

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**



“Estudio fitoquímico de *Gnaphalium liebmannii* y
optimización de la obtención de Gnafalinas a partir
de inflorescencias de gordolobo”

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:
JOSÉ GUADALUPE ROSAS CANALES

TUTOR: DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO
ASESOR: M. en F. MARÍA MARTHA UGALDE HDEZ.

México D.F., 2012





UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR
P R E S E N T E .**

Comunico a usted que el alumno ROSAS CANALES JOSÉ GUADALUPE
con número de cuenta 302277418 de la carrera de Q. F. B.,
se le ha fijado el día 08 del mes de Octubre de 2012 a las 15:00 hrs.,
para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes
profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

PRESIDENTE	DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO
VOCAL	Q. MARTHA TRINIDAD J. OLIVEROS GARCÍA
SECRETARIO	M. en F. MA. MARTHA UGALDE HERNÁNDEZ
SUPLENTE	DR. ADELFO N. REYES RAMÍREZ
SUPLENTE	M. en F. LETICIA HUERTA FLORES

El título de la tesis que se presenta es: "**Estudio fitoquímico
de *Gnaphalium liebmannii* y optimización de la obtención de Gnafalinas a partir
de inflorescencias de gordolobo**"

Opción de titulación: **Tesis Experimental**

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a, 17 de Septiembre de 2012.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

RECIBÍ:

OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES
Y DE GRADO

Vo.Bo.

DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT IN 210112, Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado a través del proyecto PAIP 4390-18.

A la facultad de Química por el apoyo recibido durante la participación en el Subprograma 127 Formación Básica en Investigación.

Índice

Resumen.....	1
Introducción	2
I. Fundamento teórico	3
1.1 <i>Gnaphalium</i> sp.....	3
1.2 <i>Gnaphalium liebmannii</i>	4
1.2.1 Uso tradicional	4
1.2.2 Fitoquímica y actividad biológica	4
1.2.2.1 Gnafalinas.....	5
1.2.2.1.1 Mecanismo de acción, en la relajación del músculo liso.....	7
1.3 Extracción de metabolitos secundarios a partir de una muestra vegetal	7
II. Planteamiento del problema	9
III. Hipótesis.....	10
IV. Objetivos	10
V. Materiales y métodos	11
5.1 Material vegetal	11
5.2 Diseño de experimental	11
5.2.1 Primera fase, exploración	11
5.2.1.1 Reflujo.....	13
5.2.1.2 Maceración	13
5.2.1.3 Tratamiento de extractos para su análisis	13
5.2.2 Segunda fase, optimización.....	14
5.2.2.1 Desarrollo de las extracciones.....	14
5.2.3 Análisis estadístico	14

5.3 Análisis fitoquímico de <i>Gnaphalium liebmannii</i>	16
5.3.1 Obtención del extracto	16
5.3.2 Fraccionamiento cromatográfico	16
5.4 Evaluación del efecto relajante de compuestos aislados.....	16
VI. Resultados	18
6.1 Optimización del proceso de extracción de gnafalina A y B	18
6.1.1 Primera fase: Exploración	18
6.1.2 Segunda fase: Optimización	22
6.2 Análisis fitoquímico de <i>Gnaphalium liebmannii</i>	25
6.3 Evaluación preliminar del efecto relajante de compuestos aislados	30
VII. Discusión	33
VIII. Conclusiones	36
IX Perspectivas	36
Anexo A. Propuesta de monografía, para gordolobo.....	36
Anexo B Espectros de masas y resonancia magnética nuclear (^1H y ^{13}C), correspondientes al compuesto Isognafalina	38
Anexo C. Espectros de masas y resonancia magnética nuclear (^1H y ^{13}C), correspondientes al compuesto 3,5-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona.....	41
Anexo D. Espectros de masas y resonancia magnética nuclear (^1H y ^{13}C), correspondientes al compuesto 3-O-metilquercetina	45
Anexo E. Espectros de masas y resonancia magnética nuclear (^1H y ^{13}C), correspondientes al compuesto 5-hidroxi-3,7-dimetoxiflavona.....	48
Bibliografía	51

Resumen

A través de la aplicación del diseño experimental fue posible determinar los factores que afectan la obtención de las gnafalinas A y B a partir de las inflorescencias de gordolobo (*Gnaphalium* sp.). En una primera fase se estudió el efecto de moler el material vegetal, la técnica y el disolvente de extracción mediante un diseño factorial 2x2x3, encontrando como resultado que la mejor manera de extracción de las gnafalinas es macerando las inflorescencias, aplicando molienda y extrayendo con metanol. Ligado a esto, y con el fin de optimizar este proceso de extracción se planteó una segunda fase, en la cual se evaluaron los factores involucrados en la maceración tales como el número de extracciones sucesivas, el tiempo y la temperatura de extracción aplicando un diseño factorial 3³. De acuerdo a los factores definidos con este diseño experimental, se preparó el extracto metanólico (23.13 %) de *Gnaphalium liebmannii* colectado en San Pablo Ixayoc, municipio de Texcoco Estado de México, con el cual se realizó el análisis fitoquímico, mediante su fraccionamiento en columna cromatográfica convencional de silica gel. De este extracto se aislaron los compuestos isognafalina (55 mg), 3,5,-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona (130 mg), mezcla de gnafalinas (1.36 g); 3-O-metilquercetina, (17.7 mg) y un compuesto puro al que se le asignó la clave JGRAN-1-90. También, a partir de una muestra de extracto hexánico de *G. liebmannii* se aisló e identificó el compuesto 5-hidroxi-3,7-dimetoxiflavona.

Se realizó la evaluación farmacológica preliminar de los compuestos y sólidos aislados, utilizando el modelo farmacológico de tráquea aislada de cobayo, donde destacan el sólido JGRAN-1-78 y el compuesto isognafalina, los cuales presentaron la mayor actividad relajante de la musculatura lisa con valores de Concentración Efectiva 50 (CE₅₀) de 24.90±0.43 y 26.32±0.45 µg/mL, con mayor potencia que la reportadas para gnafalina A y gnafalina B.

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen al estudio del gordolobo (*Gnaphalium* sp.) en especial para la especie *G. liebmannii*, al demostrar que la especie contiene diversas moléculas biológicamente activas como relajantes de la musculatura lisa de vías aéreas.

Introducción

El gordolobo (*Gnaphalium sp*), es una de las planta más utilizada por la población mexicana para el tratamiento de padecimientos respiratorios (Taddei-Bringas *et al.*, 1999). Nuestro grupo de trabajo, recientemente reportó a los compuestos gnafalina A (5,7-dihidroxi-3,8-dimetoxiflavona) y gnafalina B (3,5-dihidroxi-7,8-dimetoxiflavona) como los metabolitos secundarios activos relajantes del músculo liso de la tráquea de cobayo. Estos compuestos se aislaron del extracto hexánico de las inflorescencias de *G. liebmannii* (Rodríguez-Ramos y Navarrete, 2009) y los posiciona como compuestos potenciales, útiles para el tratamiento de enfermedades como la hipertensión, el asma y la enfermedad obstructiva crónica.

Dado que las gnafalinas A y B se encuentran en pequeña cantidad en el gordolobo, es necesario establecer una metodología para optimizar su obtención. Por tal motivo, en este trabajo se describe el diseño estadístico para el desarrollo y optimización del proceso de extracción de los flavonoides activos presentes en *Gnaphalium sp*. También se presenta el estudio químico del extracto metanólico de *Gnaphalium liebmannii* y la evaluación farmacológica de los compuestos obtenidos, como posibles agentes relajantes de la musculatura lisa traqueal de cobayo.

I. Fundamento teórico

En México, la medicina tradicional registra una función importante en el tratamiento de diversas enfermedades, ya sea por prácticas de las diversas comunidades o bien por ser motivo de múltiples estudios que conforman la base para la elaboración de medicamentos (De la Rosa *et al.*, 2006). Un estudio realizado por el IMSS mostró que el 83% de los pacientes encuestados aceptan el uso de plantas medicinales y el 75% las usa como un recurso terapéutico, siendo el gordolobo (*Gnaphalium sp.*) la planta más empleada en el tratamiento de enfermedades respiratorias (Taddei-Bringas *et al.*, 1999). Se estima que en México se utilizan más de 3500 plantas medicinales para tratar diversas enfermedades. El grado en que se han estudiado estas plantas medicinales es muy variado, así como los aspectos que se han abordado para cada una de ellas.

1.1 *Gnaphalium sp.*

El género *Gnaphalium* (Figura 1), cuyo centro de diversificación y distribución es Sudamérica y Australia (Espinosa, 1985), pertenece a una de las familias más importantes a nivel botánico, la *Asteraceae*, y comprende 230 especies distribuidas por todo el mundo. Sin embargo, sólo pocas de las especies utilizadas en la medicina tradicional han sido evaluadas o estudiadas química y biológicamente para identificar los compuestos activos y determinar sus propiedades terapéuticas (Loganga-Otshudi *et al.*, 2000).



Figura 1. Inflorescencias de *Gnaphalium sp.*

1.2 *Gnaphalium liebmannii*

La especie *Gnaphalium liebmannii* es popularmente conocida en México como “gordolobo”. Se describe como una hierba anual de 10 a 150 centímetros de alto, de ramificación nula o profusa en ocasiones rizomatosa; tallo con indumento lanoso o aracnoideo; roseta basal presente o ausente. Sus hojas son percioladas sésiles, estrechamente elípticas u oblanceoladas de 2 a 9 centímetros de largo y de 0.5 a 1.5 centímetros de ancho, ápice romo a agudo, la base atenuada, con corolas, con indumento lanoso, margen liso, sésiles, no auriculadas ni decurrentes; inflorescencia glomerular simple o corimbosa congesta; cabezuelas acampanadas, de 3 a 9 milímetros de largo y de 2.5 a 7 milímetros de diámetro, de color café dorado, café rojizo o café amarillento. El gordolobo crece desde la parte central de México a Costa Rica, a una altura de 2,400 a 4,200 metros sobre el nivel del mar, en bosques de pino y praderas alpinas (Rzedowski *et al.*, 1972).

1.2.1 Uso tradicional

A la decocción de las partes aéreas de la planta, se le atribuyen propiedades medicinales contra algunos padecimientos de vías respiratorias (Waizel *et al.*, 2009) como lo son la inflamación de las mucosas, tos, bronquitis, resfríos, fiebre, gripa, alergias y otros padecimientos que incluyen el asma, la diarrea, dolor de estómago (Clous, 2005); además, en algunas regiones se la emplea como antimicrobiano (Villagómez-Ibarra *et al.*, 2001). Hasta la fecha no hay reportes de efectos no deseados del gordolobo.

1.2.2 Fitoquímica y actividad biológica

Los estudios realizados hasta el momento para la especie *Gnaphalium liebmannii* indican que los extractos de la especie muestran las siguientes actividades:

- Actividad antimicrobiana del extracto hexánico (maceración de inflorescencias) sobre *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* (Villagómez-Ibarra *et al.*, 2001), a partir de este extracto se aislaron el ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico, zoapatlina, 13-*epi*-esclareol y mezcla de β -sitosterol y estigmasterol.
- *Actividad relajante de vías respiratorias* (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2007). A partir de las partes aéreas de *G. liebmannii*, se obtuvieron y evaluaron tres extractos (hexano, diclorometano y metanol) sobre el músculo liso, aislado de la tráquea de cobayo, demostrando que el extracto hexánico de la planta presenta la mayor actividad relajante, probablemente a través de un mecanismo que involucra la inhibición de fosfodiesterasas.

Posteriormente mediante un estudio biodirigido del extracto hexánico en el modelo de tráquea aislada de cobayo, se identificaron a las gnafalinas A y B como los principios activos, responsables de las propiedades relajantes y broncodilatadoras del “gordolobo” (Rodríguez-Ramos y Navarrete, 2009)

1.2.2.1 Gnafalinas

La figura 2 muestra la estructura química de las gnafalinas A y B (5,7-dihidroxi-3,8-dimetoxiflavona y 3,5-dihidroxi-7,8-dimetoxiflavona respectivamente). Físicamente se reporta a la gnafalina A, como un sólido cristalino amarillo con un punto de fusión de 175-176°C y a la gnafalina B, como un sólido amorfo de color amarillo (Rodríguez-Ramos y Navarrete, 2009).

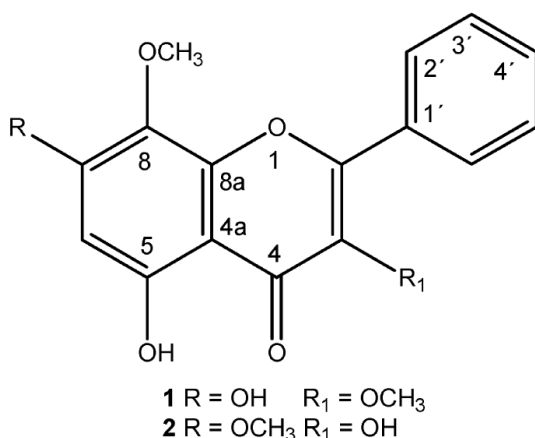


Figura 2. Estructura química de gnafalina A (1) y B (2)
(Tomado de Rodríguez-Ramos y Navarrete, 2006)

En diversas especies de *Gnaphalium*, se ha reportado la presencia de gnafalina A, al igual que en otras especies pertenecientes a diferentes familias botánicas (Cuadro 1). En cambio a la gnafalina B se le ha aislado de pocas familias botánicas (Cuadro 2) (Rodríguez-Ramos *et al.*, 2011a).

En experimentos *in vivo* (administración tópica) de gnafalina A, se le atribuyen propiedades antiinflamatorias comparables a la indometacina (Recio *et al.*, 1991), además se reporta el mecanismo de actividad antioxidante *in vitro* mediante la captación de radicales libres (Sala *et al.*, 2003), también que protege la oxidación de lipoproteínas de baja densidad mediante la quelación de trazas de ion cobre II (Schinella *et al.*, 2007).

Familia Asteraceae	Origen	Familia Amaranthaceae	Origen
<i>Achyrocline alata</i>	Brasil	<i>Amaranthus paniculatus</i>	México
<i>Achyrocline flaccida</i>	Argentina		
<i>Anaphalis margaritacea</i>	China	Familia	
<i>Gnaphalium</i>	Bolivia	Elaeocarpaceae	
<i>cheranthifolium</i>	Colombia	<i>Muntingia calabura</i>	China
<i>Gnaphalium gracile</i>	Colombia		
<i>Gnaphalium lanuginosum</i>	Turquía	Familia Fagaceae	
<i>Gnaphalium liebmannii</i>	México	<i>Nothofagus alessandri</i>	Alemania
<i>Gnaphalium luteo-album</i>	Reino Unido	<i>Nothofagus fusca</i>	
	Alemania	<i>Nothofagus solandri</i>	
<i>Gnaphalium obtusifolium</i>	Chile	<i>Nothofagus uncata</i>	
<i>Gnaphalium robustum</i>	España		
<i>Helichrysum picardii</i>	Alemania		
<i>Helichrysum italicum</i>	Argentina		
<i>Helichrysum sanguineum</i>	Turquía		
<i>Ozothamnu sericifolius.</i>	Alemania		

Cuadro 1. Presencia de 5,7-dihidroxi-3,8-dimetoxiflavona (gnafalina A) en diversas especies (Rodríguez-Ramos *et al.*, 2011a).

Familia Asteraceae	Origen	Familia Fagaceae	
<i>Achyrocline alata</i>	Brasil	<i>Nothofagus solandri</i>	Alemania,
<i>Achyrocline bogotensis</i>	Colombia		E.U. y
	Japón		Australia
<i>Achyrocline flaccida</i>	Argentina	Familia Woodsiaceae	
<i>Achyrocline tormentosa</i>	Argentina	<i>Woodsia scopulina</i>	Alemania
<i>Gnaphalium liebmannii</i>	México		
Familia Elaeocarpaceae			
<i>Muntingia calabura</i>	E.U.		

Cuadro 2. Presencia de 3,5-dihidroxi-7,8-dimetoxiflavona (gnafalina B) en diversas especies (Rodríguez-Ramos *et al.*, 2011a).

1.2.1.1. Mecanismo de acción, en la relajación del músculo liso.

Rodríguez-Ramos *et al.*, (2011b) demostraron que las gnafalinas A y B exhiben propiedades de relajación del músculo liso de la tráquea de cobayo y aorta de rata, efectos que se deben fundamentalmente a la inhibición de la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5) y por la inhibición del influjo de calcio, concluyen respecto a estas propiedades, que estas flavonas pueden ser usadas como potenciales fármacos útiles para el tratamiento de enfermedades como la hipertensión, asma y la enfermedad obstructiva crónica.

1.3 Extracción de metabolitos secundarios a partir de una muestra vegetal.

Frecuentemente, se suele recurrir a la aplicación del diseño experimental con la finalidad de determinar las condiciones que mejoran e inclusive afectan el rendimiento de la extracción, logrando a su vez optimizar recursos y tiempo (Montgomery, 1991). Una extracción adecuada depende de la naturaleza del material vegetal y tipo de los compuestos a extraer, el proceso involucra los siguientes pasos (Satyajit *et al.*, 2006):

1. Secado, homogeneizado del material vegetal (inflorescencia, raíces, hojas) y molienda.
2. Elección del disolvente:
 - a. Extracción polar: agua, etanol, metanol, butanol y así sucesivamente.
 - b. Extracción de mediana polaridad: acetato de etilo, diclorometano y así sucesivamente.
 - c. Extracción no polar: Hexano, éter de petróleo, cloroformo y así sucesivamente.
3. Elección del método de extracción.
 - a. Maceración
 - b. Reflujo
 - c. Extracción continua por Soxhlet
 - d. Extracción supercrítica de fluidos
 - e. Sublimación
 - f. Destilación por arrastre de vapor

Definidas las condiciones de extracción y obtención del extracto crudo libre de disolvente, se procede a su fraccionamiento; donde inicialmente se separa en fracciones más discretas que contienen compuestos de polaridad o tamaño molecular similar, las etapas del fraccionamiento se monitorean mediante cromatografía en capa fina o cromatografía de líquidos de alta resolución (Marston, 2007) hasta llegar al aislamiento e identificación de los

análitos de interés mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas (Satyajit et al., 2006).

