 5.5b) presentó señales en la región de los protones vinílicos (5.50-4.70 ppm) y alifáticos (2.50-0.50 ppm), principalmente; el extracto metanólico (Figura 5.5c) mostró señales de compuestos aromáticos entre 8.20 y 6.50 ppm, además señales de hidrógenos base de heteroátomos entre 4.50 y 3.00 ppm.

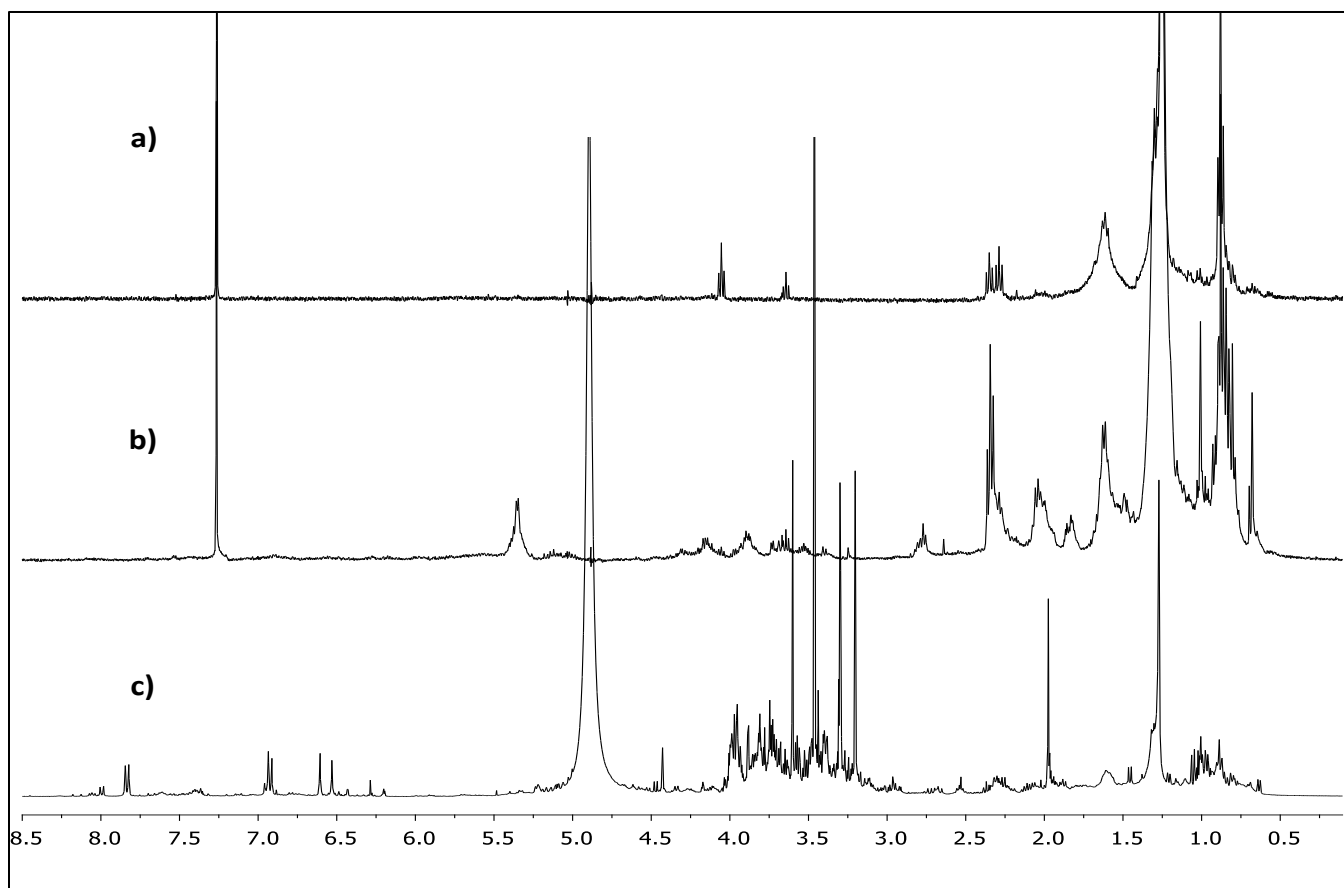


Figura 5.5. Espectros de RMN de ^1H de los extractos obtenidos de flores de *Mimosa rosei*: a) hexánico, b) CH_2Cl_2 y c) metanólico.

Cada extracto se sometió a purificaciones mediante técnicas cromatográficas obteniendo así los metabolitos mayoritarios de estos, los cuales se analizaron mediante métodos físicos, químicos y espectroscópicos.

- **Estudio Químico de extractos de hojas de *M. rosei***

El extracto hexánico se sometió a separación en columna cromatográfica para la obtención de 7 fracciones enriquecidas utilizando mezclas de polaridades ascendentes de hexanos-AcOEt (1:0, 4:1, 3:2, 1:1, 2:3, 1:4 y 0:1). Las fracciones se analizaron por TLC para determinar de manera cualitativa su similitud constitutiva. Las primeras 3 fracciones se unieron y purificaron mediante columna cromatográfica empleando hexanos-AcOEt (9:1). De esta purificación se obtuvo un sólido blanco (p.f. 77-79 °C) como compuesto mayoritario el cual representó el 3% del extracto, a este sólido se le realizaron pruebas de solubilidad las cuales se muestran en la Tabla 5.2.



Tabla 5.2. Perfil de solubilidad del compuesto **41**.

Disolvente		Disolvente		Disolvente	
Hexanos	I	AcOEt	I	Metanol	I
CH ₂ Cl ₂	PS	Acetona	I	DMSO	I
CHCl ₃	PS	Acetonitrilo	I	H ₂ O	I

I (insoluble), PS (parcialmente soluble)

En el espectro de RMN de ¹H (Figura 5.6a) se observó en 3.64 ppm una señal triple que integró para dos hidrógenos atribuida a un metileno base de alcohol; en 1.57, 1.25 y 0.88 ppm se observaron las señales características de una cadena alifática saturada. Con la finalidad de mejorar la solubilidad del compuesto, se llevó a cabo una reacción de acetilación usando anhídrido acético y piridina, a temperatura ambiente por 3 h. El producto de reacción se analizó mediante RMN de ¹H (Figura 5.6b), donde se observó una nueva señal en 2.05 ppm, típica de metilo de acetato, indicando la formación del producto esperado. El análisis por espectrometría de masa permitió determinar un ion molecular [M+H₂O]⁺ 498 *m/z*, que corresponde a la fórmula C₃₂H₆₆O₃; adicionalmente, se observa un pico en 437 *m/z*, asignado a una porción [C₃₀H₆₁O]⁺, que corresponde a la cadena alifática deacetilada. El conjunto de datos se comparó con la literatura (Jackson, 2006) y fue posible establecer la presencia de *n*-triacontanol (**41**) como producto natural, a través de su derivado acetato de *n*-triacontanilo (**42**). Este tipo de alcoholes se conocen como alcoholes grasos. En las plantas se almacenan como ceras o ésteres de ácidos grasos y las funciones que cumplen van desde prevenir la desecación de estas, protección contra bacterias y como filtros UV (Dahl, 2005).

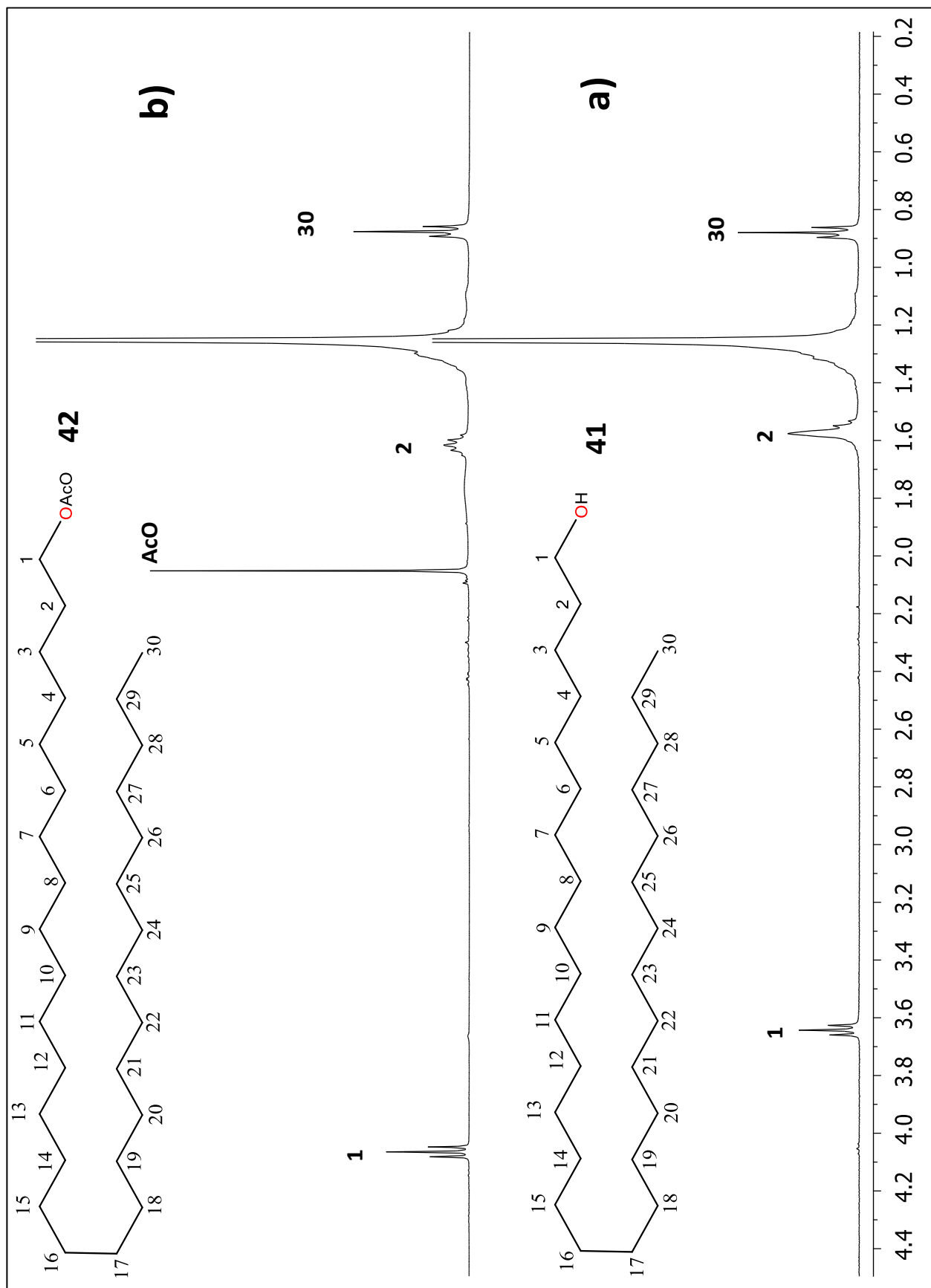


Figura 5.6. Espectro de RMN de ^1H del a) *n*-triacontanol (41) y b) su derivado acetilado (42) 400 MHz, CDCl_3 .

A partir del extracto de CH₂Cl₂ se obtuvieron 7 fracciones enriquecidas mediante cromatografía en columna, utilizando mezclas de hexanos-CH₂Cl₂ (1:0, 4:1, 3:2, 1:1, 2:3, 1:4 y 0:1). Las fracciones se analizaron por TLC y RMN de ¹H, observándose la presencia de alcoholes grasos, como **41**, representando el 1.6% en peso del extracto, además de clorofilas como los componentes mayoritarios de este extracto.

El análisis del extracto metanólico se llevó primeramente con la obtención de 7 fracciones enriquecidas utilizando mezclas de CH₂Cl₂-MeOH (1:0, 4:1, 3:2, 1:1, 2:3, 1:4 y 0:1), las fracciones enriquecidas 3 y 4 se juntaron y recromatografiaron en columna abierta usando gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil un sistema CH₂Cl₂-MeOH-H₂O, de la cual se aisló en las primeras 7 fracciones un sólido blanco el cual se analizó mediante RMN de ¹H (Figura 5.7), además de que se le realizaron pruebas de solubilidad (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Perfil de solubilidad del sólido blanco.



Disolvente		Disolvente		Disolvente	
Hexano	I	AcOEt	I	Metanol	I
CH ₂ Cl ₂	PS	Acetona	I	DMSO	S
CHCl ₃	PS	Acetonitrilo	I	H ₂ O	I

S (soluble), I (insoluble), PS (parcialmente soluble)

En el espectro de RMN de ¹H (Figura 5.7) se observó en 5.31 ppm una señal simple ancha asignada a un protón vinílico, en 5.15 y 5.01 ppm se encontraron dos señales doble de dobles ($J = 15.1, 8.7$ Hz) que correspondieron a dos hidrógenos vinílicos, las señales correspondientes al esqueleto alifático se ubicaron entre 2.40 y 0.60 ppm, además, el patrón de señales entre 4.90 y 2.80 ppm sugirió que el compuesto se encontraba glicosilado, destacándose en 4.21 ppm la señal doble del protón anomérico, estas señales fueron comparadas con una muestra real y se identificó como una mezcla de los glucósidos de β -sitosterol (**43**) y estigmasterol (**44**) en una proporción 4:1, con base en la integral de los protones vinílicos.

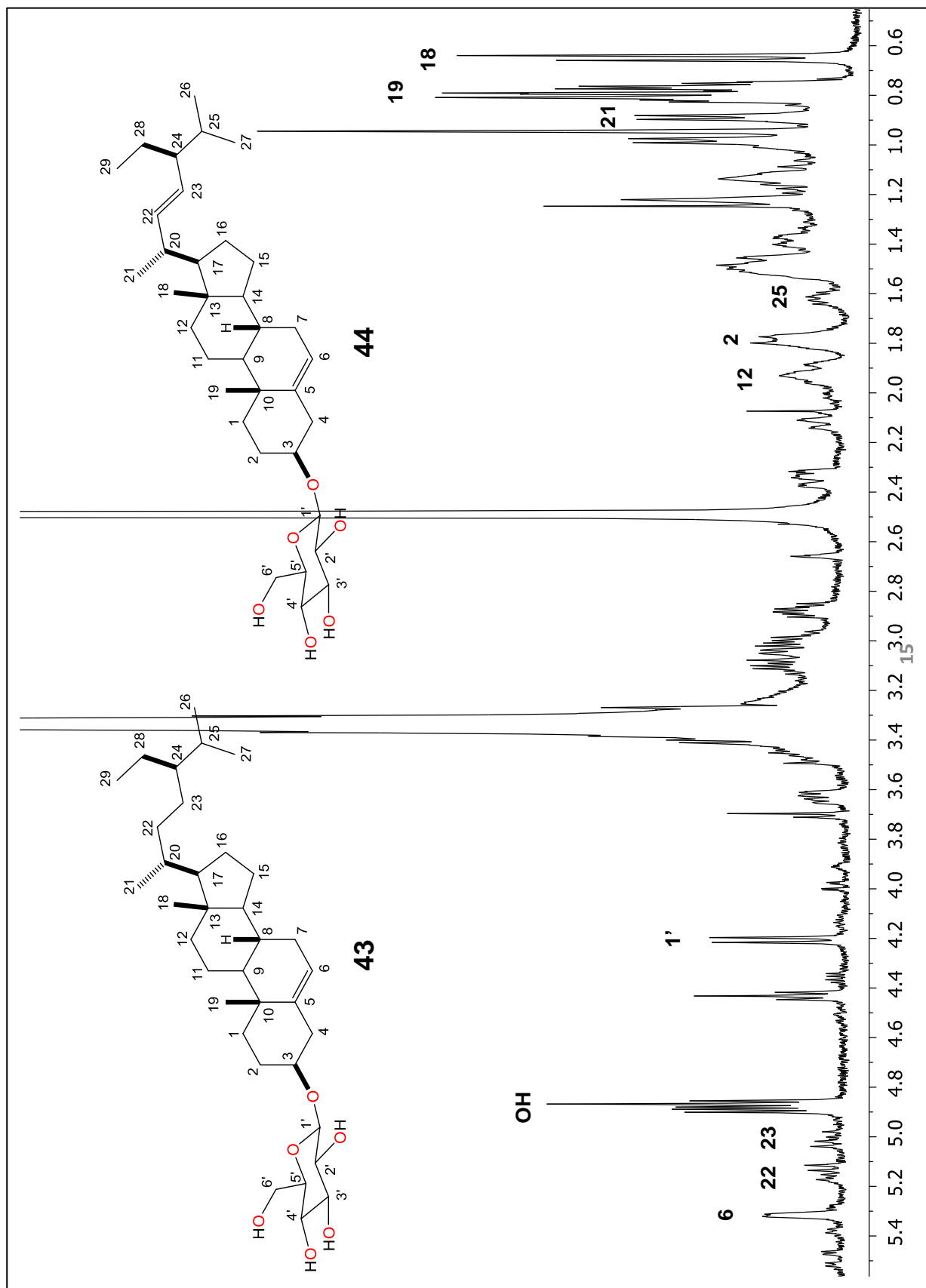


Figura 5.7. Espectro de RMN de ¹H de la mezcla de los glucósidos de β-sitosterol (43) y estigmasterol (44). 400 MHz, DMSO-*d*₆.

Continuando con el análisis de la purificación en columna, en las fracciones 15 a 25, se obtuvo un sólido blanco al cual se le realizaron pruebas de solubilidad (Tabla 5.4) y se analizó mediante RMN de ^1H y ^{13}C (Figuras 5.8 y 5.9).

Tabla 5.4. Perfil de solubilidad del compuesto **45**.



Disolvente		Disolvente		Disolvente	
Hexanos	I	AcOEt	I	Metanol	I
CH_2Cl_2	I	Acetona	I	DMSO	S
CHCl_3	I	Acetonitrilo	I	H_2O	I

S (soluble), I (insoluble)

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 5.8) se observó una señal simple en 12.77 ppm correspondiente a un puente de hidrógeno, en 8.08 ppm se ubicó una señal doble de dobles que integró para dos hidrógenos con $J = 7.7, 1.4$ Hz y en 7.60 ppm se apreció una señal múltiple que integró para 3 hidrógenos, este juego de señales es característico de un benceno monosustituido; en 7.04 ppm se encontró una señal simple correspondiente a un protón vinílico, en 6.87 y 6.47 ppm se observaron dos señales dobles, ambas con $J = 2.2$ Hz, indicando una disposición *meta* entre protones de un anillo aromático. En adición, las señales múltiples que se encontraron entre 5.15 y 3.12 ppm sugirieron un grupo funcional glicosídico, cuyos valores de las constantes de acoplamiento no fue posible determinar. Por lo anterior, se adquirió el espectro usando piridina deuterada (Ver parte experimental); esto permitió observar la señal de H-anomérico con una $J = 7.0$ Hz, lo que indicó la disposición en β . Es el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 5.9) se observaron 19 señales, dos de ellas (129.5 y 126.92 ppm) de mayor intensidad sugiriendo traslapes; en 182.7 ppm se observó una señal de carbono de carbonilo (C-4), entre 164.1 y 95.4 ppm se observaron las señales de la porción flavonoide, en 100.3 ppm se encontró el carbono anomérico de la porción glucosídica, y entre 77.6-61.0 ppm se apreciaron las señales que corresponden a los carbonos del azúcar, los datos espectroscópicos se compararon con la literatura (Liu, 2010) y correspondieron para el flavonoide crisina-7-O- β -D-glucósido (**45**), como se aprecia en la Tabla 5.5.

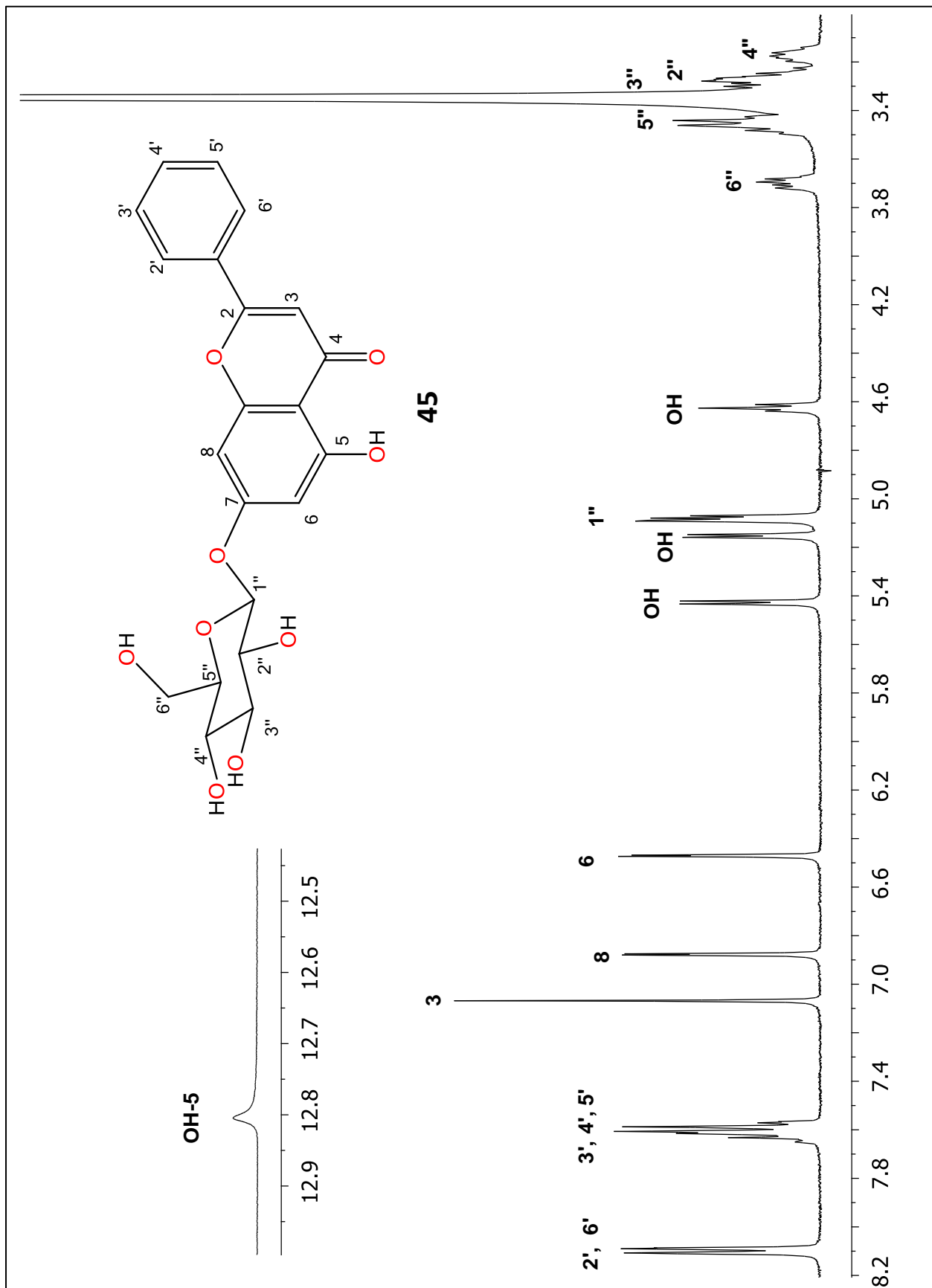


Figura 5.8. Espectro de RMN de ¹H de crisina-7-O-β-D-glucósido (45) 400 MHz, DMSO-d₆.

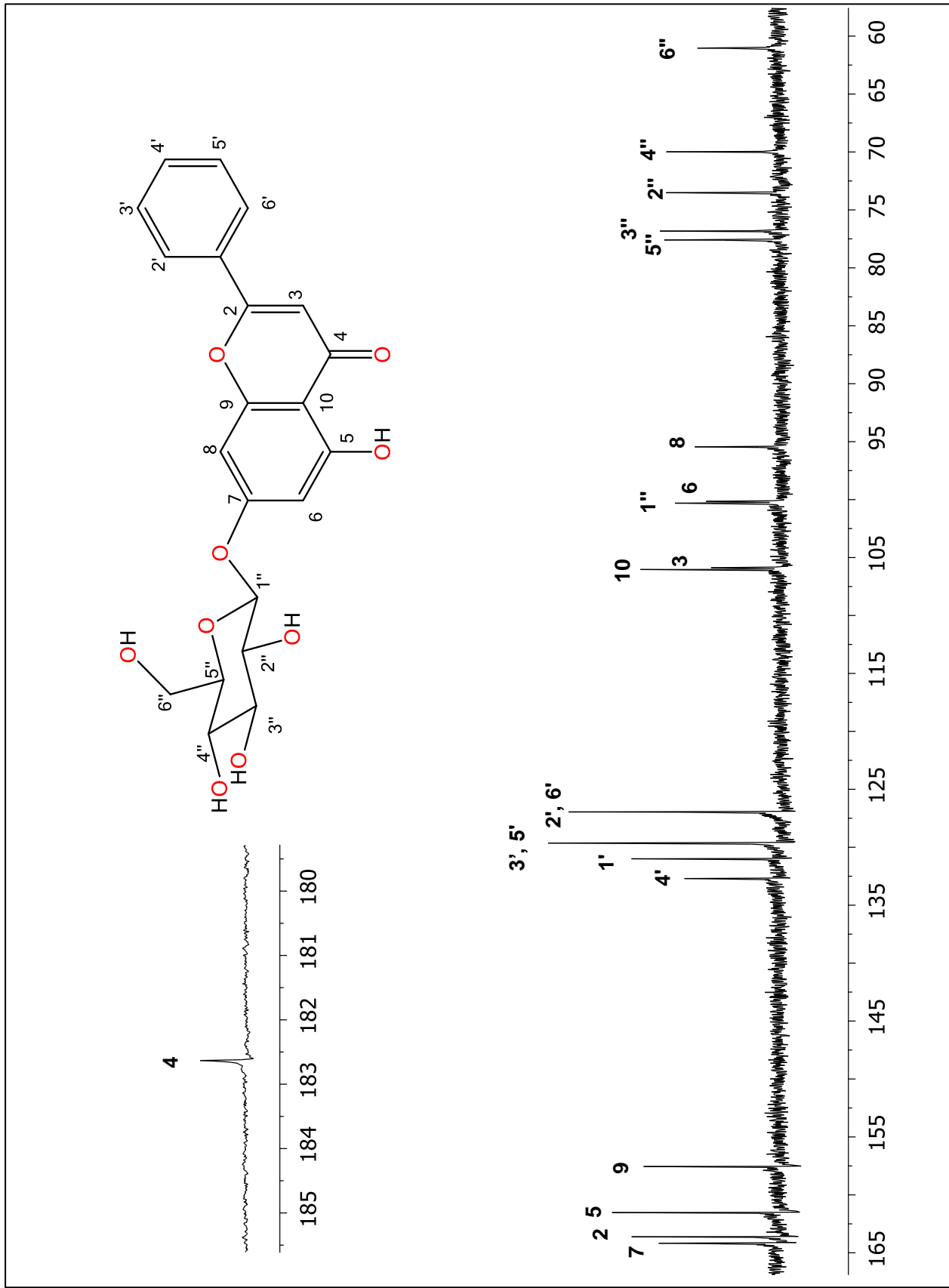


Figura 5.9. Espectro de RMN de ¹³C de crisina-7-O-β-D-glucósido (45) 100 MHz, DMSO-d₆.

Tabla 5.5. Comparación de datos de RMN de ^1H y ^{13}C del derivado glucosilado de crisina (Liu, 2010) y datos experimentales de **46**.

Posición	Crisina-7-O- β -D-Glucósido Liu, 2010		Experimental Compuesto 46	
	^1H (500 MHz)	^{13}C (125 MH)	^1H (400 MHz)	^{13}C (100 MHz)
2	-	163.6	-	163.6
3	6.95 s	105.4	7.07 s	105.8
4	-	182.0	-	182.6
5	-	161.3	-	161.5
6	6.39 s	99.5	6.47 d (2.0)	100.1
7	-	163.9	-	164.1
8	6.82	94.7	6.88 d (2.0)	95.4
9	-	157.3	-	157.5
10	-	105.2	-	106.0
1'	-	130.7	-	132.7
2'	8.09 d (7.0)	126.5	8.10 dd (8.0, 1.2)	126.9
3'		129.1		129.6
4'	7.59 m	132.1	7.61 m	131.0
5'		129.2		129.6
6'	8.09 d (7.0)	126.3	8.10 dd (8.0, 1.2)	126.9
1''	5.12 d (7.0)	99.7		100.3
2''		72.9		73.5
3''		76.6		76.8
4''	3.19-3.70 m	69.2	5.08-3.18 m	69.9
5''		77.4		77.6
6''		60.7		61.0
OH-5	12.81 s	-	12.81 s	-

El flavonoide **45**, se aisló por primera vez en 1957 de la madera de *Prunus aequinoctialis* (Hasegawa, 1957), ha presentado actividad diurética e hipotensiva (Cherkaoui, 2018), además ha mostrado baja actividad antimicrobiana y moderada actividad antioxidante (Liu, 2010).

Siguiendo el análisis de los compuestos presentes en el extracto; en las fracciones 31-46, se obtuvo un sólido amorfo amarillo intenso cuyo perfil de solubilidad se observa en la Tabla 5.6, el compuesto se analizó en RMN de ^1H y ^{13}C (Figuras 5.10 y 5.11).

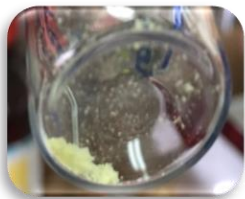


Tabla 5.6. Perfil de solubilidad del compuesto **46**.

Disolvente		Disolvente		Disolvente	
Hexanos	I	AcOEt	I	Metanol	S
CH ₂ Cl ₂	I	Acetona	PS	DMSO	S
CHCl ₃	I	Acetonitrilo	I	H ₂ O	I

S (soluble), I (insoluble)

En el espectro de RMN de ¹H (Figura 5.10) se observó en 13.03 ppm una señal simple característica de las 5-hidroxi flavonas, en 10.96 ppm se encontró una señal simple ancha correspondiente a un OH; en la región de protones aromáticos se observó en 8.18 ppm una señal doble ($J = 7.2$ Hz) asignada a los protones aromáticos H-2' y H-6' y en 7.58 ppm se encontró una señal múltiple la cual correspondió para los protones aromáticos H-3', H-4' y H-5', indicando un anillo aromático monosustituido (anillo B), en 6.99 y 6.30 ppm se encontraron dos señales simples las cuales integraron para un protón cada una, asignadas a los hidrógenos H-8 y H-6, respectivamente, las señales entre 4.69-3.24 ppm indicaron que se encontraba en su forma glucosilada, observándose en 4.69 ppm la señal doble con $J = 9.8$ Hz correspondiente al protón anomérico. El espectro de RMN de ¹³C (Figura 5.11) mostró en 182.3 ppm la señal característica del carbono de carbonilo; entre 163.4 y 98.3 ppm se encontraron las señales de la parte del flavonoide y entre 81.9 y 61.3, se observaron las señales del fragmento glucosídico que contiene la molécula, la correlación en HETCOR de la señal doble en 4.69 ppm correspondiente al anomérico con la señal en 73.3 ppm indicó que se trataba de un C-glicósido (Figura 5.12), la constante de acoplamiento de 9.6 Hz indicó una disposición β por parte del azúcar. El espectro COSY permitió asignar los hidrógenos correspondientes a la glucosa (Figura 5.13). Los datos experimentales se compararon con la bibliografía (Zhang, 1997) y concordaron para la crisina-8-C- β -D-glucósido (**46**) (Tabla 5.7).

Tabla 5.7. Comparación de datos de RMN de ^1H y ^{13}C de crisina-8-C- β -D-glucósido (Zhang, 1997) y datos experimentales del compuesto **46**, DMSO- d_6 .

