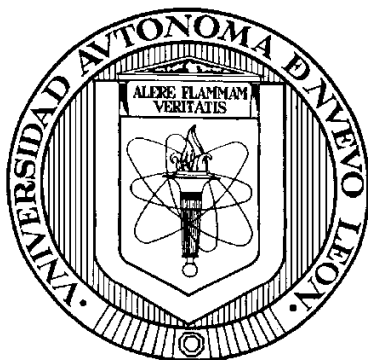


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y EVALUACIÓN  
ANTIMICOBACTERIANA DE LOS ALCALOIDES DE *Bocconia latisejala***

**Por**

**L. Q. I. EULOGIO TADEO HERNÁNDEZ ALMANZA**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en  
Farmacia**

**Marzo 2016**


Aislamiento, Caracterización Estructural y Evaluación Antimicobacteriana de los  
Alcaloides de *Bocconia latifolia*

Aprobación de la Tesis:



---

Dr. Edgar Abraham García Zepeda  
Presidente



---

Dra. Patricia Cristina Esquivel Ferriño  
Secretario (a)



---

Dr. Omar González Santiago  
Vocal



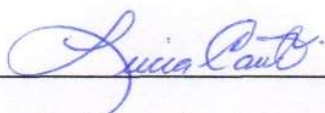
---

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez  
Sub-Directora de Estudios de Posgrado

Aislamiento, Caracterización Estructural y Evaluación Antimicobacteriana de los  
Alcaloides de *Bocconia latisejala*

Revisión de la Tesis:

Comité Tutorial



---

Dr. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas



---

Dra. Patricia Cristina Esquivel Ferriño



---

Dr. Omar González Santiago



---

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez  
Sub-Directora de Estudios de Posgrado



**Contribuciones y Conclusiones:** El estudio fitoquímico del extracto metanólico de las semillas de *B. latisejala* condujo a la purificación de diez alcaloides benzo[c]fenantridínicos, los cuales fueron caracterizados como dihidrosanguinarina, oxisanguinarina, dihidroqueleritrina (-)-6-acetonildihidroqueleritrina, (-)-queleritridimerina, queleritrina, arnottianamida, (-)-6-acetonil-12-metoxidihidroqueleritrina, (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina y 12-metoxiqueleritrina mediante el análisis riguroso de sus propiedades físicas, espectrométricas y espectroscópicas 1D y 2D (RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, COSY, NOESY, HSQC y HMBC). Los compuestos 12-metoxiqueleritrina y (-)-6-acetonil-12-metoxidihidroqueleritrina representan dos nuevos productos naturales pertenecientes a la familia de alcaloides benzo[c]fenantridínicos. Los alcaloides obtenidos fueron evaluados frente a *M. tuberculosis*, resultando cuatro compuestos activos frente a la cepa sensible H37Rv y a los aislados clínicos multifármaco-resistentes G122 y G133, con los siguientes valores de concentración mínima inhibitoria (CMI): dihidroqueleritrina, CMI = >50, 50 y >50 µg/mL; queleritrina, CMI = 12.5, 6.25 y 6.25 µg/mL; (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina, CMI = 50, 6.25 y 12.5 µg/mL; y 12-metoxiqueleritrina, CMI = 12.5, 12.5 y 6.25 µg/mL. A dichos compuestos se les realizó una evaluación citotóxica frente a fibroblastos gingivales humanos, encontrando los siguientes valores de porcentaje de inhibición de crecimiento (%IC) a una concentración de 50 µM: dihidroqueleritrina (40.5 %), queleritrina, (84.9 %), (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina (49.4 %) y 12-metoxiqueleritrina (38.9 %). Considerando los resultados biológicos, queleritrina y el nuevo producto natural denominado 12-metoxiqueleritrina representan moléculas promisorias para futuras investigaciones contra *M. tuberculosis*.



---

Dr. Edgar Abraham García Zepeda  
Director de Tesis



---

Dra. María del Rayo Camacho Corona  
Co-Director de Tesis

## DEDICATORIA

Esta Tesis está dedicada a mi familia:

*A mis padres*

*A mis hermanos*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a mis padres José Luis Hernández Jiménez y Rebeca Almanza Ibarra, por guiarme a lo largo de mi vida, por estar siempre apoyándome, por enseñarme a vivir en todo momento mirando hacia arriba, por comprender todo lo que ha implicado estudiar esta Maestría. Por mostrarme todo y lo único que necesito: *unum est necessarium*.

A mis hermanos Alba Lorena, Luis Fernando y José Tadeo, que han sido fundamentales en mi crecimiento y el desarrollo de mi carácter y personalidad.

Agradezco al Dr. Edgar Abraham García Zepeda, por haberme confiado este proyecto, por compartir conmigo sus conocimientos y por aportar a mi formación como químico y como ser humano. A la Dra. María del Rayo Camacho Corona por estar siempre atendiendo mis dudas.

A los miembros del comité tutorial, por sus valiosas sugerencias e interés en la revisión y realización de este trabajo: Dra. Patricia C. Esquivel Ferriño, Dr. Omar González Santiago, y de manera especial a la Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas, por su apoyo, por compartirme sus conocimientos y por ser siempre tan amable y dedicada con los alumnos. A los demás docentes de la Maestría.

A mis compañeros de generación: Isaac Díaz y Diana Romero. A mis compañeros del Laboratorio de Química de Productos Naturales: Karen Reyes, Jessica, Alfonso, Bryan, Karen Giselle, Adriana Romo, Adriana Hernández, Alexia y Elisama. A los que me apoyaron como auxiliares durante el proyecto: Andrea Hikari Hernández Navarro y Abdou Japhet Gutiérrez Olvera.

A la Dra. Elvira Garza González, por permitirme realizar los ensayos biológicos en el Laboratorio de Gastroenterología del Hospital Universitario de la UANL. Al Dr. Juan Manuel Favela, por apoyarnos en los ensayos.

A la M. en C. Alejandrina Huerta Acosta y al Dr. Luis D. Miranda del Instituto de Química, de la UNAM por su apoyo en la adquisición de los espectros de RMN, RO y EM.

A la Dra. María Teresa Obdulia Ramírez Apan del Instituto de Química de la UNAM, por su apoyo en la realización de los ensayos de citotoxicidad.

A la Facultad de Ciencias Químicas de Universidad Autónoma de Nuevo León, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Licenciatura y Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca de manutención con número (CVU/Becario): 591230/305648.

Y finalmente agradezco a **Dios**, que me ha creado, que cada día se me revela, por quien tengo todo lo que soy, por quien soy. Porque me permite manipular la materia que Él ha creado. Porque todos los días me sigue llamando a la eternidad. Porque sé que realmente existe y guía nuestra historia.



## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	4
2.1 Epidemiología .....	4
2.2 Etiología .....	5
2.3 Tratamiento .....	6
2.4 Medicina tradicional .....	9
2.5 <i>Bocconia latisejala</i> .....	10
2.6 Origen biosintético de los alcaloides de tipo benzo[c]fenantridina ....	11
2.7 Estudios fitoquímicos de los alcaloides de tipo benzo[c]fenantridina .....	13
2.8 Justificación del proyecto .....	17
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	18
3.1 Hipótesis .....	18
3.2 Objetivo general .....	18
3.3 Objetivos específicos .....	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
4.1 Material y equipo .....	20
4.1.1 Estudio fitoquímico .....	20
4.1.2 Ensayos biológicos .....	21

4.2 Estudio fitoquímico .....	22
4.2.1 Material vegetal .....	22
4.2.2 Obtención del extracto metanólico .....	22
4.2.3 Fraccionamiento del extracto metanólico .....	23
4.2.4 Aislamiento y purificación de los alcaloides .....	24
4.2.5 Caracterización de los compuestos aislados .....	24
4.3 Ensayos biológicos .....	26
4.3.1 Actividad antimicrobacteriana .....	26
4.3.1.1 Preparación de las muestras .....	26
4.3.1.2 Preparación del Medio Middlebrook 7H9 .....	26
4.3.1.3 Cepas bacterianas y preparación del inóculo .....	27
4.3.1.4 Ensayo biológico .....	27
4.3.2 Citotoxicidad .....	29
4.3.2.1 Cultivo de las células .....	29
4.3.2.2 Cosecha de las células .....	30
4.3.2.3 Ensayo biológico .....	30
4.4 Disposición de residuos .....	32
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	33
5.1 Aislamiento y purificación de los alcaloides .....	33
5.1.1 Aislamiento de dihidrosanguinarina .....	33
5.1.2 Aislamiento de oxisanguinarina .....	34
5.1.3 Aislamiento de dihidroqueleritrina .....	35
5.1.4 Aislamiento de (-)-6-acetonildihidroqueleritrina .....	36
5.1.5 Aislamiento de (-)-queleritridimerina .....	38
5.1.6 Aislamiento de queleritrina .....	40
5.1.7 Aislamiento de arnottianamida .....	41
5.1.8 Aislamiento de (-)-6-acetonil-12-metoxidihidroqueleritrina .....	42
5.1.9 Aislamiento de (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina .....	44
5.1.10 Aislamiento de 12-metoxiqueleritrina .....	46

5.2	Elucidación estructural de los alcaloides aislados .....	47
5.2.1	Caracterización de dihidrosanguinarina .....	47
5.2.2	Caracterización de oxisanguinarina .....	49
5.2.3	Caracterización de dihidroqueleritrina .....	51
5.2.4	Caracterización de (-)-6-acetonildihidroqueleritrina .....	53
5.2.5	Caracterización de (-)-queleritridimerina .....	57
5.2.6	Caracterización de queleritrina .....	63
5.2.7	Caracterización de arnottianamida .....	65
5.2.8	Caracterización de (-)-6-acetonil-12-metoxidihidroqueleritrina ..	67
5.2.9	Caracterización de (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina .....	70
5.2.10	Caracterización de 12-metoxiqueleritrina .....	72
5.3	Actividad antimicobacteriana .....	76
5.4	Citotoxicidad .....	80
6.	CONCLUSIONES .....	83
	REFERENCIAS .....	85
	APÉNDICES .....	92
	APÉNDICE A.- ESPECTROS .....	92

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Fracciones de la separación del extracto metanólico . . . . .	23
2. Desplazamientos de RMN <sup>1</sup> H para (-)-6-acetonildihidroqueleritrina y (-)- queleritridimerina . . . . .	62
3. Correlaciones observadas mediante el experimento HMBC . . . . .	74
4. Actividad antimicobacteriana de los metabolitos secundarios de <i>B.</i> <i>latisepala</i> . . . . .	76
5. Citotoxicidad de los metabolitos secundarios de <i>B. latisepala</i> . . . . .	80

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Fármacos de primera línea en el tratamiento de la TB . . . . .	7
2. Fármacos de segunda línea en el tratamiento de la TB . . . . .	8
3. Sistema benzo[c]fenantridina . . . . .	9
4. Hojas (a), inflorescencia temprana (b), flores (c), frutos (d) y semillas (e) de <i>B. latisepala</i> . . . . .	11
5. Biosíntesis para la formación de (S)-Reticulina a partir de L-Tirosina . . .	12
6. Ruta biosintética de alcaloides a partir de (S)-Reticulina . . . . .	13
7. Compuestos aislados de <i>B. latisepala</i> . . . . .	14
8. Alcaloides aislados de <i>B. arborea</i> . . . . .	15

9. Actividad inhibitoria de cepas sensible (H37Rv) y resistentes (M-12, M-20, 345) de <i>M. tuberculosis</i> para los alcaloides obtenidos de <i>B. arborea</i> . . .	16
10. Cromatografía del extracto metanólico . . . . .	25
11. Reducción de resazurina a resorufina . . . . .	28
12. Distribución de placa de 96 pocillos en ensayo antimicobacteriano . . .	29
13. Dihidosanguinarina . . . . .	33
14. Oxisanguinarina . . . . .	35
15. Dihidroqueleritrina . . . . .	36
16. (-)-6-acetonildihidroqueleritrina . . . . .	37
17. (-)-queleritridimerina . . . . .	39
18. Queleritrina. . . . .	40
19. Arnottianamida . . . . .	42
20. (-)-6-acetonil-12-metoxidihidroqueleritrina . . . . .	43
21. (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina . . . . .	45
22. 12-metoxiqueleritrina . . . . .	46
23. Caracterización de dihidrosanguinarina . . . . .	49
24. Señales de los grupos dioximetileno y del metilo de oxisanguinarina . .	50
25. Caracterización de oxisanguinarina . . . . .	50
26. Señales del dioximetileno y de los grupos metoxilo (espectro de RMN <sup>1</sup> H) . . . . .	52
27. Caracterización de dihidroqueleritrina . . . . .	53
28. Señales del sistema AMX (espectro de RMN <sup>1</sup> H) . . . . .	54
29. Caracterización de (-)-6-acetonildihidroqueleritrina . . . . .	55
30. Orientación Ψ-axial del grupo acetónido en el anillo de <i>N</i> -metildihidropiridina . . . . .	56
31. Confórmeros de menor energía obtenidos por PCMODEL . . . . .	56
32. Conformación más estable observada en PCMODEL . . . . .	57
33. Señales del dioximetileno (a) y del sistema ABX (b y c) del espectro de RMN <sup>1</sup> H . . . . .	58
34. Caracterización de (-)-queleritridimerina . . . . .	59
35. Estereoisómeros de queleritridimerina . . . . .	60

36. Conformaciones más estables observadas en PCMODEL . . . . .	61
37. Región aromática en el espectro de RMN <sup>1</sup> H . . . . .	64
38. Caracterización de queleritrina . . . . .	65
39. Acercamiento de la señal del protón de formamida en el espectro de RMN <sup>1</sup> H . . . . .	66
40. Caracterización de arnottianamida . . . . .	67
41. Acercamiento de las señales del sistema AMX (espectro de RMN <sup>1</sup> H) . .68	
42. Interacciones NOE relevantes para 6-acetonil-12-metoxidihidroqueleritrina . . . . .	69
43. Acercamiento de las señales de los metoxilos aromáticos (a) y alifático (b) en el espectro de RMN <sup>1</sup> H. . . . .	71
44. Caracterización de (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina . . . . .	72
45. Acercamiento de la señal de H(6) en el espectro de RMN <sup>1</sup> H . . . . .	73
46. Desplazamientos químicos de carbonos protonados . . . . .	74
47. Interacciones NOE relevantes para 12-metoxiqueleritrina . . . . .	75
48. Inhibición de crecimiento (I) de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv para benzo[c]fenantridinas cuaternarias . . . . .	79

## ABREVIATURAS

$[\alpha]_D$	Rotación específica
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
ATCC	American Type Culture Collection
ATR	Attenuated Total Reflection
C	Carbono
$c$	Concentración (mg/mL)
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
CC	Cromatografía en Columna
CCF	Cromatografía en Capa Fina
$\text{CDCl}_3$	Cloroformo deuterado
$\text{CD}_3\text{OD}$	Metanol deuterado
cel/mL	Células por mililitro
$\text{CHCl}_3$	Cloroformo
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
$\text{CO}_2$	Dióxido de carbono
col	Colaboradores
COSY	Correlation Spectroscopy
$\delta$	Desplazamiento Químico
d	Doblete
dd	Doblete de dobletes
DEPT 135	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 135 $^{\circ}$
DEPT 90	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 90 $^{\circ}$
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EM	Espectrometría de Masas
EtOH	Etanol
FE	Fase Estacionaria

FM	Fase Móvil
g	Gramos
H	Protón
h	Horas
H <sup>+</sup>	Catión Hidrógeno
H <sub>2</sub> O	Agua
Hex	Hexano
HGF	Fibroblastos Gingivales Humanos (por sus siglas en inglés)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
Hz	Hertz
% IC	Porcentaje de Inhibición de Crecimiento
IE	Impacto Electrónico
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de Acoplamiento
[M + H] <sup>+</sup>	Pico base
[M] <sup>+</sup>	Ion molecular
<i>m/z</i>	Relación <i>masa/carga</i>
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
μg	Microgramos
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Mililitro
μL	Microlitro
mM	Milimolar
μM	Micromolar
N	Nitrógeno
NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma oxidada)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)



NCI	National Cancer Institute
NE	No Evaluado
No	Número
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
OADC	Ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pf	Punto de Fusión
PM	Peso Molecular
psi	Sounds-force per Square Inch
Rf	Factor de Retención
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RO	Rotación Óptica
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
s	Singlete
SRB	Sulforodamina B
TB	Tuberculosis
TB-MDR	Tuberculosis Multifármaco Resistente
TB-XDR	Tuberculosis Extremadamente Fármacoresistente
TCA	Ácido tricloroacético
TFA- <i>d</i>	Ácido trifluoroacético deuterado
UV	Ultravioleta
v	Número de onda
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
vol/vol	Volumen/Volumen (Concentración)

## CAPITULO 1

### INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad las enfermedades infecciosas han representado una de las principales causas de mortalidad. Las enfermedades infecciosas son causadas por microorganismos patógenos, tales como bacterias, virus, parásitos u hongos y se pueden propagar, directa o indirectamente, de una persona a otra [1].

Actualmente la tuberculosis (TB) sigue siendo una de las principales enfermedades infecciosas mas mortales para los seres humanos [2–4]. La TB es una enfermedad infecciosa que suele afectar principalmente a los pulmones y es causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* [5–9].