II. Planteamiento del problema

Entre las plantas medicinales más frecuentemente empleadas en México con fines terapéuticos se reporta al gordolobo (Taddei-Bringas et al., 1999), nombre común que reciben varias especies del género *Gnaphalium*, de entre las cuales destaca *G. liebmannii*. A partir de un extracto hexánico de esta especie, fueron aislados e identificados los metabolitos secundarios gnafalina A y gnafalina B como los compuestos responsables de la relajación del músculo liso en tráquea de cobayo (Rodríguez-Ramos et al., 2009), sin embargo, en la actualidad estos compuestos se obtienen en pequeñas cantidades, por lo que el propósito de este trabajo fue determinar las condiciones experimentales que favorezcan la obtención de un extracto rico en los compuestos de interés, para en la medida de lo posible escalar este proceso. Además de contribuir con el análisis fitoquímico de la especie, en búsqueda de otros metabolitos secundarios con propiedades biológicas similares a las flavonas ya conocidas y que sustenten el uso tradicional que se le da al gordolobo.

III. Hipótesis

La extracción de gnafalina A y gnafalina B, se realizará eficientemente al aumentar la superficie de contacto del material vegetal mediante la molienda y empleando hexano como disolvente de extracción, ya que el extracto hexánico ha demostrado ser el extracto biológicamente más activo y por lo tanto, rico también en concentración de otros flavonoides con actividad relajante de la musculatura lisa bronquial.

IV. Objetivos

Optimizar la extracción de gnafalina A y B presentes en las inflorescencias de gordolobo, mediante la evaluación de los factores molienda, técnica de extracción y disolventes involucrados en el proceso de extracción.

Realizar el estudio fitoquímico complementario de las inflorescencias secas de *Gnaphalium liebmannii* por medio de métodos convencionales y determinar la actividad relajante de los compuestos aislados, en la musculatura lisa traqueal de cobayo.

V. Materiales y métodos

5.1 Material vegetal

La muestra de inflorescencias secas de gordolobo (*Gnaphalium sp*) empleadas en el diseño experimental, se compró en el mercado de Sonora de la Ciudad de México y se almacenó a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C).

Las partes aéreas de *Gnaphalium liebmannii* para el estudio fitoquímico, se colectaron en noviembre de 2010 a 3650 metros sobre el nivel del mar, en la parte montañosa (bosque de pino y oyamel) del pueblo de San Pablo Ixayoc municipio de Texcoco Estado de México. En esa localidad prevalece un clima templado con temperatura anual de 10-12 °C, (Ortega, 2007), el ejemplar fue identificado por la botánica del Herbario del IMSS, la Maestra en Ciencias Abigail Aguilar; una muestra del espécimen se conserva en dicho herbario con la clave 15800. Las inflorescencias se seleccionaron, se secaron y almacenaron a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C).

5.2 Diseño experimental

Se recurrió al diseño experimental con el objetivo de determinar las condiciones experimentales óptimas de extracción de los metabolitos activos (gnafalina A y gnafalina B), presentes en las inflorescencias de gordolobo (*Gnaphalium sp.*) y detectar aquellas variables que tienen mayor influencia, este diseño experimental involucró una primera etapa de exploración, cuyos resultados permitieron optimizar el proceso de extracción en una segunda etapa con la evaluación de nuevos factores; este diseño experimental consideró las áreas cromatograficas (obtenidas por cromatografía de líquidos de alta resolución) de gnafalina A y gnafalina B, como la respuesta experimental.

5.2.1 Primera fase, exploración

Dado que para esta primera fase se evaluaron factores no cuantitativos, se propuso un diseño multi-factorial categórico (2x2x3), el cual consistió en doce experimentos (cada uno con dos replicas).en el que se evaluaron los factores: molienda (A), técnica de extracción (B) y disolvente (C). Los factores A y B se estudiaron a dos niveles cada uno, mientras que el factor C fue evaluado a tres niveles (Cuadro 3) para esta primera fase.

Factor	Código	Nivel bajo	Nivel central	Nivel alto	Continuo
		-1	0	+1	
Molienda	A	No		Si	No
Técnica de extracción	B	Maceración		Reflujo	No
Disolvente	C	Hexano	Diclorometano	Metanol	No

Cuadro 3. Factores y niveles evaluados mediante el diseño experimental, exploración.

En el Cuadro 4, se muestra la matriz de experimentos del diseño realizado para esta fase, se indican también las condiciones experimentales de cada uno de los análisis así como también sus factores y niveles de cada uno en forma real y en su forma codificada, durante esta experimentación se mantuvo constante la cantidad de material vegetal (2 g) y el volumen de disolvente (100mL); los extractos obtenidos de cada experimentación fueron filtrados y analizados mediante cromatografía de líquidos de alta resolución para la determinación de las áreas cromatograficas correspondientes a los compuestos identificados como gnafalinas A y B presentes en cada extracto.

	Factores Codificados			Factores Reales		
	Molienda	Técnica de extracción	Disolvente	Molienda	Técnica de extracción	Disolvente
1	-1	-1	-1	No	Maceración	Hexano
2	1	-1	-1	Si	Maceración	Hexano
3	-1	1	-1	No	Reflujo	Hexano
4	1	1	-1	Si	Reflujo	Hexano
5	-1	-1	0	No	Maceración	Diclorometano
6	1	-1	0	Si	Maceración	Diclorometano
7	-1	1	0	No	Reflujo	Diclorometano
8	1	1	0	Si	Reflujo	Diclorometano
9	-1	-1	1	No	Maceración	Metanol
10	1	-1	1	Si	Maceración	Metanol
11	-1	1	1	No	Reflujo	Metanol
12	1	1	1	Si	Reflujo	Metanol

Cuadro 4. Matriz de experimentos para la fase de exploración, diseño factorial 2x2x3.

5.2.1.1 Reflujo

Para cada experimento se pesaron en un matraz bola 2 g del material vegetal, se le adicionó 100 mL del respectivo disolvente (Cuadro 4) y se le llevó a reflujo por una hora. Pasado este tiempo se dejó enfriar y filtró. Una muestra de la solución del extracto se analizó por cromatografía de líquidos de alta resolución y al resto del extracto se le concentró a vacío.

5.2.1.2 Maceración

Para cada experimento se pesaron en un matraz Erlenmeyer 2 g del material vegetal y se le adicionaron 100mL de disolvente se le dejó a temperatura ambiente por 24 horas. La solución de extracción se recuperó por filtración y concentró a vacío. El procedimiento se repitió nuevamente a las 48 y 72 horas siguientes, reuniendo y concentrando las soluciones en el mismo recipiente. El extracto final obtenido se disolvió en un volumen de 100mL y se tomó una muestra para analizarse por cromatografía de líquidos de alta resolución.

5.2.1.3 Tratamiento de extractos para su análisis

La muestra de extracto a analizar se filtró a través de un filtro de nylon y se colocó en un vial de 1 mL con tapón, el cual se insertó en el carrusel de inyección del cromatógrafo donde de forma automática se le inyectó para ser analizado según las condiciones instrumentales reportadas por Rodríguez-Ramos y colaboradores (2011a).

Columna: Inertsil® ODS-3 (5µm, 4.6x150mm) GL Science®
Fase móvil: 50% Ácido fosfórico (0.02 %), 30% Metanol y 20% Acetonitrilo
Temperatura: 40°C
Flujo: 2 mL/min
Tiempo de análisis: 20 minutos
Volumen de inyección: 10 µL

En el cromatograma obtenido se determinaron los valores de las áreas bajo la curva de gnafalina A y gnafalina B a un tiempo de retención de 12.2 y 14.7 minutos respectivamente y a una longitud de onda de 270 nm.

5.2.2 Segunda fase, optimización

Conforme a los resultados obtenidos en la fase de exploración, se procedió finalmente a la optimización del proceso de extracción mediante un nuevo diseño factorial completo del tipo 3^3 , con el que se evaluaron los factores: extracciones sucesivas (A), tiempo de maceración (B) y temperatura de extracción (C). Cada uno de los factores se estudió a tres niveles (Cuadro 5). Los factores fijos en cada uno de los experimentos fueron: la molienda del material vegetal, técnica de extracción (maceración), disolvente (metanol) y cantidad de muestra (300 mg).

Factor	Código	Nivel bajo	Nivel central	Nivel alto	Continuo
		-1	0	+1	
Extracciones sucesivas	A	1	2	3	Si
Tiempo (horas)	B	12	24	48	Si
Temperatura (°C)	C	25	35	45	Si

Cuadro 5. Factores y niveles evaluados mediante el diseño experimental, optimización.

La matriz de experimentos empleada para este diseño consta de 27 experimentos (con dos replicas cada uno) y se muestra en el Cuadro 6, donde se indican las condiciones experimentales de cada uno de los análisis.

5.2.2.1 Desarrollo de las extracciones

Para cada experimento se pesaron en un tubo de ensaye 300 mg de material vegetal previamente molido, se les adicionó 15 mL de metanol y después se llevaron a temperatura constante según las condiciones de extracción a evaluar en cada caso (Cuadro 6). El extracto obtenido de cada experimento, se secó y redisolvió en 2mL de metanol para su análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución y determinación de la cantidad de gnafalinas A y B para cada muestra, siguiendo la metodología empleada en el punto 5.2.1.3.

5.2.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico para ambas fases, se realizó mediante el software STATGRAPHICS®, éste proporcionó una serie de herramientas estadísticas que facilitaron la interpretación de los resultados, tales como: cartas de Pareto, gráficos de efecto principales, gráficos de interacciones, así como también gráficos de superficie de respuesta.

Factores Codificados				Factores Reales		
	Extracciones sucesivas	Tiempo (horas)	Temperatura (°C)	Extracciones sucesivas	Tiempo (horas)	Temperatura (°C)
1	-1	-1	-1	1	12	25
2	0	-1	-1	2	12	25
3	1	-1	-1	3	12	25
4	-1	0	-1	1	24	25
5	0	0	-1	2	24	25
6	1	0	-1	3	24	25
7	-1	1	-1	1	48	25
8	0	1	-1	2	48	25
9	1	1	-1	3	48	25
10	-1	-1	0	1	12	35
11	0	-1	0	2	12	35
12	1	-1	0	3	12	35
13	-1	0	0	1	24	35
14	0	0	0	2	24	35
15	1	0	0	3	24	35
16	-1	1	0	1	48	35
17	0	1	0	2	48	35
18	1	1	0	3	48	35
19	-1	-1	1	1	12	45
20	0	-1	1	2	12	45
21	1	-1	1	3	12	45
22	-1	0	1	1	24	45
23	0	0	1	2	24	45
24	1	0	1	3	24	45
25	-1	1	1	1	48	45
26	0	1	1	2	48	45
27	1	1	1	3	48	45

Cuadro 6. Matriz de experimentos del diseño factorial 3^3 Fase de optimización.

5.3 Análisis fitoquímico de *Gnaphalium liebmannii*

5.3.1 Obtención del extracto

Siguiendo los resultados de la fase de exploración, el material vegetal (5.3 Kg) se molió a un tamaño de partícula homogéneo y se le sometió a un proceso de maceración en metanol (3X72 horas) a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) con agitación esporádica. La solución se obtuvo por decantación, se filtró y concentró a sequedad a presión reducida.

5.3.2 Fraccionamiento cromatográfico

El extracto metanólico, se adsorbió en gel de sílice en una relación no mayor a 1:1 y se fraccionó de manera convencional por columna empacada con gel de sílice (malla 200) con una proporción 1:5, respecto al peso del extracto, la elusión se realizó utilizando mezclas de disolventes (Hexano y Acetato de etilo) en polaridad creciente, monitoreando cada fracción por medio de cromatografía en capa fina (Placas de aluminio con silica gel 60 F₂₅₄ MERK) las cuales se revelaron inicialmente bajo luz ultravioleta (254 nm) seguido de sulfato sérico amoniacal. A continuación se combinaron las fracciones semejantes con base en las características detectadas en el monitoreo previo (abundancia, tamaño de mancha y separación de los componentes acompañantes en la polaridad fraccionada) y se concentraron nuevamente para su posterior purificación.

5.4 Evaluación del efecto relajante de compuestos aislados

Para realizar los experimentos se utilizaron cobayos macho con un peso corporal de 400-450 g, los cuales se manipularon siguiendo la Norma Oficial Mexicana-062-ZOO-1999.

Los animales se sacrificaron mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (95 mg/Kg), posteriormente se realizó la disección de la tráquea, la cual se cortó en anillos de 2 mm (conteniendo 2-3 segmentos cartilaginosos). El montaje del tejido se efectuó siguiendo la técnica descrita por Rodríguez-Ramos *et al.*, en el 2009; cada anillo traqueal fue colocado dentro de una cámara de órgano aislado con 10 mL de solución de Krebs a 37 °C. La tensión isométrica fue registrada para cada canal mediante un polígrafo tipo Bio PACK System MP 100®, con una tensión isométrica inicial de 1.5 g, al tejido se le permitió estabilizar por al menos 30 minutos, pasado este tiempo el tejido se lavó en periodos de 15 minutos hasta que la señal fue estable para todos los canales. Después del periodo de estabilización los anillos traqueales fueron precontraídos con una disolución de acetilcolina 3×10^{-1} mM dos veces a intervalos de 30 minutos, seguida de lavados con solución de Krebs, para así después contraer la preparación con la disolución de carbacol 1 mM.

Después de contraer los anillos traqueales con carbacol y alcanzar una meseta se aplicaron concentraciones acumulativas de los compuestos aislados así como también de aminofilina (en su respectivo canal), permitiéndole al tejido alcanzar un resultado estacionario en cada una de las concentraciones, con los datos experimentales obtenidos se construyó la curva concentración-respuesta para cada compuesto aislado. Los controles para las curvas concentración respuesta se elaboraron con una gota de Tween 80 en 3 mL de agua destilada.

VI. Resultados

6.1 Optimización del proceso de extracción de gnafalina A y B

6.1.1 Primera fase: Exploración

En el diseño factorial tipo 2x2x3, se evaluó el efecto que tienen los factores: molienda (A), técnica de extracción (B) y disolvente (C), sobre las áreas cromatograficas obtenidas para gnafalina A y gnafalina B, los datos obtenidos para estas respuestas fueron analizados por un análisis de varianza con un nivel de significancia del 5%. Con el fin de simplificar la presentación de los resultados, en la Figura 3 se muestran sólo las cartas de Pareto obtenidas con el software STATGRAPHICS®, que muestran cada uno de los factores y sus efectos estimados en orden decreciente de magnitud. Para gnafalina A (Figura 3A), los factores molienda, disolvente y la interacción entre ambos, tienen un efecto positivo en su extracción. En cambio para gnafalina B (Figura 3B) la técnica de extracción, influye de manera negativa en la extracción de este metabolito.

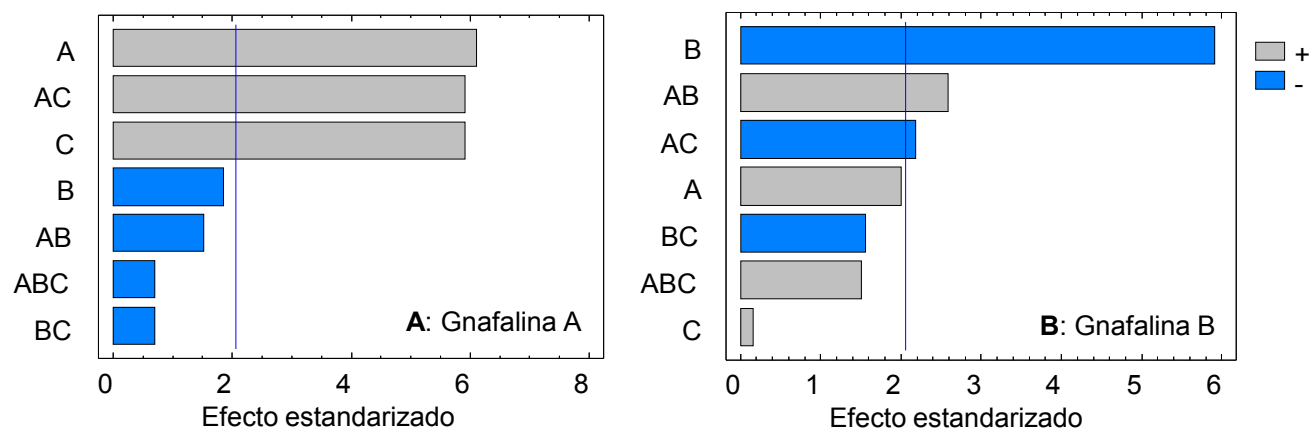


Figura 3. Cartas de Pareto para gnafalina A (Figura 3A) y gnafalina B (Figura 3B). Cualquier barra que se extienda más allá de la línea, corresponde a factores que son estadísticamente significativos con un 95.0 % de nivel de confianza. (A) Molienda; (B) Técnica de extracción; (C) Disolvente.

