

**“Aislamiento de *Nor*-triterpenos Bioactivos de una Población de
Galphimia glauca Cav. (Malpighiaceae) Colectada en Tepoztlán,
Morelos”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

Q.F.B ELEAZAR LEON ALVAREZ

DIRIGIDO POR:

DRA. MARÍA LUISA VILLARREAL ORTEGA (TUTOR)

DR. ALEXANDRE T. CARDOSO TAKETA (CO TUTOR)

ÍNDICE

CAPITULO I.....	1
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1. Plantas medicinales en México	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Distribución de <i>G. glauca</i>	3
2.1.1 Clasificación botánica	3
2.1.2 Morfología.....	3
2.2 Usos etnobotánicos de <i>G. glauca</i>	4
2.3 Metabolitos secundarios.....	4
2.3 Estudios clínicos de <i>G. glauca</i>	4
2.4 Estudios farmacológicos de <i>G. glauca</i>	5
2.5 Estudios fitoquímicos de <i>G. glauca</i>	6
2.6 Estudios biotecnológicos de <i>G. glauca</i>	7
2.7 Estudios metabolómicos de <i>G. glauca</i>	9
2.8 Estudios moleculares de <i>G. glauca</i>	10
2.9 Estudios toxicológicos de <i>G. glauca</i>	11
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
IV. JUSTIFICACIÓN	13
V. HIPÓTESIS	14
VI. OBJETIVOS	15
4.1 Objetivo General	15
4.2 Objetivos Específicos.....	15
VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	16
CAPITULO II	17
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	18
8. 1Material vegetal.....	18
8.2 Preparación del extracto crudo de <i>Galphimia glauca</i>	18
8.3 Cromatografía en Capa Fina (CCF)	19
8.4 Cromatografía en Columna Abierta (CCA)	19
8.5 Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN- ¹ H).....	19
8.6 Espectrometría de Masas (MS)	20

9. ENSAYOS FARMACOLÓGICOS DE <i>G. GLAUCA</i>	20
9.1 Evaluación de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> de <i>G. glauca</i>	20
9.1.1 Método de Griess	21
9.1.2 Diseño experimental.....	21
9.2 Evaluación de la actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> de <i>G. glauca</i>	21
9.2.1 Diseño experimental.....	22
CAPITULO III.....	23
AISLAMIENTO, ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS DE <i>G. glauca</i>	23
XL. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
9.1 Material vegetal.....	23
9.1.2 Resultados de cromatografía de columna abierta.....	23
9.1.3 Cromatoplasas de CCF de los compuestos ELA-1 y ELA-2.	26
9.2 Elucidación estructural.....	27
9.2.1 Análisis espectral de RMN para la caracterización química estructural del compuesto ELA-1.....	28
9.2.2 Análisis espectral de RMN para la caracterización química estructural del compuesto ELA-2.....	33
CAPITULO IV.....	36
ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE <i>G. glauca</i>	36
9.3 Resultados de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> de los compuestos ELA-1 y ELA-2.....	36
.....	36
9.4 Resultados de la actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> en TPA de los compuesto ELA-1 y ELA-2. 38	
A continuación se muestran los resultados obtenidos del potencial antiinflamatorio del extracto MeOH de hojas de <i>G. glauca</i> , los compuestos ELA-1 y ELA-2 <i>in vivo</i> en TPA.	38
XI. CONCLUSIÓN.....	41
XI. PERSPECTIVAS	42
XII. BIBLIOGRAFÍA	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Compuestos activos producidos por <i>G. glauca</i>	6
Cuadro 2. Datos generales de especies de <i>Galphimia glauca</i>	18
Cuadro 3. Rendimiento de extractos vegetales.	23
Cuadro 4 Rendimiento de los compuestos ELA-1 y ELA-2	23
Cuadro 5. Determinación de tipo de carbono mediante DEPT.	29
Cuadro 6. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C para los Compuestos 1-2 (los valores de J en Hz).....	34
Cuadro 7. Actividad antiinflamatoria de <i>Galphimia glauca</i>	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de <i>Galphimia glauca</i> (A) hojas, (B) flores.....	3
Figura 2. Estructura química de los <i>nor</i> -secotriterpenos (galfiminas) de <i>G. glauca</i> R1 y R2 – radicales del anillo B correspondientes a cada galfimina; Δx – posición del doble enlace del anillo E.....	8
Figura 3. Estructura química de las glaucacetalinas (A-D)	9
Figura 4. Actividad antiinflamatoria de siete poblaciones colectadas de <i>G. glauca</i> del perfil metabólico realizado por Sharma <i>et al.</i> , (2012).	10
Figura 5. Árbol filogenético de siete poblaciones colectadas de la República Mexicana de <i>G. glauca</i> basadas en secuencias de matK, correlacionado con el perfil químico de CFC de los extractos metanólicos de <i>G. glauca</i> (Sharma <i>et al.</i> , 2012)	11
Figura 6. Reacción química producida en la detección de nitritos por el método de Griess. Cuando se agrega el ácido sulfanílico, los nitritos forman una sal de diazonio y al agregar la α -naftilamina, se desarrolla un color rosado formando un cromóforo.	21
Figura 7. Diseño experimental para evaluar el efecto del extracto metanólico y los compuestos ELA-1 y ELA-2 en la inflamación aguda inducida por TPA.	22
Figura 8. Cromatoplaque de HPTLC (CAMAG) en los carriles se visualiza el extracto MeOH (EM) de las hojas, extracto MeOH de tallos, compuestos ELA-1, ELA-2 de <i>G. glauca</i> . Fase móvil CHCl_3 : AcOEt (1:4), revelado con vainillina; H_2SO_4	23
Figura 9. Diagrama de aislamiento de los compuestos ELA-1 Y ELA-2 en hojas de <i>G. glauca</i>	24
Figura 10. Diagrama de aislamiento de los compuestos ELA-1 y ELA-2 en tallos de <i>G. glauca</i>	25
Figura 11. Cromatoplaques de CCF, (A) corresponde fracciones de primarias de CCA y (B, C, D, E, F, G) fracciones con el compuesto ELA-1 aislados de las hojas de <i>G. glauca</i> por CCA, utilizando la fase móvil CHCl_3 : AcOEt (1:4), revelado con vainillina; H_2SO_4	26
Figura 12. Cromatoplaques de CCF, (A, B y C) corresponde a fracciones con el compuesto ELA-1 de CCA aislados en tallos de <i>G. glauca</i> , utilizando la fase móvil CHCl_3 : AcOEt (1:4), revelado con vainillina; H_2SO_4 ..	26
Figura 13. Cromatoplaques de CCF (A, B, C, D y E) corresponde las fracciones de CCA del compuesto ELA-2 aislados en hojas de <i>G. glauca</i> , utilizando la fase móvil CHCl_3 : AcOEt (1:4), revelado con vainillina; H_2SO_4 .	26
Figura 14. Experimentos de RMN bidimensionales utilizados en la elucidación estructural de triterpenos.	27
Figura 15. Espectro de RMN- ^1H del compuesto ELA-1a 500 MHz en CDCl_3	29
Figura 16. Espectro de RMN- ^{13}C a 500 MHz del compuesto ELA-1. (A) Espectro totalmente desacoplado, (B) DEPT 135, (C) DEPT 90.....	29
Figura 17. Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto ELA-1a 500 MHz en CDCl_3	30
Figura 18. Sub-espectro DEPT 135 del compuesto ELA-1 a 500 MHz en CDCl_3	30
Figura 19. Sub-espectro DEPT 90 del compuesto ELA-1 a 500 MHz en CDCl_3	31
Figura 20. Espectro bidimensional HSQC del compuesto ELA-1	32
Figura 21. Espectro bidimensional HSQC del compuesto ELA-1.....	32
Figura 22. Espectro bidimensional HMBC del compuesto ELA-1	33
Figura 23. Espectro de RMN- ^1H del compuesto ELA-2 A 500 MHz en CDCl_3	33

Figura 24. Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto ELA-2 a 125 MHz en CDCl ₃ .	34
Figura 25. Estructura del compuesto ELA-1.	35
Figura 26. Estructura del compuesto ELA-2 reportada como Galfimidina.	36
Figura 27. Graficas de la actividad antiinflamatoria del extracto MeOH de las hojas de <i>G. glauca</i> , compuestos ELA-1, ELA-2 y aminoguanidina (+) a [] de (A) 25, (B) 50, (C) 75 y (D) 100 µg/mL en la prueba de inflamación inducida por LPS, para la inhibición iONS con una P<0.05.	37
Figura 28. Grafica de comparación de la actividad antiinflamatoria del extracto MeOH de las hojas de <i>G. glauca</i> , compuestos ELA-1, ELA-2 y aminoguanidina (+) con una P<0.05.	37
Figura 29. Efecto del extracto MeOH de <i>G. glauca</i> y del compuesto ELA-2 en la prueba de inflamación inducida por TPA. A) Porcentaje de actividad antiinflamatoria, ANOVA de una vía seguida de una prueba de Dunnett con respecto al Veh * P<0.05, y B) Concentración inhibitoria 50 (CI ₅₀). Cada punto representa n=4-6.	40
Figura 30. Gráficas del efecto de los compuestos (a ELA-1 y (b ELA-2 en la prueba de inflamación inducida por TPA. A) porcentaje de actividad antiinflamatoria, ANOVA de una vía seguida de una prueba de Dunnett con respecto al Veh * P<0.05, y B) Concentración inhibitoria 50 (CI ₅₀), cada punto representa n=6-8 para ELA-1, para ELA-2 n=4-6.	40
Figura 31. Curvas de concentración respuesta (CCR) del extracto y compuestos de <i>G. glauca</i> .	41

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AcOEt	Acetato de etilo
CHCl ₃	Cloroformo
CLAE	Cromatografía en Líquida de Alta Eficiencia
CCF	Cromatografía en Capa Fina
DE ₅₀	Efecto dosis al 50 %
FAB	Bombardeo rápido de átomos
E _{max}	Efecto máximo de la respuesta farmacológica
g	Gramos
μL	Microlitros
Mg	Miligramos
MHz	Megahertz
m/z	Relación masa- carga
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
MeOH	Metanol
MS	Espectrometría en Masas
MC	Cuernavaca, Morelos
MM	Miacatlán, Morelos
MT	Tepoztlán, Morelos
MS	San Andrés de la Cal, Morelos
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
PS	Peso seco
CT	Tuxtla Gutiérrez, Chiapas
GM	Dr. Mora Guanajuato
JG	Guadalajara, Jalisco
QJ	Jalpan, Querétaro
TPA	13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol

RESUMEN

El uso de la especie *Galphimia glauca* (Cav.) Kuntze en la medicina tradicional Mexicana reviste de gran interés por su empleo como sedante y calmante nervioso, por lo que en estudios fitoquímicos, farmacológicos y del perfil metabólico de *G. glauca* colectadas en diferentes estados del país han llevado al descubrimiento de metabolitos activos como las galfiminas con propiedades sedante y ansiolítica, demostrando que el contenido de metabolitos secundarios varía de acuerdo a la zona de colecta y en este estudio, también se observaron compuestos que revelan una coloración azul usando vainillina-H₂SO₄ en cromatografía en capa fina (CCF) en tres poblaciones colectadas en los estados de Morelos y Guadalajara (Sharma *et al.*, 2012). Estos compuestos no habían sido identificados, por lo que como objetivo del presente trabajo se planteó la purificación y caracterización estructural química de estos metabolitos presentes en individuos de *G. glauca* colectados en Tepoztlán, Morelos.

Se implementó la técnica de maceración para preparar los extractos Hexánico, AcOEt y MeOH de las diferentes partes de *G. glauca* (tallos y hojas). Posteriormente los extractos crudos extraídos se fraccionaron en diferentes cromatografías en columna abierta (CCA) hasta obtener los compuestos purificados, los cuales fueron denominados ELA-1 y ELA-2. Se obtuvieron los espectros 1D de Resonancia Magnética Nuclear de ¹H y ¹³C así como sus técnicas de correlaciones 2D de los compuestos lo que permitió la elucidación sus estructuras químicas, indicando que se trata de dos *nor*-triterpenos ELA-1(C₃₀H₄₈O₆) es un compuesto nuevo y ELA-2 (C₃₄H₅₁O₆) es reportada como galfimidina, el cual se le asignaron la aposición

Se evaluó la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico de las hojas de *G. glauca* y los compuestos ELA-1 y ELA-2 *in vitro* en macrófagos murinos RAW 274.7 para realizar la detección indirecta de óxido nítrico (ON), el extracto metanólico de las hojas de *G. glauca* presentó una IC₅₀ de 44.89 µg/mL mientras que los compuestos ELA-1 y ELA-2 presentaron una mejor actividad antiinflamatoria ELA-1 y ELA-2 con una IC₅₀ de 18.92 y 16.67 µg/mL respectivamente. Para poder completar el estudio de la actividad antiinflamatoria se realizó el ensayo *in vivo* en edema auricular de ratones CD1 inducido por TPA, en donde el extracto metanólico presentó una IC₅₀ de 2.03 mg/g oreja y los compuestos ELA-1 y ELA-2 mostraron IC₅₀ de 1.91 y 1.42 mg/g oreja respectivamente, los cuales presentaron actividad antiinflamatoria.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

I. Plantas medicinales en México

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define como planta medicinal todo vegetal que contiene sustancias que pueden ser usadas con finalidades terapéuticas o que son precursores de síntesis química de nuevos medicamentos (Schlaepfer & Mendoza-Espinoza, 2010). Se estima que el 80% de la población de países en vías de desarrollo utilizan la medicina tradicional para la atención primaria de sus problemas de salud (OMS, 2004).

México ocupa el cuarto lugar entre los países considerados con gran diversidad biológica y tiene el 10 % del total de las especies conocidas, con un gran número de endemismos. A nivel mundial, con respecto al número de especies de plantas, ocupa el quinto lugar, y se estiman que alrededor de 7,000 especies poseen algún tipo de uso. Se han identificado y registrado 4,000 especies con propiedades medicinales que representan el 15 % de la flora total mundial (Schlaepfer & Mendoza-Espinoza, 2010). Entre 3,500 a 4,000 plantas medicinales son empleadas por la población mexicana; 3,600 se recolectan de forma silvestre; 1,500 son utilizadas regularmente sin procesar; 370 se cultivan en el huerto familiar o de manera comercial, en cuanto a la validación química, farmacológica y biomédica sólo se ha llevado a cabo en un 5% de las especies; esto marca un campo de estudio importante (Sarukhán *et al.*, 2009, Schlaepfer & Mendoza-Espinoza, 2010).

En México el uso de plantas medicinales en comunidades indígenas juega un papel importante en la solución de un número considerable de problemas inmediatos a la salud (Magaña *et al.*, 2010).

La especie *Galphimia glauca* (Cav.) Kuntze es una planta medicinal endémica de México que es empleada como sedante y calmante nervioso (Estrada, 1985). Diversos estudios fitoquímicos y farmacológicos realizados en esta especie han llevado al descubrimiento de metabolitos activos de gran interés por sus propiedades sedante y ansiolítica, que han sido

denominados como galfiminas (Cardoso-Taketa *et al.*,2004). Sin embargo, en el estudio realizado por Sharma *et al.* (2012), se demostró que los individuos de *G. glauca* que crecen en el estado de Morelos no contienen galfiminas, pero presentan otros compuestos cuya naturaleza química no había sido determinada. El presente trabajo se planteó el aislamiento y purificación de los compuestos desconocidos que están presentes en *G. glauca* colectadas en el municipio de Tepoztlán, a través de métodos cromatográficos tales como: cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía en columna abierta (CCA). Así como elucidar la estructura química de dichos compuestos por Resonancia Magnética Nuclear de protones, carbono-13 (RMN-¹H y ¹³C), con sus modalidades bidimensionales y Espectrometría de Masas (MS). También se realizaron pruebas farmacológicas de la actividad antiinflamatoria con el fin de conocer la actividad biológica de los compuestos aislados.

II. ANTECEDENTES

2.1 Distribución de *G. glauca*

El género Neotropical *Galphimia* (Cav). (Malpighiaceae) comprende 26 especies de grandes hierbas y arbustos de hábitat secos. La mayoría de las especies se encuentran en México, una de las cuales se extiende a Texas y al norte de Nicaragua, pero cuatro están restringidas a América del Sur, al sur de la Cuenca del Amazonas. En la literatura se observa cierta confusión taxonómica por la interpretación errónea de los taxa descritos con los nombres de los géneros *Galphimia* Cav. y *Thryallis* L. El uso incorrecto de diversos nombres a los especímenes de *G. gracilis* por otra parte, la similitud morfológica exterior de las especies y las inflorescencias observadas han provocado que todos los especímenes de México se nombren como *G. glauca* o *G. gracilis* (Anderson, 2007).

2.1.1 Clasificación botánica

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Malpighiales
Familia	Malpighiaceae
Género	<i>Galphimia</i>
Especie	<i>Galphimia glauca</i> Cav.