En general, la TB puede ser tratada con fármacos de primera línea (isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol), [1, 9, 10] pero en aquellos pacientes con tuberculosis multifármacorresistente (TB-MDR, por sus siglas en inglés) se administran los fármacos de segunda línea (ácido *p*-aminosalicílico, cicloserina, etionamida, ciprofloxacina, amikacina y levofloxacina), [1, 9–12] que

son más costosos y ocasionan más efectos adversos. Asimismo, se puede presentar TB extremadamente fármacorresistente (TB-XDR, por sus siglas en inglés) si dichos medicamentos se utilizan sin seguir el régimen de tratamiento recomendado por el médico [2, 12].

El surgimiento de cepas TB-MDR genera una necesidad urgente de nuevos agentes antituberculosos, para lo cual se pueden desarrollar dos estrategias principales: la síntesis química y el aislamiento de productos naturales a partir de plantas, organismos marinos y microorganismos [3, 9, 13–16].

Las plantas superiores constituyen una de las fuentes más ricas en diversidad y complejidad estructural de productos naturales [17], aunado a una gran variedad de actividades biológicas. Se estima que en el mundo existen unas 500 000 especies de plantas superiores, de las cuales solo menos del 1% ha sido estudiado exhaustivamente tomando en cuenta su gran valor medicinal y composición química [18–20]. Por ello, las plantas han sido una fuente invaluable de moléculas bioactivas y son empleadas aún en el tratamiento de diversas enfermedades por aproximadamente el 80% de la población mundial [21]. En México, algunas plantas son usadas en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades de las vías respiratorias como la tos, bronquitis y TB [4, 22–25].

Considerando que la TB es una de las enfermedades infecciosas más mortales en el mundo y teniendo en cuenta la fámacorresistencia que presenta *M. tuberculosis*, es importante implementar nuevas estrategias que permitan desarrollar agentes antituberculosos menos tóxicos y más eficaces. Por esta razón en el presente proyecto de investigación se planteó el descubrimiento de nuevos productos naturales, con propiedades antibacterianas frente a cepas sensibles y resistentes de *M. tuberculosis*, a partir de las semillas de *Bocconia latisejala*.

## **CAPITULO 2**

### **ANTECEDENTES**

#### **2.1 Epidemiología**

De acuerdo con reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente 9.0 millones de personas enfermaron de TB en 2013 y en el mismo periodo se presentaron 1.5 millones de muertes por dicha enfermedad. La situación está empeorando debido principalmente a la asociación entre la tuberculosis y la epidemia del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), así como a la creciente prevalencia de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a múltiples fármacos [7].

Las últimas estimaciones de la OMS dicen que hubo 8.6 millones de nuevos casos de TB en 2012 y 1.3 millones de muertes por esta enfermedad. La mayoría de los casos de tuberculosis y de muertes se producen en el género masculino, pero la frecuencia de la enfermedad entre las mujeres es también alta. El número de muertes por TB es inaceptable dado que la mayor parte se puede prevenir si las personas pueden acceder a la atención médica para un diagnóstico

y se proporciona el tratamiento adecuado. Regímenes de corta duración de medicamentos de primera línea que pueden curar alrededor del 90% de los casos han estado disponibles por décadas, pero no se han abatido los índices de contagio y muerte por dicha enfermedad [2].

Más de la mitad (56%) de los casos de TB en el 2013 se desarrollaron en Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental, India y China representaron el 24% y el 11% del total de los casos, respectivamente [2].

El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó que la tasa de incidencia de casos de TB (todas las formas) en México durante el año 2014 fue de 16.8 por cada 100 mil habitantes, lo cual permite observar un incremento en la tasa de incidencia por cada año, ya que en 2009 era de 15.9 y en 2011 de 16.41. Los estados con mayor tasa de incidencia son Baja California (55.3), Guerrero (36.8), Sinaloa (33.9), Sonora (32.0) y Tamaulipas (31.3) [26].

## **2.2 Etiología**

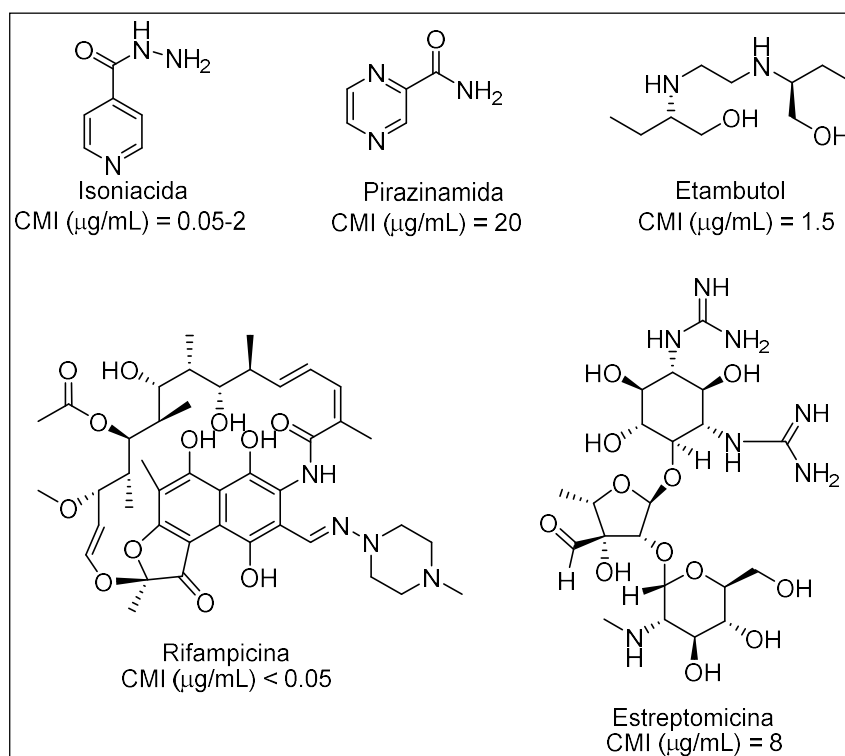
La TB se transmite de una persona a otra a través de gotículas generadas en el aparato respiratorio de pacientes con enfermedad pulmonar activa. Los síntomas de la TB pulmonar activa son tos, a veces con esputo que puede ser sanguinolento, dolor torácico, debilidad, pérdida de peso, fiebre y sudoración nocturna [2].

El género *Mycobacterium*, perteneciente a la familia Mycobacteriaceae, comprende a bacterias aerobias grampositivas débiles, ácido-alcohol resistentes, inmóviles y no esporuladas. *M. tuberculosis* es un bacilo aerobio obligado, sin movilidad y de crecimiento muy lento. No produce cápsula de polisacáridos, su envoltura celular es poco usual, partiendo del interior hacia el exterior, presenta una membrana citoplásmica cubierta por una capa extensa de peptidoglicanos unidos a polisacáridos, los cuales se encuentran esterificados con los ácidos micólicos (60% del peso de la pared celular), formados por lípidos libres, glucolípidos y peptidoglucolípidos. Dicha estructura, que le brinda una apariencia cerosa, le confiere una alta hidrofobicidad, resistencia a detergentes y a un buen número de antibióticos, a las tinciones habituales y le da afinidad por la tinción ácido alcohol resistente de Ziehl-Neelsen y Kinyoun [5, 6].

### **2.3 Tratamiento**

El tratamiento de la TB se basa en conceptos muy distintos a los de las demás infecciones bacterianas; *M. tuberculosis* tiene un tiempo de generación prolongado y la capacidad para entrar en periodos de latencia con una actividad metabólica limitada, lo que dificulta la acción de los antimicrobianos. La TB tiene un tratamiento eficaz, basado en la asociación de fármacos con una larga duración, que asegura en los casos no complicados una tasa de curación superior al 90%, siempre que se complete dicho tratamiento. La OMS recomienda un esquema terapéutico con cuatro fármacos de primera línea (isoniacida,

rifampicina, etambutol y pirazinamida) durante dos meses, seguido de la administración de isoniacida y rifampicina (Figura 1) durante cuatro meses de tratamiento [8]. Un efecto adverso característico del etambutol es la neuritis retrobulbar, produciendo pérdida de la agudeza visual y ceguera para los colores rojo y verde, debido a que en los niños es difícil evaluar la agudeza visual y la discriminación de dichos colores se sustituye el etambutol por estreptomina (Figura 1) [10, 27].

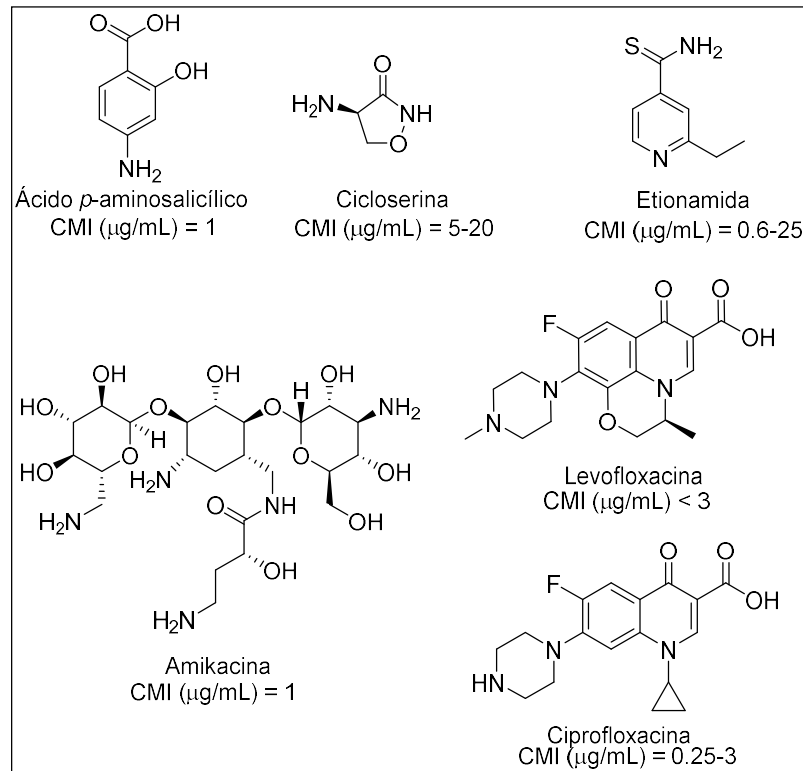


**Figura 1.** Fármacos de primera línea para el tratamiento de la TB.

La mayor parte de los pacientes con TB pueden ser tratados satisfactoriamente con los fármacos de primera línea, pero debido a la resistencia microbiana o por factores propios del paciente como infección por VIH, a veces



se necesita recurrir a fármacos de segunda línea, tales como ácido *p*-aminosalicílico, cicloserina, etionamida, ciprofloxacina, amikacina y levofloxacina (Figura 2) [10, 11].



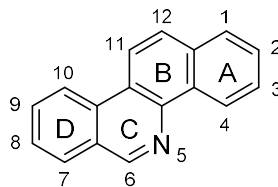
**Figura 2.** Fármacos de segunda línea para el tratamiento de la TB.

Cabe mencionar que se ha reportado en la literatura que la mayoría de los agentes antituberculosos causan trastornos gastrointestinales, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y ototoxicidad, por lo que es importante la búsqueda de nuevos agentes antimicobacterianos con menores niveles de toxicidad [27, 28].

## 2.4 Medicina tradicional

El conocimiento etnomédico y químico de las plantas medicinales usadas para el tratamiento de las infecciones bacterianas ha motivado la investigación de las mismas en busca de productos naturales antibacterianos menos tóxicos que los fármacos prescritos en la actualidad. En la selección de plantas para el descubrimiento de nuevos agentes activos existen cuatro criterios: taxonómico, quimiotaxonómico, etnomédico y al azar [29].

Entre las plantas medicinales de mayor relevancia para el tratamiento de las infecciones bacterianas, se pueden destacar algunas especies pertenecientes al género *Bocconia*, las cuales han tenido diversas aplicaciones en la medicina tradicional mexicana, para tratar abscesos, gastritis, heridas, llagas, verrugas, como anestésico local, antiparasitario, antitumoral, astringente y analgésico [30, 31]. Los estudios fitoquímicos y farmacológicos han permitido identificar a los alcaloides de tipo benzo[c]fenantridina como las moléculas responsables de la actividad biológica (Figura 3) [30, 32–42].

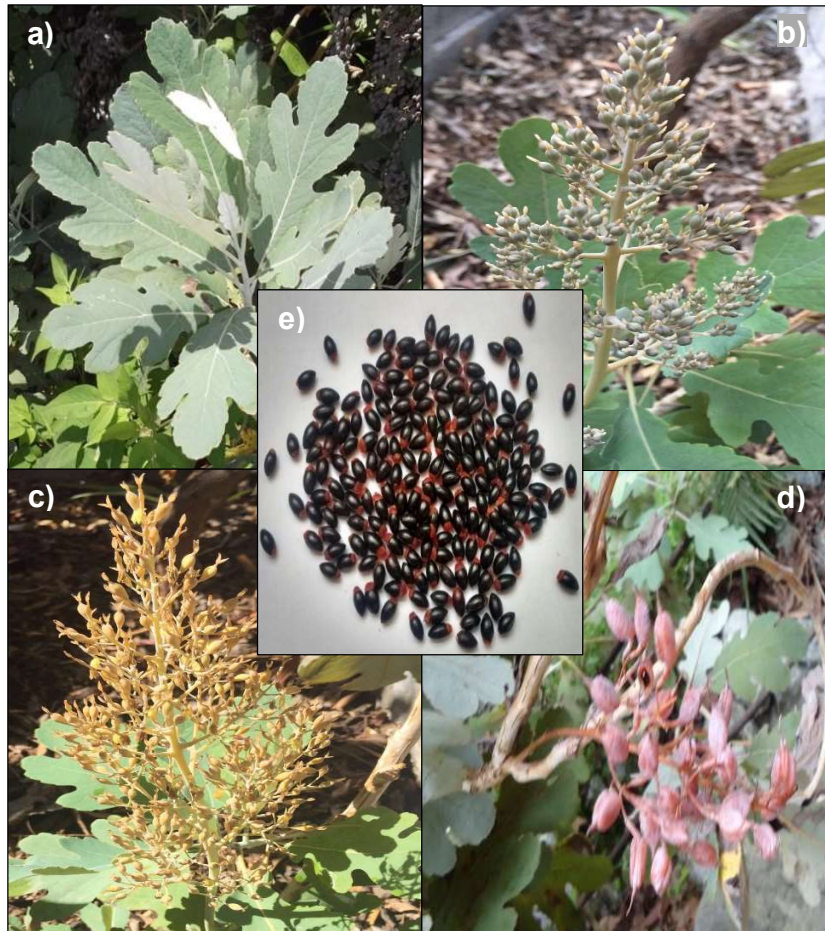


**Figura 3.** Sistema benzo[c]fenantridina

## 2.5 *Bocconia latisejala*

El género *Bocconia*, perteneciente a la familia Papaveraceae, consta de nueve especies endémicas de las áreas tropicales y subtropicales que se localizan desde México hasta Sudamérica. Se han reconocido las siguientes especies: *B. arborea*, *B. cordata*, *B. frutescens*, *B. integrifolia*, *B. latisejala*, *B. laurine*, *B. microcarpa*, *B. pearcei*, *B. vulcanica* [18, 43].

*B. latisejala*, conocida como “llora sangre” forma parte del matorral submontano de la Sierra Madre Oriental, se localiza en lomeríos de suaves pendientes y en los taludes inferiores sobre los plegamientos de las faldas de dicha sierra, entre los 400 y 800 m de altura sobre el nivel del mar [44]. Es un arbusto que crece hasta una altura de 2 m, de tallo quebradizo. Tiene las hojas grandes lobuladas, de 15 a 35 cm de ancho y de 10 a 30 cm de ancho, el haz es verde sin vellosidades y el envés es verde grisáceo con vellosidades, frecuentemente están concentradas en los extremos de las ramas. Inflorescencia en panículas de 25 a 60 cm de largo, ubicadas en las puntas de las ramas, flores pequeñas, apétalas, cáliz de dos sépalos, contienen de 12 a 16 estambres de filamentos cortos y finos y anteras alargadas color amarillo. El fruto es una cápsula elipsoide, lisa, de hasta 7 mm de largo, carnosa y puntiaguda en ambos extremos, de color rojo amaranto, las semillas son pequeñas, negras, con una zona roja en un extremo [Figura 4].