Posición	Crisina-8-C- β -D-Glucósido Zhang, 1997		Experimental Compuesto 46	
	^1H (500 MHz)	^{13}C (125 MH)	^1H (400 MHz)	^{13}C (100 MHz)
2	-	163.3	-	163.4
3	7.00 s	104.6	6.99 s	104.7
4	-	182.1	-	182.3
5	-	160.3	-	160.4
6	6.32 s	98.3	6.30 s	98.3
7	-	162.8	-	162.9
8	-	104.7	-	104.8
9	-	156.1	-	156.2
10	-	104.2	-	104.3
1'	-	131.0	-	131.0
2'	8.19 d (7.4)	126.8	8.18 d (7.2)	126.9
3'	7.55 t (7.4)	128.9	7.58 m	129.1
4'	7.63 tt (7.4, 1.2)	131.4		132.1
5'	7.55 t (7.4)	128.9		129.1
6'	8.19 d (7.4)	126.8	8.18 d (7.2)	126.9
1''	4.72 d (9.9)	73.3	4.69 d (9.6)	73.4
2''	3.86 t (9.9)	70.8	3.83 t (9.2)	70.8
3''	3.25 m	78.6	3.24 m	78.6
4''	3.41 m	70.5	3.40 m	70.5
5''	3.25 m	81.8	3.54 m	81.9
6''	3.57 dt (12.0, 5.6) 3.79 dd (12.9, 5.6)	61.2	3.77 dd (11.2, 6.8)	61.3
OH-5	13.00 s	-	13.03 s	-
OH-7	-	-	10.96 s	-

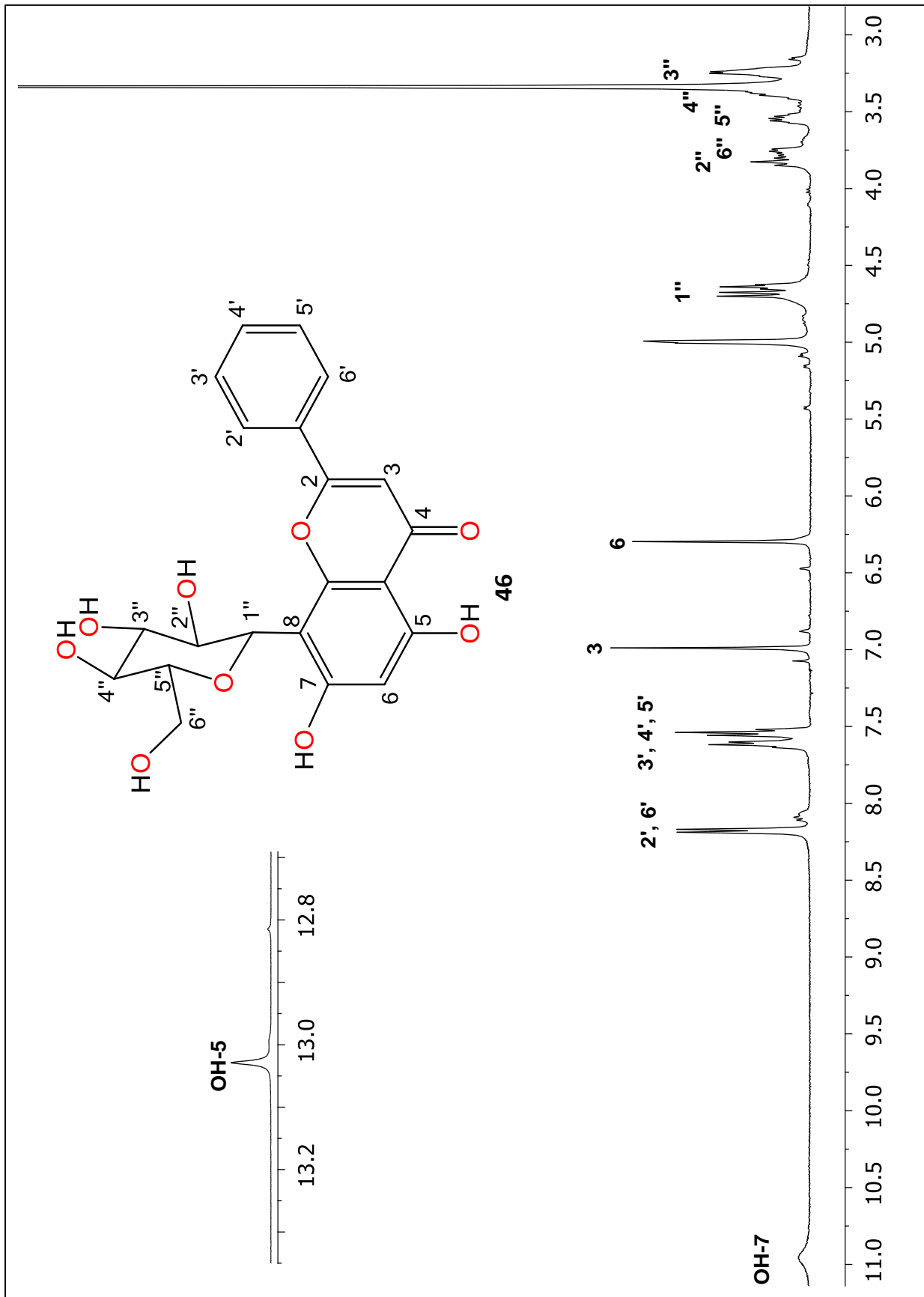


Figura 5.10. Espectro de RMN de ¹H de crisina-8-C-β-D-glucósido (46) 400 MHz, DMSO-d₆.

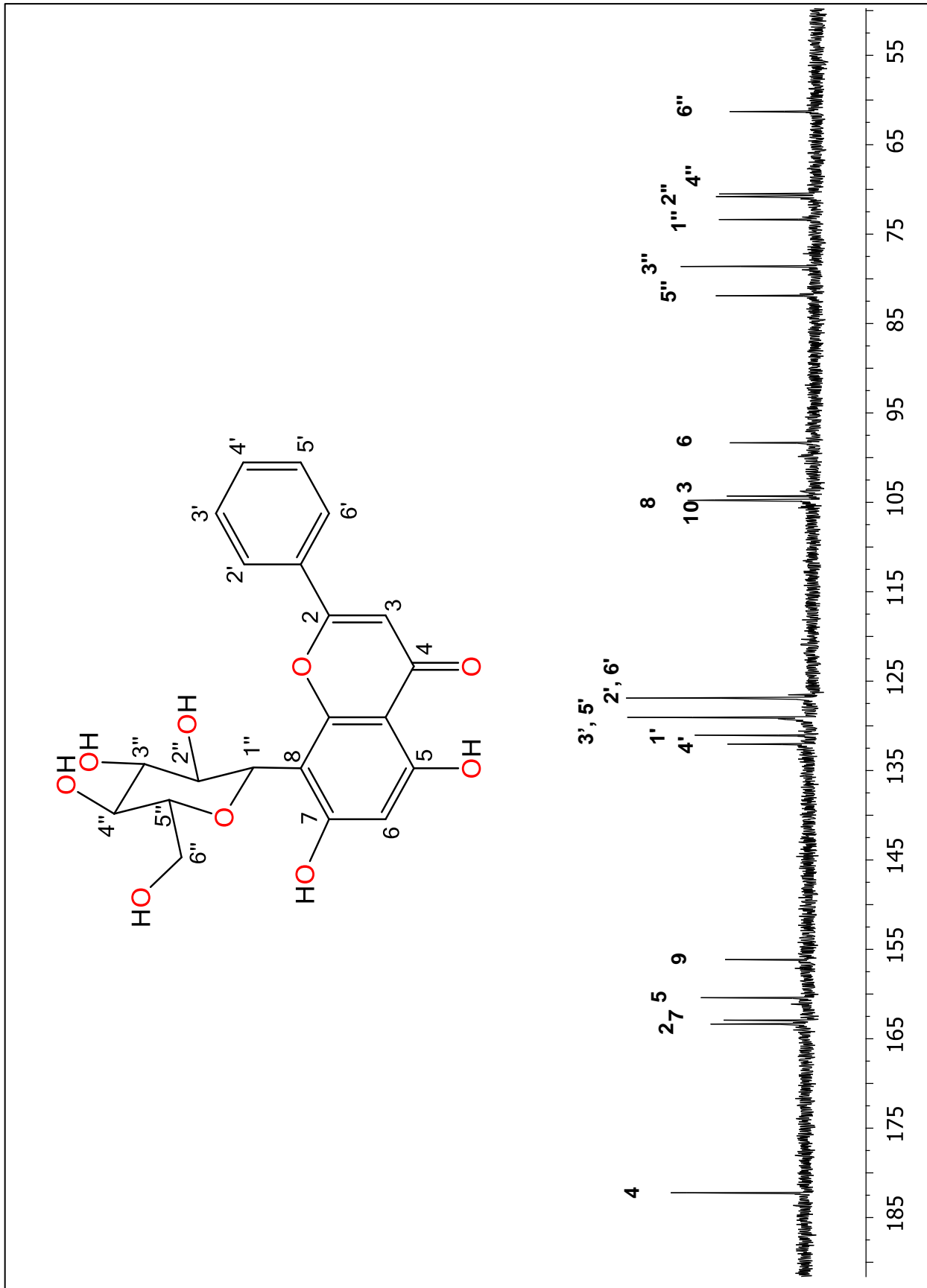


Figura 5.11. Espectro de RMN de ¹³C de crisina-8-C-β-D-glucósido (46) 100 MHz, DMSO-*d*₆.

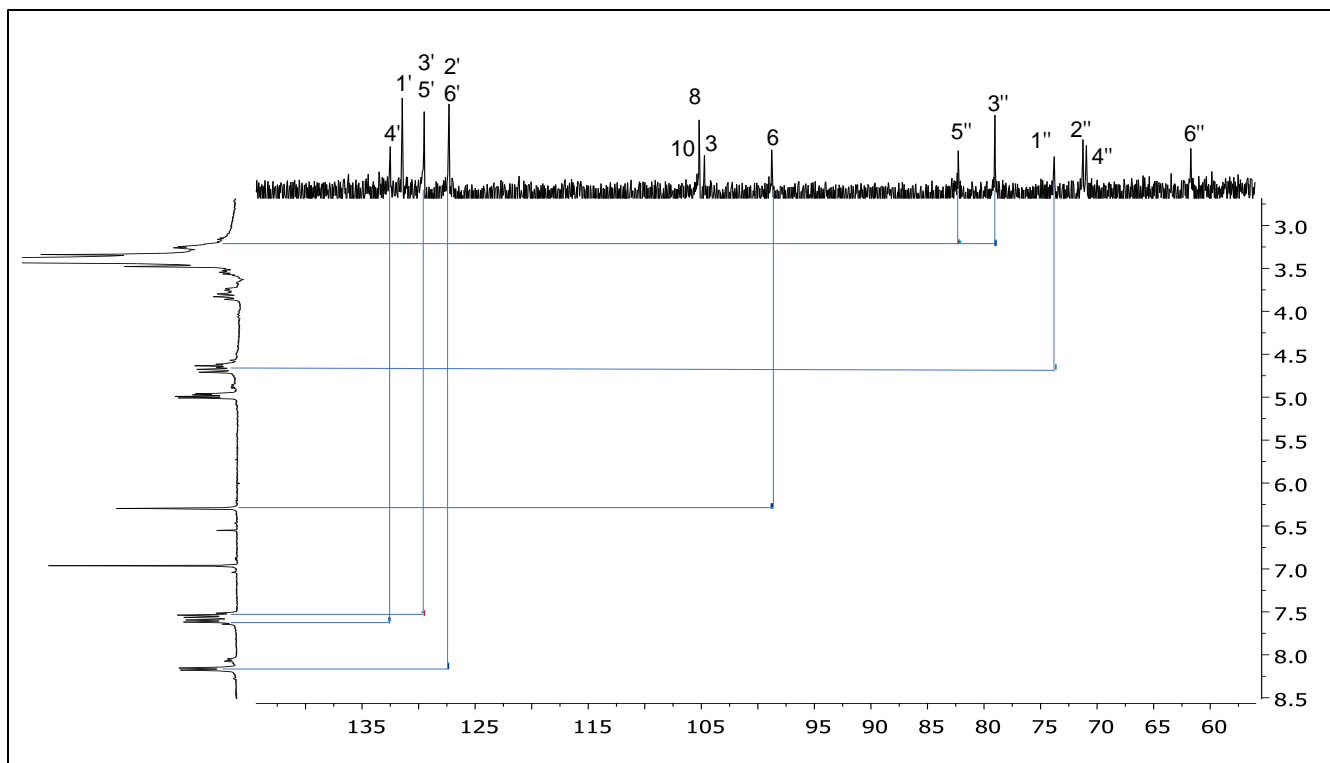


Figura 5.12. Espectro HETCOR de crisina-8-*C*- β -D-glucósido (46).

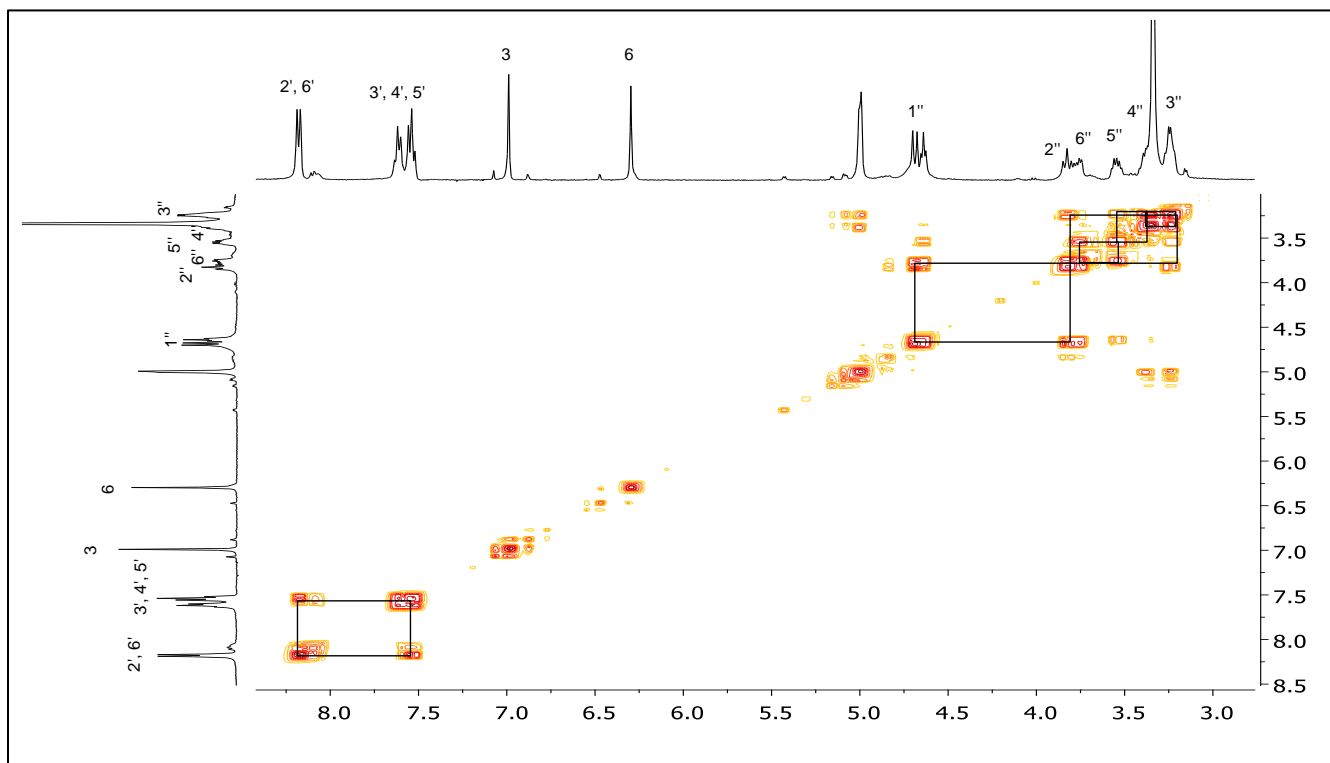


Figura 5.13. Experimento COSY de crisina-8-*C*- β -D-glucósido (46).

En fracciones más polares del análisis del extracto metanólico de hoja se obtuvo un compuesto en forma de sólido amarillo, el cual tiene el mismo perfil de solubilidad que el compuesto **46** (Tabla 5.6), al analizar el espectro de RMN de ^1H (Figura 5.14) se observó el puente de hidrógeno de flavona en 13.16 ppm, en 8.01 y 6.88 ppm se observaron dos señales dobles ($J = 8.8$ Hz) característico de sistemas aromáticos *p*-disustituidos, en 6.77 y en 6.26 ppm se encontraron dos señales simples anchas que integran para un hidrógeno cada una, correspondientes al sistema del anillo aromático A del flavonoide; este conjunto de señales son características del kaempferol y las señales encontradas entre 5.02 y 3.20 ppm indicaron que al igual que los anteriores flavonoides aislados, este se encontraba glucosilado, la constante de acoplamiento de 8.5 Hz del protón anomérico indicó una configuración en β por parte del azúcar. Comparando los desplazamientos de RMN de ^1H descritos en la literatura (Pereira, 2012) con los experimentales, se determinó que se trataba del kaempferol-7-*O*- β -D-glucósido (**47**) Tabla 5.8.

Tabla 5.8. Comparación de datos de RMN de ^1H del kaempferol-7-*O*- β -D-glucósido (Pereira, 2012) y datos experimentales del compuesto **47**.

Posición	Kaempferol-7- <i>O</i> - β -D-glucósido Pereira, 2012	Experimental Compuesto 47
	^1H (500 MHz)	^1H (400 MHz)
6	6.40 d (1.7)	6.36 s
8	6.81 d (1.7)	6.79 s
2'	7.96 d (8.8)	8.01 d (8.8)
3'	6.80	6.88 d (8.8)
5'	6.80	6.88 d (8.8)
6'	7.96 d (8.8)	8.01 d (8.8)
1''	4.60 d (7.6)	4.67d (9.6)
2''	3.36	3.40 m
3''	3.30	3.24 m
4''	3.75	3.82 t (9.2)
5''	3.42	3.42 m
6''	3.37	3.37 m
OH-5	13.05 s	13.15 s

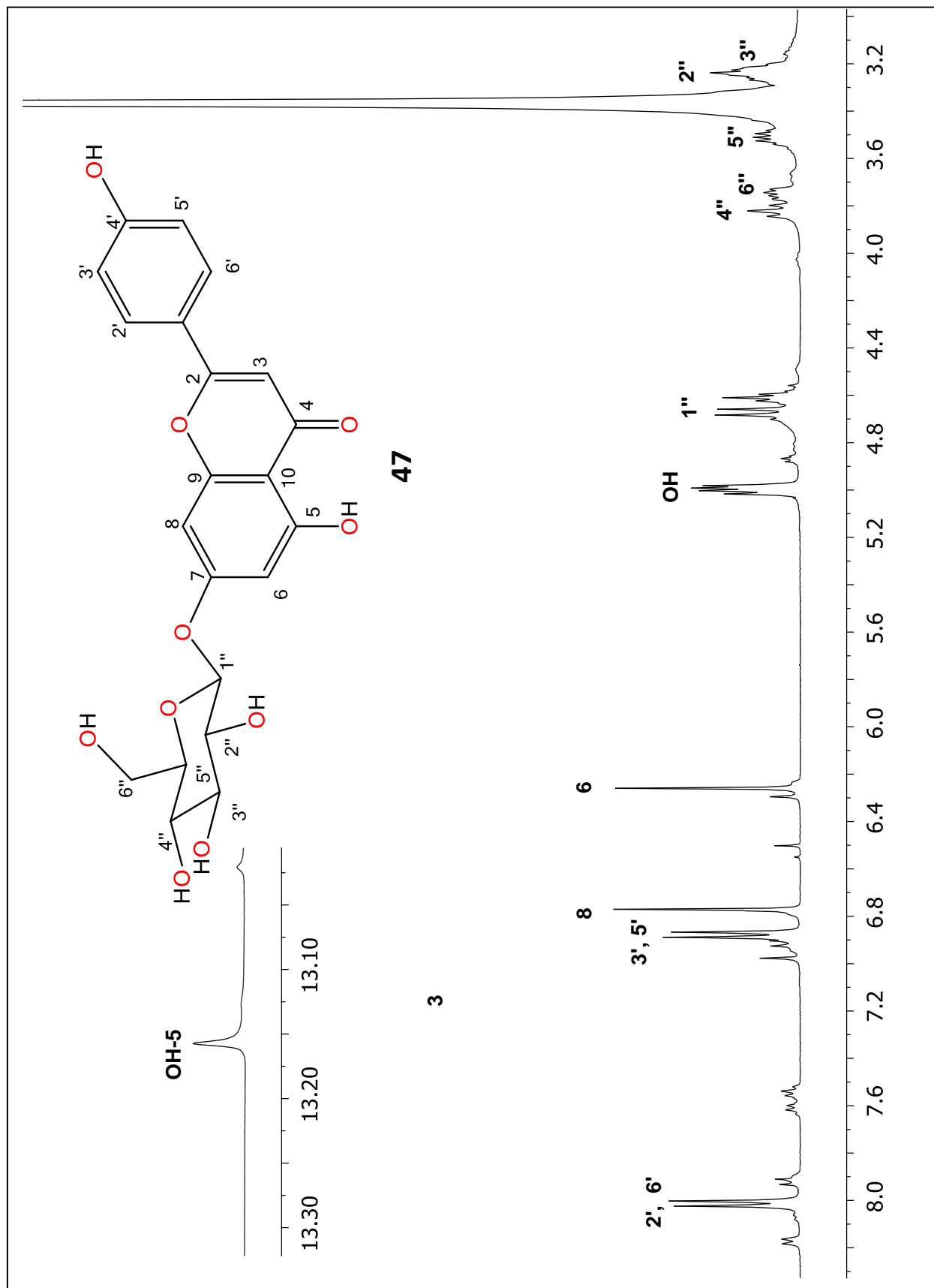


Figura 5.14. Espectro de RMN de ¹H de kaempferol-7-O-β-glucósido (47) 400 MHz, DMSO-d₆.

El estudio químico de las hojas de *M. rosei* se llevó a cabo en lotes colectados en 2016, 2017 y 2018, en ese último lote se aislaron los flavonoides antes mencionados crisina-7-O- β -glucósido (**45**) y crisina-8-C- β -D-glucósido (**46**) como los componentes mayoritarios, pero además se obtuvo otro compuesto mayoritario en forma de sólido amarillo claro con características físicas parecidas a **46**, se analizó por RMN, donde su espectro de protón (Figura 5.15) mostró en 13.42 ppm una señal simple, correspondiente al OH-5, en 10.71 ppm se observó una señal simple ancha del OH-7, en 8.07 ppm se ubicó una señal dd ($J = 8.0, 1.6$ Hz) asignada a H-2' y H-6', en 7.58 ppm se observó la señal múltiple correspondiente a H-3', H-4' y H-5'; en 6.97 y 6.55 ppm se ubicaron dos señales simples, y entre 4.89 y 3.14 ppm se observó el patrón característico de la presencia de azúcar en la molécula, cuyo protón anomérico se ubicó en 4.59 ppm como una señal doble ($J = 9.6$ Hz). Su espectro de RMN de ^{13}C (Figura 5.16) indicó que se trataba de un C-glicósido, debido al desplazamiento químico observado del carbono anomérico. Los datos experimentales se compararon con la bibliografía y coincidieron con la crisina-6-C- β -D-glucósido (Shrestha, 2018) (Tabla 5.9).

Tabla 5.9. Comparación de datos de RMN de ^1H y ^{13}C de crisina-6-*C*- β -D-glucósido (Shrestha, 2018) y datos experimentales del compuesto **56**, $\text{DMSO-}d_6$.

Posición	Crisina-6- <i>C</i> - β -Glucósido Shrestha, 2018		Experimental Compuesto 56	
	^1H (300 MHz)	^{13}C (75 MH)	^1H (400 MHz)	^{13}C (100 MHz)
2	-	163.6	-	163.5
3	6.98 s	105.1	6.97 s	105.1
4	-	182.1	-	182.1
5	-	160.7	-	160.6
6	-	109.1	-	109.1
7	-	163.0	-	162.9
8	6.57 s	94.1	6.55 s	93.7
9	-	156.4	-	156.6
10	-	103.7	-	103.7
1'	-	130.6	-	130.6
2'	8.07 d (7.2)	126.4	8.07 dd (8.0, 1.6)	126.4
3'	7.58 m	129.2	7.58 m	129.1
4'		132.1		132.0
5'		129.2		129.1
6'	8.07 d (7.2)	126.4	8.07 dd (8.0, 1.6)	126.4
1''	4.60 d (9.7)	73.0	4.59 d (9.6)	73.0
2''	3.69 d (11.5)	70.6	4.04 t (8.8)	70.6
3''	3.16 m	78.9	3.14 m	78.9
4''	3.16 m	70.2	3.17 m	70.2
5''	3.40 dt (4.9, 4.9)	81.6	3.40 m	81.6
6''	4.33 t 4.06 t (8.8)	61.5	3.68 dd (11.6, 2.0)	61.4
OH-5	13.43 s	-	13.42 s	-
OH-7	10.79 s	-	10.71 s	-

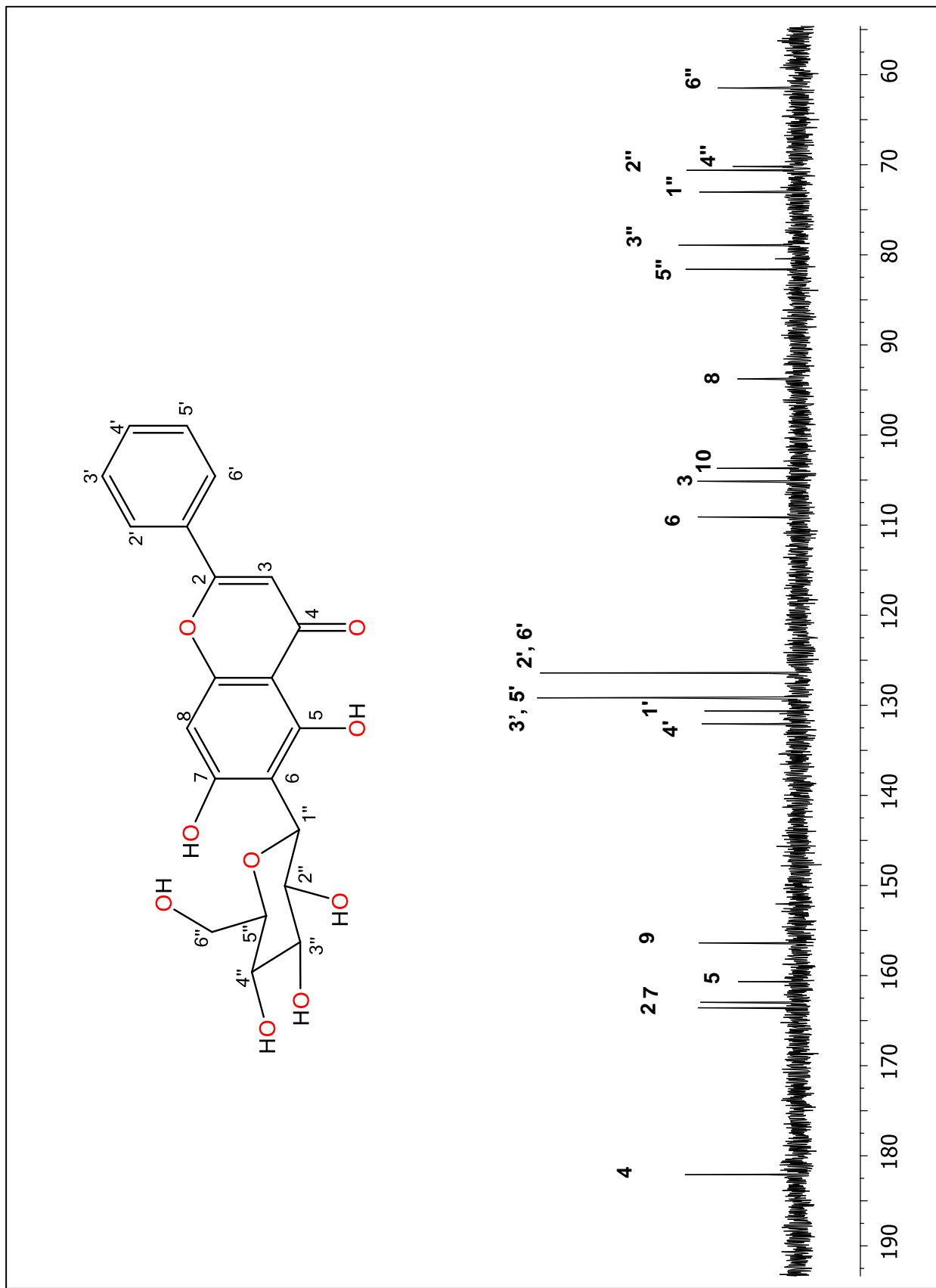


Figura 5.16. Espectro de RMN de ¹³C de crisina-6-C-β-D-glucósido (**56**) 100 MHz, DMSO-d₆.

- **Estudio Químico de extractos de tallos de *M. rosei***

Cada uno de los extractos (hexánicos, CH₂Cl₂ y de MeOH) se dividieron primeramente en 7 fracciones enriquecidas, obtenidas en polaridades crecientes (1:0, 4:1, 3:2, 1:1, 2:3, 1:4 y 0:1) de mezclas de hexanos-AcOEt para el caso de los extractos hexánicos y CH₂Cl₂ y mezclas de CH₂Cl₂-MeOH para el extracto metanólico. Las fracciones enriquecidas se monitorearon mediante TLC y RMN de ¹H donde se encontraron 3 compuestos mayoritarios presentes en los tres extractos. Recromatografías de las fracciones que presentaban mayor abundancia de estos, llevaron a la obtención de un sólido blanco tendiente a cristalizar, al analizar su espectro de RMN de ¹H (Figura 5.17) se observó la mezcla en proporción 1:4 de estigmasterol (**6**) y β-sitosterol (**7**), cuyo perfil de solubilidad se resume en la Tabla 5.10.



Tabla 5.10. Perfil de solubilidad de la mezcla **6** y **7**.

Disolvente		Disolvente		Disolvente	
Hexanos	I	AcOEt	S	Metanol	S
CH ₂ Cl ₂	S	Acetona	I	DMSO	S
CHCl ₃	S	Acetonitrilo	I	H ₂ O	I

S (soluble), I (insoluble)

El otro compuesto mayoritario aislado de los extractos de tallos se obtuvo como un sólido blanco. En su espectro de RMN de ¹H (Figura 5.18) mostró un patrón de señales característico de triterpenos, en 4.69 ppm se observó una señal doble ancha con $J = 2.4$ Hz, en 4.57 ppm se apreció una señal doble de dobles ($J = 2.4$ y 1.2 Hz), en 3.20 ppm se observó una señal doble de dobles base de alcohol ($J = 11.6$ y 5.2 Hz), entre 2.38 y 0.68 ppm se encontraron las demás señales correspondientes a la parte alifática de la estructura. Los datos de RMN de ¹³C (Tabla 5.11) confirmaron la presencia de un triterpeno, los cuales coinciden con lupeol (**11**), el cual ya se ha reportado en otras especies del género (Nery, 2015).

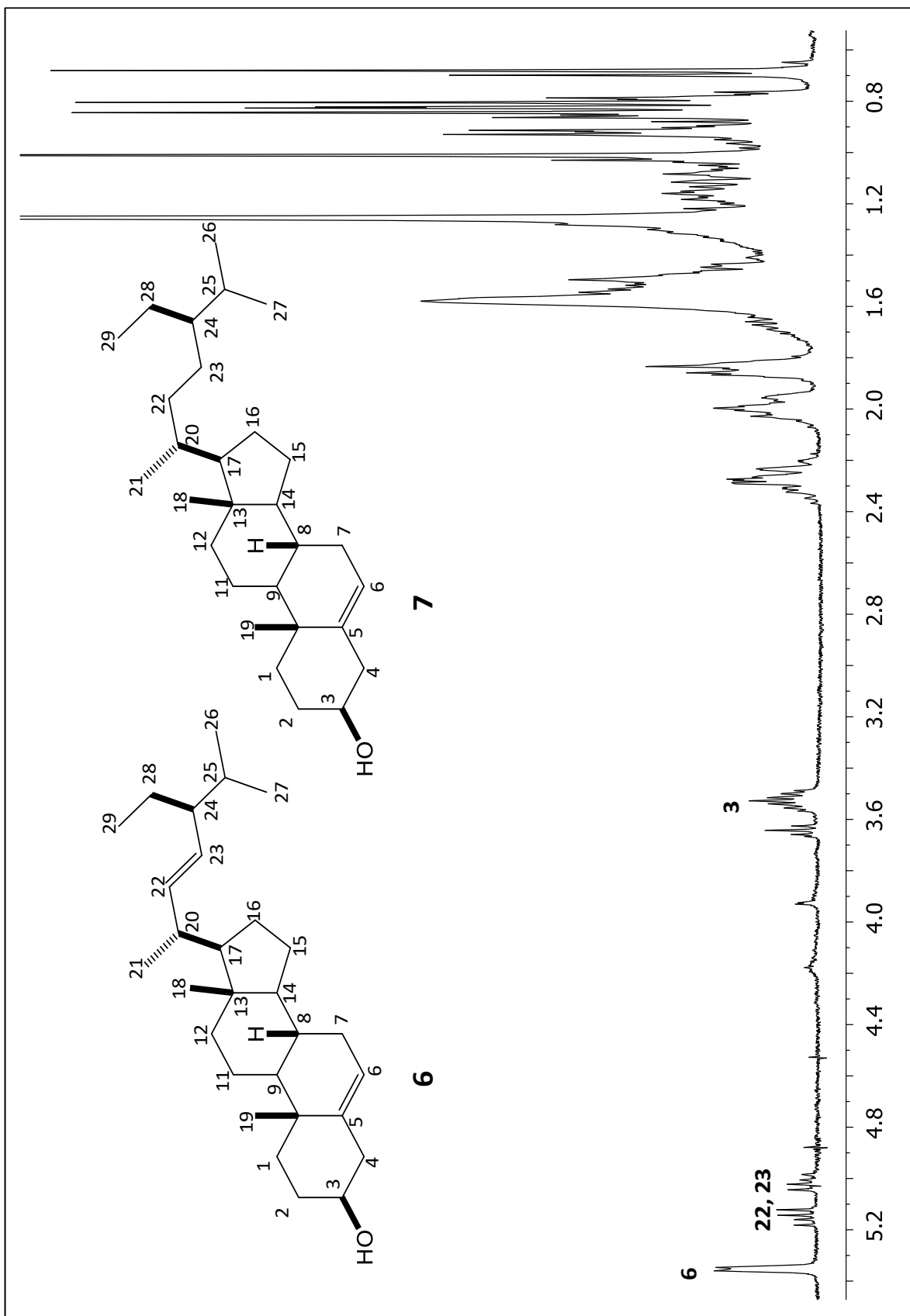


Figura 5.17. Espectro de RMN de ^1H de la mezcla de estigmasterol (6) y β -sitosterol (7) 400 MHz, CDCl_3 .