En la Figura 4, se muestran de manera independiente los efectos principales de cada uno de los factores sobre las respuestas (áreas cromatograficas) de gnafalina A y gnafalina B, la influencia de cada factor está representada por la longitud y la pendiente de su correspondiente línea. La extracción de gnafalina A, se favorece en los niveles +1 de molienda y disolvente (Figura 4A), y para gnafalina B en el nivel -1 de técnica de extracción (Figura 4B).

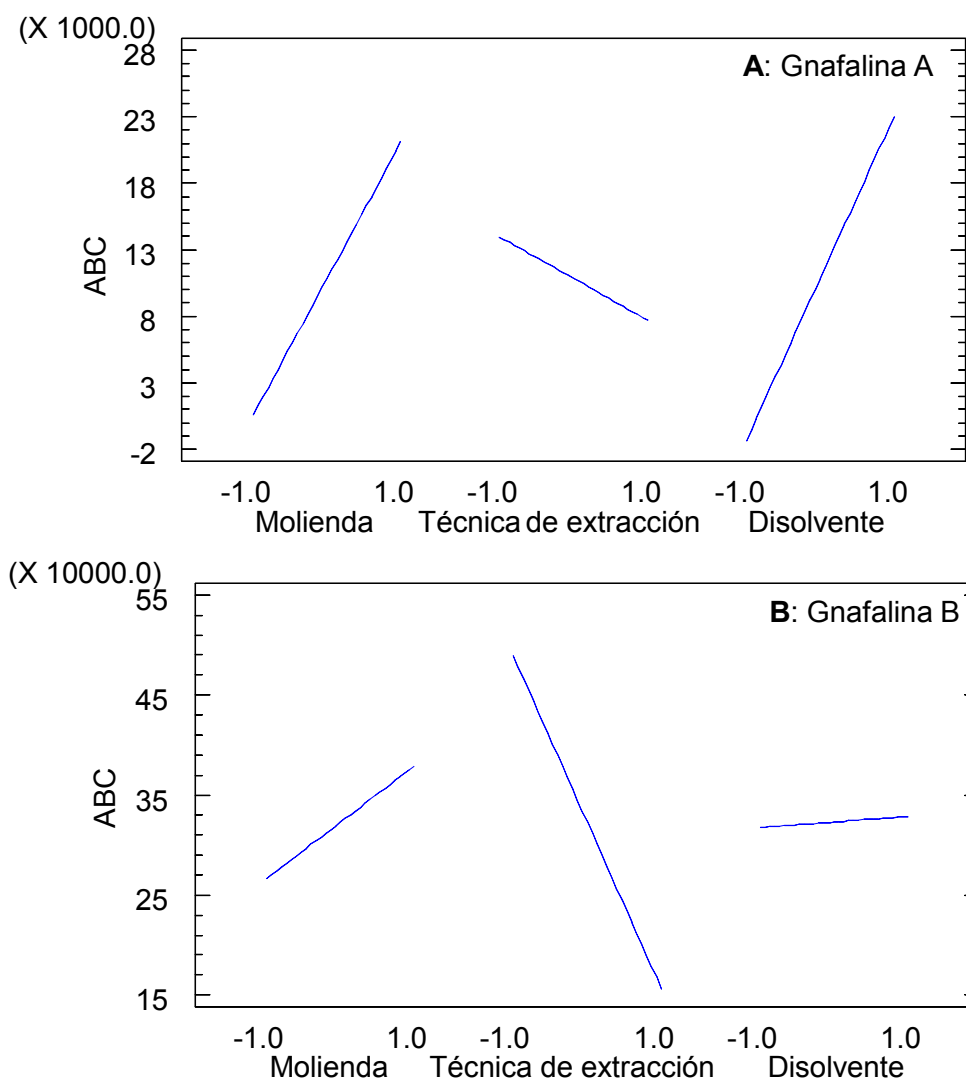


Figura 4. Gráficos de efectos principales para gnafalina A (Figura 4A) y gnafalina B (Figura 4B).

En la Figura 5 se muestran los gráficos obtenidos con el software STATGRAPHICS®, correspondientes a las interacciones entre los factores de estudio en la fase de exploración, la interacción molienda-disolvente (AC) resulto significativa para ambos metabolitos, aunque no de la misma manera, además también para gnafalina B la interacción molienda-técnica de extracción (AB), resulto significativa (Figura 3).

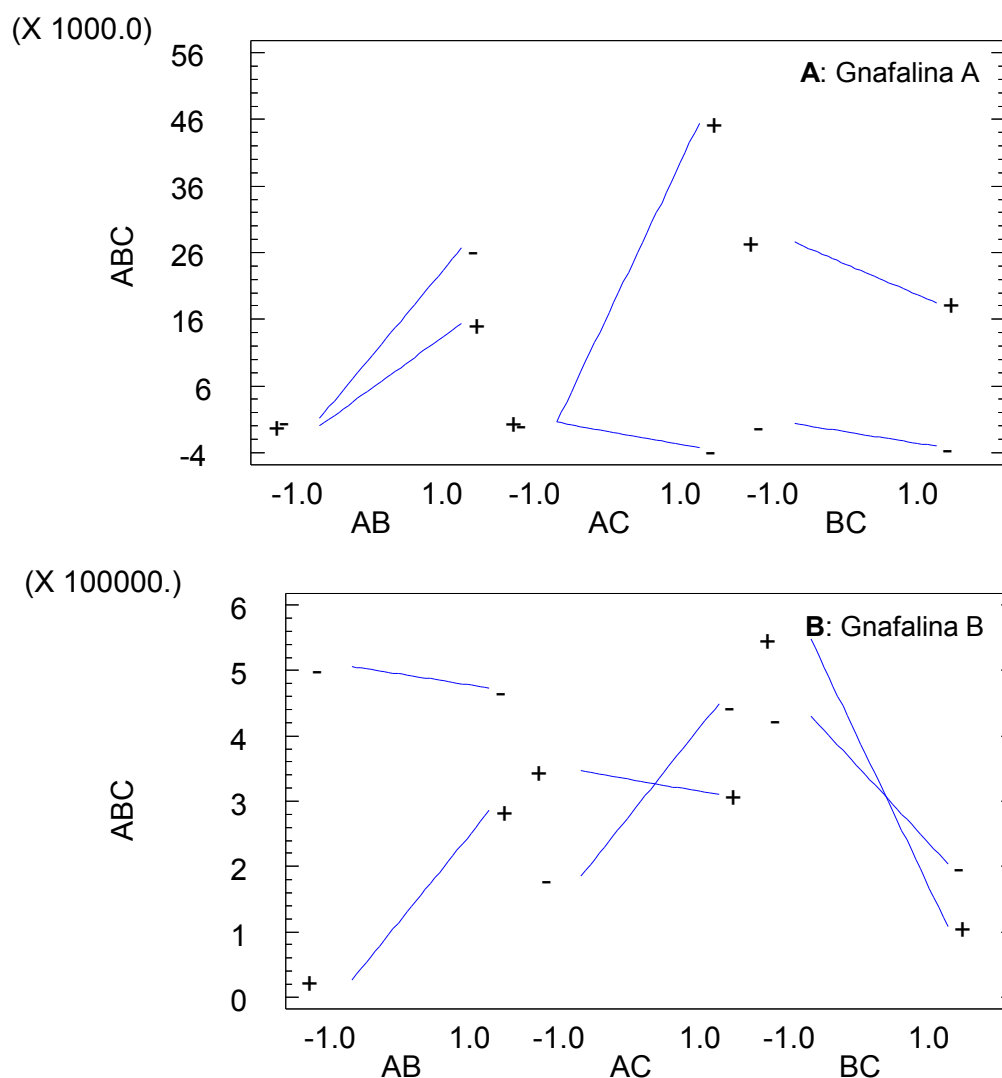


Figura 5. Gráficos de interacción para gnafalina A (Figura 5A) y gnafalina B (Figura 5B).(A) Molienda, (B) Técnica de extracción y (C) Disolvente.

El análisis de la dirección y magnitud de los tres factores de estudio (molienda, técnica de extracción y disolvente) sobre ambas respuestas de interés, se ilustra en un diagrama de cubo (Figura 6) obtenido con el software STATGRAPHICS®, donde en una de sus esquinas superiores se encuentra el valor de ***0.66**, que corresponde a la máxima deseabilidad obtenida en esta fase de exploración y que se encuentra en función de los niveles moler el material vegetal, maceración y metanol como disolvente de extracción.

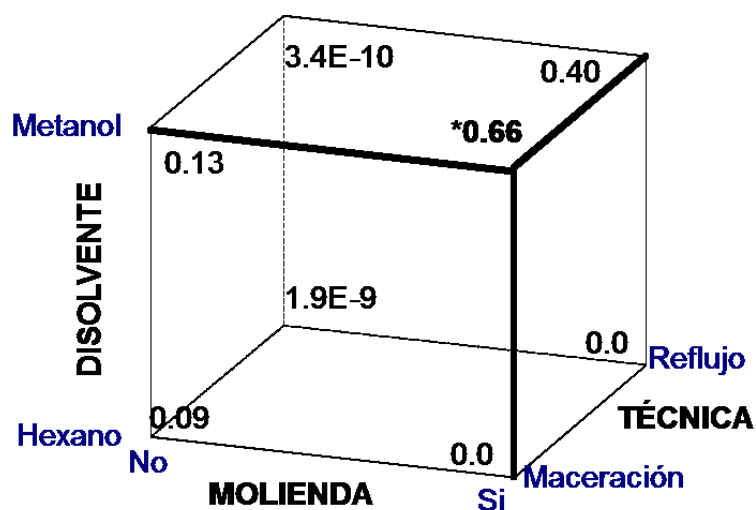


Figura 6. Gráfico cúbico de deseabilidad para gnafalina A y gnafalina B, correspondiente a fase de exploración.

6.1.2 Segunda fase: Optimización

En la Figura 7, se muestran las cartas de Pareto obtenidas con el software STATGRAPHICS® correspondientes a la optimización del proceso de maceración, se presenta cada factor e interacción en orden decreciente de magnitud. Los factores temperatura (C) y tiempo (B) de extracción favorecen de manera positiva la extracción de gnafalina A y gnafalina B respectivamente (Figura 7A y 7B), esta influencia también se observa para ambos metabolitos con el factor extracciones sucesivas (A).

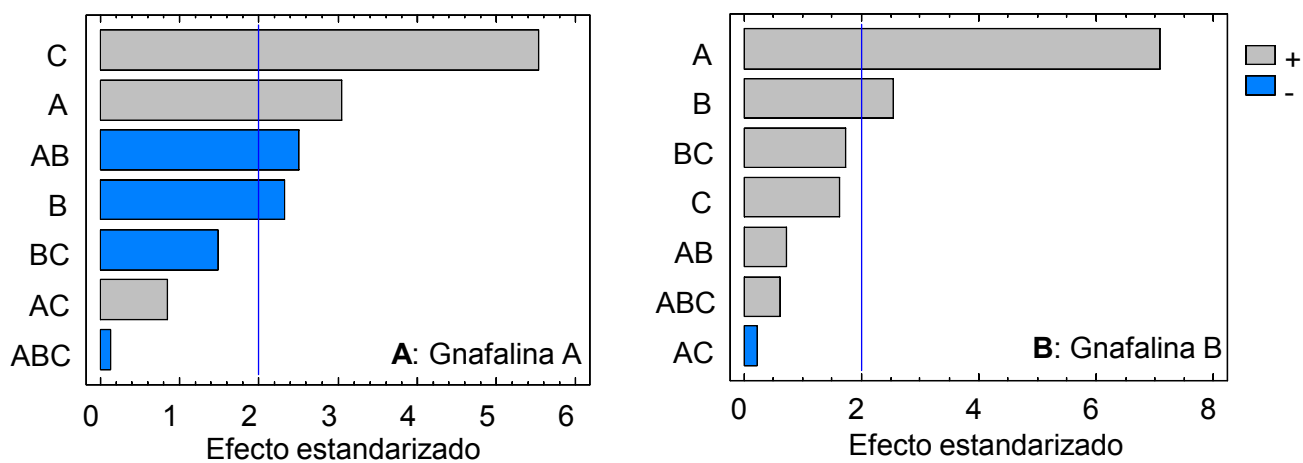


Figura 7. Cartas de Pareto para gnafalina A (Figura 7A) y gnafalina B (Figura 7B). Cualquier barra que se extienda más allá de la línea corresponde a factores que son estadísticamente significativos con un 95.0% de nivel de confianza. (A) Extracciones sucesivas, (B) Tiempo y (C) Temperatura de maceración.

En la Figura 8, se muestran los gráficos de interacción obtenidos con el software STATGRAPHICS®, que corresponden a los factores evaluados para esta fase de optimización, para gnafalina A, la interacción extracciones sucesivas-tiempo de extracción (Figura 7A) resultó significativa de manera negativa, en la Figura 8A se ilustra esta interacción, donde el área cromatográfica para este metabolito es mayor cuando las extracciones sucesivas se realizan en el menor tiempo.

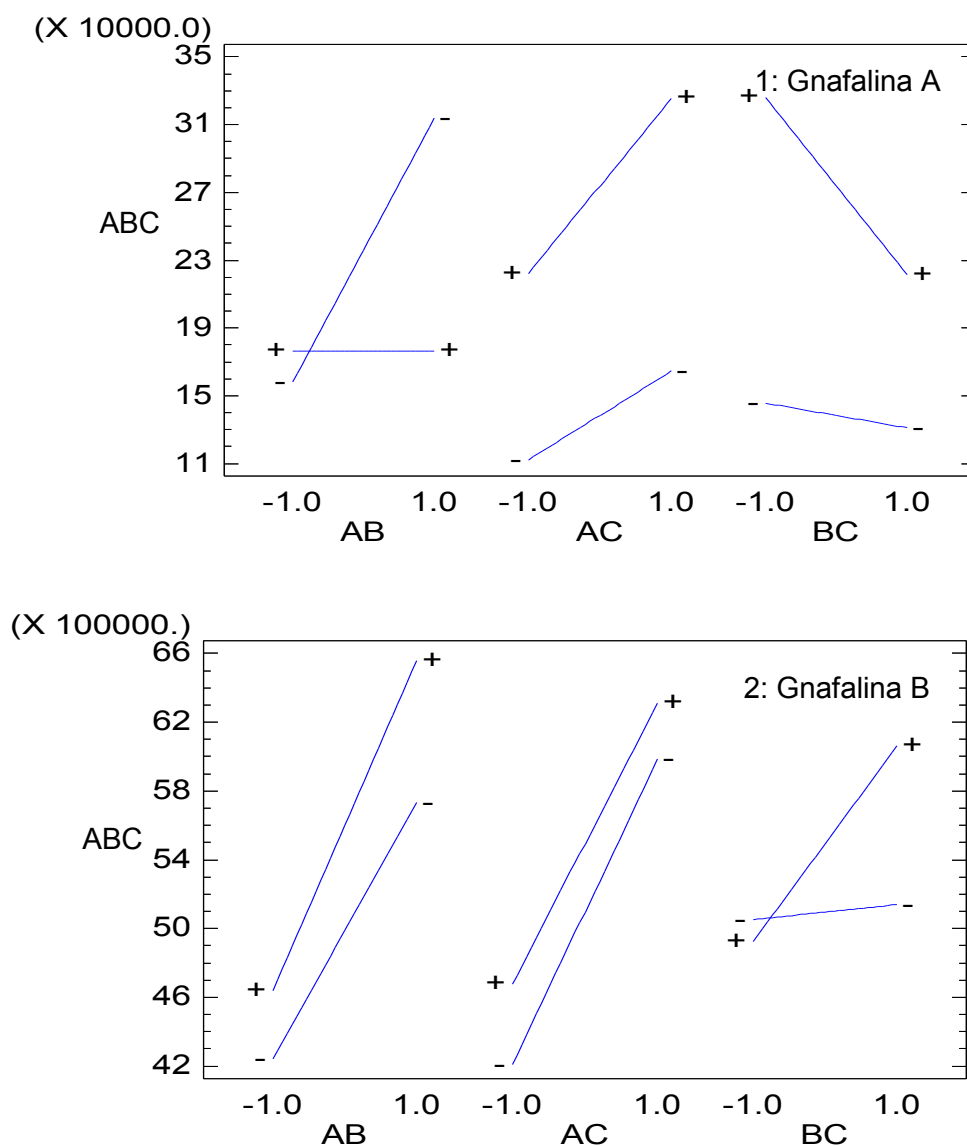


Figura 8. Gráficos de interacción para gnafalina A y gnafalina B; (A) Extracciones sucesivas, (B) tiempo y (C) temperatura.

En la Figura 9, se muestra el gráfico de superficie de respuesta de deseabilidad para ambas variables analíticas obtenidas en el proceso de maceración, se encuentran graficadas en función del número de extracciones sucesivas (A) y temperatura (C), el factor tiempo de extracción (B) se mantiene constante en su nivel óptimo de 22.28 horas (-0.143 por su valor codificado).