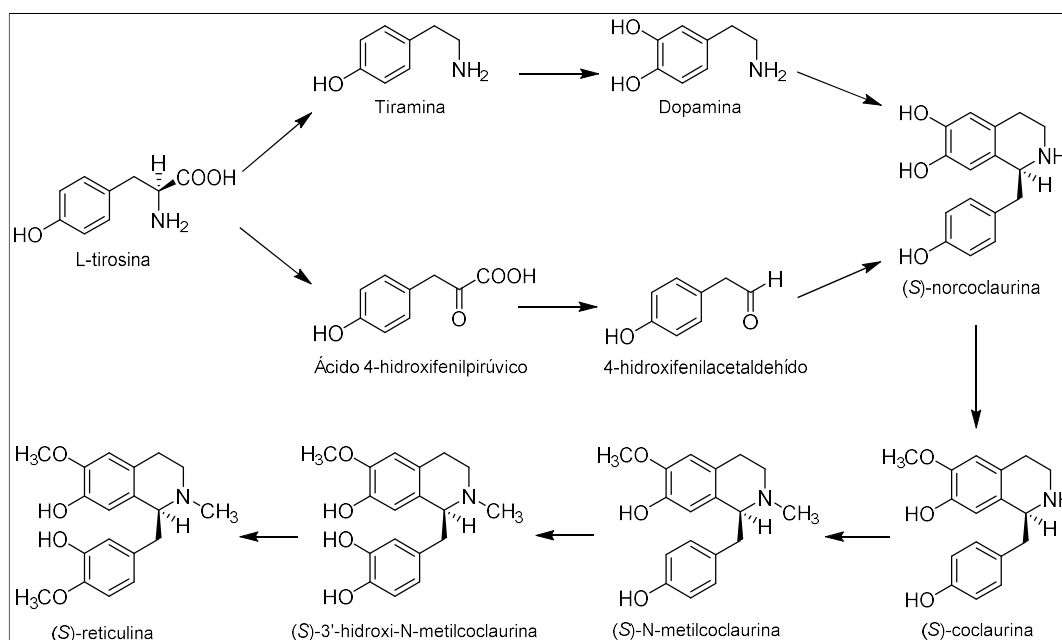


**Figura 4.** Hojas (a), inflorescencia temprana (b), flores (c) frutos (d) y semillas (e) de *B. latisejala*.

## 2.6 Origen biosintético de los alcaloides de tipo benzo[c]fenantridina

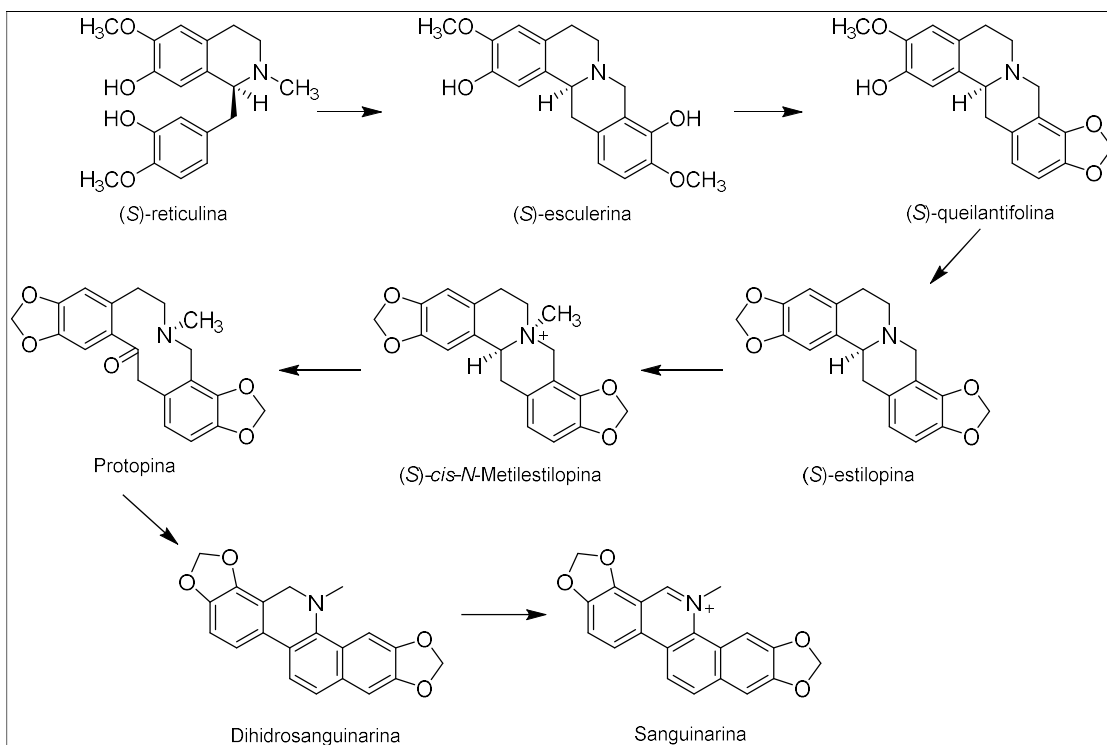
Se ha encontrado que los alcaloides de tipo benzo[c]fenantridina, se biosintetizan a partir de tirosina a través de alcaloides de tipo bencilisoquinolina, tetrahidroprotoberberina y protopina (Figura 6) [45–47]. Los compuestos benciltetrahidroisoquinolínicos son intermediarios fundamentales durante el metabolismo de alcaloides isoquinolínicos, los cuales tienen un precursor común:

(S)-reticulina. Esta afirmación está basada en resultados obtenidos de experimentos con marcaje isotópico, en donde a partir de *L*-tirosina se observó la formación de (S)-norcoclaurina, (S)-coclaurina y (S)-reticulina, a través de metilaciones con *S*-adenosilmetionina y de hidroxilaciones (Figura 5) [45–50].



**Figura 5.** Biosíntesis para la formación de (S)-Reticulina a partir de *L*-Tirosina.

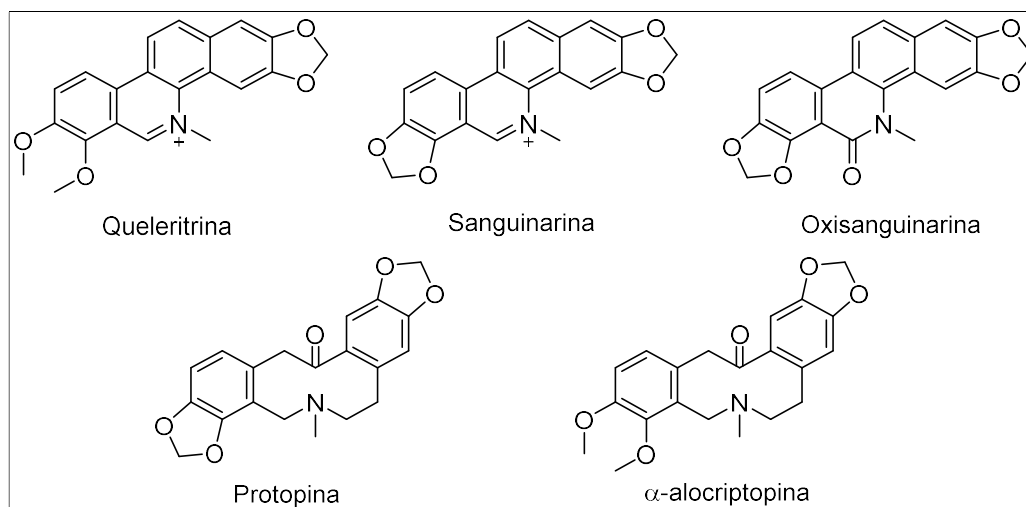
Se ha delineado una ruta que involucra la secuencia de (S)-esculerina → (S)-queilantifolina → (S)-estilopina → (S)-*cis*-*N*-metilestilopina → protopina → benzo[*c*]fenantridinas (Figura 6) [45–47].



**Figura 6.** Ruta biosintética de alcaloides a partir de (S)-Reticulina.

## 2.7 Estudios fitoquímicos de los alcaloides de tipo benzo[*c*]fenantridina

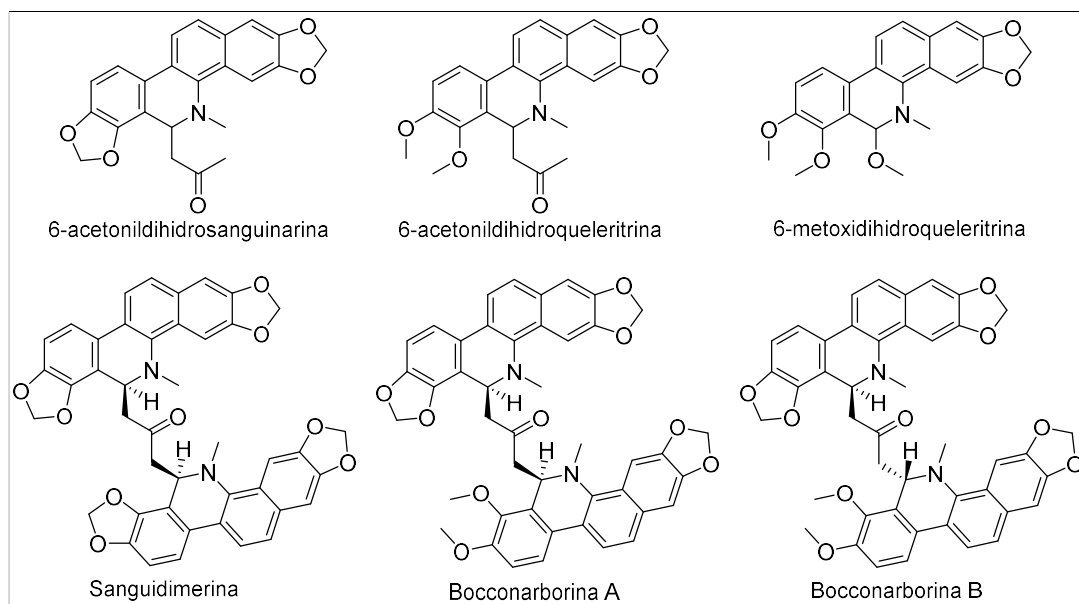
En un estudio realizado por Domínguez y col. [51] en el año de 1965, se reportó el aislamiento de queleritrina, sanguinarina, oxisanguinarina, protopina, y  $\alpha$ -alocriptopina de *B. latispala* (Figura 7). Dichos compuestos fueron caracterizados sin rigor mediante punto de fusión, análisis elemental y espectroscopía de infrarrojo.



**Figura 7.** Compuestos aislados de *B. latispala*.

En 1984, Krane y col. [52] reportaron el aislamiento de alcaloides tipo benzo[c]fenantridina de plantas de la familia Papaveraceae: sanguinarina, quelirubina, queleritrina, quelilutina, sanguirubina, avicina, dihidrosanguinarina, oxisanguinarina, oxiquelirubina, dihidroqueleritrina, oxiqueleritrina, entre otros.

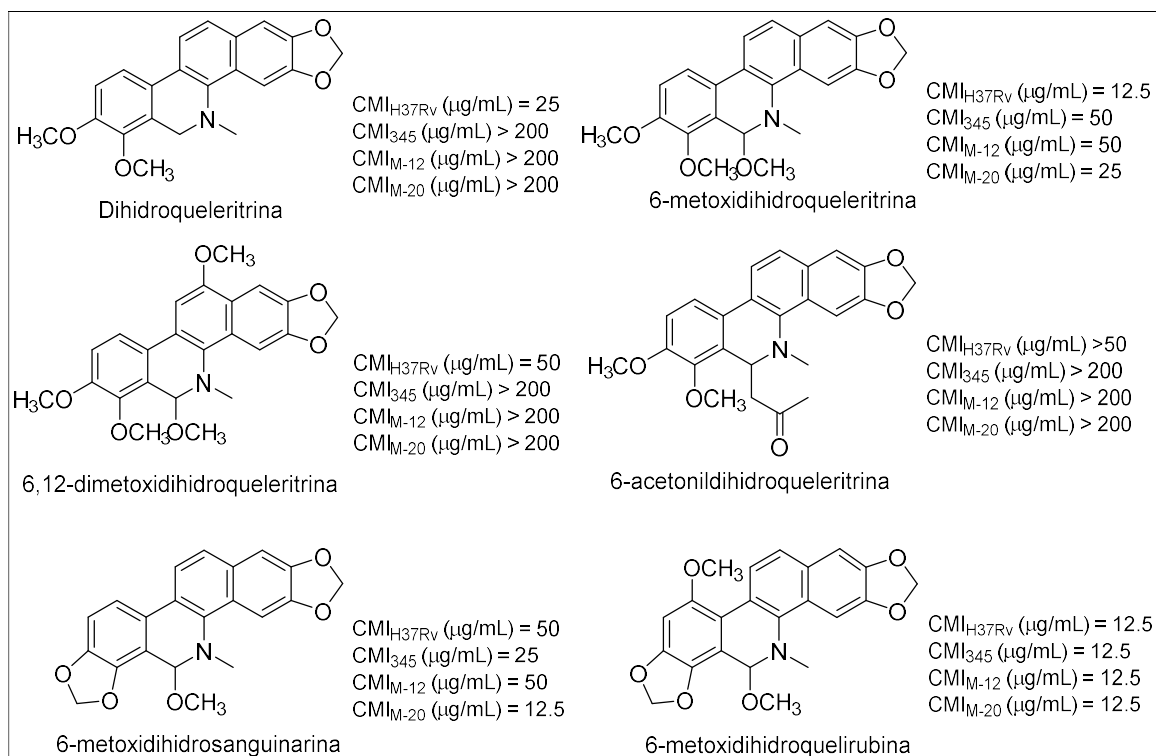
En el 2000, Julián y col. [18, 30] aislaron y caracterizaron los alcaloides presentes en la planta *B. arborea*: 6-acetonildihidosanguinarina, 6-acetonildihidroqueleritrina, 6-metoxidihidroqueleritrina, sanguidimerina, bocconarborina A y bocconarborina B (Figura 8). Además se encontró que el alcaloide benzo[c]fenantridínico denominado 6-metoxidihidroqueleritrina, presentó potencial actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, siendo la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 25, 25 y 12  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.



**Figura 8.** Alcaloides aislados de *B. arborea*.

En el 2009, Camacho y col. [4] reportaron la actividad antimicobacteriana de seis alcaloides benzo[c]fenantridínicos aislados de *B. arborea*, de los cuales 6-metoxidihidroquelerubina mostró mayor actividad (CMI = 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) contra cepas sensibles y resistentes de *M. tuberculosis*. Asimismo, se observa que 6-metoxidihidroqueleritina y 6-metoxidihidrosanguinarina también mostraron potente actividad antimicobacteriana (Figura 9). De estos alcaloides, 6-metoxidihidroquelerubina representa una molécula promisorio para subsecuentes investigaciones como agente antituberculoso.





**Figura 9.** Actividad inhibitoria de cepas sensible (H37Rv) y resistentes (M-12, M-20, 345) de *M. tuberculosis* para los alcaloides obtenidos de *B. arborea*.

Investigaciones recientes han reportado que alcaloides como la sanguinarina y berberina inducen la filamentación de bacterias tanto grampositivas como gramnegativas y previenen la división celular bacteriana mediante la inhibición de la citocinesis [33, 34]. Esto se debe a que dichos compuestos inhiben la función de FtsZ (proteína mediadora de la citocinesis en bacterias) [34].

El estudio realizado por Domínguez [51] es el único análisis fitoquímico reportado en literatura para *B. latisejala*, pero no se hace un análisis riguroso y se fundamentan los resultados en técnicas de caracterización que no permiten

concluir categóricamente sobre la estructura molecular. Tanto el estudio de Domínguez como los realizados a plantas del mismo género dan indicios de que *B. latisejala* posee alcaloides de tipo benzo[c]fenantridina, con gran potencial antituberculoso.

## 2.8 Justificación del Proyecto

La alta mortalidad causada por la TB estimula la búsqueda de nuevos fármacos antituberculosos. Teniendo en cuenta que se ha reportado que las plantas del género *Bocconia* son de gran importancia fitoquímica debido a la biosíntesis de alcaloides de tipo benzo[c]fenantridina y que estos alcaloides han demostrado poseer actividad antimicrobiana, en este proyecto se eligió la planta *B. latisejala*, de acuerdo con los criterios taxonómico y quimiotaxonómico, para aislar sus alcaloides y ponderar su capacidad antituberculosa.

## **CAPITULO 3**

### **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1 Hipótesis**

La planta *Bocconia latisejala* contiene alcaloides que poseen mayor actividad inhibitoria de *Mycobacterium tuberculosis* que etambutol y/o levofloxacina.

#### **3.2 Objetivo general**

Aislamiento, caracterización estructural y determinación de la actividad antimicobacteriana de los alcaloides presentes en las semillas de *B. latisejala*.

### 3.3 Objetivos específicos

1. Búsqueda bibliográfica.
2. Recolección de las semillas de *B. latisejala*.
3. Extracción metanólica de las semillas.
4. Fraccionamiento del extracto metanólico.
5. Separación y purificación de alcaloides.
6. Caracterización de los compuestos puros.
7. Evaluación de la actividad antimicrobiana.
8. Evaluación de la actividad citotóxica.

## **CAPITULO 4**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **4.1 Material y equipo**

##### **4.1.1 Estudio fitoquímico**

Para la cromatografía en columna (CC) se empleó gel de sílice (0.040-0.063 mm; (EMD chemical inc). Para la cromatografía en placa fina se emplearon: cromatofolios de gel de sílice 60 F-254 (Fluka analytical). La cromatografía preparativa plana se realizó en cromatoplasmas preparativas de gel de sílice 60 F-254 20 x 20 cm (Merck). Como revelador se utilizó una lámpara de UV, marca Spectroline ( $\lambda$  254 y 365). Los eluentes empleados en las cromatografías fueron: cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ), metanol (MeOH), hexano (Hex), éter etílico, éter de petróleo, etanol (EtOH) y acetona. Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Johns. Durante todo el proyecto se utilizó el evaporador rotativo marca Yamato modelo BM500. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de una dimensión ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT 90, DEPT 135) y dos dimensiones (COSY, NOESY,

HMQC, HMBC) se realizaron en un equipo de RMN Varian Unity Inova 300; se empleó tetrametilsilano (TMS) como estándar interno; los desplazamientos químicos se reportan en ppm ( $\delta$ ). Los espectros de masas se realizaron en un espectrómetro de masas Jeol AccuTOF JMS-T100LC. Los valores de rotación óptica se obtuvieron en un polarímetro Perkin Elmer 343 (Instituto de Química, UNAM).

