



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

Área Académica de Química

**“Metabolitos principales de *Mimosa aculeaticarpa* var. *biuncifera*
y *Achyropappus anthemoides*. Obtención y evaluación
analgésica de ibuprofenato de β -sitosterilo”.**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN QUÍMICA

Presenta:

I.B.Q. Martha Elena Hernández Flores

Director de tesis:

Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia

Mineral de la Reforma, Hidalgo a Junio 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
 DIRECCIÓN

M. en C. Julio César Leines Medécigo
 Director de Administración Escolar
 Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
 PRESENTE

Por este conducto le comunico que el jurado asignado al Candidato a Maestro en Química, **IBQ. Martha Elena Hernández Flores**, quien presenta el trabajo **"Metabolitos principales de Mimosa aculeaticarpa var. biuncifera y Achyropappus anthemoides. Obtención y evaluación analgésica de ibuprofenato de β -sitosterilo"**, después de revisar el trabajo en reunión de sinodales, ha decidido **autorizar la impresión del mismo**, una vez realizadas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

- PRESIDENTE: Dr. Heraclio López Ruiz (AAQ)
 SECRETARIO: Dra. Raquel Cariño Cortés (AAQ)
 VOCAL: Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia (AAQ)
 SUPLENTE: Dr. José Roberto Villagómez Ibarra (AAQ)

Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE

"Amor, Orden y Progreso"
 Mineral de la Reforma, Hgo., a 26 de mayo de 2015

Dr. Orlando Ávila Pozos
 Director del ICBI



Ciudad Universitaria Carretera Pachuca-Tulancingo
 Km. 4.5. s/n Col. Carboneras C.P. 42184
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México.
 Tel: (771)7172000 ext. 2230 , 2231



Dedicatorias:

Dedico este trabajo de manera muy especial a mis hijas Ana Carolina y Carla Elena, por ser el gran motor de mi vida e inspirarme para ser mejor cada día.

A mi esposo por apoyarme en todos los aspectos, por su amor y comprensión.

A mis padres y hermanos porque a pesar de la distancia siempre cuento con su apoyo.

Agradecimientos:

A CONACYT por la beca No. 286214, apoyo fundamental para la realización de este proyecto.

Al Dr. Martín Torres Valencia por los conocimientos transmitidos desde el primer día, por su amistad e infinita paciencia.

A la Dra. Raquel Cariño, por el apoyo en la realización de las pruebas biológicas, por los conocimientos transmitidos y por considerarme su hija académica.

A los miembros del Comité tutorial Dr. Heraclio López Ruiz, Dr. Roberto Villagómez, cuyos consejos y recomendaciones me hicieron crecer en conocimientos.

A mis compañeros Adriana, Alex, Luann Y René por la amistad y el apoyo que siempre encontré en ustedes.

A todas las personas que cuidaron de mis hijas para que yo pudiera estudiar. Gracias, su apoyo ha sido fundamental.

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

$[\alpha]_D^{25}$	Rotación específica
°C	Grados Celsius
AA	Ácido araquidónico
AcOEt	Acetato de etilo
ATP	Trifosfato de adenosina
APT	Attached proton test
^{13}C	Carbono 13
C	Concentración
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
Cm	Centímetro
COSY	Correlation Spectroscopy
CoA	Coenzima A
COX-1	Ciclooxigenasa 1
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CO ₂	Dióxido de carbono
DCV	Dicroísmo circular vibracional
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
d	Señal doble
dd	Señal doble de dobles
EtOH	Etanol
FDA	Food and Drug Administration
fig.	Figura
g	Gramo
h	Hora
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Kg	kilogramo
L	Litro
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
Me	Metilo
MeOH	Metanol

mg	Miligramo
µg	Microgramo
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Milimol
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
PG	Prostaglandinas
R _f	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
TMS	Tetrametilsilano
TX	Tromboxanos
t	Señal triple
td	Señal triple de dobles
UV	Ultravioleta
λ _{max}	Longitud de onda máxima

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	4
2. ANTECEDENTES	7
2.1 Especies de <i>Mimosa</i>	7
2.2 <i>Mimosa aculeaticarpa</i> var. <i>Biuncifera</i>	10
2.3 <i>Achyropappus anthemoides</i>	12
2.4 Fitoesteroles	14
2.4.1 Actividad biológica de los fitoesteroles	17
2.5 Colesterol	19
2.6 Efectos de los fitoesteroles en la absorción del colesterol	20
2.7 Inflamación	21
2.7.1 Mediadores de la inflamación	22
2.7.2 Metabolitos del ácido araquidónico	23
2.8 Dolor	25
2.8.1 Antiinflamatorios no esteroideos	26
2.8.2 Ibuprofeno	27
2.8.3 Efectos secundarios del ibuprofeno	30
2.9 Estudios de comportamiento	31
3. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo general	35
3.2 Objetivos específicos	35
4. JUSTIFICACIÓN	36

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
5.1 Estudio químico de <i>Mimosa aculeaticarpa</i> var. <i>Biuncifera</i>	38
5.1.1 Extracto hexánico de la raíz	42
5.2 Estudio químico de <i>Achyropappus anthemoides</i>	50
5.2.1 Obtención de la infusión	50
5.2.2 Análisis químico de la infusión	50
5.3 Obtención del ibuprofenato de β -sitosterilo	56
5.3.1 Efecto analgésico del ibuprofenato de β -sitosterilo	65
6. CONCLUSIONES	73
7. PARTE EXPERIMENTAL	75
7.1 Generalidades	75
7.2. Muestra vegetal	76
7.3 Obtención de extractos	77
7.4 Aislamiento y caracterización de compuestos	77
7.4.1 Extracto AcOEt de la infusión de <i>A. anthemoides</i>	79
7.5 Obtención de ibuprofeno	81
7.6 Obtención del ibuprofenato de β -sitosterilo	82
7.7 Solubilidad del ibuprofenato de β -sitosterilo	83
8. REFERENCIAS	84

Resumen

Los estudios químicos de la parte aérea y raíces de *Mimosa aculeaticarpa* var. *biuncifera* evidenciaron que esta especie produce β -sitosterol, estigmasterol, lupeol, (+)-pinitol, galato de metilo, α -D-glucosa, β -D-glucosa cafeoato de metilo, taxifolina, quercetina, escualeno y los ácidos grasos palmítico, esteárico, linoleico, eicosanoico y docosanoico. Su identificación se llevó a cabo mediante sus propiedades físicas y espectroscópicas, incluyendo RMN de ^1H y de ^{13}C , y GS-MS, así como por comparación con datos descritos. Dada la actividad biológica conocida de los metabolitos identificados en las especies, este trabajo contribuye a validar su empleo en medicina tradicional.

Por otro lado, el estudio químico de la infusión de la especie *Achyropappus anthemoides* condujo a la obtención del *p*-hidroxibenzaldehído, el cual se caracterizó mediante RMN de ^1H y de ^{13}C . Este compuesto aromático es, junto con la vainillina, el responsable del agradable olor de la vainilla.

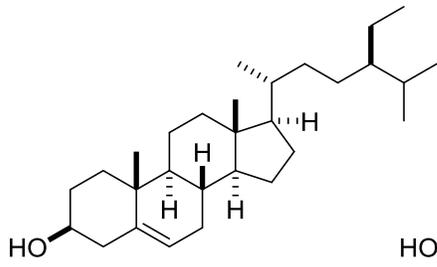
Además, la reacción entre el β -sitosterol y el ibuprofeno en la presencia de diciclohexilcarbodiimida generó el ibuprofenato de β -sitosterilo en buenos rendimientos. El éster se caracterizó mediante sus propiedades físicas y espectroscópicas y se evaluó su actividad analgésica en modelo de ratón. El compuesto mejoró las propiedades analgésicas del ibuprofeno libre.

Abstract

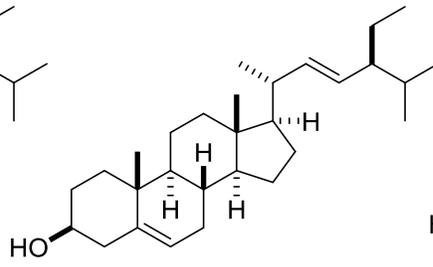
Chemical studies of the aerial parts and roots of *Mimosa aculeaticarpa* var. *biuncifera* showed that this species produces, β -sitosterol, stigmasterol, lupeol, (+)-pinitol, methyl gallate, α -D-glucose, β -D-glucose, methyl caffeate, taxifolin, quercetin, squalene, and fatty acids such as palmitic, stearic, linoleic, docosanoic and eicosanoic. Their characterization was achieved by their physical and spectroscopic properties, including ^1H and ^{13}C NMR and GS-MS as well as by comparison with published data. Given the known biological activity of the metabolites identified in this species, this study contributes to validate their use in traditional medicine.

Furthermore, a chemical study of the infusion from aerial parts of *Achiropappus anthemoides* led to obtain *p*-hydroxybenzaldehyde, which was characterized by ^1H and ^{13}C NMR. This aromatic compound is the main responsible for the pleasant smell of vanilla, together with vanillin.

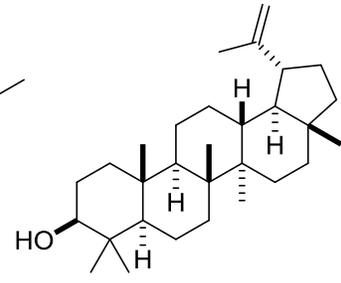
In addition, the reaction between β -sitosterol and ibuprofen in the presence of dicyclohexylcarbodiimide gave ibuprofenate of β -sitosterilo in good yields, which was characterized by its physical and spectroscopic properties. The analgesic activity of this compound was assessed in a mouse model and it improved the activity of free ibuprofen.



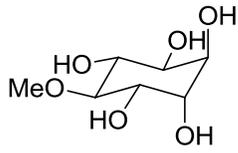
β -sitosterol



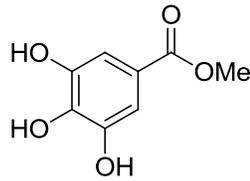
estigmasterol



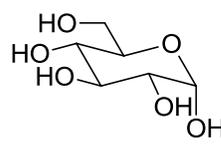
lupeol



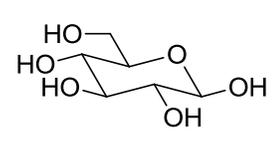
(+)-pinitol



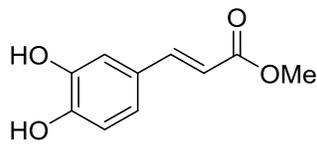
galato de metilo



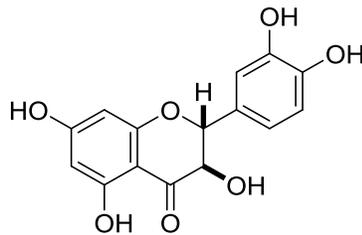
α -D-glucosa



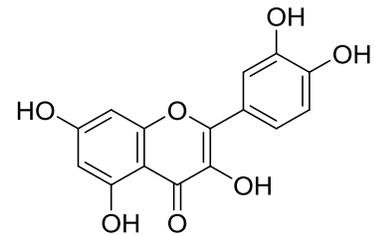
β -D-glucosa



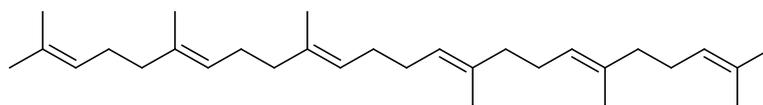
cafeoato de metilo



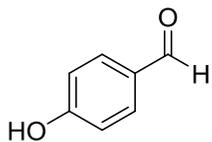
taxifolina



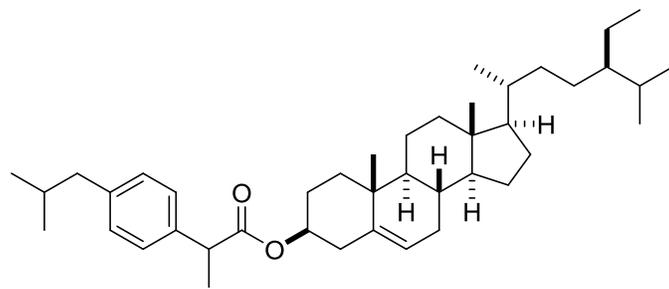
quercetina



escualeno



p-hidroxibenzaldehído



ibuprofenato de β -sitosterilo

1. Introducción

Los organismos necesitan transformar una gran variedad de compuestos orgánicos para poder vivir, crecer y reproducirse. Estas transformaciones requieren energía que la obtienen en forma de ATP y la presencia de sistemas enzimáticos. El conjunto de reacciones específicas mediante el cual un organismo fabrica sus propias sustancias y mantiene la vida se conoce como metabolismo.

Las moléculas más importantes para la vida son las proteínas, los hidratos de carbono, las grasas y los ácidos nucleicos. A pesar de las características extremadamente diferentes de los distintos seres vivos, las rutas generales para sintetizar y modificar estas sustancias son esencialmente las mismas para todos con pequeñas modificaciones. Estos procesos se conocen como Metabolismo Primario y los compuestos implicados en las diferentes rutas se conocen como metabolitos primarios. Se denomina metabolismo secundario al conjunto de procesos en el que participan compuestos con una distribución mucho más limitada y específica según el ser vivo. Los compuestos que participan en este metabolismo se denominan metabolitos secundarios, son específicos de las especies y son los que a partir de ahora definiremos como productos naturales. Los metabolitos secundarios pueden ser considerados como productos para la adaptación de un organismo a sobrevivir en un ecosistema particular. La

formación de los metabolitos secundarios en la naturaleza tiene lugar a partir de los metabolitos primarios.

La síntesis de los productos naturales comienza con la fotosíntesis que tiene lugar en plantas superiores, algas y algunas bacterias. Es un proceso endotérmico que requiere de la luz solar. Aquellos organismos incapaces de absorber la luz obtienen su energía de la degradación de carbohidratos. La fotosíntesis conduce a carbohidratos, entre ellos y de manera importante a la glucosa, cuya glicólisis conduce a tres intermediarios químicos principales: la acetil coenzima A (acetil-CoA), el ácido shikímico y el ácido mevalónico. A partir de estas sustancias se biosintetizan los principales grupos de compuestos naturales como son los ácidos grasos, policétidos, terpenos, esteroides, alcaloides, cumarinas, lignanos, entre otros. Algunos esqueletos de productos naturales se generan utilizando fragmentos que provienen de más de una ruta específica tal es el caso de los flavonoides que se forman a partir de la ruta del acetato y del ácido shikímico.¹

Los productos naturales pueden ser útiles por sus posibilidades directas como agentes terapéuticos, dado que sirven como modelos para la preparación de sustancias bioactivas, o se usan como materia prima para la síntesis de sustancias de interés farmacológico a nivel industrial. En un estudio reciente se ha analizado el origen los nuevos fármacos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) entre 1981 y 2008. De este estudio se desprende que un 57.7% tuvieron su origen en productos naturales o sus derivados.²

Las investigaciones químicas que involucran el conocimiento de los productos sintetizados a partir del metabolismo secundario de las plantas son muy importantes para numerosas disciplinas tales como la fisiología, la bioquímica, la quimiotaxonomía, la biotecnología de las plantas y la farmacognosia. Posiblemente la aplicación más importante de la investigación fitoquímica es la dirigida hacia el campo de la farmacognosia, la cual es una rama de la ciencia farmacéutica que se enfoca a los productos naturales (principalmente vegetales) y a sus componentes que demuestren actividad biológica y sean, por consiguiente, utilizados en la terapia contra diversas enfermedades.

Lo anterior resalta la importancia de llevar a cabo estudios biológicos y químicos sobre productos naturales, dado que siempre han contribuido al conocimiento de sustancias altamente promisorias (principios activos) para la prevención y control de varias enfermedades como las causadas por bacterias, virus, hongos y parásitos, así como las consideradas como crónico-degenerativas entre las que se incluyen el cáncer y la inflamación. En este sentido, en el presente trabajo se consideró el estudio químico de *Mimosa aculeaticarpa* var. *biuncifera* y de *Achyropappus anthemoides*, con la finalidad de complementar su estudio químico y contribuir al conocimiento sobre la composición química de estos géneros. En adición, se planteó la preparación y evaluación analgésica de un éster de ibuprofeno y β -sitosterol para comparar el efecto analgésico de este compuesto contra el ibuprofeno libre.

2. Antecedentes

2.1 Especies de *Mimosa*

El género *Mimosa* contiene alrededor de 500 especies distribuidas en regiones tropicales, en su mayoría en América del Sur y América Central, encontrándose pocos representantes en América del Norte, África, sur de Asia y algunos endemismos en Madagascar, por lo que se les considera en su mayoría de origen americano. Este género ha sido considerado por Barneby (1991) en 5 secciones, de las cuales *Mimosa* se divide en series y éstas en subseries.³

Estas plantas, consideradas como originarias de América del Sur, crecen en suelos blandos bien drenados con importante presencia de arena, resisten el invierno, siempre y cuando no se alcancen temperaturas cercanas a los cero grados y florecen durante la primavera y gran parte del verano.³

De manera general, las flores de esta planta son de color rosáceo y tienen una forma redondeada que hacen que sea fácil de reconocer, como por ejemplo *M. pudica* (Figura 2.1).⁴



Figura 2.1. Imágenes de *Mimosa pudica*.

Bajo la denominación de *Mimosa* se pueden encontrar varias especies de plantas de forma herbácea, de arbusto o de árbol, tanto de hoja perenne (vegetal que dura más de tres años) como caduca (órganos poco durables y que se desprenden periódicamente de la planta), entre las que destacan *M. pudica*, *M. spegazzinii*, *M. sensitiva*, *M. tenuiflora*, *M. pigra* y *M. rubicaulis*.⁴

En el estado de Hidalgo crecen las siguientes especies de *Mimosa*.

M. aculeaticarpa var. *biuncifera* Benth.

M. leucaenoides Benth.

M. aculeaticarpa Orth.

M. puberula Benth.

M. albida H. & B. ex Willd.

M. pudica L.

M. depauperata Benth.

M. tenuiflora Benth.

Pocos estudios químicos se han llevado a cabo sobre estas especies, siendo *M. púdica* la más estudiada y de la cual se han aislado varias sustancias que se

consideran responsables del movimiento de sus hojas (movimiento seismonástico).⁵

M. tenuiflora, conocida como Tepezcohuite (o árbol de piel) ha sido usada para el tratamiento de quemaduras y la prevención de la inflamación. Se observó que en quemaduras importantes, con más del 60% de la piel destruida, la epidermis se reconstituía con rapidez. La primera cicatrización aparecía al cabo de 15 días y 26 días después, los quemados tenían una piel nueva. Al término de un ciclo de 90 días, la piel se reconstituía de manera idéntica con su material celular, su potencial pigmentógeno y su sistema piloso sin ninguna traza ni secuela.⁴ Actualmente, el extracto de la corteza del Tepezcohuite forma parte de la composición de numerosos productos dermocosméticos con propiedades cicatrizantes y regeneradoras.

En un estudio químico sobre la especie mexicana de *M. tenuiflora* se identificaron dos chalconas, la kukulkamina A y B y glicósidos tritérpenicos, mientras que otro estudio sobre la especie brasileña condujo a la dimetiltriptamina (nigerina), sustancia controlada con efecto enteogénico que se ha considerado en desuso, aunque aún se puede encontrar.⁶

De *M. pigra*, estudiada por investigadores de origen francés y ha sido colectada en Puerto Rico, se aislaron saponinas triterpénicas glicosidadas que contienen residuos del ácido cinámico y del ácido *p*-metoxicinámico.⁷

2.2 *Mimosa aculeaticarpa* var. *biuncifera*

Mimosa aculeaticarpa var. *biuncifera*) (sinonimia *M. biuncifera*; *M. aculeaticarpa*) es un arbusto abundante en las zonas semiáridas del estado de Hidalgo, donde se le conoce como “uña de gato” (catclaw mimosa).⁸ Se le considera como especie multiusos, debido a que tiene uso medicinal para infecciones producidas por hongos, combustible, cerca viva ^{8,9,10} y se ha propuesto para la restauración ecológica.¹¹



Figura 2.2. Imagen de *M. aculeaticarpa* var. *biuncifera*

Hasta nuestro conocimiento, la especie no cuenta con estudios químicos, excepto por un reporte preliminar por nuestro grupo de trabajo en forma de tesis de licenciatura.⁴

La actividad antibacteriana de los extractos la parte aérea de *M. aculeaticarpa* var. *biuncifera* fue evaluada contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, mostrando actividad moderada. Adicionalmente, el extracto de AcOEt de la parte aérea de la especie mostró actividad antioxidante importante (capacidad de captura de radicales libres) en estudios usando las técnicas ABTS y DPPH. Dicha capacidad fue comparable con el ácido ascórbico (Vitamina C) y Trolox (Figura 2.3).¹³

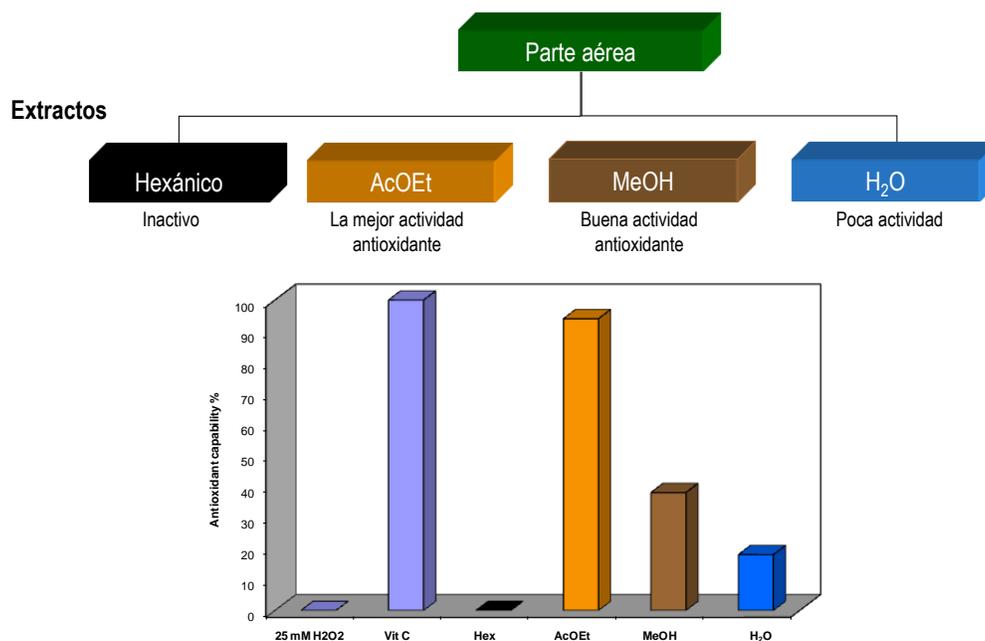


Figura 2.3. Actividad antioxidante de los extractos de *Mimosa aculeaticarpa* var. *biuncifera*

Algunos de estos extractos se sometieron a un estudio químico, el cual condujo al aislamiento de metabolitos primarios y secundarios conocidos (Figura 2.3).⁴ Sin embargo, no se complementaron sus datos físicos y espectroscópicos.