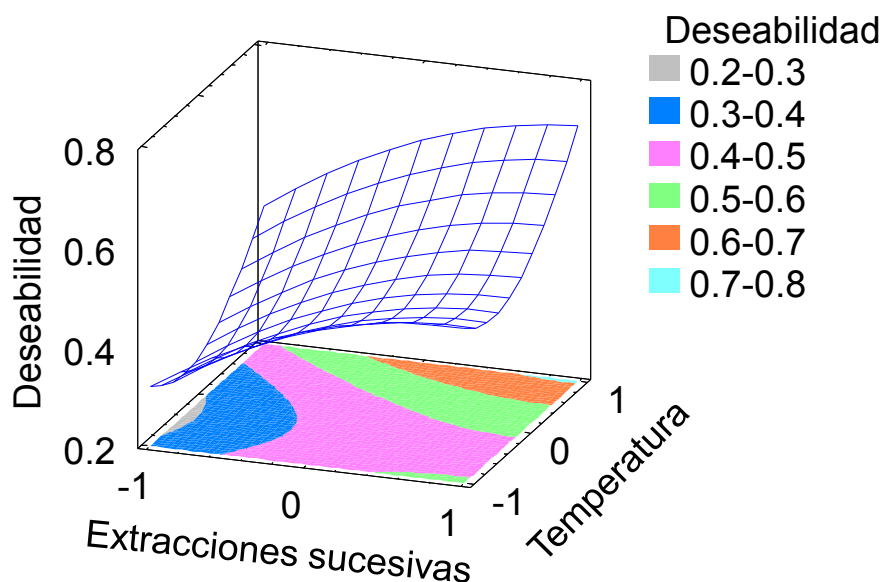


Figura 9.Superficie de respuesta estimada para gnafalina A y B.

En el cuadro 7 se resumen los niveles óptimos para cada uno de los factores evaluados, así como también las variables que se consideraron durante el proceso de extracción de gnafalina A y gnafalina B, a partir de las inflorescencias de *Gnaphalium liebmannii*.

Factores estudiados	Óptimo	Factores fijos	
Extracciones sucesivas	3	Molienda	Si
Tiempo	22.28 horas	Técnica de extracción	Maceración
Temperatura	45 °C	Disolvente	Metanol

Cuadro 7. Niveles empleados en la extracción de gnafalina A y gnafalina B.

6.2 Análisis fitoquímico de *Gnaphalium liebmannii*

Tras la optimización de los factores investigados y los insumos tenidos en el laboratorio, el procedimiento optado para la extracción simultánea de los metabolitos secundarios de *Gnaphalium liebmannii* fue mediante la maceración en metanol de la planta con tres extracciones sucesivas de 72 horas cada una, en la Figura 10 se muestra el cromatograma del extracto, obtenido bajo estas condiciones con un rendimiento del 23.13% (respecto a la planta seca).

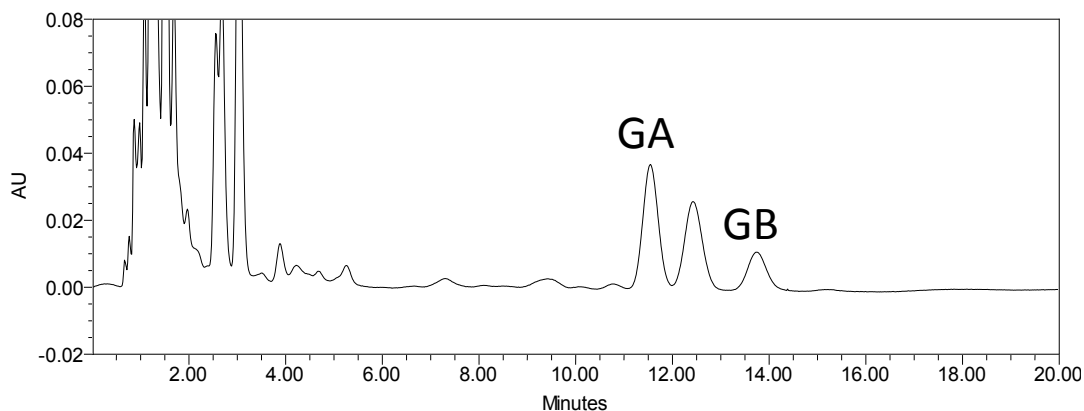


Figura 10. Cromatograma tipo de extracto metanólico de *Gnaphalium liebmannii*, obtenido con los resultados del diseño experimental.

El fraccionamiento de este extracto en columna cromatográfica muestra la presencia de los compuestos de interés en al menos 10 de las fracciones con polaridad Hexano/Acetato de etilo 80:20 las cuales al concentrarse, en cada una de ellas precipita un sólido amarillo y amorfo (1.36 g) insoluble en hexano y soluble en metanol, que corresponde a una mezcla de compuestos entre ellos los de interés según su análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (Figura 11).

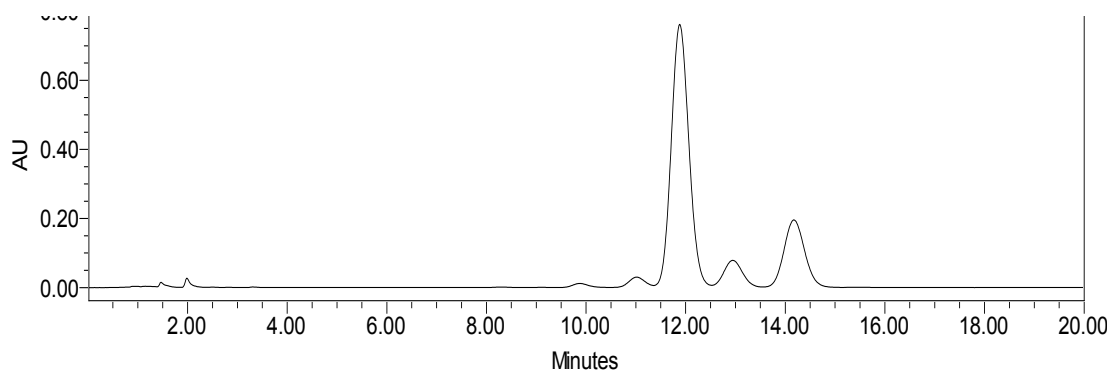


Figura 11. Cromatograma correspondiente a mezcla de gnafalina A, gnafalina B y un tercer compuesto.

El sobrenadante de estas fracciones se separó y concentró a sequedad (10 g) para ser fraccionado en una segunda columna fase normal empleando como fase móvil Hexano/Acetato de etilo 95:5; en las fracciones 35-51 precipitó un sólido algodonoso (55 mg) de color amarillo claro, con olor dulce y un punto de fusión de 171-172°C, en cromatografía de líquidos de alta resolución, muestra un tiempo de retención de 13.97 minutos (Figura 12), que corresponde al compuesto isognafalina **1** (5,8-dihidroxi-3,7-dimetoxiflavona, $C_{17}H_{14}O_6$ PM: 314 g/mol), según los espectros de resonancia magnética nuclear (1H y ^{13}C) y espectrometría de masas, que corresponden con los descritos en la literatura para este compuesto (Hirschmann, 1984); a parte de este compuesto, también se logra aislar de esta misma columna gnafalina A (6 mg), gnafalina B (7 mg) y un tercer sólido (130 mg) el cual se recrystalizó en mezcla etanol/agua originando cristales amarillos (15.8 mg) en forma de agujas muy bien definidas con un punto de fusión de 173-175°C con un tiempo de retención de 12.6 minutos (Figura 13) y que corresponde al compuesto 3,5-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona **2** ($C_{18}H_{16}O_7$ PM:344 g/mol) según los espectros de resonancia magnética nuclear (1H y ^{13}C), espectrometría de masas y literatura (Guerreiro *et al.*, 1981).

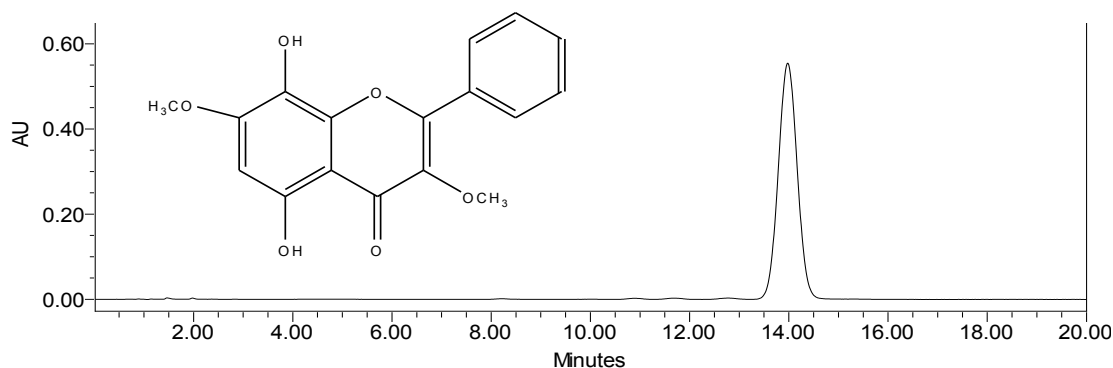


Figura 12. Cromatograma del compuesto isognafalina **1**, tiempo de retención 13.97 minutos

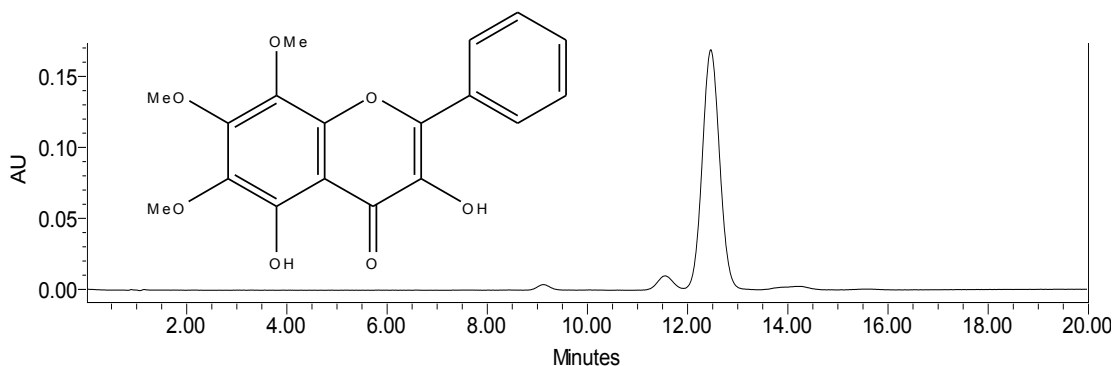


Figura 13. Cromatograma del compuesto 3,5-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona **2**, tiempo de retención 12.6 minutos

Continuando con el análisis fitoquímico inicial, al concentrarse las fracciones 1-4 Hexano/Acetato de etilo 70:30 se aisló un sólido cristalino translucido de forma cúbica **JGRAN-1-90** (203 mg) con punto de fusión de 179-181°C, insoluble en hexano o acetato de etilo y muy soluble en diclorometano, en cromatografía de capa fina y a luz UV (254 nm) el compuesto reveló de color azul cielo y presentó un tiempo de retención en cromatografía de líquidos de alta resolución de 13.20 minutos (Figura 14), la elucidación de su estructura aun no ha sido posible.

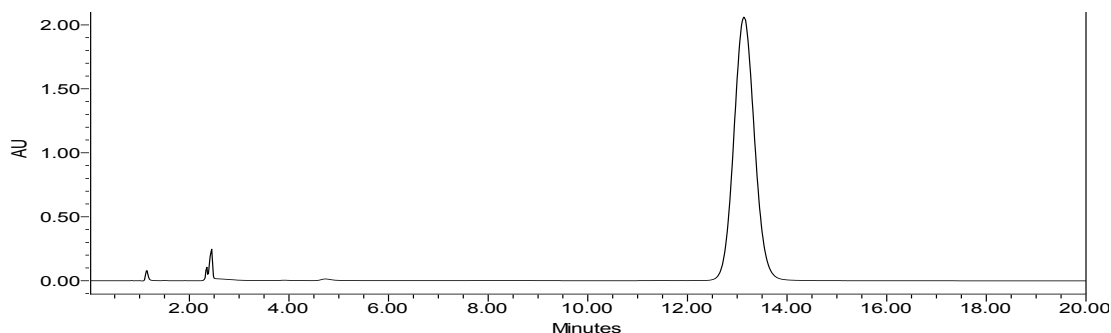


Figura 14. Cromatograma del compuesto JGRAN-1-90, tr 13.2 min.

En esta misma polaridad (Hexano/Acetato de etilo 70:30), de las fracciones 4-11 se obtuvo un sólido amorfo de color verde claro (**JGRAN-1-78**, 1178 mg) soluble en metanol, ligeramente solubles en diclorometano e insoluble en hexano, por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución, se observó la presencia de al menos 3 compuestos con un tiempo de retención entre 2.4 y 3.5 min (Figura 15). 100 mg de este sólido se fraccionaron en una columna empacada con Sephadex LH-20 y eluida con metanol, se obtuvieron A (fracciones 3-6), B (fracciones 8-11) y C (fracciones 13-19), de las cuales B se fraccionó posteriormente en una columna de menor diámetro empleando la misma fase estacionaria y fase móvil obteniendo finalmente 17.7 mg de cristales amarillos algodonosos JGRAN-1-87-(9-13) con un punto de fusión de 283-286°C, el compuesto corresponde a 3-O-metilquercetina **3** (5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-metoxiflavona), Figura 16 según los espectros de resonancia magnética nuclear (^1H y ^{13}C), espectrometría de masas y datos de la literatura (Markham *et al.*, 1969).

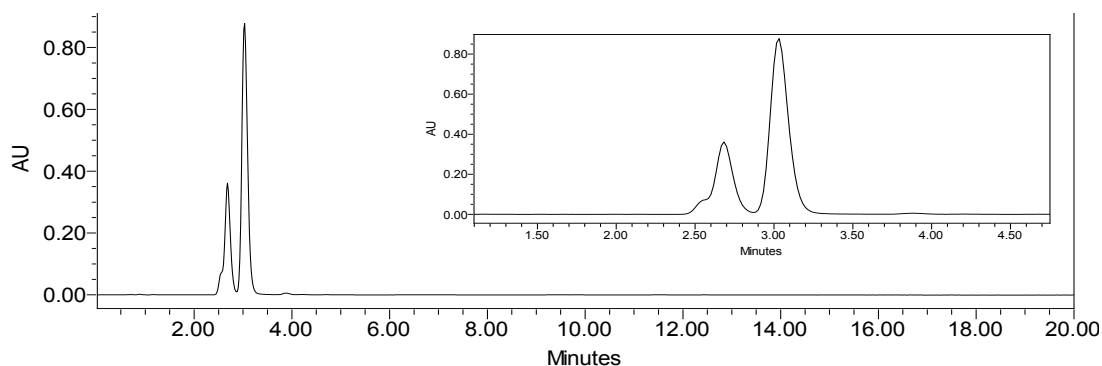


Figura 15. Cromatograma correspondiente a sólido JGRAN-1-78, obtenido de fracciones Hexano/AcOEt 70:30.

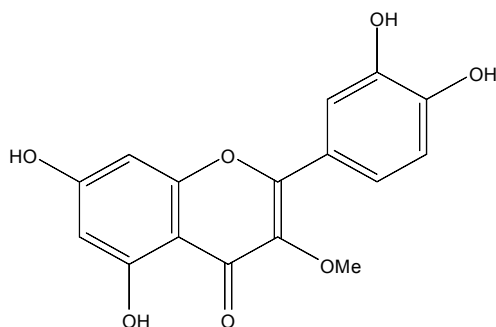


Figura 16. Compuesto 3-O-metilquercetina **3**.

De las fracciones Hexano/Acetato de etilo 60:40 (11 fracciones), se obtuvo un sólido JGRAN-1-83 (907.5 mg), el cual por cromatografía en capa fina corresponde a JGRAN-1-78.

Finalmente se obtuvieron también 15 fracciones de AcOEt, las cuales se juntaron y posteriormente se eluyeron en una columna fase reversa con metanol, para eliminar el exceso de pigmentos y obtener un sólido amorfo amarillo **JGRAN-1-87** (1.17 g) el cual por cromatografía de líquidos de alta resolución (Figura 17), muestra ser una mezcla de compuestos con un tiempo de retención entre 1.5 y 2 min.

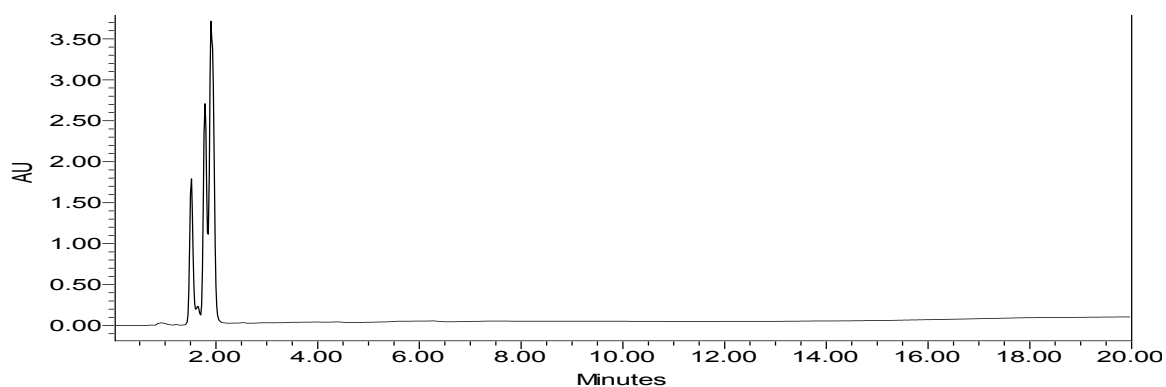


Figura 17. Cromatograma correspondiente a JGRAN-1-87, obtenido de fracciones AcOEt.

Adicionalmente al estudio fitoquímico del extracto metanólico, se aisló el compuesto 5 hidroxí-3,7-dimetoxiflavona **4** (Figura 18), del extracto hexánico de *Gnaphalium liebmannii*, al cual también se valoró como agente relajante del músculo liso traqueal de cobayo, sin embargo no presentó efecto relajante en este modelo (Figura 20).