#### **4.1.2 Ensayos biológicos**

Para todos los ensayos biológicos se emplearon microplacas estériles de 96 pocillos con tapa (Corning Costar, New York). En los ensayos para determinar actividad antimicobacteriana se empleó: medio Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), rezasurina (Biotum, Hayward, CA), ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), tween 80 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), glicerina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), tubos cónicos de 10 y 25 mL (Falcon, USA), agua bidestilada, dimetilsulfóxido (J.T.Baker, USA), Incubadora (SANYO, Miami).

## **4.2 Estudio fitoquímico**

La fitoquímica del proyecto se realizó en el Laboratorio de Química de Productos Naturales, División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

### **4.2.1 Material vegetal**

Las semillas de *B. latispala* se recolectaron en el municipio de San Pedro Garza García del estado de Nuevo León. La planta se localizó en zonas pedregosas de las faldas de la Sierra Madre Oriental y se realizaron dos colectas, una el día 13 de julio de 2014 (135.4 g) y otra el 20 de julio de 2014 (600 g), lo que permitió obtener un total de 735.4 g de semillas. El ejemplar de la planta fue identificado y depositado en el Herbario UNL de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL con los números de folio 26666 y 26667.

### **4.2.2 Obtención del extracto metanólico**

Los 735.4 g de semilla fueron triturados con ayuda de una licuadora y un mortero y macerados con 1.4 L de MeOH por 48 horas, esta operación se repitió durante dos semanas, el material fue filtrado por gravedad y concentrado en un evaporador rotativo, lo que permitió obtener 112.135 g de extracto metanólico.

#### 4.2.3 Fraccionamiento del extracto metanólico

El extracto metanólico se sometió a una cromatografía en columna (CC) usando como fase estacionaria (FE) gel de sílice (1601.2 gr) y fase móvil (FM) un gradiente de Hex/CHCl<sub>3</sub>/MeOH. Se obtuvieron un total de 18 fracciones de diferentes polaridades (Tabla 1).

**Tabla 1.** Fracciones de la separación de extracto metanólico.

Fracción	Elución	Unión	Masa (g)
1-9	Hex 100	A	0.1242
10-15	Hex:CHCl <sub>3</sub> 90:10	B	0.0030
16-23	Hex:CHCl <sub>3</sub> 85:15	C	0.1410
24-44	Hex:CHCl <sub>3</sub> 80:20	D	0.8654
45-57	Hex:CHCl <sub>3</sub> 60:40	E	0.0021
58-69	Hex:CHCl <sub>3</sub> 40:60	F	2.1513
70-75	Hex:CHCl <sub>3</sub> 30:70	G	4.7956
76-78	Hex:CHCl <sub>3</sub> 30:70	H	2.6284
79-92	Hex:CHCl <sub>3</sub> 20:80	I	3.0770
92-104	Hex:CHCl <sub>3</sub> 10:90	JK	5.8042
106-108	CHCl <sub>3</sub> 100	L	2.6543
109-110	CHCl <sub>3</sub> 100	M	0.6492
111	CHCl <sub>3</sub> 100	N	0.9643
112	CHCl <sub>3</sub> :MeOH 80:20	O	30.7559
113-118	CHCl <sub>3</sub> :MeOH 80:20	P	3.1559
119-127	CHCl <sub>3</sub> :MeOH 50:50	Q	18.0951
128-131	MeOH 100	R	0.4840

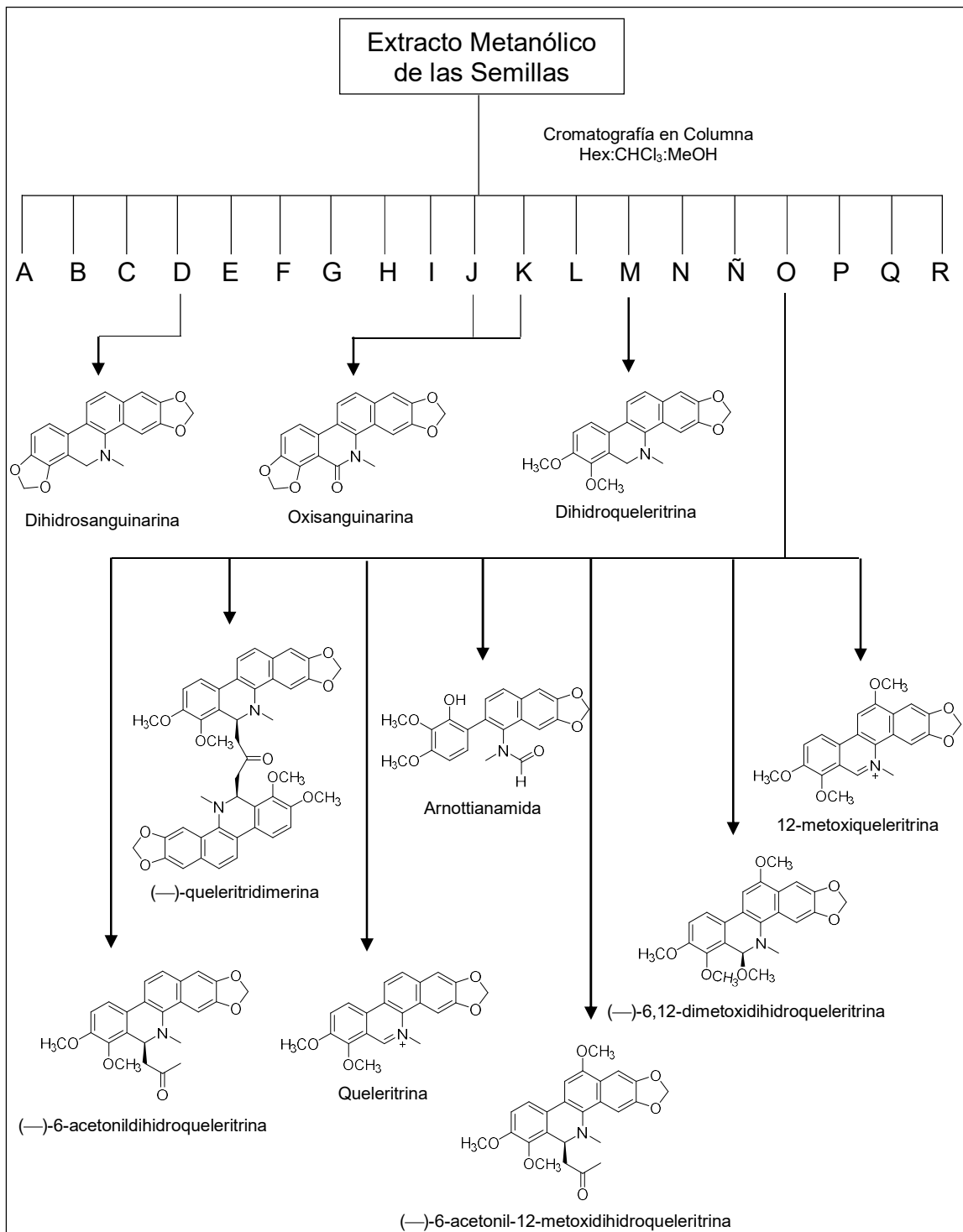


#### 4.2.4 Aislamiento y purificación de los alcaloides

De las fracciones más abundantes se lograron aislar y purificar, por diferentes técnicas cromatográficas y de cristalización, diez alcaloides, nueve del tipo benzo[c]fenantridina: dihidrosanguinarina, oxisanguinarina, dihidroqueleritrina, (–)-6-acetonildihidroqueleritrina, (–)-queleritridimerina, queleritrina, (–)-6-acetonil-12-metoxidihidroqueleritrina, (–)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina y 12 metoxiqueleritrina; y una seco-benzo[c]fenantridina [35]: arnottianamida (Figura 10).

#### 4.2.5 Caracterización de los compuestos aislados

La caracterización de los compuestos aislados se llevó a cabo por Resonancia Magnética Nuclear de una ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT 90, DEPT 135) y dos dimensiones (COSY, NOESY, HMQC, HMBC), Rotación Óptica y Espectrometría de Masas.



**Figura 10.** Cromatografía del extracto metanólico.

### **4.3 Ensayos biológicos**

Los ensayos para determinar la actividad antimicobacteriana se realizaron en el Laboratorio de Gastroenterología del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Los ensayos para determinar la actividad citotóxica se realizaron en el Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

#### **4.3.1 Actividad antimicobacteriana**

##### **4.3.1.1 Preparación de las muestras**

Las soluciones stock para la actividad antituberculosa se prepararon disolviendo aproximadamente 1 mg de las muestras a evaluar con dimetilsulfóxido (DMSO) hasta alcanzar una concentración de 20 mg/mL. Las soluciones de trabajo se prepararon tomando una alícuota de las soluciones stock y diluyéndolas con medio Middlebrook 7H9 enriquecido.

##### **4.3.1.2 Preparación del medio Middlebrook 7H9**

El medio Middlebrook 7H9 se preparó pesando 4.7 g de base caldo Middlebrook 7H9 y añadiendo 20 mL de glicerol al 10% vol/vol, 880 mL de agua. El medio se esterilizó en autoclave por 15 min a 121°C/15 psi y posteriormente a

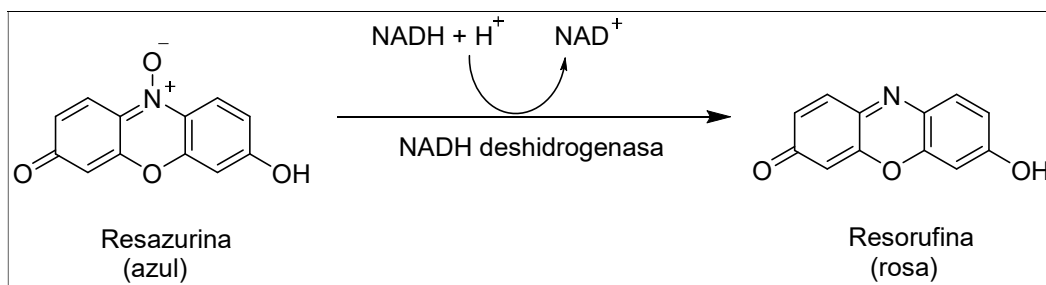
temperatura ambiente, se le agregó 100 mL de OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa).

#### **4.3.1.3 Cepas bacterianas y preparación del inóculo**

Se empleó *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294, la cuál es sensible a isoniacida, rifampicina, etambutol y pirazinamida, y dos aislados clínicos de cepas multifármaco resistentes (MDR) de *M. tuberculosis*: G122 (sensible a estreptomycin y resistente a isoniacida, rifampicina y etambutol) y G133 (resistente a isoniacida, rifampicina y estreptomycin). Las cepas se cultivaron en medio Middlebrook 7H9 a 37 °C durante 2 semanas, con el propósito de que alcanzaran la fase logarítmica de crecimiento. El inóculo para el ensayo biológico se preparó diluyendo el cultivo en fase logarítmica hasta ajustar la turbidez al estándar No. 1 de McFarland, luego se diluyó a 1:20 con medio Middlebrook 7H9.

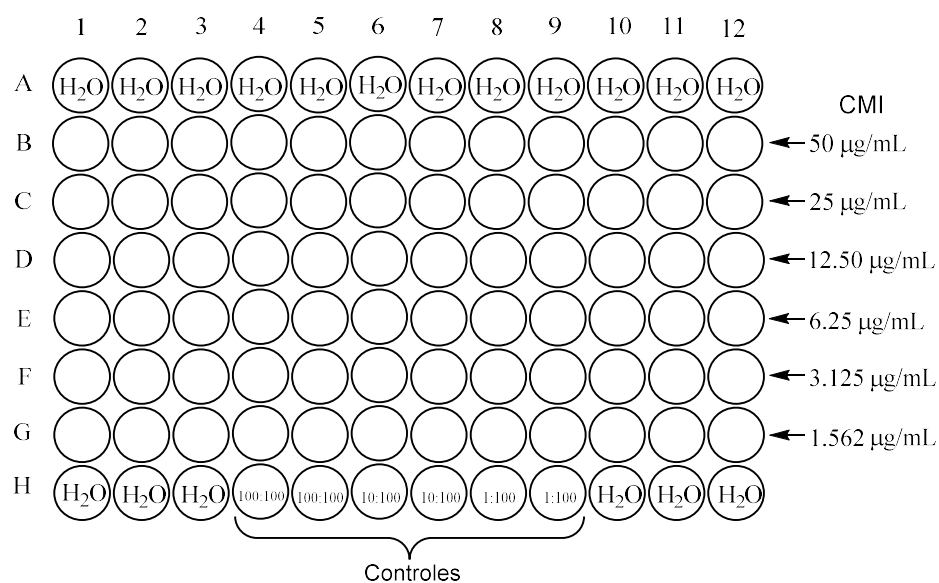
#### **4.3.1.4 Ensayo biológico**

La actividad antituberculosa se determinó con el ensayo de Microplaca de Alamar Azul [53–56]. El método se basa en que los microorganismos en crecimiento liberan al medio deshidrogenasas que reducen la resazurina, que es de color azul y sin fluorescencia en su forma oxidada, a resorufina, que es de color rosa y fluorescente en su forma reducida (Figura 11).



**Figura 11.** Reducción de resazurina a resorufina.

El ensayo se llevó a cabo en microplacas de 96 pocillos, cada concentración se realizó por duplicado. Se colocaron 200  $\mu$ L de agua estéril en los pozos de la primer fila (Fila A), en los demás se añadieron 100  $\mu$ L de caldo Middlebrook 7H9. Después se añadieron 100  $\mu$ L de la solución de trabajo 4X en los pocillos de concentración más alta (50  $\mu$ g/mL), con lo que se obtuvo una concentración de DMSO < 1% v/v en cada pocillo. Enseguida se realizó una serie de diluciones 1:2 a lo ancho de la placa y posteriormente se añadieron 100  $\mu$ L del inóculo bacteriano previamente preparado. Simultáneamente se prepararon tres controles a) 100:100, b) 190:10 y c) 199:1. Los cuales representan el 100%, 10% y 1% de la población bacteriana a ensayar. Las placas se incubaron a 37 °C por 5 días, después, se le adicionaron 20  $\mu$ L del reactivo Alamar azul y 12  $\mu$ L de Tween 80 al 10% a todos los pocillos, se re-incubaron a 37 °C por 24 horas. Si después de esta incubación se observó cambio de color del reactivo de azul a rosa, se interpretó como crecimiento, si no se observó cambio de color se interpretó como ausencia de crecimiento. Como controles positivos se utilizaron isoniacida, rifampicina, etambutol y levofloxacin. Se determinó la CMI de cada uno de los compuestos (Figura 12).



**Figura 12.** Distribución de placa de 96 pocillos en ensayo antimicobacteriano.

### 4.3.2 Citotoxicidad

Las propiedades citotóxicas de los compuestos puros se evaluaron utilizando Fibroblastos Gingivales Humanos (HGF) pertenecientes al panel del NCI mediante un rastreo de actividad (*screening*) con el Método Colorimétrico de la Sulforodamina B (SRB, un colorante de unión a proteínas) de acuerdo con el protocolo descrito en la literatura [57-59].

#### 4.3.2.1 Cultivo de las células

Las células fueron adaptadas al medio de cultivo RPMI-1640 adicionado con suero fetal bovino (10 %), una mezcla de antibióticos-antimicóticos al 10 % y

2 mM de glutamina. A estas líneas se les caracterizó el tiempo de duplicación y con ello se estableció la densidad de inóculo que se deposita en cada micropozo.

#### **4.3.2.2 Cosecha de las células**

Las células se adhirieron a las botellas de cultivo y para cosecharlas se adicionó 1 mL de 0.05 % de tripsina-EDTA. Enseguida que las células se desprendieron del sustrato plástico, se les adicionó medio de cultivo para inactivar la tripsina. Las células en suspensión se depositaron en tubos cónicos y fueron centrifugadas por 3 minutos, ya formado el paquete celular se le agregó medio de cultivo para resuspenderlas. De la suspensión se tomó una alícuota y se agregó azul de tripano, para contar la población de células viables y ajustar la densidad del inóculo. Se determinó una población de  $10 \times 10^4$  cel/mL, se hicieron los ajustes necesarios para depositar el inóculo en un volumen de 100  $\mu$ L/pozo a la densidad ya antes mencionada.