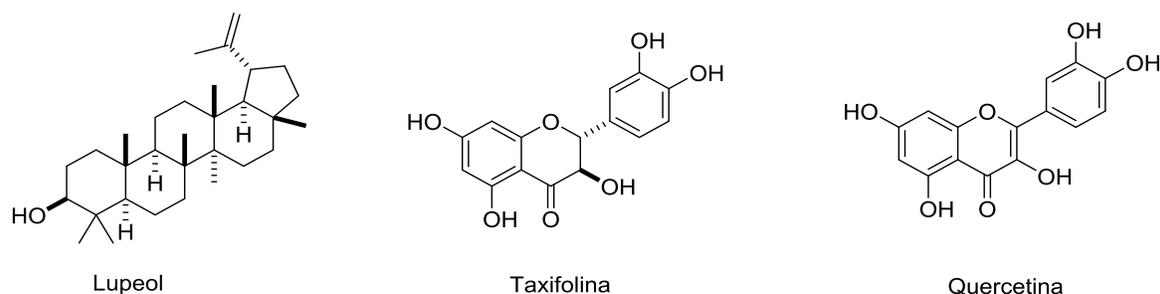


Figura 2.4. Metabolitos aislados de *Mimosa aculeaticarpa* var. *biuncifera*

2.3 *Achyropappus anthemoides*

Achyropappus anthemoides (Figura 2.5) es una planta herbácea anual, de 10 a 60 cm de alto; tallos erectos, ramificados, hispídulos con pelos aplicados y además provistos de pelos glandulosos erectos; hojas con pecíolos hasta de 2 cm de largo, base envainante, láminas hasta de 6 cm de largo, bi a triternadamente divididas en segmentos lineares a oblongos, de 5 a 12 mm de largo, hispídulos y a menudo con pelos glandulares; cabezuelas con pedúnculos de 1 a 5 cm de largo, con pelos glandulares; involucre hemisférico, de 4 a 5 mm de alto, de 7 a 8 mm de ancho, sus brácteas obovadas, de 2 a 2.5 mm de ancho; flores periféricas 5, blancas o amarillas, lígulas de 3 a 6 mm de largo, oblongas a orbiculares; flores centrales 30 a 40, corola con la garganta anchamente campanulada, de 2 a 3 mm

de largo; aquenios de 2 a 3 mm de largo, negruzcos, hispídulos a glabrescentes; vilano con escamas de 0.5 a 0.8 mm de largo, de ápice redondeado



Figura 2.5. Imágenes de *Achyropappus anthemoides*.

Esta especie tiene presencia esporádica en pastizal, bosque de pino-encino y en la vegetación secundaria, crece en alturas de 2000–2600 m., florece de junio a noviembre. Se ha reportado en San Luis Postosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Estado de México, D.F. y Tlaxcala. Dada su rareza, la especie es vulnerable a la extinción.¹⁴

Hasta donde es de nuestro conocimiento no existen estudios químicos de esta especie.

2.4 Fitoesteroles

Los fitoesteroles son componentes naturales de las plantas y son parte del amplio grupo de isoprenoides. En las células vegetales, contribuyen a la regulación de la fluidez y permeabilidad de las membranas celulares, son sustratos para la síntesis de numerosos metabolitos secundarios de las plantas y actúan como precursores biogénicos de compuestos que intervienen en el crecimiento. Los fitoesteroles son estructuralmente relacionados con el colesterol.¹⁵

Son compuestos no nutritivos cuya estructura química difiere de la del colesterol sólo por modificaciones menores. Sin embargo, sitosterol y campesterol son los esteroides vegetales más frecuentes y constituyen aproximadamente el 60% y 35%, respectivamente, de los esteroides vegetales en los alimentos.

Los estanoles, son la forma saturada de esteroides vegetales, lo que significa que no presentan doble enlace en el anillo esteroide. La saturación de sitosterol, el esteroide vegetal más común, da lugar a sitostanol; y la saturación de campesterol da lugar a campestanol.¹⁵

Los principales esteroides encontrados en plantas son el β -sitosterol, estigmasterol y campesterol (Figura 2.6) que son 24-etil y el 24-metil análogos del colesterol. En el caso de estigmasterol contiene además una insaturación en la cadena lateral, un doble enlace de estereoquímica *trans* en C-22, una característica vista muchas veces en esteroides vegetales pero nunca en mamíferos.

Los esteroides son consumidos en la dieta diaria de las personas y las estimaciones de rango de absorción intestinal van de 0.4–5% y de 0.02–0.3% para su contraparte saturada. En consecuencia, las concentraciones de estanoles en suero son inferiores a las concentraciones de esteroides vegetales. La baja absorción de los esteroides se debe, posiblemente a la poca afinidad con acil-CoA-colesterol-O-aciltransferasa (ACAT) para estos componentes. Como esteroides esterificados son incorporados a los quilomicrones, y la absorción de esteroides no esterificado es consecuentemente baja.¹⁵

Los fitoesteroides son abundantes en verduras cargadas de grasa, productos vegetales y aceite de oliva, pero también en las frutas secas. Aunque el colesterol y fitoesteroides son estructuralmente similares, se metabolizan de manera diferente. En contraste con el colesterol, los fitoesteroides no son sintetizados en el cuerpo y son únicamente de origen dietético. Una dieta normal occidental contiene aproximadamente 200 a 500 mg de colesterol y de 200 a 400 mg de esteroides vegetales, y alrededor de 50 mg de estanoles.¹⁵

En la naturaleza, se han descrito más de 200 tipos diferentes de esteroides vegetales en diferentes especies de plantas, siendo los más abundantes el β -sitosterol, campesterol y estigmasterol, constituyendo el 95–98% de los fitoesteroides identificados.

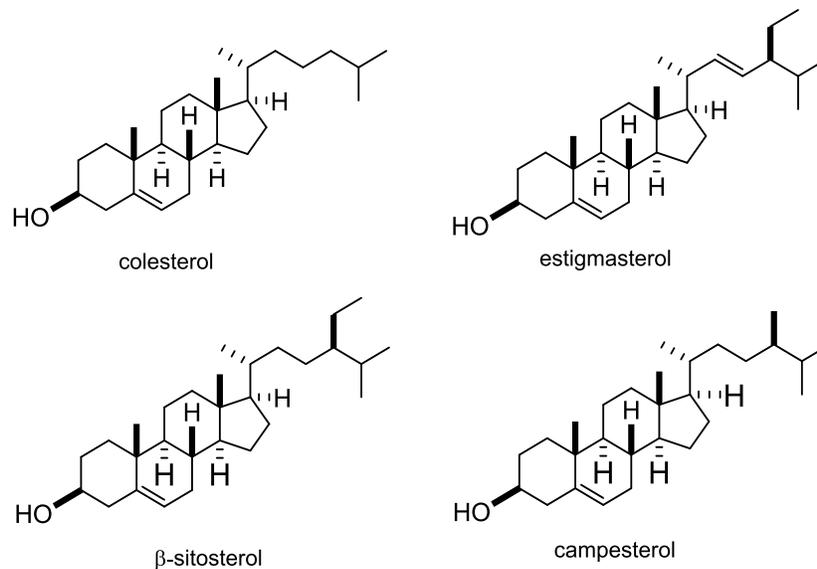


Figura 2.6. Estructuras del colesterol, estigmasterol, β -sitosterol y campesterol.

Los fitoesteroles forman parte de la membrana de las células de las plantas. Estos compuestos también son abundantes como esteroides glucosidados y ésteres de esteroides glucosidados, β -sitosterol representa 83% de los glicolípidos en harina de garbanzos desgrasada. En general, las personas ingieren fitoesteroides de su dieta diaria (160–400 mg/día), por lo que la concentración fisiológica en la sangre humana puede ser mantenida relativamente constante consumiendo una dieta enriquecida en fitoesteroides. Los estudios hasta el momento no han demostrado ningún efecto secundario de los fitoesteroides, estos ya han sido usados para bajar niveles de lípido de sangre en humanos previniendo enfermedades cardiovasculares.¹⁶

En septiembre de 2000, la Food and Drug Administration (FDA) emitió una norma provisional que permite una declaración de propiedades saludables para reducir el riesgo de enfermedad coronaria de los alimentos que contienen fitoesteroides y son

bajos en grasas saturadas y colesterol. En el 2001, el panel de expertos del National Cholesterol Education Program (NCEPATP III) recomendó alimentos funcionales enriquecidos con fitosteroles como parte de una estrategia de prevención dietética óptima en la prevención primaria y secundaria de enfermedades cardiovasculares. La American Heart Association (AHA) ve a los fitoesteroles “como una opción terapéutica para los individuos con elevados niveles de colesterol”.

Desde entonces otras sociedades tales como la Sociedad Española de Cardiología, la Asociación de Clínicas y Nutricionistas de Salud Pública de Finlandia y la Fundación Nacional del Corazón en Australia, han identificado a los fitoesteroles como una opción adicional dietética importante en la gestión de hipercolesterolemia.¹⁵

2.4.1 Actividad biológica de los fitoesteroles.

β -sitosterol es el más estudiado de los fitoesteroles, se encuentra en diversidad de frutas, vegetales y semillas y se le atribuyen una gran variedad de propiedades farmacológicas. Tiene un peso molecular de 414.7 g/mol y su fórmula molecular es $C_{29}H_{50}O$, y como ya se mencionó, tiene una estructura química muy similar al colesterol. Además bloquea la absorción del colesterol lo que resulta en niveles más bajos de colesterol sérico y también evita la oxidación del colesterol LDL, reduciendo así el riesgo de aterosclerosis. Se ha utilizado para tratar problemas de

la próstata tales como la hipertrofia prostática benigna y ayuda a aumentar el flujo de orina; por lo tanto, puede reducir el crecimiento de la glándula prostática, así como la inhibición de las células de cáncer de colon y la alteración de los lípidos de membrana.

Otras funciones importantes incluyen el control de azúcar sanguínea y los niveles de insulina en la diabetes de tipo II, además de ayudar a prevenir la debilidad inmune temporal que típicamente ocurre durante la recuperación del ejercicio de resistencia. También es un antioxidante y antiinflamatorio activo capaz de reducir el daño en el ADN, reducir el nivel de radicales libres en las células, estimular la producción de linfocitos y aumentar el nivel de antioxidantes.¹⁷

Las células cuando se tratan con diferentes concentraciones de β -sitosterol también muestran cambios típicos de apoptosis, cambios morfológicos y daños al ADN. La dosis eficaz de β -sitosterol usado en estudios de cáncer es de 4–70 μM en sangre humana. Así el β -sitosterol probablemente puede ser usado como un agente preventivo contra cáncer en el futuro. Algunos estudios revelan que en zonas donde el consumo de productos derivados de soya es elevado, se ve disminuido el índice de cáncer de próstata y colon. Esto es debido a que los ácidos biliares pueden ser promotores de cáncer de colon y un efecto indirecto del consumo de esteroides es la disminución en la secreción de ácidos biliares. Además, estudios *in vitro* revelan un posible efecto protector de β -sitosterol sobre la proliferación de células epiteliales de colon, como un marcador para carcinogénesis. Además β -sitosterol inhibe el crecimiento de HT-29 una línea celular de cáncer en humanos.

En cuanto a los efectos que los esteroides pudieran tener en la membrana, se ha demostrado que los esteroides y estanoles son incorporados a la membrana celular, no se presentó efecto del β -sitosterol en la fluidez de la membrana.¹⁸

2.5 Colesterol

El esteroide más comúnmente encontrado en mamíferos es el colesterol, además es precursor de otras estructuras esteroideas como algunas hormonas y corticosteroides. Pese a tener consecuencias perjudiciales en altas concentraciones, es esencial para crear la membrana plasmática que regula la entrada y salida de sustancias que atraviesan la célula.

El colesterol es un derivado del ciclopentano perhidrofenantreno, en el carbono 17 tiene una cadena lineal de ocho carbonos, posee un doble enlace entre el carbono 5 y el 6, además posee un grupo OH en el carbono 3, en el cual le confiere un pequeño carácter polar (Figura 2.6). Su importancia estructural radica en mantener la membrana plasmática, la cual necesita incorporar colesterol para mantener su fluidez. Esta molécula diferencia a los procariotas de las eucariotas, los procariotas no tienen colesterol, sin embargo, los eucariotas sí. Es una molécula indicadora de mejora evolutiva.

En lo que se refiere a importancia metabólica el colesterol es precursor de hormonas esteroideas (mineral-corticoides, glucocorticoides, hormonas sexuales),

permite la formación de ácidos y sales biliares (para la digestión de grasas), además de ser precursor de algunas vitaminas como la vitamina D que participa en el metabolismo fosfo-calcio. El colesterol puede esterificarse con un ácido graso dando lugar a un éster de colesterol. El transporte de colesterol se realizará, por tanto unido a proteínas transportadoras. El colesterol total en sangre puede estar unido a proteínas transportadoras (LDL, HDL) o disuelto en pequeña cantidad.

2.6 Efectos de los fitoesteroles en la absorción del colesterol

Datos epidemiológicos indican que el consumo de granos y legumbres, disminuyen la tasa de mortalidad por enfermedades cardiovasculares. Niveles elevados de colesterol de baja densidad en suero (LDL) son la principal causa de enfermedades cardiovasculares, estudios revelan que la reducción de un 1% de colesterol LDL resulta en una reducción del 1% de mortalidad cardiovascular

Diferentes mecanismos se han sugerido para explicar la disminución del colesterol por acción de los fitoesteroles. Primeramente, los fitoesteroles pueden desplazar al colesterol de las micelas mixtas, sin embargo estos son más hidrofóbicos que el colesterol. Este reemplazo causa una reducción en la concentración de colesterol micelar y consecuentemente una disminución en la absorción del colesterol. Posteriormente los fitosteroles reducen la velocidad de esterificación del colesterol en el enterocito y consecuentemente la cantidad del colesterol excretado vía los

quilomicrones. Los efectos de los fitoesteroles sobre la absorción del colesterol continúan varias horas después de la ingestión.¹⁹

2.7 Inflamación

La inflamación es la respuesta del sistema inmunológico de un organismo, al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos o por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica. Aunque dolorosa, la inflamación es una respuesta reparadora y un proceso que implica un enorme gasto de energía metabólica. En ocasiones, transcurre hacia una situación crónica que suele dar lugar a una enfermedad degenerativa como artritis, arteriosclerosis o incluso, cáncer. También puede acompañarse de una respuesta generalizada llamada “respuesta de fase aguda”, caracterizada por un cuadro clínico pasajero de sensación de malestar, fiebre y modificación del perfil de las proteínas y leucocitos circulantes. En ciertos casos, la inflamación aguda local provoca una reacción orgánica generalizada conocido como “síndrome de respuesta inflamatoria sistémica” que, en una secuencia de reacciones a modo de espiral sin control (inflamación maligna), conduce al fracaso funcional de los órganos y sistemas que puede provocar la muerte del individuo.²⁰

El sistema inmune es el encargado de eliminar a los microorganismos patógenos o al tejido deteriorado cuando existe una infección o algún daño tisular. Al sitio

donde ocurre la agresión, arriban diversos tipos celulares del sistema inmune innato que producen factores solubles que desencadenan el proceso fisiológico de la inflamación. Esta primera fase es general e inespecífica y es seguida por la respuesta inmune adaptativa que gracias a la generación de anticuerpos es altamente específica. Los signos característicos de la inflamación han sido definidos con las palabras: calor, dolor, rubor y tumor, aunque el fenómeno ya era conocido desde la época de los griegos. Actualmente sabemos que estos signos son inducidos por la acción de factores solubles, entre los que destacan las citocinas y las quimiocinas. Las citocinas son proteínas que funcionan como señales que regulan tanto el crecimiento como la maduración de los diferentes tipos celulares que participan en el proceso inflamatorio; por su parte, las quimiocinas también son proteínas cuya acción es atraer a las células del sistema inmune al sitio dañado, tanto las citosinas como las quimiocinas son reconocidas por receptores específicos que se encuentran en la membrana de los elementos celulares reclutados.²¹

2.7.1 Mediadores de la inflamación

Numerosos estudios señalan la importancia del reclutamiento de leucocitos en el foco inflamatorio a partir del grupo circulante. Sin embargo, una rápida respuesta requiere células centinelas estacionadas en los tejidos. Los macrófagos y especialmente los mastocitos, cumplen tal función. Los mastocitos perivasculares

responden a los neuropéptidos liberados por las terminaciones nerviosas dañadas y estimuladas liberando histamina, triptasa y otras proteasas así como TNF- α preformados, eicosanoides nombre dado a las prostaglandinas inflamatorias, tromboxanos y leucotrienos, citoquinas y quimioquinas neoformadas. Histamina, eicosanoides y triptasas causan vasodilatación responsable del calor y rubor inflamatorio y extravasación responsable del tumor o edema inflamatorio.²²

2.7.2 Metabolitos del ácido araquidónico

El ácido araquidónico (AA) (Figura 2.7) es un derivado del ácido linoléico, con muchos enlaces dobles, que se encuentra normalmente esterificado en forma de fosfolípido en las membranas celulares. El AA se libera por acción de las fosfolipasas celulares, a partir de cualquier célula activada, estresada o a punto de morir por necrosis.

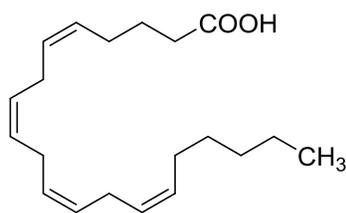


Figura 2.7. Estructura química del ácido araquidónico.

Las prostaglandinas son los miembros de un grupo de compuestos de lípidos derivados enzimáticamente a partir de ácidos grasos. Se metabolizan

rápidamente, actúan localmente y están involucradas en muchos procesos que causan la inflamación después de una lesión o enfermedad, regulan la contracción del útero, afectan a la constricción y la relajación de los vasos sanguíneos y están implicadas en la agregación de las plaquetas de la sangre. Las prostaglandinas se encuentran en la mayoría de tejidos y órganos y se producen por todas las células nucleadas, excepto por los linfocitos, a partir de ácidos grasos esenciales como el ácido γ -linolénico, ácido araquidónico y el ácido eicosapentanoico.

La biotransformación subsiguiente de ácido araquidónico es catalizada por la prostaglandina G₂/H₂ sintasa, resultando en la formación secuencial de prostaglandina G₂ (PGG₂) y prostaglandina H₂ (PGH₂) a través de las actividades de la proteína ciclooxygenasa (COX). Sintetas de prostaglandina específicas de tejido convierten PGH₂ a otras prostaglandinas y tromboxano que tienen diferentes funciones en diversos tejidos. Por ejemplo, PGD₂ está implicado en la regulación del sueño y reacciones alérgicas; PGF₂ controla la contracción del útero y de la broncoconstricción, y el tromboxano A₂ (TXA₂) estimula la constricción de los vasos sanguíneos e induce la agregación plaquetaria. La prostaciclina (PGI₂) dilata los vasos sanguíneos, inhibe la agregación plaquetaria, y puede proteger contra el daño a la mucosa del estómago; prostaglandina E₂ (PGE₂) está implicada en el dolor, la inflamación y la fiebre, también actúa para evitar daños en el estómago.²⁴

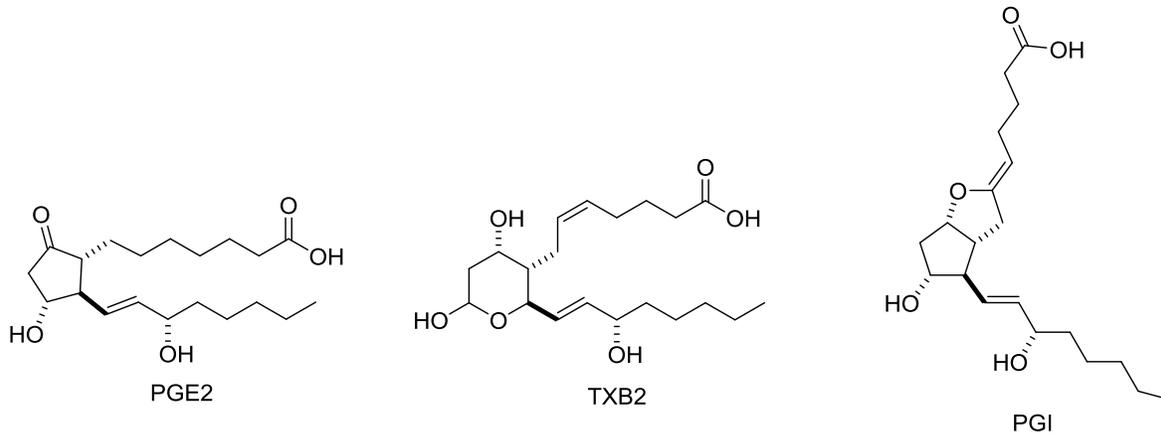


Figura 2.8. Estructura química de prostaglandina, tromboxano y prostaciclina.