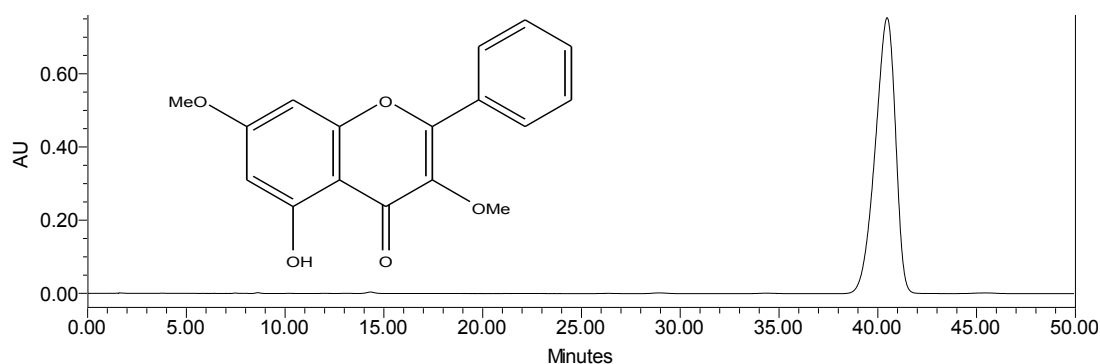


Figura 18. Cromatograma correspondiente a 5 hidroxí-3,7-dimetoxiflavona **4**, tiempo de retención 40.39 min

6.3 Evaluación preliminar del efecto relajante de compuestos aislados

En la Figura 19, se muestran las curvas concentración-respuesta del efecto relajante de los sólidos (mezcla de compuestos) **JGRAN-1-78**, **JGRAN-1-87** y mezcla de **gnafalinas** obtenidos en el estudio químico de *Gnaphalium liebmannii*. El sólido JGRAN-1-78 muestra mayor actividad con $CE_{50}=26.32\pm0.45\mu\text{g}/\text{mg}$ (Cuadro 8).

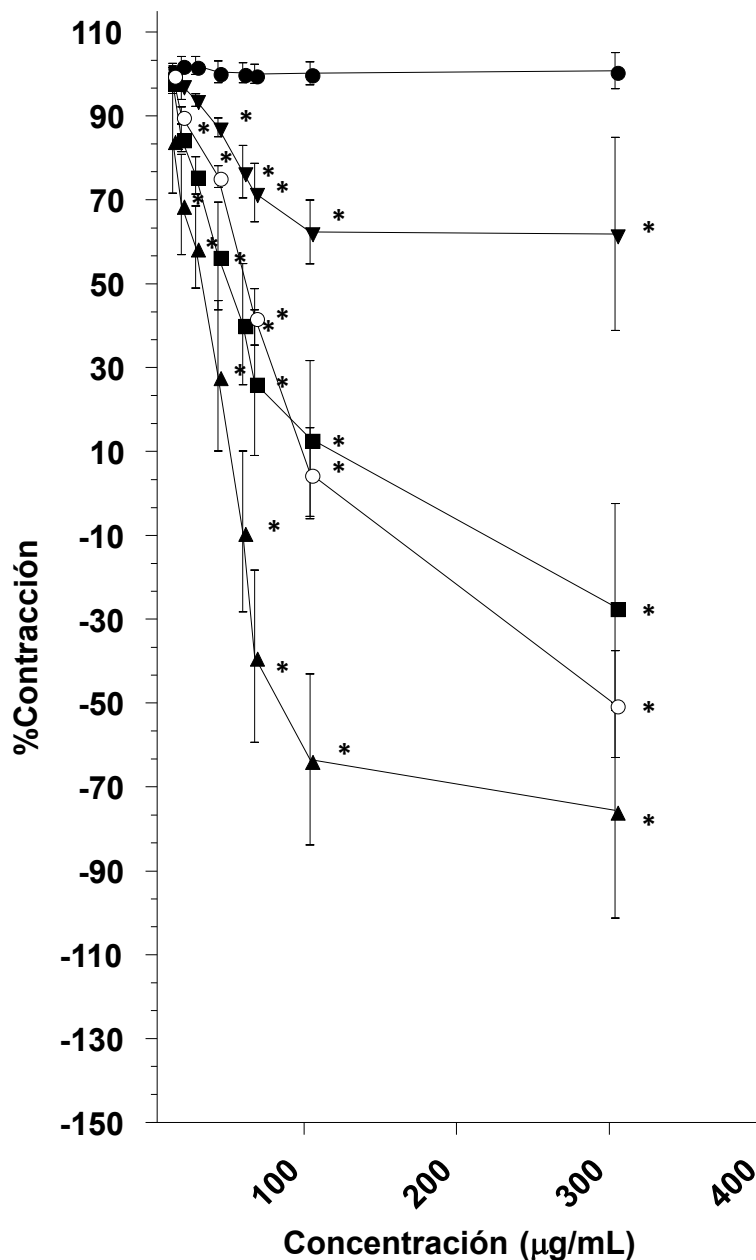


Figura 19. Curvas concentración respuesta del efecto relajante de los sólidos: mezcla de gnafalinas (○), JGRAN-1-87 (▼), JGRAN-1-78 (▲). Control (●) y aminofilina (■), cada punto corresponde a la media $\pm$ EEM. * $p<0.05$ respecto al grupo control.

En la Figura 20, se muestran las curvas concentración-respuesta del efecto relajante de los compuestos isognafalina **1**, 3,5-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona **2**, 5-hidroxi-3,7-dimetoxiflavona **4** y JGRAN-1-90, obtenidos en el estudio químico de *Gnaphalium liebmannii*, El compuesto isognafalina fue el más activo con $CE_{50}=24.90\pm0.43 \mu\text{g/mL}$ (Cuadro 8).

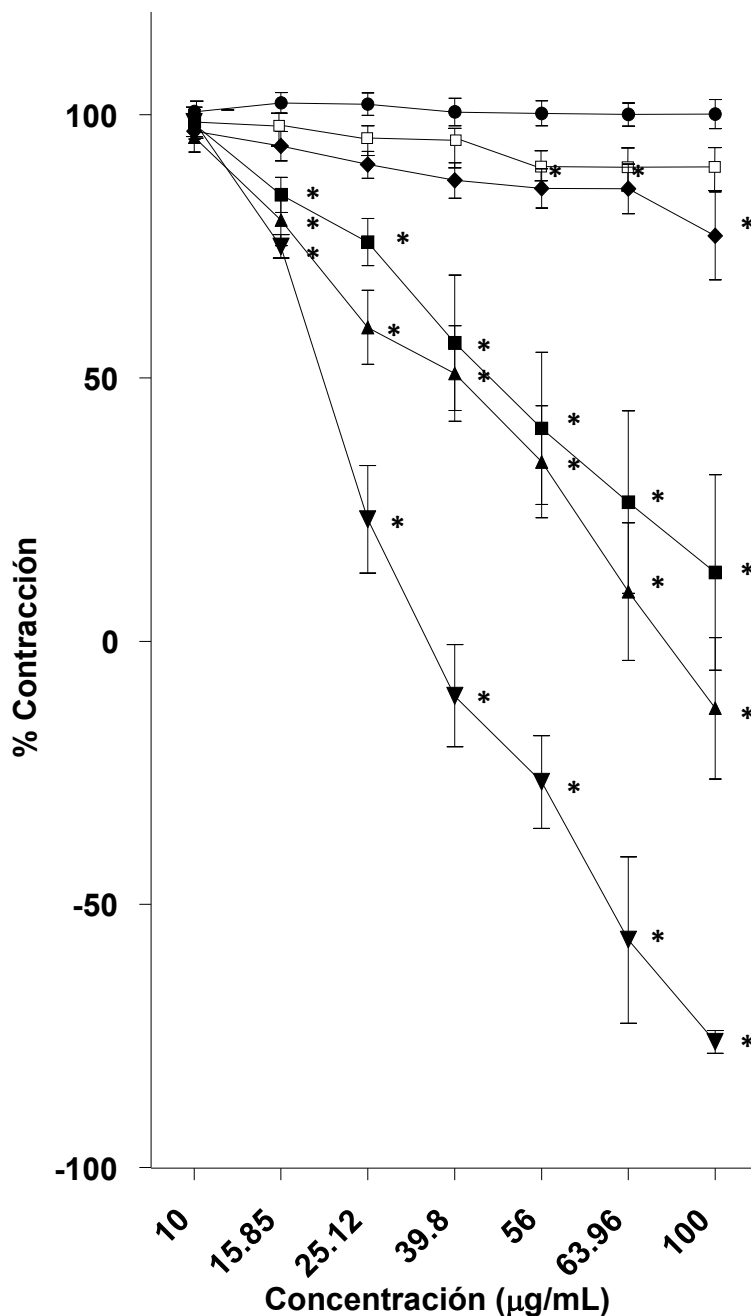


Figura 20. Curvas concentración respuesta del efecto relajante de Isognafalina **1** (▼), 3,5-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona **2** (▲), 5-hidroxi-3,7-dimetoxiflavona **4** (□) y JGRAN-1-90 (◆), también se presenta aminofilina (■) y control (●). Cada punto corresponde a la media $\pm$ EEM. * $p<0.05$ respecto al grupo control.

Mezcla de compuestos	CE₅₀±EEM (µg/mL)
Gnafalinas	61.96±0.55
JGRAN-1-78	26.32±0.45
JGRAN-1-87	167.80 ±0.55
Compuestos	
5-Hidroxi-3,7-dimetoxiflavona 4	Sin efecto
Isognafalina 1	24.90 ±0.43
3,5-Dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona 2	30.44±0.51
JGRAN-1-90	>100
Gnafalina A	63.05*
Gnafalina B	43.10*
Aminofilina	39.86 ±0.69

Cuadro 8. Valores de CE₅₀ de los sólidos (mezcla de compuestos) y compuestos aislados en el estudio quico de *Gnaphalium liebmannii*. * valores teóricos.

VII. Discusión

Mediante los resultados obtenidos en la primera fase de exploración, se logró observar que el extracto hexánico, el cual se reporta biológicamente más activo (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2007) no es un extracto rico en los compuestos activos de *Gnaphalium liebmannii*, esto se deduce a partir de las cartas de Pareto (Figura 3A), donde el efecto de la molienda (A) y el disolvente (C) son las variables más importantes con un efecto significativo ($p < 0.05$) en la extracción de gnafalina A, ambos factores muestran un efecto positivo sobre el área cromatográfica obtenida y se ilustra en la Figura 4A, donde las rectas correspondientes a los factores A y C son largas y con pendiente positiva, lo que indica que el rendimiento de extracción de gnafalina A se ve favorecido al trabajar en los niveles más altos correspondientes a estos factores (material vegetal molido y metanol), además la interacción (AC) de estos factores, también fue significativa para ambos metabolitos (Figura 5) aunque no de la misma manera, en el caso de gnafalina A, esta interacción afecta de manera positiva (Figura 3A y 5A) y concuerda con el gráfico de efectos principales correspondientes a estos factores (Figura 4A).

En tanto que para gnafalina B, la técnica de extracción es el factor que más influye en su extracción al ser estadísticamente significativo (Figura 3B), en el gráfico de efectos principales (Figura 4B) se observa a la recta correspondiente a la técnica de extracción con pendiente negativa, lo que sugiere emplear a la maceración como principal técnica de extracción de este metabolito, al igual que gnafalina A, la interacción molienda-disolvente (AC) Figura 5B afecta de manera negativa, en comparación con la interacción molienda-técnica de extracción (AB, Figura 3B) donde la interacción es positiva y según su respectivo gráfico de interacción (Figura 5B), la mejor respuesta se obtiene al realizar la maceración del material vegetal previamente molido.

De manera general, las áreas bajo la curva obtenidas en este diseño para gnafalina A y gnafalina B en función de los tres factores evaluados, se ilustra con un gráfico cúbico de deseabilidad (Figura 6) donde la deseabilidad máxima obtenida para este diseño factorial es 0.66 (siendo 1 la deseabilidad máxima), y se encuentra posicionada en la esquina correspondiente a los niveles molienda, maceración y metanol, si bien al moler el material vegetal se favorece la extracción de los metabolitos secundarios, debido a que la

disminución del tamaño de partícula, aumenta la superficie de contacto entre el material vegetal y el disolvente, lo que incrementa el grado de difusión del disolvente a través del tejido celular; en el caso el metanol por su carácter de alcohol, la permeabilidad del disolvente a través de las paredes celulares de la matriz vegetal se favorece y aumenta la extracción de los metabolitos de interés junto con otros metabolitos de mediana y alta polaridad (Satyajit D. *et al.*, 2006). El extracto metanólico muestra también ser el extracto con el mayor rendimiento (23.13 % respecto al peso seco de la planta), además que su elución en la columna cromatográfica no es mayor problema al contener mínima cantidad de ceras comparado con cualquiera de los otros dos extractos.

El segundo diseño factorial tipo 3^3 se planteó con la finalidad de optimizar el proceso de maceración y como los resultados lo indican, la interacción entre el número de extracciones sucesivas-tiempo de maceración (AB) solo fue significativa para gnafalina A en la Figura 8A se ilustra esta interacción y se observa que el mejor rendimiento del metabolito es obtenido, al realizar 3 extracciones y cada una de ellas se realice cada 12 horas. En general, los demás efectos de interacción no muestran ser significativos, pero los gráficos a estas interacciones permitieron visualizar la influencia que tienen en el proceso de extracción, Así para ambas variables (Figura 8), el gráfico de interacción AC (extracciones sucesivas-temperatura de extracción), muestra que el incremento de la temperatura favorece la extracción y disminuye el tiempo de extracción en el caso de gnafalina A (Figura 8A). En relación al número de extracciones sucesivas, se llega a una conclusión parecida observando los gráficos de interacción AC (extracciones sucesivas-temperatura) y AB (extracciones sucesivas-tiempo).

La construcción de gráficos de superficie de respuesta (Figura 9), permite describir el comportamiento de cada uno de los tres factores y la interacción entre éstos sobre la cantidad extraída de los dos componentes de interés (gnafalina A y gnafalina B) de forma simultánea, a través de un valor de deseabilidad, las condiciones óptimas específicas de extracción según este diseño se indican en el Cuadro 7.

El escalamiento de la extracción por maceración a partir de *Gnaphalium liebmannii* (espécimen colectado), se realizó mediante tres extracciones sucesivas de 72 horas cada una a temperatura ambiente, principalmente para reducir la evaporación y consecuente

disminución del volumen de disolvente a 45 °C, permitiendo así la obtención de un extracto con un 23.14 % de rendimiento con respecto al material vegetal seco.

El análisis químico del extracto metanólico permitió el aislamiento de cuatro compuestos aún no reportados para *Gnaphalium liebmannii*, tales compuestos fueron isognafalina **1**, 3,5-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona **2**, y 3-metil éter quercetina **3**, además de 5 hidroxí-3,7-dimetoxiflavona **4** a partir del extracto hexánico.

Respecto a la actividad relajante de los compuestos aislados en el modelo farmacológico de tráquea aislada de cobayo, se observa que la actividad relajante de los cuatro flavonoides aislados dependen del tipo de estructura química, es decir de la posición y número de sustituciones en el núcleo del flavonoide y en el anillo B, según Wun-Chang y colaboradores (2004), la presencia de la doble ligadura entre C-2 y C-3, así como la presencia de grupos OH en C-3 y C-7 y la orto-sustitución en el anillo B en C-3' y C-4', incrementan la actividad relajante de los compuestos vía inhibición de fosfodiesterasas. Las estructuras de los cuatro flavonoides aislados en este trabajo, contienen grupos –OH libres ya sea en C-5, C-6, C-7 o grupos metoxilo (–OCH₃) en C-3, C-6 o C-7.

Estos resultados sugieren que en el extracto metanólico principalmente hay un mayor número de estructuras con grupos –OH libres en posiciones estratégicas, que les confieren una actividad relajante más alta que los que pudiera encontrarse en el extracto de Hexano, además por su aspecto y consistencia, el extracto metanólico de *Gnaphalium liebmannii* contiene compuestos más polares que probablemente reducen su actividad biológica *in situ* como oportunamente lo ha demostrado Sánchez-Mendoza y colaboradores (2007). Sin embargo, el derivado de quercetina (3-O-metilquercetina **3**) detectado y aislado del sólido JGRAN-1-78, contiene –OH libres en C-5, C-7, C-3' y C-4', los cuales se ha demostrado le confieren una actividad relajante importante e inclusive especificidad por PDE3 (Wun-Chang K. *et al.*, 2003 y 2004).

Los datos estadísticos obtenidos de las curvas concentración respuesta (Figura 20), fueron significativos para los compuestos evaluados, con excepción del compuesto 5-hidroxí-3,7-dimetoxiflavona **4** obtenido del extracto de hexánico, en el cuál prácticamente no tuvo actividad relajante (Cuadro 8), según la relación estructura actividad (Wun-Chang K. *et al.*,

2004) la presencia del único grupo –OH en C-5 en este compuesto, no es importante en la inhibición de fosfodiesterasas, como si estuviese en C-3 o C-7.

VIII. Conclusiones

La maceración en metanol de las inflorescencias molidas, con tres extracciones sucesivas de 22 horas cada una, a 45°C, mejoran el rendimiento de extracción de gnafalinas.

Se logró el aislamiento e identificación de 4 compuestos adicionales a los ya descritos para *Gnaphalium liebmannii*, los cuales fueron Isognafalina **1**, 3,5-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona **2**, 3-O-metilquercetina **3** y 5-hidroxi-3,7-dimetoxi-flavona **4**.

Los flavonoides activos adicionales a las gnafalinas A y B presentaron el siguiente orden de actividad: Isognafalina **1** > 3,5-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona **2** > 5-hidroxi-3,7-dimetoxiflavona **4**.