#### **4.3.2.3 Ensayo biológico**

Cada placa fue inoculada con la línea celular, por triplicado y después preincubada por 24 h a 37 °C con una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> y 100 % de humedad relativa, para favorecer la estabilidad de éstos antes de adicionar las sustancias a probar. Para el cernimiento primario (*screening*), cada compuesto se evaluó a la concentración más alta permitida 50  $\mu$ M. Las muestras fueron solubilizadas en DMSO a una concentración 100 veces mayor a la que se

evaluaron. Inmediatamente después de la preparación de las muestras en solución se agregaron 100 µL de la solución de cada compuesto a cada pozo, siendo el volumen final del pozo de 200 µL. Nuevamente la microplaca fue incubada por 48 h bajo las condiciones antes mencionadas. Al finalizar el periodo de incubación de los compuestos con las células, éstas fueron precipitadas (o fijadas) *in situ* añadiendo 50 µL de una solución de TCA frío al 50 % e incubadas a 4 °C por 60 minutos. Se desechó el sobrenadante y las placas se lavaron 5 veces con agua desionizada y secadas al ambiente. Para el teñido de las células fijadas al sustrato del pozo se añadieron 100 µL de una solución de SRB al 0.4 % a cada pozo y fueron incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. La SRB no unida fue removida lavando 3 veces con ácido acético al 1 % y se dejaron secar al ambiente, después se les agregó 100 µL de un buffer de tris y se agitaron por 10 minutos para favorecer la disolución del complejo; a continuación se midió la densidad óptica (DO) en un lector de microplacas (Synergy/BioteK) a una longitud de onda de 515 nm. Los datos se procesaron obteniendo el promedio de la DO de los 3 pozos/línea tratados con el compuesto (DO<sub>t</sub>), los 3 pozos tratados con DMSO (DO<sub>c</sub>) y 2 pozos de testigos, es decir aquellos que no tiene células pero si compuesto (DO<sub>b</sub>). El porcentaje de inhibición del crecimiento (%IC) se calculó con la siguiente expresión:

$$\%IC = 100 - \left( \frac{DO_t - DO_b}{DO_c - DO_b} \right) (100)$$



#### **4.4 Disposición de residuos**

La disposición de los residuos de la parte experimental se realizó en base a las normas establecidas por el departamento de manejo y control de residuos de la Facultad de Ciencias Químicas y de la Facultad de Medicina de la UANL; así como de acuerdo a los lineamientos del Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la UNAM.

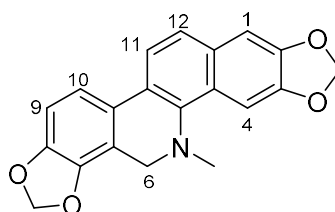
## CAPITULO 5

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1 Aislamiento y purificación de los alcaloides

##### 5.1.1 Aislamiento de dihidrosanguinarina

De la fracción D (Hex:CHCl<sub>3</sub> 80:20) se obtuvo por recristalizaciones sucesivas con CHCl<sub>3</sub> y MeOH un sólido cristalino color blanco (309.7 mg equivalente al 0.0004 % del total del peso de las semillas), el cual fue caracterizado como dihidrosanguinarina (Figura 13). Dicha sustancia resultó ser mayoritaria de esta fracción, sus características físicas y espectroscópicas se presentan a continuación.



**Figura 13.** Dihidrosanguinarina.

Cristales color blanco

En CCF se observa color azul intenso (UV<sub>365</sub>)

Rf: 0.95 Hex:CHCl<sub>3</sub>:MeOH (50:47.5:2.5)

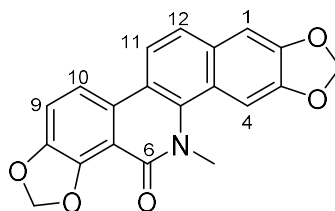
C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub> PM: 333 g/mol Pf: 262-265 °C

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>ppm</sub>: 7.68 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-11), 7.67 (1H, s, H-4), 7.47 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-12), 7.29 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-10), 7.10 (1H, s, H-1), 6.85 (1H, d, J = 8.1, H-9), 6.05 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 6.03 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 4.19 (2H, s, H-6), 2.61 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>ppm</sub>: 148.1 (C-8), 147.49 (C-2), 147.07 (C-3), 144.60 (C-7), 142.49 (C-4b), 130.77 (C-12a), 127.23 (C-10b), 126.49 (C-10a), 124.37 (C-4a), 123.91 (C-12), 120.32 (C-11), 116.17 (C-10), 113.60 (C-6a), 107.16 (C-9), 104.31 (C-1), 101.29 (OCH<sub>2</sub>O), 101.01 (OCH<sub>2</sub>O), 100.72 (C-4), 48.24 (C-6), 41.54 (N-CH<sub>3</sub>).

### 5.1.2 Aislamiento de oxisanguinarina

De las fracciones J y K se recuperó un sólido con un color gris gris negruzco (Hex:CHCl<sub>3</sub> 10:90) el cual fue purificado por recristalizaciones sucesivas con CHCl<sub>3</sub> y MeOH, obteniéndose 435.4 mg de un sólido de color café grisáceo (0.00059 % del total del peso de las semillas). Dicha sustancia resultó ser mayoritaria de esta fracción y fue identificada, por sus características físicas y espectroscópicas, como oxisanguinarina. Este alcaloide fue aislado en 1965 de las hojas, raíces y semillas de *B. latisejala* [51].



**Figura 14.** Oxisanguinarina.

Sólido color café grisáceo

En CCF se observa color azul oscuro (UV<sub>254</sub>) y azul brillante (UV<sub>365</sub>)

Rf: 0.60 Hex:CHCl<sub>3</sub>:MeOH (50:45:5)

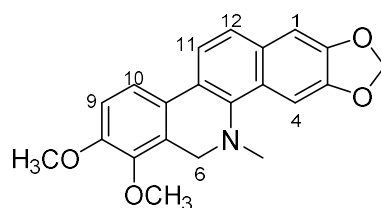
C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>5</sub> PM: 347 g/mol Pf: > 300 °C

IR:  $\nu$  = 2922 (C-H), 1647 (C=O), 1477 (C=C), 1257 (C-O), 1038 (C-O) cm<sup>-1</sup>.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{ppm}$ : 7.98 (1H, d, *J* = 9.3 Hz, H-12), 7.76 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-10), 7.56 (1H, s, H-4), 7.54 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-11), 7.25 (1H, d, *J* = 9.3 Hz, H-9), 7.16 (1H, s, H-1), 6.28 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 6.10 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 3.91 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>).

### 5.1.3 Aislamiento de dihidroqueleritrina

En la fracción M (CHCl<sub>3</sub> 100 %) se encontró un polvo amarillo que fue purificado por recristalizaciones sucesivas con CHCl<sub>3</sub> y MeOH, obteniéndose 51.9 mg (0.00007 % del material seco). Dicho sólido fue caracterizado como dihidroqueleritrina (Figura 14) mediante el análisis de sus propiedades físicas y espectroscópicas.



**Figura 15.** Dihidroqueleritina.

Sólido color amarillo

En CCF se observa color amarillo brillante ( $UV_{365}$ )

Rf: 0.79 Hex:CHCl<sub>3</sub>:MeOH (50:45:5)

C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub> PM: 349 g/mol Pf: 164-165 °C

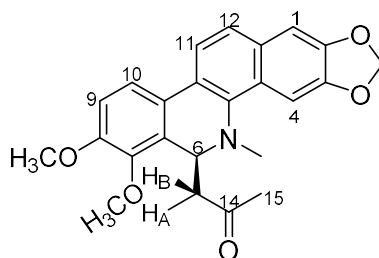
RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>ppm</sub>: 7.70 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-11), 7.67 (1H, s, H-4), 7.51 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-10), 7.48 (1H, d, *J* = 9 Hz, H-12), 7.11 (1H, s, H-1), 6.94 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-9), 6.05 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 4.29 (2H, s, H-6), 3.93 (3H, s, C(7)-OCH<sub>3</sub>), 3.88 (3H, s, C(8)-OCH<sub>3</sub>), 2.60 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>ppm</sub>: 152.24 (C-3), 148.04 (C-2), 147.43 (C-8), 146.06 (C-7), 142.68 (C-4b), 130.76 (C-12a), 126.34 (C-4a), 126.24 (C-10a), 126.20 (C-10b), 124.22 (C-6a), 123.75 (C-12), 120.10 (C-11), 118.66 (C-10), 110.90 (C-9), 104.33 (C-1), 101 (OCH<sub>2</sub>O), 100.70 (C-4), 61.09 (7-OCH<sub>3</sub>), 55.79 (8-OCH<sub>3</sub>), 48.71 (C-6), 41.29 (N-CH<sub>3</sub>).

#### 5.1.4 Aislamiento de (-)-6-acetonildihidroqueleritina

La fracción O (CHCl<sub>3</sub>:MeOH 80:20) (30.756 g) fue separada en sus constituyentes mediante una cromatografía en columna empacada con gel de

sílice (615.120 g). Se utilizó una columna de 62 cm de altura y 3 cm de diámetro y se usó un sistema de elución en gradiente de Hex:CHCl<sub>3</sub>:MeOH, iniciando con una mezcla de Hex:CHCl<sub>3</sub> 60:40 e incrementando gradualmente la polaridad de la mezcla de elución hasta MeOH 100 %. Los eluatos colectados fueron de 100 mL cada uno. De las subfracciones 4-8 (Hex:CHCl<sub>3</sub> 36:64 - Hex:CHCl<sub>3</sub> 20:80) se recuperaron algunos cristales color amarillo claro, que se lavaron con MeOH y después se recrystalizaron usando CHCl<sub>3</sub> y MeOH (1843.4 mg). Este compuesto también fue aislado de la subfracción 18 (Hex:MeOH 90:10) de la columna mencionada (884.8 mg). Se obtuvieron en total 2728.2 mg, (0.0037 % del material seco) de un compuesto que fue caracterizado como (-)-6-acetonildihidroqueleritrina (Figura 15) mediante el análisis de sus propiedades físicas y espectroscópicas.



**Figura 16.** (-)-6-acetonildihidroqueleritrina.

Cristales color amarillo claro

En CCF se observa color azul rey (UV<sub>254</sub>) y azul rey brillante (UV<sub>365</sub>)

R<sub>f</sub>: 0.93 Hex:CHCl<sub>3</sub>:MeOH (50:45:5)

C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub> PM: 405 g/mol Pf: 186-188 °C

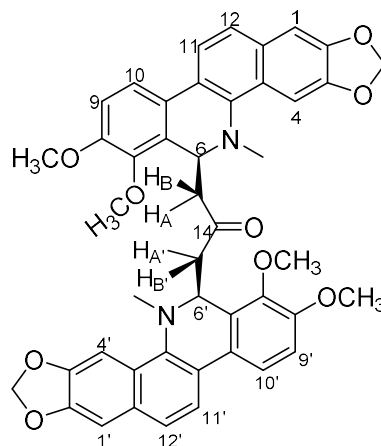
RO  $[\alpha]_D$ : -13.59 ° (c 1.03, CHCl<sub>3</sub>)

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{ppm}$ : 7.71 (1H, d,  $J$  = 8.7 Hz, H-11), 7.53 (1H, d,  $J$  = 8.7 Hz, H-10), 7.51 (1H, s, H-4), 7.48 (1H, d,  $J$  = 8.7 Hz, H-12), 7.10 (1H, s, H-1), 6.95 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-9), 6.03 (2H, dd,  $J$  = 1.8, 1.2 Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.04 (1H, dd,  $J$  = 11.1, 3.9 Hz, H-6), 3.96 (3H, s, C(7)-OCH<sub>3</sub>), 3.93 (3H, s, C(8)-OCH<sub>3</sub>), 2.64 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 2.58 (1H, dd,  $J$  = 14.7, 11.4 Hz, CO-CH<sub>B</sub>), 2.26 (1H, dd,  $J$  = 14.7, 3.9 Hz, CO-CH<sub>A</sub>), 2.06 (3H, s, COCH<sub>3</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{ppm}$ : 207.65 (C-14), 152.24 (C-3), 148.25 (C-2), 147.67 (C-8), 145.61 (C-7), 131.15 (C-12a), 127.41 (C-4a), 124.88 (C-10a), 123.95 (C-12), 123.37 (C-6a), 119.85 (C-11), 118.89 (C-10), 111.62 (C-9), 104.43 (C-1), 101.13 (OCH<sub>2</sub>O), 100.70 (C-4), 61.07 (7-OCH<sub>3</sub>), 55.89 (8-OCH<sub>3</sub>), 55.00 (C-6), 46.93 (C-13), 42.90 (N-CH<sub>3</sub>), 31.20 (C-15).

### 5.1.5 Aislamiento de (-)-queleritridimerina

De la subfracción 12 (Hex:CHCl<sub>3</sub> 5:95), obtenida de la fracción O tal como se describe en la sección 5.1.3, se recuperó un sólido color crema el cual fue solubilizado en la mínima cantidad de CHCl<sub>3</sub> caliente y recristalizado de metanol en baño de hielo, después se lavó con MeOH y se fue intercalando el proceso de recristalización y lavado. Se obtuvieron 117.1 mg de un sólido blanco (0.00016 % del material seco), el cual fue identificado como (-)-queleritridimerina (Figura 16) con base en sus propiedades físicas y espectroscópicas.



**Figura 17.** (-)-queleritridimerina.

Sólido color blanco

En CCF se observa color azul oscuro (UV<sub>254</sub>) y azul brillante (UV<sub>365</sub>)

Rf: 0.80 Hex:CHCl<sub>3</sub>:MeOH (50:45:5)

C<sub>45</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub> PM: 752 g/mol Pf: 289 °C

RO [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>: -0.96 ° (c 2.08, CHCl<sub>3</sub>)

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{ppm}$ : 7.60 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-11, H-11'), 7.48 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-10, H-10'), 7.40 (2H, s, H-4, H-4'), 7.38 (2H, d,  $J = 9$  Hz, H-12, H-12'), 7.00 (2H, s, H-1, H-1'), 6.91 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-9, H-9'), 5.99 (2H, d,  $J = 1.2$  Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.92 (2H, d,  $J = 0.9$  Hz, OCH<sub>2</sub>O), 5.17 (2H, dd,  $J = 10.8, 3.9$  Hz, H-6, H-6'), 3.97 (6H, s, C(7)-OCH<sub>3</sub>, C(7')-OCH<sub>3</sub>), 3.92 (6H, s, C(8)-OCH<sub>3</sub>, C(8')-OCH<sub>3</sub>), 2.61 (6H, s, N-CH<sub>3</sub>, N-CH<sub>3</sub>'), 2.40 (2H, dd,  $J = 15.6, 10.8$  Hz, CO-CH<sub>B</sub>, CO-CH<sub>B</sub>'), 2.30 (2H, dd,  $J = 15.6, 3.9$  Hz, CO-CH<sub>A</sub>, CO-CH<sub>A</sub>').

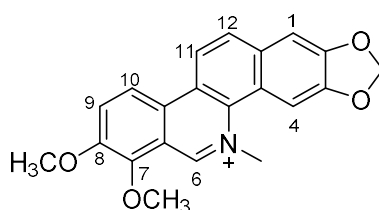
RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{ppm}$ : 207.01 (C-14), 152.13 (C-3, C3'), 148.03 (C-2, C-2'), 147.54 (C-8, C-8'), 145.63 (C-7, C-7'), 139.40 (C-4b, C-4b'), 131.00 (C-12a, C-12a'), 128.55 (C-4a, C-4a'), 127.46 (C-10a, C-10a'), 125.01 (C-10b, C-10b'),



123.78 (C-6a, C-6a'), 123.23 (C-12, C-12'), 119.71 (C-11, C-11'), 118.78 (C-10, C-10'), 111.42 (C-9, C-9'), 104.23 (C-1, C-1'), 101.04 (2 x OCH<sub>2</sub>O), 100.80 (C-4, C-4'), 61.07 (7-OCH<sub>3</sub>, 7'-OCH<sub>3</sub>), 55.86 (8-OCH<sub>3</sub>, 8'-OCH<sub>3</sub>), 54.30 (C-6, C-6'), 46.98 (C-13, C-13'), 42.76 (N-CH<sub>3</sub>, N-CH<sub>3</sub>').

### 5.1.6 Aislamiento de queleritrina

De la subfracción 18 de la fracción O (CHCl<sub>3</sub>:MeOH 90:10) se recuperó un sólido color blanco, al intentar solubilizarlo en CHCl<sub>3</sub> quedaron en el fondo del vial unos cristales color rosa claro. Dichos cristales se recuperaron y se recrystalizaron con CHCl<sub>3</sub> y MeOH y después se dejaron reposar en una mezcla de CHCl<sub>3</sub> y MeOH para que cristalizaran lentamente. Se obtuvieron 28.8 mg de cristales de color rosa (0.00004 % del material seco), los cuales fueron caracterizados como queleritrina (Figura 17) mediante el análisis de sus propiedades físicas y espectroscópicas. Este alcaloide fue aislado en 1965 de las cortezas, tallos y semillas de *B. latisejala* [51].



**Figura 18.** Queleritrina.

Cristales color rosa claro

En CCF se observa color amarillo (UV<sub>254</sub>) y amarillo brillante (UV<sub>365</sub>)

Rf: 0.66 Hex:CHCl<sub>3</sub>:MeOH (50:45:5)

C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup> PM: 348 g/mol Pf: 244-246 °C

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, TFA-*d*) δ<sub>ppm</sub>: 9.93 (1H, s, H-6), 8.78 (1H, d, *J* = 9.3 Hz, H-11)  
8.71 (1H, d, *J* = 9 Hz, H-10), 8.35 (1H, d, *J* = 9.3 Hz, H-12), 8.30 (1H, d, *J* = 9.3  
Hz, H-9), 8.20 (1H, s, H-4), 7.65 (1H, s, H-1), 6.38 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 5.19 (3H, s,  
N-CH<sub>3</sub>), 4.51 (3H, s, C(7)-OCH<sub>3</sub>), 4.34 (3H, s, C(8)-OCH<sub>3</sub>).