2.8 Dolor

El dolor es definido como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a una lesión tisular real o potencial”. El dolor puede clasificarse como *agudo* o *crónico* y su diferencia no es únicamente una cuestión de temporalidad. El dolor *agudo* es la consecuencia inmediata de la activación de los sistemas nociceptivos por una noxa, tiene al menos tres funciones: 1) advertir al individuo la existencia de un daño tisular real, 2) advertir de la probabilidad de que el daño tisular está a punto de producirse mediante la realización de un estímulo que tiene el potencial de causar daños y 3) advertir al individuo de peligro tan pronto exista para cualquiera de sus miembros. Tiene función de protección biológica (alarma a nivel del tejido lesionado). Los síntomas psicológicos son escasos y limitados a

una ansiedad leve. Es un dolor de naturaleza nociceptiva y aparece por la estimulación química, mecánica o térmica de nociceptores específicos.

Por su parte, el dolor *crónico*, no posee una función protectora y más que un síntoma se considera como una enfermedad. Es un dolor persistente que puede autoperpetuarse por un tiempo prolongado después de una lesión, e incluso, en ausencia de ella. Suele ser refractario a los tratamientos y se asocia a importantes síntomas psicológicos.

En función de los mecanismos fisiopatológicos, el dolor puede diferenciarse en *nociceptivo o neuropático*. El primero es la consecuencia de una lesión somática o visceral, mientras que el segundo es el resultado de una lesión y alteración de la transmisión de la información nociceptiva a nivel del sistema nervioso central o periférico.

2.8.1 Antiinflamatorios no esteroideos

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son un grupo de medicamentos ampliamente usados para tratar el dolor, la inflamación y la fiebre. En este grupo se incluyen medicamentos tan conocidos y usados como el ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, indometacina, diclofenaco, piroxicam (Figura 2.9). Se trata de fármacos que se han utilizado para aliviar la inflamación aguda y crónica, contribuyendo de forma muy importante a mejorar la calidad de vida del ser humano puesto que son de gran utilidad para controlar enfermedades

incapacitantes como las enfermedades reumáticas. Hay que destacar que además tienen una gran utilidad por su potencial como antiagregante, es decir, poseen la propiedad de disminuir la capacidad de las plaquetas para unirse y formar trombos. Por esa capacidad se usan en la prevención y tratamiento de enfermedades vasculares tan importantes y tan prevalentes en la actualidad como el infarto de miocardio o los accidentes vasculares cerebrales.

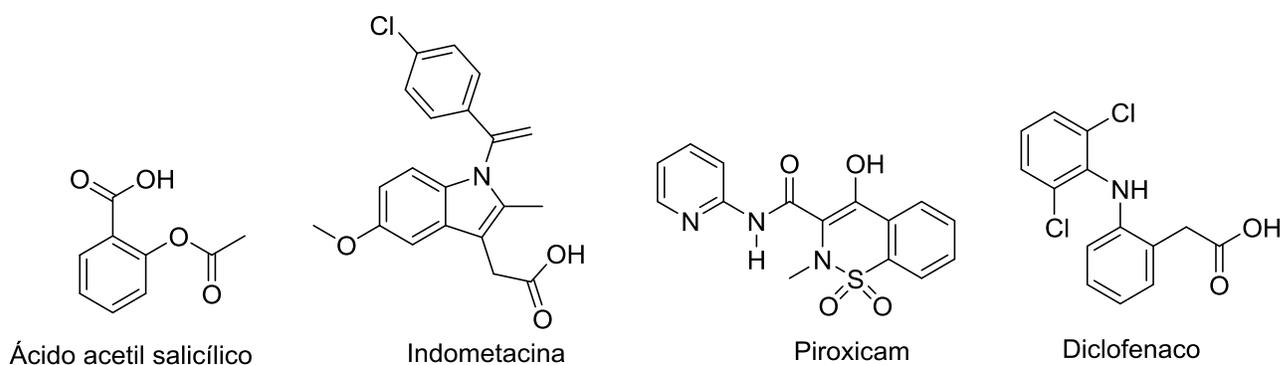


Figura 2.9. Principales AINE's.

2.8.2 Ibuprofeno

El ibuprofeno es un AINE perteneciente al subgrupo de los derivados del ácido propiónico (Figura 2.10), que posee actividad antiinflamatoria, antipirética y analgésica eficaz. Es probablemente la molécula más estudiada clínicamente entre todos los AINEs, su popularidad ha aumentado recientemente a expensas del descubrimiento del polimorfismo de las cicloxigenasas y su aplicación a la

clínica con los coxibs, pues ha sido usado como el comparador en muchos estudios en la era de la investigación epidemiológica moderna.

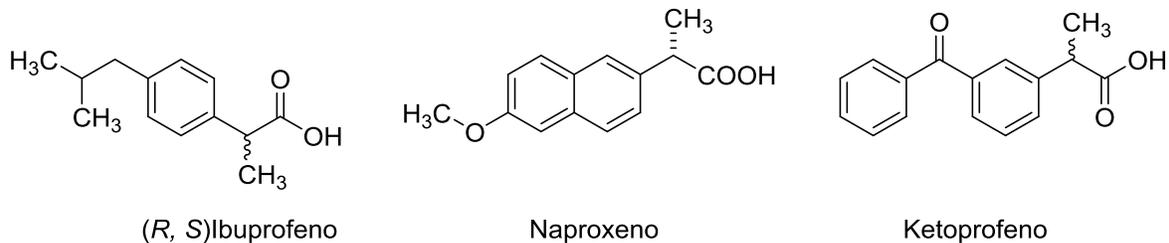


Figura 2.10. Derivados del ácido propiónico.

Como se mencionó anteriormente, el sistema enzimático de cicloxigenasas (COX) cataliza la conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas (PGs) biológicamente activas dentro de múltiples procesos homeostáticos en casi todos los órganos del cuerpo (protección gastrointestinal, homeostasis renal, funciones uterinas, regulación de la temperatura y hasta del ritmo circadiano). Las prostaglandinas y otras citoquinas regulan los procesos reparativos correspondientes a la respuesta inflamatoria periférica y la consecuente sensibilización neuronal y dolor. Al inhibir la COX y regular a la baja la producción de las PGs, los AINEs adquieren sus indicaciones terapéuticas, disminuyen la inflamación reduciendo la hiperalgesia inflamatoria (analgesia periférica), y regulando respuestas neuronales basales (antipiresis), así como procesos de transmisión neuronal nociceptiva en el sistema nervioso central (hiperalgesia neurogénica secundaria: “analgesia central”). Semejante diferencia y variabilidad de efectos dependen en primer lugar del órgano o funciones donde intervenga la

enzima y en segundo lugar de su capacidad estructural de adaptación a varias funciones (el llamado polimorfismo). El sistema COX es una familia de *isoenzimas* (hasta ahora conocidas COX1, COX2, COX3) que son a la vez constitutivas, es decir que participan en funciones normales y también son inducibles (aumentan su cantidad y efecto como el caso de la COX2 en inflamación). La diferencia de un AINE en el perfil de inhibición sobre cada una de las tres isoenzimas es probablemente la responsable de la eficacia en sus efectos terapéuticos e indeseables. El ibuprofeno es capaz de inhibir a las tres.

Los AINEs son rápidamente absorbidos por vía oral. En el caso del ibuprofeno muestra concentraciones de 20–40 µg/mL después de una dosis oral de 400 mg, alcanzando la concentración pico en 1–2 horas, disminuyendo a 5 µg/mL 6 horas después. El tejido sinovial está altamente vascularizado y recibe la droga a través de la circulación, sin embargo la concentración en el líquido sinovial es un poco más lenta en alcanzar las concentraciones pico, posteriormente tiende a ser más alta en el líquido sinovial que en el plasma. El tiempo que toma el equilibrio de las concentraciones entre plasma y líquido sinovial se correlaciona bien con las vidas medias de los AINEs. Tras suministrar dosis múltiples de 400 mg/8 h o 3 veces al día (1200 mg/día) durante dos días a 15 pacientes con artritis, las concentraciones medias de ibuprofeno en plasma fueron de 20 µg/mL, con una media de concentración sinovial de 7.5 µg/L. El fármaco libre difunde a través de las membranas celulares y se une a la COX. La proporción de fármaco libre se verá afectada por múltiples factores, como la concentración plasmática de albúmina,

sexo, edad, interacciones con otros fármacos a este nivel, y alteraciones hepáticas o renales.

Se metaboliza por conjugación u oxidación en el hígado, se excreta normalmente por vía urinaria, bien por filtración glomerular o bien por secreción tubular.²⁵

2.8.3 Efectos secundarios del ibuprofeno

En el manejo del dolor agudo y posoperatorio los efectos secundarios de dosis únicas de ibuprofeno no se diferencian del placebo, en un metanálisis de cinco estudios aleatorios y controlados para el tratamiento de la migraña aguda su utilización en plazos cortos no presentó efectos adversos importantes en dosis menores de 1600 mg/día. Sin embargo, cuando se trata de la administración crónica de los AINE's, la incidencia comparativa de los efectos secundarios graves puede llegar a ser diferente entre las diferentes moléculas debido en parte a características farmacodinamias intrínsecas (su perfil de selectividad sobre las tres ciclooxigenasas) y en forma probablemente más importante a las características farmacocinéticas individuales.²⁵

Las complicaciones graves representan la mayor amenaza, especialmente en las poblaciones de riesgo. La administración de ibuprofeno como todos los AINE's puede producir erosiones gástricas, úlceras, sangrado y muerte por hemorragia gastrointestinal, sin embargo su administración a largo plazo se correlaciona con

una menor incidencia de sangrado intestinal comparada con otros AINE's. El fallo renal agudo es un evento que puede ser precipitado por la exposición a AINE's en pacientes de edad avanzada, con enfermedad renal o cardíaca pre-existente, con terapia de diuréticos de asa o en aquellos que hayan perdido el 10% o más de volumen sanguíneo.²⁵

Estudios recientes demuestran que una administración diaria de ibuprofeno reduce el riesgo de cáncer de pulmón. Algunos derivados de ibuprofeno tales como los fosfo-ibuprofeno (PI), han demostrado mejorar la eficacia del ibuprofeno en la inhibición del crecimiento de algunas líneas celulares *in vitro* de cáncer de colon y en cáncer de colon humano injertado en ratón, sin daño gastrointestinal significativo.²⁶

2.9 Estudios de comportamiento

La experimentación con animales o experimentación "*in vivo*" es el uso de animales no humanos en experimentos científicos. La mayoría de animales son criados para este fin y sacrificados después de usarlos en un experimento. Estudios experimentales concisos sobre animales son a menudo denominados como "estudios de comportamiento", es decir el estudio de las respuestas a impulsos externos. Los estudios de comportamiento que son utilizados para el estudio de nocicepción constituyen un sistema de "entrada-salida" que funciona vía "cajas negras". Como resultado, se describen características más específicas,

en la entrada el estímulo aplicado por el investigador, y en la salida la reacción del animal. Así, estas pruebas deben ser una contabilidad de las respuestas, según la naturaleza del estímulo el cuál puede ser eléctrico, térmico, mecánico o químico.²⁷

Estímulo eléctrico. La aplicación de un estímulo eléctrico tiene como ventaja ser cuantificable, reproducible y no invasivo, produce señales sincronizadas aferentes. Pero también tiene serias desventajas, la más importante de ellas, la intensa excitación por estímulos eléctricos en una forma no diferencial de las fibras, entre ellas un gran diámetro de fibras que no están directamente implicados en la respuesta antinociceptiva.

Estímulo térmico. El calor es más selectivo en la ruta de los receptores de estímulos cutáneos, por lo tanto, categorías específicas de los axones periféricos, incluyendo las fibras nociceptivas y termosensibles, pueden ser excitadas. Sin embargo, el poder calórico de los simuladores que se utilizan generalmente es débil, generando una limitación de este método. De hecho, la velocidad de la calefacción cutánea inducida de esta manera es lenta (10°C/s), lo que resulta en un asíncrona de la activación de las neuronas periféricas y centrales.

Estímulo mecánico. La aplicación de un estímulo mecánico puede ser progresiva o gruesa. Las respuestas producidas por estímulos mecánicos nocivos están graduadas en relación con la intensidad y/o la duración del estímulo, a través de los reflejos desde vocalizaciones hasta conductas motoras complejas. El estímulo es detenido tan pronto como se obtiene una respuesta.

Estímulo Químico. La estimulación química implica la administración de agentes alógenicos y representa forma de estimulación lenta, incluso muy lenta. A este respecto, los estímulos químicos son claramente diferentes de otras formas de estimulación; también son progresivos, son de mayor duración y tienen un carácter ineludible una vez que se han aplicado. Como resultado dan un típico reflejo, lo que exigirá un nivel mínimo de sincronización de la actividad de los nervios aferentes o sensoriales primarios.²⁷

✚ **Writhing test.** La prueba de contracciones abdominales o *Writhing test* es un método químico utilizado para inducir dolor de origen periférico mediante inyección de principios irritantes como fenilquinona o ácido acético en ratones. La actividad analgésica del compuesto de ensayo se relaciona con la disminución en la frecuencia de las contracciones. Las manifestaciones de contracciones abdominales en ratones fueron descritas como un arqueo de la espalda, la extensión de las extremidades traseras y la contracción de la musculatura abdominal.

Las contracciones generadas por la administración parenteral de ácido acético en ratones, son debidas al dolor profundo de la naturaleza endógena y que se repiten durante un período prolongado de tiempo. Debido a la naturaleza irritante, estos principios también son propensos a inducir lesiones. *Writhing* es una respuesta abierta al intenso dolor inducido por principios irritantes a través nociceptores caracterizados por episodios de retracción del abdomen y el estiramiento de las extremidades posteriores. Las señales transmitidas a sistema nervioso central en

respuesta al dolor debido a la irritación, causa la liberación de mediadores tales como prostaglandinas que contribuye a la mayor sensibilidad a los nociceptores.²⁸

El método consiste en administrar el agente irritante y observar a los individuos por lapsos de tiempo de 5 minutos, llevando un conteo de las contracciones abdominales presentadas. Al término de 30 min, se detiene dicho conteo.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Contribuir al conocimiento de nuevos principios activos antiinflamatorios y anticancerígenos, mediante el estudio químico y biológico de especies medicinales o modificaciones estructurales a moléculas de interés.

3.2 Objetivos Específicos

- Llevar a cabo el estudio químico de *Mimosa aculeaticarpa* var. *biuncifera* y de *Achyropappus anthemoides* para la obtención y caracterización de sus principales metabolitos secundarios, empleando técnicas cromatográficas así como métodos físicos y espectroscópicos.
- Preparar y caracterizar el éster ibuprofenato de β -sitosterilo mediante reacciones de esterificación rutinarias y métodos espectroscópicos, para el análisis de su actividad analgésica y compararla con el ibuprofeno libre en un modelo de ratón.

4. Justificación

La inflamación es un importante problema de salud pública en el mundo, que trae como consecuencia varios padecimientos como el dolor o la artritis y en el caso de una inflamación crónica, puede conducir a cáncer. Aunque existen en el mercado fármacos con propiedades antiinflamatorias y analgésicas, se conoce que éstos en ocasiones no son muy efectivos, que causan efectos secundarios y muchas veces son de costo elevado. Entonces se vuelve importante la investigación enfocada a la obtención de nuevos principios activos para tratar este padecimiento que sean efectivos y de bajo costo, siendo una estrategia el estudio químico y biológico de plantas usadas en medicina tradicional, o las modificaciones estructurales a moléculas líderes empleadas como fármacos.

Con base en lo anterior, en este trabajo se llevó a cabo el estudio químico de *Mimosa aculeaticarpa* var. *biuncifera* y *Achyropappus anthemoides*, con la finalidad de contribuir al conocimiento de la química de estas especies y de nuevos principios activos antiinflamatorios. En adición se preparó el éster de ibuprofeno y β -sitosterol para medir en un modelo de antinocicepción en ratón, si este nuevo compuesto podría mejorar a nivel preclínico las propiedades antinociceptivasas del ibuprofeno libre.

5. Resultados y Discusión

Mimosa aculeaticarpa var. *biuncifera* (Figura 5.0) se colectó en la comunidad de “El Nopalillo”, en el municipio de Epazoyucan, estado de Hidalgo, el 13 de junio de 2013, mientras que *Achyropappus anthemoides* (Figura 5.1) se colectó en la localidad de Santo Tomás, municipio de Zempoala, en noviembre de 2013. Las plantas se dejaron secar a la sombra y se dividieron en sus partes áreas y de raíces para proceder a la obtención de los extractos.



Figura 5.0. *Mimosa aculeaticarpa* var. *biuncifera* (Benth.) Barneby.



Figura 5.1. *Achyropappus anthemoides* (H.B.K.) A. Gray

5.1 Estudio químico de *M. aculeaticarpa* var. *biuncifera*

Las hojas y los tallos de la especie se extrajeron con MeOH y posterior partición con AcOEt, *n*-BuOH y H₂O, mientras que las raíces se extrajeron de manera secuencial con hexano, AcOEt y MeOH. Los extractos y sus respectivas partes se sometieron a análisis por RMN de ¹H. En la parte AcOEt del extracto MeOH de las hojas (Figura 5.2) se obtuvo principalmente el **galato de metilo**. Por su parte, la fracción *n*-BuOH (Figura 5.3) mostró mayoritariamente el galato de metilo en adición de trazas de compuestos aromáticos, mientras que en la parte acuosa (Figura 5.4) se observó una mezcla de **(+)-pinitol**, **α-D-glucosa**, **β-D-glucosa**.

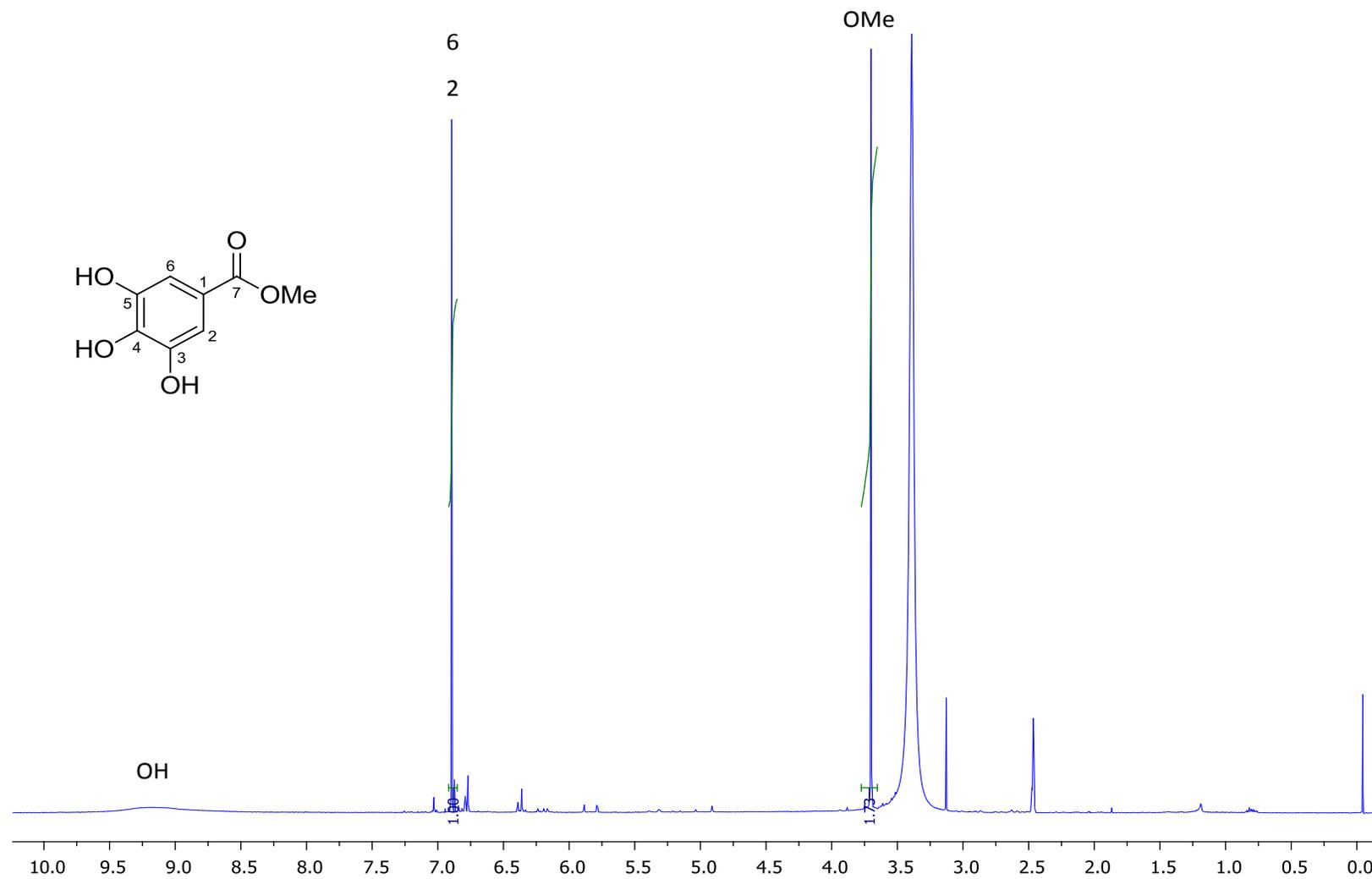


Figura 5.2 Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) en DMSO-d_6 del galato de metilo.