Figura 1. Morfología de *Galphimia glauca* (A) hojas, (B) flores

2.1.2 Morfología

El género *Galphimia* se caracteriza por tener flores con pétalos amarillos (a menudo impregnados con rojo) se encuentra en racimos, dispuestos en panículas; en ocho especies los pétalos son persistentes en la fruta (Anderson, 2007) como se muestra en la figura 1. La especie *Galphimia glauca* (Cav.) Kuntze es conocida popularmente como “lluvia de oro”, “hierba de hormiga”, “palo de muerto”, “flor de chinche” y “palo de San Vicente” “Calderona amarilla”. En México se distribuye esta especie en altitudes de 0 a 2,350

m.s.n.m. y crecen a una altura de 1 a 3 m (Rzedowski & Equihua, 1987, Estrada, 1985).

2.2 Usos etnobotánicos de *G. glauca*

La especie *Galphimia glauca* ha sido empleada en la medicina tradicional para tratar la fiebre y escalofríos. Durante el periodo colonial Francisco Hernández describió otros usos medicinales de *G. glauca*, para el dolor de posparto, la diarrea, la indigestión disentería y funciona como laxante para heridas (Hernández, 1959). En el estado de Morelos es usada como tratamiento para la candidiasis vaginal (Martínez, 1969). Se le atribuye la actividad sedante y calmante nervioso (Estrada 1985; 1990). Otro uso medicinal es para el tratamiento del asma, alergias y la malaria (Díaz, 1976). Por otro lado, es empleada para el tratamiento de enfermedades del corazón (Linares *et al.*, 1994).

2.3 Metabolitos secundarios

El metabolismo secundario se puede definir como la biosíntesis, la transformación y la degradación de compuestos endógenos mediante proteínas de especialización. En general, puede afirmarse que los metabolitos secundarios constituyen el mundo de señales químicas a través del cual las plantas se relacionan con su entorno (Azacón-Bieto & Talón, 2008).

Los metabolitos secundarios se agrupan en cuatro grupos; el primer grupo lo conforma los terpenos, en los que se encuentran las hormonas, pigmentos o aceites esenciales. El segundo grupo son los compuestos fenólicos conformado por las cumarinas, flavonoides, lignina y taninos. El tercer grupo son los glucósidos que lo conforman las saponinas, glucósidos cardiacos, glucósidos cianogénicos, glucosinolatos, y por último están los alcaloides, que son sustancias orgánicas nitrogenadas de origen vegetal (Azacón-Bieto & Talón, 2008).

Los metabolitos secundarios presentan propiedades biológicas que tienen aplicación en medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otras (Ávalos *et al.*, 2009).

2.3 Estudios clínicos de *G. glauca*

Los estudios realizados por Wiesenauer & Gaus (1985) demostraron las propiedades farmacológicas de *G. glauca* en estudios clínicos en humanos contra la fiebre del heno, utilizando extractos hidroalcohólicos. Wiesenauer & Lüdtke (1995) realizaron un ensayo

clínico doble ciego, controlado con placebo y aleatorización en 164 pacientes con polinosis, demostrando la efectividad de *G. glauca* D4 como tratamiento. Herrera-Arellano *et al.*, (2007) realizaron otro estudio clínico en 152 pacientes con problemas de ansiedad, donde se demostró la efectividad de *G. glauca* para el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central.

2.4 Estudios farmacológicos de *G. glauca*

Con especímenes de *G. glauca* colectadas en el estado de Guanajuato, se realizaron extractos acuosos de hojas y flores, demostrando su actividad para el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central (Estrada, 1985). Dorsch & Wagner (1991) realizaron un estudio farmacológico, empleando extractos etanólicos y metanólicos en cobayos mostrando las propiedades antialérgicas de esta especie.

Estudios realizados por Tortoriello & Lozoya (1992), utilizando extractos metanólicos de tallos y flores de *G. glauca* colectadas en Guanajuato, demostraron la actividad sedante y anticonvulsiva. Otros estudios reportan que fracción de acetato de etilo de las partes aéreas de *G. glauca* se analizó para determinar la broncoconstricción inducida por antígenos y varios agonistas en las tráqueas de cobayos. La fracción orgánica inhibió actúa significativamente la respuesta contráctil a la ovoalbúmina en tráqueas de cobayos sensibilizadas, e inhibió de manera significativa y selectiva la broncoconstricción inducida por el leucotrieno D₄ (LTD₄) (Campos *et al.*, 2001).

Existen otros compuestos de *G. glauca* responsables de la actividad sedante, que son una familia *nor*-secotriterpenos, designadas como galfiminas B (GB) y (GE) 6-acetixogalfimina-B (Osuna *et al.*, 1999). Además, en 2004 se reportaron otras galfiminas, haciendo un total de nueve *nor*-secofriedelanos con actividades sedantes y ansiolíticas denominadas galfiminas (A-I), aislados del extracto metanólico de partes aéreas de *G. glauca* como se muestra en la figura 2 (Cardoso-Taketa *et al.*, 2004). Otro estudio demostraron el efecto ansiolítico y antidepresivo de las galfiminas B, A y E en ensayos neurofarmacológicos Herrera-Ruiz *et al.*,(2006).

2.5 Estudios fitoquímicos de *G. glauca*

Estudios fitoquímicos de diferentes extractos de *Galphimia glauca* han permitido la identificación de diversos metabolitos secundarios con actividad biológica como los que se señalan en la tabla 1.

Cuadro 1. Compuestos activos producidos por *G. glauca*

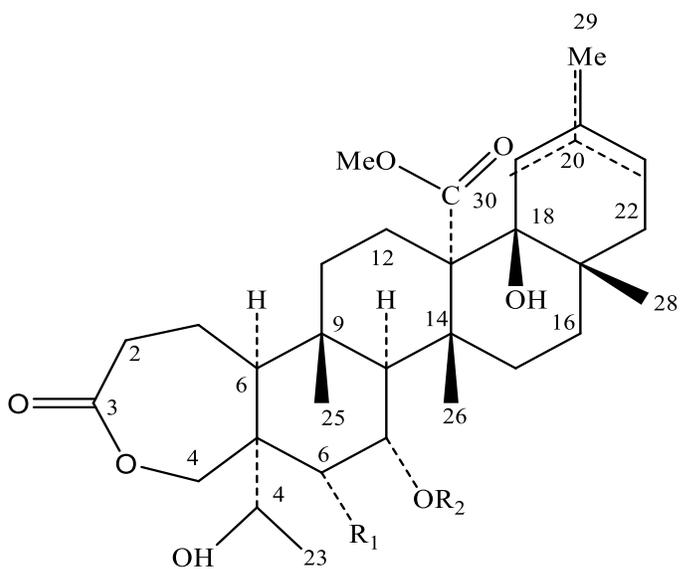
Compuestos	Parte vegetal o cultivo de <i>G. glauca</i>	Actividad biológica	Autores
Ácido gálico, quercetina y metil galato	Extracto MeOH y etanólico de las partes aéreas	Alergias y reacciones bronquiales	Dorsch <i>et al.</i> , 1992
Ácido elágico, ácido quínico y ácido tetragaloilquínico	Extracto hidroalcoholico de las partes aéreas	Antiasmático y reacciones alérgicas	Neszmelyi <i>et al.</i> , 1993 Dorsch <i>et al.</i> , 1992
Aciflavonoides	Extracto MeOH de las partes aéreas	Hiperactividad bronquial	Müller <i>et al.</i> , 1993
Derivados de ácido gálico	Extracto etanolico	Alergias y obstrucción bronquial	Müller <i>et al.</i> , 1993
Polifenoles	Extracto MeOH de las partes aéreas	Inhibidor hemolisis	Müller <i>et al.</i> , 1998
Galfimina B(GB)	Extracto MeOH de las partes aéreas	Depresora de neuronas de área ventral en ratas	Tortoriello <i>et al.</i> , 1998 Tortoriello <i>et al.</i> , 1993 Toscano <i>et al.</i> , 1993
Galfina A, B, C y galfimidina	Extracto MeOH de tallos y flores	Actividad como antiprotozoarios y citotóxica	Camacho <i>et al.</i> , 2002
Galfimina B (GB) y 6-acetoxigalfimina-B	Cultivo celular de callos	Actividad sedante	Osuna <i>et al.</i> , 1998
<i>nor</i> -secofriedelanos, galfiminas (A-I)	Extracto MeOH de las partes aéreas	Actividades sedante y ansiolítica	Cardoso-Taketa <i>et al.</i> , 2004

Galfiminas A,B y E	Extracto MeOH de las partes aéreas	Actividad ansiolítica y antidepresiva	Herrera-Ruiz <i>et al.</i> ,2006
Glaucacetalinas A, B, C (<i>nor</i> -friedelano)	Cultivo de raíces transformadas	Actividad sedante	Nader <i>et al.</i> ,2004
Ácido maslínico y 6-acetoxigalfimina-B (GE)	Cultivo de raíces transformada	Actividad Sedante	Nader <i>et al.</i> ,2006
Glaucacetalina D (<i>nor</i> -friedelano)	Cultivo de células transformadas en suspensión	Actividad sedante	Ortíz <i>et al.</i> , 2010

2.6 Estudios biotecnológicos de *G. glauca*

Osuna *et al.*, (1999) realizaron estudios en cultivos celulares de callos de *G. glauca*, para la producción de triterpenos como las galfiminas B (GB) con actividad sedativa, obteniendo un rendimiento de 0.23 mg/g PS. Se reportó un nuevo compuesto activo nombrado 6-acetoxigalfimina-B, con un rendimiento de 0.12 mg/g PS. Posteriormente se realizaron cultivos *in vitro* en células en suspensión en dos fases de *G. glauca* mostrando la presencia de galfiminas B con un rendimiento de 0.15 mg/g PS y en la segunda fase 0.21 mg/g de PS, presentando un incremento del 36 % en relación a la primera fase (Osuna *et al.*, 2002).

Nader *et al.*(2004) establecieron un sistema de cultivo de raíces transformadas que permitió la producción de compuestos bioactivos novedosos de tipo *nor*-friedelano conocidas como glaucacetalinas A, B, C, con rendimientos de 2.06, 0.41, 0.16 mg/L de PS respectivamente. Se ha reportado en raíces pilosas compuestos como; ácido maslínico y 6-acetoxigalfimina-B con rendimientos de 0.43 y 0.10 mg/g de PS respectivamente (Nader *et al.*, 2006). La identificación de un nuevo compuesto con actividad sedante, de tipo *nor*-friedelano nombrada como glaucacetalina D, se reportó en células transformadas en suspensión de *G. glauca*, como se muestra en la figura 3 (Ortiz *et al.*, 2010).



$\Delta^{20(21)}$	R ₁	R ₂
B	H	H
E	OA _c	H
A	OH	H
$\Delta^{20(29)}$		
F	H	H
G	OA _c	H
H	OH	H
I	OH	Ac
Δ^{19}		
C	H	H

Figura 2. Estructura química de los *nor*-secotriterpenos (galfiminas) de *G. glauca* R1 y R2 – radicales del anillo B correspondientes a cada galfimina; Δx – posición del doble enlace del anillo E.

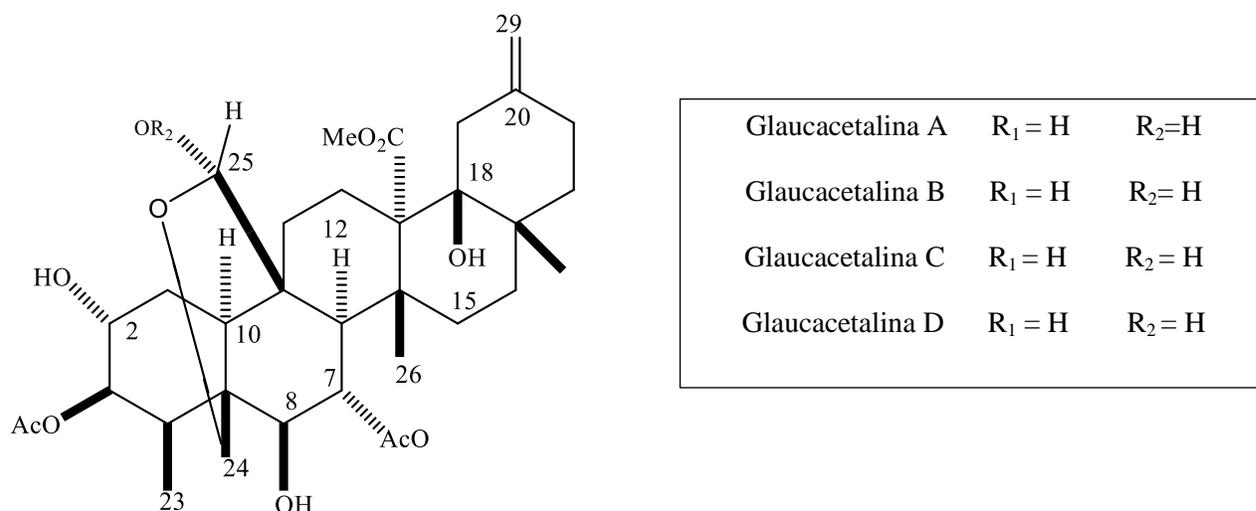


Figura 3. Estructura química de las glaucacetalinas (A-D)

2.7 Estudios metabólicos de *G. glauca*

Cardoso-Taketa *et al.* (2008) realizaron un estudio en el que propusieron el perfil metabólico de *G. glauca*, colectada en seis localidades diferentes de la República Mexicana; Doctor Mora, Guanajuato (GM), Guadalajara, Jalisco (JG), Cuernavaca, Morelos (MC), Tepoztlán, Morelos (MT), San Andrés de la Cal, Morelos (MS) y Jalpa de Serra, Querétaro (QJ), utilizaron registros de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN-¹H), análisis multivariados de datos y perfiles cromatográficos de CLAE de los extractos metanólicos de las hojas de *G. glauca*. Mostraron la presencia de galfiminas en las localidades de GM y QJ con rendimientos de 6.58 mg/g y 5.66 mg/g de PS respectivamente. Estos resultados están correlacionados con los resultados de los ensayos farmacológicos, porque solo estas localidades presentaron las actividades sedante y ansiolítica.

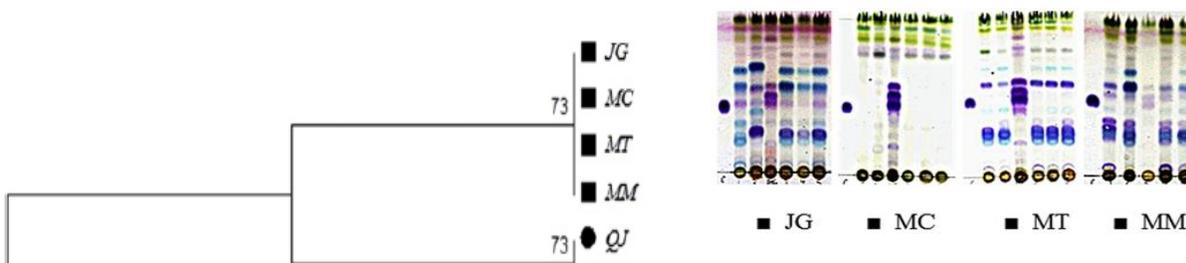
Sharma *et al.* (2012) realizaron un estudio comparativo del perfil metabólico de *G. glauca* del año 2005 y 2009 de cinco localidades ya estudiadas en el primer estudio; GM, JG, MC, MT y QJ incrementando dos nuevas localidades Tuxtla Gutiérrez, Chiapas (CT) y Miacatlán, Morelos (MM). Utilizando técnicas de análisis multivariado de datos, espectrometría de RMN-¹H y perfiles cromatográficos de CLAE del extracto MeOH de las hojas de *G. glauca*, mostraron que todas las poblaciones presentaron derivados de ácido

galoilquinico variando su concentración con respecto al primer estudio debido a los factores ambientales y solo las poblaciones de GM y QJ presentaron galfiminas 7.21y 6.19 mg/g de PS respectivamente, correlacionados con las actividades ansiolítica y sedante sienta estas las poblaciones activas. Con respecto a la actividad antiinflamatoria en TPA los resultados fueron similares para todas las localidades y no está asociada con la presencia de galfiminas como se observa en la figura 2.

Figura 4. Actividad antiinflamatoria de siete poblaciones colectadas de *G. glauca* del perfil metabólico realizado por Sharma *et al.*, (2012).