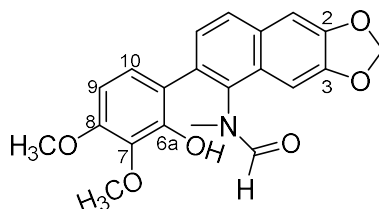
RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, TFA-*d*) δ<sub>ppm</sub>: 150.78 (C-2), 149.58 (C-3), 149.55 (C-8), 148.40  
(C-6), 132.30 (C-12a), 132.27 (C-11), 132.05 (C10a), 126.28 (C-12), 118.87 (C-  
9), 117.59 (C-10), 106.36 (C-1), 103.17 (C-4), 102.71 (OCH<sub>2</sub>O), 61.82 (7-OCH<sub>3</sub>),  
55.88 (8-OCH<sub>3</sub>), 51.47 (N-CH<sub>3</sub>).

EM-AR (EI<sup>+</sup>) *m/z* calculada para C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup> = 348.1230 [M]<sup>+</sup>; observada:  
348.1225.

### 5.1.7 Aislamiento de arnottianamida

El sólido blanco que se recuperó de la subfracción 18 de la fracción O (CHCl<sub>3</sub>:MeOH 90:10), y del cual se rescataron los cristales de queleritina, fue purificado realizando lavados con EtOH, y posteriormente recristalizando con CHCl<sub>3</sub> y MeOH. Se obtuvieron 181.2 mg, que corresponden al 0.00025 % de la materia orgánica total. De acuerdo con sus propiedades físicas y

espectroscópicas fue caracterizado como arnottianamida (Figura 18), un alcaloide de tipo seco-benzo[c]fenantridina [35].



**Figura 19.** Arnottianamida.

Sólido color blanco

En CCF se observa color azul oscuro (UV<sub>254</sub>)

Rf: 0.64 Hex:CHCl<sub>3</sub>:MeOH (50:45:5)

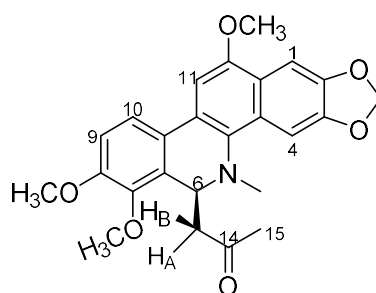
C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>6</sub> PM: 381 g/mol Pf: 265-267 °C

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>ppm</sub>: 8.10 (OC-H), 7.75 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-12), 7.29 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-11), 7.23 (1H, s, H-4), 7.02 (1H, s, H-1), 6.81 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-10), 6.57 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-9), 6.10 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 3.90 (3H, s, C(7)-OCH<sub>3</sub>), 3.85 (3H, s, C(8)-OCH<sub>3</sub>), 3.00 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>).

### 5.1.8 Aislamiento de (-)-6-acetonil-12-metoxidihidroqueleritrina

Al sólido restante de la subfracción 18, de la fracción principal O (7.311 g), se le realizó una cromatografía en columna empacada con gel de sílice (147.148 g), utilizando una columna de 39 cm de altura y 1.8 cm de diámetro. La columna fue eluida con Hexano 100 % y con mezclas en gradiente de Hex:CHCl<sub>3</sub> y

CHCl<sub>3</sub>:MeOH. Se colectaron eluatos de 20 mL, los cuales fueron reunidos en 8 fracciones de acuerdo con sus similitudes en cromatoplasas analíticas. De la subfracción 7 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH 95:5) de dicha columna se recuperó un sólido (0.1417 g) que fue purificado por medio de cromatografía en columna, utilizando una columna empacada con gel de sílice (4.069 g) de 36.5 cm de altura y 1.2 cm de diámetro. Dicha columna fue eluida con Hexano 100 % y mezclas de Hex:Acetona hasta finalizar con Acetona 100 %. Se colectaron eluatos de 20 mL y se reunieron en 3 fracciones (A, B y C) de acuerdo a su similitud cromatográfica. De la subfracción B (Hex:Acetona 70:30 - Hex:Acetona 30:70) se obtuvieron 14.5 mg de un sólido blanco (0.00002 % del material seco), el cual fue caracterizado como (-)-6-acetonil-12-metoxidihidroqueleritrina (Figura 19) mediante el análisis de sus propiedades físicas y espectroscópicas. Este alcaloide representa un nuevo producto natural.



**Figura 20.** (-)-6-acetonil-12-metoxidihidroqueleritrina.

Sólido color blanco

En CCF se observa color azul oscuro (UV<sub>254</sub>) y azul brillante (UV<sub>365</sub>)

Rf: 0.92 Hex:CHCl<sub>3</sub>:MeOH (50:45:5)

$C_{25}H_{25}NO_6$  PM: 435 g/mol Pf: 187-189 °C

RO  $[\alpha]_D$ : -1.18 ° (c 5.10,  $CHCl_3$ )

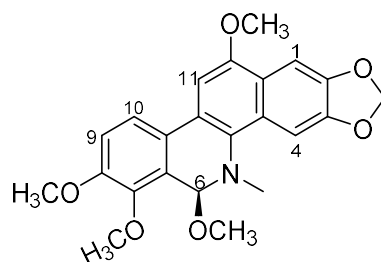
RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_{ppm}$ : 7.54 (1H, s, H-4), 7.52 (1H, d,  $J = 9.6$  Hz, H-10), 7.49 (1H, s, H-1), 7.06 (1H, s, H-11), 6.96 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz H-9), 6.05 (2H, dd,  $J = 1.8, 1.5$  Hz,  $OCH_2O$ ), 5.00 (1H, dd,  $J = 11.1, 3.9$  Hz, H-6), 4.04 (3H, s, C(12)- $OCH_3$ ), 3.96 (3H, s, C(7)- $OCH_3$ ), 3.93 (3H, s, C(8)- $OCH_3$ ), 2.58 (1H, dd,  $J = 14.7, 11.4$  Hz, CO- $CH_B$ ), 2.57 (3H, s, N- $CH_3$ ), 2.24 (1H, dd,  $J = 14.7, 3.9$  Hz, CO- $CH_A$ ), 2.06 (3H, s,  $COCH_3$ ).

RMN  $^{13}C$  (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_{ppm}$ : 152.38 (C-8), 147.75 (C-2), 145.87 (C-7), 123.28 (C-4a), 122.77 (C-6a), 118.91 (C-10), 111.67 (C-9), 101.25 (C-4), 100.55 ( $OCH_2O$ ), 99.63 (C-11), 98.45 (C-1), 61.07 (7- $OCH_3$ ), 55.91 (12- $OCH_3$ ), 55.77 (8- $OCH_3$ ), 55.47 (C-6), 46.74 (C-13), 42.86 (N- $CH_3$ ), 31.09 (C-15).

EM-AR (ESI+)  $m/z$  calculada para  $C_{25}H_{25}NO_6 = 436.1682$   $[M + H]^+$ ; observada: 436.1755.

### 5.1.9 Aislamiento de (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina

De la subfracción 8 ( $CHCl_3$ :MeOH 50:50), de la primer columna descrita en la sección 5.1.7, se obtuvo un sólido color blanco-crema, que fue purificado por recristalizaciones sucesivas con  $CHCl_3$  y MeOH (172.6 mg, 0.0002 % del material seco). El sólido fue caracterizado como (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina (Figura 20) con base en sus propiedades físicas y espectroscópicas.



**Figura 21.** (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritina.

Sólido color blanco-crema

En CCF se observa color amarillo intenso (UV<sub>254</sub>) y amarillo limón (UV<sub>365</sub>)

Rf: 0.55 Hex:CHCl<sub>3</sub>:MeOH (50:45:5)

C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>6</sub> PM: 409 g/mol Pf: 244-246 °C

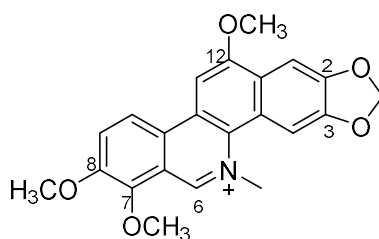
RO [α]<sub>D</sub>: -10.6 ° (c 1.6, CHCl<sub>3</sub>)

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>ppm</sub>: 7.68 (1H, s, H-4), 7.58 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-10), 7.56 (1H, s, H-1), 7.13 (1H, s, H-11), 7.04 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-9), 6.06 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 5.50 (1H, s, H-6), 4.02 (3H, s, C(12)-OCH<sub>3</sub>), 3.96 (3H, s, C(7)-OCH<sub>3</sub>), 3.93 (3H, s, C(8)-OCH<sub>3</sub>), 3.45 (3H, s, C(6)-OCH<sub>3</sub>), 2.67 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>ppm</sub>: 152.25 (C-8, C-12), 149.66 (C-3), 148.44 (C-7), 131.94 (C-4b), 122.81 (C-12a), 122.41 (C-10b), 118.87 (C-10), 112.83 (C-9), 101.13 (OCH<sub>2</sub>O), 100.63 (C-4), 99.84 (C-1), 98.85 (C-11), 86.21 (C-6), 61.77 (7-OCH<sub>3</sub>), 56.07 (8-OCH<sub>3</sub>), 55.80 (12-OCH<sub>3</sub>), 54.13 (6-OCH<sub>3</sub>), 40.52 (N-CH<sub>3</sub>).

### 5.1.10 Aislamiento de 12-metoxiqueleritrina

En el fondo de los viales que contenían el licor madre del proceso de recristalización de (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina, se encontró un sólido color amarillo mostaza. Dicho sólido se raspó para recuperarlo y se observó que solubilizó fácilmente en MeOH o CHCl<sub>3</sub> caliente. Por ello, el sólido fue recristalizado de CHCl<sub>3</sub> caliente y éter de petróleo en baño de hielo, obteniéndose 11.8 mg (0.00002 % de la materia orgánica total). El sólido fue caracterizado como 12-metoxiqueleritrina (Figura 21) con base en sus propiedades físicas y espectroscópicas. Este alcaloide es un componente minoritario de las semillas y es el alcaloide de mayor polaridad que ha sido aislado de *Bocconia*. Además representa un nuevo producto natural.



**Figura 22.** 12-metoxiqueleritrina.

Sólido color amarillo mostaza

En CCF se observa color amarillo intenso (UV<sub>254</sub>) y amarillo limón (UV<sub>365</sub>)

Rf: 0.37 Hex:CHCl<sub>3</sub>:MeOH (50:45:5)

C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>5</sub><sup>+</sup> PM: 378 g/mol Pf: 168-171 °C

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{ppm}}$ : 9.74 (1H, s, H-6), 8.48 (1H, d,  $J = 9.2$  Hz, H-10), 8.01 (1H, d,  $J = 9.2$  Hz, H-9), 7.96 (1H, s, H-4), 7.84 (1H, s, H-1), 7.70 (1H, s, H-11), 6.22 (2H, s,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 4.95 (3H, s, N- $\text{CH}_3$ ), 4.26 (3H, s, C(7)- $\text{OCH}_3$ ), 4.23 (3H, s, C(12)- $\text{OCH}_3$ ), 4.09 (3H, s, C(8)- $\text{OCH}_3$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{ppm}}$ : 157.30 (C-12), 150.79 (C-2), 149.87 (C-8, C-3), 146.77 (C-6), 146.13 (C-7), 128.33 (C-10a), 128.03 (C-10b), 127.82 (C-4b), 125.85 (C-12a), 125.75 (C-9), 121.63 (C-4a), 119.96 (C-6a), 118.89 (C-10), 104.11 (C-4), 103.15 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 101.61 (C-1), 95.63 (C-11), 62.55 (7- $\text{OCH}_3$ ), 57.12 (12- $\text{OCH}_3$ ), 56.80 (8- $\text{OCH}_3$ ), 52.42 (N- $\text{CH}_3$ ).

EM-AR (EI+)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{NO}_5^+$  = 378.1336  $[\text{M}]^+$ ; observada: 378.1330.

## 5.2 Elucidación estructural de los alcaloides aislados

### 5.2.1 Caracterización de dihidrosanguinarina

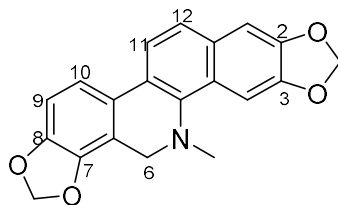
El sólido blanco obtenido de la fracción D del extracto metanólico fue caracterizado mediante RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de acuerdo con las siguientes señales: en  $\delta_{\text{H}}$  2.61 ppm hay una señal sencilla con integración para tres hidrógenos la cual es característica de grupo metilo unido al nitrógeno. A  $\delta_{\text{H}}$  4.19 ppm está presente una señal sencilla que integra para dos hidrógenos, la cual corresponde a los protones del metileno unido al nitrógeno. A  $\delta_{\text{H}}$  6.03 y 6.04 ppm



se observan dos singuletes que integran para dos hidrógenos cada uno y que, de acuerdo con sus desplazamientos químicos, corresponden a dos grupos dioximetileno. En la región de los protones aromáticos se observan cuatro dobletes ( $\delta_H$  6.85, 7.29, 7.47 y 7.68 ppm) con constantes de acoplamiento ( $J$ ) típicas para protones en posición *orto* (alrededor de 8.1 Hz) y dos señales sencillas ( $\delta_H$  7.10 y 7.67 ppm) que integran para un hidrógeno cada una y que son atribuibles a los protones en posición *para*.

El espectro de RMN  $^{13}C$  (75 MHz,  $CDCl_3$ ) presenta un total de 20 señales. Del experimento DEPT se dedujo la presencia de 10 carbonos unidos a hidrógeno, de los cuales uno corresponde a grupo metilo, tres a grupos metileno y seis a grupos metino. Por consiguiente, las señales restantes que se observan en el espectro de RMN  $^{13}C$  corresponden a carbonos cuaternarios con hibridación  $sp^2$  de acuerdo con sus desplazamientos químicos. Los desplazamientos químicos observados para el grupo metilo ( $\delta_C$  41.54 ppm) y uno de los grupos metileno ( $\delta_C$  48.24 ppm) indicaron que se trata de carbonos unidos a un átomo de nitrógeno; mientras que, los desplazamientos de los dos grupos metileno restantes ( $\delta_C$  101.01 y 101.29 ppm) son característicos de carbonos unidos a dos átomos de oxígeno (grupo dioximetileno). La comparación de los datos observados en RMN  $^1H$  y  $^{13}C$  con los reportados en la literatura permitieron establecer que la estructura corresponde al alcaloide benzo[c]fenantridínico denominado dihidrosanguinarina. Aunque algunos autores ya han reportado su

presencia en otras especies del género *Bocconia* [60-63], esta es la primera ocasión que dihidrosanguinarina se reporta como constituyente de *B. latisejala*.

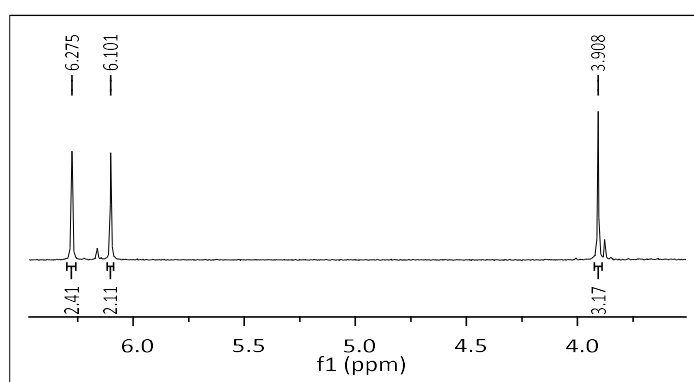


**Figura 23.** Caracterización de dihidrosanguinarina.

### 5.2.2 Caracterización de oxisanguinarina

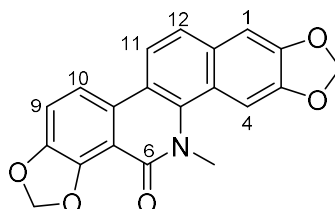
De las fracciones J y L se recuperó un sólido color café grisáceo, cuyo espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) presenta un patrón de señales similar al de dihidrosanguinarina, pero a campos más bajos, lo cual permitió inferir que su estructura molecular corresponde a una benzo[c]fenantridina. Por ejemplo, en  $\delta_H$  3.91 ppm se observa una señal sencilla con integración para tres hidrógenos que fue atribuida a un grupo metilo unido al átomo de nitrógeno de un sistema de *N*-metil-2-piridona. A  $\delta_H$  6.10 y 6.28 ppm se observan dos señales sencillas con integración para dos protones cada una, características de grupos dioximetileno. En la región de los protones aromáticos se observaron cuatro dobletes ( $\delta_H$  7.25, 7.54, 7.76 y 7.98 ppm) y dos singuletes ( $\delta_H$  7.16 y 7.56 ppm), con una integración total para seis hidrógenos. La multiplicidad de estos sistemas de señales resultaron idénticas a las descritas para dihidrosanguinarina; sin embargo, es relevante la ausencia de la señal correspondiente a los protones de la posición 6

(Figura 24). Considerando que en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  no se observaron señales para protones adicionales, se dedujo que el carbono de la posición 6 era cuaternario. La anterior deducción fue confirmada mediante el análisis del espectro de infrarrojo, el cual mostró una banda para carbonilo (C=O) de amida  $\alpha,\beta$ -insaturada en  $1647\text{ cm}^{-1}$  (véase apéndice).