La mezcla de compuestos JGRAN-1-78, contiene al menos un compuesto con mejores propiedades de relajación del músculo liso, en comparación a gnafalina A y gnafalina B.

IX. Perspectivas

Identificar por medio de sus propiedades espectrométricas y espectroscópicas, al compuesto JGRAN-1-90.

Desarrollar un método de aislamiento de los metabolitos secundarios contenidos en la mezcla JGRAN-1-78, ya que su estudio preliminar en el modelo de relajación y análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución, muestran la presencia de compuestos (entre ellos 3-O-metilquercetina) con actividad relajante superior a gnafalina A o gnafalina B.

Evaluar la actividad biológica de 3-O-metilquercetina y compararla con los datos existentes en la literatura.

Realizar el estudio comparativo entre las demás especies de gordolobo (*Gnaphalium sp.*) mexicano.

Anexo A

Propuesta de monografía, para gordolobo.

GORDOLOBO

Gnaphalium sp.

DEFINICIÓN. Consiste en las partes aéreas desecadas de varias especies del género *Gnaphalium*. Familia *Asteraceae*. Las especies más comunes son *G. liebmannii*, *G. oxyphyllum* y *G. viscosum*., Contiene no menos de 0,08% de mezcla de gnafalinas A y B ($C_{17}H_{14}O_6$; MM 314.28), respecto a la droga vegetal seca.

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA. Hierba de 10 a 150 centímetros de alto, de ramificación nula o profusa en ocasiones rizomatosa; tallo con indumento lanoso o aracnoideo; roseta basal presente o ausente. Hojas percioladas a sésiles, estrechamente elípticas u oblanceoladas de 2 a 9 centímetros de largo y de 0.5 a 1.5 centímetros de ancho, ápice romo a agudo, la base atenuada, concoloras, con indumento lanoso, margen liso, sésiles, no auriculadas ni decurrentes, concoloras; inflorescencia glomerular simple o corimbosa congesta; cabezuelas acampanadas, de 3 a 9 milímetros de largo y de 2.5 a 7 milímetros de diámetro, de color café dorado, café rojizo o café amarillento. Presenta olor aromático y sabor ligeramente amargo.

METALES PESADOS. MGA 0561, Método II. No más de 30 ppm.

ENSAYOS DE IDENTIDAD. MGA-FH 0050, Cromatografía en capa delgada.

Soporte. Gel de sílice F₂₅₄ Merck.

Fase móvil. Mezcla de hexano:acetato de etilo (60:40)

Preparación de la muestra. Extraer 2.0 g de planta con 100 mL de metanol, calentando a reflujo por una hora. Dejar enfriar, filtrar y concentrar a presión reducida hasta sequedad. El extracto seco se disuelve con 2 mL de metanol.

Preparación de referencia. Disolver 1.6 mg de gnafalina A o B en 2 mL de metanol.

Procedimiento. Aplicar en carriles separados, 2.0 µL de cada preparación, desarrollar la cromatoplaaca hasta que el frente de la fase móvil haya recorrido 90 por ciento a lo largo, dejar secar la placa. Examinar bajo lámpara UV a 254 nm.

Interpretación. En el cromatograma obtenido con la preparación de la muestra se observa una mancha de fluorescencia a 254 nm, tenue similar a la posición y fluorescencia a la mancha obtenida en el cromatograma con la preparación de referencia.

MATERIA EXTRAÑA. *MGA-FH 0030.* No más de 10.0 por ciento de tallos y no más de 2.0 por ciento de otros elementos extraños. Determinar en 50 g de la droga vegetal.

PÉRDIDA POR SECADO. *MGA-FH 0080.* No más de 6.0 por ciento. Determinar en 1.0g de droga molida, secar en una estufa hasta peso constante a una temperatura de 100°C a 105°C.

MATERIAL EXTRAIBLE. *MGA-FH 0070. Método 1. Extracción en caliente.* No menos del 27.0 por ciento en agua, 23.0 por ciento en metanol, 17.0 por ciento en etanol, 5.0 por ciento en diclorometano y 2.0 por ciento en hexano. Colocar 2.0 g de droga vegetal en 150 mL de disolvente.

VALORACIÓN. *MGA 241, Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.*

Soporte. Columna de acero inoxidable, de 15.0cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, empacada con gel de sílice octadecilsilano para cromatografía (5 µm).

Fase móvil. Mezcla de ácido fosfórico 0.02%:metanol:acetonitrilo (50:30:20).

Flujo. 1.5 mL/min

Temperatura. 40 °C

Detector. UV/VIS ajustado a 270 nm

Preparación de la muestra. A 200 mg de droga vegetal molida añadir 4 mL de metanol y sonicar por 30 minutos, centrifugar por 15 minutos a 6000 rpm. Transferir el sobrenadante a un matraz volumétrico de 10 mL. Repetir tres veces combinando el sobrenadante en el mismo matraz. Ajustar al volumen final a 10 mL con metanol.

Preparación de referencia. Diluir 1 mL de la preparación de referencia descrita en el Ensayo de identidad hasta 5 mL con metanol.

Procedimiento. Inyectar la preparación de la muestra. Determinar el tiempo de retención de la gnafalina A o B, utilizando 10 µL de la preparación de referencia examinada bajo las mismas condiciones que la preparación de la muestra.

Interpretación.

$$CG = 0.16 (Am/Ar)$$

Donde:

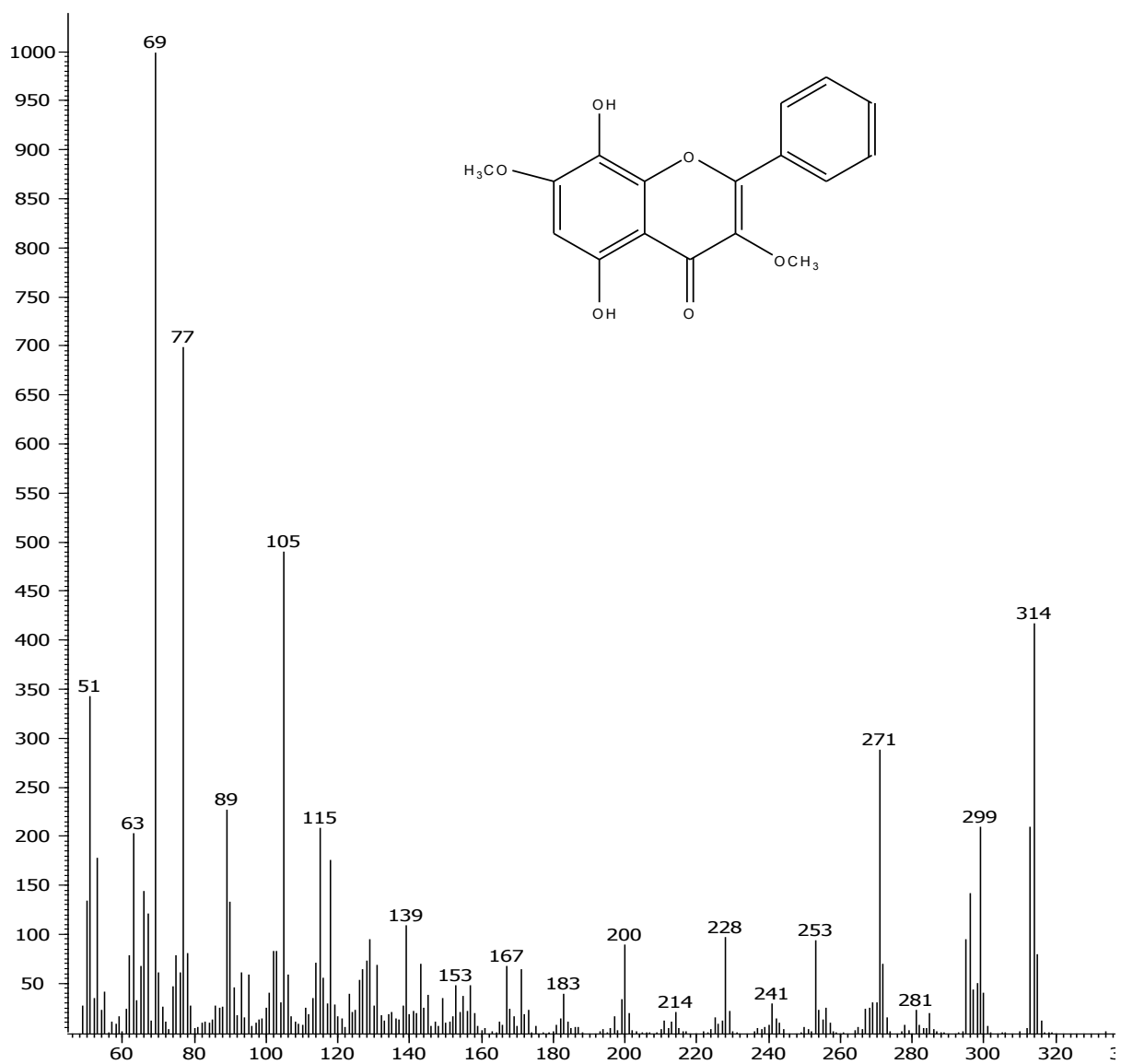
CG = Concentración de gnafalina en la muestra

Am = Área del pico correspondiente a gnafalina, en el cromatograma de la preparación de la muestra.

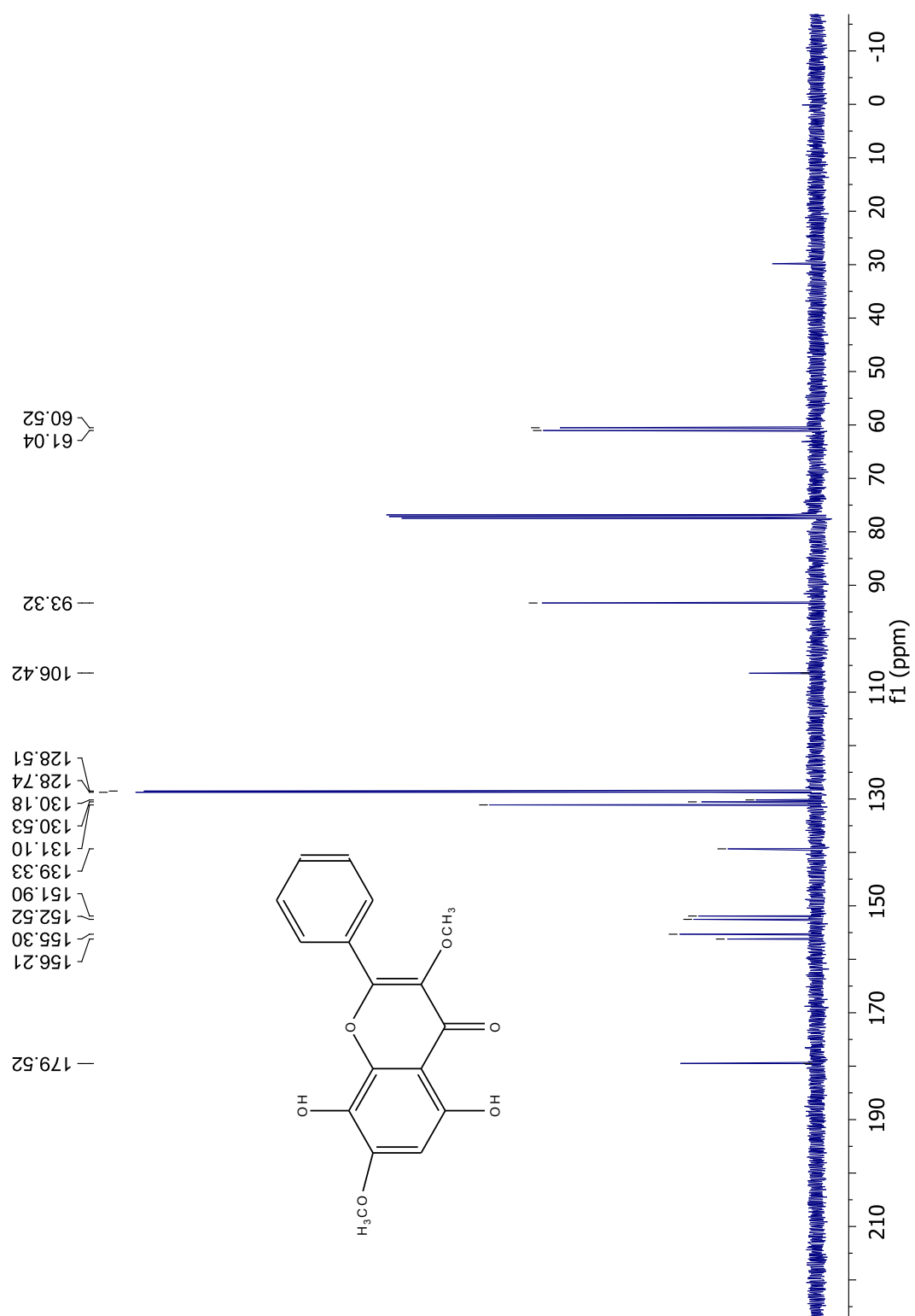
Ar = Área del pico correspondiente a gnafalina, en el cromatograma de la preparación de la referencia

CONSERVACIÓN. A temperatura ambiente, en envases cerrados, sacos o costales protegidos de la luz y la humedad.

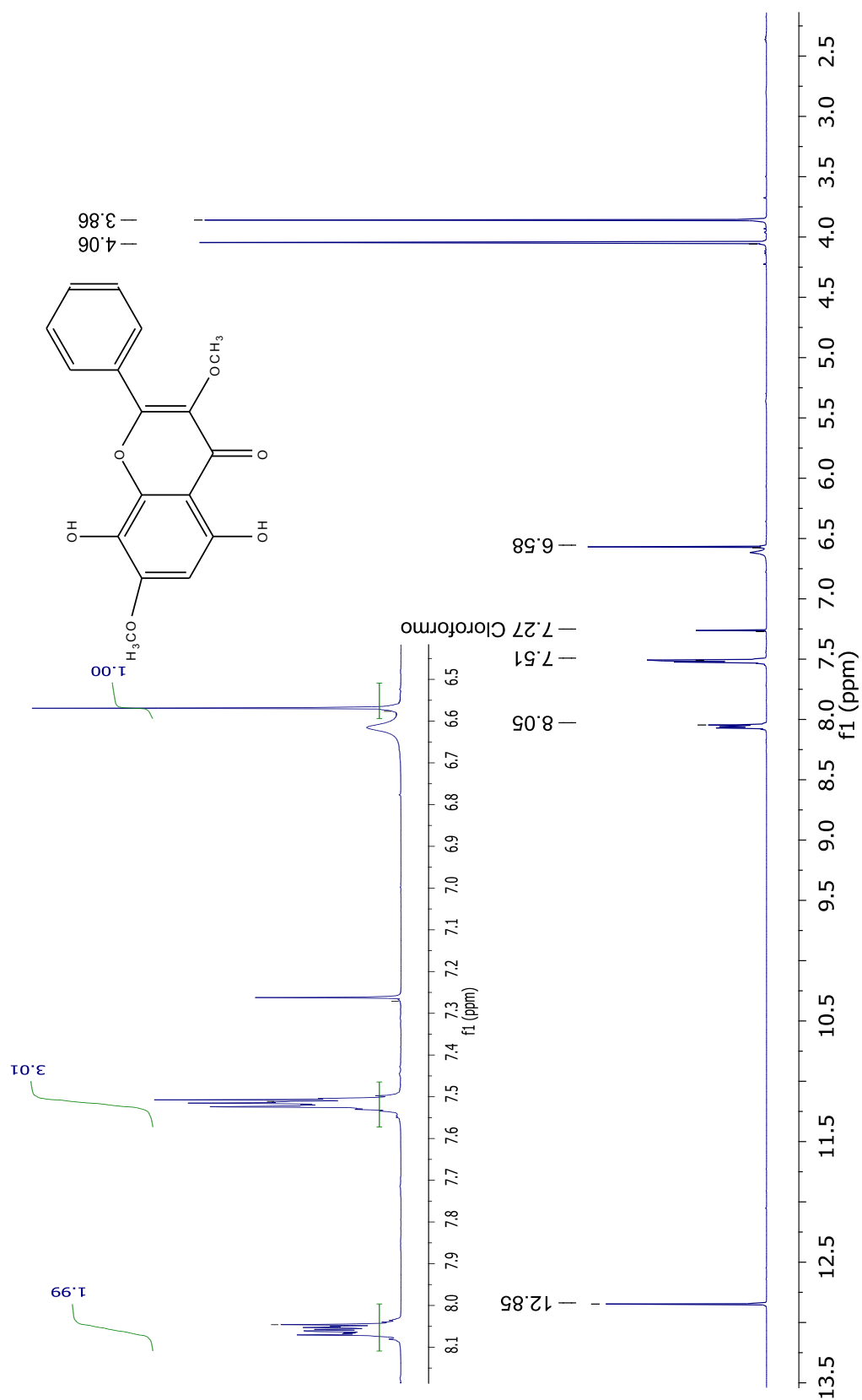
Anexo B



Espectro de masas para Isognafalina.