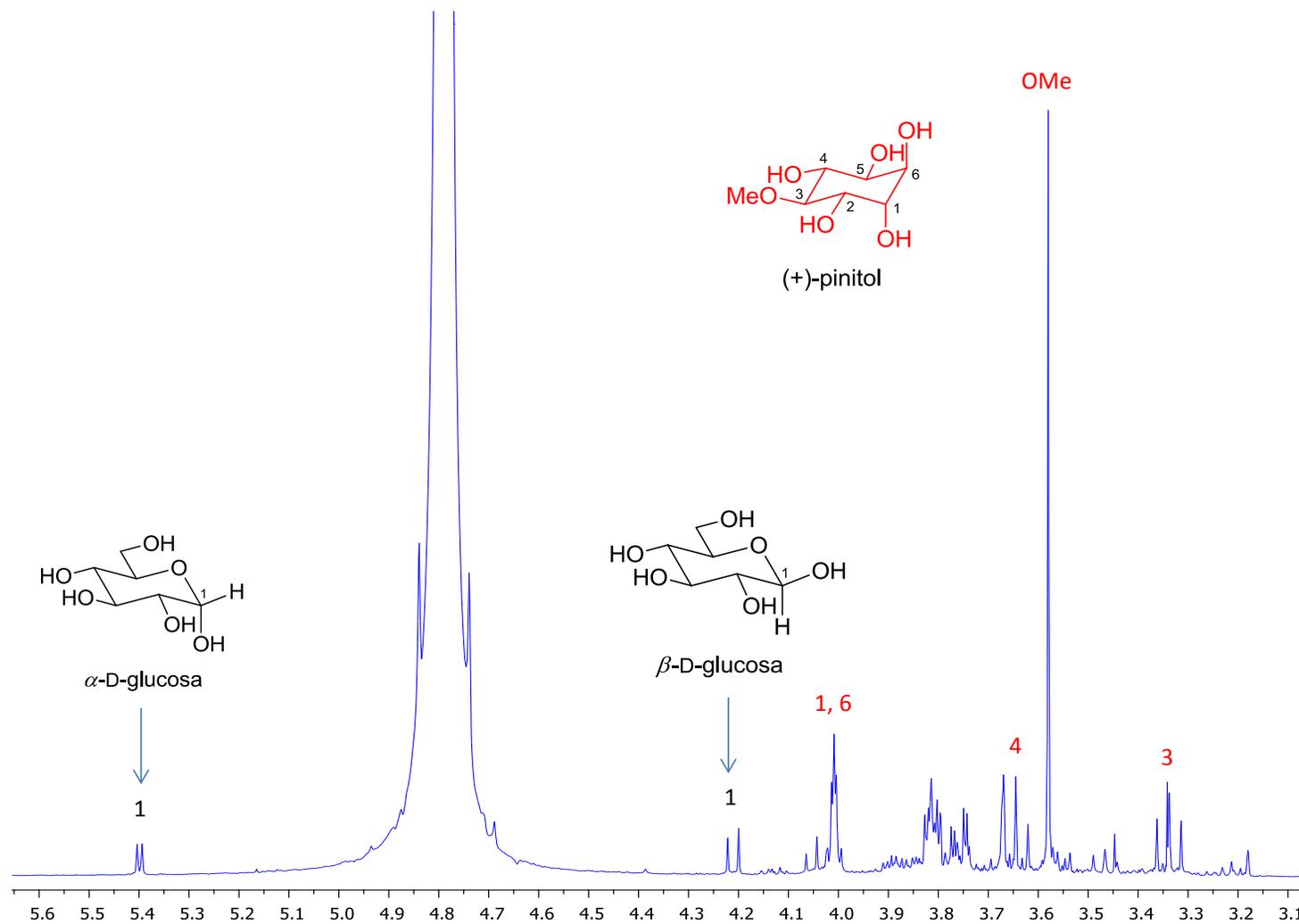


Figura 5.3 Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) en D_2O de la mezcla de α -D-glucosa, β -D-glucosa y (+)-pinitol.

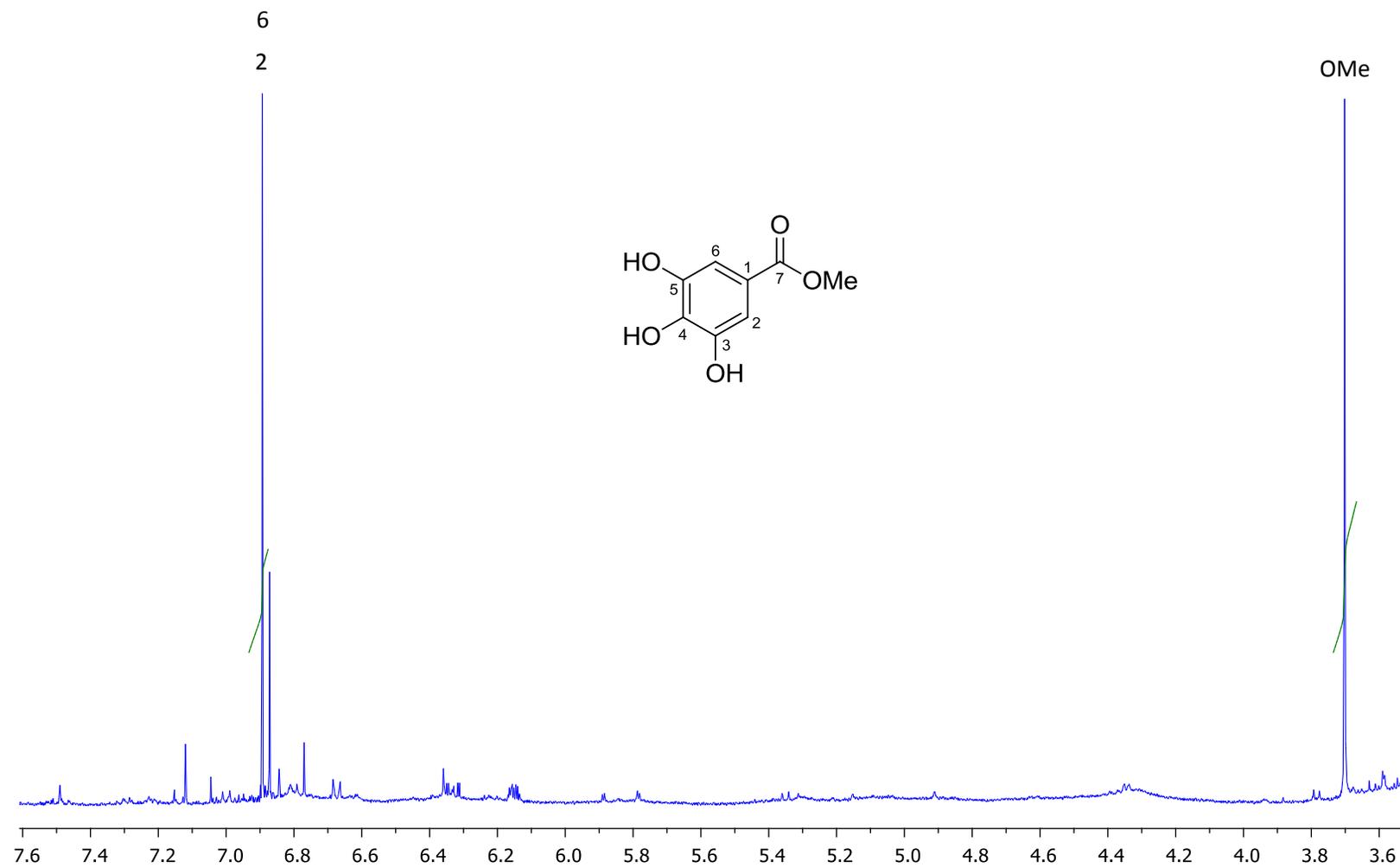


Figura 5.4 Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) en metanol- d_4 de la parte n -BuOH del extracto MeOH de las hojas.

La corteza de la raíz se trituró con ayuda de un molino con la finalidad de aumentar el área de contacto entre el material orgánico y el disolvente. Se obtuvo un total de 625 g de raíz seca, la cual se colocó en un matraz balón, se adicionó hexano (3 L) y se sometió a reflujo durante 5 horas. Pasado este tiempo se dejó enfriar, se filtró y se concentró en rotavapor para obtener el extracto hexánico, el cual se desengrasó con MeOH caliente → frío, filtrado y concentrado en el rotavapor para obtener el nuevo extracto (3.45 g). El proceso se repitió de manera secuencial con AcOEt (9.6 g) y MeOH (120 g), excepto que en este último no se hizo el proceso de desengrasado.

5.1.1. Extracto hexánico de la raíz

El extracto hexánico se analizó mediante cromatografía en capa fina (CCF) usando como fase móvil hexano y mezclas de hexano-AcOEt (9:1 y 8:2) (Figura 5.5). Se observó que la mejor separación se obtuvo con la mezcla hexano-AcOEt (9:1). Se distinguieron cuatro compuestos principalmente, los cuales presentaron los siguientes valores de R_f : compuesto No. 1, $R_f=0.25$, compuesto No.2, $R_f=0.38$, compuesto No.3, $R_f=0.63$ y para el compuesto No.4, $R_f=0.75$.

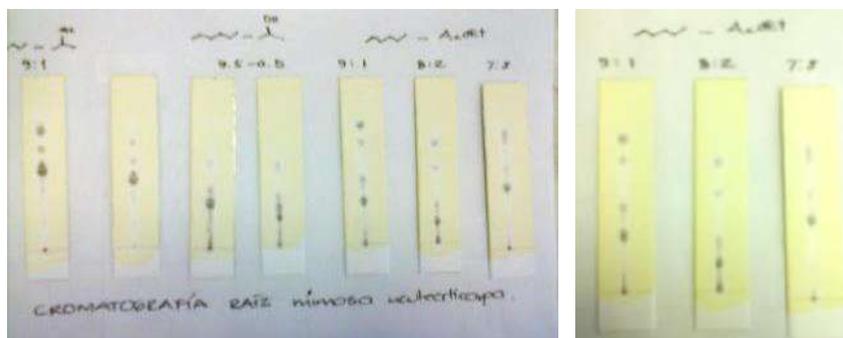


Figura 5.5 CCF del extracto hexánico.

El extracto hexánico desengrasado (1g) se sometió a separación mediante cromatografía en columna (CC), usando la técnica de cromatografía rápida con las condiciones que se muestran en la Tabla 5.0

Tabla 5.0 Condiciones para la columna del extracto hexánico.

Diámetro:	35 mm	
Fase estacionaria:	Gel de sílice 60 (230–400 mesh) (6 in)	
Fase móvil:	Hexano–AcOEt (4:1), 500 mL	
Velocidad de elución:	2 pulg/min.	

Se colectaron 22 fracciones de 20 mL, las cuales se analizaron por CCF y se agruparon con base en la similitud de su relación de frente (R_f), dando lugar a las

fracciones A (1–3), B (4–8), C (9–13), D (14–16) y E (17–19). Estas fracciones se analizaron por RMN de ^1H (400 MHz) en CDCl_3 .

En la fracción A se apreciaron señales características de sustancias grasas, en la fracción B (Figura 5.7) se observó la presencia de un sólido blanco (10 mg) que se caracterizó como **lupeol**, con base en la comparación de sus señales con las reportadas (Tabla 5.1) ²⁹. En la fracción C (Figura 5.8) se identificó una mezcla de **β -sitosterol** y **estigmasterol**. La comparación de su espectro con el de una muestra auténtica corroboró la presencia de estos fitoesteros.

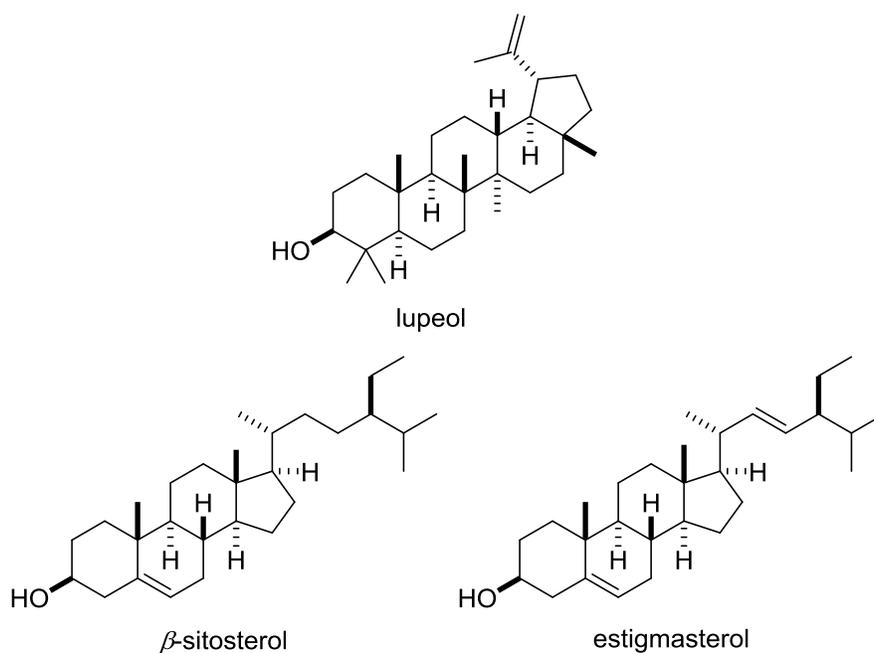


Figura 5.6 Estructuras del triterpeno lupeol , β -sitosterol y stigmasterol.

Finalmente, en la fracción D se apreciaron señales para mezclas de triterpenos, pero en cantidades muy pequeñas que no nos permitió deducir de la estructura de los compuestos.

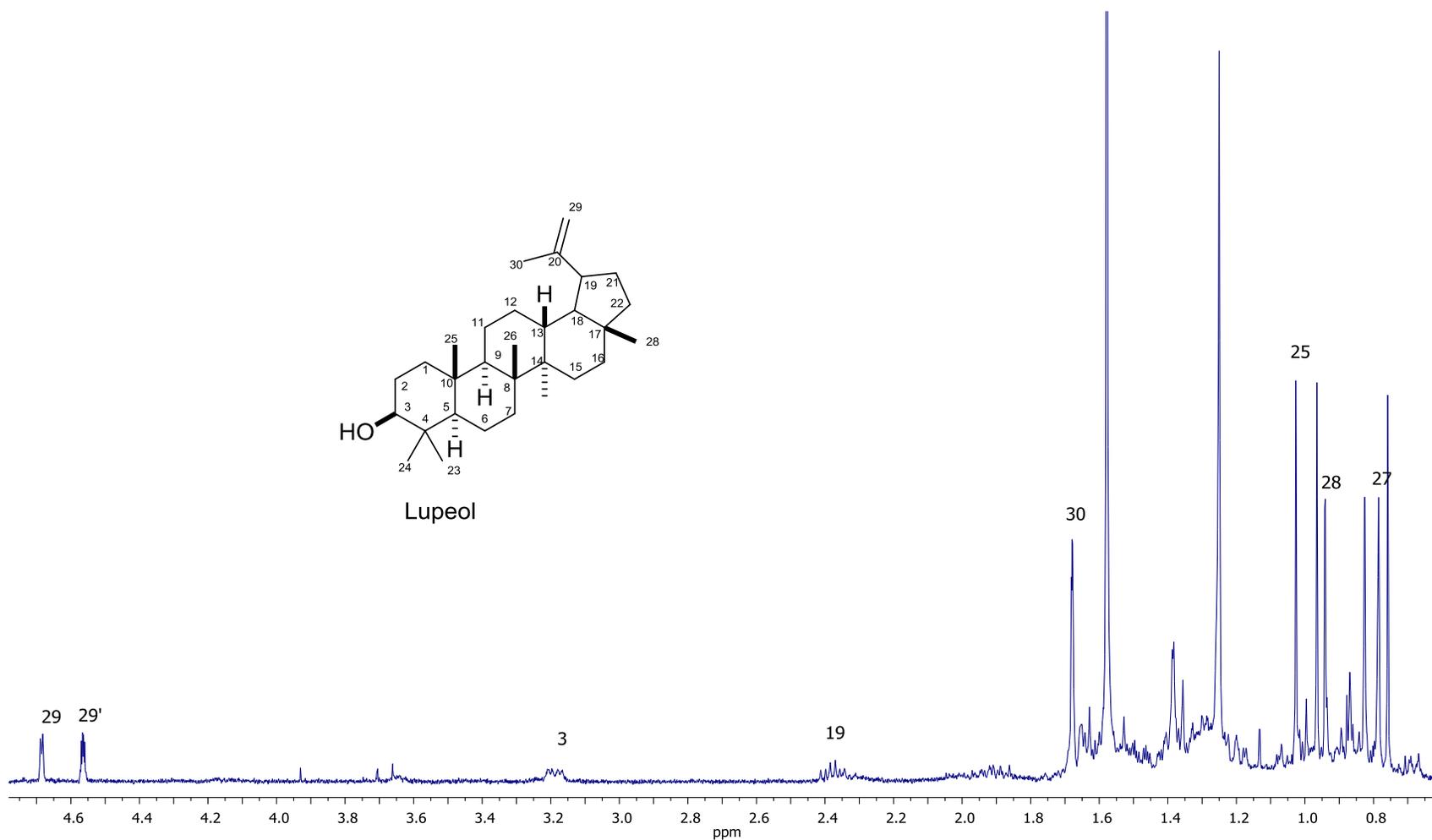


Figura 5.7 Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) en CDCl_3 de la fracción B (lupeol).

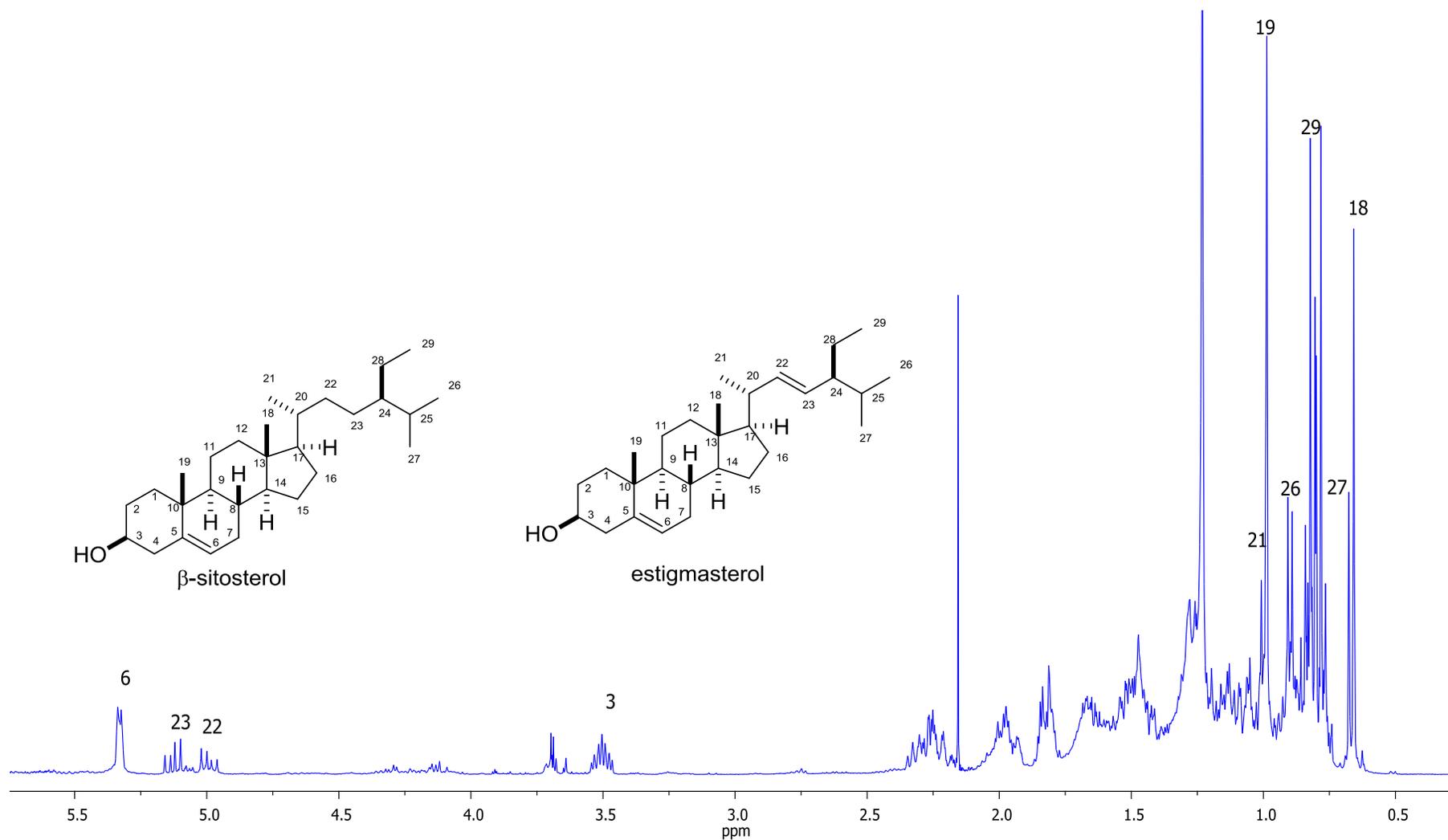


Figura 5.8 Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) en CDCl_3 de la fracción C (mezcla de β -sitosterol y estigmasterol).

Tabla 5.1 Datos parciales de RMN de ^1H (400 MHz) del lupeol, en CDCl_3 .