Tabla 5.11. Comparación de datos experimentales de RMN de ^{13}C de lupeol (**11**) con la literatura (Silva, 2017).

Posición	Lupeol (Silva, 2017)	Experimental lupeol (11)
1	38.0	38.9
2	27.4	27.4
3	79.0	79.0
4	38.7	38.8
5	55.3	55.2
6	18.3	18.3
7	34.3	34.2
8	40.8	40.8
9	50.4	50.4
10	37.2	37.8
11	20.9	20.9
12	25.2	25.1
13	38.9	38.6
14	42.8	42.9
15	27.5	27.3
16	35.6	35.1
17	43.0	42.8
18	48.3	48.3
19	48.0	47.9
20	150.9	150.9
21	29.8	29.8
22	40.0	40.5
23	28.0	27.9
24	15.4	15.9
25	16.1	16.1
26	16.0	15.8
27	14.6	14.5
28	18.0	17.9
29	109.3	109.3
30	19.3	19.3

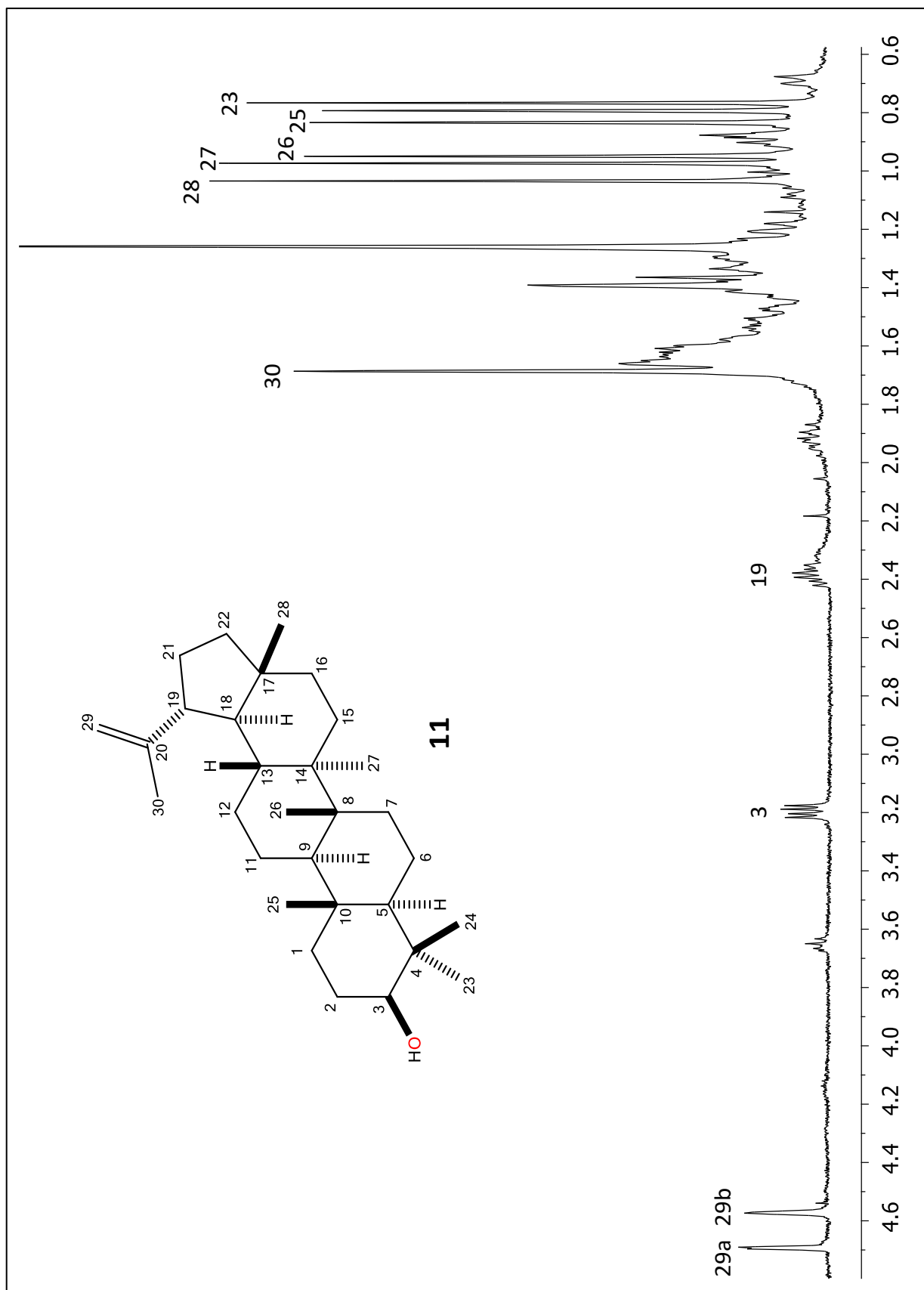


Figura 5.18. Espectro de RMN de ¹H del lupeol (**11**) 400 MHz, CDCl₃.

- **Estudio Químico de extractos de flores de *M. rosei*.**

El análisis por RMN de ^1H de los extractos hexánicos y CH_2Cl_2 indicaron la presencia de ácidos grasos y triglicéridos como los componentes mayoritarios (Figura 5.19); por otro lado, la recromatografía en columna del extracto metanólico utilizando mezclas de CH_2Cl_2 -MeOH, condujo al aislamiento de un compuesto en forma de sólido amarillo con un perfil de solubilidad mostrado en la Tabla 5.12.



Tabla 5.12. Perfil de solubilidad de **48**.

Disolvente		Disolvente		Disolvente	
Hexanos	I	AcOEt	I	Metanol	S
CH_2Cl_2	I	Acetona	S	DMSO	S
CHCl_3	I	Acetonitrilo	I	H_2O	I

S (soluble), I (insoluble)

En su espectro de RMN de ^1H (Figura 5.20) se observó en 12.97 ppm una señal simple correspondiente al puente de hidrógeno del OH en posición 5; en 7.40 ppm se ubicó una señal doble de dobles con $J = 8.2$ y 2.2 Hz, en 7.37 ppm se encontró una señal doble ($J = 2.2$ Hz) y en 6.85 ppm otra señal doble ($J = 8.2$ Hz) indicando una doble sustitución en el anillo B del flavonoide; en 6.64 ppm se observó una señal simple correspondiente al protón vinílico 3, en 6.42 y 6.15 ppm se encontraron dos señales dobles ($J = 1.9$ Hz) correspondientes al anillo A. El espectro de RMN de ^{13}C (Figura 5.21) mostró 15 señales, donde el carbono de carbonilo se ubicó en 181.6 ppm y el resto de las señales entre 164.7 y 93.8 ppm, los datos se compararon con los de la literatura (Alwahs, 2015) y coincidieron para el flavonoide luteolina (**48**) el cual se encuentra como mayoritario en el extracto metanólico de flor.

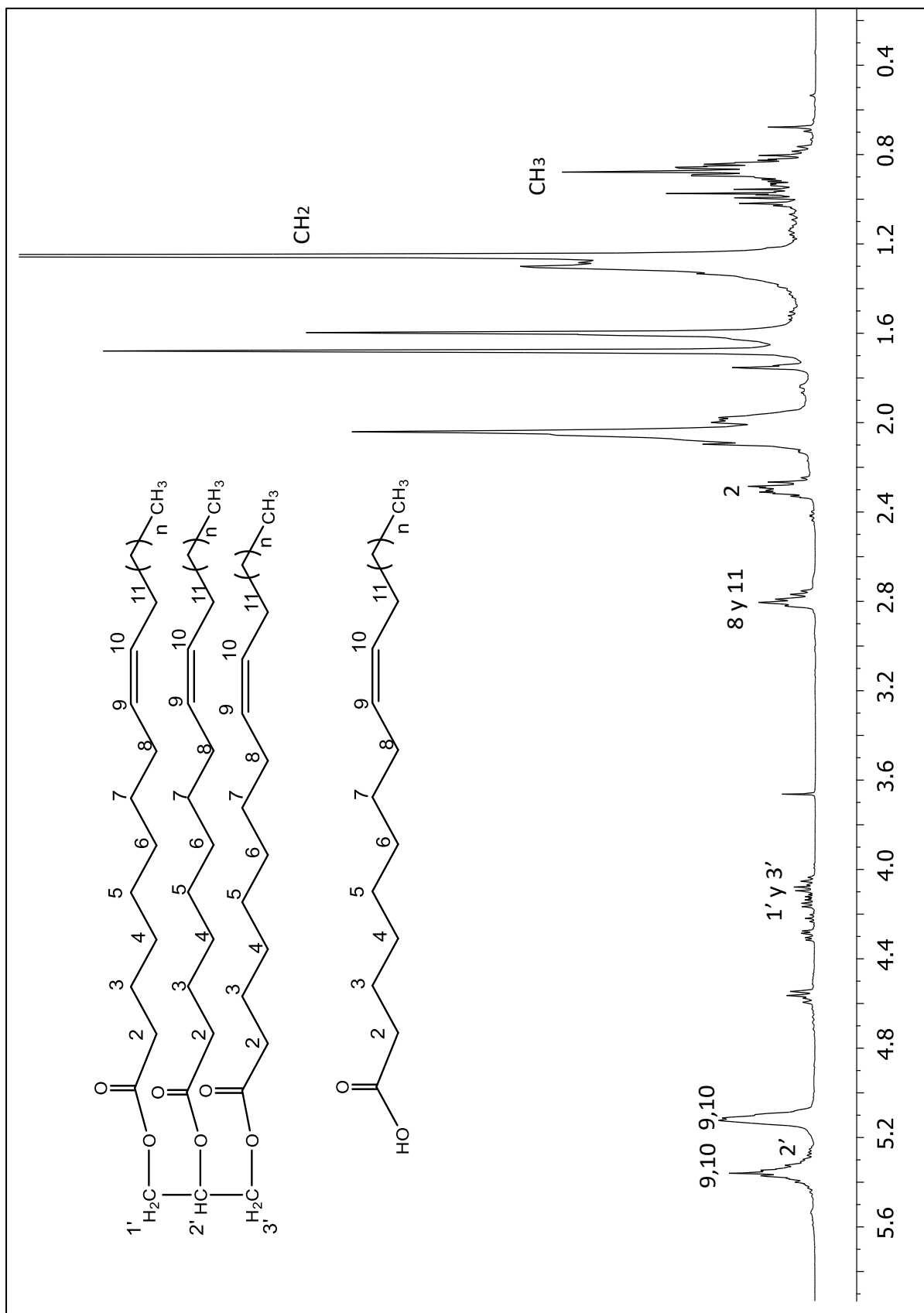


Figura 5.19. Espectro de RMN de ^1H de ácidos grasos y triglicéridos aislados de extractos de flores 400 MHz, CDCl_3 .

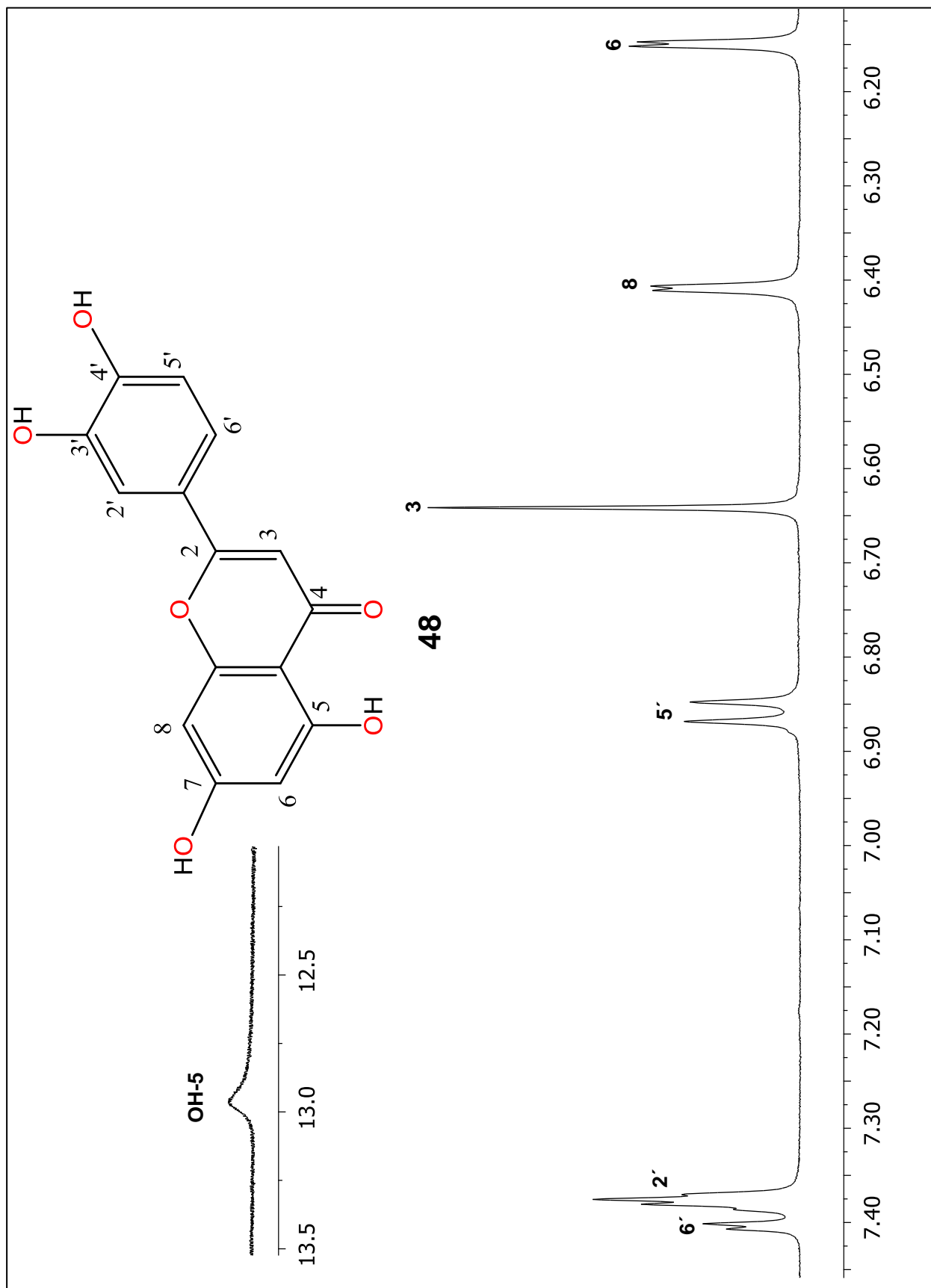


Figura 5.20. Espectro de RMN de ¹H de luteolina (48) 400 MHz, DMSO-*d*₆.

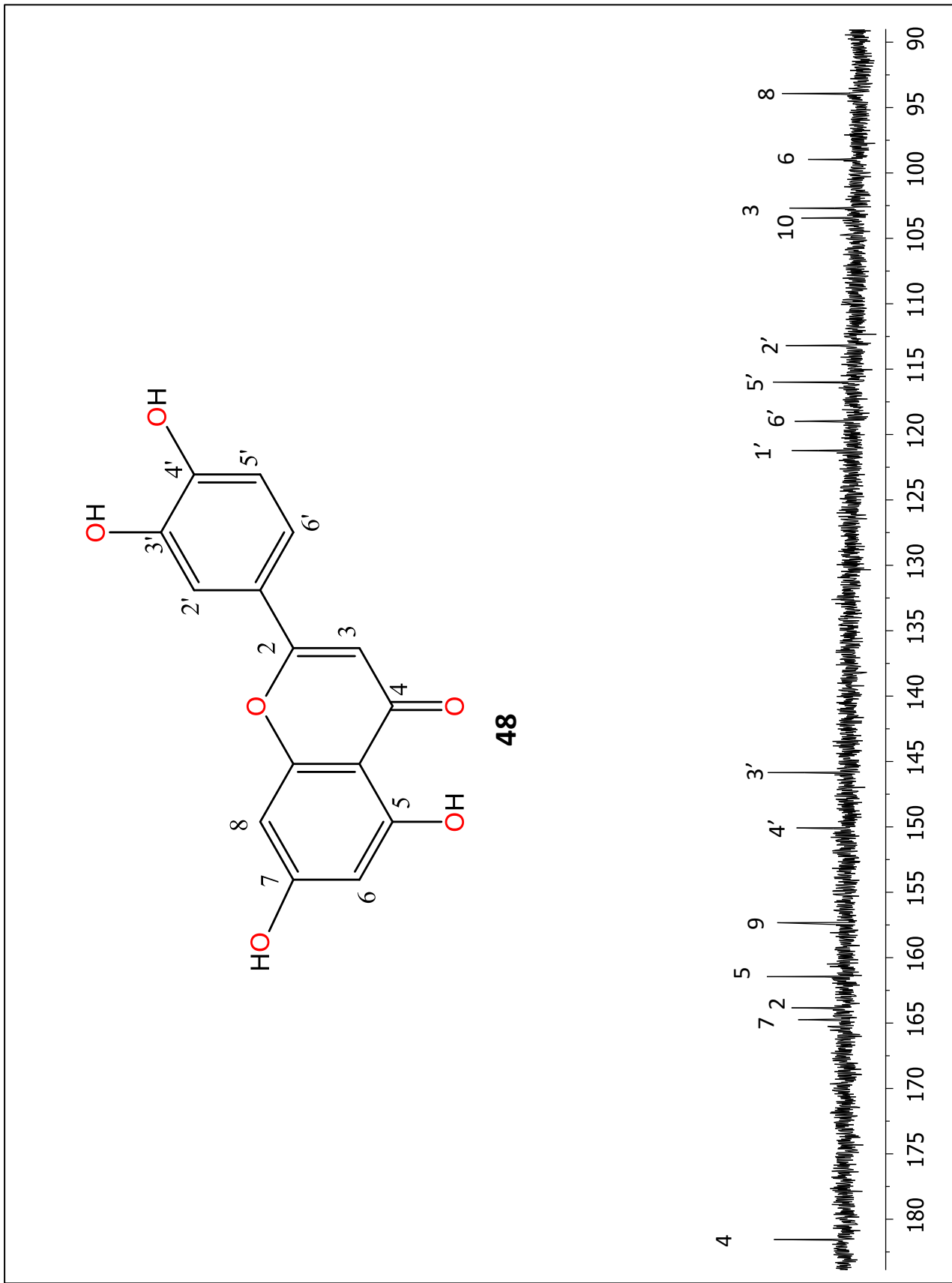


Figura 5.21. Espectro de RMN de ^{13}C de luteolina (48) 100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$.

- **Estudio Químico de extractos de *M. spirocarpa***

El procesamiento de los extractos de esta especie se llevó a cabo igual que con *M. rosei*, primeramente, se obtuvieron fracciones enriquecidas de cada extracto mediante cromatografía en columna y posteriormente con recromatografías se obtuvieron los metabolitos mayoritarios de hojas y tallos. A partir de los extractos hexánicos y de diclorometano de hojas se obtuvo al *n*-triacontanol (**41**), mientras que del extracto metanólico se aisló la mezcla de β -sitosterol (**43**) y estigmasterol (**44**) ambos en su forma glucosilada, además de que fue abundante en azúcares libres. A partir de los tallos se obtuvieron la mezcla de estigmasterol (**6**) y β -sitosterol (**7**), así como al lupeol (**11**). Los cuales se encontraron en los tres extractos obtenidos, pero mayoritariamente en el extracto de diclorometano.

- **Preparación de derivados de metabolitos mayoritarios aislados**

Debido a la abundancia de los flavonoides crisina-*O*- β -D-glucósido (**45**) y crisina-8-*C*- β -D-glucósido (**46**) aislados de hojas de *M. rosei*, se seleccionaron para someterlos a reacciones de derivatización para la obtención de nuevos compuestos que puedan tener potenciales efectos biológicos; debido a que fueron compuestos polihidroxilados, se prepararon sus ésteres.

Se ensayaron condiciones para la preparación de los derivados peracetilados utilizando condiciones estándar de acetilación con anhídrido acético y piridina y llevándose las reacciones sobre baño de vapor para favorecer la completa acetilación. Los productos de reacción **49** (derivado de **45**) y **50** (derivado de **46**) se analizaron por RMN de ^1H y ^{13}C . El compuesto **49** se obtuvo en un rendimiento del 85% como cristales incoloros en forma de aguja, p.f. 193-195°C los cuales fueron solubles en la mayoría de los disolventes que se usaron para las pruebas de solubilidad (Tabla 5.13).

Tabla 5.13. Perfil de solubilidad de **49**.



Disolvente		Disolvente		Disolvente	
Hexanos	I	AcOEt	S	Metanol	PS
CH ₂ Cl ₂	S	Acetona	S	DMSO	S
CHCl ₃	S	Acetonitrilo	S	H ₂ O	I

S (soluble), I (insoluble)

Su espectro de RMN de ^1H (Figura 5.22) mostró las señales que corresponden al núcleo del flavonoide entre 8.00 y 6.60 ppm, entre 2.40 y 2.00 ppm se observaron las 5 señales simples correspondientes a los metilos de acetilo incorporados; además, las señales de los hidrógenos de la glucosa que se encontraban entre 3.50 y 3.10 ppm, ahora se encontraron entre 5.50 y 4.00 ppm, este compuesto fue reportado por el grupo de Pearl en 1971, sin embargo hasta ahora se describen sus datos de RMN de ^1H y ^{13}C (Tabla 5.14).

El derivado peracetilado de crisina-8-C- β -D-glucósido se obtuvo en un rendimiento del 80% como un sólido blanco con un perfil de solubilidad igual al de **49** (Tabla 5.13), el espectro de RMN de ^1H (Figura 5.23) mostró las señales características en 7.85 y 7.52 ppm de anillo aromático B y en 7.34 y 6.64 ppm las señales de los protones aromáticos 6 y 3, respectivamente; las señales de la glucosa se desplazaron a campo bajo encontrándose entre 5.73 y 3.83 ppm, en 2.50 y 2.48 ppm se encontraron las dos señales simples de los metilos de acetato 7 y 5, y entre 2.07 y 1.83 ppm se ubicaron las cuatro señales de los acetatos de la glucosa. El compuesto **50** no se encuentra reportado por lo que se trata de un nuevo derivado. Los datos de RMN de ^{13}C de **49** y **50** se encuentran resumidos en la Tabla 5.14.

Tabla 5.14. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H a 400 MHz y de ^{13}C a 100 MHz (CDCl_3) del derivado peracetilado de crisina-7- O - β -D-glucósido (**49**) y el derivado peracetilado de crisina-8- C - β -D-glucósido (**50**).

Posición	49		50	
	δ ^1H en ppm, multiplicidad (J en Hz)	δ ^{13}C en ppm	δ ^1H en ppm, multiplicidad (J en Hz)	δ ^{13}C en ppm
2	-	159.9	-	162.5
3	6.63 s	108.5	6.65 s	111.7
4	-	176.3	-	176.1
5	-	158.4	-	153.2
6	6.70 d (2.4)	109.3	7.34 s	108.6
7	-	162.4	-	157.3
8	7.02 d (2.4)	102.6	-	118.9
9	-	150.7	-	148.6
10	-	112.9	-	114.5
1'	-	131.1	-	130.7
2'	7.85 dd (8.0, 1.6)	126.1	7.84 dd (8.0, 1.6)	126.1
3'	7.53 m	129.1	7.52 m	129.0
4'	7.53 m	131.7	7.52 m	131.8
5'	7.53 m	129.1	7.52 m	129.0
6'	7.85 dd (8.0, 1.6)	126.1	7.84 dd (8.0, 1.6)	126.1
1''	5.26 d (7.6)	98.1	4.86 d (9.6)	72.3
2''	5.31 m	70.8	5.74 t (9.6)	70.4
3''	5.33 m	72.1	5.33 t (9.6)	76.4
4''	5.19 t (9.6)	68.1	5.18 t (10.0)	68.0
5''	3.99 ddd (12.0, 6.0, 2.6)	72.4	3.82 ddd (12.0, 4.0, 1.6)	89.4
6''	4.28 dd (12.0, 6.0) 4.22 dd (12.0, 2.6)	61.9	4.42 dd (12.0, 4.0) 4.0 d	60.3
CO_2CH_3 -5	2.45 s	29.7	2.49	29.6
CO_2CH_3 -7	-	-	2.51	29.6
CO_2CH_3 2''- 6''	2.08-2.05 s	21.1-20.6	2.07-1.82	21.0-20.0
CO_2CH_3 -5	-	170.5	-	170.4
CO_2CH_3 -7	-	-	-	170.2
CO_2CH_3 2''- 6''	-	170.1-169.2	-	169.5-167.8

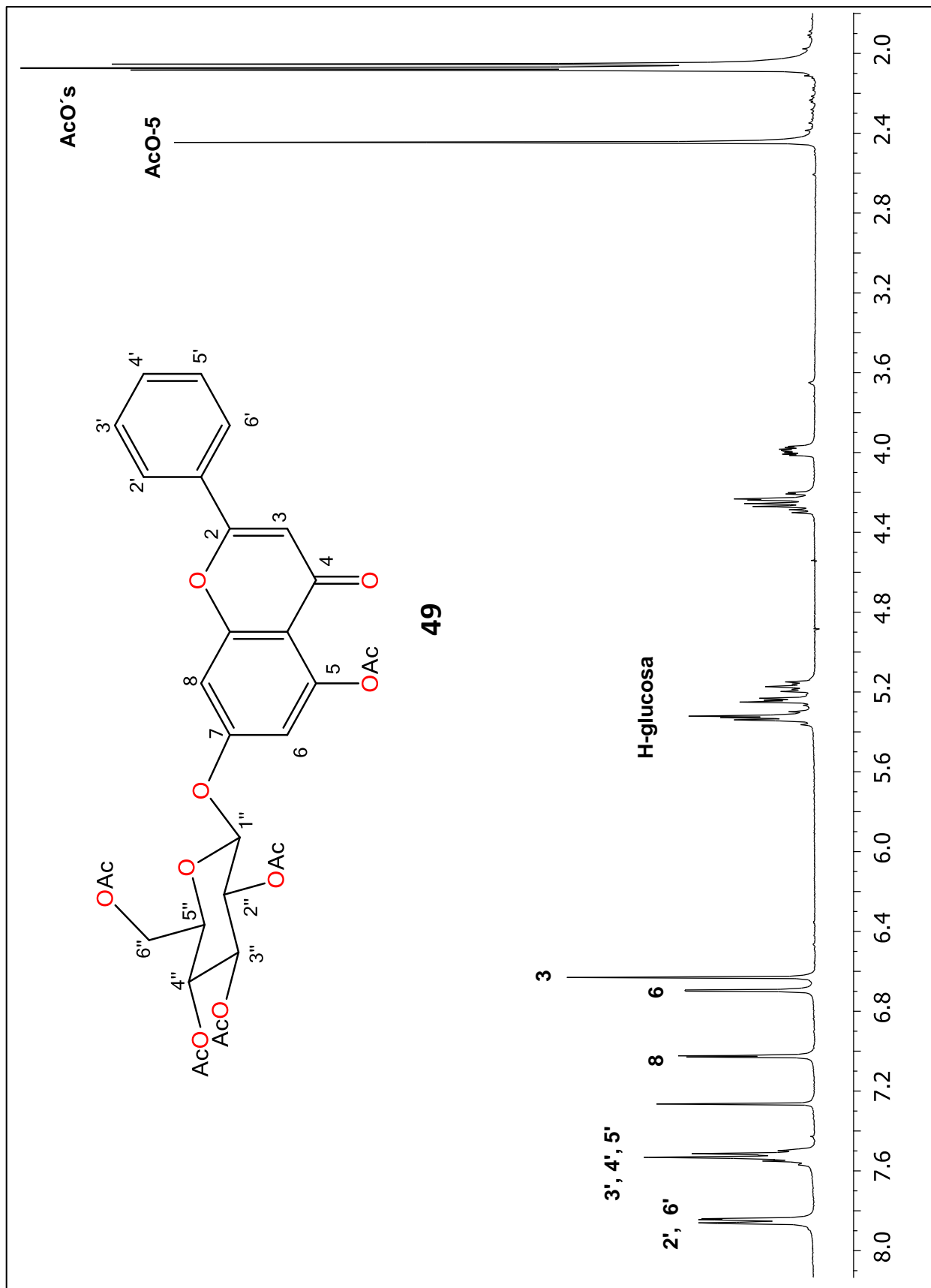


Figura 5.22. Espectro de RMN de ¹H del derivado peracetilado de crisina-7-O-β-D-glucósido (**49**) 400 MHz, CDCl₃.

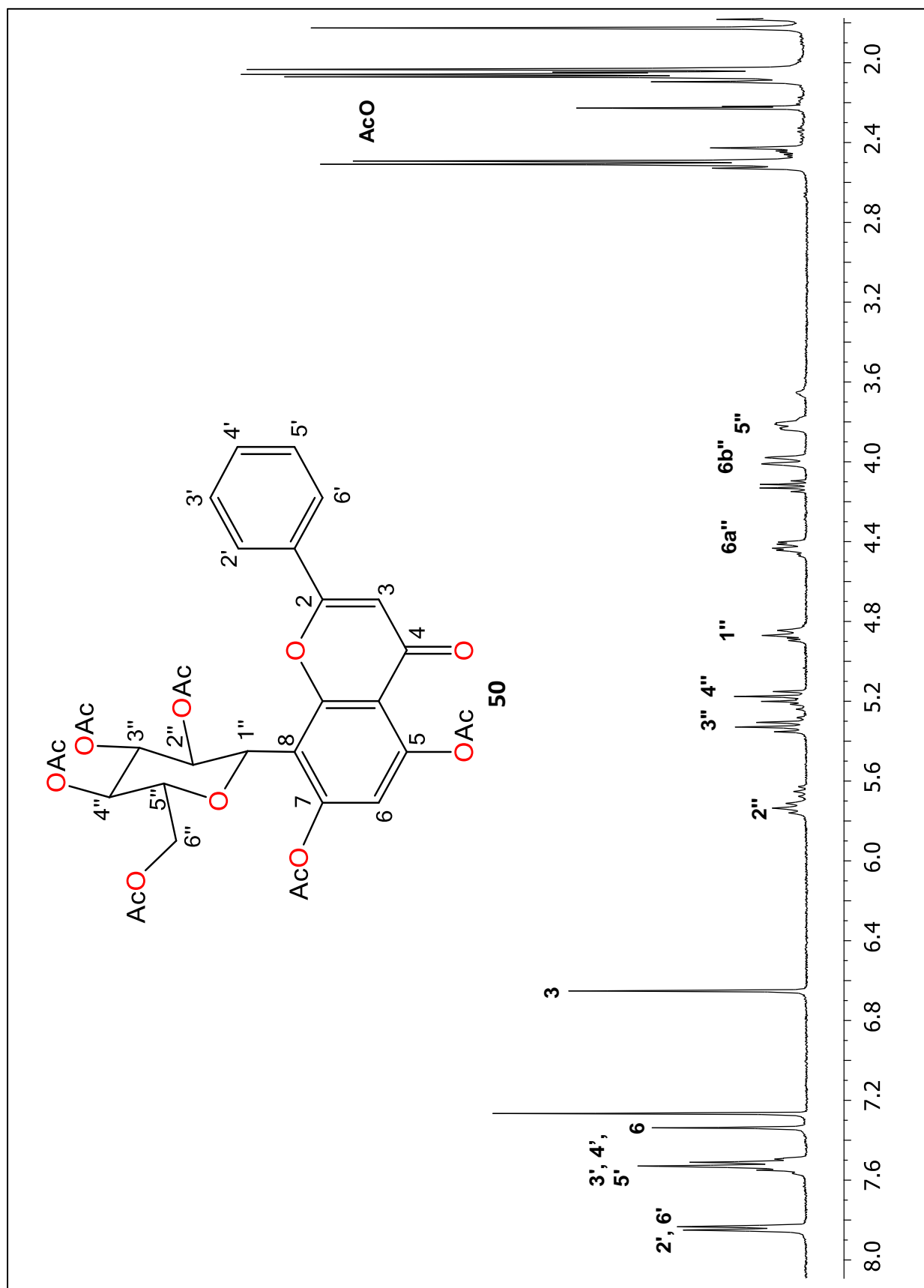


Figura 5.23. Espectro de RMN de ^1H del derivado peracetilado de crisina-8-C-β-D-glucósido (**50**) 400 MHz, CDCl_3 .