2.8 Estudios moleculares de *G. glauca*

Sharma *et al* (2012) realizaron técnicas moleculares como amplificación por PCR, purificación y secuenciación empleando marcadores moleculares como; *matK*, *rbcL* y *rpoC1* de ADN y perfiles cromatográficos de CCF en donde construyeron árboles filogenéticos de *Galphimia glauca* de siete poblaciones Tuxtla Gutiérrez, (CT), Doctor Mora (GM), Guadalajara (JG), Cuernavaca (MC), Tepoztlán (MT), Miacatlán (MM) y Jalpan de Serra (QJ) colectadas en la República Mexicana. En este análisis filogenético demostraron que las poblaciones se dividen en tres grupos: GM y QJ pertenecen a un grupo activo por la presencia de galfiminas, mientras que las poblaciones de MM, MT, MC y Jalisco son inactivas, pero presentan compuestos que revelan de color azul no identificados y la población de Chiapas muestra un perfil diferente como se muestra en la figura 5, esto nos indica que las siete poblaciones analizadas molecularmente no pertenecen a la misma especie de *Galphimia* si no a posiblemente a tres especies del género *Galphimia*, estos resultados están correlacionados con los perfiles químicos cromatográficos de CCF.



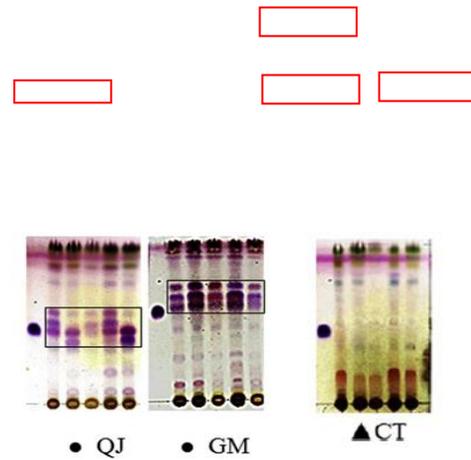


Figura 5. Árbol filogenético de siete poblaciones colectadas de la República Mexicana de *G. glauca* basadas en la secuencia de *matK*, correlacionado con el perfil químico de CCF de los extractos metanólicos de *G. glauca* (Sharma *et al.*, 2012)

2.9 Estudios toxicológicos de *G. glauca*

Aguilar-Santamaría *et al.* (2007) evaluaron la actividad toxicológica y citotóxica de los extractos acuoso, etanólico y metanólico de las hojas de *G. glauca* colectadas de campo experimental en Xochitepec, Morelos. Estandarizando el contenido de las galfiminas B, A y G las cuales no presentaron efectos citotóxicos en ratones utilizando las líneas celulares transformadas de KB (carcinoma de cérvix), UIISO (carcinoma de piel) y OVCAR-5 (carcinoma de ovario) todos los extractos inhibieron específicamente el cáncer de colon (HCT-15); estos estudios no mostraron un efecto genotóxico.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso de plantas medicinales en México es una práctica común, para el tratamiento de problemas de salud en un sector importante de la población, por lo que el estudio científico de esta flora reviste de gran interés. *Galphimia glauca* es una planta endémica de México, que se utiliza para tratar trastornos del sistema nervioso central y otros padecimientos. Diversos estudios fitoquímicos y farmacológicos han identificado compuestos bioactivos presentes en esta especie. Por otra parte, se han realizado estudios del perfil metabolómico de *G. glauca* de diferentes estados de la República Mexicana, demostrando que el contenido de metabolitos secundarios como las galfiminas varía de acuerdo a la zona de colecta. Mostrando que las actividades ansiolítica y sedativa de JG y QJ están relacionadas a la presencia de galfiminas. Sharma *et al.*, (2012) observaron compuestos que presentan una coloración azul en placas de Cromatografía en Capa Fina (CCF), en las siguientes poblaciones; Tepoztlán, Morelos (MT), Miacatlán, Morelos (MM) y Guadalajara, Jalisco (GJ). Estos compuestos no han sido identificados, por lo que en la presente propuesta se plantea la purificación y caracterización estructural química de estos metabolitos presentes en individuos de *G. glauca* colectadas en Tepoztlán, Morelos, así como el estudio de sus

actividades farmacológicas, para proponerla como tratamiento para ciertas enfermedades correlacionadas con las actividades reportadas en la literatura.

IV. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existe un gran interés a nivel internacional en el estudio científico de plantas medicinales, lo que permitirá aislar nuevas moléculas con actividad farmacológica y con el potencial para desarrollar agentes terapéuticos novedosos. Los estudios fitoquímicos y farmacológicos realizados en la especie *Galphimia glauca* han resultado en el aislamiento de principios biodinámicos novedosos con actividades sedante y ansiolítica de especímenes creciendo en los estados de Guanajuato y Querétaro, que corresponden a triterpenos denominados galfiminas. Los individuos de *G. glauca* que crecen en el estado de Morelos no contienen galfiminas, pero presentan otros compuestos cuya naturaleza química no ha sido determinada. Es importante realizar la caracterización química y farmacológica de estos compuestos, estudios anteriores de la actividad antiinflamatoria en TPA en ratones, mostraron que la población de Tepoztlán, Morelos presenta actividad antiinflamatoria, por lo que se plantea realizar esta actividad con los compuestos purificados.

V. HIPÓTESIS

La aplicación de métodos fitoquímicos de alta resolución permitirá aislar y caracterizar los principios biodinámicos presentes en individuos de *Galphimia glauca* Cav. (Malpighiaceae) colectadas en el municipio de Tepoztlán, estos compuestos purificados presentarán actividad antiinflamatoria en modelos *in vitro* utilizando macrófagos murinos e *in vivo* en el modelo edema auricular aguda inducida por TPA en ratones.

VI. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

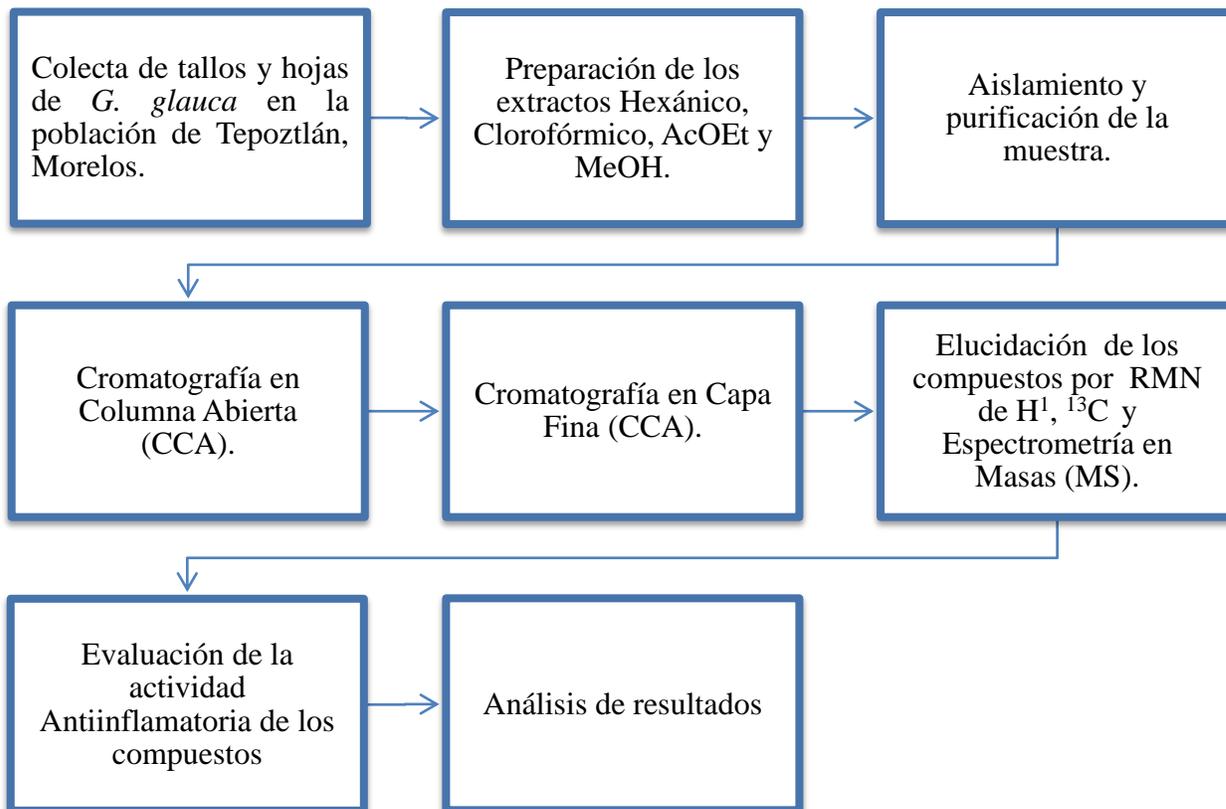
Determinar la estructura química y la actividad biológica de los metabolitos aislados presentes en individuos de *Galphimia glauca* colectadas en Tepoztlán, Morelos.

4.2 Objetivos Específicos

1. Aislar y purificar los compuestos bioactivos mediante Cromatografía en Capa Fina (CCF), Cromatografía de Columna Abierta (CCA).
2. Elucidar los compuestos mediante Resonancia Magnética Nuclear de protones y carbono-13 (RMN-¹H, C¹³), así como sus modalidades bidimensionales y Espectrometría de Masas (MS).
3. Realizar ensayos *in vitro* de la actividad antiinflamatoria de los compuestos purificados de *G. glauca* en macrófagos murinos de la línea celular RAW 274.7 *in vivo* en el modelo edema auricular agudo inducida por TPA en ratones CD1.

VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En el presente trabajo de investigación se plantea la siguiente estrategia experimental.



CAPITULO II

PARTE EXPERIMENTAL

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Material vegetal

La recolección de tallos y hojas de *Galphimia glauca* Kuntze se realizó dos veces en el mes de marzo y julio del 2017 en la población de Tepoztlán, Morelos. Las muestras se depositaron en el Herbario de la Universidad Autónoma de Morelos (HUMO) con número de referencia 37527 (Cuadro 2). La identificación fue realizada por parte del M. en C. Gabriel Flores Franco.

Cuadro 2. Datos generales de especies de *Galphimia glauca*.

Planta	No. de referencia	Fecha de recolecta	Posición	Altitud (m)
<i>G. glauca</i>	37527	8 de marzo de 2018	W 99° 1333' N 18°9667'	1800

Los tallos y las hojas de *G. glauca* obtenidas en las dos colectas, se secaron sobre papel estraza a temperatura ambiente de 22 °C durante dos semanas. Posteriormente, se pulverizaron con ayuda de un molino de mano. Se pesó el material vegetal de la primera colecta realizada en el mes de marzo de los tallos de *G. glauca*, obteniendo 150 g de PS. En la segunda colecta de las hojas de *G. glauca* en mes de julio, se obtuvieron 250 g de PS.

8.2 Preparación del extracto crudo de *Galphimia glauca*

Se utilizaron 100 g de la muestra pulverizada de los tallos de *G. glauca*, se maceró en 800 mL de MeOH (1:8) por 24 horas. Posteriormente se sónico la muestra por 15 minutos. Para poder filtrar la muestra se utilizó papel filtro de punto medio, con ayuda de una bomba de vacío se utilizó un rotavapor para separar el extracto del solvente a una temperatura de 40 °C a presión reducida, se emplea tres veces este procedimiento. Para evaporar el solvente, el extracto metanólico se colocó en una campana de extracción.

Se pesaron 250 g de la muestra pulverizada de las hojas de *G. glauca* y se empleó el procedimiento anteriormente descrito. Para obtener los extractos de las diferentes fracciones, se utilizaron solventes de polaridad creciente como; Hexano, Cloroformo, AcOEt y MeOH.

8.3 Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Para las muestras que se analizaron por cromatografía en capa fina (CCF), se pesaron 100 mg del material pulverizado, se colocaron en viales de 2 mL se agregó 1 mL de MeOH, la muestra se agitó por 2 minutos en vortex, posteriormente se sónico por 15 minutos y se centrifugó por 15 minutos a 13000 rpm, se retiró el sobrenadante en viales, se repitió este procedimiento cuatros veces, hasta obtener el extracto metanólico.

Se utilizaron placas de sílice grado analítico G/UV 254, 0.2 mm, en soporte y se emplearon la fase móvil CHCl₃: AcOEt (1:4 v/v ml).

La visualización de los compuestos en CCF se realizó con una lámpara de luz UV de longitud de onda corta y larga a 232 nm, porque los triterpenos aislados de *G. glauca*, en los trabajos citados anteriormente se observaron a esa longitud de onda. Las CCF se revelaron con vainillina; H₂SO₄ (1:10), debido a que es un revelador de fenoles. Posteriormente, las cromatoplasas se calentaron a 100 °C para finalizar el revelado.

8.4 Cromatografía en Columna Abierta (CCA)

El fraccionamiento del extracto metanólico de los tallos de *G. glauca*, se llevó a cabo mediante una columna abierta de dimensión 80 x 4 cm, la cual se empacó con 150 g de gel de sílice 60 de tamaño 53-110 µm. Primero fue necesario compactar la sílice con cloroformo, se inició la separación por gradiente de polaridad creciente utilizando la fase móvil CHCl₃: AcOEt (1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 v/v ml) se utilizaron 200 mL de cada proporción, se recolectaron las fracciones en viales de 20 mL. Cada fracción se analizó mediante Cromatografía en Capa Fina (CCF) para identificar los compuestos.

8.5 Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN-¹H).

La muestra obtenida a través del proceso de purificación se envió al Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) de la UAEM. Los espectros de RMN-¹H y ¹³C se obtuvieron en un aparato Bruker DMX-500, los cuales operaron a una frecuencia de 500 MHz para el registro de los espectros de RMN-¹H, y 125 MHz para los de RMN-¹³C.

8.6 Espectrometría de Masas (MS)

El registro para los espectros de masas se realizará mediante el bombardeo rápido de átomos (FAB) y en algunos casos, cuando se trate de una muestra volátil se empleará un cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard 5890 serie II al espectrómetro de masas modelo JEOL SX-102 A, utilizando la técnica de impacto electrónico (IE) para lograr la ionización.

9. ENSAYOS FARMACOLÓGICOS DE *G. GLAUCA*

9.1 Evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vitro* de *G. glauca*.

Siguiendo la metodología empleada por Flores-Vallejo (2017), se evaluó la actividad antiinflamatoria *in vitro* de *G. glauca* utilizando la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC®) estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) al determinar la producción de NO_2^- , como prueba indirecta de la inhibición de la NO sintasa inducible (iNOS); enzima que se activa durante procesos inflamatorios en células animales. La línea celular RAW 264.7 se cultivó en medio DMEM-F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO Inc., NY, USA) suplementado con suero fetal bovino (10%) y se incubó a 37 °C y 5% CO_2 . Las células crecieron en placas (Corning®) de 25 cm^2 con un inóculo inicial de 106 células, en un volumen de 5mL de medio de cultivo, el cambio de medio de cultivo se realizó cada dos días.

Después de 7-8 días de iniciado el cultivo celular se procedió a realizar el ensayo de actividad antiinflamatoria en placas (Falcon®) de 96 pozos. Las células (100 μL /pozo, 2×10^5 células/mL) fueron estimuladas con LPS (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para inducir la respuesta inflamatoria, e incubadas por 24 hrs. a 37 °C y 5% CO_2 . Se evaluaron cuatro concentraciones (100, 75, 50 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de los compuestos purificados y del extracto MeOH de las hojas de *G. glauca* con el objetivo de determinar si presentan o no actividad antiinflamatoria. Se utilizó como control positivo a estas mismas concentraciones, aminoguanidina; inhibidor directo de la iNOS. Posterior a la incubación por 24h se tomaron 100 μL del sobrenadante y se le añadieron 100 μL del reactivo de Griess (sulfanilamida 1% y naftiletilendiamina diclorhidrato 0.1% en ácido fosfórico 2.5%). Se incubaron las placas por 10 minutos, en la oscuridad, a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 540 nm.

9.1.1 Método de Griess

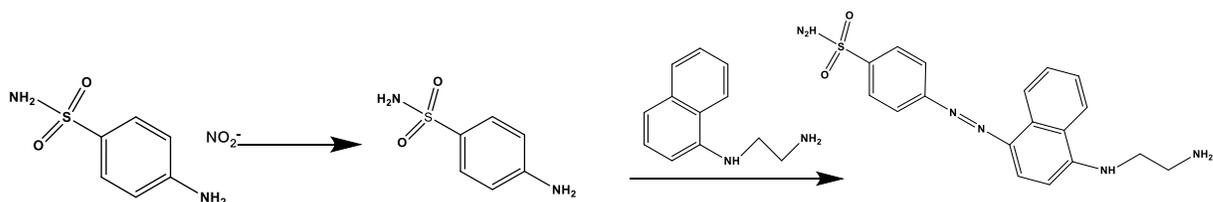


Figura 6. Reacción química producida en la detección de nitritos por el método de Griess. Cuando se agrega el ácido sulfanílico, los nitritos forman una sal de diazonio y al agregar la α -naftilamina, se desarrolla un color rosado formando un cromoforo.

9.1.2 Diseño experimental

Se determinó la producción de NO₂⁻ y estos resultados se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba de Dunnett de comparación múltiple. Las diferencias significativas entre los grupos se tomaron para $p \leq 0.05$. Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism.