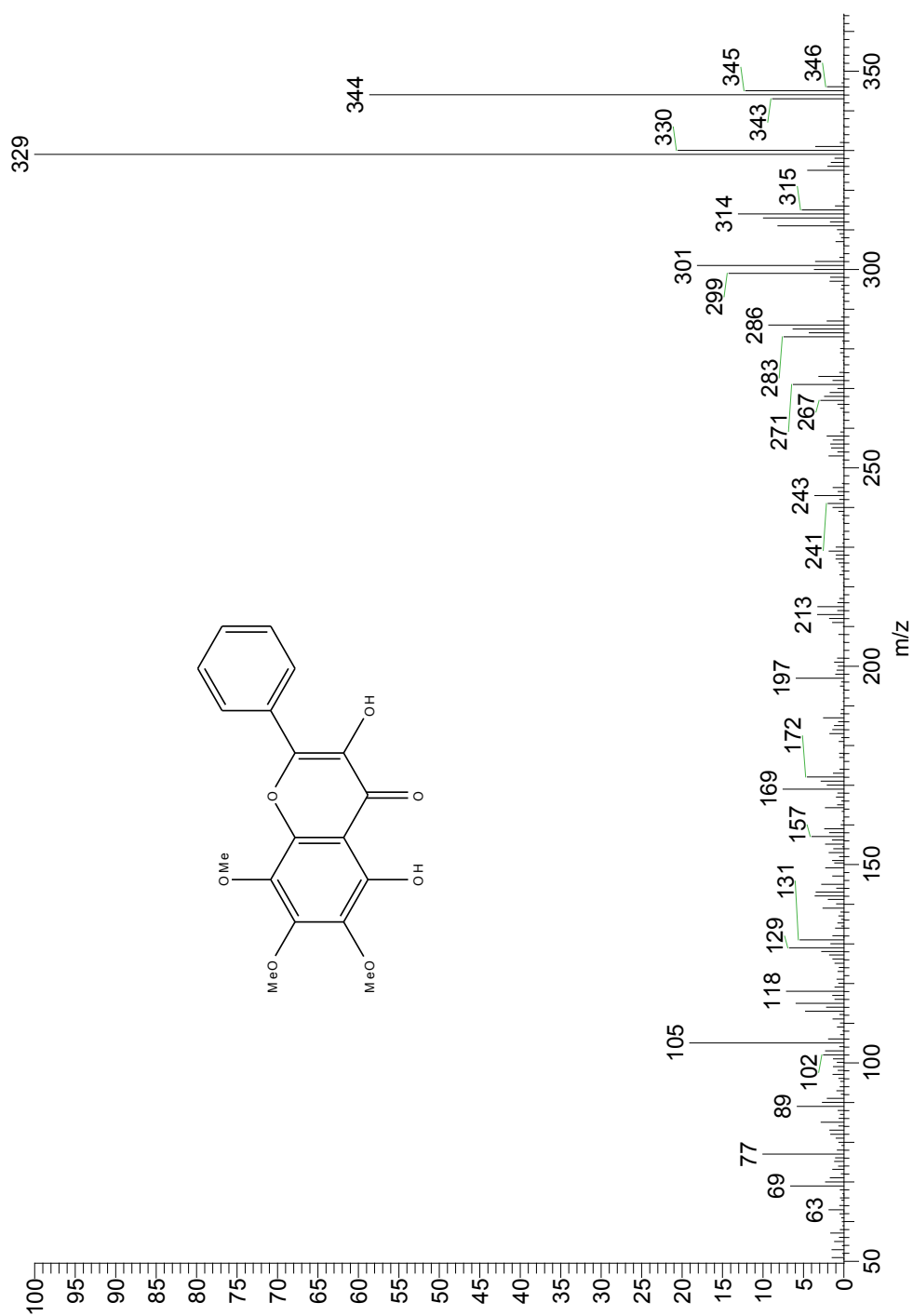


Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , TMS) del compuesto isognafalina

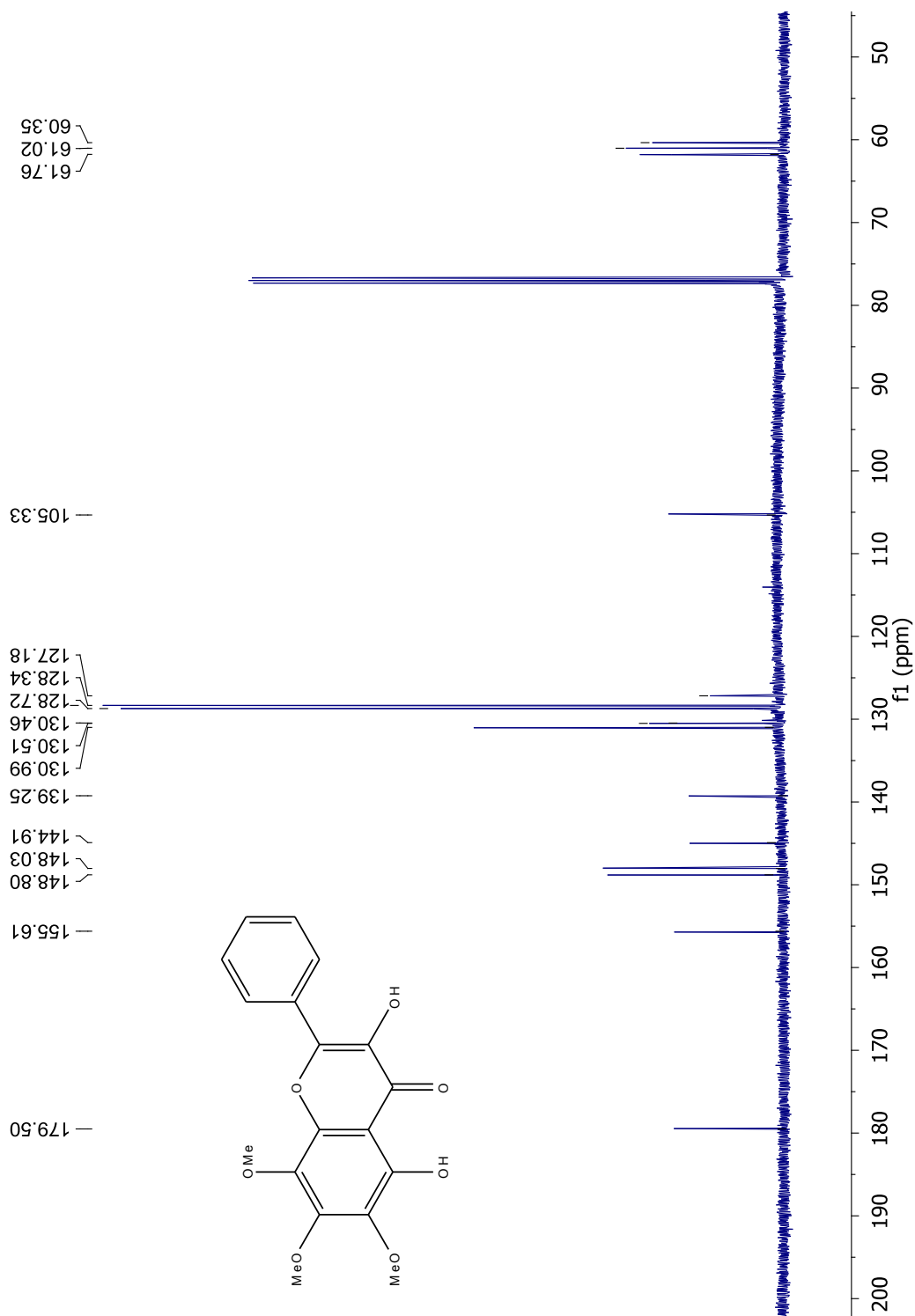


Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, TMS) del compuesto Isognafalina.

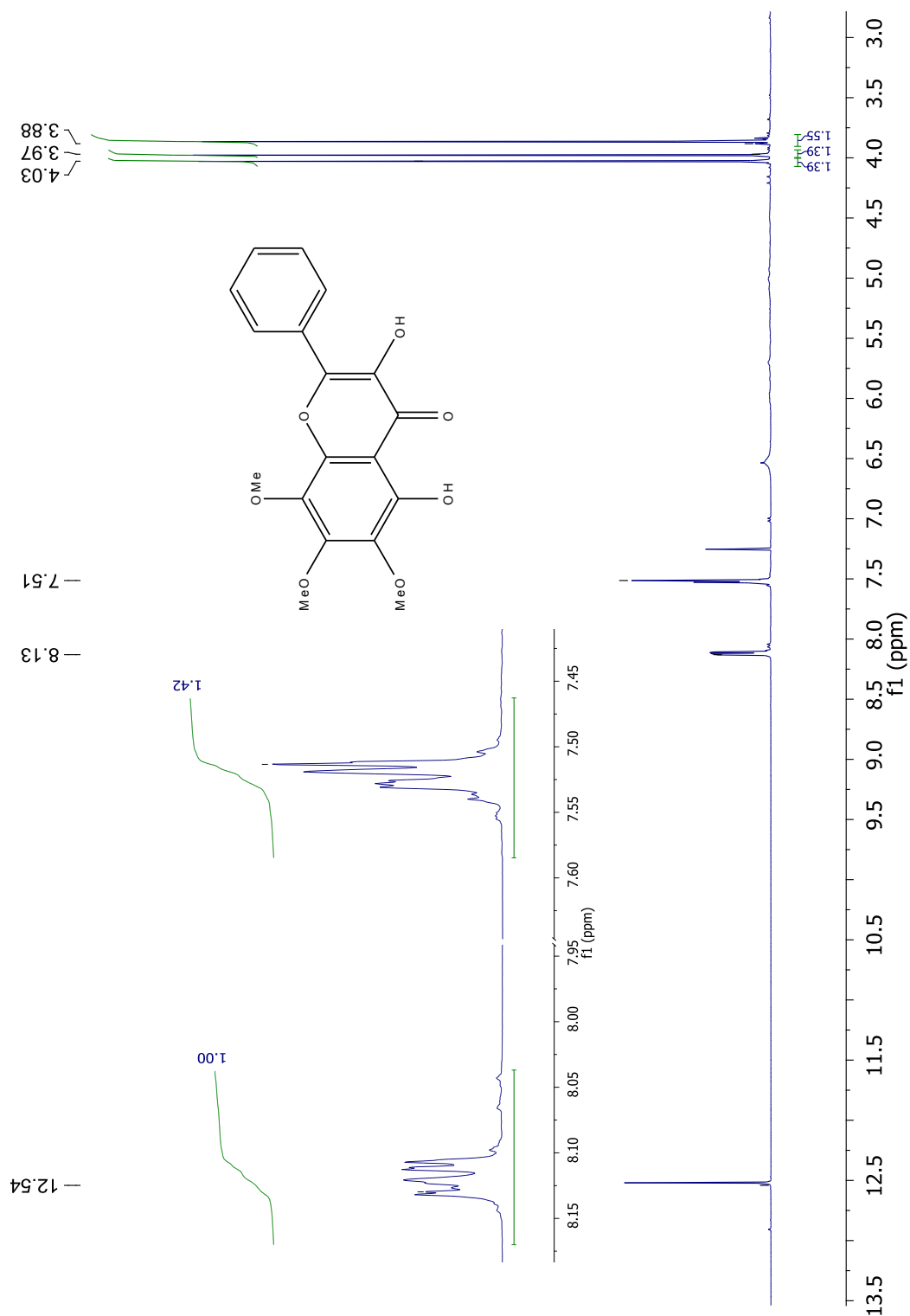
Anexo C



. Espectro de masas para 3,5-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona



Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , TMS) del compuesto
3,5-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona.

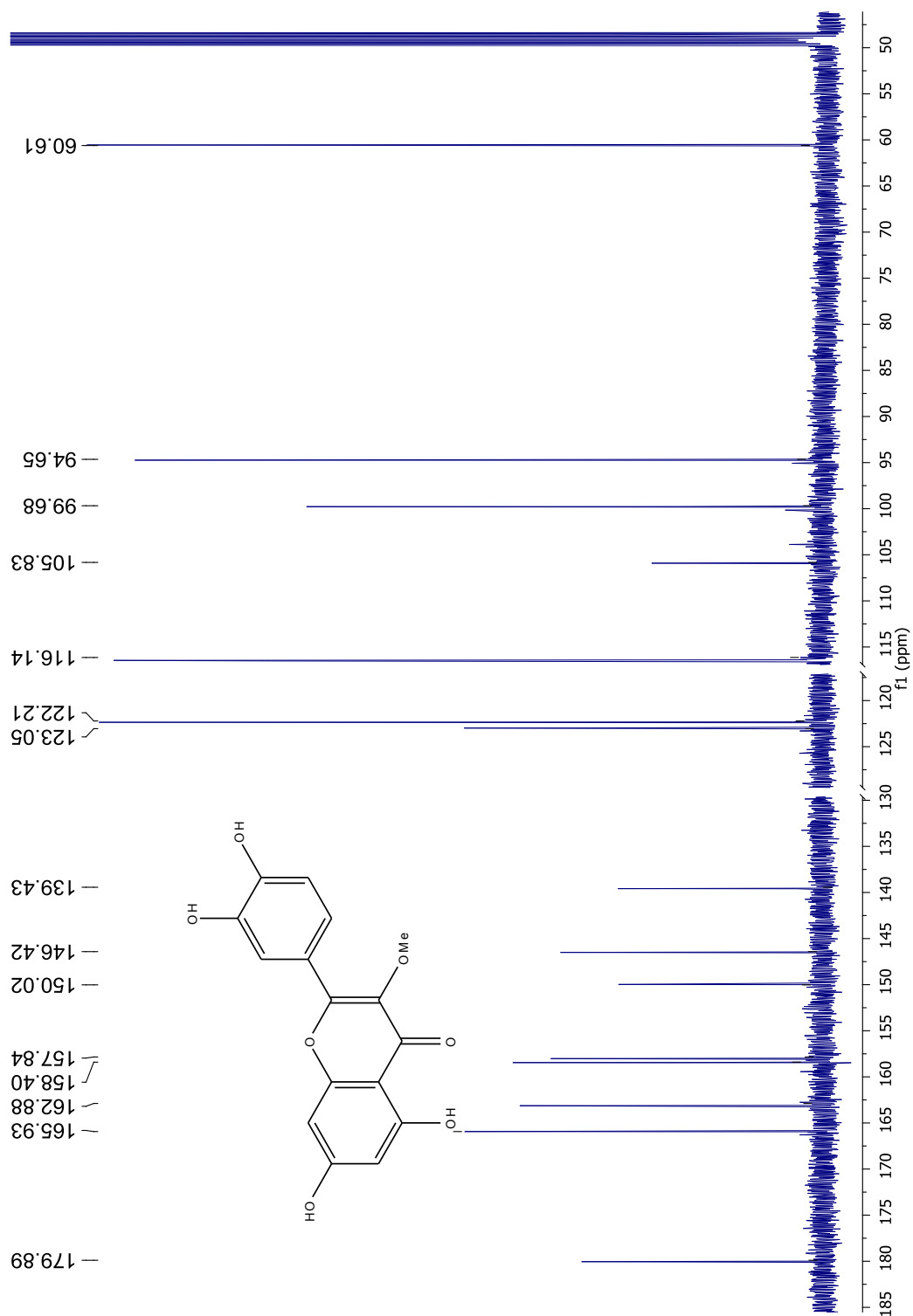


Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, TMS) del compuesto
3,5-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona.