Posición	$\delta^1\text{H}$ en ppm (mult, J en Hz)	Referencia ²⁰
3	3.20 (m)	3.20 (m)
19	2.37 (m)	2.37 (m)
23	0.75 (s)	0.74 (s)
24	0.78 (s)	0.78 (s)
25	0.82 (s)	0.83 (s)
26	0.93 (s)	0.91 (s)
27	0.96 (s)	0.94 (s)
28	1.02 (s)	1.06 (s)
29	4.68 (d, 2.2)	4.70 (d)
29'	4.56 (dd, 2.2, 1.1Hz)	4.56 (dd, 2.2, 1.1Hz)
30	1.67 (s)	1.72 (s)

Tabla 5.2 Datos parciales de RMN de ^1H (400 MHz) de β -sitosterol y estigmasterol, en CDCl_3 .

Posición	$\delta^1\text{H}$ en ppm (mult, J en Hz)	Referencia estigmasterol	Referencia β -sitosterol
3	3.47 (tdd, 4.5 Hz)	3.51 (tdd, 4.5, 4.2, 3.8 Hz)	3.53 (tdd, 4.5, 4.2, 3.8 Hz)
5	5.30 (d, 6.2 Hz)	5.31 (d, 6.1 Hz)	5.36 (d, 6.1 Hz)
19	0.95 (d, 6.3 Hz)	0.91 (d, 6.2 Hz)	0.93 (d, 6.2 Hz)
20	4.96 (m)	4.98 (m)	
21	5.09 (m)	5.14 (m)	
24	0.83	0.83 (t, 7.1 Hz)	0.84 (t, 7.2 Hz)
26	0.82	0.82 (d, 6.6 Hz)	0.83 (d, 6.4 Hz)
27	0.80	0.80 (d, 6.6 Hz)	0.81 (d, 6.4 Hz)
28	0.71	0.71 (s)	0.68 (s)
29	1.03	1.03 (s)	1.01 (s)

Los resultados descritos en este trabajo, en complemento con el trabajo previo⁴ evidenciaron que los extractos metanólicos de la parte aérea contienen gran

cantidad de **(+)-pinitol** (~12%), **galato de metilo** (~10%), así como **α -D-glucosa** y **β -D-glucosa** (~12%), en menor proporción están presentes el **escualeno** (1.48%) y el **cafeato de metilo** (0.15%), mientras que los metabolitos minoritarios son **taxifolina** (0.11%) y **quercetina** (0.11%), así como el **lupeol** (0.10%). Por su parte, las raíces contienen mayoritariamente **β -sitosterol** y **estigmasterol** (31%) y en menor proporción el triterpeno **lupeol** (0.1%).

Los metabolitos identificados en esta especie poseen actividad biológica relevante. **β -Sitosterol** y **estigmasterol** poseen actividad antiinflamatoria, analgésica y son importantes para disminuir el nivel de lipoproteínas de baja densidad (LDL colesterol) en sangre.³⁰ El **lupeol** ha mostrado actividad antiprotozoaria, antiinflamatoria y antitumoral, entre otras.³¹ El (+)-pinitol posee actividad larvicida, anticáncer, lupus y otras enfermedades autoinmunes, así como propiedades nutricionales en composiciones para el tratamiento de la diabetes mellitus.³² El galato de metilo ha mostrado importante actividad antioxidante³³ y ha sido aislado como principio antitumoral de varias especies de plantas.³⁴ Es bien conocida la actividad antioxidante de los derivados del ácido cafeico, particularmente el cafeato de metilo posee actividad antitumoral³⁵ y anti VIH-1.³⁶ Taxifolina y quercetina son excelentes agentes antioxidantes y antiinflamatorios. En adición, se ha demostrado que inhiben a la topoisomerasa I, implicando su importancia en el control del crecimiento de células cancerosas.³⁷ Finalmente, el **escualeno**, en adición de otras propiedades benéficas para el cuerpo humano, posee actividad antioxidante y citoprotectora de la médula ósea en modelo de citotoxicidad inducida por cisplatino.³⁸

5.2 Estudio químico de *Achyropappus anthemoides*

5.2.1 Obtención de la infusión

La planta se dividió en parte aérea (hojas y flores) y raíz, las cuales se cortaron en trozos pequeños y se dejaron secar a la sombra por 10 días. De la parte aérea (120 g) se preparó una infusión con agua destilada (1.5 L) por 15 minutos. Posteriormente se llevó a temperatura ambiente y se extrajo con AcOEt (1.5 L). La parte AcOEt se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se evaporó en el rotavapor para obtener el correspondiente extracto (5 g).

5.2.2 Análisis químico de la infusión

Dicho extracto se analizó por RMN de ^1H . El espectro evidenció la presencia de un compuesto aromático mayoritario y otros materiales grasos en menor cantidad. La separación mediante cromatografía en columna del extracto, usando gel de sílice y mezclas de hexano–AcOEt (2:3), permitió la obtención de una sustancia que se analizó por RMN de ^1H y ^{13}C en 1D y 2D, (Figuras 5.10 – 5.13). En la Tabla 5.3, se describen los datos de desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C que llevaron a la

conclusión de que se trata del *p*-hidroxibenzaldehído (pHB), el cual es un producto natural conocido responsable, junto con la vainillina, del olor y sabor de la vainilla.

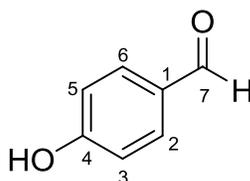


Figura 5.9 Estructura del *p*-hidroxibenzaldehído.

Tabla 5.3 Datos de RMN de ^1H y ^{13}C (400MHz y 100MHz) del parahidroxibenzaldehído (pHBA), en CDCl_3 .

Posición	$\delta^1\text{H}$ en ppm (mult)	$\delta^{13}\text{C}$ en ppm
1		129.67
2	7.82 (d)	132.41
3	6.98 (d)	115.85
4		161.16
5	6.98 (d)	115.85
6	7.82 (d)	132.41
7	9.86 (s)	191.3

$$J_{2,3} = J_{5,6} = 8.0 \text{ Hz}$$

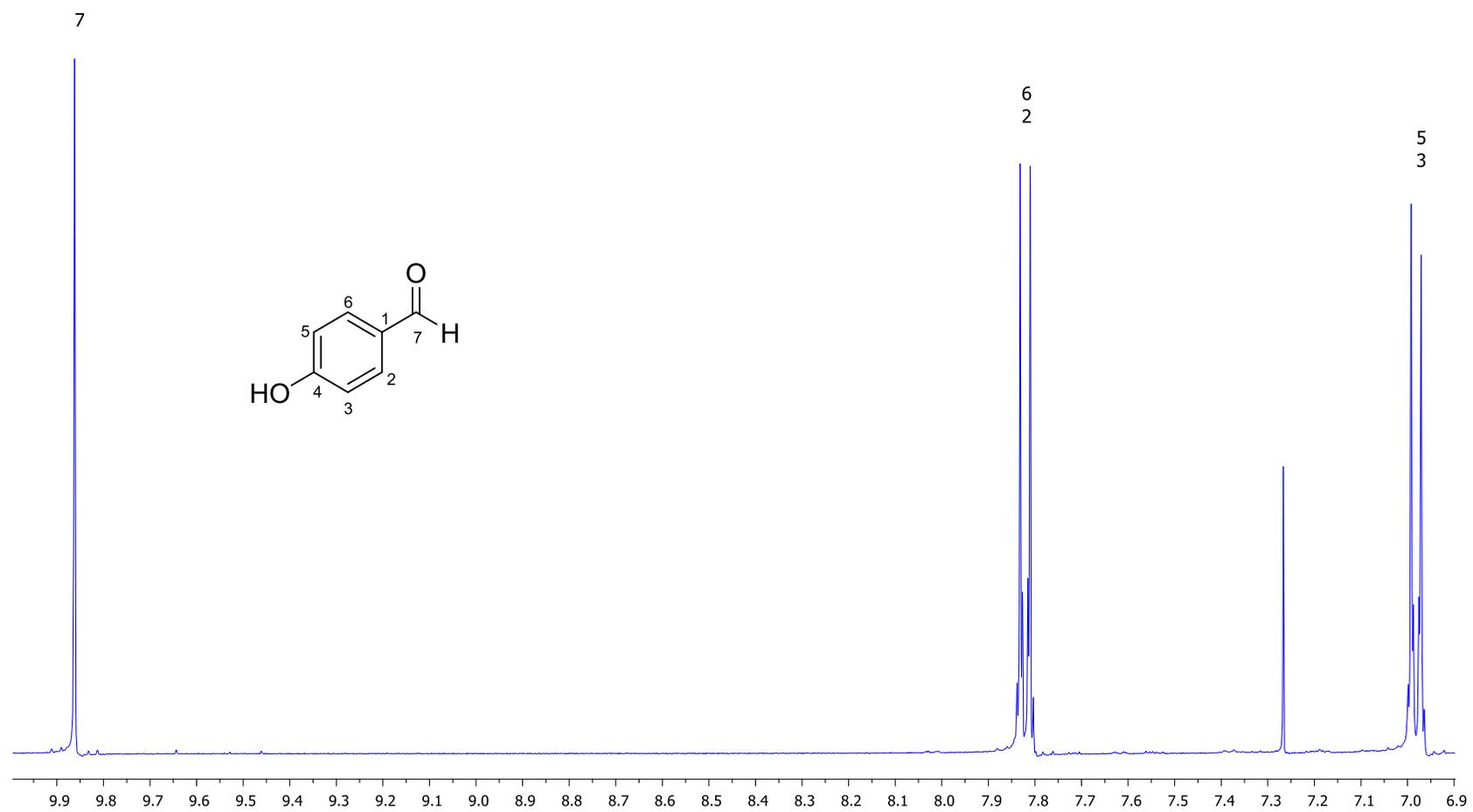


Figura 5.10. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) del *p*-hidroxibenzaldehído (pHB), en CDCl_3 .

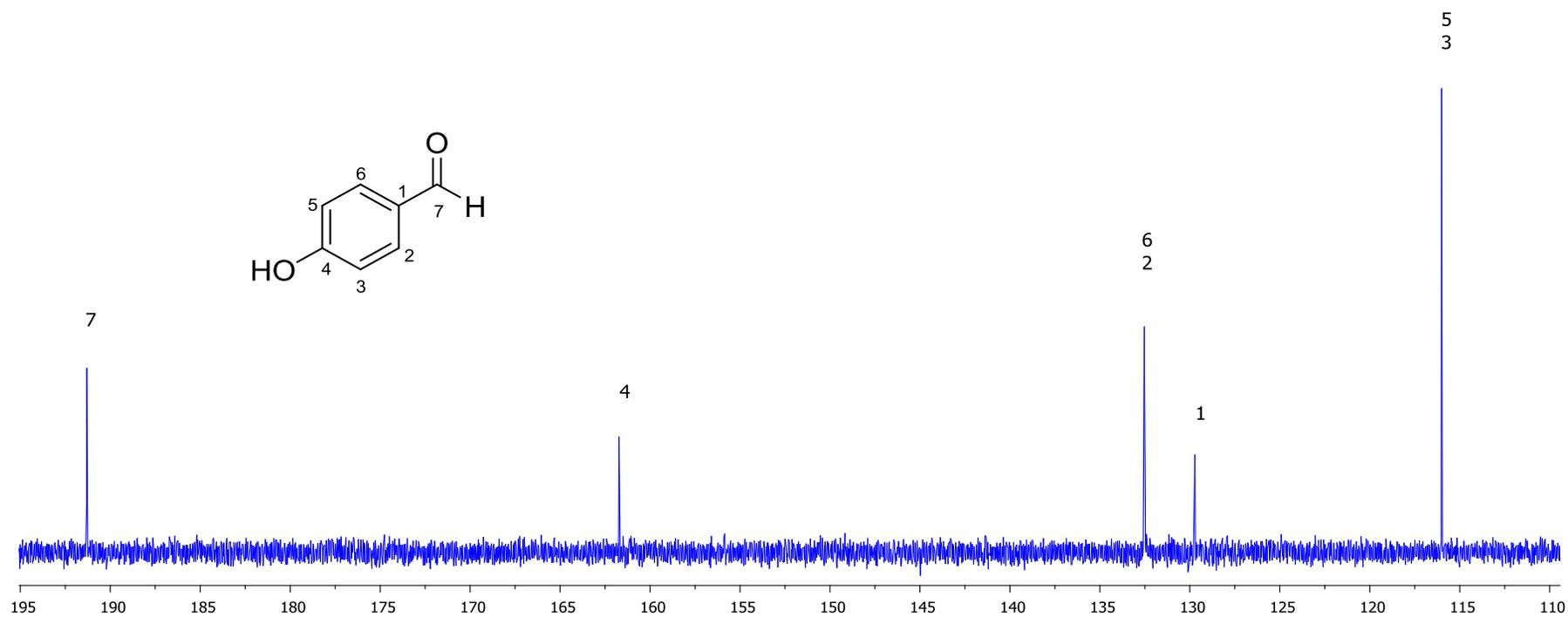


Figura 5.11. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) del *p*-hidroxibenzaldehído (pHB), en CDCl_3 .

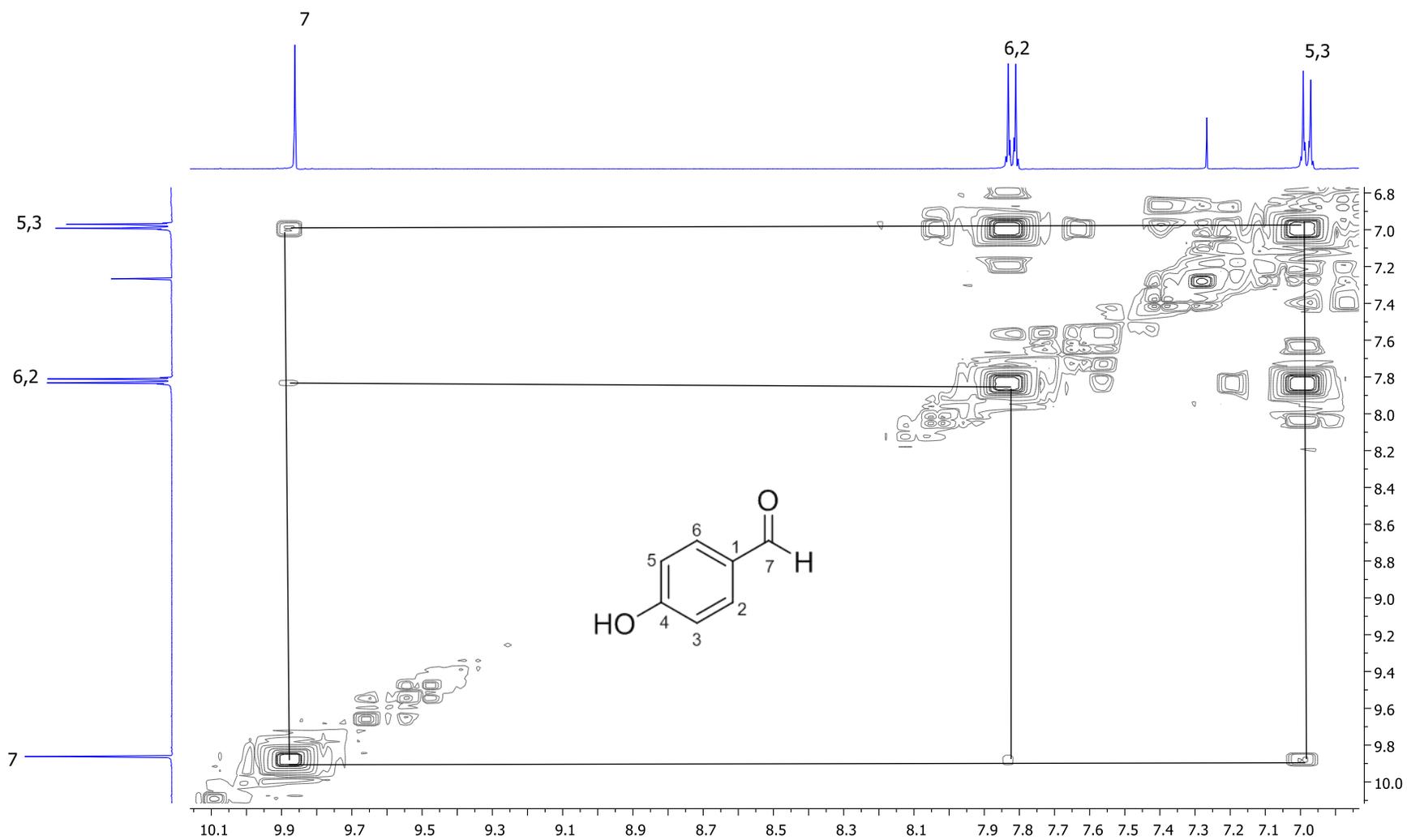


Figura 5.12. Espectro COSY del *p*-hidroxibenzaldehído (pHB), en CDCl_3 .

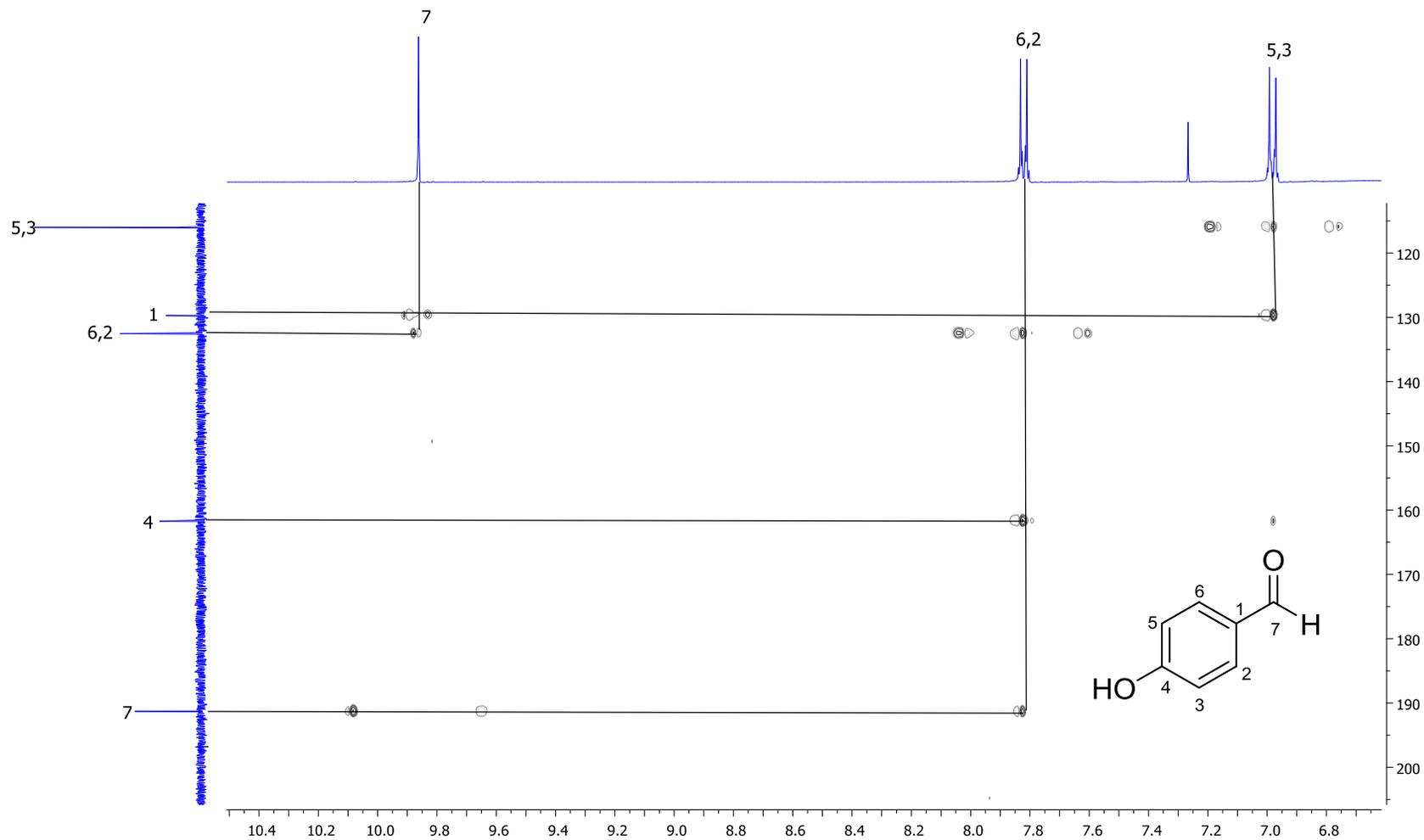


Figura 5.13. Espectro HMBC del *p*-hidroxibenzaldehído (pHB), en CDCl_3 .

5.3 Obtención del ibuprofenato de β -sitosterilo

El ibuprofeno se obtuvo a partir de tabletas comerciales, mientras que el β -sitosterol se consiguió de la marca Aldrich. La esterificación del ibuprofeno (0.5 g) y el β -sitosterol (1 g) se llevó a cabo usando una solución 1.0 M de diciclohexilcarbodiimida (DCC) en CH_2Cl_2 (20 mL) y cantidades catalíticas de 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (DAMP) (Figura 5.14). La mezcla de reacción se dejó durante 24 h. a 30 °C, con agitación magnética, se filtró, se evaporó el disolvente y el producto se sometió a separación mediante cromatografía en columna, usando gel de sílice y mezclas de hexano- CH_2Cl_2 (1:1). Se obtuvieron 0.5 g de un compuesto de consistencia cerosa y color amarillo claro, el cual fue identificado mediante Resonancia Magnética Nuclear como el producto de esterificación.