9.2 Evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vivo* de *G. glauca*

Para determinar el efecto antiinflamatorio, se utilizó la prueba de inflamación inducida por TPA (13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol). En esta prueba se utilizaron ratones hembras de la cepa CD1 con un peso corporal de 30-35 g. En grupos de 5 animales se colocaron en cajas de acrílico transparente a una temperatura ambiente (24-26 °C), con un fotoperiodo (luz/obscuridad) de 12 horas con agua y alimento *ad libitum*. Bajo anestesia general con pentobarbital sódico (63 mg/kg) se produjo la inflamación a través de la administración cutánea de una solución de 10 μ L de TPA, disuelto en etanol (0.250 mg/mL), en cada una de las orejas.

Después de 5 a 10 minutos se administraron 20 μ L de los compuestos a evaluar, vehículo (metanol) o el compuesto de referencia (indometacina, 1 mg/oreja). Cuatro horas después de la aplicación de TPA se sacrificaron los ratones por dislocación cervical y posteriormente se pesó una muestra de 6 mm de diámetro de cada una de las orejas, y se determinó el porcentaje de incremento de inflamación de la oreja con respecto al valor basal y de efecto posteriormente se calculó utilizando las siguientes formulas:

$$\text{Porcentaje de inflamación} = \frac{\text{Peso del edema} * 100}{\text{Peso de la oreja basal}} - 100$$

$$\text{Porcentaje de efecto} = \frac{\text{inflamacion del tratamiento} * 100}{\text{inflamacion del TPA}} - 100$$

9.2.1 Diseño experimental

Para comparar más de dos grupos experimentales se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Dunnet con el programa estadístico Graphpad Prism 5.0 (San Diego CA, EUA). En donde una $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa.

Para determinar el efecto antiinflamatorio de indometacina y los compuestos ELA-1 y ELA-2 se administraron vía tópica como se mencionó anteriormente. El extracto crudo y compuestos a evaluar se prepararon una sola vez y se almacenaron en refrigeración (4°C), a excepción de la indometacina que se preparó el día del experimento. Se realizaron réplicas del experimento en diferentes días, con un total de 6-8 unidades experimentales por tratamiento. En esta prueba una disminución del peso del edema en comparación con el grupo tratado con el vehículo se interpreta como efecto antiinflamatorio.

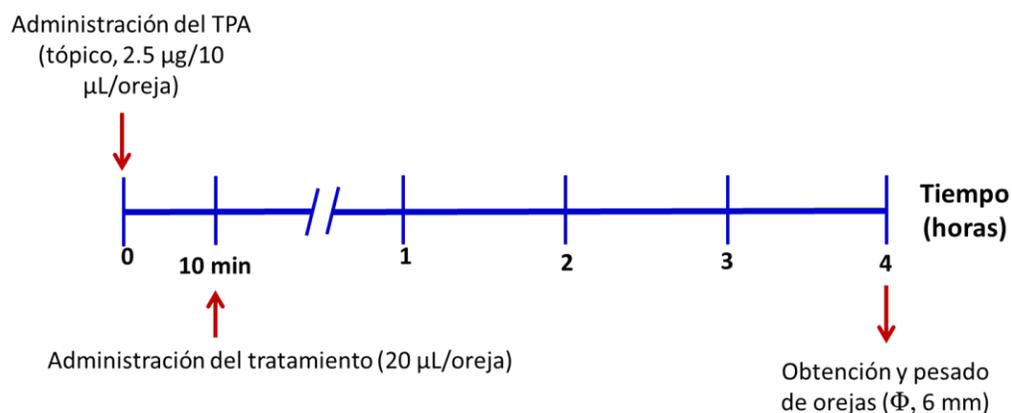


Figura 7. Diseño experimental para evaluar el efecto del extracto metanólico y los compuestos ELA-1 y ELA-2 en la inflamación aguda inducida por TPA.

CAPITULO III

AISLAMIENTO, ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS DE *G. glauca*

XL. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Material vegetal

Los rendimientos de los extractos vegetales de las partes de *Galphimia glauca* Kuntze se presentan en cuadro 3.

Cuadro 3. Rendimiento de extractos vegetales.

Planta	Parte de la planta	PS inicial en g	Extracto	PS en g	PS en %
<i>G. glauca</i>	Hojas	250	Hexánico	4.44	1.776
			Clorofórmico	6.97	2.788
			AcOEt	5.92	2.368
			MeOH	19.60	7.84
			MeOH	35.7	14.28
	Tallos	250			

9.1.2 Resultados de cromatografía de columna abierta

Por medio de cromatografía de columna abierta (CCA) se aislaron dos compuestos los cuales fueron nombrados ELA-1 y ELA-2, como se muestra en el diagrama 9 y 10, los cuales se identificaron por medio de cromatografía de capa fina (CCF) en donde se caracterizaron por adquirir una coloración azul al ser revelado con vainillina/H₂SO₄, como se muestra en la figuras 11,12 y 13.

Cuadro 4 Rendimiento de los compuestos ELA-1 y ELA-2

Partes de <i>G. glauca</i>	Compuesto	Rendimiento en mg
Hojas	ELA-1	69.3
Tallos		
Hojas	ELA-2	34

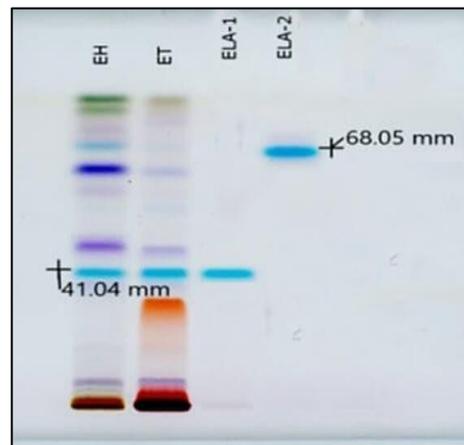


Figura 8. Cromatoplate de HPTLC (CAMAG) en los carriles se visualiza el extracto MeOH (EM) de las hojas, extracto MeOH de tallos, compuestos ELA-1, ELA-2 de *G. glauca*. Fase móvil CHCl₃: AcOEt (1:4), revelado con vainillina; H₂SO₄.

AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS ELA-1 Y ELA-2

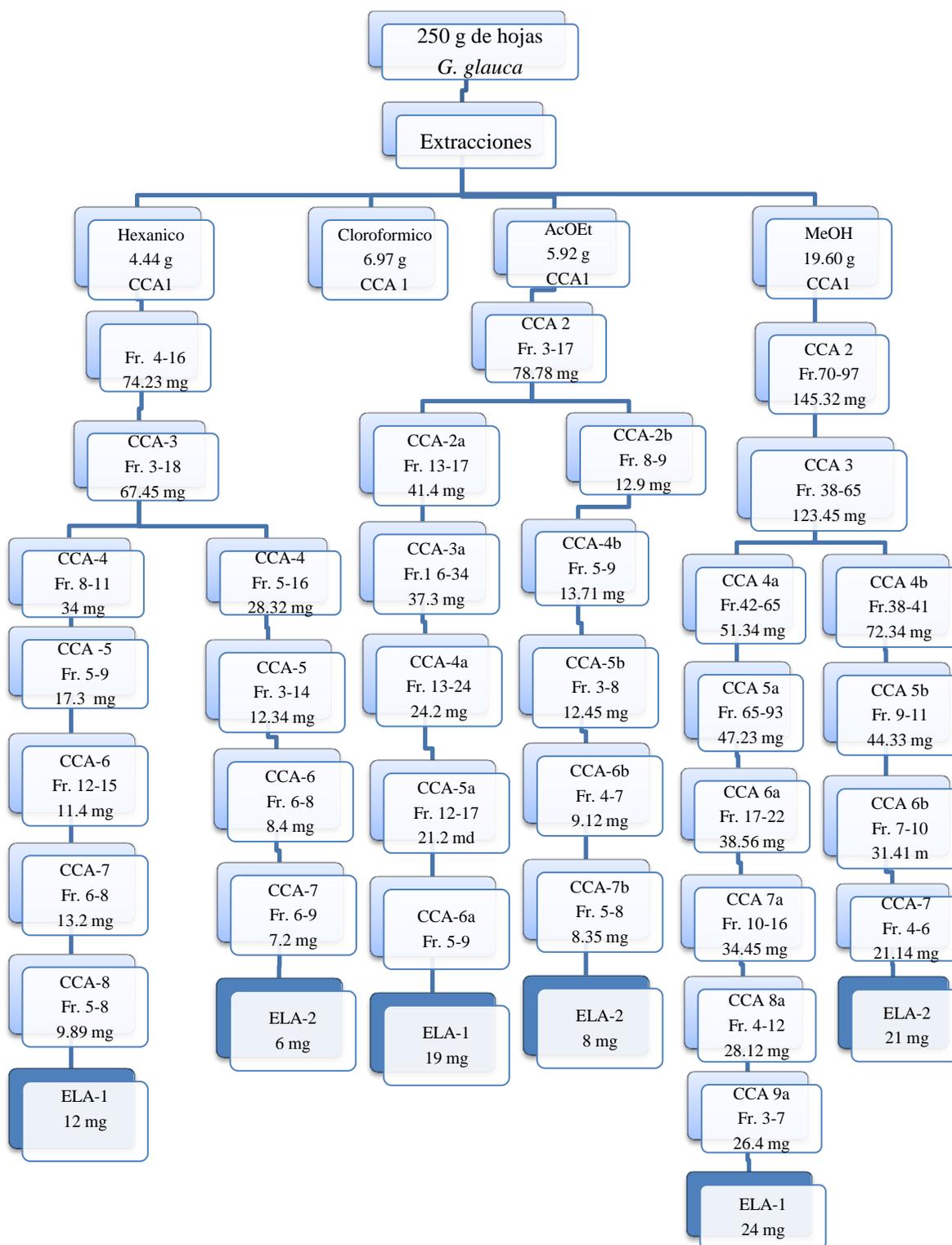


Figura 9. Diagrama de aislamiento de los compuestos ELA-1 y ELA-2 en hojas de *G. glauca*.

AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS ELA-1 Y ELA-2.

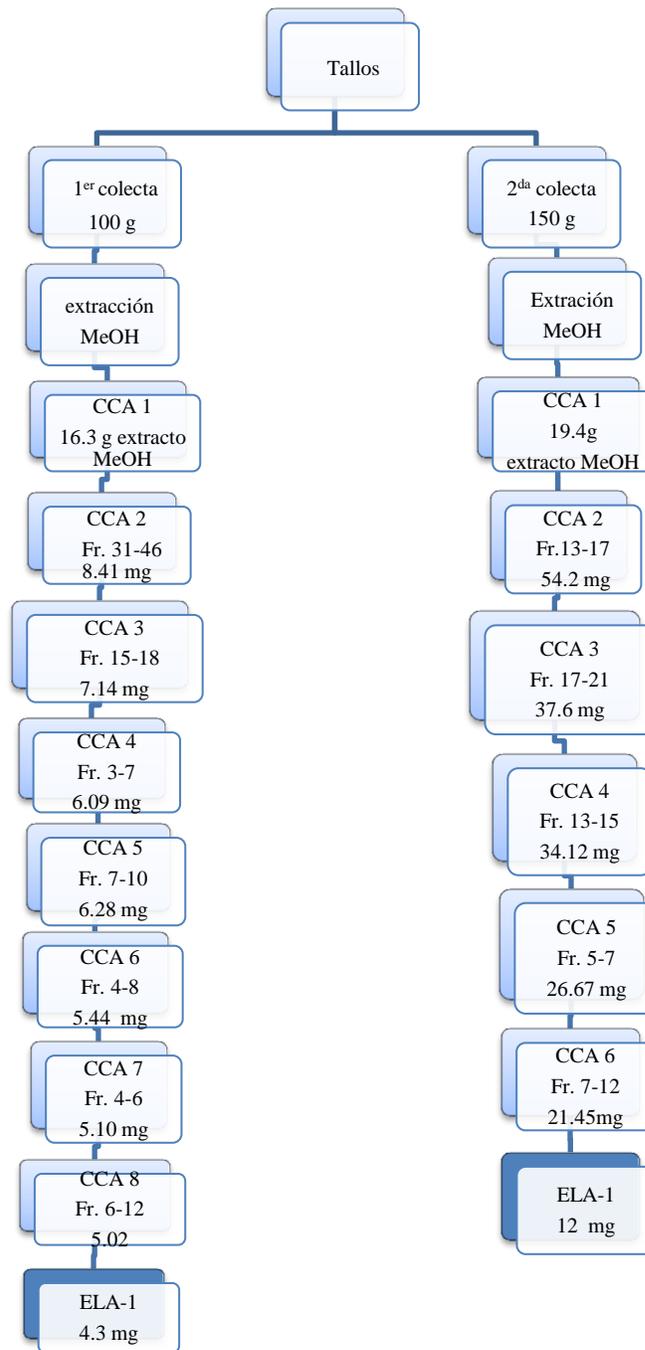


Figura 10. Diagrama de aislamiento de los compuestos ELA-1 y ELA-2 en tallos de *G. glauca*.

9.1.3 Cromatoplasmas de CCF de los compuestos ELA-1 y ELA-2.

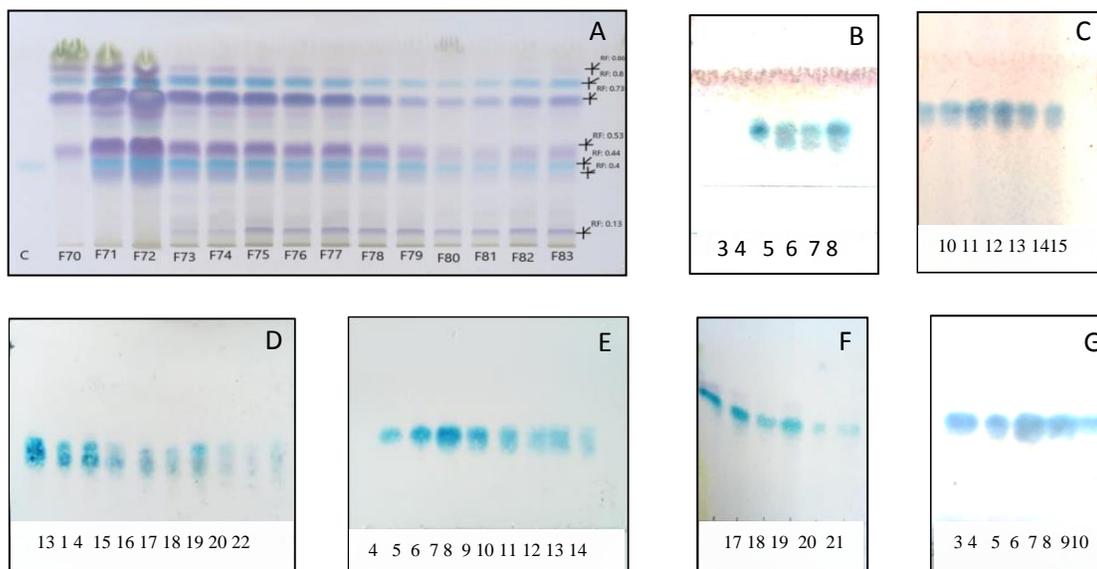


Figura 11. Cromatoplasmas de CCF, (A) corresponde fracciones de primarias de CCA y (B, C, D, E, F, G) fracciones con el compuesto ELA-1 aislados de las hojas de *G. glauca* por CCA, utilizando la fase móvil CHCl_3 : AcOEt (1:4), revelado con vainillina; H_2SO_4 .

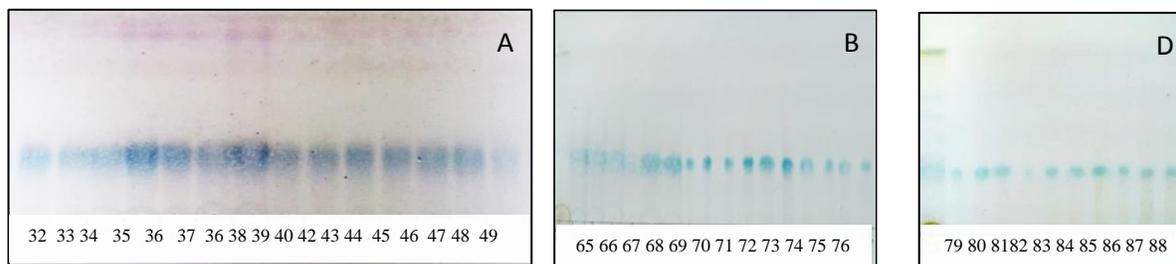


Figura 12. Cromatoplasmas de CCF, (A, B y C) corresponde a fracciones con el compuesto ELA-1 de CCA aislados en tallos de *G. glauca*, utilizando la fase móvil CHCl_3 : AcOEt (1:4), revelado con vainillina; H_2SO_4 .