Además de los derivados peracetilados, se ensayaron las condiciones para la obtención de los carbonatos de metilo y etilo. El percarbonato de metilo de crisina-7-*O*- β -D-glucósido (**51**), se obtuvo en un 47% de rendimiento, como un sólido blanco con un perfil de solubilidad mostrado en la Tabla 5.15. En su espectro de RMN de ^1H (Figura 5.24) se observaron las señales del azúcar, en 5.30 ppm se apreció una señal doble del protón anomérico H-1" ($J = 7.6$ Hz), en 5.24 ppm se observó una señal triple ($J = 9.2$ Hz) asignada a H-3", en 5.16 ppm se apreció una señal doble de dobles ($J = 9.2$ y 7.5 Hz) del H-2", en 5.02 ppm se encontró una señal triple ($J = 9.2$ Hz) correspondiente al H-4" y en 4.37 y 4.06 ppm se observaron dos señales múltiples atribuidas a H-6" y H-5", respectivamente. Las cinco señales simples encontradas entre 3.99 y 3.71 ppm correspondientes a los metoxilos de los carbonatos incorporados, indicaron la completa carbonatación de la molécula.

El percarbonato de metilo de crisina-8-*C*- β -D-glucósido (**52**), se obtuvo en un 40% de rendimiento, como un sólido blanco con un perfil de solubilidad igual que el mostrado para el compuesto **51** (Tabla 5.15). Los datos obtenidos de su espectro de RMN de ^1H (Figura 5.25) mostró las señales del núcleo de crisina entre 7.85 y 6.70 ppm, las señales correspondientes al azúcar se observaron entre 5.46 y 4.29 ppm, y entre 3.99 y 3.77 ppm se ubicaron seis señales simples correspondientes a los OMe de los carbonatos incorporados. Además, los compuestos se consideran nuevos, debido a que no hay reportes de estos en la literatura.

Tabla 5.15. Perfil de solubilidad de **51** y **52**.

Disolvente		Disolvente		Disolvente	
Hexanos	I	AcOEt	S	Metanol	PS
CH ₂ Cl ₂	S	Acetona	S	DMSO	S
CHCl ₃	S	Acetonitrilo	S	H ₂ O	I

S (soluble), I (insoluble), PS (parcialmente soluble)

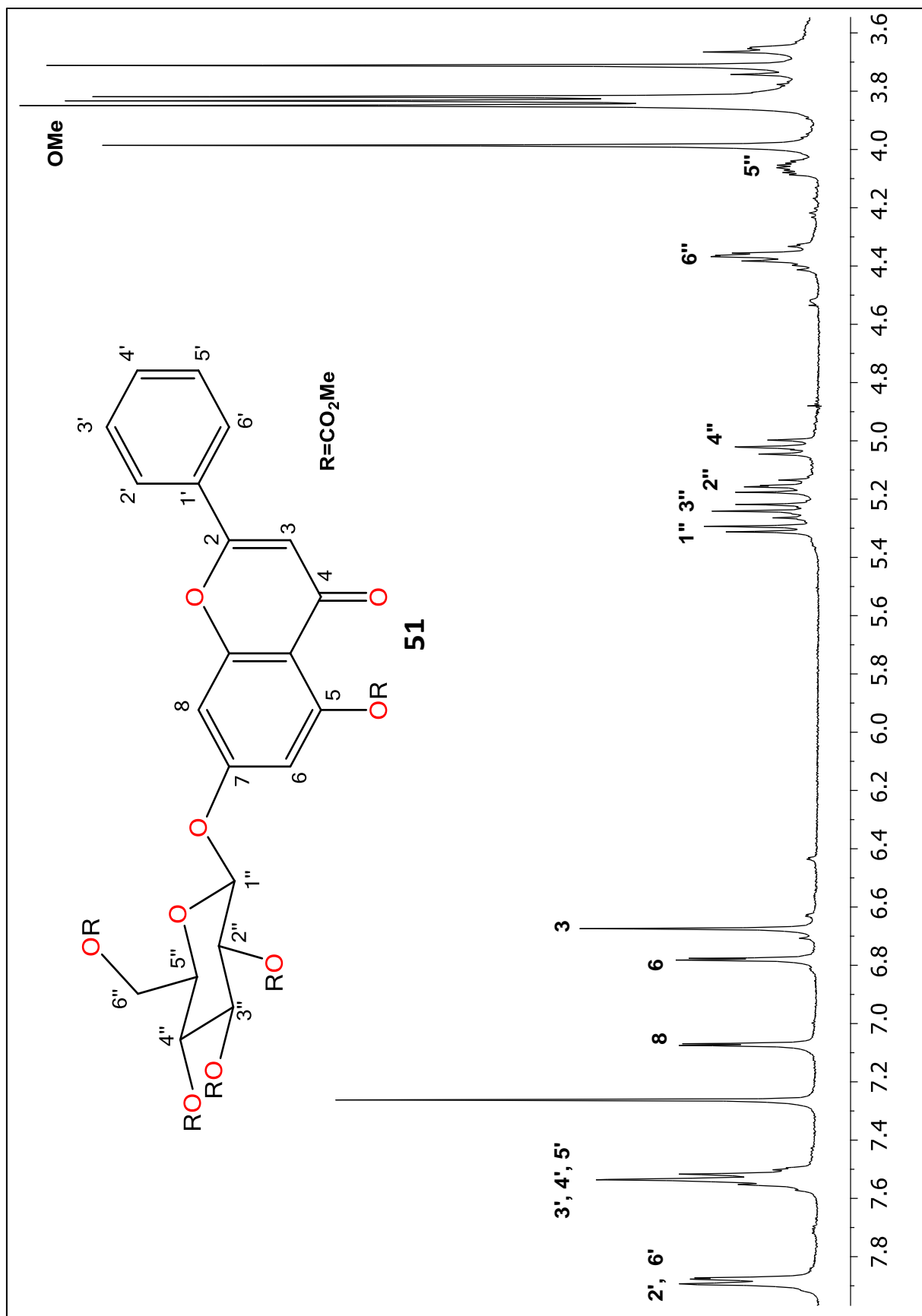


Figura 5.24. Espectro de RMN de ¹H del derivado metil percarbonato de crisina-7-O-β-D-glucósido (**51**) 400 MHz, CDCl₃.

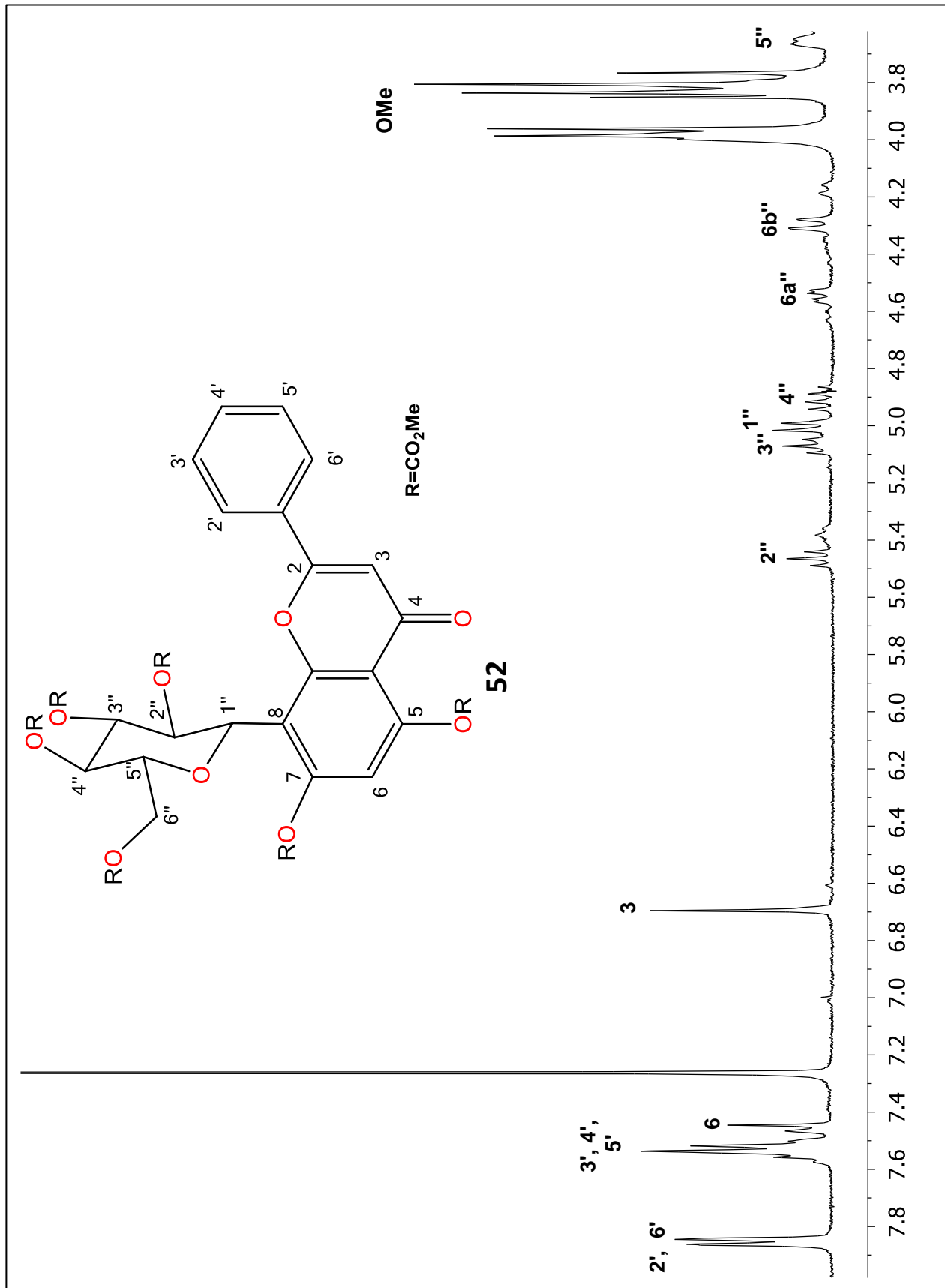


Figura 5.25. Espectro de RMN de ¹H del derivado metil percarbonato de crisina-8-C-β-D-glucósido (52) 400 MHz, CDCl₃.

La preparación de los etil percarbonatos de los glucósidos de crisina se llevaron a cabo con piridina y cloroformiato de etilo en agitación por 5 h. El derivado etil percarbonato de crisina-7-*O*- β -D-glucósido (**53**), se obtuvo como sólido amorfo de color blanco, p.f. 77-75 °C, con un rendimiento del 89% y con características de solubilidad similar a los carbonatos de metilo (Tabla 5.15), su espectro de RMN de ^1H (Figura 5.26) mostró las señales cuádruples correspondientes a los CH_2 , mientras que entre 1.40 y 1.20 ppm se ubicaron las señales triples de los CH_3 . El espectro de RMN de ^{13}C (Figura 5.27) confirmó la completa carbonatación, ya que se observaron cinco nuevas señales en 162.3, 159.6, 158.2, 154.6 y 154.4 ppm correspondientes a los carbonilos de los carbonatos.

Por su parte, la reacción para la obtención del etil percarbonato de crisina-8-*C*- β -D-glucósido (**54**) resultó en varios productos, por lo que se sometió a purificación en cromatografía en columna, utilizando mezclas de hexanos-AcOEt en proporción 3:2 con lo cual se obtuvo un sólido blanco amorfo, p.f. 90-92 °C, con un rendimiento del 56% cuyo espectro de RMN de ^1H (Figura 5.28) mostró una modificación en la multiplicidad de las señales encontradas en 7.84 ppm correspondiente a los H-2' y H-6' y en 7.57 ppm correspondiente a H-3', H-4' y H-5' ahora presentándose como señales simples anchas, indicando que los grupos carbonato incorporados presentan influencia en la porción del anillo B debido a la cercanía espacial que presentan. Las señales del azúcar se recorrieron a campo bajo encontrándose ahora entre 5.43-4.07 ppm además se observó la aparición de las señales cuádruples de los grupos etilo entre 4.44 y 3.92 ppm y entre 1.50 y 0.86 ppm se observaron las señales triples de los metilos de carbonato. El espectro de ^{13}C (Figura 5.29) confirmó la completa carbonatación del compuesto, ya que se observaron seis nuevas señales entre 154.7-151.3 ppm que correspondieron a los carbonilos de los carbonatos. Cabe destacar que todos los derivados carbonatados se tratan de compuestos nuevos.

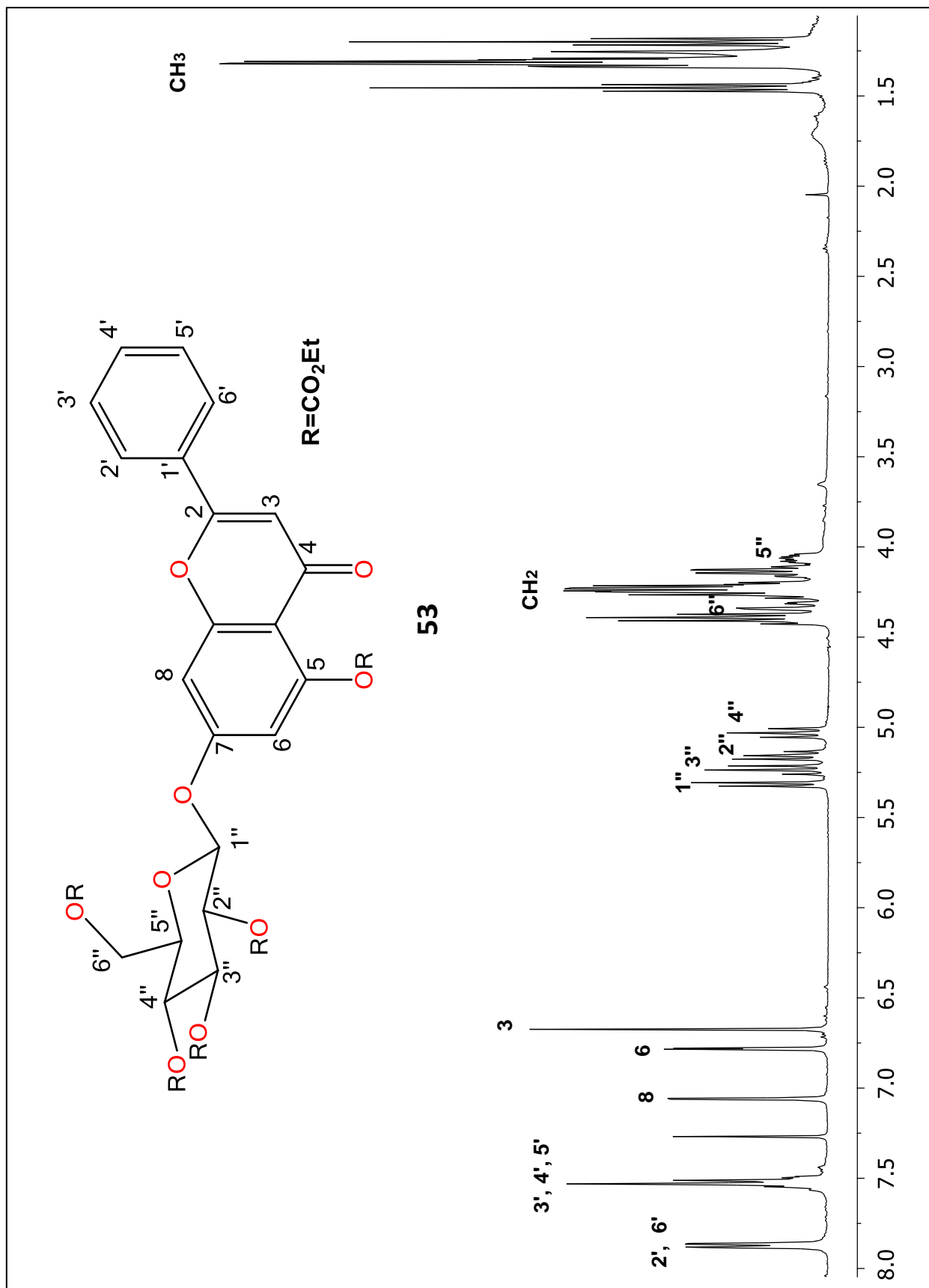


Figura 5.26. Espectro de RMN de ^1H del derivado etil percarbonato de crisina-7-O- β -D-glucósido (**53**) 400 MHz, CDCl_3 .

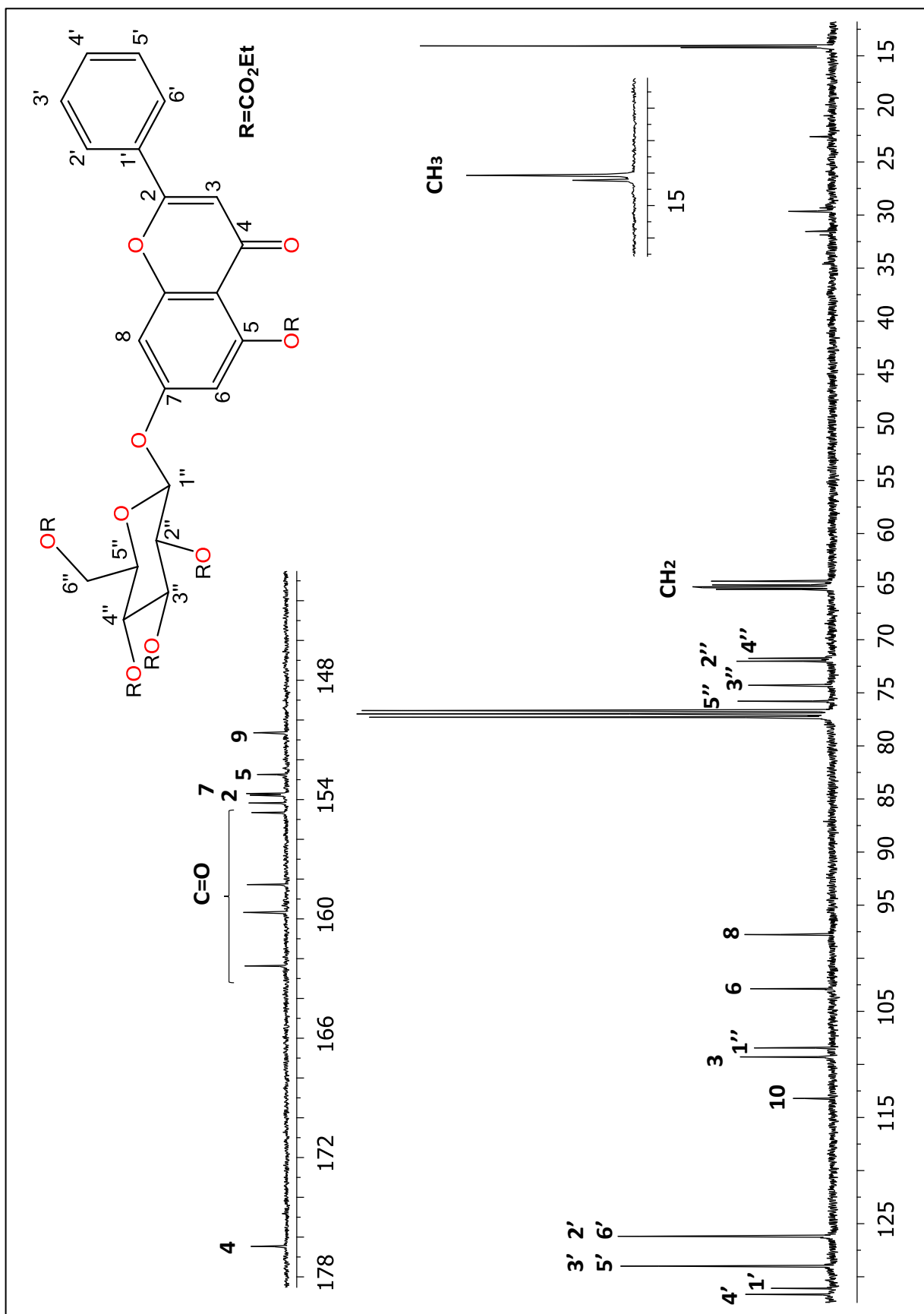


Figura 5.27. Espectro de RMN de ¹³C del derivado etil percarbonato de crisina-7-O-β-D-glucósido (**53**) 100 MHz, CDCl₃.

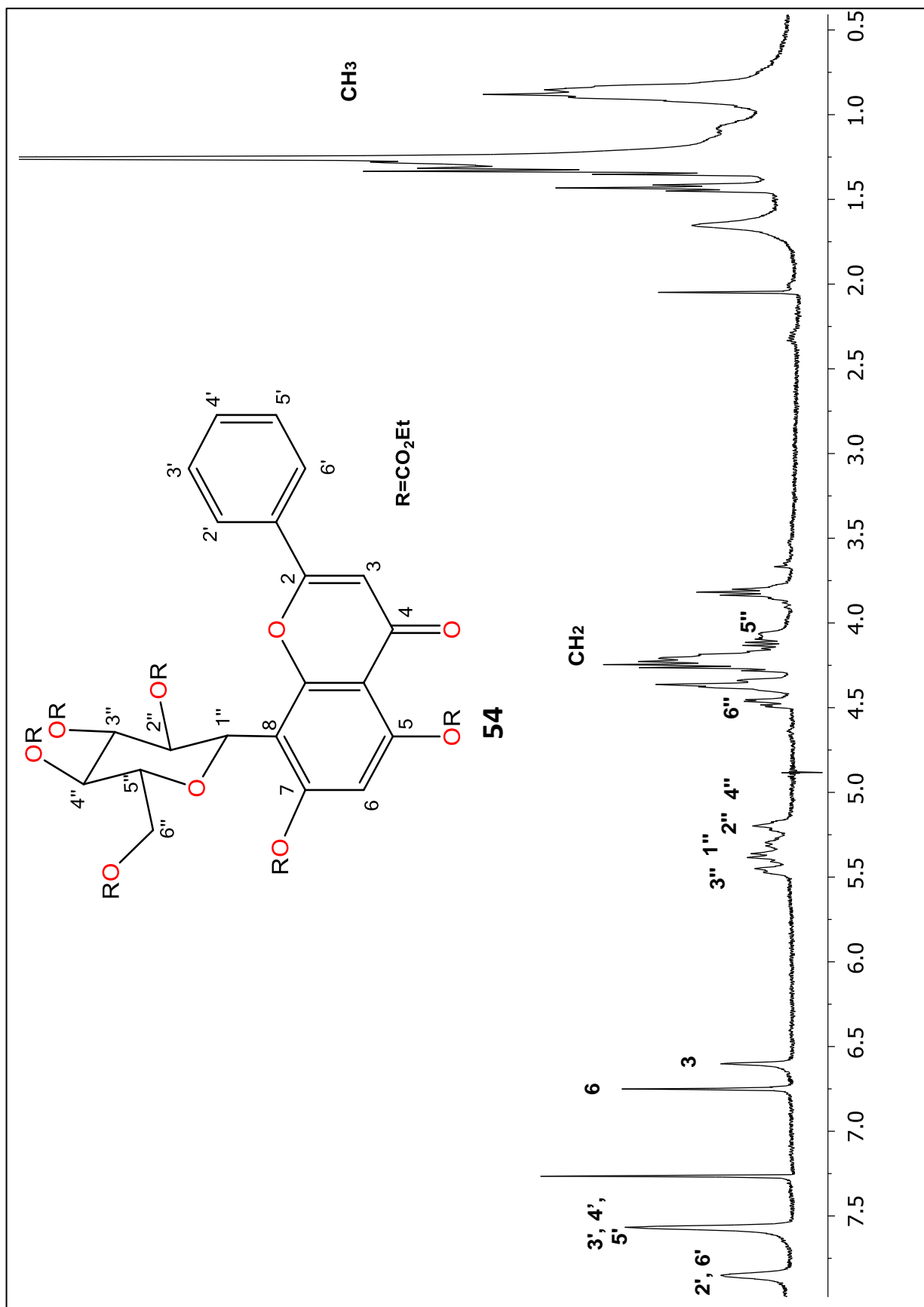


Figura 5.28. Espectro de RMN de ¹H del derivado etil percarbonato de crisina-8-C-β-D-glucósido (**54**) 400 MHz, CDCl₃.

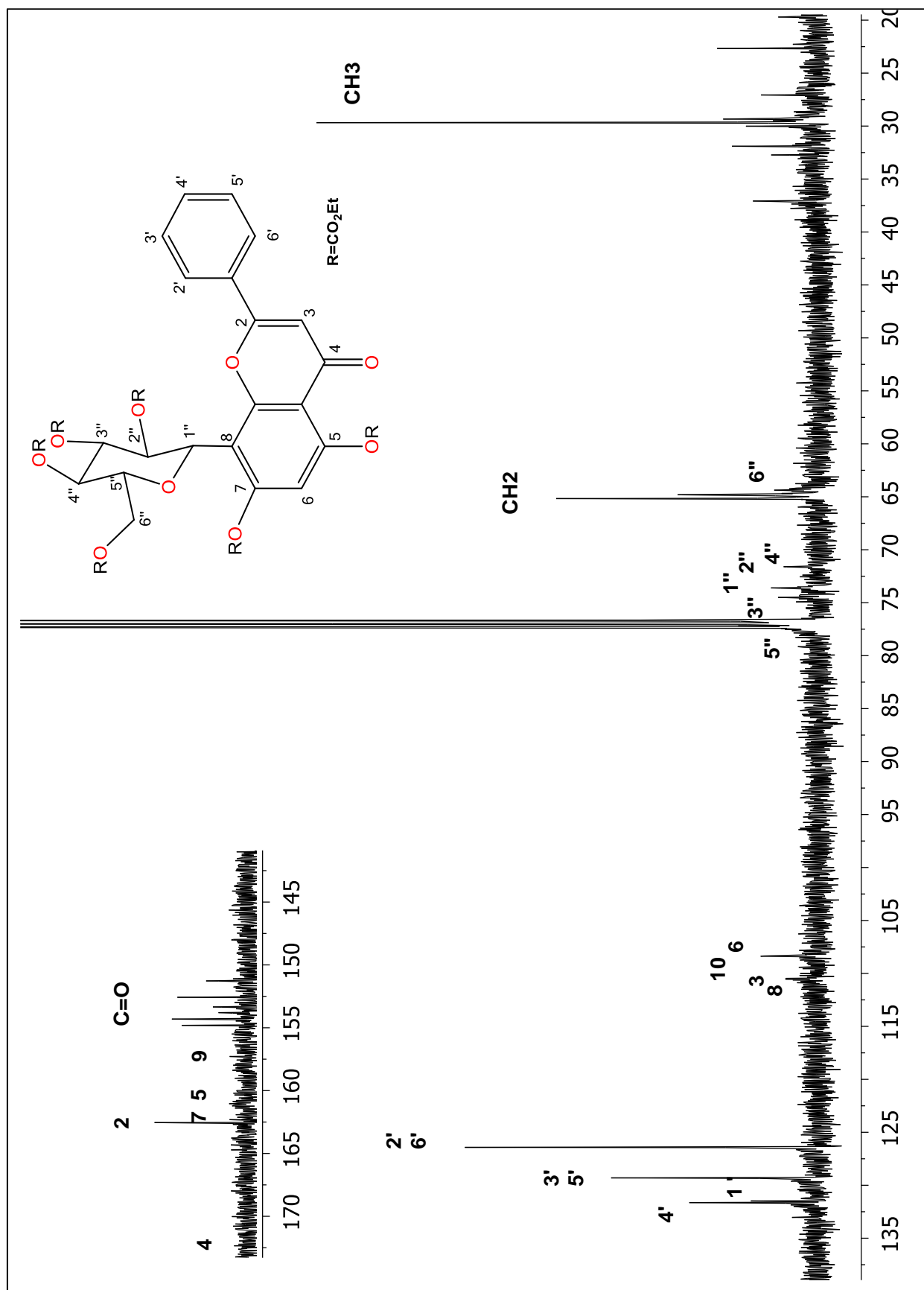
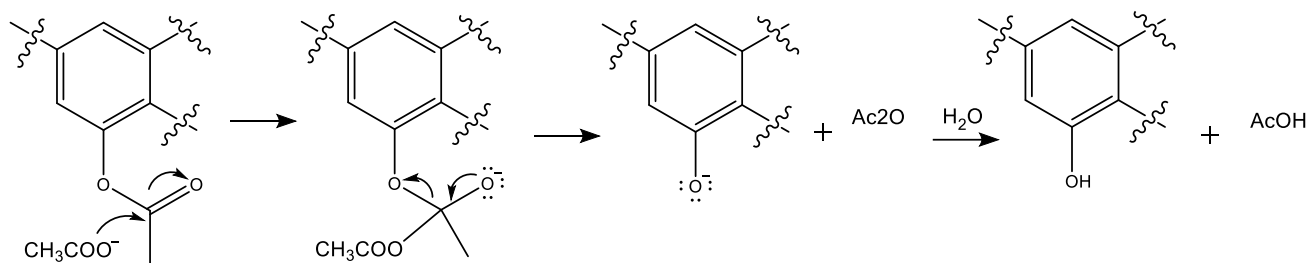


Figura 5.29. Espectro de RMN de ¹³C del derivado etil percarbonato de crisina-8-C-β-D-glucósido, 100 MHz, CDCl₃.

Con la intención de preparar nuevos derivados, se ensayaron condiciones para la hidrólisis selectiva del peracetato de crisina **49**. Lotes de 20 mg del compuesto se disolvieron en 3 mL de MeOH y se adicionó 100 mg de acetato de sodio, la mezcla se sometió a reflujo de 4 h y posterior a este tiempo se extrajo en baño de hielo, lo que propició la precipitación del producto de reacción **55**, este compuesto se recrystalizó con mezcla de hexanos-CH₂Cl₂ para obtener agujas finas, p.f. 103-105 °C cuyo perfil de solubilidad fue igual al presentado para **49**. Su espectro de RMN de ¹H (Figura 5.30) mostró la presencia del puente de hidrógeno en 12.76 ppm característico del OH-5 de la flavona lo que indicó la desprotección del hidroxilo aromático; además, se observó que las cuatro señales simples entre 2.11 y 2.06 ppm pertenecientes a los acetatos de la porción del azúcar permanecieron intactas, lo que corroboró la selectividad de la hidrólisis para la obtención de la crisina-7-O-β-D-tetraacetilglucosa (**55**). Se propone que esta selectividad se debe que el carbonilo del acetato en 5 se encuentra más polarizado debido a la influencia del anillo aromático, además, el anión CH₃COO⁻ al presentar baja nucleofilicidad conlleva a que el ataque de este sea selectivo hacia el acetato aromático que está más susceptible a sufrir un ataque nucleofílico por el anión y posteriormente sufrir la hidrólisis. (Esquema 5.1). Los resultados obtenidos mostraron una metodología sencilla para obtener hidrólisis selectivas sobre acetatos aromáticos, lo cual puede ser de interés en el área sintética.



Esquema 5.1. Mecanismo de hidrólisis básica del acetato aromático catalizada con acetato de sodio.

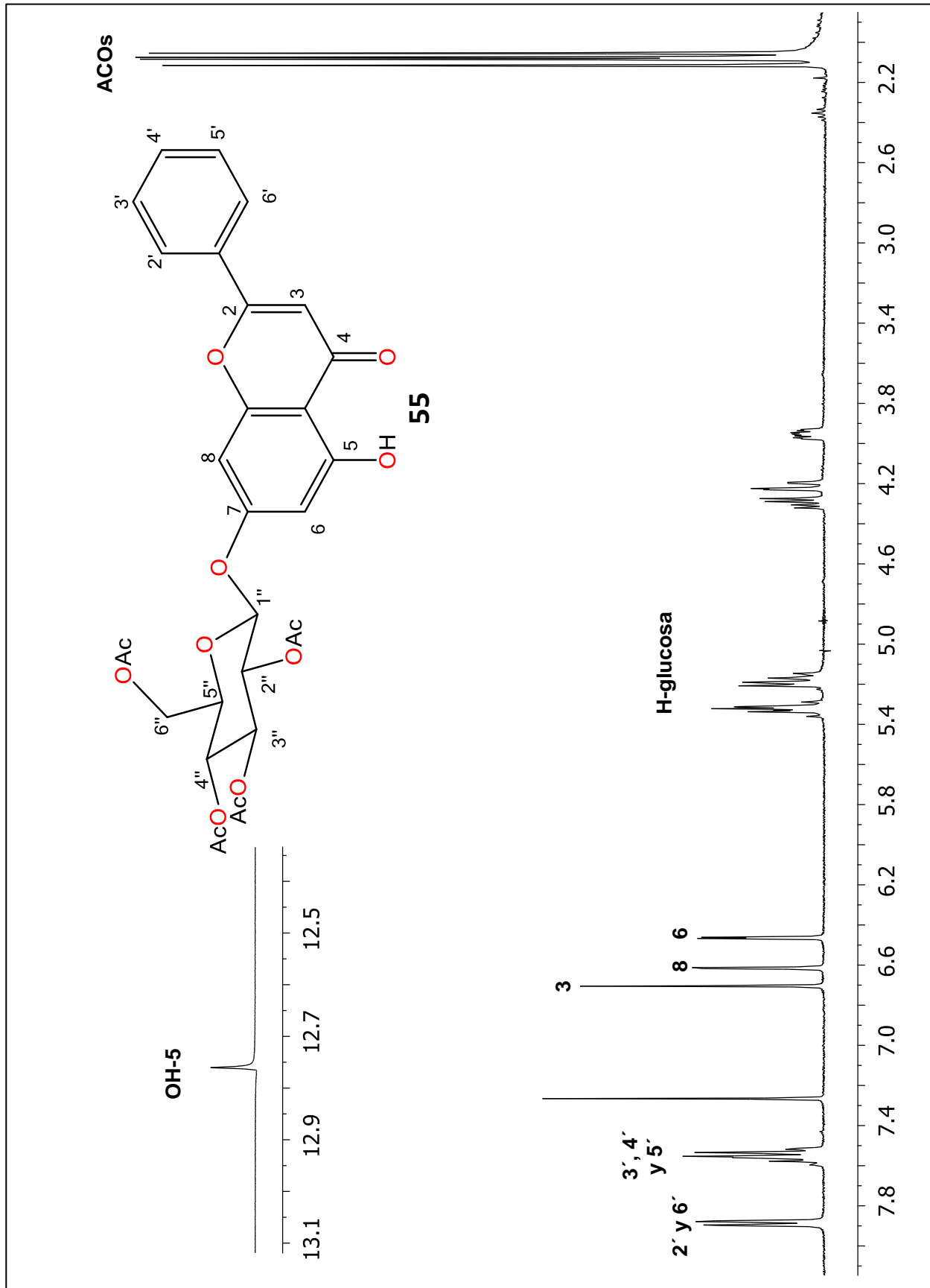


Figura 5.30. Espectro de RMN de ¹H del derivado tetracetilado de crisina-7-O-β-D-glucósido (**55**) 400 MHz, CDCl₃.