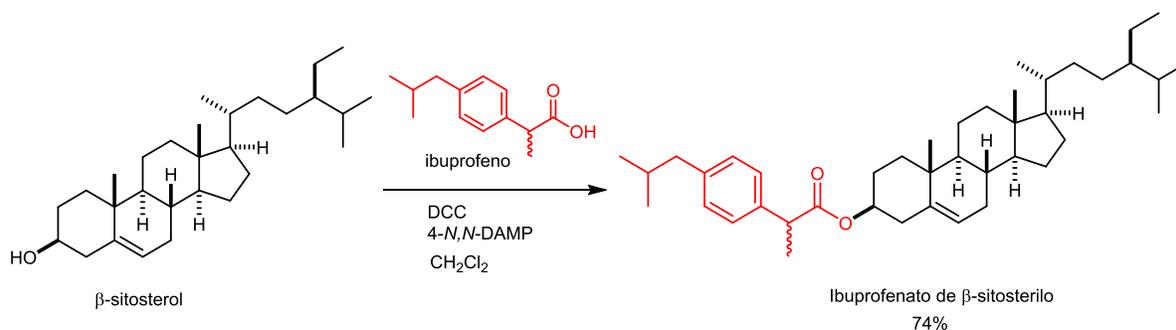


Figura 5.14. Reacción de esterificación.

Con fines comparativos, en las figuras 5.15 y 5.16, se muestran los espectros de RMN de ^1H del β -sitosterol y del ibuprofeno, en ese orden.

El espectro de RMN ^1H del ibuprofenato de β -sitosterilo (Figura 5.17) mostró señales de protones aromáticos típicas de un sistema AA'BB' en 7.20 ($J = 8.1$ Hz, H-5 y H-9) y 7.08 ppm (H-6 y H-8), un protón vinílico en 5.33 ppm ($J = 4.5$ Hz, H-3') y la señal para el hidrógeno en C-3', base del grupo éster, en 4.61 ppm. El resto de las señales del residuo de ibuprofeno se observaron en 3.65 (1H, q, $J = 7.2$ Hz, H-2), 2.44 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-10), 1.66 (1H, m, H-11), 1.47 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, Me-3), y 0.90 (6H, d, $J = 6.6$ Hz, Me-12 y Me-13) ppm. El espectro RMN ^{13}C (Figura 5.18) mostró señales para un carbonilo del grupo éster en 174.2 ppm (C-1), para seis átomos de carbonos aromáticos en 140.3 (C-7), 138.0 (C-5), 129.2 (C-6 and C-8) y 127.1 (C-5 and C-9) ppm, para dos átomos de carbonos vinílicos en 139.6 (C-5), 122.5 (C-6) y para un átomo de carbono de base de oxígeno en 74.1 (C-3') ppm. La correlación observada en el espectro HMBC, el cual es un experimento en dos dimensiones que sirve para identificar correlaciones a dos y tres enlaces corroboró la correlación entre las señales asignadas a H-3' y al carbono del grupo carbonilo (C-1) confirmando la esterificación en C-3'. El resto de las señales de RMN ^1H y ^{13}C fueron similares a las reportadas para ibuprofeno³⁹ y β -sitosterol.⁴⁰

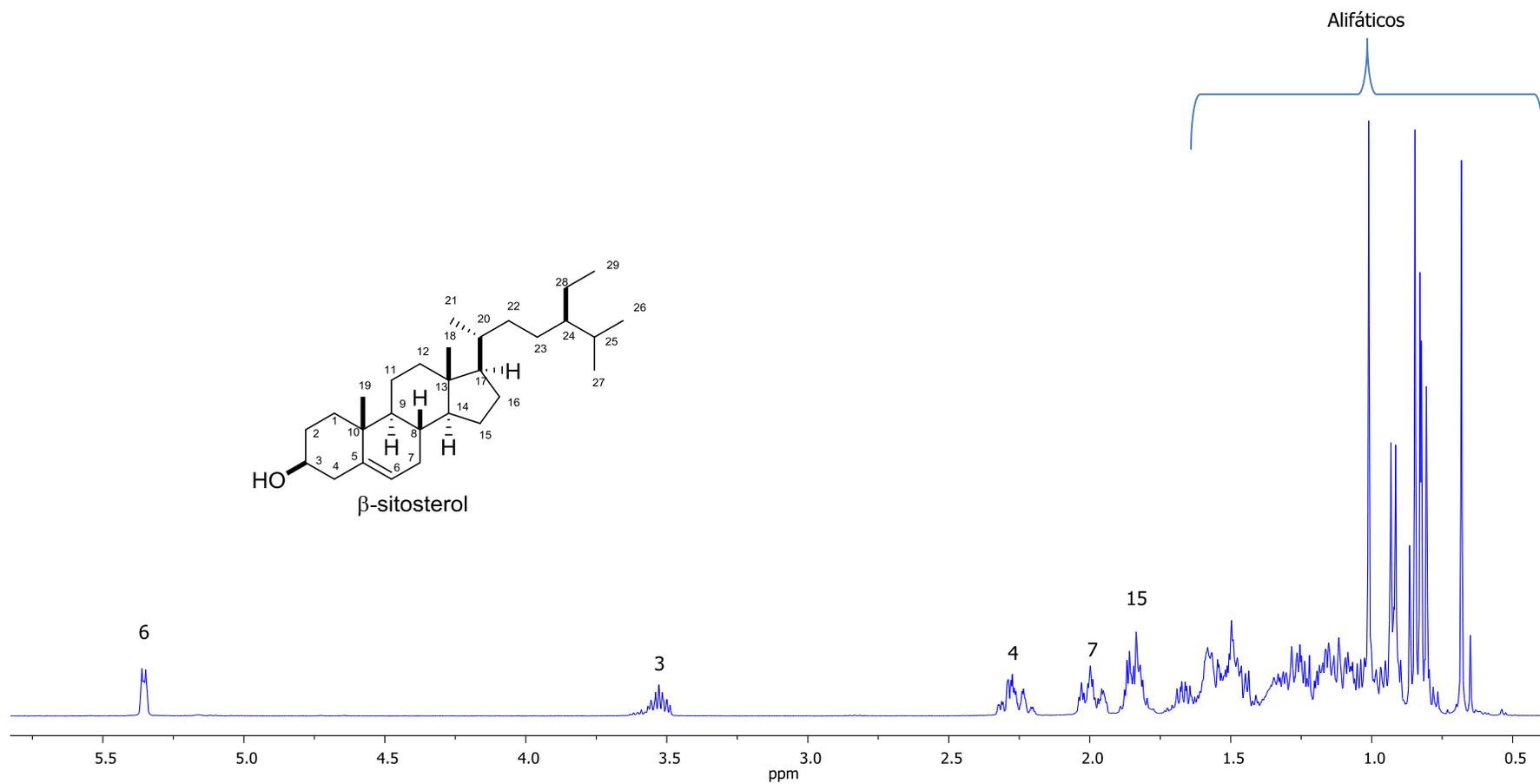


Figura 5.15. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) en CDCl_3 , del β -sitosterol (ALDRICH).

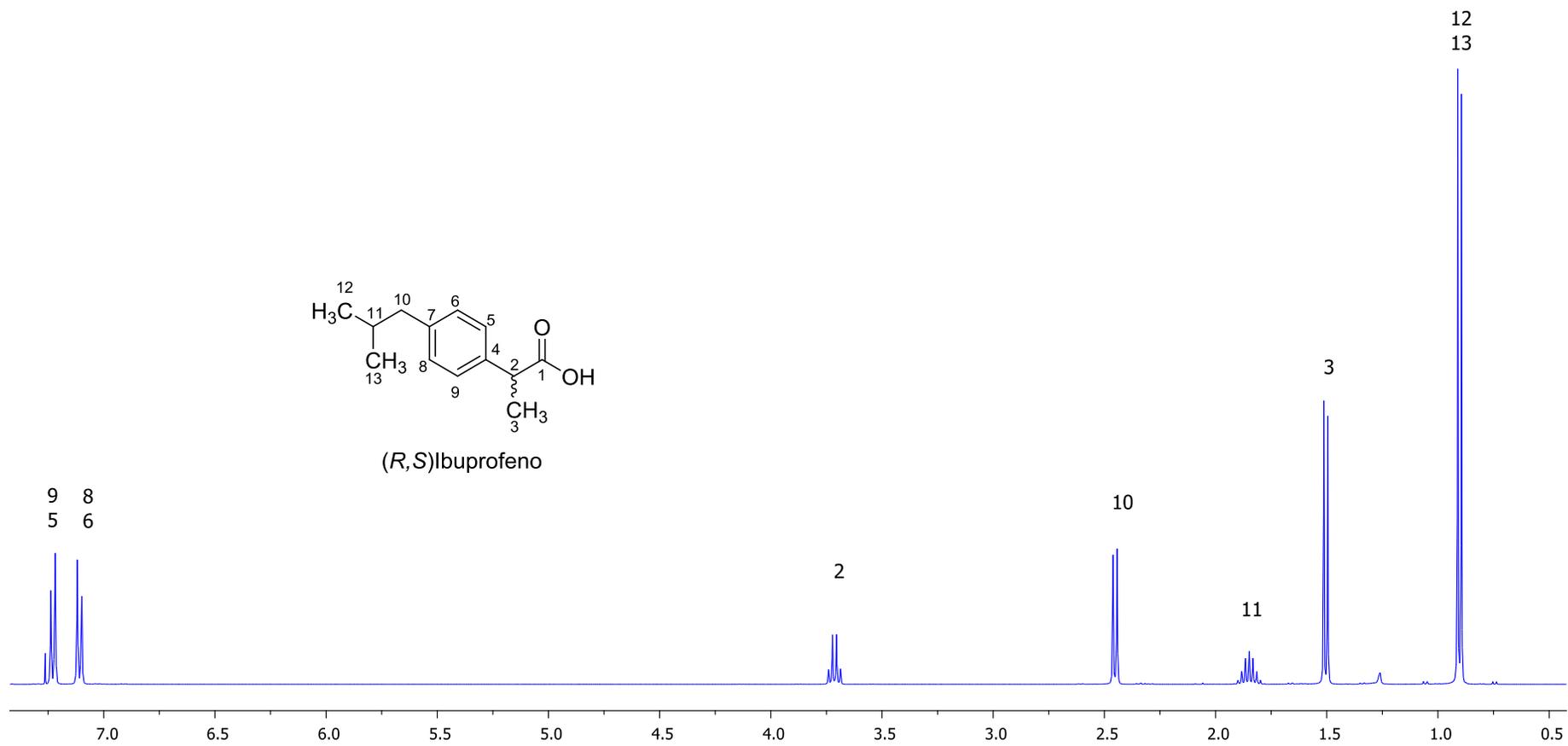
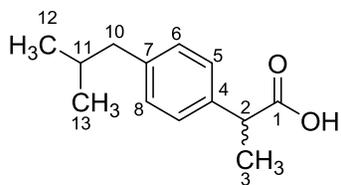


Figura 5.16. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) en CDCl_3 , del ibuprofeno extraído de tabletas comerciales.



(R,S)-Ibuprofeno

Tabla 5.4 Datos de RMN de ^1H (400 MHz) de ibuprofeno, extraído de tabletas comerciales en CDCl_3 .

Posición	$\delta^1\text{H}$ en ppm (mult, J en Hz)
2	3.73 (m)
3	1.52 (d, 4.0)
5	7.25 (m)
6	7.13 (m)
8	7.13 (m)
9	7.25 (m)
10	2.47 (d, 8.0)
11	1.87 (m)
12	0.92 (dd, 8.0)
13	0.92 (dd, 8.0)

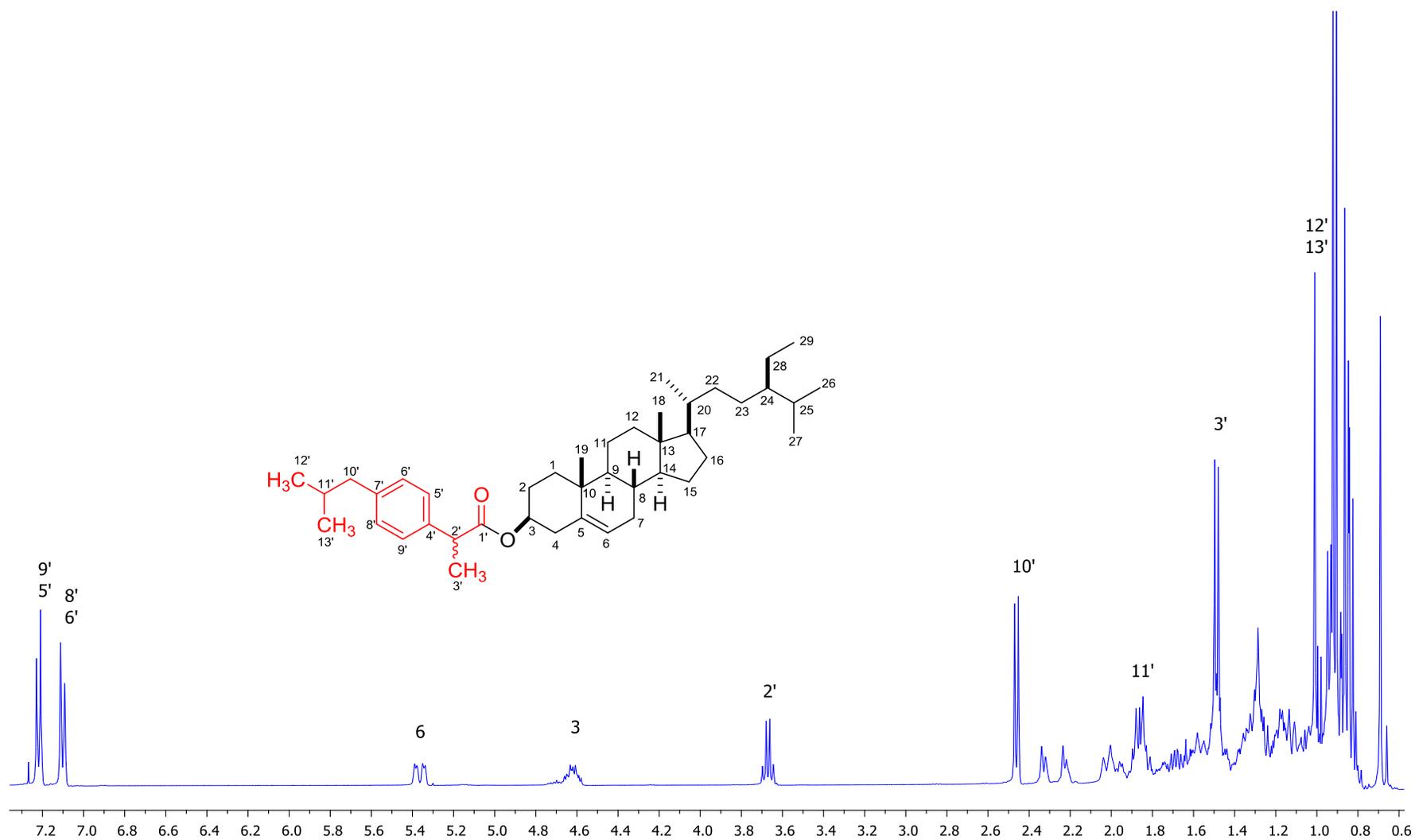


Figura 5.17. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) en CDCl_3 del ibuprofenato de β -sitosterilo.

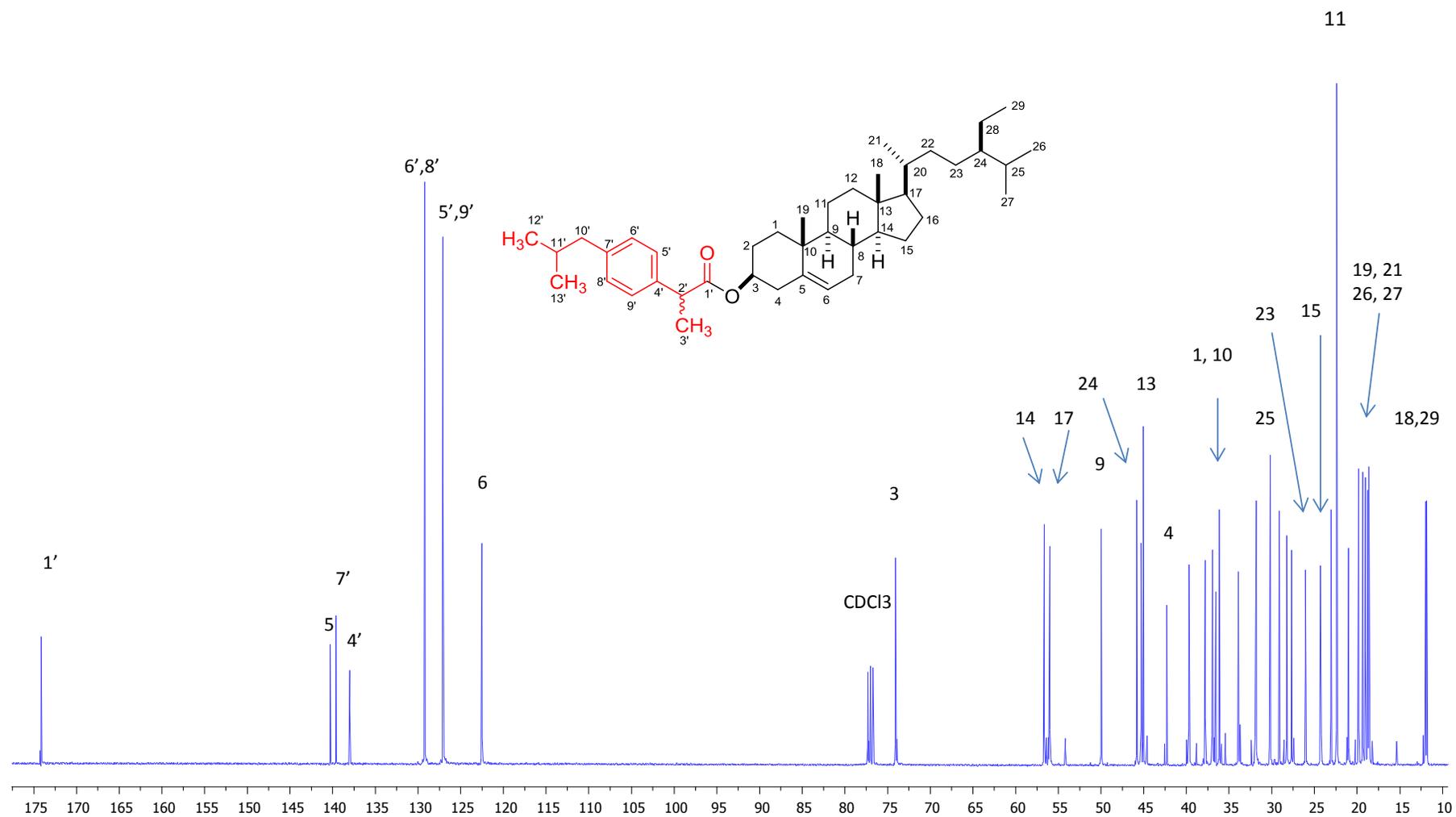


Figura 5.18. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) en CDCl_3 del ibuprofenato de β -sitosterilo

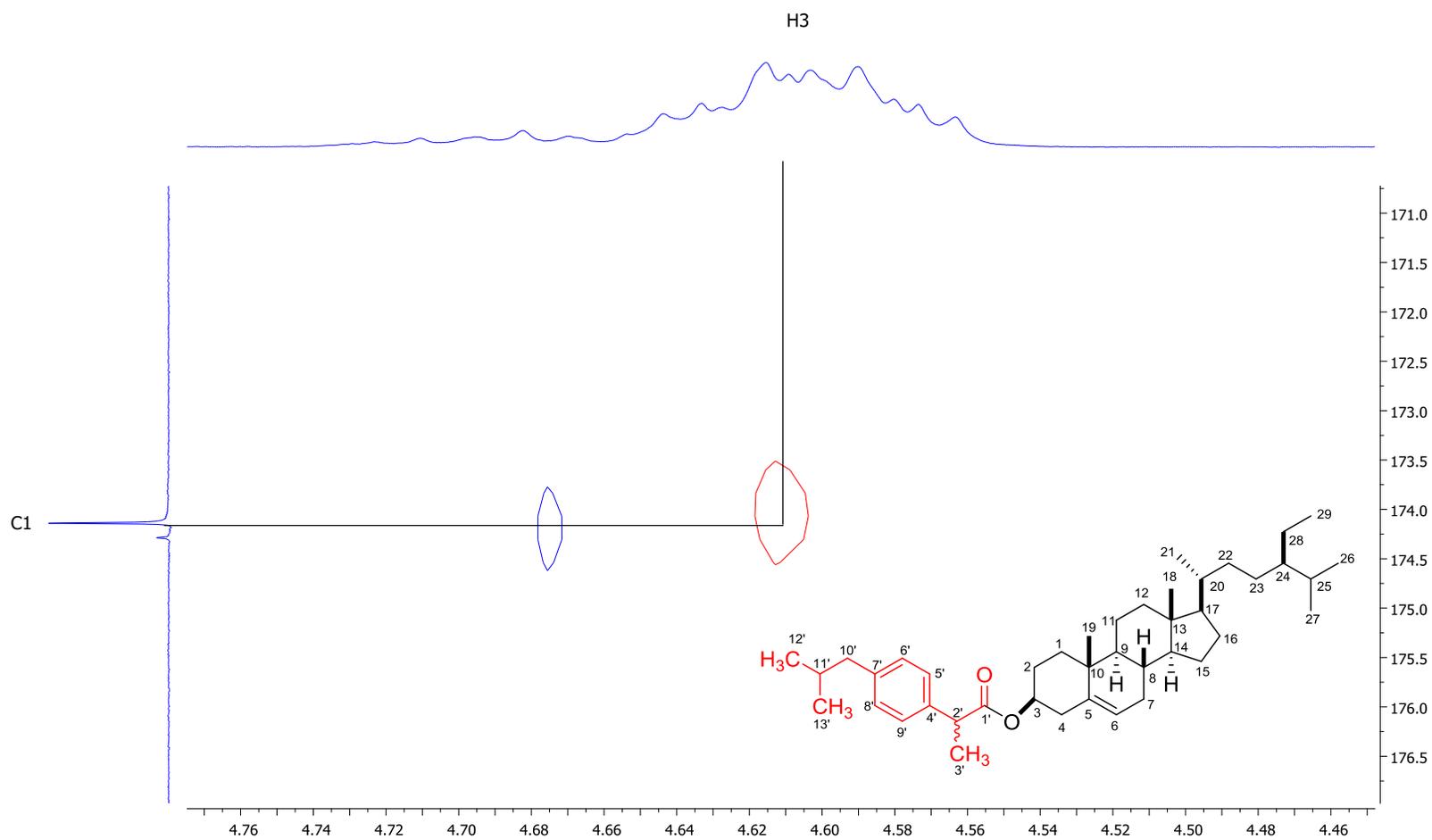


Figura 5.20. Parte del espectro HMBC en CDCl_3 de ibuprofenato de β -sitosterilo. Correlación entre H-3 y C-1'.