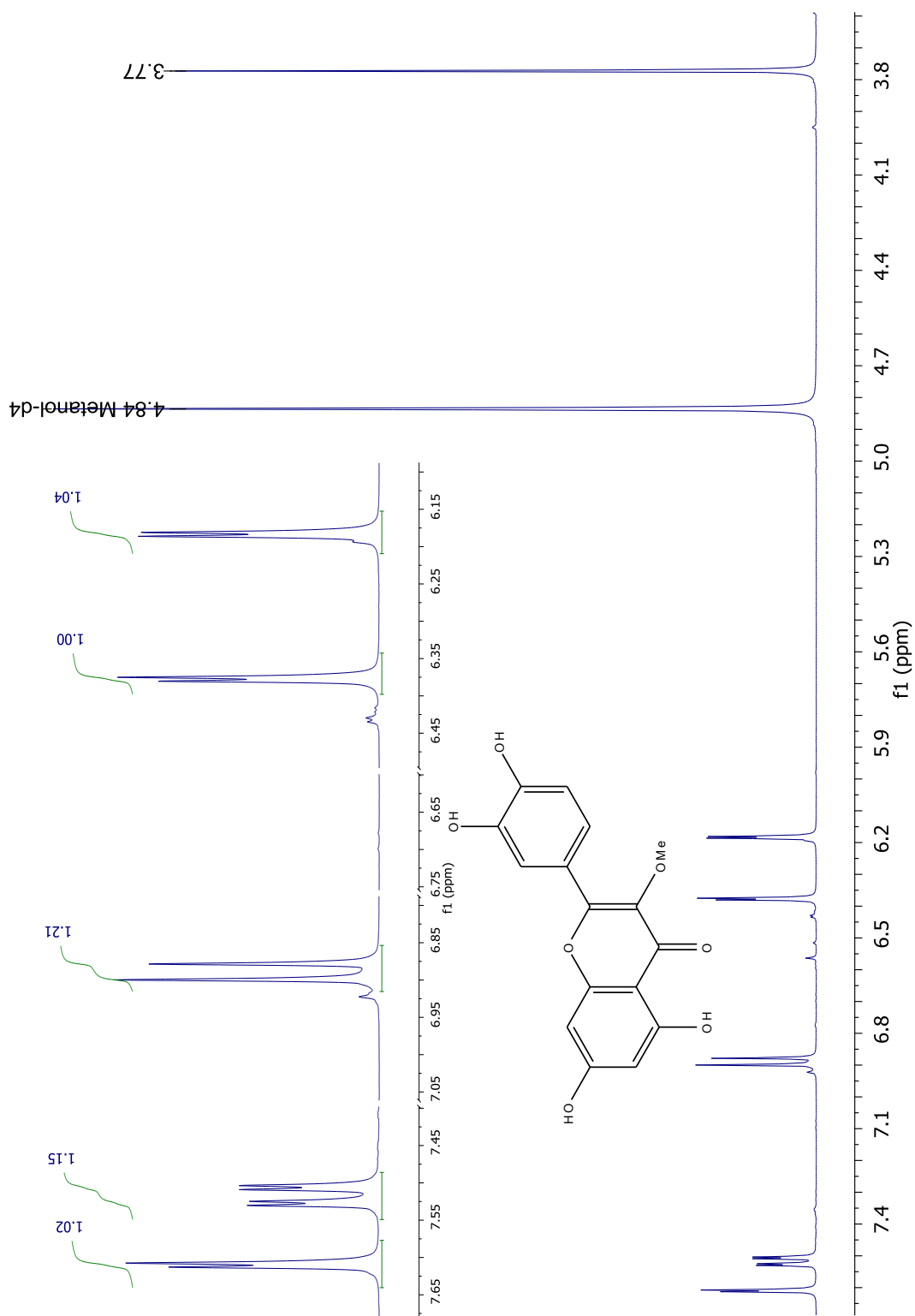
Anexo D



Espectro de masas (IE) para 3-O-metilquercetina

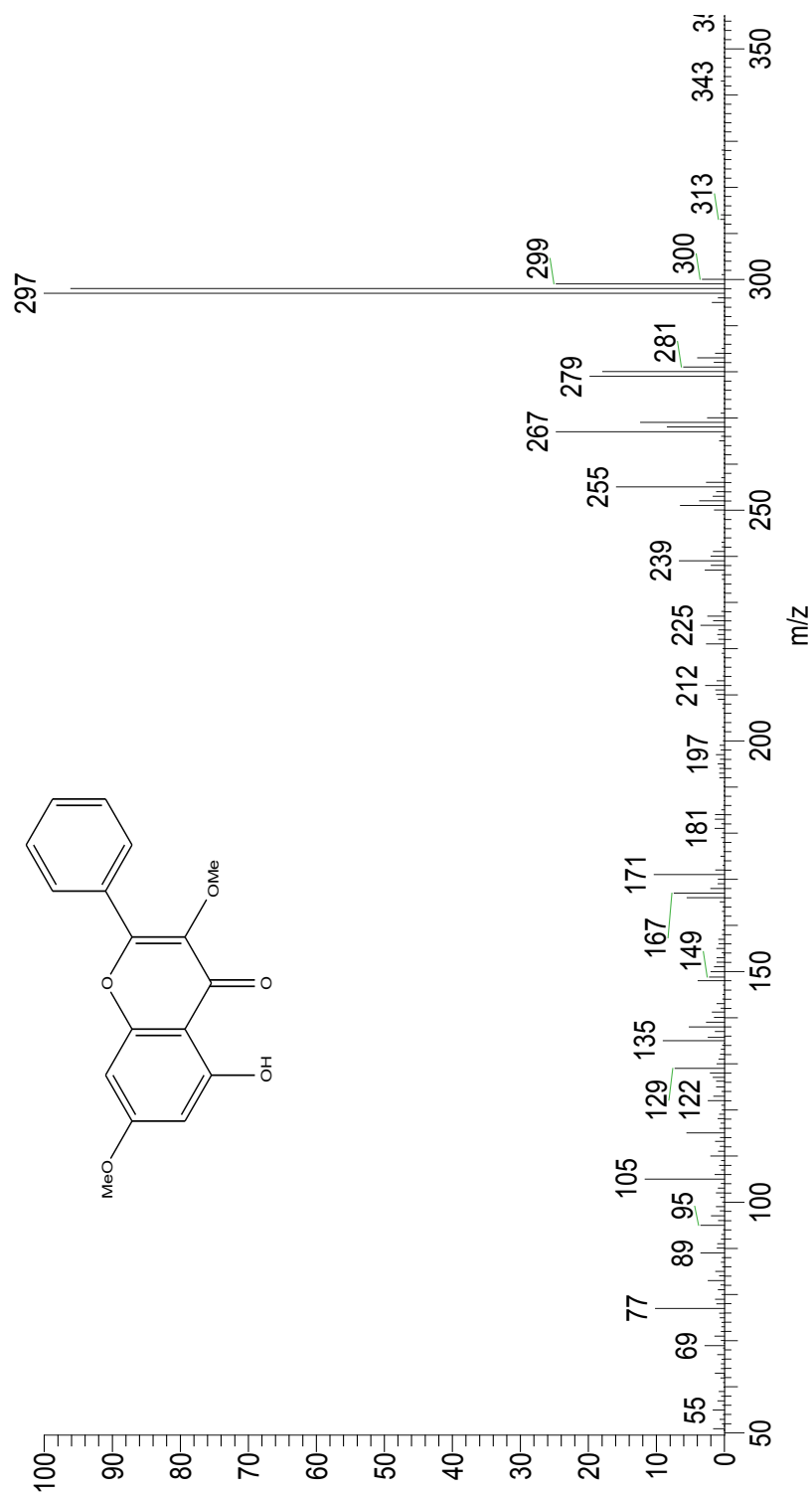


Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD, TMS) del compuesto 3-O-metilquercetina.

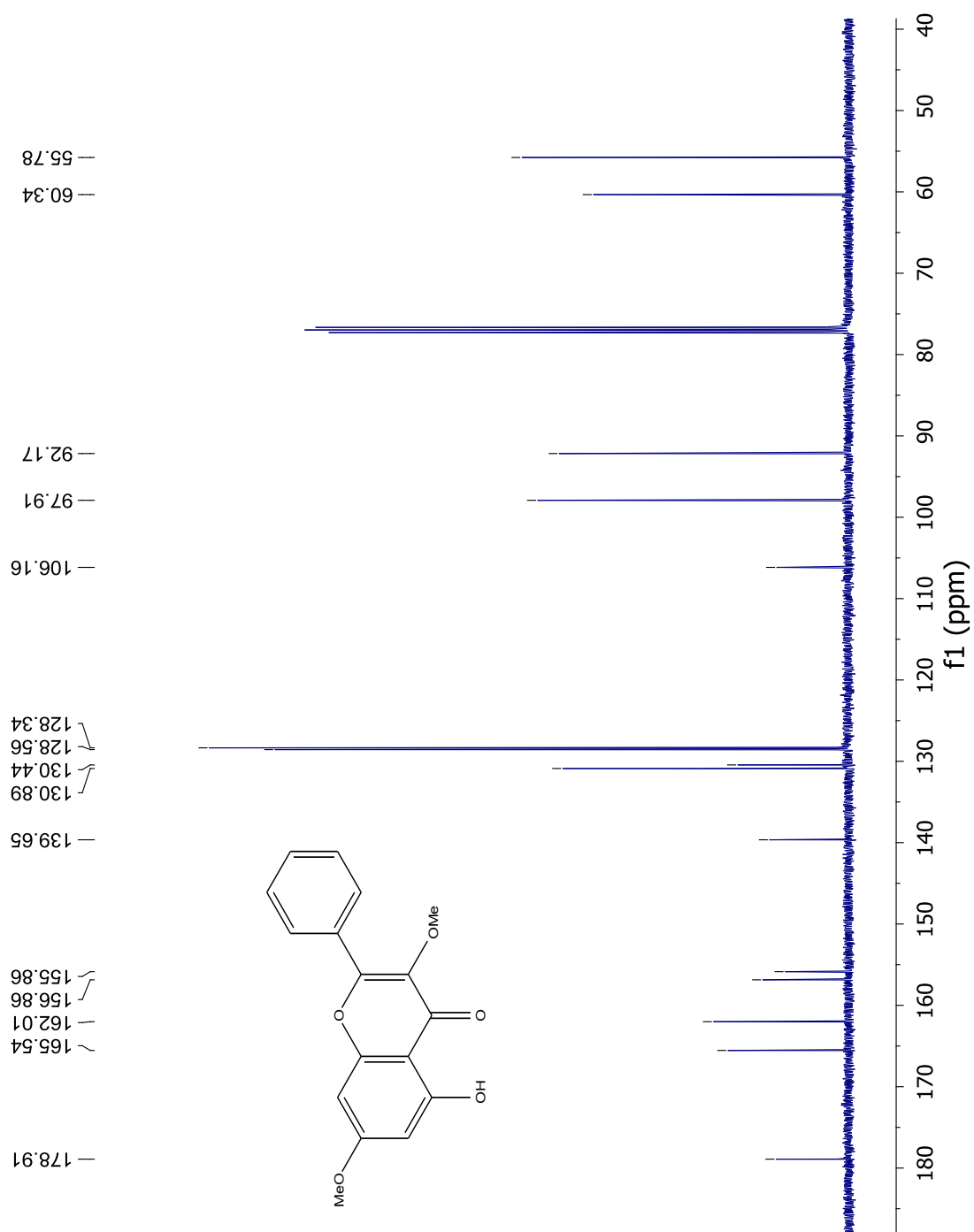


Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD, TMS) del compuesto 3-O-metilquercetina

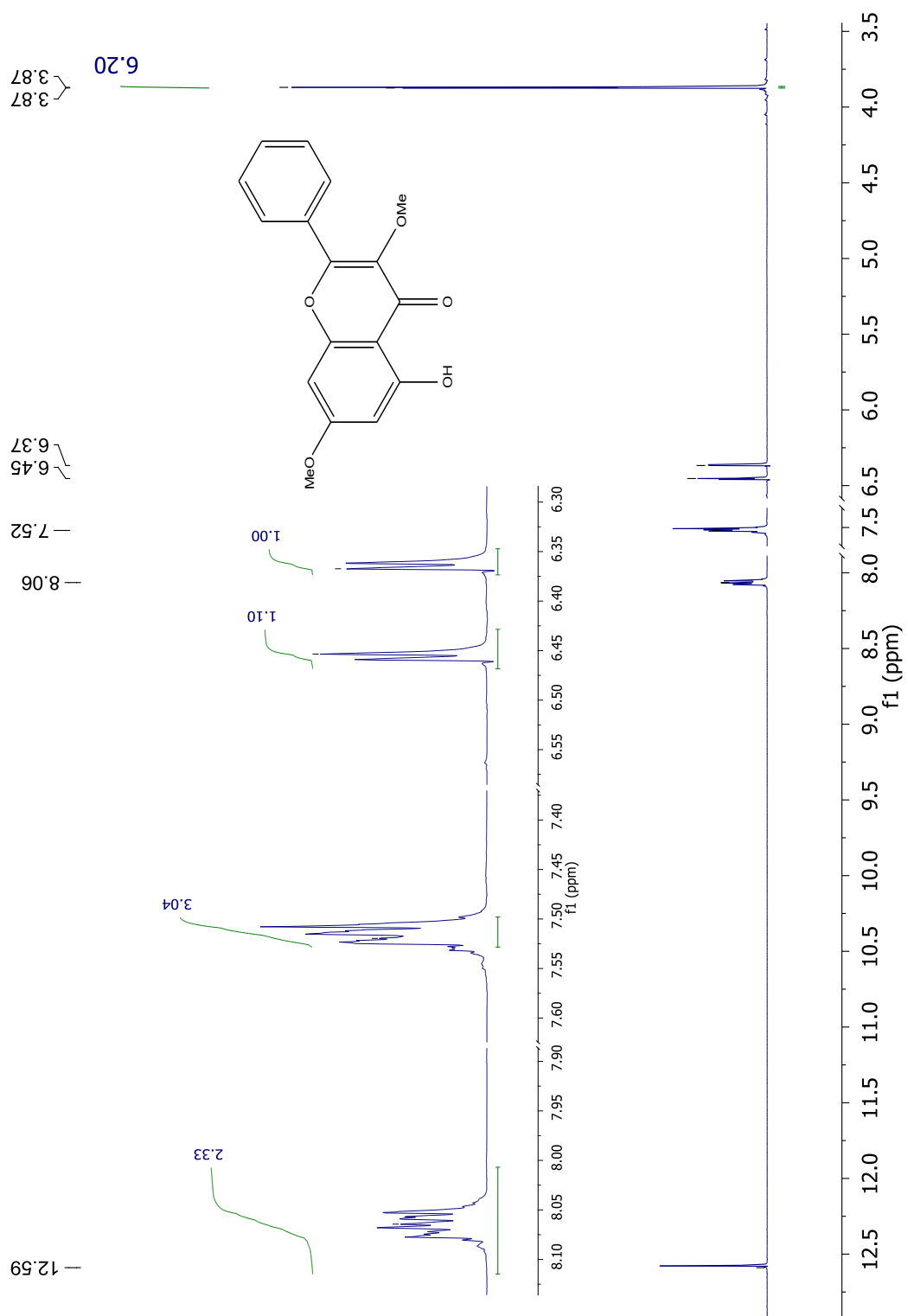
Anexo E



Espectro de masas para 5-hidroxi-3,7-dimetoxiflavona.



Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, MeOD, TMS) del compuesto 5-hidroxi-3,7-dimetoxiflavona.



Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD, TMS) del compuesto 5-hidroxi-3,7-dimetoxiflavona.

Bibliografía

- De la Rosa, M. Huerta, I. Liga, N. Velázquez, O. (2006) Actividad antimicrobiana del extracto fluido de la planta *Gnaphalium sp* (Gordolobo). *Episteme*; No. 8-9, Año 2, <http://www.uvmnet.edu/investigacion/episteme/numero8y9-06/> Fecha de consulta: 12 julio 2010.
- Espinosa, F. (1985) El Género *Gnaphalium* (*Compositae: Inulae*) en el Valle de México. Tesis de Maestría-UNAM. México: 103 pp.
- FHEUM. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, Primera Edición (2001). Secretaria de Salud, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. México.
- Guerreiro, E., Kavka, J., Giordano, O. S., (1981), 5,8-Dyhydroxy-3-6-7-trimethoxyflavone from *Gnaphalium gaudichaudianum*. *Phytochem.*, (21): 10, 2601-2602.
- Hirschmann,, G. S. (1984), The constituents of *Achyrocline satureioides* DC., From *Revista Latinoamericana de Química*, 15(3-4): 134-135.
- Loganga-Otshudi, A. Vercrysse, A. y Foriers, A. (2000) Contribution to the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological studies of traditionally used medicinal plants in the treatment of dysentery and diarrhea in Lomela area, Democratic Republic of Congo (DRC). *J Ethnopharmacol*; (71): 411-423.
- Markham K. R., Mabry T. J., Voirin B., (1969), 3-O-Methylquercetin 7-O-diglucoside 4'-O-glucoside from the fern, *Ophioglossum vulgatum*, *Phytochem.* (8): 469.
- Marston, A. (2007) Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry*; 68: 2785-2797.
- Montgomery Douglas C. Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica. México 1991.
- Ortega Peña, José Ricardo (2007). "Inventario de recursos naturales con enfoque participativo de la comunidad de San Pablo Ixayoc, Texcoco Edo. DE Mex.". Chapingo, México. 86pag.
- Rodríguez-Ramos, F., Navarrete, A. (2009). Solving the Confusion of Gnaphiliin A y Gnaphilliin B Identified as Active Principles of *Gnaphalium liebmannii* with Tracheal Smooth Muscle Relaxant Properties. *J Nat Prod*; 72: 1061-1064.

- Rodríguez-Ramos, Sánchez-Estrada, Alfaro-Romero, Tapia-Álvarez Navarrete, A. (2011). Development and Validation of a Column High-Performance Liquid Chromatography Method for Quantification of Gnaphaliin A and B in Inflorescences of *Gnaphalium liebmannii* Sch. Bp ex Klatt. Journal of AOAC International Vol. 94, No. 4.
- Rzedowski, J. y Rzedowski, G. (1972) Flora fanerogámica del Valle de México. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN. Vol. II: 507-508.
- Sánchez-Mendoza, M. E., Torres, G., Arrieta, J., Aguilar, A., Catillo-Henckel, C., Navarrete, (2007) Mechanisms of relaxant action of a crude hexane extract of *Gnaphalium liebmannii* in guinea pig tracheal smooth muscle. *J Ethnopharmacol*; 111:142-147.
- Satyajit D. Sarker, Zahid Latif, and Alexander I. Gray, Natural Product Isolation *an Overview*. Natural product isolation 2nd edition. Methods in biotechnology. Humana press. Totowa, New Jersey 2006. Pag15-17.
- Taddei-Bringas GA, Santillana-Macedo MA, Romero-Cancio JA, Romero-Téllez MB. (1999) Acceptance and use of medicinal plants in family medicine. *Salud Publica Mex.*; 41(3):216-20.
- Villagómez-Ibarra, R. Sánchez, M. Espejo, O. Zúñiga-Estrada, A. Torres-Valencia, M. Joseph-Nathan, P. (2001) Antimicrobial activity of three Mexican *Gnaphalium* species. *Fitoterapia*; 72: 692-694.
- Waizel HS, Waizel BJ. (2009) Algunas plantas utilizadas en México para el tratamiento del asma. *An. Orl. Mex.*; 54(4):145-71.
- Williamson E, Okpako D. y Evans F. 1996. Pharmacological methods in phytotherapy research. Vol. I Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. Jhon Wiley and Sons, GB: VI-IX, 1-8.
- Wun-Chang K., Chwen-Ming S., Ya-Hsin L., Jun-Hao C., Hui-Lin H. (2004) Inhibitory effect of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure-activity relationship. *Biochem. Pharmacol.*, 68: 2087-2094.
- Wun-Chang K., Mei-Chun C., Sheng-Hao W., Ya-Hsin L., Jun-Hao C., Chun-Nan L., (2003), 3-O-Metylquercetin More Selectively Inhibits Phosphodiesterase Subtype 3. *Planta. Med.*, 69: 310-315.