Los compuestos aislados como mayoritarios **45** y **46** así como los derivados preparados **49-50**, **53-55** se consideraron como candidatos para evaluar su potencial citotóxico y antiinflamatorio. Debido a la inestabilidad de los metil percarbonatos **51** y **52**, no fue posible determinar su actividad biológica; sin embargo, la preparación de estos mejoró la definición de las señales del azúcar en sus espectros de RMN de ^1H . En la Figura 5.31 se presentó el comparativo de espectros de crisina-7-*O*- β -D-glucósido (Figura 5.31a) y sus derivados peracetilado (Figura 5.31b) y percarbonatado (Figura 5.31c) donde se apreció mejor resolución en el desdoblamiento de las señales de la porción del azúcar del derivado **51** lo que permitió la medición de las constantes de acoplamiento que comprobaron la identidad del azúcar como glucosa.

La Figura 5.32 muestra el comparativo de los espectros de RMN de ^1H de crisina-8-*C*- β -D-glucósido **46** (Figura 5.32a) y los derivados peracetilado (Figura 5.32b) y el percarbonato de metilo (Figura 5.32c) donde se observó que la resolución de las señales del azúcar mejoró en ambos derivados, permitiendo así la identificación del azúcar como glucosa.

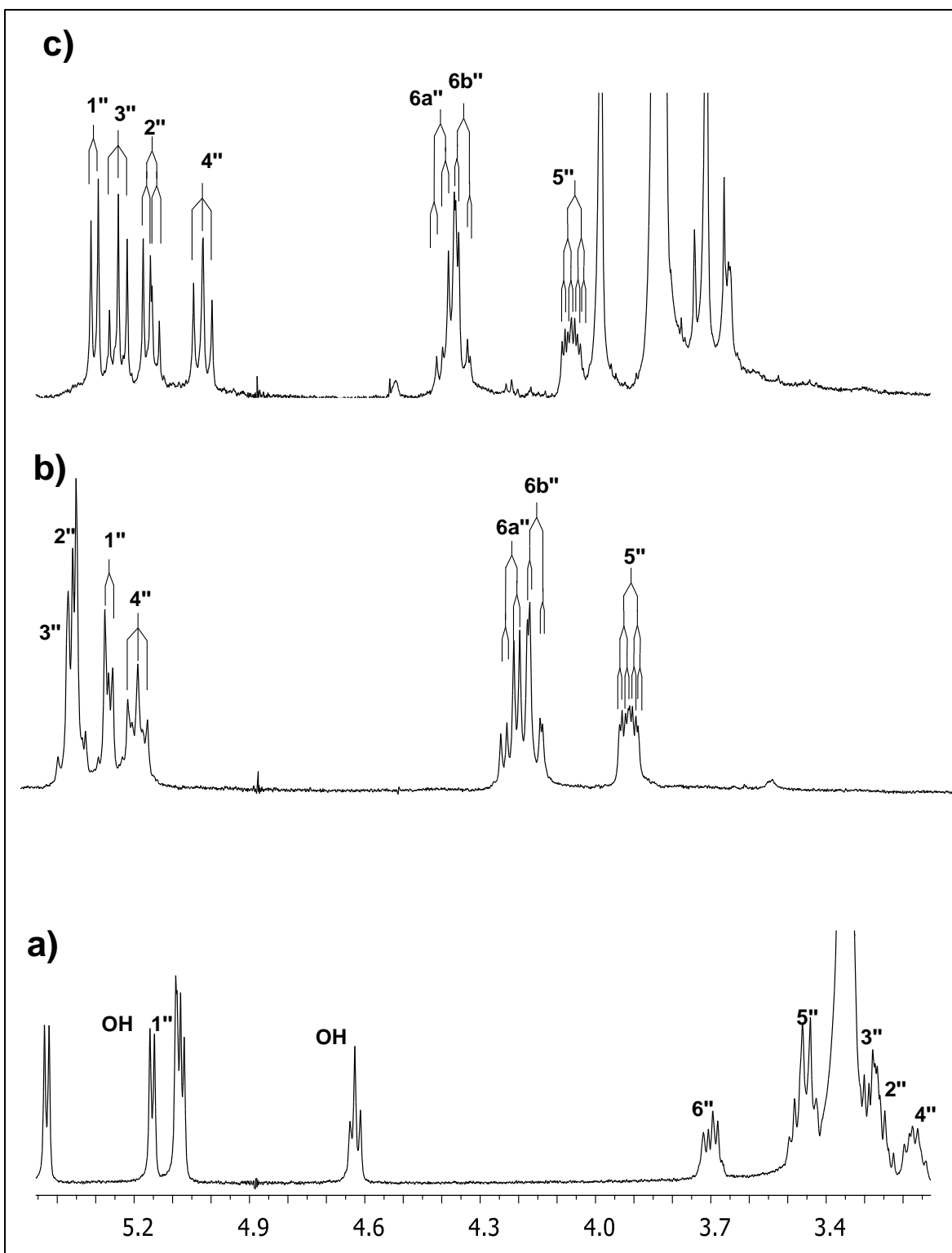


Figura 5.31. Comparación de espectros de RMN de ^1H de la porción del azúcar de crisia-7-O- β -D-glucósido (a), pentaacetato de crisia-7-O- β -D-glucósido (b) y pentametil carbonato de crisia-7-O- β -D-glucósido (c).

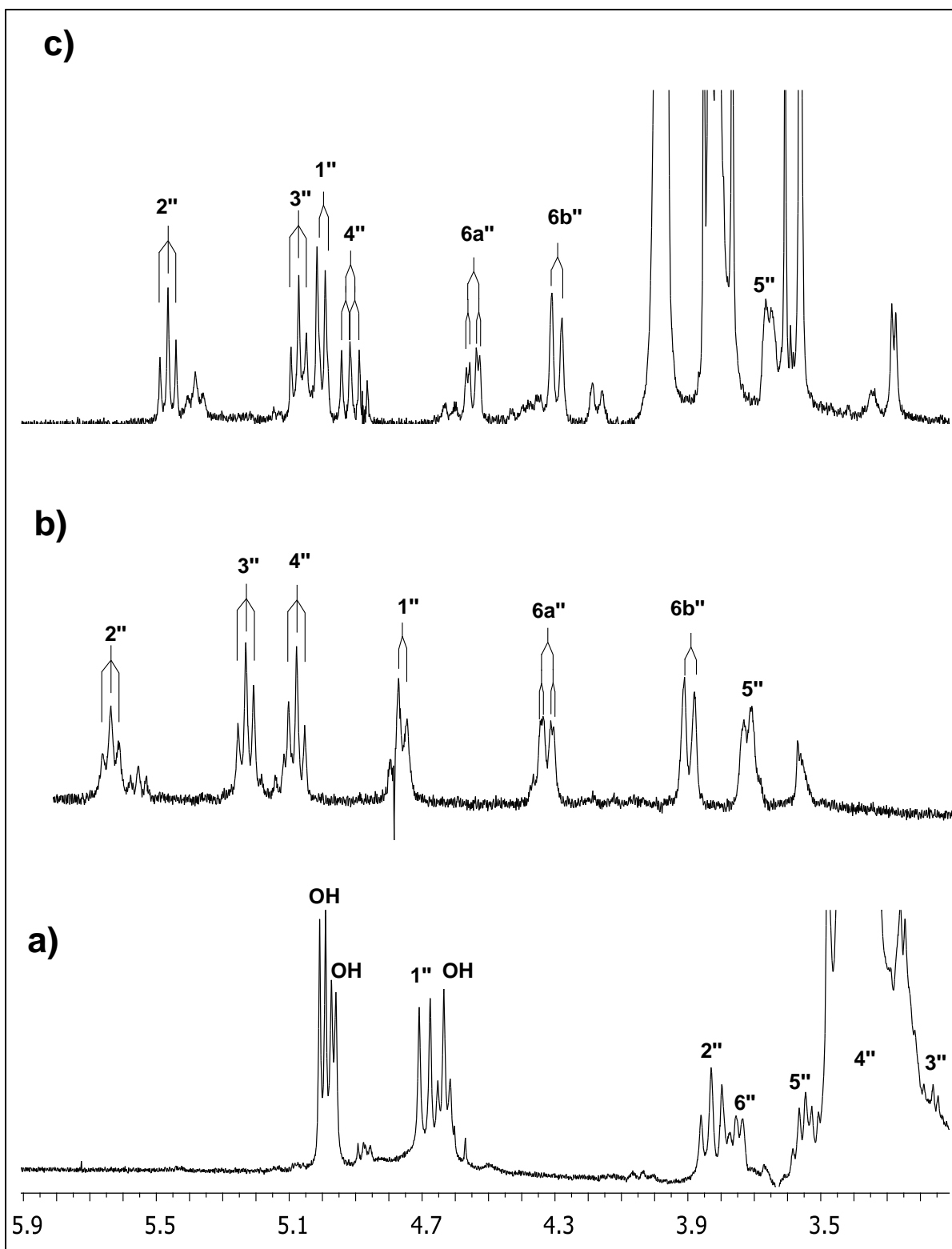
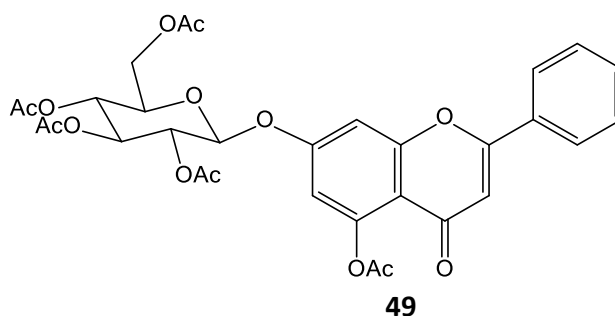


Figura 5.32. Comparación de espectros de RMN de ^1H de la porción del azúcar de crisia-8-C- β -D-glucósido (a), pentaacetato de crisia-8-C- β -D-glucósido (b) y pentametil carbonato de crisia-8-C- β -D-glucósido (c).

En la literatura se han encontrado ambigüedades en la correcta asignación de compuesto glicosilados (Antri, 2004; Liu, 2010); ya que muchas veces las señales correspondientes al azúcar no se aprecian adecuadamente para determinar el tipo de carbohidrato, por lo que se tiene que acudir a técnicas destructivas para la determinación de este. Considerando que la búsqueda de compuestos de origen natural para potenciales actividades biológicas requiere una correcta elucidación estructural, se buscan técnicas no destructivas que apoyen la correcta identificación de los compuestos, como es el Dicroísmo Circular Vibracional (DCV). Los métodos de análisis espectroscópicos quirópticos han sido explorados desde hace varios años para la elucidación de la configuración absoluta (CA) mediante dicroísmo circular vibracional (DCV). Desde hace más de 40 años se evaluó la sensibilidad del DCV en azúcares (Marcott, 1978) y se propuso como una técnica para la elucidación de estos (Back, 1984), los estudios de años posteriores se enfocaron en la búsqueda de bandas estratégicas particularmente en la región de $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ (Partelini, 1986; Taniguchi 2007b) y bandas asociadas al C-H anomérico de los azúcares (Monde, 2004; Miura, 2006). El uso de cálculos con teoría del funcional de la densidad (DFT) para correlacionar estas bandas específicas de DCV con las preferencias conformacionales, mejoraron el entendimiento de esta metodología (Miura, 2006; Taniguchi, 2007a; Taniguchi, 2008; Jovan, 2015), además esclareció que la presencia de hidroxilos libres que forman puentes de hidrógeno causaba significantes variaciones en los espectros (Teodorescu, 2013; Joseph-Nathan, 2015). Con el fin de disminuir este factor, se ha optado por realizar simples derivatizaciones de los hidroxilos a éteres (Taniguchi, 2007a; Taniguchi, 2008) o acetatos (Bose, 1999) con resultados favorables. En años más recientes se han incorporado métodos estadísticos para comparar los espectros de DCV experimentales y calculados (Joseph-Nathan, 2015; Rodríguez-García, 2019), aunque estas comparaciones para la determinación de la CA de azúcares por VCD sólo se describen para furanosas (Taniguchi, 2017).

Si bien los estudios de DCV en glicósidos tienen más de 4 décadas que se han implementado, no fue hasta el 2006 que se comenzó a complementar estas mediciones con cálculos teóricos; sin embargo, comparaciones estadísticas han sido casi nulas en este tema, por lo que el nivel de confianza en estas comparaciones ha sido inexacto. Debido a las características estructurales, se seleccionó al compuesto **49** como candidato para realizar un estudio de DCV que permita validar un método para definir el nivel de teoría que se ajuste más a este tipo de estructuras.



- **Análisis de dicroísmo circular vibracional del flavonoide 49**

Se llevó a cabo el modelado molecular del compuesto **49** en el programa Spartan. Para evitar la obtención de confórmeros redundantes se restringió la rotación de los grupos acetatos del azúcar en C-2", C-3" y C4", fijando los respectivos ángulos diedros H"-C"-O-C_{sp2} a 0°, las cuales adquieren una conformación estable debido a las conocidas estabilidades electrónicas en este tipo de sistemas atómicos (Romers, 1956; Hehre, 1976). Posterior al modelado, se llevó a cabo la búsqueda conformacional con el protocolo de Monte Carlo mediante MMFF, lo cual arrojó 100 confórmeros en la ventana energética de 0-10 kcal/mol cuya restricción conformacional fue liberada para la optimización de la energía con B3LYP-631G(d) lo que llevó a la obtención de 38 confórmeros en la ventana de 0-5 kcal/mol, los cuales se sometieron a optimización conformacional con los niveles de teoría, B3LYP, B3PW91 y PBEPBE con una base de cálculo DGDZVP con la finalidad de establecer el procedimiento computacional más adecuado, ya que su aplicación es común en cálculos de DCV (Joseph-Nathan, 2015). El anterior tratamiento computacional arrojó 25 confórmeros para el nivel de teoría PBEPBE, 12 en B3LYP y 19 confórmeros para B3PW91 en la ventana de 0-2 kcal/mol (Tabla 5.16), los cuales se emplearon para calcular los espectros de IR y DCV. La población conformacional ponderada

de acuerdo con la ecuación $\Delta G = -RT \ln K$ se realizó para generar los respectivos espectros de IR y DCV derivados de la distribución de Boltzmann. Los conformeros más relevantes obtenidos con B3LYP representando el 89% del total de la población se representan en la Figura 5.33, donde se observan que las preferencias conformacionales de los grupos acetatos C-2", C-3" y C-4" concuerdan con el criterio aplicado en el modelo molecular de partida en la búsqueda conformacional.

El espectro de DCV experimental se comparó con los calculados a los diferentes niveles de teoría en el rango de 1000-1490 cm^{-1} y la correlación estadística utilizando el programa CompareVOA, dio los valores del factor de anarmonicidad (anH), la similitud espectroscópica de DCV para el enantiómero correcto (S_E), la similitud espectroscópica para el enantiómero incorrecto (S_{-E}), el índice de similitud (ESI) obtenido de la diferencia de $S_E - S_{-E}$ y los valores del nivel de confianza para la configuración absoluta (C) (Tabla 5.17). Los datos obtenidos indicaron que los niveles de teoría más adecuados para este sistema fueron B3LYP/DGDZVP y B3PW91/DGDZVP, los cuales presentaron un nivel de confianza del 100%, además de que no hay diferencia significativa entre ellos en los parámetros estadísticos medidos (Tabla 5.17). Debido al menor número de conformeros obtenidos y al tiempo de cálculo computacional, se considera a B3LYP/DGDZVP el nivel de teoría más adecuado para este tipo de compuestos.

Tabla 5.16. Análisis Termoquímico del compuesto **49**.

Conf	$\Delta E_{\text{MMFF}}^{\text{a}}$	$\%_{\text{MMFF}}^{\text{b}}$	$\Delta E_{\text{DFT}}^{\text{c}}$	$\%_{\text{DFT}}^{\text{d}}$	$\Delta G_{\text{OPT}}^{\text{e}}$	$\%_{\text{OPT}}^{\text{*}}$	$\Delta G_{\text{OPT}}^{\text{f}}$	$\%_{\text{OPT}}^{\text{*}}$	$\Delta G_{\text{OPT}}^{\text{g}}$	$\%_{\text{OPT}}^{\text{*}}$
49a	3.06	0.20	0.76	4.68	0.00	31.98	0.00	16.49	0.68	3.90
49b	2.51	0.52	1.03	2.98	0.18	23.81	0.21	11.59	0.50	5.26
49c	2.96	0.24	0.89	3.77	0.31	18.91	0.50	7.12	1.10	1.90
49d	3.05	0.21	0.94	3.47	1.02	5.78	0.90	3.63	1.00	2.26
49e	4.95	8.67e-003	2.07	0.51	1.04	5.56	0.77	4.52	1.26	1.46
49f	3.83	0.05	1.13	2.52	1.32	3.51	1.00	3.03	1.39	1.17
49g	4.82	0.01	2.75	0.16	1.52	2.49	1.36	1.67		
49h	3.65	0.07	0.99	3.19	1.59	2.23	1.76	0.85	1.28	1.41
49i	4.59	0.01	1.65	1.04	1.77	1.65	1.17	2.29	0.98	2.34
49j	0.89	8.17	0.20	12.01	1.80	1.56	1.08	2.67	0.03	11.60
49k	0.00	37.06	0.00	17.06	1.86	1.38			0.00	12.23
49l	1.31	4.04	2.40	0.29	1.99	1.13	0.30	9.96	0.22	8.37
49m	1.38	3.60	2.34	0.32			0.25	10.76	0.23	8.24
49n	0.47	16.57	0.43	8.19			0.44	7.83	0.25	7.93
49o	2.77	0.34	4.81	5.04 e-003			0.45	7.63		
49p	0.43	17.91	0.30	10.25			0.66	5.42	0.63	4.24
49q	2.64	0.004	1.37	1.66			1.38	1.60	0.35	6.75
49r	3.87	0.05	1.19	2.28			1.40	1.56	1.33	1.31
49s	3.79	0.06	1.08	2.74			1.90	0.68	1.32	1.32
49t	1.18	5.02	2.06	0.52			1.94	0.62	0.08	10.69
49u	3.15	0.17	1.50	1.35					0.80	3.19
49v	2.85	0.29	2.25	0.37					1.39	1.18
49w	2.38	0.66	1.67	1.01					1.44	1.08
49x	2.29	0.76	1.64	1.05					1.47	1.02
49y	3.06	0.21	2.31	0.34					1.88	0.52

^aEnergías en mecánica molecular relativas a **49k**, $E_{\text{MMFF}} = 63.3025636$ kcal/mol. ^bPoblación en % calculada de las energías de MMFF de acuerdo con $\Delta E_{\text{MMFF}} \approx -RT \ln K$. ^cEnergías en Single-point B3LYP/6-31G(d) relativas a **49k**, $E_{6-31G(d)} = -1413522.07$ kcal/mol. ^dPoblación en % calculada de las energías de B3LYP/6-31G(d) de acuerdo con $\Delta E_{6-31G(d)} \approx -RT \ln K$. ^eEnergías libres de Gibbs relativas a **49k** para PBEPBE/GDGDZVP = -1411776.794079 kcal/mol, **49a** ^fB3LYP/GDGDZVP = -1413384.882 kcal/mol, y **49a** ^gB3PW91/DGDZVP = -1412802.595576 kcal/mol. ^hPoblación en % calculada de la energía libre de Gibbs de acuerdo a $\Delta G = -RT \ln K$.

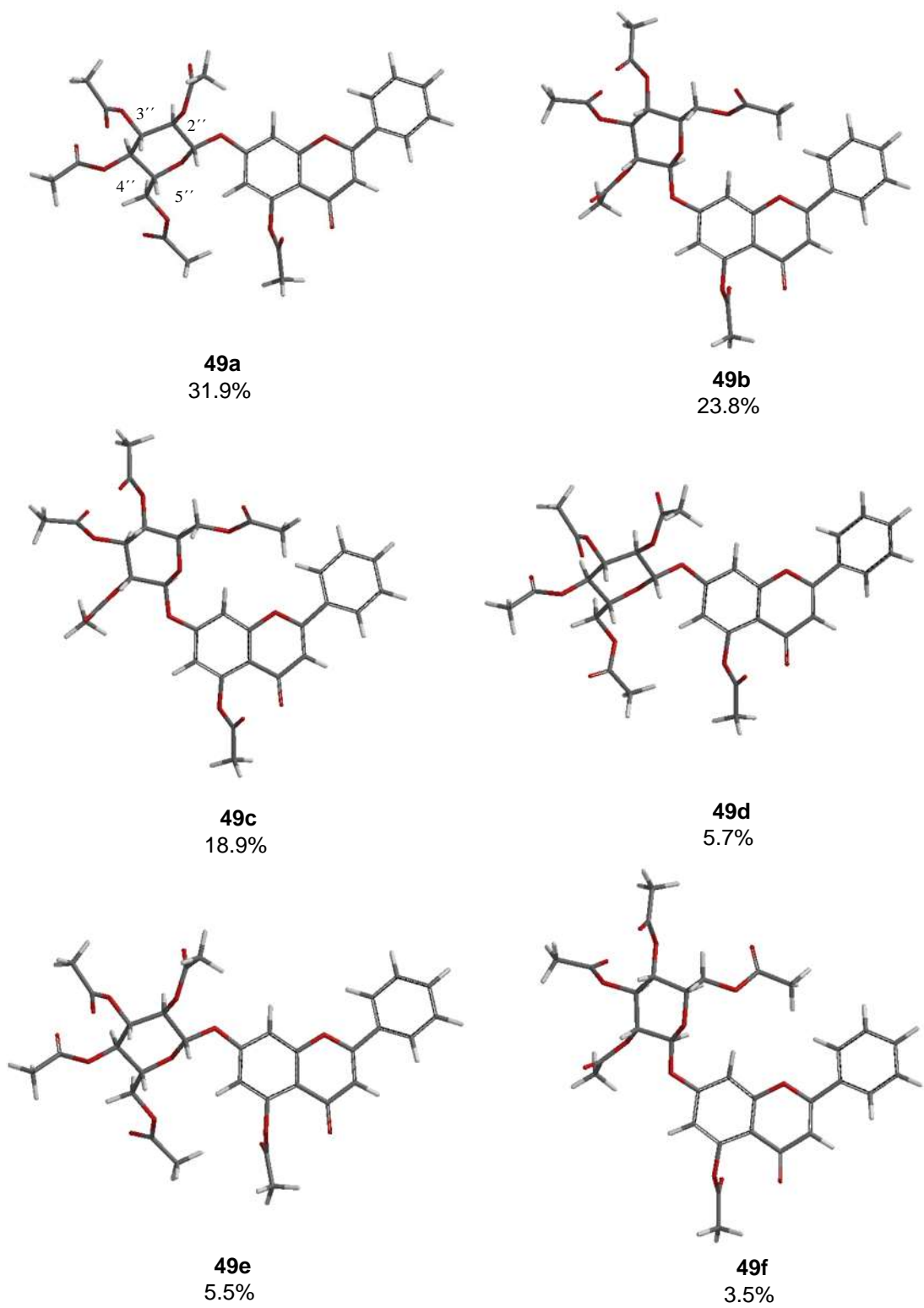


Figura 5.33. Confórmeros más relevantes de la crisina-7-O- β -D-glucósido pentaacetato, representando el 89% de la población conformacional.

Tabla 5.17. Datos de nivel de confianza de los espectros de IR y VCD del compuesto **49**, calculado para los niveles de teoría B3LYP, B3PW91 y PBEPBE con base de cálculo DGDZVP.

Nivel de teoría	anH^a	S_{IR}^b	S_E^c	S_{-E}^d	ESI ^e	C ^f (%)
B3LYP	0.979	97.0	74.4	19.7	54.7	100
B3PW91	0.969	97.3	70.1	20.0	50.1	100
PBEPBE	1.090	88.3	51.8	18.1	33.7	40

^aFactor de anarmonicidad. ^b Similitud espectral en IR. ^cSimilitud espectral para el enantiómero correcto en VCD. ^dSimilitud espectral para el enantiómero incorrecto en DCV. ^eÍndice de similitud enantiomérico calculado como $S_E - S_{-E}$. ^fNivel de confianza de las asignaciones configuracionales.

Una vez que la comparación espectral experimental y calculada de IR y DCV fue obtenida y validada cuantitativamente, se asignaron varias bandas estratégicas de la porción del azúcar mediante el software GaussView (Figura 5.34). La vibración negativa en 1432 cm^{-1} (1) fue originada por la vibración de O-7-C-1"-H-1", la banda negativa en 1373 cm^{-1} (2) y la banda positiva en 1186 cm^{-1} (6) fueron asignadas a vibraciones de tipo tijera de $C_{sp^2}\text{-C-H}$ y $O_{sp^2}\text{-C}_{sp^2}\text{-C}$ respectivamente del acetato en C-5. La vibración positiva en 1329 cm^{-1} (3) fue asignada a todas las vibraciones de tijera de los O-C-H de la glucosa, mientras que su correspondiente vibración de agitación y torsión fueron asociadas a la banda negativa en 1246 cm^{-1} (4). La banda negativa más intensa en 1213 cm^{-1} (5) fue atribuida a las vibraciones de $O_{sp^2}\text{-C}_{sp^2}\text{-C}$ y $C_{sp^2}\text{-C-H}$ de los grupos acetatos C-2", C-3" y C-4" y la banda positiva en 1172 cm^{-1} (7) fue considerada para la vibración de C-5"-O-1"-C-1" y la porción del azúcar O-1"-C-1"-O-7 mostró su vibración de estiramiento como una banda negativa en 1051 cm^{-1} (8). La vibración del C-O anomérico de O- α -D-glucósidos aromáticos ya ha sido descrita anteriormente (Taniguchi, 2008), por lo que con los resultados anteriormente descritos se complementa los datos de DCV de azúcares aromáticos.

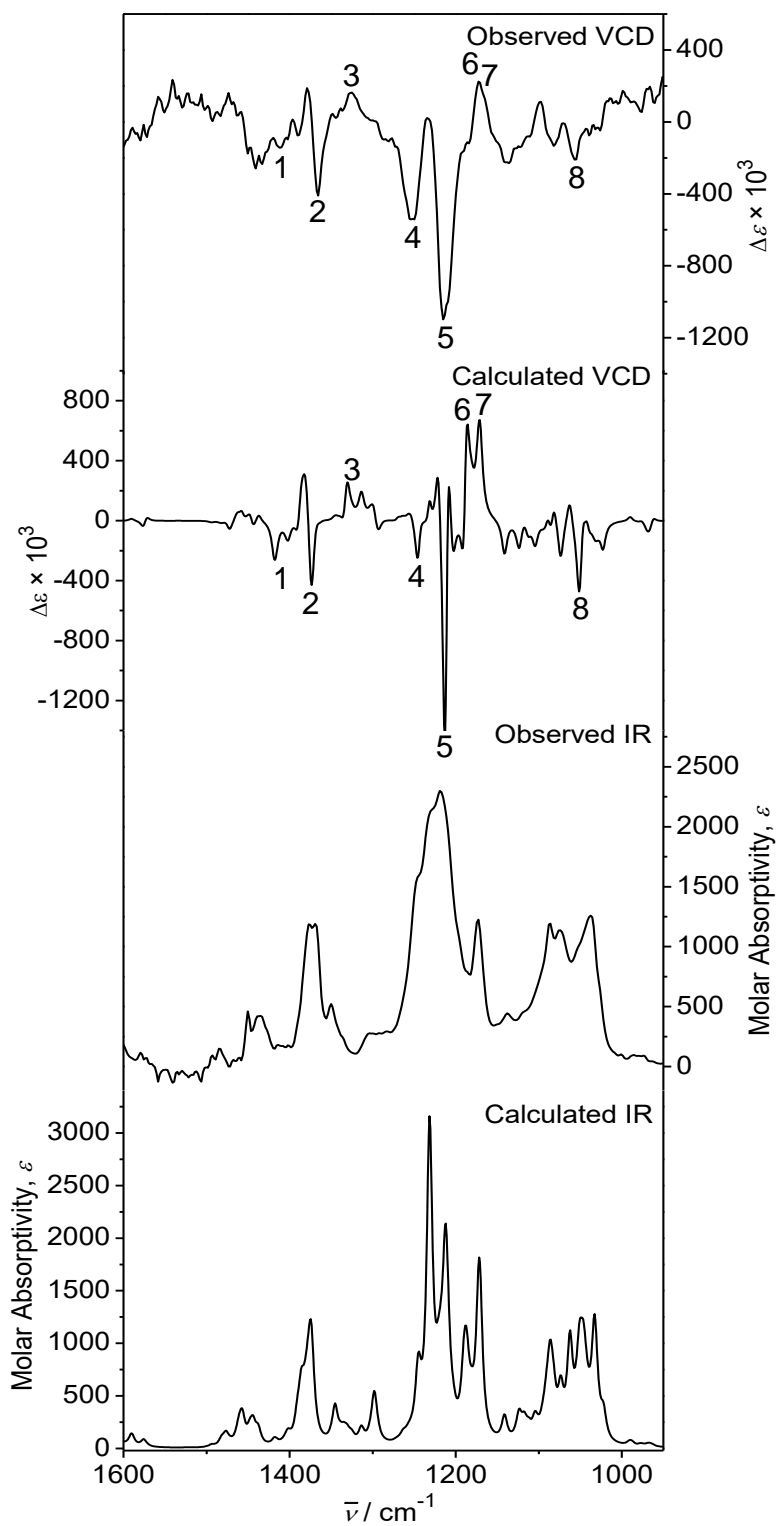
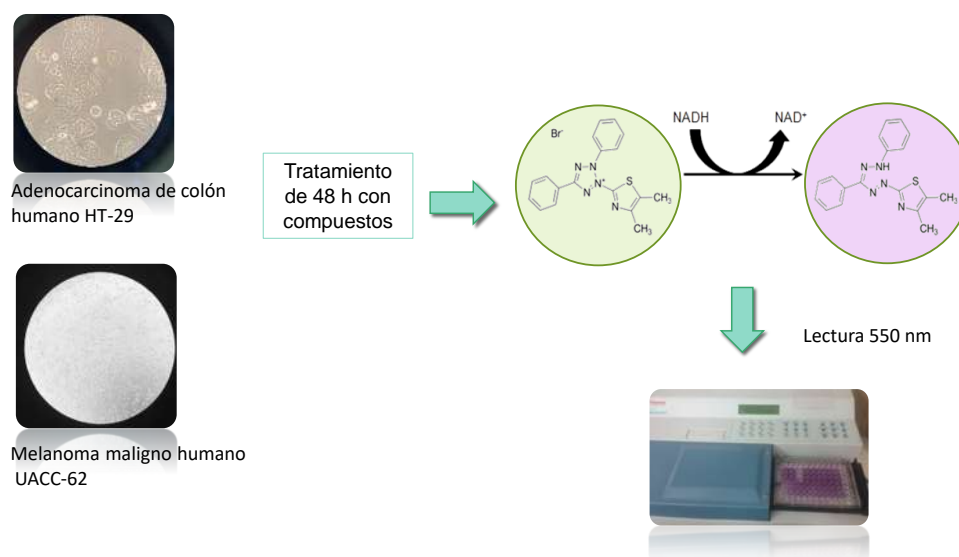


Figura 5.34. Comparación de espectros de IR y DCV experimentales y calculados con DFT B3LYP/DGDZVP de crisina-7-O- β -D-glucósido pentaacetato (**49**).