**Figura 24.** Señales de los grupos dioximetileno y del metilo de oxisanguinarina.

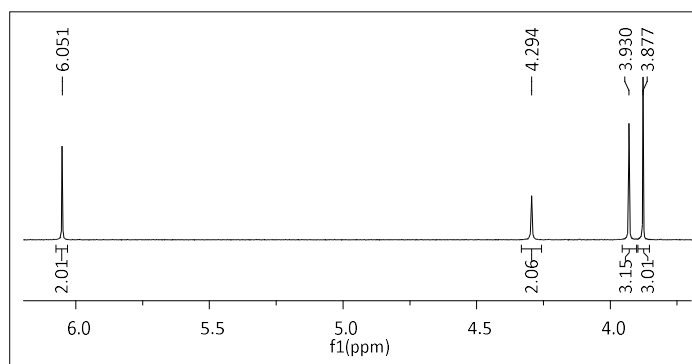
La comparación de estos datos espectroscópicos con los observados en la literatura permitieron establecer que la estructura corresponde a oxisanguinarina (Figura 25) [45, 64]. Este alcaloide fue reportado por Domínguez para *B. latisejala* en 1965 [51].



**Figura 25.** Caracterización de oxisanguinarina.

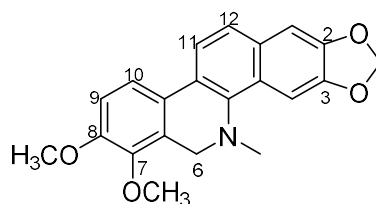
### 5.2.3 Caracterización de dihidroqueleritrina

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del sólido amarillo obtenido de la fracción M exhibieron patrones de señales muy similares a los observados para dihidrosanguinarina, lo cual permitió inferir que su estructura molecular corresponde a una benzo[c]fenantridina. Las similitudes espectroscópicas radican en el singulete que resuena en  $\delta_{\text{H}}$  2.60 ppm (integración para tres hidrógenos) y es atribuido a los hidrógenos del grupo *N*-metilo, la señal sencilla en  $\delta_{\text{H}}$  4.29 ppm (integración para dos hidrógenos) que corresponde al metileno unido a nitrógeno, el singulete típico de grupo dioximetileno en  $\delta_{\text{H}}$  6.05 ppm (integración para dos hidrógenos), los dos sistemas AB de protones *orto* aromáticos (cuatro dobletes en  $\delta_{\text{H}}$  6.94, 7.48, 7.51 y 7.70 ppm, con integraciones para un hidrógeno y constantes de acoplamiento de aproximadamente 8.7 Hz) y los dos singuletes correspondientes a los protones aromáticos en posición *para* ( $\delta_{\text{H}}$  7.11 y 7.67 ppm). Al comparar el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de este compuesto con el obtenido para dihidrosanguinarina (Figura 26), se puede observar la ausencia de un singulete de grupo dioximetileno y la presencia de dos singuletes en  $\delta_{\text{H}}$  3.87 y 3.93 ppm, las cuales integran para tres hidrógenos cada una y muestran desplazamientos químicos característicos de grupos metoxilo unidos a benceno



**Figura 26.** Señales del dioximetileno y de los grupos metoxilo (espectro de RMN  $^1\text{H}$ ).

La presencia de los dos grupos O-metilo fue corroborada por las señales que resuenan en  $\delta_{\text{C}}$  55.79 y 61.08 ppm en los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) y DEPT. Las 19 señales restantes exhibieron desplazamientos químicos muy similares a los observados para la dihidrosanguinarina, como por ejemplo el carbono del grupo dioximetileno resonante en  $\delta_{\text{C}}$  100.99 ppm y los carbonos de los grupos N-metilo y N-metileno resonantes en  $\delta_{\text{C}}$  41.28 y 48.70 ppm, respectivamente. La comparación de los datos observados en RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  con los reportados en la literatura permitieron establecer que la estructura corresponde al alcaloide benzo[c]fenantridínico denominado dihidroqueleritrina. Este alcaloide ya ha sido reportado para otras especies del género *Bocconia* [60, 62, 63, 65] y esta es la primera vez que se reporta su aislamiento a partir de *B. latisepala*.

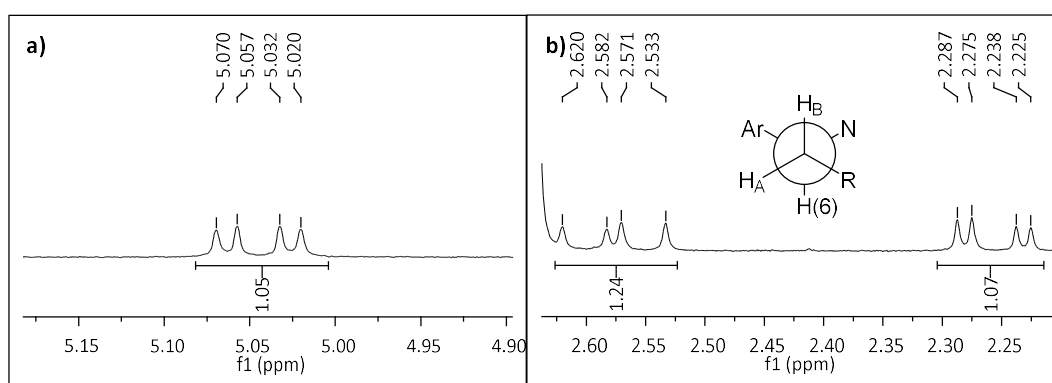


**Figura 27.** Caracterización de dihidroqueleritina.

#### 5.2.4 Caracterización de (-)-6-acetonildihidroqueleritina

En los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del sólido cristalino obtenido de la fracción O se observaron patrones de señales muy similares a los descritos para dihidroqueleritina, es decir, se observaron las señales características del grupo *N*-metilo ( $\delta_{\text{H}}$  2.64 y  $\delta_{\text{C}}$  42.90 ppm), de los dos grupos *O*-metilo ( $\delta_{\text{H}}$  3.93 y 3.96 ppm;  $\delta_{\text{C}}$  55.89 y 61.07 ppm), del grupo dioximetileno ( $\delta_{\text{H}}$  6.04 y  $\delta_{\text{C}}$  101.12 ppm), los cuatro grupos metinos *orto* aromáticos ( $\delta_{\text{H}}$  6.95, 7.48, 7.53 y 7.71 ppm;  $\delta_{\text{C}}$  111.62, 118.89, 119.85 y 123.95 ppm) y los dos grupos metinos *para* aromáticos ( $\delta_{\text{H}}$  7.10 y 7.51 ppm;  $\delta_{\text{C}}$  100.70 y 104.43 ppm). Las diferencias espectroscópicas con respecto de dihidroqueleritina radican en la presencia de señales debidas a un sistema AMX de protones (Figura 28) y a un fragmento de metilcetona. El sistema AMX de protones se conforma por tres sistemas de señales dobles de dobles centrados en  $\delta_{\text{H}}$  5.04 ( $J = 11.1, 3.9$  Hz), 2.58 ( $J = 14.7, 11.4$  Hz) y 2.26 ppm ( $J = 14.7, 3.9$  Hz), los cuales integran para un hidrógeno cada uno y corresponden al metino H-6 y a un metileno vecino a carbonilo, respectivamente. El desplazamiento químico observado para los hidrógenos del grupo metileno ( $\delta_{\text{H}}$  2.58 y 2.26 ppm) es congruente considerando su posición  $\alpha$  a grupo carbonilo.

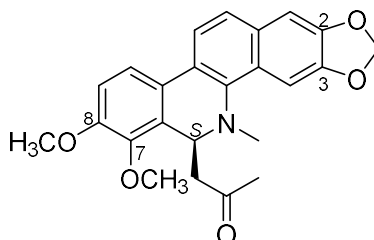
Adicionalmente, se dedujo que el grupo carbonilo también se encuentra unido a un grupo metilo, ya que el espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostró una señal simple en  $\delta_{\text{H}}$  2.06 ppm, que integra para tres hidrógenos. La presencia de este fragmento de acetona unido a C-6 quedó confirmado por la presencia de un grupo metileno y un grupo metilo en el espectro DEPT ( $\delta_{\text{C}}$  46.93 y 31.20 ppm, respectivamente), los cuales no se observan en el espectro DEPT de dihidroqueleritrina.



**Figura 28.** Señales del sistema AMX (espectro de RMN  $^1\text{H}$ ).

La comparación de los datos espectroscópicos descritos con los reportados en la literatura permitieron deducir que la estructura corresponde a 6-acetonildihidroqueleritrina [30, 66], cuya estereoquímica en C-6 no ha sido reportada. A pesar de que Sreelekha y colaboradores obtuvieron una molécula ópticamente activa ( $[\alpha]_{\text{D}}$ :  $-132^\circ$ ,  $c$  0.1  $\text{CHCl}_3$ ) [66], estos no determinaron la estereoquímica relativa ni absoluta de la misma. Considerando que en el presente estudio se observó un valor negativo de rotación óptica ( $[\alpha]_{\text{D}}$ :  $-13.59^\circ$ ,  $c$  1  $\text{CHCl}_3$ ) para 6-acetonildihidroqueleritrina (Figura 29), se decidió realizar un

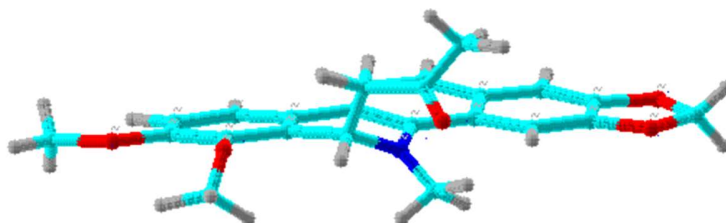
análisis conformacional y configuracional a fin de establecer su estereoquímica en C-6. La constante de acoplamiento de 11.4 Hz exhibida por H-6 sugiere que dicho hidrógeno adopta una conformación *anti* con relación a uno de los hidrógenos del grupo metileno ( $\delta_{\text{H}}$  2.58,  $J = 14.7, 11.4$  Hz,  $H_{\text{B}}$ ) y que por consiguiente, el otro hidrógeno ( $\delta_{\text{H}}$  2.26 ppm,  $J = 14.7, 3.9$  Hz,  $H_{\text{A}}$ ) adopta una conformación *gauche* con relación a H-6 (Figura 28).



**Figura 29.** Caracterización de (-)-6-acetonildihidroqueleritrina.

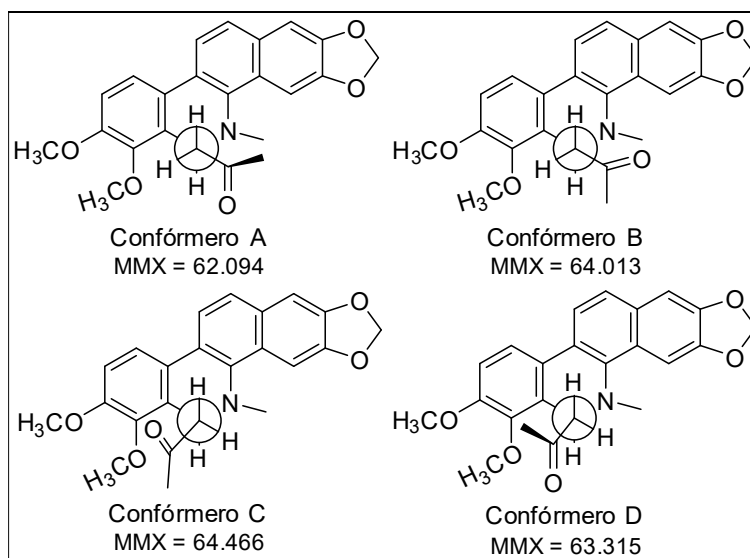
De acuerdo con los resultados obtenidos del análisis conformacional mediante mecánica molecular (PCMODEL Program. Serena Software, PO Box, 3076, Bloomington, IN 47402-3076, USA), los conformeros de menor energía potencial relativa (MMX) resultaron aquellos con el fragmento de acetona orientado  $\Psi$ -axial en el anillo de *N*-metildihidropiridina (Figura 30) [67].



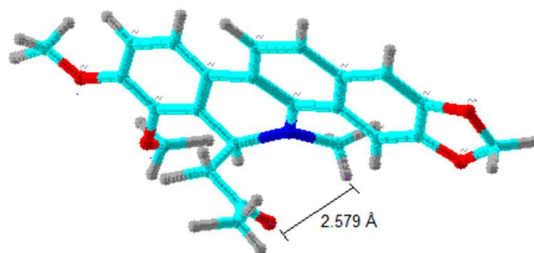


**Figura 30.** Orientación  $\Psi$ -axial del grupo acetónido en el anillo de *N*-metildihidropiridina.

De los cuatro conformeros obtenidos (A–D) (Figura 31), el conformero A resultó el más estable con el grupo carbonilo orientado en la misma dirección que el grupo *N*-metilo, lo que probablemente permite la formación de un enlace de hidrógeno débil (3.2–4.0 Å) entre un hidrógeno del metilo y el oxígeno del carbonilo (Figura 32).



**Figura 31.** Conformeros de menor energía obtenidos por PCMODEL



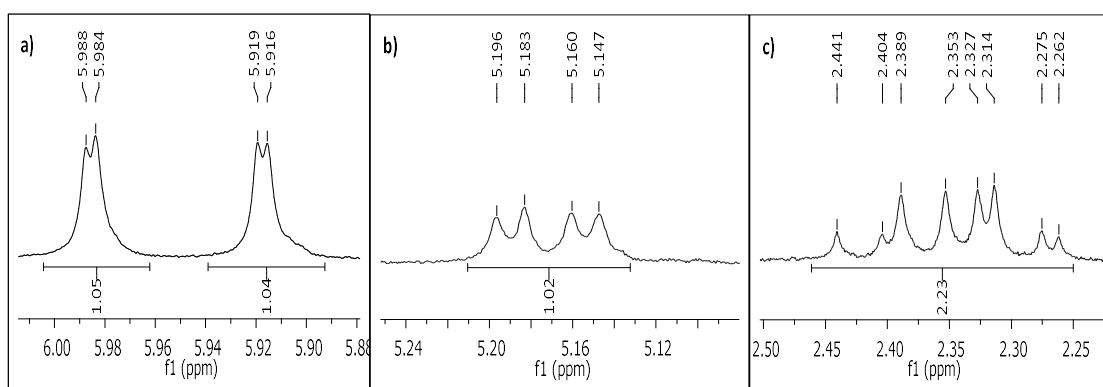
**Figura 32.** Conformación más estable observada en PCMODEL.

La conformación más estable (A) observada en PCMODEL resultó muy similar a las estructuras cristalinas reportadas para 6-acetonildihidroqueleretrina [68] y para ambidalmina A1 [37]. Este alcaloide ya ha sido reportado para otras especies del género *Bocconia* [30, 65] y es la primera vez que se reporta su aislamiento a partir de *B. latisejala*.

### 5.2.5 Caracterización de (-)-queleritridimerina

El sólido color crema obtenido de la fracción O exhibió espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  con patrones de señales muy similares a los observados para dihidroqueleritrina, lo cual permitió inferir que su estructura molecular corresponde a una benzo[c]fenantridina. Las similitudes espectroscópicas son las señales características del grupo *N*-metilo ( $\delta_{\text{H}}$  2.61 y  $\delta_{\text{C}}$  42.76 ppm), de dos grupos *O*-metilo ( $\delta_{\text{H}}$  3.92 y 3.97 ppm;  $\delta_{\text{C}}$  55.86 y 61.07 ppm), de dos grupos dioximetilenos ( $\delta_{\text{H}}$  5.99 y 5.92;  $\delta_{\text{C}}$  101.04 ppm), de cuatro grupos metinos *orto* aromáticos ( $\delta_{\text{H}}$  6.91, 7.38, 7.48 y 7.60 ppm;  $\delta_{\text{C}}$  111.42, 118.78, 119.71 y 123.23 ppm) y de dos grupos metinos *para* aromáticos ( $\delta_{\text{H}}$  7.00 y 7.40 ppm;  $\delta_{\text{C}}$  100.80 y

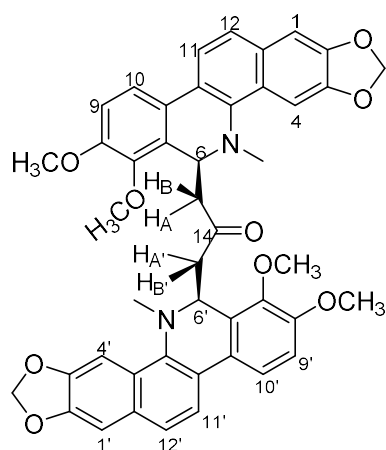
104.23 ppm). Adicionalmente, se observaron las señales de un sistema ABX de protones (Figura 33), tres dobletes de dobletes centrados en  $\delta_H$  5.17 ( $J = 10.8, 3.9$  Hz), 2.40 ( $J = 15.6, 10.8$  Hz) y 2.30 ppm ( $J = 15.6, 3.9$  Hz), correspondientes a los hidrógenos de los grupos *N*-metino y metileno vecino a carbonilo.