33

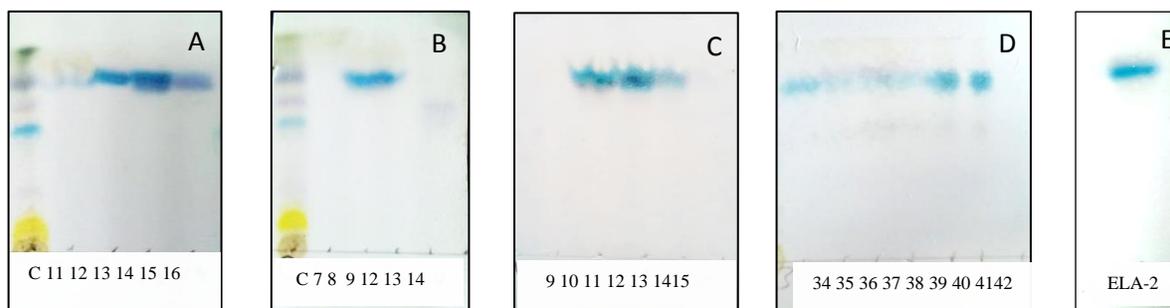


Figura 13. Cromatoplasmas de CCF (A, B, C, D y E) corresponde las fracciones de CCA del compuesto ELA-2 aislados en hojas de *G. glauca*, utilizando la fase móvil CHCl_3 : AcOEt (1:4), revelado con vainillina; H_2SO_4 .

9.2 Elucidación estructural

Una vez realizada la purificación de los compuestos (ELA-1) 1 y (ELA-2) 2 se analizaron por Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas, para poder elucidar su estructura molecular.

La elucidación estructural de los compuestos 1-2 permitió concluir que es triterpenos novedosos que se enmarcan en el tipo de *nor*-triterpenos derivados del friedelano, siendo que el primero una estructura nueva no reportada y la segunda estructura un *nor*-friedelano galfimidina ya reportado por Camacho *et al.*, 2002.). Se consultaron en el banco de datos internacional Scifinder para confirmar los datos de las moléculas aisladas de *G. glauca*.

Mediante el análisis de Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN- ^1H), se obtuvieron espectros en donde se identificaron los hidrógenos que corresponden a cada molécula, mientras que los espectros de carbono-13 (RMN- ^{13}C) mostraron los valores de los carbonos de cada molécula, el análisis DEPT (Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer), en sus técnicas DEPT 135 y 90 se identificaron el tipo de carbono (primario -CH₃, secundario-CH₂ y terciario-CH).

En la estrategia de elucidación estructural de productos naturales, en particular de los triterpenos, los espectros de correlaciones bidimensionales ofrecen información clave para el establecimiento de la estructura química.

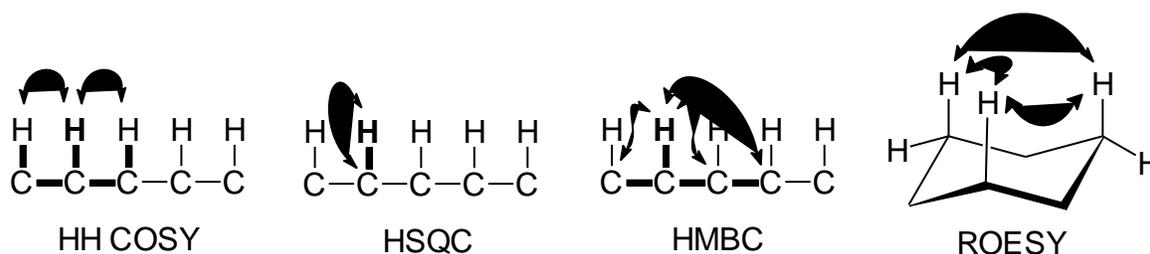


Figura 14. Experimentos de RMN bidimensionales utilizados en la elucidación estructural de triterpenos.

El espectro HSQC indica la correlación heteronucleares a un enlace de distancia ($1J_{\text{CH}}$), en este caso hace referencia a la correlación que existe entre cada uno de los carbonos con los protones unidos a ellos, mientras que el espectro HMBC permite conocer las correlaciones heteronucleares a dos y a tres enlaces de distancia ($2-3J_{\text{CH}}$), en este caso la relación de los carbonos con los protones unidos a carbonos vecinos (Duddeck y col., 2000)

9.2.1 Análisis espectral de RMN para la caracterización química estructural del compuesto ELA-1.

A continuación se muestran los espectros de RNM de ^1H , ^{13}C , DEPT, HSQC y HMBC (500 Y 125 MHz, CHCl_3-d_6) del compuesto identificado como ELA-1 (Figuras 18, 19, 20, 21 y 22).

En la figura 15 se muestra el espectro de protones (RMN- ^1H) en donde se identificaron los hidrógenos de cada molécula correspondientes a la molécula de ELA-1. En la figura 16 se pueden observar el espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado, que indica el número de carbonos de la molécula; al centro está el espectro DEPT 135, cuyas señales positivas permiten identificar a los carbonos terciarios (CH) a tres carbonos primarios (CH_3), y las señales negativas los carbonos secundarios (CH_2). El espectro DEPT 90, que aparece en la Figura indica la presencia de carbonos terciarios (CH). En caso de no existir señales en los espectros DEPT 135 y 90, pero que aparezca en el espectro totalmente desacoplado, se tratará de unos carbonos cuaternarios (Cq) (Cuadro 5).

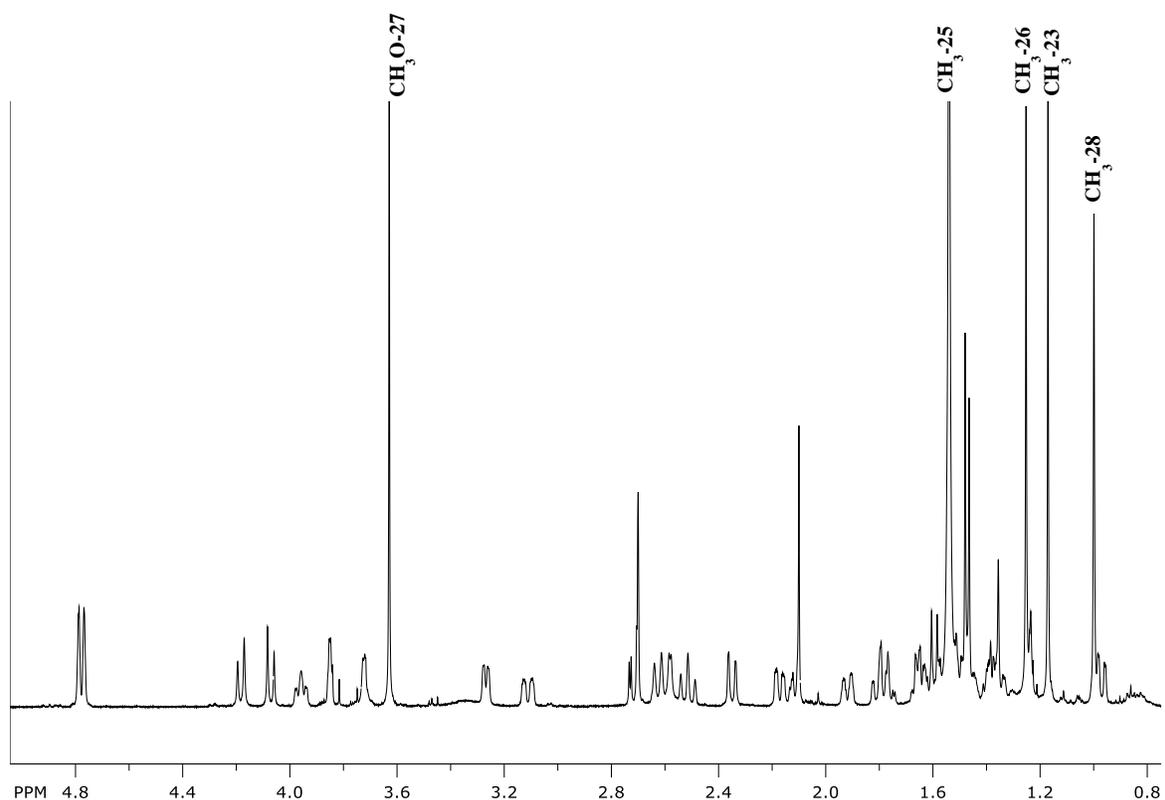


Figura 15. Espectro de RMN-¹H del compuesto ELA-1a 500 MHz en CDCl₃.

Cuadro 5. Determinación de tipo de carbono mediante DEPT.

Tipo de Carbono	Estado en B	Estado en C	Representación gráfica
CH₃	Señal arriba	Sin señal	
CH₂	Señal abajo	Sin señal	
CH	Señal arriba	Señal arriba	
qC	Sin señal	Sin señal	

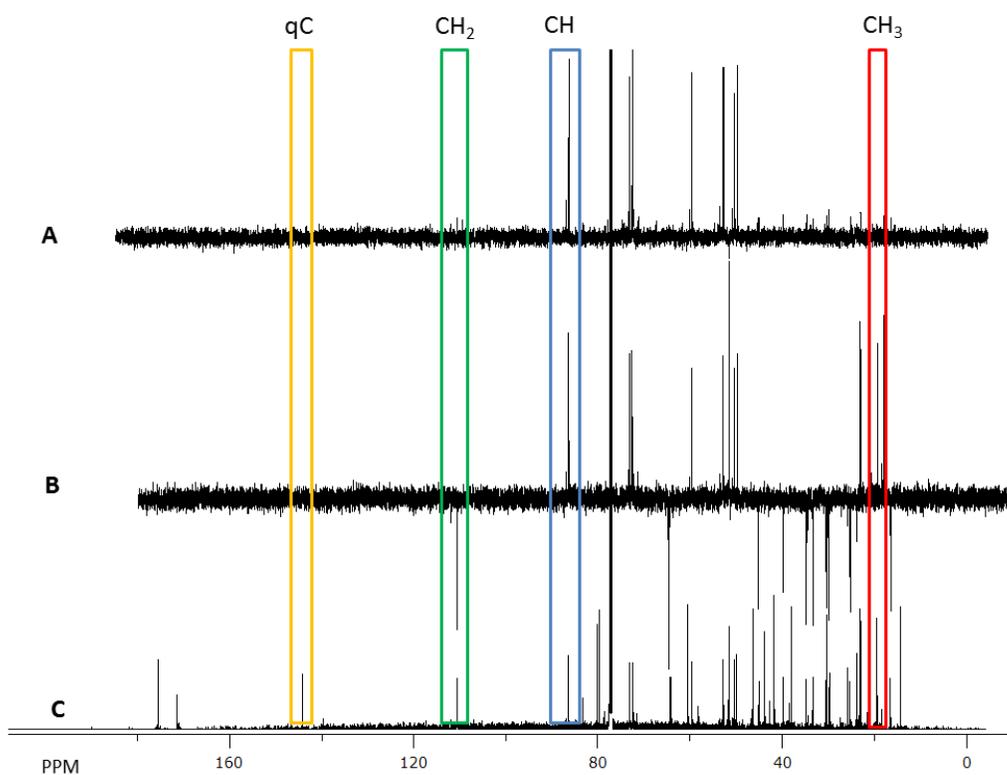


Figura 16. Espectro de RMN¹³C a 500 MHz del compuesto ELA-1. (A) Espectro totalmente desacoplado, (B) DEPT 135, (C) DEPT 90.

Por ejemplo la señal δ_C 110.61 correspondiente al C-19, que presenta una señal negativa en el espectro DEPT 135, indicando que se trata de un CH₂ (figura 16).

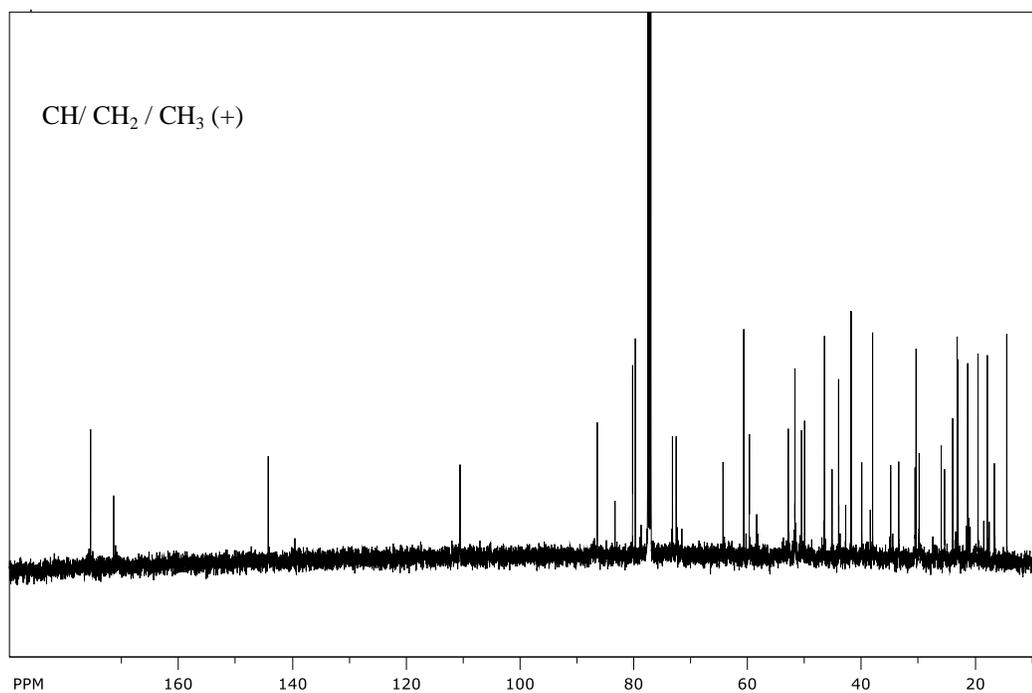


Figura 17. Espectro de RMN-¹³C del compuesto ELA-1 a 500 MHz en CDCl₃.

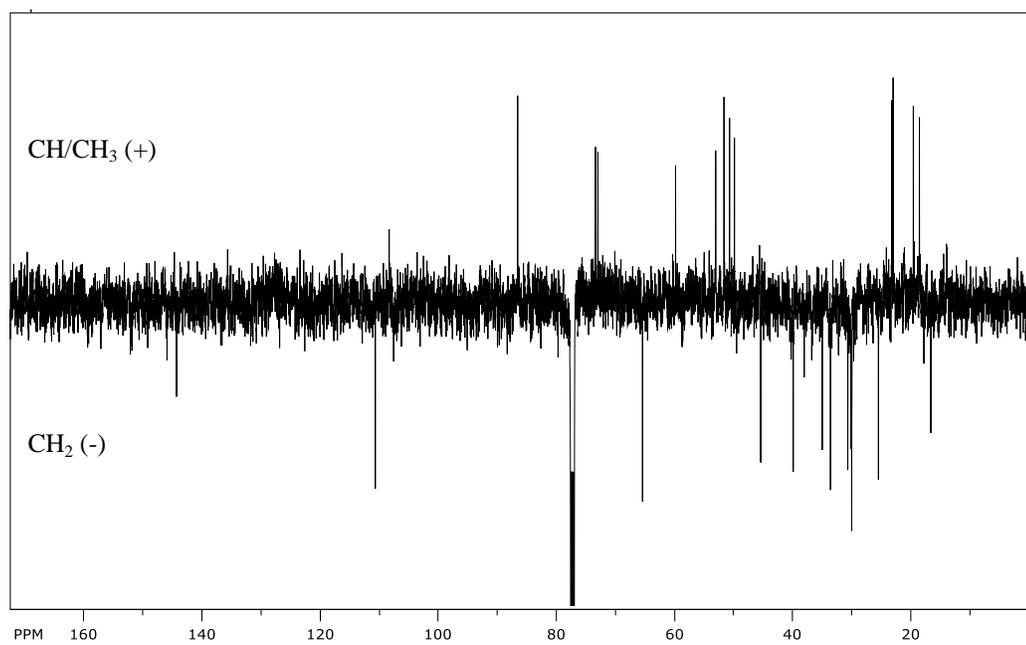


Figura 18. Sub-espectro DEPT 135 del compuesto ELA-1 a 500 MHz en CDCl₃.