- **Evaluación de la actividad citotóxica**

La actividad citotóxica *in vitro* se realizó mediante el método de MTT, donde se evaluaron los compuestos en dos líneas celulares cancerosas, adenocarcinoma de colon humano HT-29 y melanoma maligno humano UACC-62 (Esquema 5.2). Se comparó la actividad de los flavonoides naturales: crisina-7-*O*- β -D-glucósido (**45**) y crisina-8-*C*- β -D-glucósido (**46**) con la actividad de los derivados preparados (**49**, **50**, **53**, **54** y **55**) y se usó como control positivo el fármaco oxaliplatino.



Esquema 5.2. Ensayo de actividad citotóxica mediante MTT.

En las figuras 5.35 a y b se presentan los porcentajes de viabilidad presentados por crisina-7-*O*- β -D-glucósido y derivados (**49**, **53** y **55**) para ambas líneas celulares. El compuesto parcialmente acetilado **55** fue el que mostró la mayor actividad citotóxica en ambas líneas celulares (IC_{50} = 11.6 μ M para HT-29, IC_{50} = 21.8 μ M para UACC-62); mientras que el derivado peracetilado **49** sólo fue moderadamente activo sobre la línea de melanoma UACC-62 (IC_{50} = 61.5 μ M). Por otro lado, tanto **46** como sus derivados no mostraron tener alta actividad frente a las líneas de adenocarcinoma y melanoma, pero su actividad citotóxica se vio mejorada en los derivados acetilado (**50**) y percarbonatado (**54**), los cuales disminuyen la viabilidad celular en comparación del compuesto natural, como se observa en las Figuras 5.35 c y d.

Se calcularon los valores de IC₅₀ y compararon con los obtenidos del fármaco Oxaliplatino, la mayoría de los compuestos se consideraron no activos ya que su IC₅₀ fue mayor a 100 μ M; el pentaacetato de crisina-7-O- β -glucósido (**49**) mostró actividad sólo en las células de melanoma UACC-62 mientras que el derivado **55** presentó buena actividad citotóxica en ambas líneas celulares incluso mayor a la mostrada por el oxaliplatino en HT-29 (Tabla 5.18).

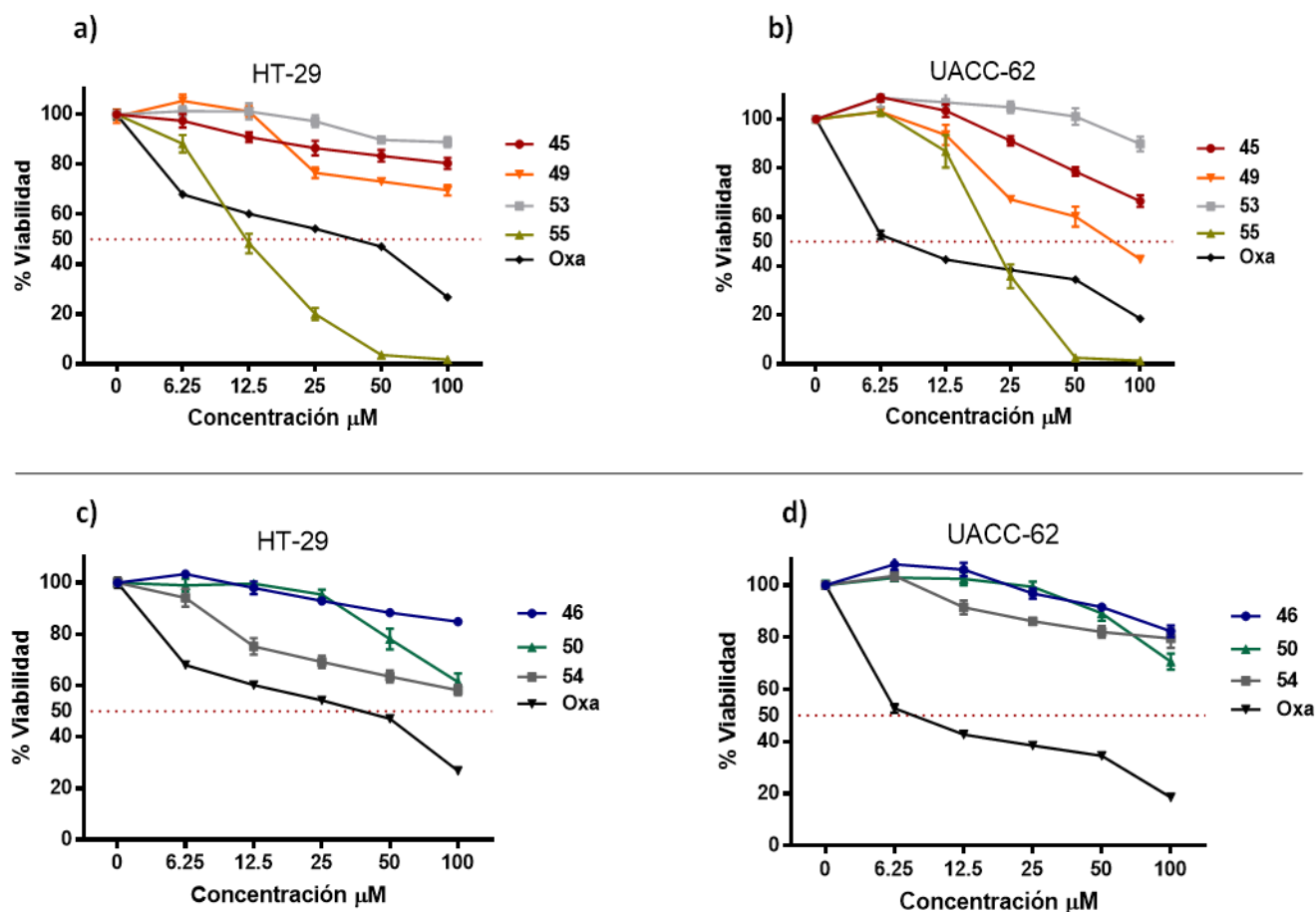


Figura 5.35. Viabilidad de líneas de adenocarcinoma de colon humano HT-29 y melanoma maligno humano UACC-62 posterior a tratamientos de 48 h a concentraciones de 6.25, 12.5, 25, 59 y 100 μ M, se utilizó al fármaco oxaliplatino como control positivo. Actividad de crisina-7-O- β -D-glucósido y derivados frente a HT-29 a) y UACC-62 b); actividad de crisina-8-C- β -D-glucósido y derivados frente a HT-29 c) y UACC-62 d).

Tabla 5.18. Valores de IC₅₀ (μM) de compuestos evaluados frente a líneas celulares de cáncer, los valores se expresan como el promedio de tres experimentos individuales ± el error estándar.

Compuesto	IC ₅₀ HT-29	IC ₅₀ UACC-62
45	>100	>100
46	>100	>100
49	>100	61.5 ± 1.2
50	>100	>100
53	>100	>100
54	>100	>100
55	11.6 ± 0.77	21.8 ± 0.97
Oxaliplatino	31.9 ± 2.4	5.5 ± 0.27

Para la determinación de la selectividad se evaluaron sólo los compuestos que se consideraron activos en cada línea celular; para la comparación en células de colon se utilizó la línea celular de colon normal CCD-841, donde se evaluó la citotoxicidad del compuesto **55** y se comparó con la actividad mostrada en HT-29; en el ensayo de selectividad en células de piel se empleó la línea de queratinocitos HaCaT y se comparó con la actividad presentada de los compuestos **49** y **55** en células de cáncer UACC-62, como control positivo se usó el oxaliplatino. En ambos ensayos se observó que tanto **49** y **55** fueron más activos en las células de cáncer que en las células normales (Figura 5.36).

El concentrado de IC₅₀, así como del índice de selectividad que mostraron los compuestos, se resume en la Tabla 5.19. Donde se aprecia que el compuesto **55** tiene un índice de selectividad muy parecido al oxaliplatino y el valor de IC₅₀ fue menor al mostrado por el fármaco en el ensayo frente a células de colon. Por otro lado, en los ensayos en células de piel, el oxaliplatino mostró ser más citotóxico y selectivo en células de cáncer que los compuestos **49** y **55**. El índice de selectividad (IS) se obtiene al dividir el valor de IC₅₀ en células normales/ IC₅₀ en células de cáncer que mostraron los compuestos, un índice de selectividad alto se considera cuando es mayor a 3 (Prayong, 2008).

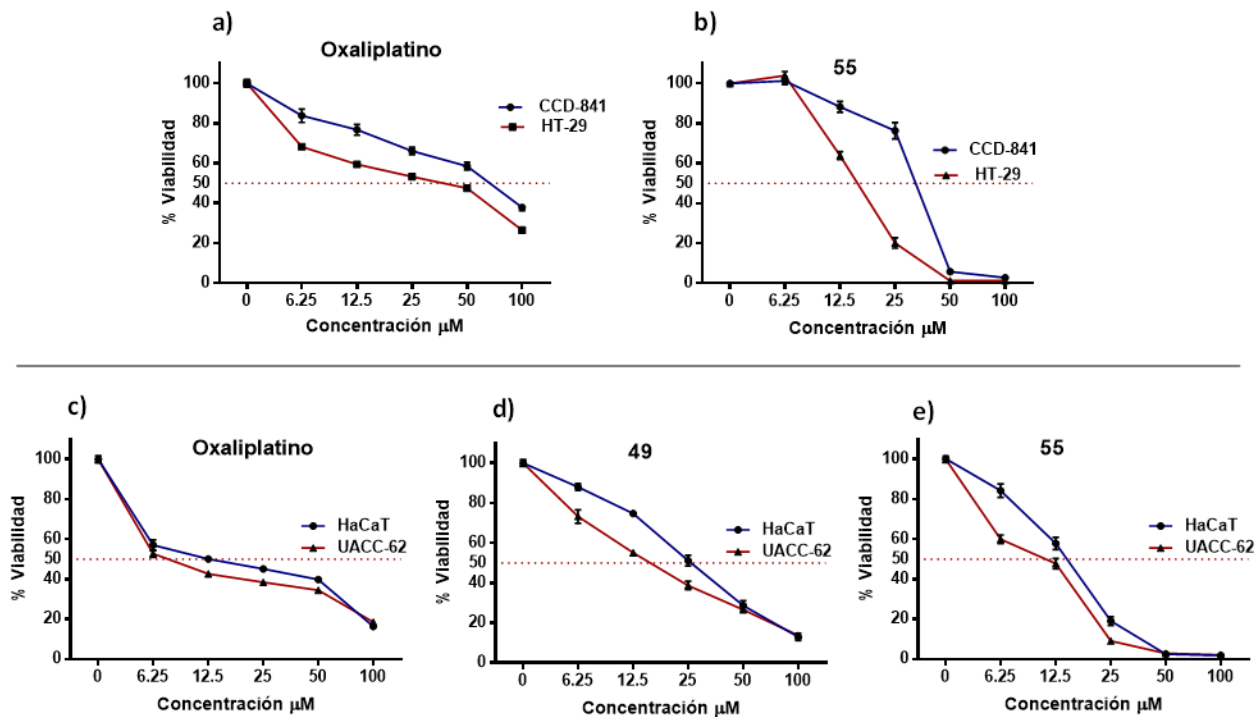


Figura 5.36. Gráfico de porcentaje de viabilidad en ensayos de selectividad en células de colon normal humano CCD-841 y células de adenocarcinoma de colon humano HT-29, a) citotoxicidad del oxaliplatino b) citotoxicidad del compuesto **55**; ensayos de selectividad en células de piel queratinocitos HaCaT y células de melanoma maligno humano UACC-62, c) citotoxicidad del oxaliplatino, d) citotoxicidad del compuesto **49** y d) citotoxicidad del compuesto **55**.

Tabla 5.19. Valores de IC₅₀ (µM) e índice de selectividad (IS) de compuestos frente a líneas celulares no cancerosas vs líneas cancerosas.

Compuesto	IC ₅₀		IS	IC ₅₀		IS
	CCD-841	HT-29		HaCaT	UACC-62	
49	-----	-----	---	26.5 ± 2.4	15.5 ± 1.1	1.7
55	28.2 ± 1.2	14.4 ± 0.4	1.9	13.1 ± 0.4	8.8 ± 0.8	1.5
Oxaliplatino	63.5 ± 0.9	31.9 ± 2.3	2.0	17.8 ± 0.9	5.5 ± 0.2	3.2

- **Actividad antioxidante.**

Se evaluó la actividad antioxidante de los compuestos a diferentes concentraciones (200-3.12 μM) mediante el método del ABTS⁺, utilizando como control positivo al trolox. De los compuestos analizados, sólo **45** y **46** presentaron moderada actividad antioxidante mientras que los derivados no mostraron actividad (Tabla 5.20), lo cual concuerda con los reportes de que la actividad antioxidante de los flavonoides está relacionada al número de hidroxilos libres que presenta la molécula (Burda, 2001).

Tabla 5.20. Actividad Antioxidante de los compuestos expresada en concentración efectiva 50 (EC₅₀) \pm el error estándar.

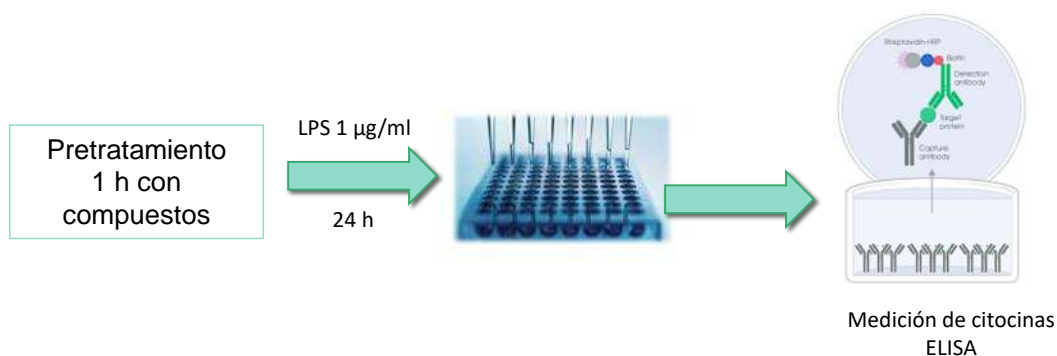
Compuesto	EC ₅₀ (μM)
Trolox	19.4 \pm 0.53
45	>200
46	>200
49	0
50	0
53	0
54	0
55	0

- **Actividad Anti-inflamatoria**

A partir del ensayo MTT se seleccionaron las concentraciones no letales de cada compuesto para realizar los tratamientos a células de leucemia monocítica aguda THP-1 diferenciadas a macrófagos. Conociendo las concentraciones adecuadas se pretrataron los macrófagos con los compuestos y posteriormente se estimularon con LPS. La cuantificación de citocinas que intervienen en los procesos inflamatorios se llevó a cabo mediante kits de ELISA específicos (Esquema 5.3).



Macrófagos THP-1



Esquema 5.3. Evaluación de la actividad anti-inflamatoria mediante la cuantificación de citocinas en macrófagos THP-1 estimulados con LPS.

En las Figuras 5.37 y 5.38 se presenta el perfil de cuantificación de citocinas mediante ELISA posterior al tratamiento con los compuestos y estimulación con LPS. Como se muestran en ambas figuras, el LPS induce un significativo incremento de los niveles de $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ en comparación con el control sin estimular ($p < 0.001$), la dexametasona por su parte reduce notablemente los niveles de ambas citocinas inducidas por LPS. Crisina-7-*O*- β -D-glucósido (**45**) y sus derivados **49**, **53** y **55**, no disminuyeron los niveles de las citocinas pro-inflamatorias $\text{TNF-}\alpha$ (Figura 5.37a) e $\text{IL-1}\beta$ (Figura 5.37b) sin embargo, el compuesto **53** mostró un marcado aumento en la cantidad de ambas citocinas. Este efecto es considerado importante ya que la familia de citocinas IL-1 influyen en la inmunidad nata. Se ha demostrado que la citocina $\text{IL-1}\beta$ presentan un rol benéfico en la resolución de la inflamación aguda y supresión tumoral a través de la citotoxicidad mediada por células T (García, 2018). Por otro lado, no se observó efecto sobre los niveles IL-10 (Figura 5.37c) por parte de este grupo de compuestos.

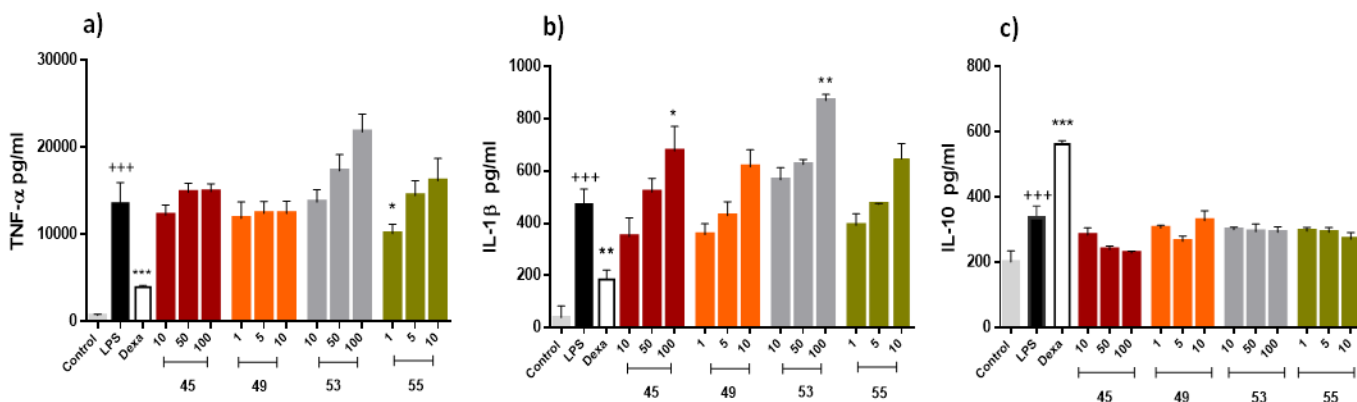


Figura 5.37. Cuantificación de citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β y anti-inflamatoria IL-10 en sobrenadantes obtenidos del tratamiento con los compuestos **45**, **49**, **53** y **55** y estimulación con LPS en macrófagos THP-1. Los datos corresponden a la media \pm el error estándar de tres experimentos independientes (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA-Bonferroni. +++p<0.001 vs. Control; ***p<0.001 vs. LPS; **p<0.01 vs. LPS; *p<0.05 vs. LPS.

Para el caso de crisina-8-C- β -D-glucósido (**46**) y derivados **50** y **54** (Figura 5.38), mostraron de buena a moderada actividad, siendo **46** quien presentó la mayor actividad anti-inflamatoria, ya que disminuyó significativamente los niveles de las citocinas proinflamatorias TNF- α (p<0.001) (Figura 5.38a) e IL-1 β (p<0.01) (Figura 5.38b) a concentración de 100 μ M, este comportamiento se observó en los derivados **50** y **54** pero no fue tan marcado el efecto como con **46**, el cual además mostró un aumento significativo de los niveles de la citocina anti-inflamatoria IL-10 (p<0.001) incluso mayor al efectuado por la dexametasona (Figura 5.38c).

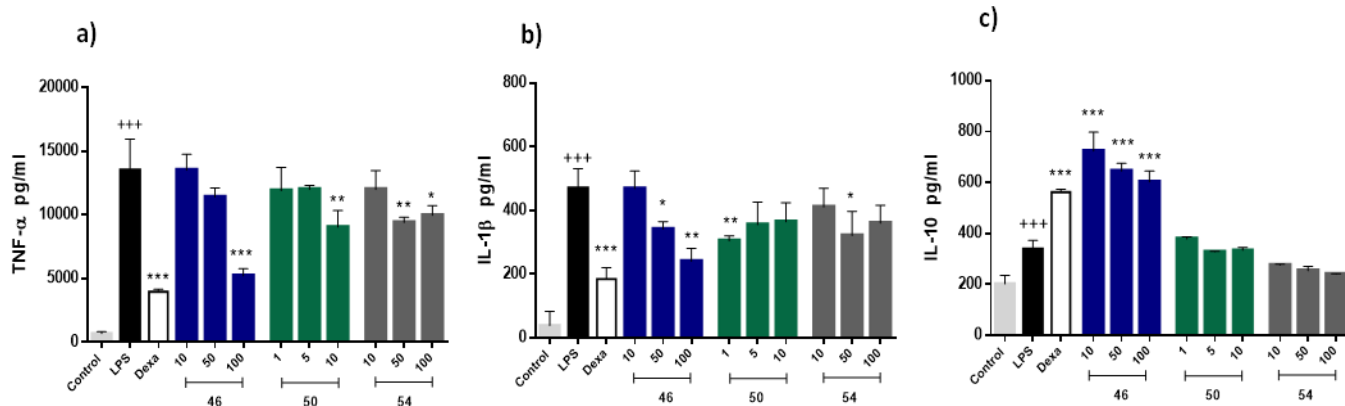


Figura 5.38. Cuantificación de citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β y anti-inflamatoria IL-10 en sobrenadantes obtenidos del tratamiento con los compuestos **46**, **50** y **54** y estimulación con LPS en macrófagos THP-1. Los datos corresponden a la media \pm el error estándar de tres experimentos independientes (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA-Bonferroni. +++p<0.001 vs. Control; ***p<0.001 vs. LPS; **p<0.01 vs. LPS; *p<0.05 vs. LPS.

Debido al comportamiento en la modulación de los niveles de citocinas y a su moderada actividad antioxidante, se seleccionó al compuesto **46** para profundizar en la evaluación de su actividad anti-inflamatoria ahora midiendo mediante western blot su efecto sobre la expresión de la proteína proinflamatoria COX-2 y las proteínas relacionadas en la vía antioxidante hemo oxigenasa-1 (HO-1), la cual es una proteína que previene del daño oxidativo a las células endoteliales y reduce la migración leucocitaria a través de la inhibición de la síntesis y liberación de mediadores inflamatorios (Alcaraz, 2003). Y Nrf2, una proteína que actúa como factor de transcripción regulando la expresión de proteínas antioxidantes que protegen contra el daño oxidativo causado por lesiones e inflamación (Gold, 2012)

Los resultados mostraron una sobreexpresión de la COX-2 en el grupo estimulado con LPS respecto al control sin estimular (p<0.001) mientras que la dexametasona disminuyó significativamente la expresión de esta proteína (p<0.001), por su parte el compuesto **46** mostró diferencia significativa al disminuir la expresión de COX-2 con el tratamiento de 100 μ M (p<0.01). Por otro lado, la expresión de la hemo oxigenasa se vio incrementada en el grupo estimulado con LPS respecto al control (p<0.05) y el tratamiento con el compuesto **46** a concentraciones de 50 y 100 μ M incrementó significativamente la expresión de esta proteína (p<0.01). De igual forma la expresión de Nrf2 se vio aumentada con los tratamientos con la flavona **46** (**p<0.01) (Figura 5.39).

Los resultados sugieren el potencial que presenta la crisina-8-*C*- β -D-glucósido (**46**) como agente anti-inflamatorio debido a su efecto modulador de los niveles de citocinas, así como su actividad en la expresión de proteínas clave que participan en los procesos inflamatorios.

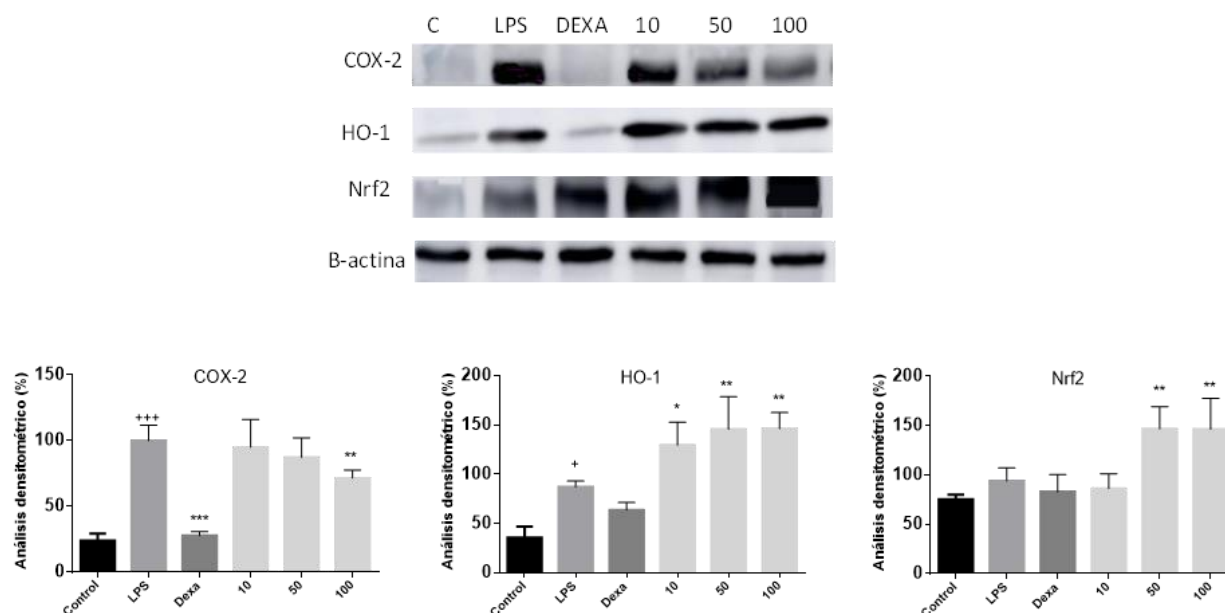
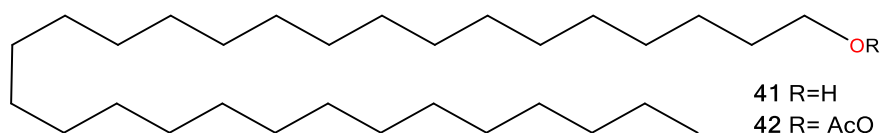


Figura 5.39. Efecto de **46** sobre los niveles de expresión de COX-2, hemo oxigenasa-1 y Nrf2 en macrófagos THP-1 a concentraciones de 10, 50 y 100 μ M. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguida de un test de Bonferroni: +++p<0.001 vs. Control; ***p<0.001 vs. LPS; **p<0.01 vs. LPS; *p<0.05 vs. LPS.

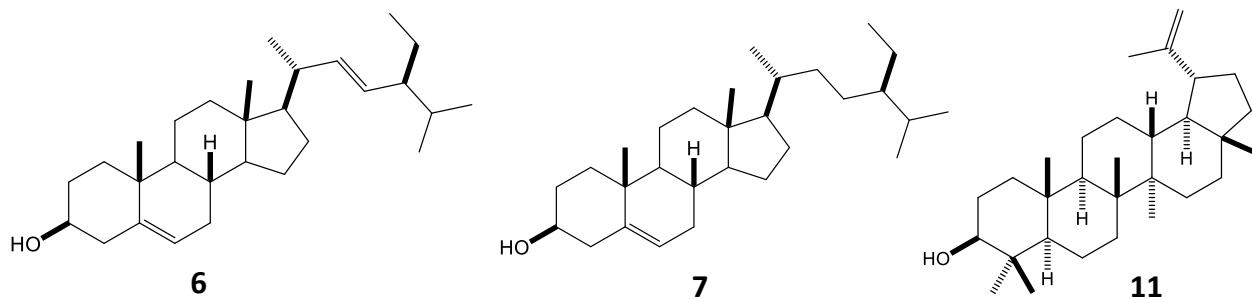
6. CONCLUSIONES

Con este trabajo se contribuye con el conocimiento de los metabolitos mayoritarios presentes en las partes aéreas de dos especies de *Mimosa* que crecen en la región de la Selva baja caducifolia del Estado de Michoacán, las cuales presentaron metabolitos secundarios en común, con lo que se contribuye con la quimiotaxonomía de las especies.

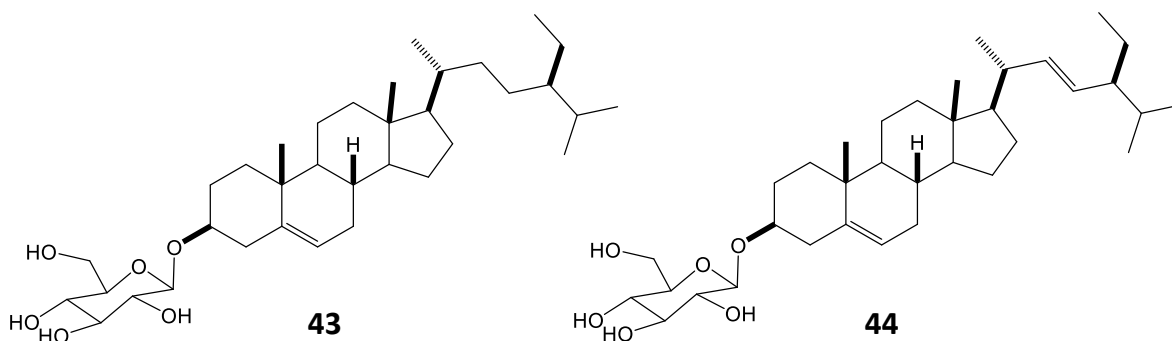
El estudio químico de las especies *Mimosa rosei* y *M. spirocarpa* permitió conocer los tipos de metabolitos presentes, los extractos hexánicos y CH_2Cl_2 de hojas y flores fueron ricos en alcoholes de cadena larga como el compuesto **41** y de ácidos grasos, la acetilación de **41** dio como resultado al compuesto **42**.



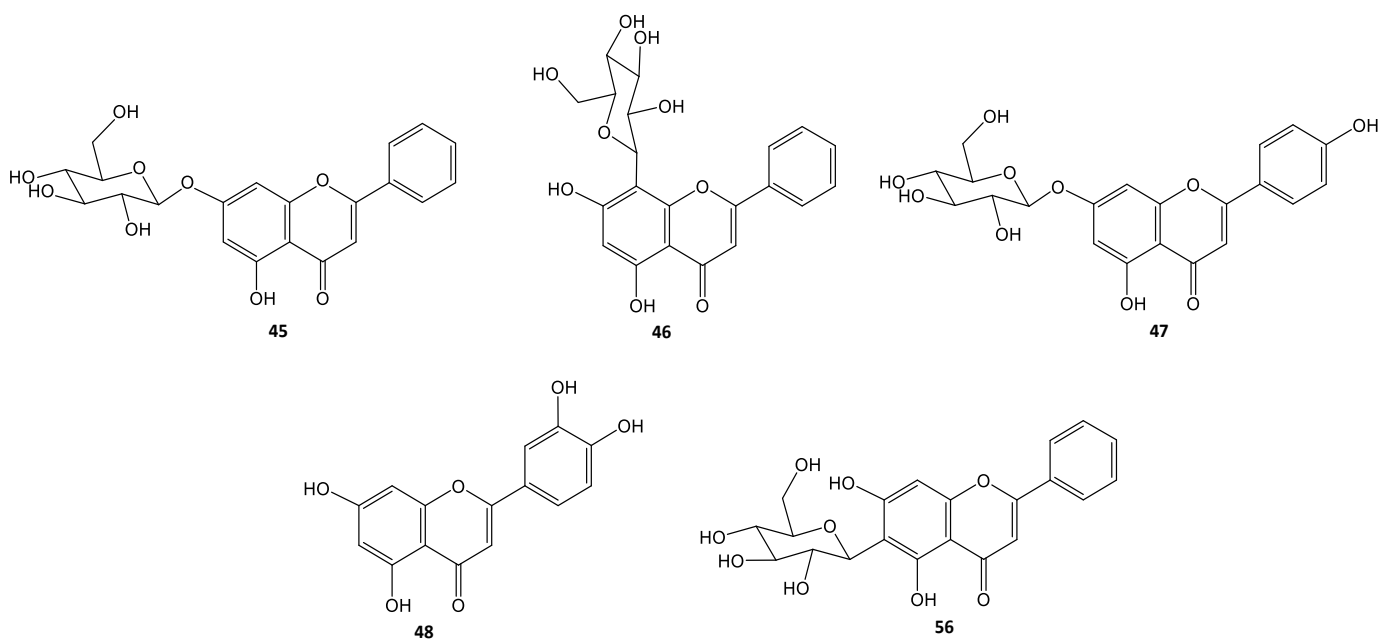
A partir de cada extracto (hexánicos, CH_2Cl_2 y metanólicos) de tallos de ambas especies, se obtuvieron como metabolitos mayoritarios a la mezcla de estigmasterol (**6**) y β -sitosterol (**7**), y al lupeol (**11**) cuyo aislamiento ya se ha descrito en especies del género *Mimosa*.