5.3.1 Efecto analgésico del ibuprofenato de β -sitosterilo

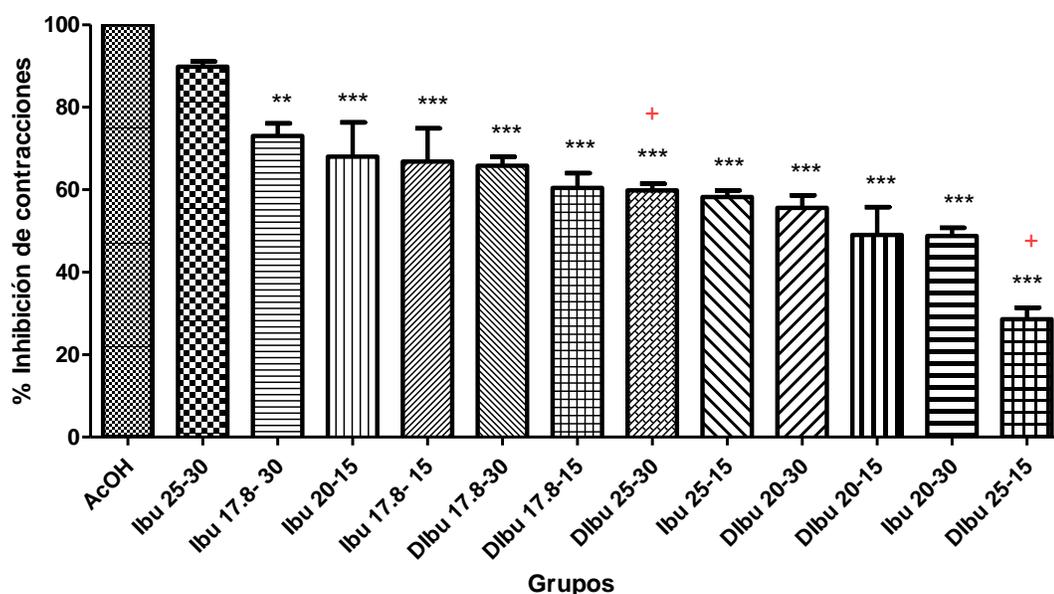
Los experimentos realizados se basaron en la Guía de Estándares Éticos para la Investigación Experimental del dolor en los animales⁴¹, y en la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado animal(NOM-62).⁴² Se hicieron esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales y para reducir el número de animales utilizados. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética para el Cuidado Animal, el cuál mediante normas establece y procura el cuidado y el menor sufrimiento en los animales de experimentación. El método utilizado para evaluar el efecto antinociceptivo es el llamado *Writhing test*, o prueba de contracciones abdominales. Los ratones macho CD1⁺ de 30-35 g de peso fueron obtenidos del Bioterio del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Estado de Hidalgo.



Figura 5.21. Izquierda, suspensiones de los compuestos a evaluar. Derecha, ratón CD¹⁺ utilizado en la experimentación.

Las dosis probadas fueron 25, 20, 17.8, 10 y 31.6 mg/kg de peso, se probaron también dos tiempos de acción basados en la hipótesis de que la naturaleza química del β -sitosterol permite una mayor biodisponibilidad del fármaco, es decir, podría mejorar las propiedades de transporte del ibuprofeno. Las observaciones se muestran en las tablas 5.5 y 5.6.

Los resultados fueron descritos como la media más menos el error estándar ($X \pm SE$) y se consideró un valor $p \leq 0.05$ como significativo. La comparación de más de dos grupos se realizó con un análisis de varianza (ANOVA) y la significancia estadística se determinó con la prueba de Tukey. Los análisis se realizaron con el programa SigmaStat versión 3.0 (Systat Software Inc, 2008)



** Diferencia significativa con un error de 0.01%. ***Diferencia significativa con un error de 0.001%.
+ Grupos del ibuprofenato de β -sitosterilo que presentan diferencia significativa con respecto a la correspondiente dosis de ibuprofeno.

Figura 5.22. Porcentaje de inhibición de contracciones abdominales para los diferentes tratamientos.

En la Figura 5.22 se observa cada uno de los grupos de estudio de acuerdo a las dosis administradas y los tiempos de acción después de administrados los compuestos. Los datos se expresan en porcentaje de inhibición de contracciones abdominales. Puede observarse que el 100% corresponde al grupo administrado únicamente con el agente irritante. El resto de los grupos corresponden a Ibuprofeno en cada una de las dosis y a las respectivas para ibuprofenato de β -sitosterilo. La disminución de las contracciones se muestra para todos los grupos pero es significativa en los grupos tratados con ibuprofenato de β -sitosterilo en dosis de 20 mg/kg a 15 minutos después de administrado, ibuprofeno 20 mg/kg a 30 minutos después de administrado, e ibuprofenato de β -sitosterilo 25 m/kg a 15 minutos después de administrado.

Tabla 5.5. Efecto del ibuprofenato de β -sitosterilo (Dibu) en la prueba de contracciones inducidas por ácido acético a los 15 minutos de la administración.

Tratamiento (dosis: mg/kg)	No. de contracciones \pm m	% inhibición
Vehículo	102 \pm 10.1	-
ibuprofeno (31.6)	49.0 \pm 11.9	51.70
ibuprofeno (25)	55.0 \pm 6.6	42.20
ibuprofeno (20)	69.6 \pm 19.8	32.03
ibuprofeno (17.8)	66.5 \pm 13.5	33.20
Dibu (25)	31.0 \pm 7.0 *	71.29
Dibu (20)	50.2 \pm 8.6 *	50.98
Dibu (17.8)	63.8 \pm 7.5	39.84
Dibu (10)	85.0 \pm 4.1	16.66

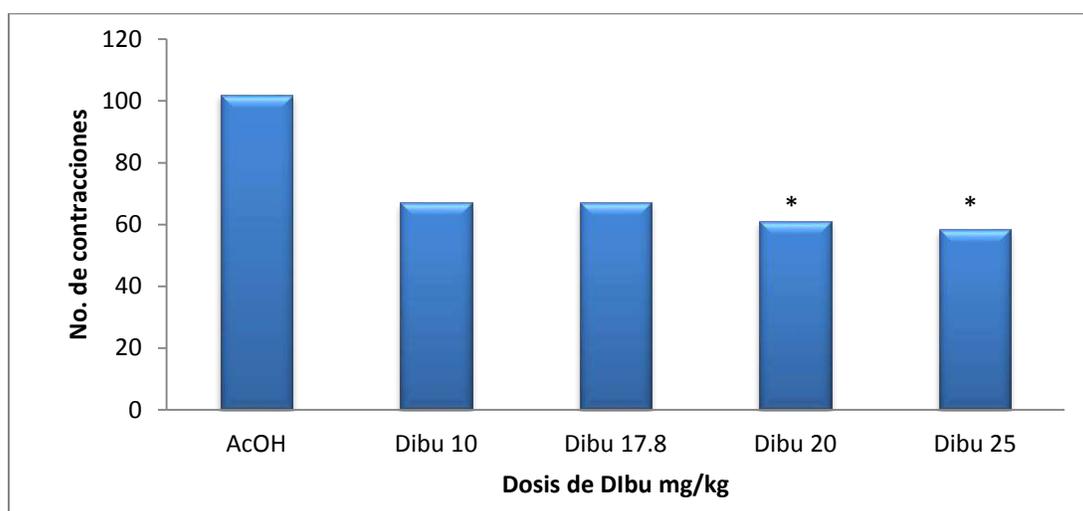
*Diferencia significativa respecto al ibuprofeno.

Tabla 5.6 Efecto del ibuprofenato de β -sitosterilo (Dibu) en la prueba de contracciones inducidas por ácido acético a los 30 minutos de administración..

Tratamiento (dosis: mg/kg)	No. de contracciones \pm m	% inhibición
Vehículo	102 \pm 10.1	-
ibuprofeno (31.6)	26.0 \pm 3.7	74.70
ibuprofeno (25)	91.8 \pm 2.7	10.35
ibuprofeno (20)	49.8 \pm 4.3	51.37
ibuprofeno (17.8)	75.0 \pm 7.9	26.76
Dibu (25)	58.4 \pm 4.0*	40.43
Dibu (20)	61.0 \pm 7.1	44.53
Dibu (17.8)	67.4 \pm 5.3	34.18
Dibu (10)	67.0 \pm 4.0	44.44

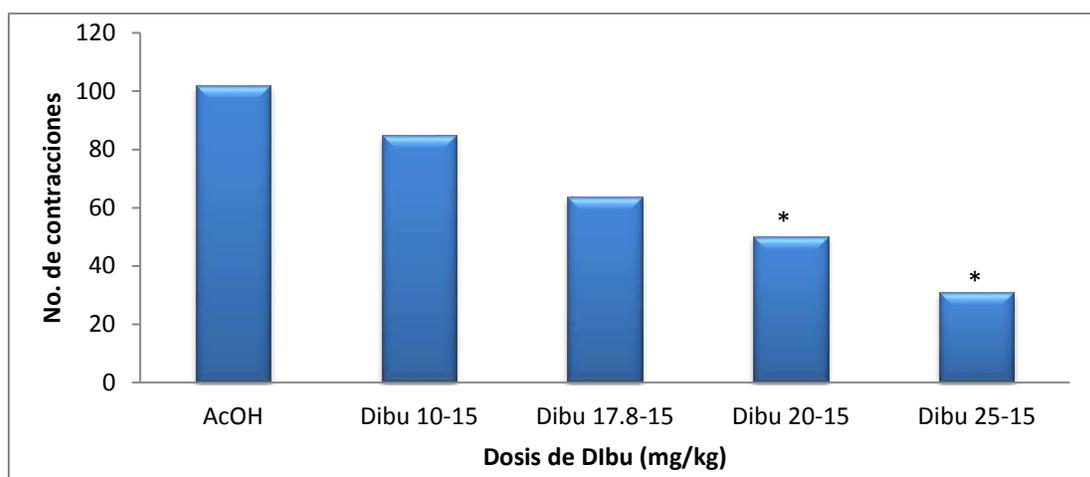
Los ratones tratados con ácido acético mostraron un comportamiento de contracciones abdominales mismo que fue significativamente reducido por el ibuprofenato de β -sitosterilo.

Los resultados obtenidos muestran una disminución en las contracciones abdominales que va desde un 16% para el caso de ibuprofenato de β -sitosterilo en dosis de 10 mg/kg de peso, hasta un 71% para el caso del ibuprofenato de β -sitosterilo en dosis de 25 mg/kg después de 15 min de su administración siendo éste el mejor resultado (Figuras 5.23 y 5.24).



* Indica una diferencia significativa frente al grupo tratado con AcOH.

Figura 5.23. Número de contracciones abdominales mostradas en los grupos tratados con Dibu a 30 minutos después de administrado el agente irritante.



* Indica una diferencia significativa frente al grupo tratado con AcOH.

Figura 5.24. Número de contracciones abdominales mostradas en los grupos tratados con Dibu a 15 minutos después de administrado el agente irritante.

El número de contracciones obtenido (Figura 5.23) para cada uno de los grupos de estudio fue comparado con el obtenido para el grupo control, el cual fue administrado únicamente con el agente irritante (ácido acético), también fueron comparadas con el control positivo, el cual se administró únicamente con ibuprofeno.

El gráfico que se muestra en la Figura 5.25 describe el comportamiento de los individuos al ser tratados con el ibuprofenato de β -sitosterilo en la dosis con mejor respuesta antinociceptiva, comparado con el correspondiente al control negativo, puede observarse que existe una disminución considerable en el número de contracciones en cada uno de los lapsos de tiempo. Lo cual se traduce en una disminución considerable del dolor.

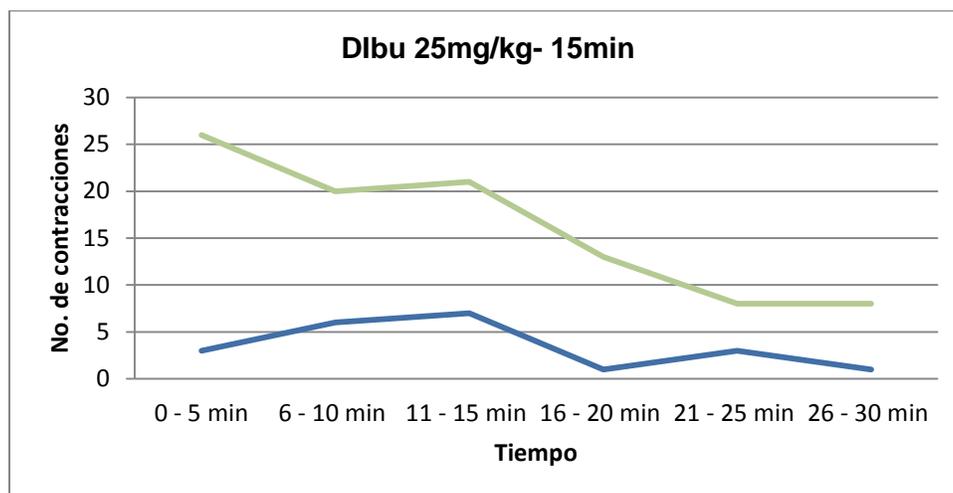


Figura 5.25. Comportamiento del grupo tratado con ibuprofenato de β -sitosterilo 25mg/kg.

El ibuprofenato de β -sitosterilo redujo las contracciones abdominales de manera dependiente de la dosis, este comportamiento puede observarse principalmente en los grupos tratados con ibuprofenato de β -sitosterilo a los 15 minutos de administrado el agente irritante (Figura 5.24). Además, puede observarse que la dosis más efectiva fue 25 mg/kg, la cual presenta una disminución en el número de contracciones observadas que va de 100 a 31 contracciones en 30 minutos de observación.

Cabe resaltar que el ibuprofenato de β -sitosterilo se evaluó a las mismas dosis que el ibuprofeno libre libre, pero que el éster tiene un peso molecular casi tres veces mayor que el ibuprofeno. Es decir, que para lograr el mismo efecto, la

cantidad de ibuprofeno en forma de éster que se incorpora en el organismo es 3 veces menor. Más aún, el éster tiene un tiempo de respuesta menor (15 minutos) que el ibuprofeno (30 minutos), lo cual se traduce en una mejor eficacia del éster.

Aunado a lo anterior, es predecible que si se está incorporando tres veces menos dosis del ibuprofeno en el organismo, disminuirán sus efectos adversos conocidos, entre ellos el daño gástrico.

Por otro lado, es importante mencionar que la incorporación de β -sitosterol en el organismo no produce daños conocidos, sino al contrario, es benéfico para la salud de las personas, entre otras cosas ayuda a disminuir el colesterol en sangre previniendo de problemas de arterioesclerosis.

Finalmente, cabe plantearse la pregunta ¿Por qué el ibuprofenato de β -sitosterilo mejoró las propiedades antinociceptivas del ibuprofeno libre en el modelo empleado? Una posible respuesta es que, al unirse el ibuprofeno al β -sitosterol, un esteroide vegetal que posee una estructura química muy semejante al colesterol, y que éste último forma parte de las membranas celulares de los animales, el éster es fácilmente transportado al interior de la célula. Una vez dentro de la célula, éste podría hidrolizarse para liberar ibuprofeno y ejercer su efecto. Esta hipótesis tendría que ser comprobada con otros estudios biológicos, como la farmacocinética, que comprende la adsorción, distribución, metabolismo y eliminación del compuesto.

6. Conclusiones

Se llevó a cabo un estudio químico de *Mimosa aculeaticarpa* var. *biuncifera* y de *Achyropappus anthemoides*. Los extractos de la parte aérea y raíces de *M. aculeaticarpa* var. *biuncifera* contienen principalmente (+)-pinitol, galato de metilo, escualeno, β -sitosterol y estigmasterol. Además, en menor proporción cafeoato de metilo, taxifolina, quercetina y lupeol. Los metabolitos se caracterizaron mediante sus propiedades físicas y espectroscópicas, además por comparación con datos descritos.

La infusión de *A. anthemoides* contiene principalmente el *p*-hidroxibenzaldehído, el cual es uno de los componentes principales y responsable del agradable olor a vainilla. Su caracterización se llevó a cabo mediante sus propiedades espectroscópicas.

El presente trabajo complementa el aislamiento y la caracterización de los principales metabolitos de las especies y contribuye al conocimiento sobre la composición química de estos géneros. Dada la actividad biológica conocida de los compuestos identificados, esta investigación también valida el uso tradicional de las plantas estudiadas.

En adición, se preparó el éster ibuprofenato de β -sitosterilo y se evaluó su actividad analgésica en un modelo de ratón, la cual se comparó contra el

ibuprofeno libre. El éster superó el efecto antinociceptivo del ibuprofeno y alcanzó su mejor resultado a los 15 minutos contra 30 minutos del ibuprofeno libre. En adición, y comparando los pesos moleculares del éster y del ibuprofeno, la cantidad de ibuprofeno en forma de éster (unido al β -sitosterol) que se incorpora al organismo es cerca de tres veces menor para lograr el mismo efecto, con lo cual se podría suponer la disminución de los efectos colaterales del compuesto con respecto del ibuprofeno.

7. Parte experimental

7.1. Generalidades

Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo empleando gel de sílice 60, Merk, 0.04-0.063 mm (Aldrich, 2300-400 mesh ASTM) en columnas de vidrio de 5, 2 y 1 cm de diámetro interno por 40 y 60 cm de largo, utilizando la técnica de cromatografía rápida.⁴² La separación mediante cromatografía en placa fina se realizó en cromatofolios de gel de sílice sobre aluminio de 1 x 5 cm y 2 x 5 cm, usando como revelador sulfato cérico amoniacal. Las rotaciones ópticas se determinaron en CHCl_3 en un polarímetro Perkin Elmer 341. Los espectros de ^1H (400 MHz) y de ^{13}C (100 MHz), así como los experimentos en dos dimensiones COSY, HSQC y HMBC se determinaron en un equipo Varian 400, usando como disolventes CDCl_3 , MeOH-d_4 o D_2O y como referencia interna TMS. Los datos de IR se determinaron en CHCl_3 en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 2000 FT-IR. Las pruebas de Writhing test, se llevaron a cabo en las instalaciones del Bioterio de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, dichas pruebas fueron realizadas apegadas a las técnicas descritas.

7.2. Muestra Vegetal



Mimosa aculeaticarpa var. *biuncifera* (Benth.) Barneby (Fabaceae-Mimosoideae) se colectó en el mes de junio del 2013 en la comunidad “El nopalillo”, el municipio de Epazoyucan, en el estado de Hidalgo, México.

Un ejemplar de la especie está depositado (JM Torres-Valencia 18) en el Herbario del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Mineral de la Reforma, Hidalgo, donde el Prof. Manuel González Ledesma identificó el material vegetal.



Achyropappus anthemoides (H.B.K.) A. Gray se colectó en la localidad de Santo Tomás, municipio de Zempoala, Hidalgo, en octubre de 2014. Un ejemplar de la especie está depositado (JM Torres-Valencia 149)

en el Herbario del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo La especie, Mineral de la Reforma, Hidalgo, donde el Prof. Manuel González Ledesma identificó el material vegetal.

7.3. Obtención de extractos

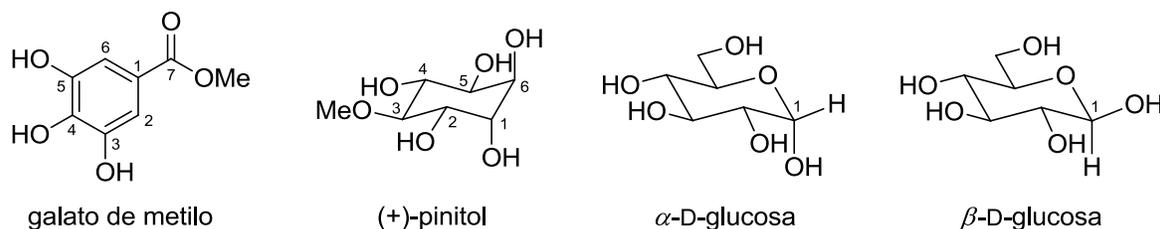
Las hojas (310 g) secas y molidas de *M. aculeaticarpa* var. *biuncifera* se extrajeron con MeOH (2 L) mediante reflujo por 6 h, filtrado y concentrado en rotavapor para obtener el extracto correspondiente (12 g). Por su parte, las raíces secas y molidas (625g) se extrajeron de manera secuencial mediante reflujo con hexano (3L), AcOEt (3 L) y MeOH (3 L), filtrado y concentrado. Los residuos de hexano y AcOEt se desengrasaron con MeOH caliente→frio. El proceso anterior permitió obtener los extractos de hexano (3.44 g), de AcOEt (9.67 g), y MeOH (120 g).