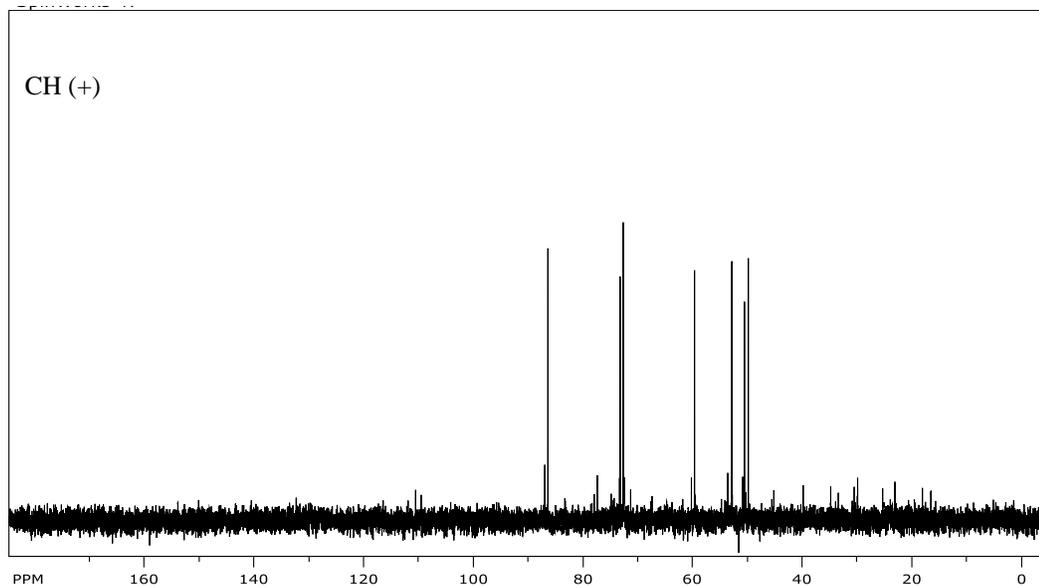


Figura19. Sub-espectro DEPT 90 del compuesto ELA-1 a 500 MHz en CDCl_3 .

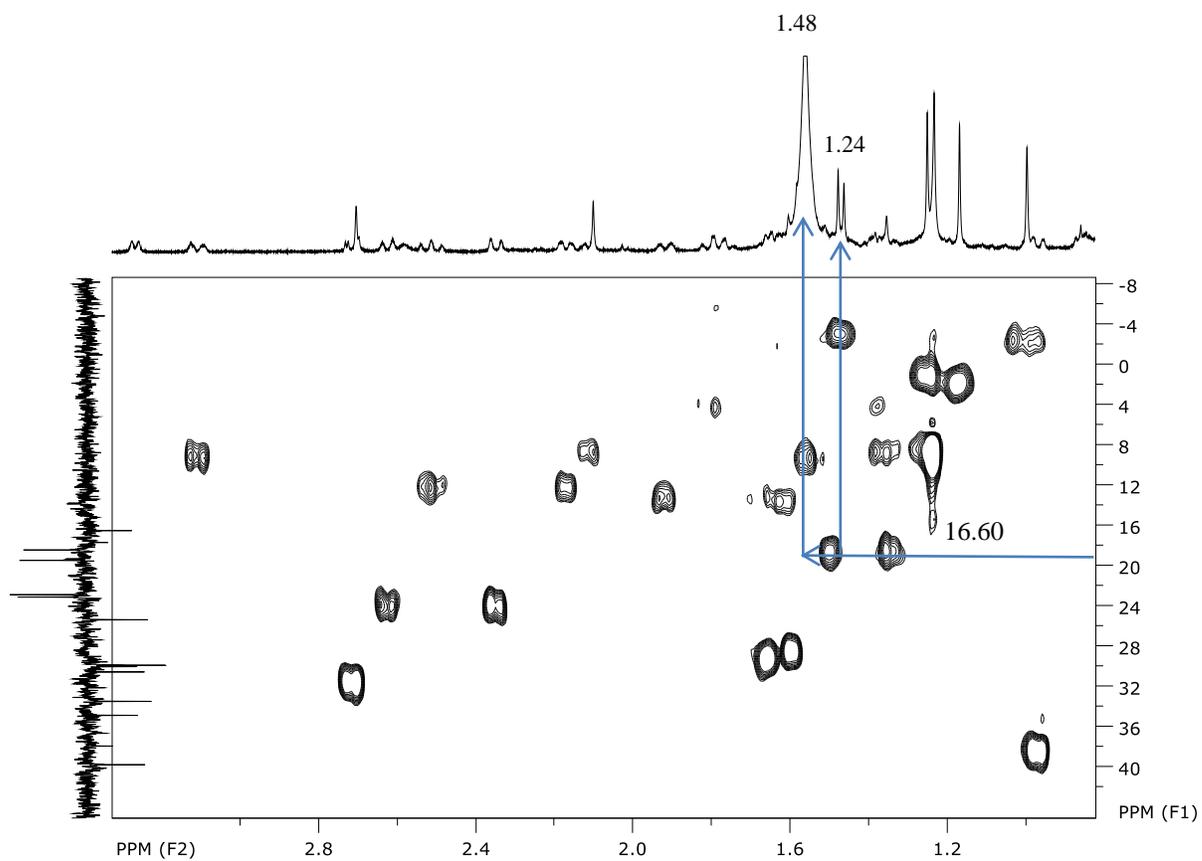


Figura 20. Espectro bidimensional HSQC del compuesto ELA-1

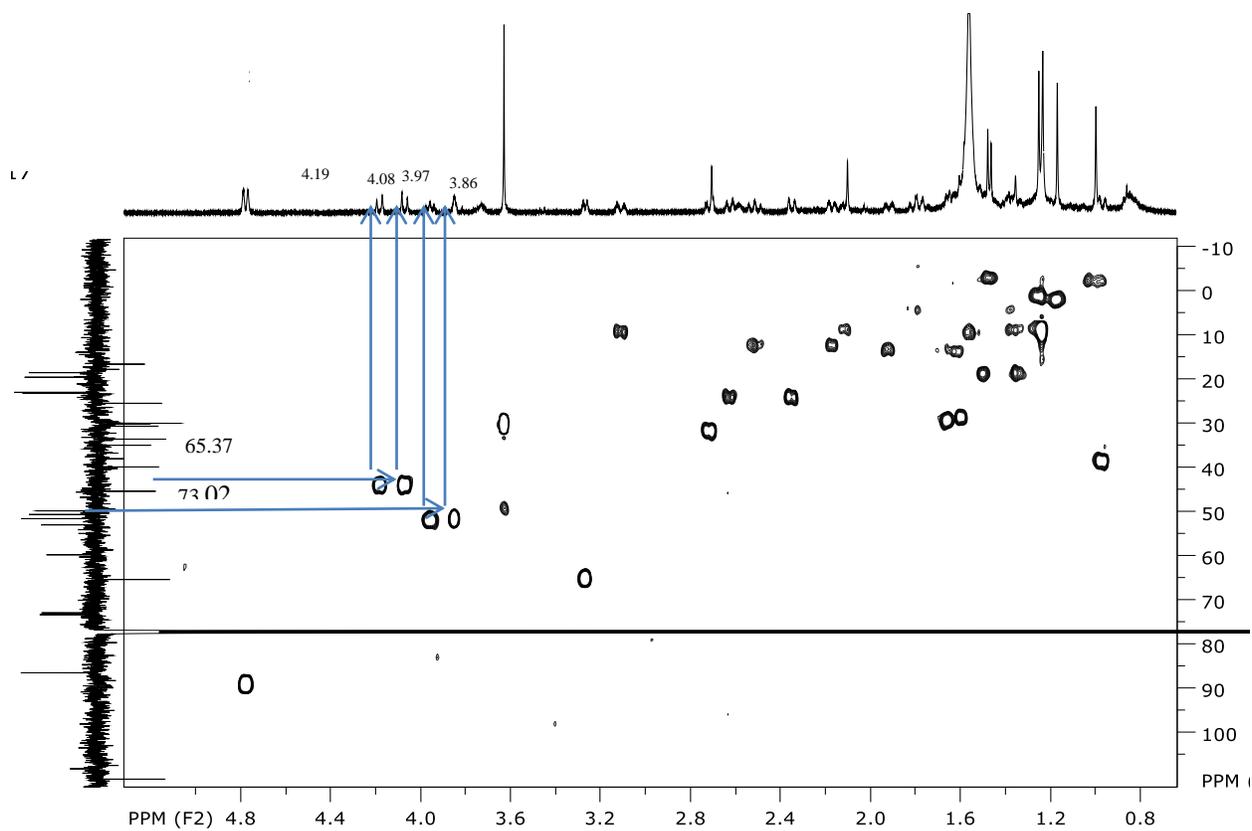


Figura 21. Espectro bidimensional HSQC del compuesto ELA-1.

SpinWorks 4:

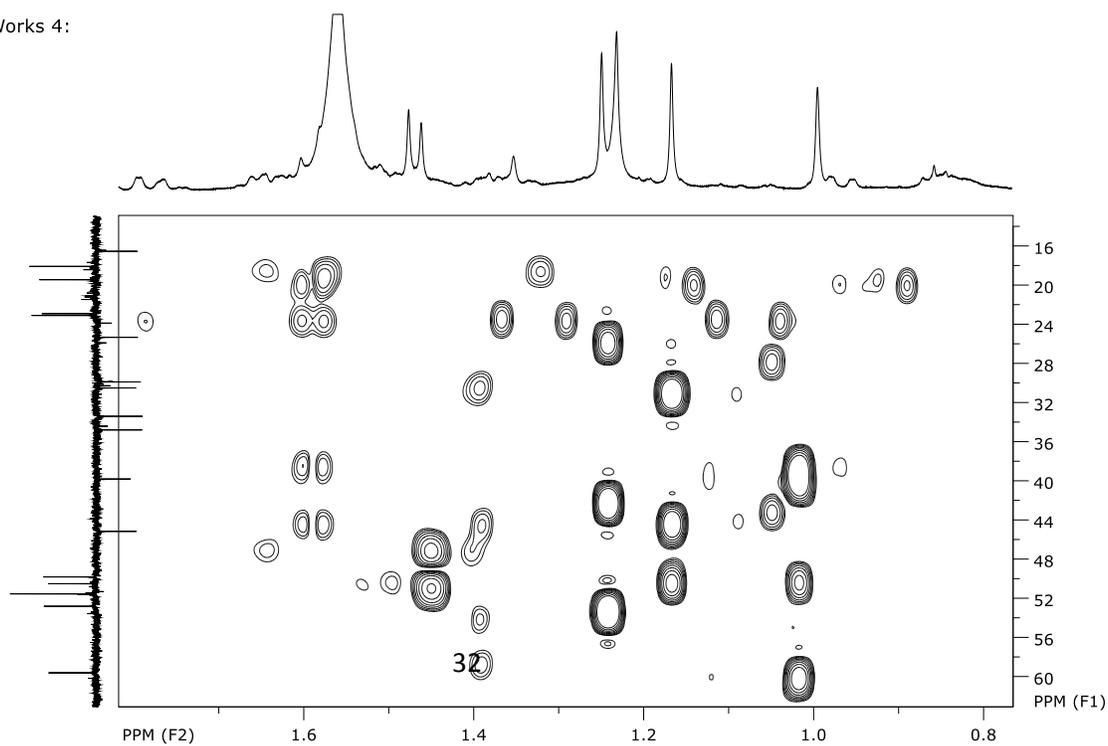


Figura 22. Espectro bidimensional HMBC del compuesto ELA-1

9.2.2 Análisis espectral de RMN para la caracterización química estructural del compuesto ELA-2.

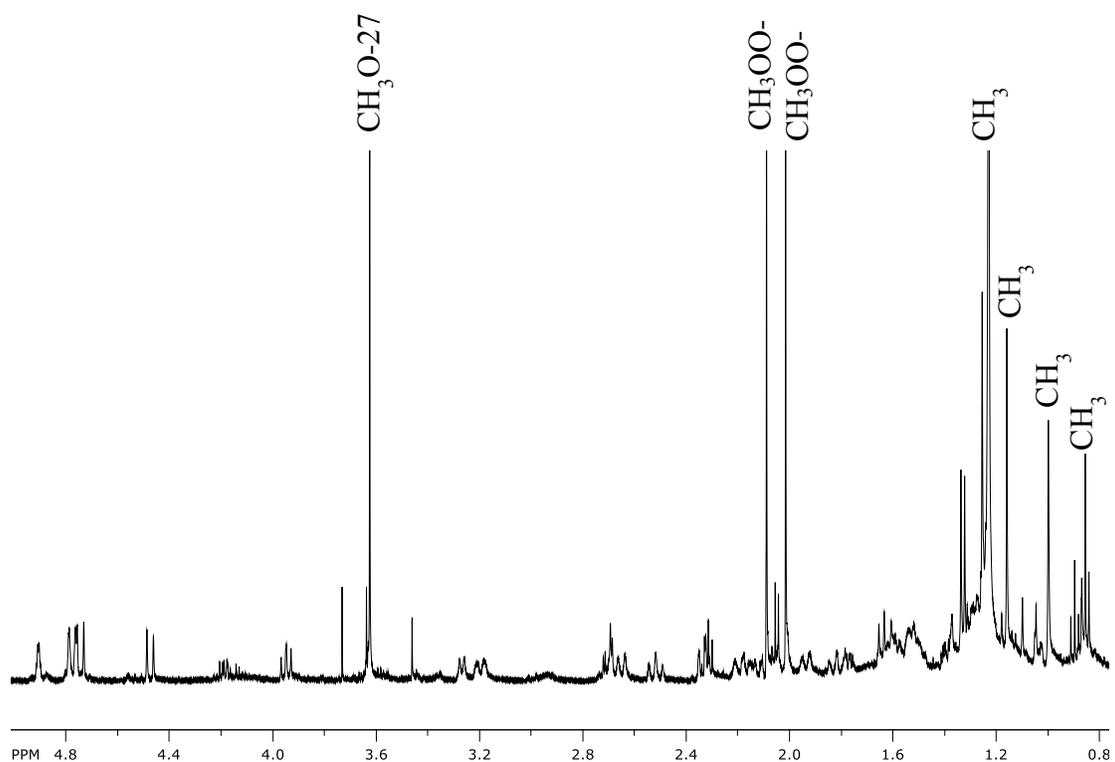


Figura 23. Espectro de RMN-¹³C del compuesto ELA-2 A 500 MHz en CDCl₃

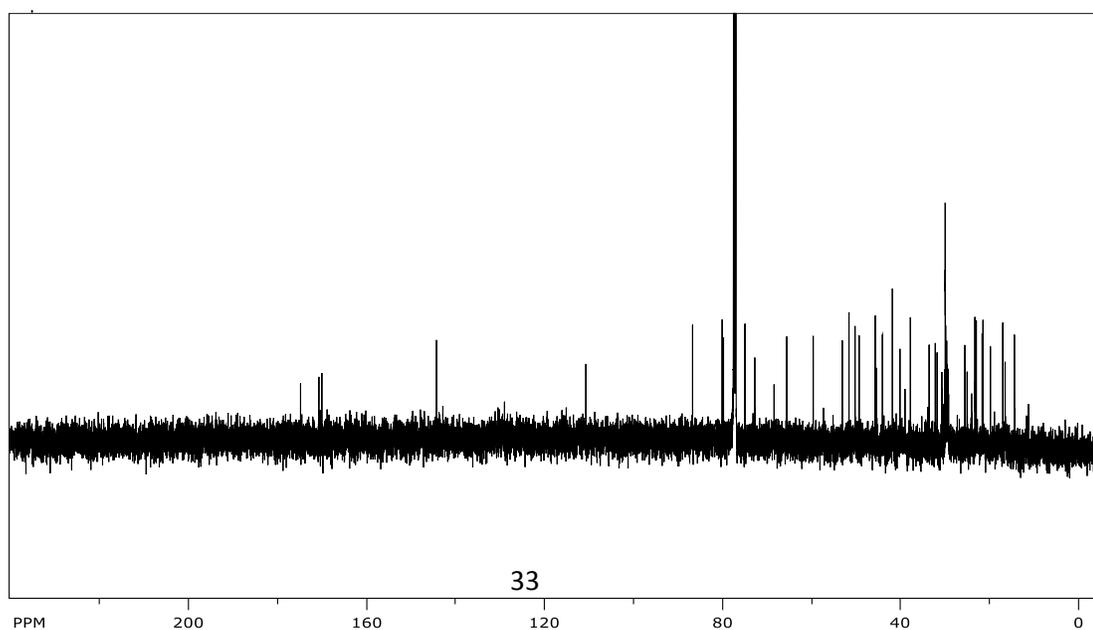


Figura 24. Espectro de RMN-¹³C del compuesto ELA-2 a 125 MHz en CDCl₃.