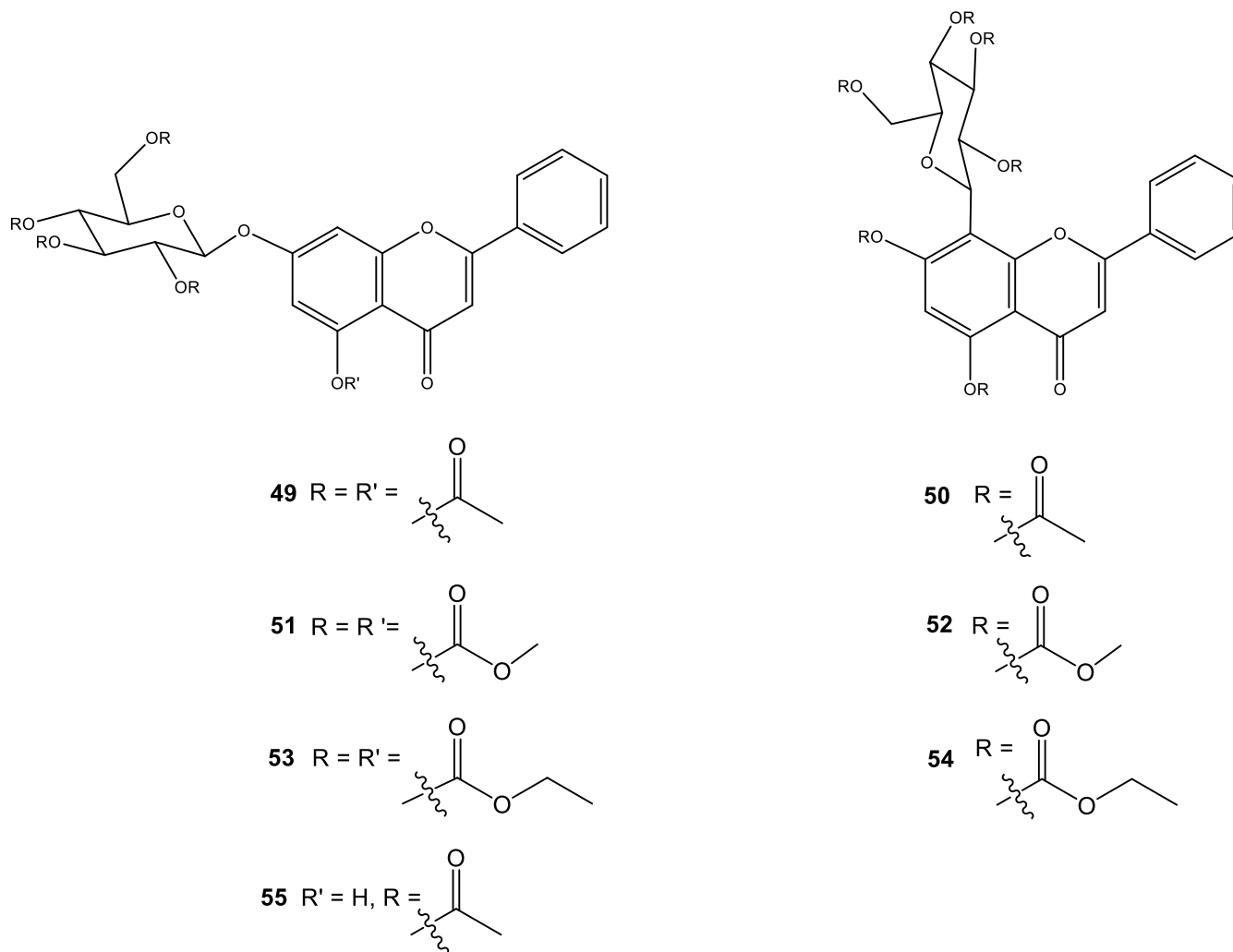
De los extractos metanólicos de hojas de las dos especies se obtuvo la mezcla en proporción 4:1 de los glucósidos de β -sitosterol (**43**) y estigmasterol (**44**).



A partir del extracto metanólico de hojas de *M. rosei* se obtuvieron a la crisina-7-*O*- β -D-glucósido (**45**) y a la crisina-8-*C*- β -D-glucósido (**46**) como los compuestos mayoritarios, además del kaemferol-7-*O*- β -D-glucósido (**47**), y crisina-6-*C*- β -D-glucósido (**56**) mientras que del extracto metanólico de flores se aisló a la luteolina (**48**).



La derivatización de **45** y **46** permitió la obtención de los peracetatos y carbonatos de metilo y etilo en rendimientos de moderados a buenos, además se obtuvo el derivado parcialmente peracetilado de la crisina glucosilada (**55**) mediante hidrólisis selectiva. La preparación de los derivados metil percarbonatos de **45** y **46** permitió corroborar la identidad de los flavonoides de partida, ya que las señales observadas en sus espectros de RMN de ^1H tuvieron buena resolución. Los compuestos **50-55** correspondieron a nuevos derivados.



Se exploró una metodología para el cálculo de DCV de flavonas glucosiladas, y a partir de los resultados del estudio de DCV del compuesto **49** se determinó que los ángulos diedros $\text{H}''\text{-C}''\text{-O-C}_{\text{sp}2}$ de las posiciones del azúcar en C-2'', C-3'' y C4'' deben fijarse a 0° para evitar conformeros redundantes, y que el funcional B3LYP/DGDZVP es la herramienta más adecuada

para la obtención del espectro de DCV calculado. Además, se ubicaron las bandas estratégicas en el espectro de DCV experimental y calculado asociadas a los centros estereogénicos de la glucosa, lo cual complementa los pocos estudios que existen de DCV en glucopiranosidos como lo es **49**.

La evaluación de la actividad biológica de los flavonoides indicó que el núcleo de la crisina-7-O- β -D-glucósido (**45**) fue más eficaz en la actividad citotóxica frente a líneas de cáncer ensayadas, y sus derivados acetilados **49** y **55** mostraron de moderada a buena actividad sobre las líneas HT-29 y UACC-62, lo que indica la importancia de la presencia de los grupos acetatos en este tipo de moléculas. Además, estos compuestos mostraron mayor selectividad frente a las líneas celulares cancerosas en comparación con las líneas celulares normales. Otro aspecto interesante fue el efecto de la posición del azúcar en la molécula, ya que también influyó en el efecto citotóxico mostrado.

Los compuestos naturales **45** y **46**, los cuales presentan hidroxilos libres tuvieron moderada actividad antioxidante frente al radical ABTS⁺, actividad que no mostraron los derivados, indicando que los OH libres en este tipo de compuestos, son indispensables para efectuar la captación del radical.

Por su parte, crisina-8-C- β -D-glucósido (**46**) y derivados mostraron buena actividad anti-inflamatoria, disminuyendo significativamente los niveles de las citocinas pro inflamatorias TNF- α e IL-1 β , además que **46** produce un incremento en la producción de la citocina anti-inflamatoria IL-10. Los ensayos mediante Western blot indicaron la capacidad que tiene este compuesto para disminuir la expresión de la proteína COX-2 y a su vez incrementa la expresión de NrF2 y hemo oxigenasa-1, estas dos anteriores están relacionadas con los mecanismos protectores antioxidantes, por lo que este compuesto se propone como un buen candidato con potencial actividad anti-inflamatoria.

7. PARTE EXPERIMENTAL

- **Procedimientos Generales**

Los puntos de fusión (sin corregir) fueron determinados en un aparato Fisher–Johns. La rotación óptica fue medida en CHCl_3 o piridina a temperatura ambiente en un polarímetro Perkin Elmer 341. Los espectros de IR se midieron empleando un espectrofotómetro marca Buck 500. Los espectros de UV se adquirieron en MeOH en espectrofotómetro Genesys 10S Uv-VIS. Los espectros de RMN de 1D y 2D fueron medidos a 300 o 400 MHz para ^1H y a 75.4 o 100 MHz para ^{13}C en espectrómetros Varian Mercury 300 o 400, utilizando CDCl_3 , acetona- d_6 , CD_3OD , piridina- d_5 o $\text{DMSO}-d_6$ y tetrametilsilano como referencia interna. Los desplazamientos químicos se reportan en partes por millón y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. Masas de baja resolución fueron medidas en un espectrómetro Varian Saturn 2000, mientras que las masas de alta resolución se adquirieron en un espectrómetro Waters Synapt G2 en el Departamento de Bioquímica, Universidad de Colorado, Boulder, CO, USA. Gel de sílice 230–400 mesh (Merck) fue usado para las columnas cromatográficas.

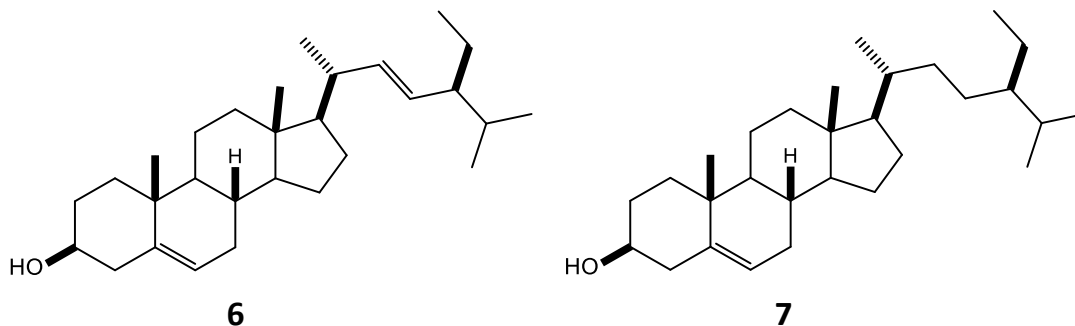
- **Material Vegetal**

Las especies de *Mimosa rosei* B.L.Rob. (Voucher No. 30189) y *Mimosa spirocarpa* Rose (Voucher No. 3642) fueron colectadas en el municipio de La Huacana, Michoacán, México (18° 57' 09.1" N, 101° 53' 28.3" W) 480 m sobre el nivel del mar durante los meses de julio y agosto del año 2016 al 2019. El material vegetal fue identificado por las profesoras Rosa Isabel Fuentes Chávez y Norma Patricia Reyes Martínez de la Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

- **Obtención de Extractos**

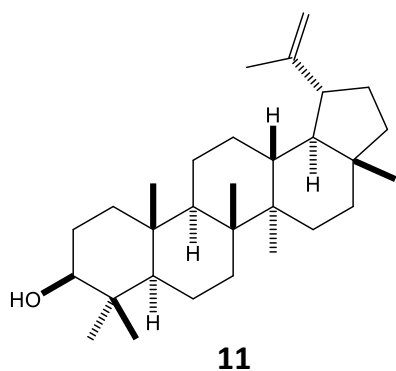
De cada parte (hojas, tallo y flores) se obtuvieron los extractos con hexanos, CH_2Cl_2 y MeOH. Los extractos de flores y hojas se realizaron mediante maceración por tres días, mientras que de los tallos se consiguieron mediante reflujo de 6 h. Cada extracto fue analizado por TLC y RMN de ^1H y se sometió a cromatografía en columna para la obtención de fracciones enriquecidas.

Estigmasterol (6) y 3 β -sitosterol (7)



La mezcla en proporción 1:4 de los compuestos **6** y **7** se obtuvo como un sólido tendiente a cristalizar (18 mg, 0.47%) a partir de la cromatografía en columna eluida con mezclas 98:2 hexanos-AcOEt de 3.8 g de extracto hexánico de tallos de *M. rosei*, también se aisló la mezcla de los compuestos (8 mg, 0.8%) a partir de 1 g del extracto CH₂Cl₂. Estos compuestos se ubicaron presentes también en el extracto de MeOH y en los extractos hexánicos, CH₂Cl₂ y metanólico de tallos de *M. spirocarpa*.

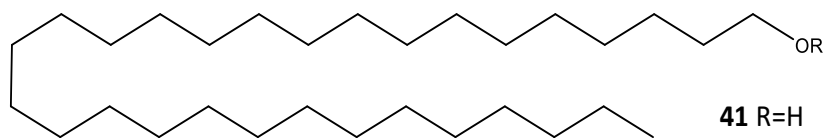
Lupeol (11)



El extracto metanólico de tallos (40 g) de *M. rosei* se dividió en 7 fracciones enriquecidas mediante cromatografía en columna (CC), 4.38 g de la fracción enriquecida 3 obtenida con mezclas de CH₂Cl₂-MeOH (7:3) se recromatografiaron en CC eluida con mezcla 7:3 CH₂Cl₂-AcOEt obteniéndose el compuesto **11** (22 mg, 0.5%) como un sólido amorfo blanco, p.f. 212-214 °C; la presencia del compuesto también se observó en los extractos hexánicos y de CH₂Cl₂ de ambas especies mediante RMN de ¹H y CCF. Los

datos de RMN de ¹³C se muestran en la Tabla 5.11.

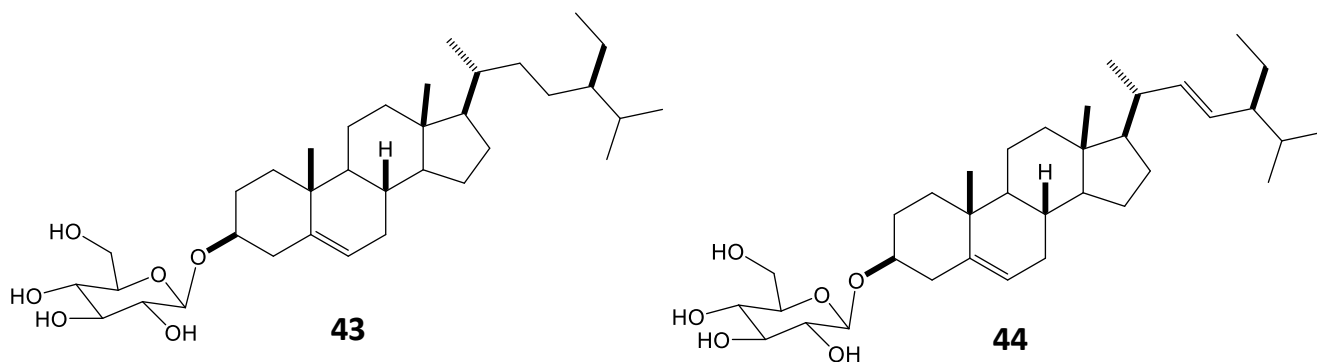
n-triacontanol (**41**) y acetato de *n*-triacontanilo (**42**)



El compuesto **41** se obtuvo mediante purificación en columna cromatográfica usando mezclas de hexanos-AcOEt en polaridades

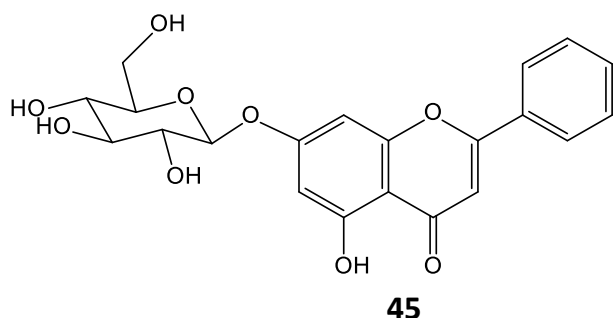
ascendentes de 7.5 g del extracto hexánico de hojas de *M. rosei* (225 mg, 3%) y 5.5 g de *M. spirocarpa* (121 mg, 2.2%) como un sólido blanco como producto mayoritario, p.f. 77-79 °C, RMN de ¹H de (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.64 (2H, t, CH₂-1), 1.57 (2H, s, CH₂-2), 1.25 (s, CH₂-3-CH₂-29), 0.88 (3H, t, CH₃-30). El derivado **42** (20.7 mg, 92%) se obtuvo en forma de sólido ceroso, p.f. 63-65 °C, a partir de la reacción de acetilación de 20 mg de **41**. EMIE *m/z* 498 [M+H₂O]⁺. RMN de ¹H de (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.15 (2H, t, CH₂-1), 2.05 (3H, s, AcO), 1.67 (2H, q, CH₂-2), 1.25 (s, CH₂-3-CH₂-29), 0.88 (3H, t, CH₃-30).

Glucósido de 3β-sitosterol (**43**) y glucósido de estigmasterol (**44**)



El extracto metanólico de hojas de *M. rosei* se dividió en 7 fracciones enriquecidas utilizando mezclas de CH₂Cl₂-MeOH (1:0, 4:1, 3:2, 1:1, 2:3, 1:4 y 0:1), la fracción enriquecida 3 (9 g) se recromatografió en CC usando un sistema CH₂Cl₂-MeOH-H₂O. En las fracciones 1-7 se obtuvo un sólido blanco (32 mg, 0.16%) correspondiente a la mezcla en proporción 4:1 de **43** y **44**. Esta mezcla también se encontró presente en el extracto metanólico de hojas de *M. spirocarpa*.

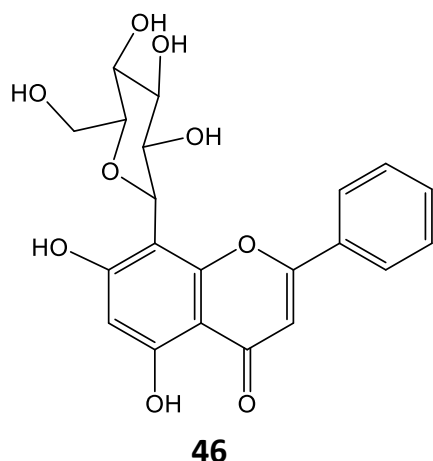
Crisina-7-O-β-D-glucósido (45)



El compuesto **45** se obtuvo como un sólido blanco amarillento (100 mg, 1.11%), p.f. 208-210 °C a partir de la recromatografía en columna utilizando mezclas CH₂Cl₂-MeOH-H₂O de la fracción enriquecida 3 (9g) del extracto metanólico de hoja de *M. rosei*; $[\alpha]_{589} -65$, $[\alpha]_{578} -69$, $[\alpha]_{546} -78$ (c, 0.05, piridina), IR ν_{\max} (KBr, cm⁻¹): 3398, 1653,

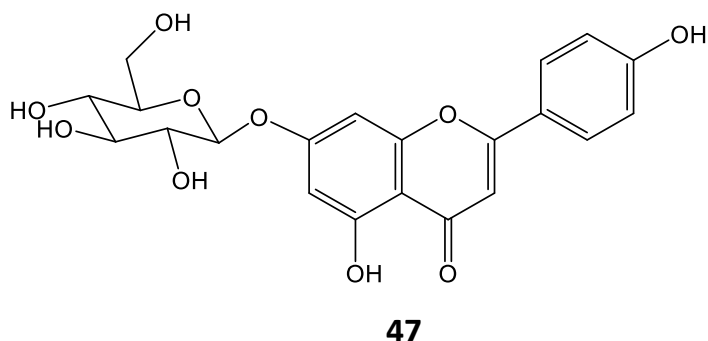
1075, 838. UV λ_{\max} (MeOH) 217, 273. EMIE m/z 254 [M-Glu]⁺. Datos de RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) se presentan en Tabla 5.5. ¹H NMR (300 MHz, piridina-*d*₅) δ (ppm) 13.40 (1H, s, OH-5), 7.91 (2H, dd, $J = 7.9, 1.2$, H-2', H-6'), 7.48 (3H, m, H-3', H-4', H-5'), 7.15 (1H, d, $J = 2.0$, H-8), 7.01 (1H, s, H-3), 6.89 (1H, d, $J = 2.0$, H-6), 5.88 (1H, d, 7.0, H-1), 4.61–4.25 (m, H-azúcar).

Crisina-8-C-β-D-glucósido (46)



La fracción enriquecida 3 (9 g) obtenida del extracto metanólico de hoja de *M. rosei* se recromatografió en CC usando mezclas de CH₂Cl₂-MeOH-H₂O en proporción 9:1:0.1, obteniéndose al compuesto **46** en las fracciones 31-46 como un sólido amorfo de color amarillo intenso (62 mg, 0.68%), p.f. 235-237 °C, IR ν_{\max} (cm⁻¹): 3485, 3384, 1646, 1613, 1062, 843. UV λ_{\max} (MeOH) 216, 271, 313. Datos de RMN de ¹H y ¹³C se encuentran en Tabla 5.7.

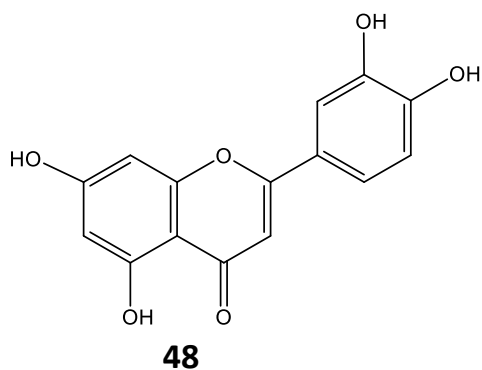
Kaempferol-7-O- β -D-glucósido (47)



La fracción enriquecida 4 (12 g) obtenida del extracto metanólico de hojas de *M. rosei* se recromatografió en CC usando mezclas de CH_2Cl_2 -MeOH- H_2O en proporción 4:1:0.1 de la cual se obtuvo el compuesto **47** (8 mg, 0.06%) como un sólido amorfo amarillo, p.f. 254-256 °C. Los datos de

RMN de ^1H se muestra en la Tabla 5.8.

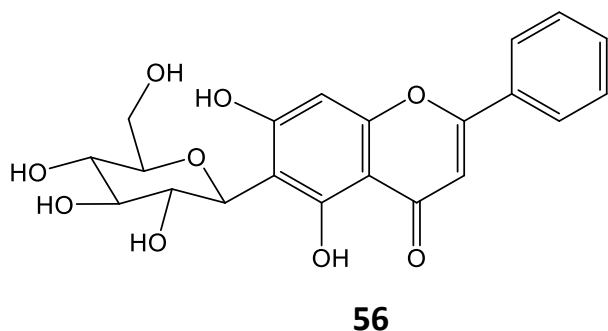
Luteolina (48)



13.5 g de extracto metanólico de flores de *M. rosei* se sometieron a purificación cromatográfica utilizando la mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH en proporción 9:1, en las fracciones 19-31 se obtuvo el compuesto **48** en forma de sólido amarillo (14mg, 0.10%). RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm) 12.97 (1H, s, OH-5), 7.40 (1H, dd, $J = 8.2, 2.2$, H-6'), 7.37 (1H, d, $J = 2.2$, H-2'), 6.85 (1H, d, $J = 8.2$, H-5'), 6.64 (1H, s, H-3), 6.42 (1H, d, $J = 1.9$, H-8) 6.15

(1H, d, $J = 1.9$, H-6).

Crisina-6-C- β -D-glucósido (**56**)



El compuesto se aisló como uno de los componentes mayoritarios del extracto metanólico de hojas (lote 2018) de *M. rosei*. La purificación de fracciones enriquecidas con los flavonoides **45**, **46** y **56** se llevó a cabo mediante cromatografía en placa preparativa, utilizando mezclas de CH₂Cl₂-Acetona-MeOH en proporción 8:2:1. El compuesto

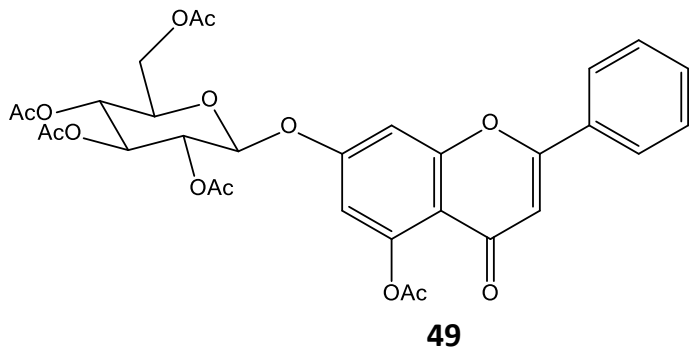
se obtuvo en forma de sólido amarillo claro con p.f. 174-176 °C, IR ν_{max} (cm⁻¹): 3398, 1627, 1569, 1359, 1161, 1033, 764. UV λ_{max} (MeOH) 216, 272, 315. Los de RMN de ¹H y ¹³C se encuentran en la Tabla 5.9.

- **Obtención de Derivados**

Reacciones de acetilación fueron llevadas a cabo con lotes de 10 mg de materia prima (**41**, **45** y **46**) y con excesos de anhídrido acético (1mL) y piridina (1mL). Para el compuesto **41** la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por 3 h, mientras que para **45** y **46** se llevó la reacción sobre baño de vapor por 4 y 6 h, respectivamente. Posterior al tiempo de reacción se llevó a cabo la extracción del producto usando acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con solución de HCl al 10%, seguido de agua destilada, solución saturada de NaHCO₃ y finalmente con agua destilada, finalmente, la humedad fue eliminada con Na₂SO₄ anhidro.

Las reacciones de carbonatación se realizaron en lotes de 10 mg de materia prima (**45** y **46**). Los compuestos se colocaron en matraz balón, se les adicionó 1 mL de piridina para disolverlos y se colocaron en agitación, a continuación, se adicionó cloroformiato de metilo o etilo (1 mL para cada reacción), se dejaron en agitación por 5 h. Posterior al tiempo de reacción se extrajeron con AcOEt y se realizaron lavados con solución acuosa de HCl al 5%, agua destilada, solución diluida de NaHCO₃ y finalmente con agua. La humedad fue eliminada con Na₂SO₄ anhidro. Las reacciones se monitorearon cada hora mediante TLC.

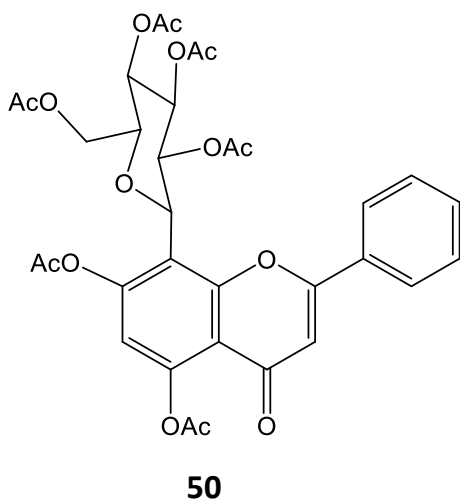
Pentaacetato de Crisina-7-O- β -D-glucósido (**49**)



El derivado **49** (12.8 mg, 85%) se obtuvo en forma de cristales incoloros con p.f. 193-195 °C. $[\alpha]_{589} -26$, $[\alpha]_{578} -28$, $[\alpha]_{546} -32$, $[\alpha]_{436} -59$ (c, 0.6, CHCl₃) IR ν_{max} (KBr, cm⁻¹): 2947, 1755, 1642, 1613. EMAR m/z 649.1525 [M+Na]⁺ (cal. para C₃₁H₃₀O₁₄ + Na⁺, 649.1528). Los datos de RMN de ¹H y ¹³C se

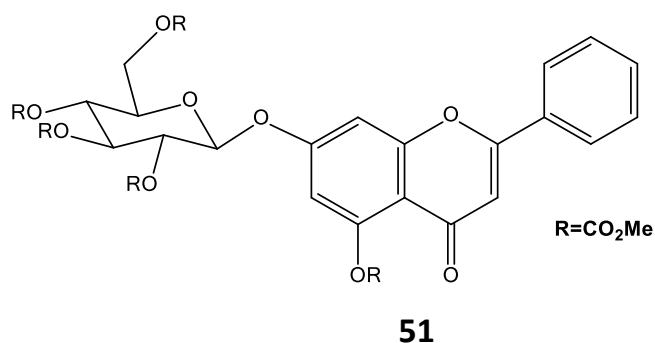
encuentran en la Tabla 5.14.

Hexaacetato de crisina-8-C- β -D-glucósido (**50**)



El derivado hexaacetilado **50** se obtuvo como un sólido blanco (12.6 mg, 80%) p.f. 124-126 °C. IR ν_{max} (cm⁻¹): 2925, 1747, 1646, 1165, 1033. Datos de RMN de ¹H y ¹³C (Tabla 5.14).

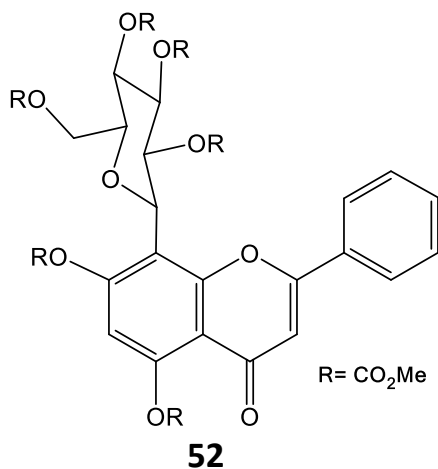
Pentacarbonato de metilo de crisina-7-O-β-D-glucósido (51)



El derivado percarbonatado **51** se obtuvo como un sólido blanco (8 mg, 47%) p.f. 118-120 °C. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ en ppm, J en Hz; 7.88 (2H, dd, $J = 7.6, 1.2$, H-2', H-6'), 7.54 (3H, m, H-3', H-4', H-5'), 7.07 (1H, d, $J = 2.4$, H-8), 6.78 (1H, d, $J = 2.4$, H-6), 6.67 (1H, s, H-3), 5.30 (1H, d, $J = 7.6$, H-1''), 5.24 (1H, t, $J = 9.2$,

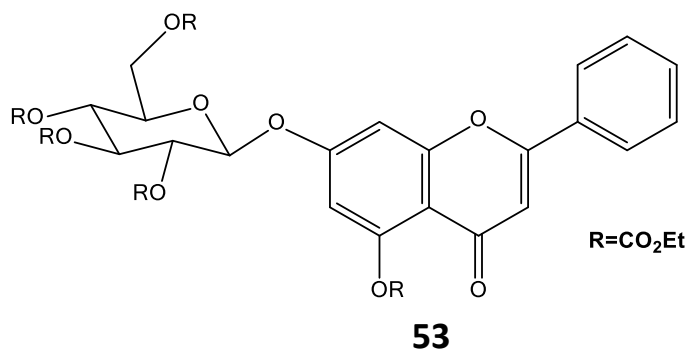
H-3''), 5.16 (1H, dd, $J = 9.2, 7.6$, H-2''), 5.02 (1H, t, $J = 9.2$, H-4''), 4.39 (1H, dd, $J = 12.0, 6.0$, H-6a''), 4.34 (1H, dd, $J = 12.0, 3.0$, H-6b''), 4.06 (1H, ddd, $J = 9.2, 6.0, 3.0$, H-5''), 3.99, 3.85, 3.83, 3.82, 3.71 (s, OMe).

Hexacarbonato de metilo de crisina-8-C-β-D-glucósido (52)



El derivado percarbonatado **52** se obtuvo como un sólido blanco (7.2 mg, 40%), p.f. 125-127 °C, IR ν_{max} (cm^{-1}): RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ en ppm, J en Hz, 7.85 (2H, dd, $J = 7.6, 1.2$, H-2', H-6'), 7.53 (3H, m, H-3', H-4', H-5'), 7.45 (1H, s, H-8), 6.70 (1H, s, H-6), 5.47 (1H, t, $J = 9.6$, H-2''), 5.07 (1H, t, $J = 9.6$, H-3''), 5.00 (1H, d, $J = 10$, H-1''), 4.92 (1H, t, $J = 9.6$, H-4''), 4.55 (1H, dd, $J = 12.0, 4.0$, H6a''), 4.29 (1H, dd, $J = 12.0, 1.6$, H6b''), 3.66 (1H, m, H-5''), 3.99, 3.96, 3.85, 3.84, 3.80, 3.77 (s, OMe).

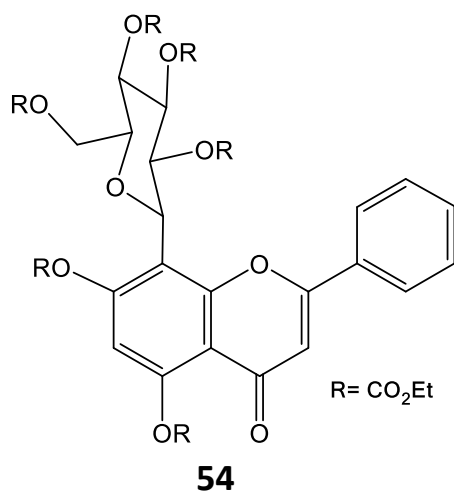
Pentacarbonato de etilo de crisina-7-O-β-D-glucósido (53)



El compuesto se obtuvo en forma de sólido blanco (16.6 mg, 89%), p.f. 75-77 °C, IR ν_{\max} (cm^{-1}): 2929, 1775, 1649, 1204, 1018. RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ en ppm, J en Hz, 7.87 (2H, dd, $J = 7.6, 1.6$, H-2', H-6'), 7.52 (3H, m, H-3', H-4', H-5'), 7.06 (1H, d, $J = 2.4$, H-8), 6.78 (1H, d, $J = 2.4$, H-6), 6.67 (1H, s,

H-3), 5.32 (1H, d, $J = 7.6$, H-1''), 5.24 (1H, t, $J = 9.2$, H-4''), 5.16 (1H, dd, $J = 9.2, 7.6$, H-2''), 5.03 (1H, t, $J = 9.2$, H-3''), 4.33 (1H, dd, $J = 12.0, 2.8$, H-6''), 4.07 (1H, ddd, $J = 12.0, 6.0, 2.8$, H-5''), 4.40, 4.25, 4.23, 4.22 (2H, q, CH_2), 1.46, 1.32, 1.31, 1.31, 1.20 (3H, t, CH_3). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 176.4 (C-4), 162.3 (C-7), 159.6 (C-2), 158.2 (C-5), 154.6 (C-9), 154.1, 153.8, 153.7, 152.7, 150.6 (C=O), 131.6 (C-4'), 131.09 (C-1'), 129.0 (C-3', C-5'), 126.2 (C-2', C-6'), 113.2 (C-10), 109.3 (C-3), 108.4 (C-6), 102.8 (C-1'), 97.7 (C-8), 75.7 (C-5''), 74.3 (C-3''), 72.0 (C-2''), 71.7 (C-4''), 65.2 (C-6''), 65.1, 65.0, 65.0, 64.8, 64.5 (OCH_2), 14.2, 14.0 (CH_3).