La parte aérea de *A. antemoides* (120 g) se sometió a infusión (1.5L de H₂O destilada) por 15 minutos, se filtró y la solución se extrajo con AcOEt. La parte de AcOEt se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró en el rotavapor, generando un residuo de 5 g.

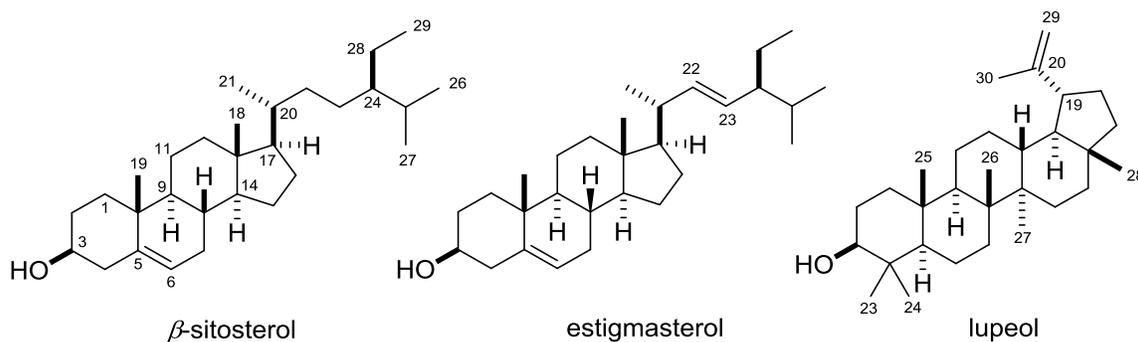
7.4. Aislamiento y Caracterización de compuestos

El extracto MeOH de las hojas de *M. aculeaticarpa* var. *biuncifera* se particionó con AcOEt, *n*-BuOH y H₂O y las partes se analizaron por RMN de ¹H. En la de AcOEt se evidenció la presencia galato de metilo, sustancias grasas y restos de compuestos aromáticos, en la parte *n*-BuOH, nuevamente se apreciaron ácidos

grasos y galato de metilo, mientras que en la parte acuosa fue clara la presencia del (+)-pinitol, α -D-glucosa y β -D-glucosa.



El extracto hexánico de las raíces (1 g) se sometió a CC empleando hexano–AcOEt (4:1, 450 mL). Se colectaron fracciones de 20mL que se analizaron por CCF y RMN de ^1H para obtener las fracciones A (eluatos 1–4), B (5–7), C (8–12), y D (13–22). En la fracción A (225 mg) se observaron sustancias grasas, en la fracción B se obtuvo el lupeol (10 mg), en la fracción C (310 mg) se identificó una mezcla de β -sitosterol y estigmasterol, mientras que en la fracción D (115 mg) se apreciaron sustancias grasas con trazas de triterpenos.



El extracto de AcOEt de las raíces se sometió al mismo procedimiento descrito para el extracto hexánico de las raíces, empleando hexano–AcOEt (3:2). Este

procedimiento condujo nuevamente a mezclas de ácidos grasos además de β -sitosterol y estigmasterol (250 mg). Por su parte el análisis por RMN de ^1H del extracto MeOH de las raíces evidenció la presencia de polisacáridos y sustancias grasas por lo que no se continuó con su estudio.

(+)-Pinitol: Sólido amorfo blanco, p.f: 178–180 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 70.6$ (*c* 1.7, H_2O). RMN de ^1H (400 MHz, D_2O): 3.98 (2H, m, H-1, 6), 3.79 (1H, dd, $J = 10.0, 2.9$ Hz, H-2), 3.74 (1H, dd, $J = 10.0, 2.9$ Hz, H-5), 3.63 (1H, t, $J = 10.0$ Hz, H-4), 3.57 (3H, s, MeO), 3.32 ppm (1H, t, $J = 10.0$ Hz, H-3). RMN de ^{13}C (100 MHz, D_2O): 82.9 (C-3), 72.3 (C-4), 71.8 (C-1), 71.6 (C-6), 70.7 (C-5), 70.0 (C-2), 59.9 (MeO).

Galato de metilo: Sólido amorfo café claro, p.f: 187–190 °C, RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6): 7.00 (2H, s, H-2,6), 3.80 ppm (3H, s, MeO). RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6): 166.6 (C-7), 145.1 (C-3,5), 137.9 (C-4), 119.8 (C-1), 108.9 (C-2,6), 51.4 ppm (MeO).

β -Sitosterol y estigmasterol: Sólido amorfo blanco, p.f: 138–140 °C. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): 5.35 (2H, d a, $J = 5.5$ Hz, H-6), 5.14 (1H, dd, $J = 15.0, 8.4$ Hz, H-22), 5.01 (1H, dd, $J = 15.0, 8.8$ Hz, H-23), 3.53 (2H, sept, $J = 4.8$ Hz, H-3), 1.01 (s, Me-19), 0.92 (d, $J = 7.1$ Hz, Me-21), 0.85 (s, Me-29), 0.80 (d, $J = 7.0$ Hz, Me-26, 27), 0.70 ppm (s, Me-18). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 140.8 (C-5), 138.0 (C-22), 129.2 (C-23), 121.8 (C-6), 71.9 ppm (C-3). MS (EI, 70 eV) m/z (%) **2:** 414 (M^+) (50), 381 (40), 329 (38), 303 (35), 273 (24), 213 (43), 173 (25), 145 (80), 121 (62),

95 (82), 55 (100); **3**: 412 (M^+) (15), 379 (5), 351 (5), 300 (15), 271 (16), 255 (18), 213 (10), 173 (15), 145 (25%), 95 (38), 83 (70), 55 (100).

Lupeol: Sólido amorfo blanco, p.f: 209–212 °C. RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$): 4.68 (1H, sa, H-29a), 4.57 (1H, sa, H-29b), 3.19 (1H, dd, $J = 11.0, 4.8$ Hz, H-3), 3.38 (1H, td, $J = 10.0, 5.8$ Hz, H-19), 1.68 (3H, s, Me-30), 1.03 (3H, s, Me-28), 0.97 (3H, s, Me-27), 0.94 (3H, s, Me-26), 0.83 (3H, s, Me-25), 0.79 (3H, s, Me-24), 0.76 ppm (3H, s, Me-23). RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): 151.2 (C-20), 109.4 (C-29), 79.1 (C-3), 55.4 (C-5), 19.4 (C-30), 18.4 (C-28), 16.2 (C-25), 16.0 (C-26), 15.4 (C-24), 14.6 ppm (C-27).

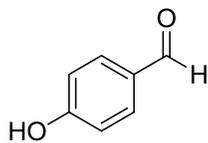
7.4.1. Extracto AcOEt de la infusión de *A. anthemoides*.

El extracto de la infusión (0.5 g), se impregnó con gel de sílice y se sometió a CC empleando una columna de vidrio de 5 cm de diámetro interno, gel de sílice (6 pulgadas) y como eluyente una mezcla de hexano–AcOEt (2:3), se obtuvieron 20 eluatos de 20 mL que se agruparon en base a su relación de frente en las fracciones A (eluatos 3-6), B (eluato 9), C (eluatos 12-14).

El análisis por RMN de 1H reveló sustancias interesantes en la fracción A, misma que se llevó a una nueva separación cromatográfica.

La fracción A se sometió a CC en una columna de 1 cm de diámetro interno, gel de sílice (6 pulgadas) y como eluyente una mezcla de hexano–AcOEt (2:3), se obtuvieron 16 fracciones de 10 mL, las cuales se agruparon en base a su relación

de frente de la siguiente manera, fracción A (eluito 1), fracción B (2–6), fracción C (7–16).



p-hidroxibenzaldehído

***p*-Hidroxibenzaldehído.** El análisis por RMN de ^1H y de ^{13}C en 1D y 2D de la fracción B permitió la identificación del compuesto *p*-hidroxibenzaldehído. Sus datos espectroscópicos se presentan en la Tabla 5.5.

7.5 Obtención del ibuprofeno

El ibuprofeno se obtuvo mediante extracción de las tabletas comerciales de la marca Pharma life, (Figura 7), y la extracción consistió en triturar las tabletas, el polvo obtenido se vertió en 100 mL de H_2O destilada y se le ajustó el pH a 5. Posteriormente, se extrajo con AcOEt y esta fase se dejó evaporar a temperatura ambiente, para obtener cristales blancos que fueron analizados por RMN de ^1H y de ^{13}C , corroborando que se trataba del ibuprofeno en forma pura (Figura 5.16).

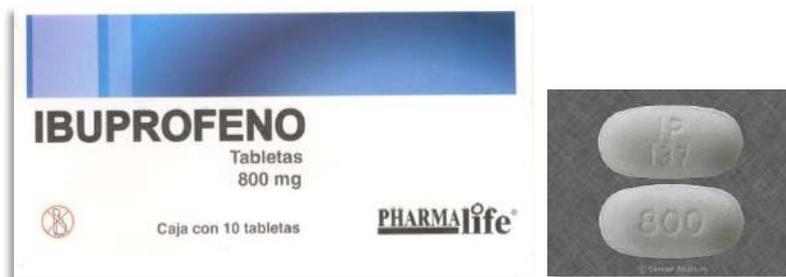
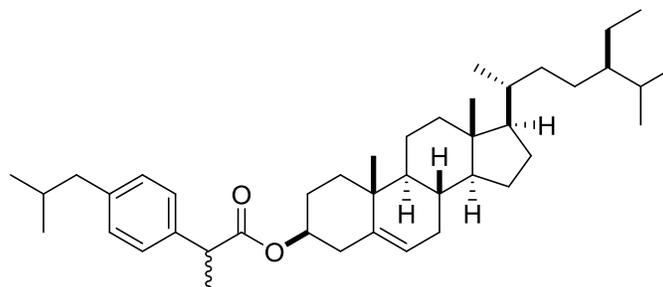


Figura 7. Tabletas utilizadas para la extracción de ibuprofeno.

7.6. Obtención del ibuprofenato de β -sitosterilo

Mediante una reacción de esterificación entre el ibuprofeno extraído de las tabletas comerciales y el β -sitosterol adquirido de ALDRICH, se obtuvo el éster ibuprofenato de β -sitosterilo. La reacción consistió en colocar ibuprofeno (0.5 g) y β -sitosterol (1 g) en una solución 1.0 M de diciclohexilcarbodiimida (DCC) en CH_2Cl_2 (20 mL) y cantidades catalíticas de 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (DAMP). La mezcla de reacción se dejó durante 24 h. a 30 °C, con agitación magnética, se filtró, se evaporó el disolvente y el producto se sometió a CC, usando gel de sílice y mezclas de hexano- CH_2Cl_2 (1:1). Se obtuvo el producto de esterificación en la fracción A con un rendimiento del 74%.



Ibuprofenato de β -sitosterilo

Ibuprofenato de β -sitosterilo. El análisis de RMN en una y dos dimensiones de la fracción A permitió identificar al producto de esterificación. Se obtuvo un compuesto con consistencia cerosa de color blanco (0.5 g), el cual mostró un $[\alpha]_D^{20} - 12.5$ (c 0.2, CHCl_3), y p. f. 71.3–73 °C.

7.7. Solubilidad del ibuprofenato de β -sitosterilo

La prueba de solubilidad se inició con Twin 80, se colocaron 7.5 mg del ibuprofenato de β -sitosterilo (Dibu) derivado en 1 mL de agua y se agregaron dos gotas de TWIN 80, sin embargo no se observó solubilidad del compuesto aun aumentando la cantidad del detergente. Como segunda prueba se utilizó DMSO, que aunque no es muy recomendable en pruebas biológicas, se utiliza en casos de escasa solubilidad por parte de los compuestos a probar. Para esta prueba se mezcló 7.5 mg del Dibu, 1 mL de agua y 0.5 mL de DMSO, pero no se observó solubilidad. En la siguiente prueba se utilizó carboximetilcelulosa, esta sólo es efectiva, cuando se mezcla con el Dibu antes de agregar el agua. Finalmente se probó SPAN 20, colocando 0.2 mL (dos gotas) del detergente a 7.5 mg del Dibu. Una vez mezclados, se agregó 1 mL de agua y se llevó a un baño ultrasónico por 6 minutos posteriormente se adicionó 1 mL más de agua. Lo anterior permitió obtener una suspensión apropiada para su administración intragástrica en ratones.

8. Referencias

1. Dewick P.M. *Medicinal Natural Products* 3° Ed. Editorial John Wiley & Son, U.K. **2009**, pp. 7-12.
2. Gutiérrez Ravelo A., Estévez Braun A. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat.* **2009**, *103*. 409-419.
3. Izaguirre P.; Beyhaut R., *Bol. Soc. Argent. Bot.* **2009**, *44*, 351–352.
4. Cabrera-Miranda, C. Estudio químico de las hojas y tallos de *Mimosa aculeaticarpa* var. *biuncifera* (Benth). Tesis de licenciatura, Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 2006.
5. Minoru U., Yamamura S. *Tetrahedron Letters*.**1999**, *40*, 2981-2984.
6. Domínguez XA., García S., Williams HJ., Ortiz C., Scott AI., Reibenspies JH. *J Nat Prod* **1989** *52*: 864–867.
7. Englert J., Weniger B., Lobstein A., Anton R., Krempp E., Guillaume D., Leroy Y. *J Nat Prod* **1995**. *58*: 1265–1269.
8. Pérez BE, Villavicencio MA, Ramírez A. **2003**. Lista de plantas útiles del estado de Hidalgo. Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del estado de Hidalgo, México, pp. 39, 72.
9. Camargo-Ricalde SL., García-García V. **2001**. El género *Mimosa* L. (Fabaceae) y la restauración ecológica. *Contactos* 39: 34–42.
10. Camargo-Ricalde SL., Dhillion SS. *Rev Biol Trop* **2004**. *52*: 845–851

11. Pavón NP., Ballato-Santos J., Pérez-Pérez C. *Rev Mex Biodiversidad* **2011**. 82: 653–661.
12. <http://www.etatpur.es/index.php/mimosa-tenuiflora-ficha-produce>.
13. González-Hernández, M. Y. Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de cuatro plantas del género *Stevia* y cuatro plantas del género *Mimosa*. Tesis de licenciatura, Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 2004.
14. Villarreal Q. J. A. *Flora del Bajío y de Regiones adyacentes*. Fascículo 140, **2006**.
15. Weingärther O., Böhn M., Olrich L. *Eu. Heart J.*, **2009**, 30, 404-409.
16. Zhao Y., Chang S., Qu G., Li T., and Cui H. J. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 5211–5218.
17. Sudhamalla B., Gokara M., Ahalawat N., Amooru D.G., Subramanyam R. *J. Phys. Chem. B.* **2010**, 114, 9054–9062.
18. Jong A., Plat J., Mensik R.P. *Journal of Nutritional Biochemistry.* **2003**. 14. 362-369.
19. Rochfort S., Panozzo J. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 7981–7994.
20. García Barreno., P. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat.* **2008**. 102, 91-159.
21. Domínguez Nieto., Rentella Dehesa A., Velázquez Rodríguez J.R. *R.E.B.* **2009**.28, 125-131.
22. Meek I.L., Van Laar M., Vonkeman E.H. *Pharmaceuticals.* **2010**. 3, 2146-2162.
23. Bejarano P. F., *EMB (Ed. Esp.)*. **2006**. 5. 39-42.

24. Cheng K.W., Nie T., Ouyang N., Alston N., Wong C.C., Mattheolabakis G., Papayannis I., Huang L., Rigas B. *International Journal of Pharmaceutics*. **2014**
25. Le Bars D., Gozariu M., W.Cadden. *Pharmacol Rev*, **2001**, 53, 597- 96.
26. OMS, 2015.
27. Ventaka Sai Prakash C., Prakash I. *Res. J. Pharmaceutical Sci.* **2012**. 1. 23-27.
28. Gawade S.P. *J Pharmacol Pharmacother.* **2012** 3 (4). 348.
29. *Applied NMR Spectroscopy for Chemists and Life Scientists*, First Edition. Oliver Zerbe and Simon Jurt. **2014**.
30. Villaseñor IM., Angelada J., Canlas AP., Echegoyen D. *Phytother Res* **2002**. 16: 417–421.
31. Gallo MBC., Sarachine MJ. *Int J Biomed Pharm Sci* 3 **2009**. (Special Issue I): 46–66.
32. Chaubal R., Pawar PV., Hebbalkar GD., Tungikar VB., Puranik VG., Deshpande VH., Deshpande NR. *Chem Biodiversity* **2005**. 2 684–688.
33. Ekaprasada MT., Nurdin H, Ibrahim S., Dachriyanus. *Indo J Chem* **2009**. 9: 457–460.
34. Bailey AE., Asplund RO., Ali MS. *J Nat Prod* **1986**. 49: 1149–1150
35. Chen H-z., Chen Y-b., Lv Y-p., Zeng F., Zhang J., Zhou Y-l., Li H-b., Chen L-f., Zhou B-j., Gao J-r., Xia C-n. *Bioorg Med Chem Lett* **2014** 24: 4367–4371
36. Xia C-n., Li H-b., Liu F., Hu W-x. *Bioorg Med Chem Lett* **2008** 18: 6553–6557
37. Webb M., Ebeler SE. *Biochem J* **2004** 384: 527–541

38. Das B., Yeger H., Baruchel H., Freedman MH., Koren G., Baruche S. *Eur J Cancer* **2003** 39: 2556–2565.
39. Muller N., Payan E., Lopicque F., Bannwarth B., Netter P. *Fundam Clin Pharmacol*, **1990**, 4, 617-34.
40. Koizumi N., Fujimoto Y., Takeshita T., Ikekawa N. *Chem. Pharm. Bull.* **1979**, 29, 38-42.
41. Zimmermann, M. *Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain.* **1983**; 16, 109–110.
42. NOM, **1999**. Norma Oficial Mexicana para el uso y manejo animal. (NOM-062- ZOO-1999).
43. Still W. C., Kahn M., Mitra A., *J. Org. Chem.* **1978**. 43. 2923–2925.
44. Ueda M.; Yamamura, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 30, 1400–1414.
45. Bianchini, F.; Carrara A.P. *Guía de Plantas y Flores. Grijalbo*, **1974**, pp. 524–530.
46. Domínguez X.A., García S., Williams H., Ortíz C., Scott A., and Reibenspies. *J. Nat. Prod.* **1989**, 52, 864–867.
47. Jian Y., Haag-Berrurie., Antón R. *J. Nat. Prod.* **1991**, 54, 1247–1253.
48. Lara O. y Marquez A. *Plantas Medicinales de México. Composición, usos y actividad biológica. UNAM, 1ª edición, México*, **1996**, 99.
49. Englert J., Weniger B., Lobtein A., Anton R., Krempp E., Guillaume D. and Leroy Y. *J. Nat. Prod.* **1995**, 58, 1265–1269.
50. Remaund G. S., Martin Y., Martin G. G., Martin G. J. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 859–866.

51. Bhattacharya A., Murphy D. *Organic Process Research & Development*. **2003**, 7, 717–722.
52. Adcox C., Boyd L., Oehrl L., Allen J., and Fenner G. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 2090–2095.
53. Mayer JM., Bartolucci C., Maitre JM., Testa B. *Xenobiotica*. **1988**, 18, 533-43.
54. Knihinicki RD., Williams KM., Day RO. *Biochem Pharmacol.* **1989**, 38, 4389-95.
55. Knihinicki RD., Williams KM., Day RO. *Biochem Pharmacol.* **1991**, 42, 1905-11.
56. Wright J. L. C., McInnes A. G., Shimizu S., Smith D. G., Walter J. A. *Can. J. Chem.* **1978**, 56, 1898.
57. Kamboj A., Saluja A.K. *Int. J. Pharm Pharm Sci*, **2011**, 3, 94-96.
58. Bushara R., Aslam. *Oman Medical Journal*. **2010**, 25, 155-161.
59. Landoni M.F., Soraci A., *Current Drug Metabolism*, **2001**, 2, 37-51.
60. Miettinen Tatu A., Gylling H. *The American Journal of Cardiology* **2005**, 96.
61. Nestel P., Cehum M., Pomeroy S., Abbey M., Weldon G. *European Journal of Clinical Nutrition* **2001**, 55, 1084-1090.
62. Orlando B.J., Lucido M.J., Malkowski M.G. *Journal of structural Biology*, **2015**, 189, 62-66.
63. Jong A., Plat J., Mensink R.P., *Journal of Nutritional Biochemistry*, **2003**, 362-369.
64. Hoi-Kei L., Dongyang L., Jusko J.W. *Crit Rev. Biomed. Eng.* **2012**; 40, 295-312.

65. Fujimura T., Ohta T., Oyama K., Miyashita T., Miwa K. *World J.Gastroenterol.* **2006**, *12*, 1336-1345.
66. Mehta N., Aggarwal S., Thareja S., Malla P., Misra M., Bhardwaj T.R., Kumar M. *international Journal of ChemTech Research* **2010**, *2*, 233-238.
67. Bushra R., Aslam N. *Oman Medical Journal.* **2010**, *25*, 155-161.
68. Viegas A., Manso J., Corvo M.C., Marques M.M.B., Cabrita E.J. *J.Med. Chem.*, **2011**, *54*, 8555-8562.
69. González-Lorena M., Cilla A., Gracia-Llatas G., Barbera R., Lagarda M.J. *Journal Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 4725-4734.
70. Ventaka Sai Prakash C., Prakash. *International Current Pharmaceutical Journal.* **2012**. *1(9)*. 239-242.