Cuadro 6. Datos de RMN de ¹H y ¹³C para los Compuestos 1-2 (los valores de J en Hz)

Posición	1 (ELA-1)		2 (ELA-2)		Galfimidina	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	1.50 1.54	16.44	1.50, m 1.53, m	16.43	1.45, m 1.55, m	16.2
2	1.62 1.93	34.90	1.93	31.71	1.81, m	31.5
3	3.86	73.02	4.90	74.72	4.93, brs	74.7
4	1.66	50.71	1.77, m	49.1	1.77, m	49.1
5	-	46.22	-	45.82	-	45.4
6	3.27	86.40	3.27	86.51	3.28, d 8	86.3
7	3.86	73.50	3.94	72.82	3.98, brt 8	72.5
8	1.60	49.90	1.64	49.98	1.66, brd 9	50.0
9	-	37.71	-	37.20	-	37.5
10	2.72	53.06	1.04	59.39	1.06, dd 10, 2.6	59.3
11	1.37 2.12	30.01	1.31 1.52	40.07	1.55, m 3.22, dd 12.2	30.4
12	3.12 1.57	30.59	2.12 3.18	33.81	1.43, m 2.18, m	29.6
13	-	79.50	-	80.05	-	79.9
14	-	43.64	-	43.59	-	43.8
15	1.38 1.80	25.37	2.12	30.52	1.55, m	39.8
16	4.19 4.08	65.37	1.36 1.82	25.49	1.40, m	25.3
17	-	41.51	-	41.50	1.95, m	41.5
18	3.97	73.50	-	79.52	-	79.5
19	2.64 2.36	45.35	2.33 2.65	45.36	2.37, d 13 2.66, d 13	45.0
20	-	144.35	-	144.01	-	144.1
21	2.90 2.52	33.56	2.31 2.51	34.37	2.20, m 2.54, m	33.2
22	1.50 1.62	39.84	2.70	53.35	2.74, m	52.7
23	1.48, CH ₃	18.54	1.32	16.94	1.35, d 7	16.7
24	4.19,S 4.08	65.37	4.47 4.74	65.56	4.50, d 12 4.73, d 12	65.1
25	1.26, s	19.57	0.99, s	19.73	1.02, s	23.0
26	1.17, s	23.12	1.16, s	23.21	1.18, s	19.5
27	-	174.93	-	174.70	-	174.8
28	1.01, s	19.57	1.25, s	22.97	1.27, s	22.8
29	4.79 2H	110.71	4.78 2H	110.71	4.79, brs 4.81, brs	110.4
OAc	-	-	2.01, s	21.39	-	21.2

				170.77		170.3
OAc	-	-	2.08, s	21.59 170.25	2.04, s	21.4 170.0
CO₂ME						
OCH₃	3.64	51.64	3.62	51.53	2.11, s	51.4

Lo anterior permitió elucidar la estructura del compuesto ELA-1, comprobando que se trata de un *nor*-triterpeno ($C_{30}H_{46}O_6$) como se muestra en la figura 25 y el compuesto ELA-2 es un terpenoide derivado de un *nor*-secofriedelano llamado Galfimidina ($C_{34}H_{53}O_{10}$) figura 26.

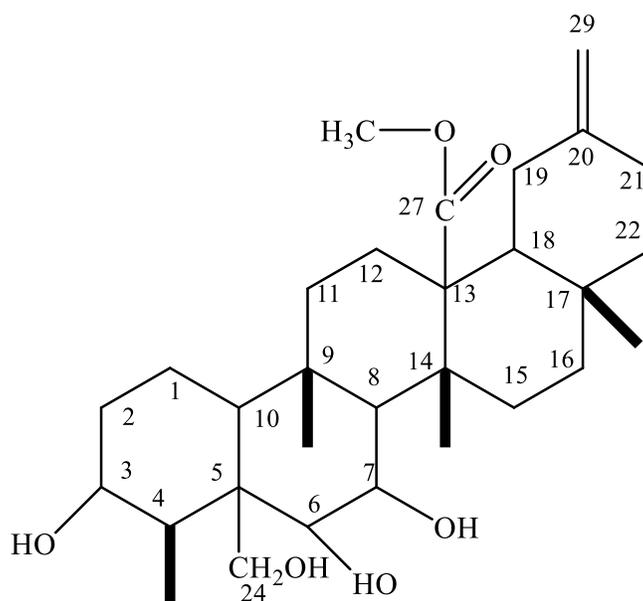


Figura 25. Estructura del compuesto ELA-1.

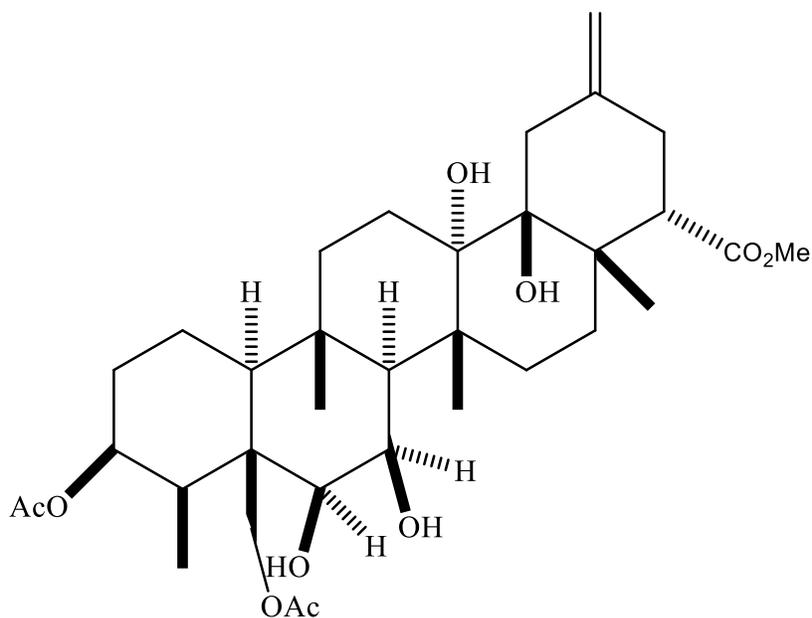


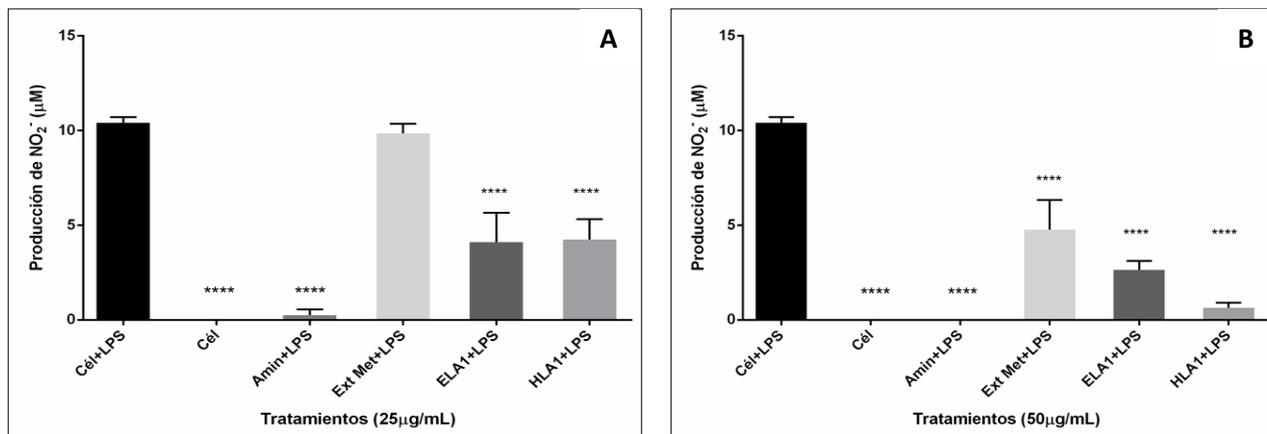
Figura 26. Estructura del compuesto ELA-2 reportada como Galfimidina.

CAPITULO IV

ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE *G. glauca*.

9.3 Resultados de la actividad antiinflamatoria *in vitro* de los compuestos ELA-1 y ELA-2.

Los resultados de la evaluación del potencial antiinflamatorio *in vitro* en macrófagos murinos 274.7 del extracto metanólico así como de los compuestos ELA-1 y ELA-2 presentan una mejor actividad antiinflamatoria con una IC_{50} de 18.92 y 16.67 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, en comparación con el extracto MeOH de las hojas de *G. glauca* que inhibieron la producción de (ON) con una IC_{50} de 44.89 $\mu\text{g/mL}$.



C

D

Figura 27. Graficas de la actividad antiinflamatoria del extracto MeOH de las hojas de *G. glauca*, compuestos ELA-1, ELA-2 y aminoguanidina (+) a [] de (A) 25, (B) 50, (C) 75 y (D) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en la prueba de inflamación inducida por LPS, para la inhibición iONS con una $P < 0.05$.

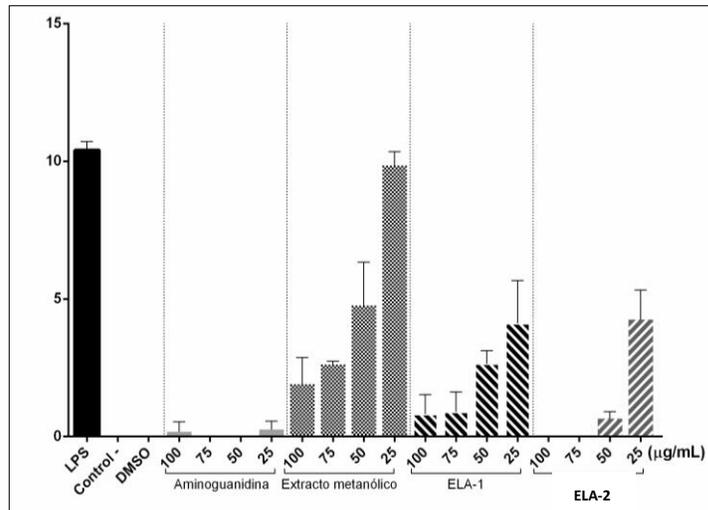


Figura 28. Grafica de comparación de la actividad antiinflamatoria del extracto MeOH de las hojas de *G. glauca*, compuestos ELA-1, ELA-2 y aminoguanidina (+) con una $P < 0.05$.

Extracto/compuesto	Dosis por mg/ oreja	(%) Emax	ED ₅₀ (mg/oreja)
Indometacina	0.1-1	82.25±1.8	0.52
Ext. MeOH	0.3-3	57.22±7.0	2.03
ELA-1	0.1-1	36.92±2.4	1.91
ELA-2	0.1-1	40.99±7.2	1.42

9.4 Resultados de la actividad antiinflamatoria *in vivo* en TPA de los compuesto ELA-1 y ELA-2

A continuación se muestran los resultados obtenidos del potencial antiinflamatorio del extracto MeOH de hojas de *G. glauca*, los compuestos ELA-1 y ELA-2 *in vivo* en TPA.

Cuadro 7. Actividad antiinflamatoria de *Galphimia glauca*

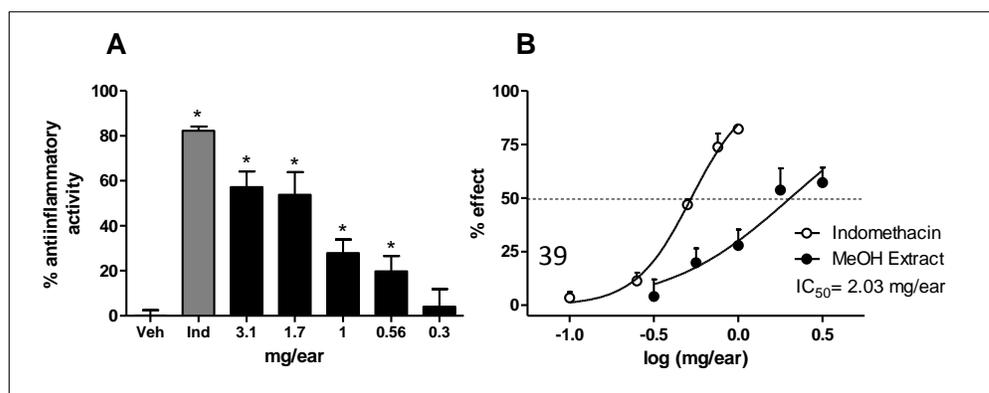
Se evaluaron los efectos del extracto MeOH de las hojas de las *G. glauca* y de los compuestos (ELA-1)1 y (ELA-2) 2 para la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema auricular inducido por 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol (TPA) en ratones CD1. Mediante una curva de dosis-respuesta en donde el extracto MeOH presento un Emax de 57.22 ± 7.0 con un ED₅₀ de 2.03 mg/oreja, los compuestos 1 y 2 presentaron un Emax de

36.92 ± 2.4 y 40.99 ± 7.2 con un ED₅₀ de 1.91 y 1.42 mg/oreja teórica respectivamente, la actividad antiinflamatoria, es significativamente diferente con una p<0.05 con respecto al control (-), las dosis evaluadas de los compuestos no alcanzan el 50 % de inhibición, por lo que se necesita incrementarlas. Como se muestra en las gráficas de las figuras 29, 30 y 31.

Los resultados obtenidos de la actividad antiinflamatoria se comparan con el estudio realizado por Gonzales *et al.*, 2013 de *G. glauca* colectados de Cuernavaca, Morelos, en donde el extracto MeOH presento 1.48 ± 1.45 mg/oreja (X ± DS) comparado con los resultados no presenta variabilidad en cuanto a la actividad, la galfimina A presento una Emax de 99.01% y un ED₅₀ de 0.81 mg / oreja y la galfimina B un Emax de 90.8% y un ED₅₀ de 0.31 mg / oreja de actividad antiinflamatoria. Estos resultados comparados con los compuestos 1 y 2 aislados de la población de Tepoztlán, Morelos (TM) presentan actividad pero son menos activos que las galfiminas A y E esto puede deberse las concentraciones y a la composición química.

En el análisis de las relaciones estructura-actividad de los compuestos activos es que ELA-1 en su estructura química (figura 6) en la posición C6 del anillo B, tiene un grupo hidroxilo al igual que ELA-2 (Galfimidina) y presenta dos grupos acetatos en los carbonos C3 y C24, lo cual sugiere que la presencia de una función oxigenada en el carbono C6 es necesario para la actividad antiinflamatoria. Esto es lo se propone que sucede con las galfiminas en donde la diferencia estructural entre estas dos galfiminas activas (GA, GE) y el GB inactivo es el estado de oxidación en la posición C6 de anillo B. En esta posición, hay un grupo hidroxilo en GA y un grupo acetato en G E, mientras que en B, estos grupos están ausentes. Este hecho está de acuerdo con la ausencia de actividad de las galfiminas G-K y G-L no oxigenadas C6 restantes.

Este es el primer estudio realizado de la actividad antiinflamatoria de los compuestos 1 y 2 de aislados de *G. glauca* la de población de TM, en el estudio realizado por Sharma *et al.*, 2012 esta población es inactiva, porque no presentaba galfiminas, sin embargo esta



localidad presento en 77.2 % de actividad antiinflamatoria, los compuestos ELA-1 y ELA-2 y otros metabolitos secundarios podrían ser precursores dicha actividad. El compuesto 2 fue reportado de una población de Guerrero, esta podría ser la misma especie de *G. glauca* y presentar la actividad antiinflamatoria.

Figura 29. Efecto del extracto MeOH de *G. glauca* y del compuesto ELA-2 en la prueba de inflamación inducida por TPA. A) Porcentaje de actividad antiinflamatoria, ANOVA de una vía seguida de una prueba de Dunnett con respecto al Veh * $P < 0.05$, y B) Concentración inhibitoria 50 (CI₅₀). Cada punto representa n=4-6.

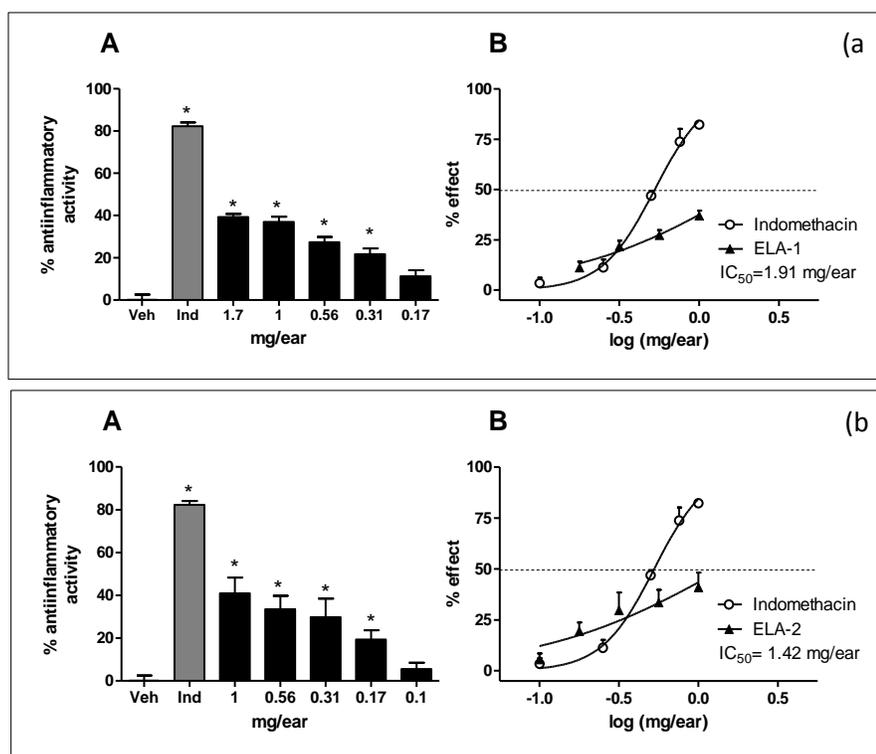


Figura 30. Gráficas del efecto de los compuestos (a) ELA-1 y (b) ELA-2 en la prueba de inflamación inducida por TPA. A) porcentaje de actividad antiinflamatoria, ANOVA de una vía seguida de una prueba de Dunnett con respecto al Veh * $P < 0.05$, y B) Concentración inhibitoria 50 (CI₅₀), cada punto representa n=6-8 para ELA-1, para ELA-2 n=4-6.