Hexacarbonato de etilo de crisina-8-C-β-D-glucósido (54)

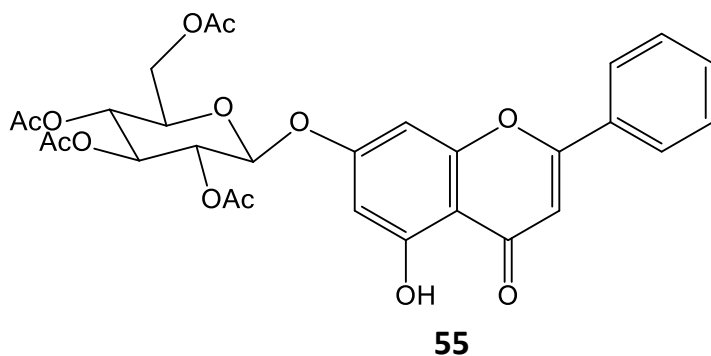


El crudo de reacción para la obtención de **54** se sometió a purificación en columna cromatográfica utilizando mezcla de hexanos-AcOEt (3:2). El compuesto se obtuvo en forma de sólido blanco (11.2 mg, 56%), p.f. 90-92 °C, IR ν_{\max} (cm^{-1}): 2926, 1750, 1246, 1033. RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ en ppm, J en Hz, 7.84 (2H, d $J=6.8$, H-2', H-6'), 7.51 (3H, m, H-3', H-4', H-5'), 7.00 (1H, d $J=2.0$, H-8), 6.60 (1H, s, H-6), 5.47 (1H, d $J= 8.4$, H-1''), 5.37 (1H, m, H-3''), 5.29 (1H, m, H-2''), 5.17 (1H, t, $J = 8.8$, H-4''), 4.48 (1H, dd $J=12.4, 4.0$, H-6a), 4.08 (1H, ddd, $J=12.4, 4.0, 2.4$, H-5''), 4.44-3.95 (2H, q, CH_2),

1.48-0.86 (3H- t, CH_3). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 177.4 (C-4), 164.3 (C-7), 162.5 (C-2), 162.5 (C-5), 157.2 (C-9), 154.8, 154.3, 153.8, 153.3, 152.6, 151.2 (C=O), 131.6 (C-4'), 131.5 (C-1'), 129.3 (C-3', C-5'), 126.4 (C-2', C-6'), 110.6 (C-10), 110.5 (C-3), 108.4 (C-6), 108.3

(C-8), 77.0 (C-5''), 76.7 (C-3''), 74.6 (C-1'') 73.7 (C-2''), 71.8 (C-4''), 65.1(C-6''), 65.1, 65.0, 65.0, 64.8, 64.5 (OCH₂), 14.2, 14.0 (CH₃).

Crisina-7-O-β-D-glucósido, tetraacetato (55)



El compuesto **55** se obtuvo de la hidrólisis selectiva de **49**, se colocaron lotes de 20 mg los cuales se disolvieron en 3 mL de MeOH y se les adicionó 100 mg de acetato de sodio, la mezcla de reacción se colocó a reflujo por 4 h y posteriormente se vertió en hielo, con lo cual precipitó el compuesto

55, el cual se filtró y lavó con agua destilada. El compuesto se recrystalizó en mezclas de hexanos-CH₂Cl₂, obteniéndose agujas finas (24 mg, 86%) p.f. 103-105 °C, IR ν_{\max} (cm⁻¹): 3507, 2926, 1749, 1227, 1035. RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ en ppm, *J* en Hz, 12.74 (1H, s OH-5), 7.89 (2H, dd *J*= 8.0, 1.6, H-2', H-6'), 7.55 (3H, m, H-3', H-4', H-5'), 6.70 (1H, s, H-3), 6.61 (1H, d *J*=2.0, H-8), 6.46 (1H, d *J*=2.0, H-6), 5.33-5.14 (m, H-1'', H-2'', H-3'', H-4''), 4.29 (1H, dd *J*= 12.4, 6.0, H-6a''), 4.21 (1H, dd *J*= 12.4, 2.4, H-6b''), 3.95 (1H- m, H-5''), 2.11, 2.08, 2.07, 2.05 (3H, s, AcO). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 182.5 (C-4), 164.4(C-2), 162.4 (C-5), 162.1 (C-7), 157.4 (C-9), 170.5, 170.1 169.3, 169.2 (C=O, Ac), 132.0 (C-4'), 131.0 (C-1'), 129.1 (C-3', C-5'), 126.3 (C-2', C-6'), 107.0 (C-10), 106.0 (C-3), 105.9 (C-6), 99.9 (C-1'), 99.7 (C-8), 72.5 (C-5''), 72.4 (C-3''), 70.9 (C-2''), 68.1 (C-4''), 61.9 (C-6'').

- **Obtención del espectro experimental de dicroísmo circular vibracional.**

Los datos se obtuvieron en un espectrofotómetro BioTools dualPEM ChiralIR FT, 3.6 mg del compuesto **49** fueron disueltos en 150 μ L CDCl₃ 100% deuterado y colocado en una celda de BaF₂ de 100 μ m. El espectro fue adquirido con una resolución de 4 cm⁻¹ por 6 h, con la línea de base proporcionada restando el espectro del solvente adquirido bajo las mismas condiciones, la estabilidad de la muestra fue monitoreada por RMN de ¹H antes y después de la medición de DCV.

- **Cálculos teóricos de Dicroísmo circular vibracional.**

La búsqueda conformacional se realizó con un modelo de **49** con restricción conformacional en los grupos acetatos de la parte del azúcar en C-2", C-3", y C-4" empleando el protocolo Monte Carlo, usando MMFF94 en el programa Spartan'04, fijando el correspondiente ángulo diedro H"-C"-O-C_{sp2} a 0°. Se obtuvieron 100 confórmeros en rango de 0-10 kcal/mol, de los cuales se hizo un corte en el rango de 0-5 kcal/mol lo que llevó a la obtención de 38 confórmeros, los cuales se sometieron a optimización de la energía ahora sin restricción conformacional con el nivel de teoría DFT B3LYP/6-31G(d) en el programa Spartan'04, resultando en 25 confórmeros de mínima energía dentro del rango de 0-5 kcal/mol. Las estructuras fueron optimizadas en geometría y energía con DFT empleando los niveles de teoría, B3LYP, B3PW91 y PBEPBE con base de cálculo DGDZVP en el programa Gaussian 09. Las estructuras minimizadas fueron utilizadas para calcular los parámetros termodinámicos y los espectros de IR y DCV a 298 K y 1 atm. Todas las estructuras de mínima energía fueron verificadas por la ausencia de frecuencias imaginarias y sus energías libres relativas se emplearon para calcular la distribución de Boltzmann. Los espectros de IR y DCV se calcularon considerando las bandas de Lorentzian con medias anchuras de 6 cm⁻¹. La visualización molecular fue llevada con el programa GaussView 6.0. La optimización de la geometría y los cálculos vibracionales requirieron de 20 minutos de tiempo computacional por confórmero utilizando un procesador de 20 núcleos de 2.3 GHz con 128 Gb de RAM. Los datos experimentales y calculados se compararon estadísticamente utilizando el programa CompareVOA.

- **Cultivos Celulares**

Línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT-29 fue adquirida de la European Collection of Cell Cultures; Línea celular de melanoma de piel humano UACC-62 fue amablemente cedida por el grupo del profesor Miguel López Lázaro, del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla. Células epiteliales de colon humano normal CCD-841 CoN y línea celular de queratinocitos humanos espontáneamente inmortalizados HaCaT fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) y la línea celular monocitaria de leucemia aguda humana THP-1 fue cedida

amablemente por el profesor Francisco Muriana del Instituto de la Grasa (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Sevilla). Todas las células fueron incubadas en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37 °C. HT-29 fue cultivada en medio McCoy's 5A; UACC-62 y THP-1 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 con L-Glutamina 2 mM y HEPES 25 mM; HaCaT y CCD-841 CoN se cultivaron en medio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM). Todos los medios de cultivo fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomicina.

- **Ensayos Citotóxicos y de selectividad**

La citotoxicidad *in vitro* de los compuestos se evaluó mediante la técnica de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio), el cual puede ser metabolizado por las células vivas a formazán, un compuesto color morado cuya absorbancia puede definir el porcentaje de viabilidad de las células al ser tratadas con el compuesto que se quiere evaluar.

Primeramente, la línea celular THP-1 se sometió a diferenciación a macrófagos utilizando el compuesto phorbol 12-miristato 13-acetato (PMA), con el cual las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 10⁴ células por pocillo y se incubaron por 72 h en atmosfera húmeda y 5% de CO₂ a 37 °C.

Las líneas celulares de cáncer HT-29 y UACC-62 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 10⁴ células por pocillo. Las células se les permitió adherirse por 24 h en atmosfera húmeda y 5% de CO₂ a 37 °C. Posterior al tiempo de incubación se removió el medio de cultivo y las células fueron lavadas con buffer salino de fosfatos (PBS) e incubadas nuevamente por 48 h con soluciones de los compuestos disueltos en DMSO y preparados en medio de cultivo a concentraciones de 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 μM. Se consideraron controles incubados únicamente con medio y DMSO (0.1% v/v), el cual no afecta la viabilidad celular, además de que se utilizó el fármaco oxaliplatino como control positivo. Posterior al tiempo de tratamiento, se retiró el medio y se adicionó 100 μL a cada pocillo de solución (0.25 mg/mL) de MTT y se incubó por 4 h. Los cristales de formazán fueron disueltos con DMSO (100 μL/pocillo) y se midió la absorbancia a 550 nm en un lector de placas Labsystems Multiskan EX. Los

experimentos se llevaron por triplicado y la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) fue calculada, se consideraron activos a aquellos compuestos cuyo IC₅₀ fuera menor a 100 μM , los cuales se seleccionaron para las pruebas de selectividad donde se comparó su actividad citotóxica en líneas celulares no cancerosas (Colon normal CCD-841 y queratinocitos HaCaT) a la par con las líneas HT-29 y UACC-62. Para este ensayo se sembraron 5×10^3 células/pocillo y se probaron las concentraciones (100-6.25 μM), el tratamiento se dejó por 48 h y se determinó la viabilidad con MTT siguiendo la metodología descrita anteriormente; el índice de selectividad (IS) se calculó dividiendo el valor de IC₅₀ que los compuestos mostraron en las células no cancerosas entre el IC₅₀ que mostraron en células de cáncer.

- **Actividad antioxidante con el método ABTS**

La actividad antioxidante fue medida con el método del ABTS, ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) el cual es un radical catiónico de color azul que al reaccionar con un antioxidante regresa a su forma neutra incolora. El radical ABTS^{•+} se generó con ABTS y persulfato de potasio disueltos en agua e incubado en la oscuridad por 12-16 h. Los ensayos se llevaron a cabo a diferentes concentraciones de los compuestos desde 200 hasta 3.12 μM donde se añadieron en placas de 96 pocillos; el radical ABTS^{•+} se diluyó con etanol hasta una concentración final de 0.0795 mg/mL y se añadieron 100 μL de esta dilución a cada pocillo, incubándose por 6 min a temperatura ambiente. Posterior al tiempo de incubación, se midió la absorbancia a 734 nm en un lector de placas Synergy HT. Como control positivo se utilizó Trolox (3.12-200 μM) para generar una curva de calibración. Se calculó la concentración efectiva 50 (EC₅₀), que es la concentración para ejercer el 50% de actividad antioxidante, los resultados se expresan como equivalentes de trolox (EC₅₀ muestra/ EC₅₀ del Trolox).

- **Actividad anti-inflamatoria**

Estudio de niveles de citocinas mediante ELISA

El estudio de producción de citocinas reguladoras de respuestas inflamatorias y tumorales IL-1 β y TNF- α , así como la citocina anti-inflamatoria IL-10 se realizó empleando la línea celular monocitaria THP-1. Para lo cual primeramente y mediante el ensayo de MTT se

buscaron las concentraciones de los compuestos en el rango de 100-6.25 μM que mantuviera al menos el 80% de viabilidad de las células.

Para la obtención de las citocinas, se realizaron ensayos en placas de 96 pocillos, donde se sembraron 15×10^3 células/pocillo a los cuales se les añadió PMA a una concentración de 8 nM y se incubaron durante 72 h en atmosfera húmeda y 5% de CO_2 a 37 °C para diferenciar las células a macrófagos. A continuación, se les retiró el medio y las células se lavaron con PBS estéril frío para eliminar los monocitos no transformados. Posteriormente se pre-trataron por 1 h con los compuestos **45**, **46**, **53** y **54** a 10, 50 y 100 μM ; **49**, **50** y **55** a concentraciones de 1, 5 y 10 μM ; se usó dexametasona (1 μM) como control positivo. La respuesta inflamatoria fue inducida por la adición de lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se consideraron grupos control (sin estimulación con LPS) y estimulados con LPS. Las células se incubaron durante 24 h y los sobrenadantes de los cultivos que contenían las citocinas fueron recogidos y almacenados -80 °C hasta su uso, la cuantificación de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-10) se realizó con kits de ELISA específicos para cada citocina (Diaclone), la absorbancia fue medida en lector de placas Labsystems Multiskan EX a 450 nm. Para el cálculo de concentración de citocinas se preparó una curva patrón a partir de diluciones de citocina estándar provenientes del kit.

Estudio de la expresión de proteínas mediante Western blot

Se determinó la expresión de la enzima ciclooxigenasas COX-2 ya que es un parámetro directo de inflamación, además de que se determinó la enzima hemo oxigenasa-1 y el factor de transcripción Nrf2 los cuales están implicados en mecanismos de defensa antioxidantes.

La expresión de las proteínas se determinó empleando la línea celular THP-1. Para estos estudios, se seleccionaron a los compuestos que mostraron la mejor actividad anti-inflamatoria en el perfil de citocinas. Para la obtención de proteínas se sembraron 10^6 células por pocillo en placas de 6 pocillos, se adicionó PMA a una concentración de 8 nM y se incubaron por 72 h para diferenciarlos a macrófagos. Los cultivos se lavaron con PBS estéril frío para la eliminación de células no transformadas y se añadieron 2 mL de medio completo a cada pocillo con el correspondiente tratamiento, se incubó por 1 h y posterior a este tiempo se adicionó LPS a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para posteriormente incubar por 24 h. Además de los tratamientos

con el compuesto, se consideraron controles sin estimular con LPS, controles estimulados con LPS y controles tratados con el antiinflamatorio dexametasona ($1 \mu\text{M}$). A continuación, se retiró el medio y los macrófagos se lavaron con PBS frío, los remanentes de estos lavados se extrajeron y se añadió $40 \mu\text{L}$ de tampón de lisis para despegar las células de la superficie a la que estaban adheridas empleando un raspador, las células se recolectaron y sonicaron en baño de hielo a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min y se centrifugaron (375 g , 5 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) para eliminar los restos membranosos. El contenido en proteínas en el sobrenadante se determinó por el método de Bradford, empleando γ -globulina como estándar.

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes utilizando geles de electroforesis al 10% de acrilamida. Previo a la carga de las muestras en los geles, se homogenizaron las muestras con reactivo de Laemmli y se desnaturizaron las proteínas mediante incubación durante 10 min en un termobloque a $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Se cargaron $26 \mu\text{L}$ de cada muestra y se llevó a cabo la electroforesis en una cubeta Mini Protean® Tetra Cell (Bio Rad) a 70 V y temperatura ambiente. Se emplearon como marcadores proteínas pre-teñidas de masa molecular conocida (Bio-Rad). A continuación, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (1.5 h, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 100 voltios, 0.4 amperios) en un aparato Mini Trans-Blot® Cell (Bio Rad). Las membranas obtenidas de la transferencia se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos primarios específicos para la detección de las proteínas COX-2, hemo oxigenasa-1 y Nrf2, así como de la β -actina. Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se expresan en porcentaje del análisis densitométrico.

Anticuerpos usados: COX-2 (Catalogo n° 160116, Cayman, USA); HO-1 (Catalogo n° ADI-SPA-396, Enzo, USA), Nrf2 (Catalogo n° C-20 SC-722, Santa Cruz); β -actina (Catalogo n° A5316, Sigma-Aldrich).

Después del tiempo de incubación se realizaron lavados y se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario Anti-rabbit Ig G (H + L) (31460) HRP conjugated de Dako Cytomation, por 1.5 h, para la β -actina se usó Polyclonal Goat Anti-mouse Ig/HRP, code n° P0447, Dako Cytomation.

Las membranas se revelaron mediante un kit de revelado de quimioluminiscencia (SuperSignal-West Pico Chemiluminescent Substrate) suministrado por Pierce.

- **Análisis Estadístico**

Los resultados obtenidos se analizaron con el programa GraphPad 6.0. y se expresan como la media \pm error estándar de los resultados obtenidos. En poblaciones múltiples con diferentes medias, se llevó a cabo análisis de la varianza de estas mediante el test ANOVA (análisis de varianza) de una rama, comparándose las medias mediante un test de Bonferroni. También se realizó la prueba t-Student para comparar dos poblaciones entre sí. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguiar, L. B. 2012. Plantas medicinales cultivadas em quintais de comunidades rurais no domínio do cerrado piauiense. *Rev. bras. plantas med.* 14, 419-434.
- Alcaraz, M.J. Fernandez, P. Guillen, M.I. 2003. Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. *Curr. Pharm. Des.* 9, 2541-51.
- Alwabs, M. Khairuddean, M. Chong, W. 2015. Chemical constituents and antioxidant activity of *Teucrium barbeyanum* Aschers. *Rec. Nat. Prod.* 9, 159-163.
- Antri, A. Messouri, I. Chendid, R. Bouktaib, M. Alami, R. Bali, B. Lachkar, M. 2004. Flavone glycosides from *Calycotome Villosa* Subsp. *Intermedia. Molecules.* 9, 568-573.
- Back, D. Polavarapu, P. 1984. Fourier-transform infrared, vibrational circular dichroism of sugars. A spectra-structure correlation. *Carbohydr. Res.* 133, 163-167.
- Barreiro, E. 2019. What is hidden in the biodiversity? The role of natural products and medicinal chemistry in the drug discovery process. *An Acad. Bras. Cienc.* 91: e20190306.
- Bautista, E. Calzada, F. Ortega, A. Yépez, L. 2011. Antiprotozoal Activity of Flavonoids Isolated from *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae-Mimosoideae). *J. Mex. Chem. Soc.* 55, 251-253.
- Benedí, J. Gómez, M. 2006. Fármacos antineoplásicos (I). *Farmacia Profesional.* 20, 60-64.
- Bose, P. Polavarapu, P. 1999. Acetate groups as probes of the stereochemistry of carbohydrates: a vibrational circular dichroism study. *Carbohydr. Res.* 322, 135-141.
- Burda, S. Oleszek, W. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 6, 2774-2779.
- Camargo, R. 2000. Descripción, distribución, anatomía, composición química y uso de *Mimosa tenuiflora* en México. *Rev. Biol. Trop.* 48, 939-954.
- Camargo, S. Grether, R. Martínez, A. García, V. Barrios, S. 2001. Especies útiles del género *Mimosa* (Fabaceae-Mimosoideae) en México. *Bol. Soc. Bot. México.* 68, 33-44.
- Chen, S. Farina, V. 1995. Paclitaxel chemistry and structure-activity relationships. *The Chemistry and Pharmacology of Taxol and its Derivatives.* 1st edition. Elsevier Science: Amsterdam, 165-254.
- Cherkaoui, T. Lachkar, M. Wibo, M. Morel, M. Gilani, A.H. Lyoussi, B. 2008. Pharmacological studies on hypotensive, diuretic and vasodilator activities of chrysin glucoside from *Calycotome villosa* in Rats. *Phytother. Res.* 22, 356-361.
- Chiu, N. C. 1998. The illustrated medicinal plants of Taiwan Taipei. Southern Materials Center Inc, 5, 99.
- CONABIO, 2009. Catálogo taxonómico de especies de México. 1. In Capital Nat. México. CONABIO, México.

- CONABIO. Selvas secas, Página web Biodiversidad mexicana, consultado 10 de enero del 2018 URL: <http://www.biodiversidad.gob.mx/ecosistemas/selvaSeca.html>
- Cseke, L. Kirakosyan, A. Kaufman, P. Warber, S. Duke, J. Briemann, H. 2006. Natural Products from plants. 2nd edition. Taylor and Francis group.
- Dahl, K. Oppo, D. Eglinton, T. Hughen, K. Curry, W. Sirocko, F. 2005. Terrigenous plant wax inputs to the Arabian Sea: Implications for the reconstruction of winds associated with the Indian Monsoon. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 69, 2547-2558.
- Dewick, P. 2009. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 3rd Edition. Wiley.
- Dhillon, S. A. 2004. Integrative ecological restoration and local involvement in the Tehuacan-Cuicatlan Valley, Mexico. *Environ. Conserv.* 31, 1-3.
- Domínguez, X. G. 1989. Kukulkanins A and B, new chalcones from *Mimosa tenuifolia*. *J. Nat. Prod.* 52, 864-867.
- Falcone, M. Rius, S. Casati, P. 2012. Flavonoids: biosynthesis, biological functions and biotechnological applications. *Front. Plant. Sci.* 3, 222.
- Farnsworth, N. 1991. Global importance of medicinal plants. New York: Cambridge University Press.
- Ferlay, J. Colombet, M. Soerjomataram, I. Mathers, C. Parkin, D.M. Piñeros, M. Znaor, A. Bray, A. 2019. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer.* 144, 1941-1953.
- García, E. Smith, M. Buqué, A. Aranda, F. de la Peña, F.A. Ivars, A. Cánovas M.S. Conesa, M.A.V. Fucikova, J. Spisek, R. Zitvogel, L. Kroemer, G. Galluzzi, L. 2018. Trial watch: immunostimulation with recombinant cytokines for cancer therapy. *Oncoimmunology.* 15, 7-6.
- Ghani, A. 2003. Medicinal plants of Bangladesh. 2nd edition. Bangladesh: The Asiatic society of Bangladesh.
- Gold, R. Kappos, L. Arnold, D.L. Bar-Or, A. Giovannoni, G. Selmaj, K. 2012. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 12, 1098-1107.
- Grether, R. 1988. A new species of *Mimosa* from the State of Guerrero, Mexico. *Syst. Bot.* 13, 425-427.
- Grether, R. Camargo, S. Martínez, A. 1996. Especies del género *Mimosa* (Leguminosae) presentes en México. *Bol. Soc. Bot. México.* 58, 149-152.
- Harborne, J. 1999. The Handbook of Natural Flavonoids. Vol 1. Wiley.
- Hasegawa, M. 1957. Flavonoids of Various *Prunus* Species. VI. The Flavonoids in the Wood of *Prunus aequinoctialis*, *P. nipponica*, *P. Maximowiczii* and *P. aiium*. *J. Amer. Chem. Soc.* 79, 173.
- Hehre, W. People, W. Devaquet, A. 1976. Torsional potentials of methyl rotors attached to polar linkages. *J. Am. Chem. Soc.* 98, 664-668.

- Heinrich, M. R. 1998. Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38, 539-565.
- INEGI 2017. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero). Consultado en línea el día 31 de Enero del 2018. http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/cancer2017_Nal.pdf
- Jackson, M. Eller, F. 2006. Isolation of long-chain aliphatic alcohols from beeswax using lipase-catalyzed methanolysis in supercritical carbon dioxide. *J. of Supercritical Fluids*, 37, 173-177.
- Jain, S. 1991. Dictionary of Indian Folk Medicine and Ethnobotany. New Delhi: Deep Publications.
- Jain, R. A. 1997. Saponins from the roots of *Mimosa hamata* Willd. *Indian J. Chem.* 36, 61-64.
- Jovan, K. Beckett, D. Raghavachari, K. 2015. Vibrational circular dichroism spectra for large molecules through molecules-in-molecules fragment-based approach. *J. Chem. Theory Comput.* 11, 4238-4247.
- Joseph-Nathan, P. Gordillo-Román, B. 2015. Vibrational circular dichroism absolute configuration determination of natural products. In: A.D. Kinghorn, H. Falk, J. Kobayashi, eds. Progress in the chemistry of organic natural products. Springer International Publishing, Switzerland.
- Judd, W. C. 2002. Plant systematics: a phylogenetic approach. 4th edition. Sinauer Assoc. 287-292.
- Katewa, S. G. 2005. Traditional herbal medicines from Shekhawati region of Rajasthan. *Indian J. Tradit. Know.* 4, 237-245.
- Kingston, D. Jagtap, P. Yuan, H. Samala, L. 2002. The chemistry of Taxol and related taxoids. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 84, 53-225.
- Kirkr, L. M. 2003. A 5-deoxyflavonol derivative in *Mimosa pudica*. *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 103-105.
- León, L. M. 2004. Tenuiflorins A-C: new 2-phenoxychromones from leaves of *Mimosa tenuiflora*. *Planta Med.* 70, 536-539.
- Lin, L. C. 2011. 5-Deoxyflavones with cytotoxic activity from *Mimosa diplotricha*. *J. Nat. Prod.* 74, 2001-2004.
- Liu, H. Mou, Y, Zhao, J. Wang, J. Zhou, L. Wang, M. Wang, D. Han, J. Yu, Z. Yang, F. 2010. Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. *Molecules.* 15, 7933-7945.
- Marcano, D. Hasegawa, M. 2002. Fitoquímica Orgánica. Segunda edición. Universidad Central de Venezuela.
- Marcott, C. Havel, H. Overend, J. Moscovitz, A. 1978. Vibrational circular dichroism and individual chiral centers. An example from the sugars. *J. Am. Chem. Soc.* 100, 22-23.
- Martínez, M. 1996. Las plantas medicinales de México. Editorial Botas, México.
- Meckes, M. L. 1990. Propiedades farmacológicas in vitro de algunos extractos de *Mimosa tenuiflora*. *Archivos de Investigación Médica.* 21, 163-169.

- Mehta, B. S. 1988. 4-ethylgallic acid from two *Mimosa* species. *Phytochemistry*. 27, 3004-3005.
- Miura, N. Taniguchi, T. Monde, K. Nishimura, S. 2006. A theoretical study of α - and β -D-glucopyranose conformations by the density functional theory. *Chem. Phys. Lett.* 419, 326-332.
- Monde, K. Taniguchi, T. Miura, N. Nishimura, S. 2004. Specific band observed in VCD predicts the anomeric configuration of carbohydrates. *J. Amer. Chem. Soc.* 126, 9496-9497.
- Museo de las Ciencias Biológicas Iztacala, Selva baja caducifolia, UNAM, consultado en línea el día 10 de enero del 2018. <http://www.iztacala.unam.mx/biologiamuseo/Textos%20pdf%20Portal/SELVA%20BAJA%20CADUCIFOLIA.pdf>
- Nery, N. Q. 2015. Assessing chemical constituents of *Mimosa caesalpinifolia* stem bark. *Molecules*. 20, 4204-4224.
- Newman, D. 2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79, 629-661.
- Newman, D. Cragg, G. 2020. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* 83, 770-803.
- Organización Mundial de la Salud. 2014. 10 datos sobre el cáncer. Consultado en línea el día 31 de enero del 2018. <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/es/>
- Organización Mundial de la Salud. 2015. Enfermedades no transmisibles. Nota descriptiva. Consultado en línea el día 31 de enero del 2018. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es/>
- Organización Mundial de la Salud. 2018. Enfermedades no transmisibles. Nota descriptiva. Consultado en línea el día 27 de agosto del 2020. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es/>
- Paller, C. Antonarakis, E. 2011. Cabazitaxel: a novel second-line treatment for metastatic castration-resistant prostate cancer drug design. *Devel. Ther.* 5, 117-124.
- Partelini, M. Freedman, T. Nafie, L. 1986. Ring current enhanced vibrational circular dichroism in the CH-stretching motions of sugars. *J. Amer. Chem. Soc.* 108, 1389-1397.
- Pearl, I. Darling, S. 1971. Studies of the Hot Water Extractives of the Bark and Leaves of *Populus deltoides* Bartr. *Can. J. Chem.* 49, 49-55.
- Pereira, C. Bomfim, C. Machado, R. 2012. Flavonoids and a neolignan glucoside from *Guarea macrophylla* (Meliaceae). *Quim. Nova*, 35, 1123-1126.
- Prayong, P. Barusrux, S. Weerapreeyakul, N. 2008. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. *Fitoterapia*. 79, 598-601.
- Rodríguez-García, G. Villagómez-Guzmán, A.K. Talavera-Alemán, A. Cruz-Corona, R. Gómez-Hurtado, M.A. Cerda-García-Rojas, C.M. Joseph-Nathan, P. del Río, R.E. 2019. Conformational, configurational, and supramolecular studies of podocephalol acetate from *Lasianthaea aurea*. *Chirality*. 31, 923-933.

- Romers, C. Creutzberg, J.E. 1956. An electron-diffraction investigation of the molecular structures of acetone, 2-butanone, and 3-pentanone, *Rec. Trav. Chim.* 75, 331-345.
- Rzedowski, G. 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. Michoacán, México: Instituto de Ecología y comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad.
- Sampaio, R. P. 2008. Jurema-Preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.): a Review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 51, 937-947.
- Savill, J. Dransfield I, Gregory C, Haslett C. 2002. A blast from the past: Clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 965-75.
- Seigler, D. 1995. Plant secondary metabolism. Department of Plant Biology, University of Illinois. Springer Science.
- Sepúlveda, G. Porta, H. Rocha, M. 2004. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21, 355-363.
- Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, Perretti M, Rossi AG, Wallace JL. 2007. Resolution of inflammation: State of the art, definitions and terms. *Faseb. J.* 21, 325-32.
- Serhan CN, Chiang N. 2008. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: A new pharmacologic genus. *Br. J. Pharmacol.* 153, 200-15.
- Shrestha, A. Pandey, R. Dhakal, D. Parajuli, P. Sohng, J. 2018. Biosynthesis of flavone C-glucosides in engineered *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 1251-1267.
- Silva, M. Dias, A. 2012. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. *Rev. de Cienc. Farm. Basica e Apl.* 33, 267-274.
- Silva, A. T. Magalhães, C. G. Duarte, L. P. Mussel, W. N. Ruiz, A. L. T. G. Shiozawa, L. Carvalho, J. E. Trindade, Vieira, I. C. 2017. Lupeol and its esters: NMR, powder XRD data and in vitro evaluation of cancer cell growth. *Braz. J. Pharm. Sci.* 53(3): e00251.
- Simmonds, M. 2003. Novel drugs from botanical sources. *Drug Discov. Today.* 8, 721-722.
- Sosa, V. Davila, P. 1994. Una evaluación del conocimiento florístico de México. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 81, 749-757.
- Taiz, L. Zeiger, E. 2006. Fisiología Vegetal Vol 1. Universitat Jaume.
- Taniguchi, T. Monde, K. 2007a. Spectrum-structure relationship in carbohydrate vibrational circular dichroism and its application to glycoconjugates. *Chem. Asian J.* 2, 1258-1266.
- Taniguchi, T. Monde, K. 2007b. Vibrational circular dichroism (VCD) studies on disaccharides in the CH region: toward discrimination of the glycosidic linkage position. *Org. Biomol. Chem.* 5, 1104-1110.
- Taniguchi, T. Tone, I. Monde, K. 2008. Observation and characterization of a specific vibrational circular dichroism band in phenyl glycosides. *Chirality.* 20, 446-453.
- Taniguchi, T. Nakano, K. Bab, R. Monde, R. 2017. Analysis of configuration and conformation of furanose ring in carbohydrate and nucleoside by vibrational circular dichroism. *Org. Lett.* 19, 404-407.

- Teodorescu, F. Costinela, I. Stavarache, C. Naubron, J. Hîrtopeanu, A. 2013. Experimental and calculated vibrational circular dichroism spectra of an iminosugar molecule: (2*R*,3*R*,4*R*)-1,4-dideoxy-1,4-imino-*D*-arabinitol hydrochloride. *Rev. Chim.* 64, 351-354.
- Toledo, V. 1995. New paradigms of a new ethnobotany: Reflexions on the case of Mexico. Portland, USA: Dioscorides Press.
- Vasconsuelos, A. Boland, R. 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sci.* 172, 861-875.
- Villaseñor, J. 2003. Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. *Interciencia.* 28, 160-167.
- Zaware, B. C. 2014. An overview of *Mimosa pudica* linn. Chemistry and pharmacological profile. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 6, 754-761.
- Zhang, J. Yuan, K. Zhou, W. Yang, P. 2011. Studies on the active components and antioxidant activities of the extracts of *Mimosa pudica* Linn. from southern China. *Pharmacog. Mag.* 7, 35-39.
- Zhang, Y. Guo, Y. Ageta, H. Harigaya, Y. Onda, M. Hashimoto, K. Ikeya, Y. Okada, M. Maruno, M. 1997. A new flavone C-glycoside from *Scutellaria baicalensis*. *J. Chinese Pharm. Sci.* 6, 182-186.