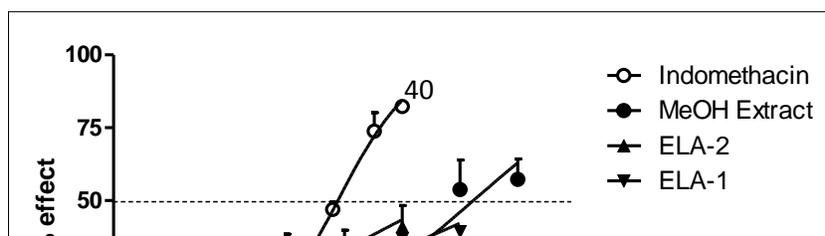


Figura 31. Curvas de concentración respuesta (CCR) del extracto y compuestos de *G. glauca*. Concentración inhibitoria 50 (CI₅₀). Cada punto representa n=4-6. Nótese que los compuestos ELA-1, ELA-2 a las concentraciones evaluadas no alcanzan el 50% de inhibición, por lo que la CI₅₀ presentada es teórica, se necesita aumentar el rango de concentración a evaluar para obtener una CI₅₀ experimental.

XI. CONCLUSIÓN

La presente investigación se empleó técnicas de cromatografía de columna abierta y cromatografía de capa fina permitieron aislar y purificar los compuestos ELA-1 y ELA-2 de los extractos Hexánico, AcOEt, MeOH de hojas y a ELA-1 del extracto MeOH de los tallos *G. glauca*, colectadas en Tepoztlán, Morelos.

Mediante el análisis de Resonancia Magnética Nuclear de protones, carbono (RMN- ¹H, ¹³C) y sus modalidades bidimensionales, permitieron elucidar las estructuras químicas de los compuestos 1 y 2, indicando que se trata de un nuevo *Nor*-triterpenos y un *nor*-friedelano reportado como Galfimidina, el cual se le realizaron las asignaciones correctas de sus carbonos.

Los compuestos 1 y 2 presentaron actividad antiinflamatoria en los ensayos *in vitro* utilizando macrófagos murinos de la línea celular RAW 274.7.

Los compuestos también presentaron actividad antiinflamatoria *in vivo* en el modelo edema auricular agudo inducida por TPA en ratones CD1.

XI. PERSPECTIVAS

- El presente estudio abre un campo más amplio de estudio en el ámbito fitoquímicos, farmacológico y biotecnológico. Algunas de las actividades que se proponen las siguientes:

Fitoquímico

- Purificar los compuestos ELA-1 y ELA-2 para realizar más ensayos farmacológicos y biotecnológico.
- Cuantificar los compuestos puros por métodos de cromatográficos como HPLC.

Farmacológico

- Evaluar los compuestos ELA-1 y ELA-2 en las actividades antibacterianas, citotóxicos.
- Proponer el mecanismo de acción de los mecanismos los compuestos ELA-1 y ELA-2 con respecto a la actividad antiinflamatoria.

Biotechnológico

- Establecer un protocolo para el cultivo *in vitro* de la especie *G. glauca* para la producción de ELA-1 y ELA-2.
- Determinar la actividad antibacteriana y citotóxica de los compuestos obtenidos de cultivos *in vitro* de *G. glauca*.
- Identificar y cuantificar la presencia de los compuestos y seleccionar las líneas estables e hiperproductoras de los compuestos activos.

XII. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Santamaría, L., Ramírez, G., Herrera-Arellano, A., Zamilpa, A., Jiménez, J. E., Alonso-Cortés, D., Tortoriello, J. (2007). Toxicological and cytotoxic evaluation of standardized extracts of *Galphimia glauca*. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(1), 35- 40.

Anderson, C. (2007). Revision of *Galphimia* (Malpighiaceae). *Contr. University Michigan Herb.*, 25: 1-82.

Ávalos GA, Pérez-Urria CE. (2009). Metabolismo Secundario de Plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2(3),119-145.

Azacón-Bieto J., Talón M. (2008) “Fundamentos de Fisiología Vegetal” Madrid. Editorial McGraw-Hill Interamericana de España, S.L. pp 323 -326.

Campos M., Tortoriello J., Oropeza MV., Vargas M., Montano L.(2001), *Galphimia Glauca* organic fraction antagonizes LTD4-Induced contraction in guinea pig airways. *Journal of Ethnopharmacology* 74: 7-15.

Camacho M. (1997). Productos naturales contra protozoos. Tesis de Doctorado, Facultad de

Medicina de la Universidad de Londres. pp.136.

Cardoso-Taketa, A. T., Lozada-Lechuga J., Fragoso-Serrano M., Villarreal, M. L., & Pereda-Miranda, R. (2004). Isolation of *nor*-secofriedelanes from the sedative extracts of *Galphimia glauca*. *Journal of Natural Products*,67 (4), 644-649.

Cardoso-Taketa, A. T., Pereda-Miranda, R., Young, H. C., Verpoorte, R., & Villarreal, M. L. (2008). Metabolic profiling of the Mexican anxiolytic and sedative plant *Galphimia glauca* using nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate data analysis. *Journal Planta Med*,74(10),1295-1301.

Díaz JL.(1976). *Uso de Plantas Medicinales de México*. Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales. Ed. Libros de México, México, pp.329.

Dorsch W., & Wagner H. (1991). New antiasthmatic drugs from traditional medicine. *Journal of International Archives of Allergy and Applied Immunology* 94:262-265.

Dorsch W., Bittinger M. Kaas A., Kreher B., Wagner H.(1992). Antiasthmatic effect of *Galphimia glauca*, gallic acid and related compounds prevent allergen and bronchial hiperreactivity in guinea pigs. *Journal of International Archives of Allergy and Applied Immunology* 97:1-7.

Estrada E. (1985). *Jardín Botánico de Plantas Medicinales "Maximino Martínez"*, Ed. Universidad Autónoma de Chapingo, México. pp.41

Estrada E. (1990). *Plantas Medicinales de México*, 4th ed. Universidad Autónoma de Chapingo. México. pp.601.

Flores-Vallejo, R. C., (2017). Aislamiento de hongos endófitos de la especie medicinal mexicana *Crescentia alata* Kunth. Productores de compuestos antiinflamatorios, y caracterización preliminar del endo y exometaboloma secundario. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Biotecnología. UAEM, Morelos.

Herrera- Arellano A., Jiménez-Ferrer E., Zamilpa A., Morales Valdéz M., García Valencia

- CE., Tortoriello J. (2007). Efficacy and tolerability of a standardized herbal product from *Galphimia glauca* on generalized anxiety disorder. A randomized, double-blind clinical trial controlled with lorazepam. *Journal of Medical Plant*, 73(1) 713-717.
- Herrera-Ruiz, M., Jiménez-Ferrer, J. E., De Lima, T. C. M., Avilés-Montes, D., Pérez-García, D., González-Cortazar, M., & Tortoriello, J. (2006). Anxiolytic and antidepressant-like activity of a standardized extract from *Galphimia glauca*. *Journal of Phytomedicine*, 13(1-2), 23-28.
- Hernández F. (1959). *Historia Natural de la Nueva España*. Ed, Universidad Nacional Autónoma de México, México. pp.475.
- Houghton P, Howes M-J, Lee C & Steventon G (2007). Uses and abuses of *in vitro* test in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *Journal of Ethnopharmacology* 110:391-400.
- Klancnik A, Pskrnik, Jersek B y Mozina SS (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiology Methods* 81: 121-126.
- Linares E., Flores B., Bye R. (1994) *Selección de plantas Medicinales de México*. Ed. Limusa, México, pp.208.
- Magaña, A.M.A., Gama, C.L.M., Méndez, M.R. (2010). El uso de las plantas medicinales en las comunidades Mayachontales de Nacajuca, Tabasco, México. *Polibotánica*, (29), 213-262
- Martínez M. (1969). *Las Plantas Medicinales de México*. Ed. Botas, México. pp. 656
- Medellín C.E.R. (2011) Validación del método de cuantificación de galfiminas mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Galphimia glauca*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Biotecnología. UAEM, Morelos.

Müller M., Antus S., Bittinger M., Dors W., Kaas A., Kreher B., Neszmelyi A., Neszmelyi A., Stuppner H., Wagne H. (1993). Chemistry and pharmacology of the antiasthmatic plants *Galphimia glauca*, *Adhatoda vasica* and *Picrorhizakurrooa*. *Journal of Medical Plant*, 59:33-56.

Müller, A., Reiter, S., Wirth, C., & Wagner, H. (1998). Anticomplementary flavonoids from *Galphimia glauca*. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 5(5), 341–345.

Nader, B.L., Taketa A.T., Pereda-Miranda R., Villarreal M.L. (2004). Genetic transformation of *Galphimia glauca* by *Agrobacterium rhizogenes* and the production of *norfriedelates*. *Journal Planta Med*, 70:1-6.

Nader, B. L., Cardoso T., A. T., Pereda-Miranda, R., & Villarreal, M. L. (2006). Production of triterpenoids in liquid-cultivated hairy roots of *Galphimia glauca*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 72(9), 842-844.

Neszmelyi, A., Kreher, B., Muller, A., Dorsch, W., & Wagner, H. (1993). Tetragalloylquinic acid, the major antiasthmatic principle of *Galphimia glauca*. *Journal of Medical Plant*, 59(2), 164-167.

Núñez, Arango P.N (2015). Estudio de helechos Mexicanos para la identificación de derivados del floroglucinol y su evaluación antibacteriana citotóxica e inhibitoria de la monoaminooxidasa. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación en Biotecnología. UAEM.

OMS- Organización Mundial de la Salud. 2004 “Tradicional Medicine”

Ortíz, A., Cardoso-Taketa, A., Monroy, M. R., Arellano, J., Hernández, G., & Villarreal, M. L. (2010). Transformed cell suspension culture of *Galphimia glauca* producing

- sedative *nor*-friedelanes. *Journal Planta Med*, 76(4), 386-392.
- Osuna, L., Pereda-Miranda, R., Tortoriello, J., & Villarreal, M. L. (1999). Production of the sedative triterpene galphimine B in *Galphimia glauca* tissue culture. *Journal Planta Med*, 65(2), 149-152.
- Osuna, L., Pereda-Miranda, R., & Villarreal, M. L. (2002). *In vitro* production of sedative galphimine B by cell suspension cultures of *Galphimia glauca*. *Journal of Biotechnology Letters*, 24(4), 257-261.
- Rzedowski J., Equihua M.(1987).Flora.En Secretaria de Educación Pública, Instituto Nacional de Antropología e Historia.Atlas cultural de México.pp 57.
- Sarukhán, J., Koleff, P., Carabias, J., Soberón, J., Dirzo, R., Llorente-Bousquets, J., de la Maza, J. (2009). *Capital Natural de México Síntesis: Conocimiento Actual y Perspectivas de Sustentabilidad*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- Schlaepfer L.& Mendoza-Espinoza. J. A. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41, 18-27.
- Sharma, A., Cardoso-Taketa, A., Choi, Y. H., Verpoorte, R., & Villarreal, M. L. (2012). A comparison on the metabolic profiling of the Mexican anxiolytic and sedative plant *Galphimia glauca* four years later. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(3), 964-974.
- Sharma, A., Luis Folch, J., Cardoso-Taketa, A., Lorence, A., & Luisa Villarreal, M. (2012). DNA barcoding of the Mexican sedative and anxiolytic plant *Galphimia glauca*. *Journal of Ethnopharmacology*, 144(2), 371-378.
- Shilpa K, Varun K, Lakshmi BS. (2010). An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. 5, 222-227.
- Tortoriello, J., & Lozoya, X. (1992). Effect of *Galphimia glauca* methanolic extract on

- neuropharmacological tests. *Journal of Medical Plant* , 58(3), 234-236.
- Tortoriello J. Ortega A. (1993) Sedative effect of galphimine B, a norsescotriterpenoid from *Galphimia glauca*. *Journal of Medical Plant*, 59:389-400.
- Tortoriello J., Ortega A., Herrera Ruíz M., Trujillo J. and Reyes Vazquez C. (1998) *Galphimine B* modifies electrical activity of ventral tegmental area neurons in rats. *Journal of Medical Plant*, 64:1-5.
- Tortoriello J., Herrera Arellano A., Herrera Ruíz M., Rojas-Bribiesca G., Zamilpa A., Gonzalez Cortázar M. (2006) PL04 Aplicación clínica de un ansiolítico obtenido de *Galphimia glauca*. *Revista de Fitoterapia*. pp. 37-40.
- Toscano R., Ortega A., Maldonado E., Gaviño R., Lozoya X. and Tortoriello J. 1993. Structure of galphimine B. *Acta Crystallographica*. C 49: 1-4.
- Verpoorte R., Choi YH., Sertic ., Kim HK., Wilson EG., Michopoulos F., Lefeger AW., Erkelens C., Prat Kricun SD. (2005). Classification of *Ilex* species based on metabolomic fingerprinting using nuclear magnetic resonance and multivariate data analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23:1237-45.
- Wiesenauer M., & Gaus W. (1985) Double blind trial comparing the effectiveness of the homeopathic preparation *Galphimia* potentation D6, *galphimia* dilution 10^{-6} and placebo on pollinosis. *Journal of Arzmeimittle*. Forsh 36:1745-1747.
- Wiesenauer, M., & Lüdtke, R. (1995). The treatment of pollinosis with *Galphimia glauca* D4 - a randomized placebo-controlled double-blind clinical trial -. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 2(1), 3-6



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 30 Nov 2018

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María Luisa Villarreal Ortega (Tutor principal)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Co Tutor)
Dr. Ashutosh Sharma
Dr. José de Jesús Arellano García
Dra. Anabel Ortiz Caltempa

Tesis: "Aislamiento de *Nor*-triterpenos Bioactivos de una Población de *Galphimia glauca* Cav. (Malpighiaceae) Colectada en Tepoztlán, Morelos"

Alumno que la presenta a revisión: **ELEAZAR LEON ALVAREZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. ASHUTOSH SHARMA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 30 Noviembre 2018

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María Luisa Villarreal Ortega (Tutor principal)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Co Tutor)
Dr. Ashutosh Sharma
Dr. José de Jesús Arellano García
Dra. Anabel Ortiz Caltempa

Tesis: "Aislamiento de *Nor*-triterpenos Bioactivos de una Población de *Galphimia glauca* Cav. (Malpighiaceae) Colectada en Tepoztlán, Morelos"

Alumno que la presenta a revisión: **ELEAZAR LEON ALVAREZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. LUISA VILLARREAL ORTEGA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 30 NOV. 2018

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María Luisa Villarreal Ortega (Tutor principal)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Co Tutor)
Dr. Ashutosh Sharma
Dr. José de Jesús Arellano García
Dra. Anabel Ortiz Caltempa

Tesis: "Aislamiento de *Nor*-triterpenos Bioactivos de una Población de *Galphimia glauca* Cav. (Malpighiaceae) Colectada en Tepoztlán, Morelos"

Alumno que la presenta a revisión: **ELEAZAR LEON ALVAREZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 30 Nov. 2018

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María Luisa Villarreal Ortega (Tutor principal)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Co Tutor)
Dr. Ashutosh Sharma
Dr. José de Jesús Arellano García
Dra. Anabel Ortiz Caltempa

Tesis: "Aislamiento de *Nor*-triterpenos Bioactivos de una Población de *Galphimia glauca* Cav. (Malpighiaceae) Colectada en Tepoztlán, Morelos"

Alumno que la presenta a revisión: **ELEAZAR LEON ALVAREZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. ANABEL ORTIZ CALTEMPA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 30 noviembre de 2018

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María Luisa Villarreal Ortega (Tutor principal)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Co Tutor)
Dr. Ashutosh Sharma
Dr. José de Jesús Arellano García
Dra. Anabel Ortiz Caltempa

Tesis: "Aislamiento de *Nor*-triterpenos Bioactivos de una Población de *Galphimia glauca* Cav. (Malpighiaceae) Colectada en Tepoztlán, Morelos"

Alumno que la presenta a revisión: **ELEAZAR LEON ALVAREZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE


DR. JOSE DE JESUS ARELLANO GARCIA