**Figura 33.** Señales de los grupos dioximetilenos (a) y del sistema ABX (b y c) del espectro de RMN <sup>1</sup>H.

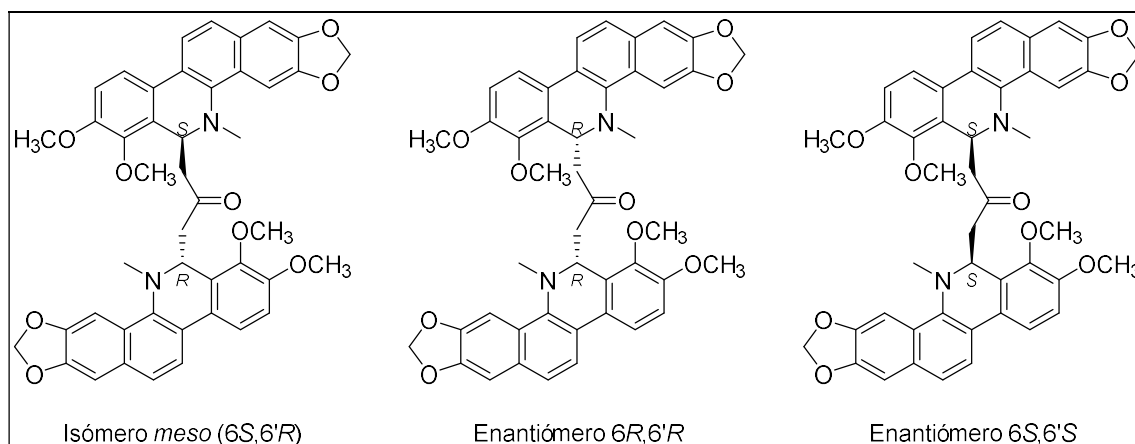
No obstante la similitud espectroscópica con (–)-6-acetonildihidroqueleritrina, los espectro de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del sólido color crema no exhibieron las señales del grupo metilo unido a carbonilo y sólo se observó la señal del carbonilo de cetona en  $\delta_C$  207.01 ppm. La ausencia del grupo metilo unido a carbonilo y la presencia de dos grupos dioximetilenos en  $\delta_H$  5.99 ( $J = 1.2$  Hz) y 5.92 ppm ( $J = 0.9$  Hz), sugirieron la presencia de un dímero de dihidroqueleritrina unido por un fragmento de acetona. La suposición anterior fue sustentada mediante el análisis de los datos espectroscópicos reportados en la literatura para alcaloides benzo[*c*]fenantridínicos diméricos como 1,3-bis(11-hidroqueleritrinil)acetona [62], toddalidimerina [69] y (±)-sanguidimerina [45], las

cuales se componen de dos unidades de benzo[c]fenantridina unidas por un fragmento  $\text{CH}_2\text{COCH}_2$ . Así, se estableció que la estructura corresponde al compuesto 1,3-bis(11-hidroqueleritrinil)acetona [62], también denominado queleritridimerina [70]. A pesar de que el nombre de la molécula ya ha sido descrito en la literatura, los autores no han reportado sus datos espectroscópicos ni su estereoquímica, sino únicamente han discutido sus datos espectrométricos [62, 69]. Por ello, esta tesis representa el primer análisis espectroscópico y estereoquímico para queleritridimerina (Figura 34).



**Figura 34.** Caracterización de (-)-queleritridimerina.

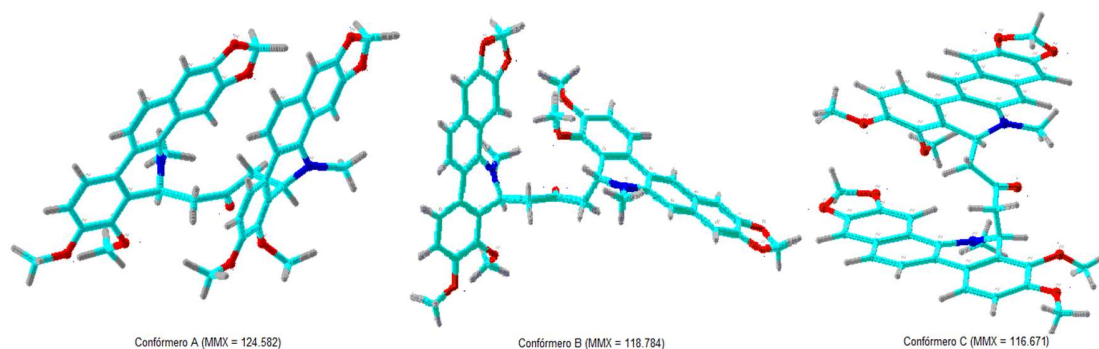
Tomando en cuenta que la molécula posee dos carbonos estereogénicos (C-6 y C-6') y que tiene simetría, se pueden establecer tres posibles estereoisómeros: el isómero *meso* ( $6R,6'S$  o  $6S,6'R$ ) y los enantiómeros ( $6R,6'R$ ) y ( $6S,6'S$ ) (Figura 35).



**Figura 35.** Estereoisómeros de queleritridimerina.

Adicional a la estereoquímica de los dos centros quirales, queleritridimerina posee un fragmento de acetona 1,3-disustituida que confiere cierta libertad conformacional a las dos unidades de dihidroqueleritrina. El análisis conformacional en solución de este fragmento, mediante RMN <sup>1</sup>H, permitió establecer que H-6 y H-6' ( $\delta_H$  5.17 ppm,  $J = 10.8, 3.9$  Hz) adoptan una conformación *anti* con relación a H<sub>B</sub> y H<sub>B'</sub> ( $\delta_H$  2.40 ppm,  $J = 15.6, 10.8$  Hz) y *gauche* con relación a H<sub>A</sub> y H<sub>A'</sub> ( $\delta_H$  2.30 ppm,  $J = 15.6, 3.9$  Hz). El análisis conformacional del isómero *meso* y del enantiómero (6S,6'S), mediante mecánica molecular en PCMODEL, mostró que las preferencias conformacionales de H-6, H-6' y los protones de los grupos metilenos, en los conformeros de mínima energía A (MMX = 124.582), B (MMX = 118.784) y C (MMX = 116.671) (Figura 36), resultaron muy similares a las deducidas por RMN <sup>1</sup>H. Cabe mencionar que, el compuesto *meso* presentó el conformero B (MMX = 118.784) con menor energía potencial que el conformero A (MMX = 124.582); sin

embargo, en el conformero B una unidad de dihidroqueleritrina se orienta a aproximadamente 80 grados con respecto del plano de la otra unidad (Figura 36).



**Figura 36.** Conformaciones más estables observadas en PCMODEL.

La existencia del conformero B en solución quedaría justificada si en los espectros de RMN se observara un sistema de señales para cada una de las unidades de dihidroqueleritrina; sin embargo, los datos espectroscópicos experimentales descartan la presencia del conformero asimétrico B. Por el contrario, los conformeros A y C tienen simetría  $C_2$  y por tanto se puede esperar un sólo sistema de señales para los protones de ambas unidades de dihidroqueleritrina, tal como se observó experimentalmente para queleritridimerina. Adicionalmente, si comparamos los desplazamientos químicos entre (-)-6-acetonildihidroqueleritrina y queleritridimerina, se observa que los protones aromáticos del dímero aparecen a campos más altos que los correspondientes del monómero (Tabla 2). Este efecto de protección no sería posible para el conformero A debido al arreglo paralelo de las dos unidades de dihidroqueleritrina (Figura 36); mientras que, en el conformero C sí sería posible

observar el efecto de protección para los protones aromáticos (principalmente para H-4, H-4', H-11, H-11', H-12, H-12') y para H<sub>B</sub> y H<sub>B'</sub> (Figura 36). Asimismo, en el conformero C se favorece un efecto anisotrópico en H-6 y H-6' (Tabla 2), ya que éstos protones se encuentran espacialmente cercanos (2.63–2.67 Å) al átomo de oxígeno del grupo carbonilo y caen en la zona de desprotección del mismo. Así, los datos experimentales y computacionales proporcionan evidencia de que el conformero C es el arreglo conformacional más estable para queleritridimerina.

**Tabla 2.** Desplazamientos de RMN <sup>1</sup>H para (–)-6-acetonildihidroqueleritrina y (–)-queleritridimerina.

Asignación	(–)-6-acetonildihidroqueleritrina	(–)-queleritridimerina	δ <sub>1</sub> -δ <sub>2</sub>
	δ <sub>1</sub> (mult, J (Hz))	δ <sub>2</sub> (mult, J (Hz))	
H-1	7.10	7.00	+ 0.10
H-4	7.51	7.40	+ 0.11
H-6	5.04 (dd, J = 11.1, 3.9)	5.17 (dd, J = 10.8, 3.9)	- 0.13
H-9	6.95 (d, J = 8.4)	6.91 (d, J = 8.7)	+ 0.04
H-10	7.53 (d, J = 8.7)	7.48 (d, J = 8.7)	+ 0.05
H-11	7.71 (d, J = 8.7)	7.60 (d, J = 8.7)	+ 0.11
H-12	7.48 (d, J = 8.7)	7.38 (d, J = 9.0)	+ 0.10
OCH <sub>2</sub> O	6.03 (dd, J = 1.8, 1.2)	5.99 (dd, J = 1.2)	+ 0.04
		5.92 (dd, J = 0.9)	+ 0.11
H <sub>B</sub>	2.58 (dd, J = 15.0, 11.4)	2.40 (dd, J = 15.6, 10.8)	+ 0.18
H <sub>A</sub>	2.26 (dd, J = 15.0, 3.9)	2.30 (dd, J = 15.6, 3.9)	- 0.04
COCH <sub>3</sub>	2.06	—	—
C(7)-OCH <sub>3</sub>	3.96	3.97	- 0.01
C(8)-OCH <sub>3</sub>	3.93	3.92	+ 0.01
N-CH <sub>3</sub>	2.64	2.61	+ 0.03

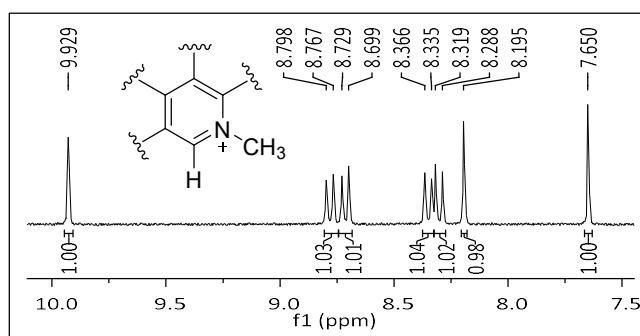
Considerando que la queleritridimerina del presente trabajo mostró un valor negativo de rotación óptica ( $[\alpha]_D$ :  $-0.96^\circ$ ,  $c$  2.08  $\text{CHCl}_3$ ) se puede confirmar la inexistencia del estereoisómero *meso* y la existencia de uno de los enantiómeros del par enantiomérico *dl*. Asumiendo que queleritridimerina proviene de la ruta biogenética de (-)-6-acetonildihidroqueleritrina, es factible suponer que el dímero posee la estereoquímica (6*S*,6*S'*) mostrada en la Figura 35. Por lo anterior se propone que, para futuras referencias, el signo de la rotación óptica anteceda el nombre trivial de la siguiente forma: (-)-queleritridimerina.

#### 5.2.6 Caracterización de queleritrina

De la subfracción 18 de la fracción O se recuperaron unos cristales color rosa claro, cuyo espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, TFA-*d*) presenta un patrón de señales similar al de dihidroqueleritrina, pero a campos más bajos. Por ejemplo, en  $\delta_{\text{H}}$  4.34 y 4.51 ppm se observan dos señales sencillas que integran para tres protones y que son características de grupos metoxilo. En  $\delta_{\text{H}}$  5.19 ppm se observa otra señal sencilla con integración para tres hidrógenos del metilo unido a un nitrógeno aromático. A  $\delta_{\text{H}}$  6.38 ppm se observa una señal sencilla con integración para dos protones, característica del dioximetileno. En la región de los protones aromáticos se observaron cuatro dobletes ( $\delta_{\text{H}}$  8.30, 8.35, 8.71 y 8.78 ppm) y dos singuletes ( $\delta_{\text{H}}$  7.65 y 8.20 ppm), con una integración total para seis hidrógenos. La multiplicidad de estos sistemas de señales resultaron idénticas a las descritas para dihidroqueleritrina; sin embargo, las señales presentaron

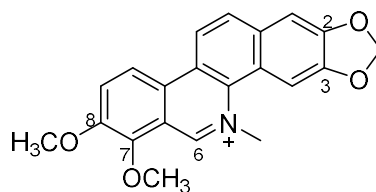


desplazamientos químicos hacia campos más bajos que los observados para dihidroqueleretrina. El efecto anisotrópico experimentado por estos protones fue atribuido a que la molécula presenta un fragmento de piridina en lugar del fragmento de dihidropiridina, generando un sistema aromático de 18 electrones  $\pi$  que causa desplazamientos a campos bajos de los protones que se encuentran en el plano de dicho sistema. Lo anterior fue confirmado por la presencia de un singulete en  $\delta_H$  9.93 ppm, el cual integra para un hidrógeno y presenta un desplazamiento químico característico de un protón de imina (Figura 37). La presencia del grupo iminio también explica que la señal del grupo *N*-metilo aparezca en  $\delta_H$  5.19 ppm y no a campos altos como en dihidroqueleretrina.



**Figura 37.** Región aromática en el espectro de RMN  $^1H$ .

La comparación de estos datos espectroscópicos con los observados en la literatura permitieron establecer que la estructura corresponde a queleritrina (Figura 38) [15, 52]. Este alcaloide fue reportado por Domínguez para *B. latisejala* en 1965 [51].

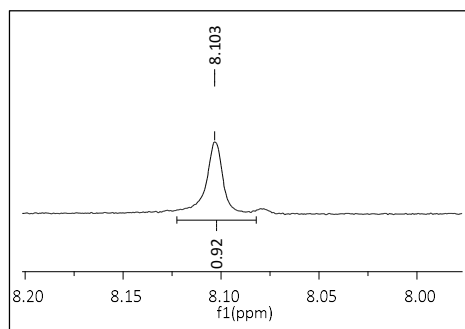


**Figura 38.** Caracterización de queleritrina.

### 5.2.7 Caracterización de arnottianamida

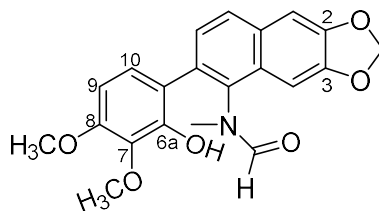
El espectro de RMN  $^1\text{H}$  del sólido blanco, obtenido de la subfracción 18 de la fracción O, exhibió patrones de señales muy similares a los observados para dihidroqueleritrina. Por ejemplo en  $\delta_{\text{H}}$  3.00 ppm hay una señal sencilla con integración para tres protones, correspondiente al grupo metilo unido al nitrógeno. Se observan dos señales sencillas intensas a  $\delta_{\text{H}}$  3.85 y 3.90 ppm con integración para tres protones cada una, que corresponden a grupos metoxilo aromáticos. A  $\delta_{\text{H}}$  6.10 ppm se observa un singulete con integración para dos protones, que de acuerdo a su desplazamiento químico se trata de un grupo dioximetileno. En la región de los protones aromáticos se distinguen seis grupos de señales con multiplicidades típicas de dos sistemas AB de protones con acoplamiento *orto* (cuatro dobletes en  $\delta_{\text{H}}$  6.57, 6.81, 7.29 y 7.75 ppm, con integraciones para un hidrógeno y constantes de acoplamiento de aproximadamente 9.3 Hz) y un sistema de protones con acoplamiento *para* (dos singuletes en  $\delta_{\text{H}}$  7.02 y 7.23 ppm, los cuales integran para un hidrógeno). De manera adicional, a  $\delta_{\text{H}}$  8.10 ppm se presenta un singulete que no es congruente

con el espectro de dihidroqueleritrina, integra para un protón y de acuerdo a la región donde resuena, corresponde a un protón de formamida (Figura 39).



**Figura 39.** Acercamiento de la señal del protón de formamida en el espectro de RMN <sup>1</sup>H.

Con los datos anteriores se puede deducir que este alcaloide no corresponde a una benzo[c]fenantridina común y que existe una ruptura en el ciclo C del sistema benzo[c]fenantridina entre los C-6 y C-6a (Figura 3), concluyéndose que dicho alcaloide es una *seco*-benzo[c]fenantridina (el prefijo *seco* proviene del verbo latín “seco” que significa cortar [71]) denominada arnottianamida (Figura 40) [35, 38]. En 2010, Deng [38] reportó el aislamiento de arnottianamida a partir de *Macleaya microcarpa*, una especie de la Familia Papaveraceae, pero hasta ahora no había sido aislado de ninguna especie del género *Bocconia*.

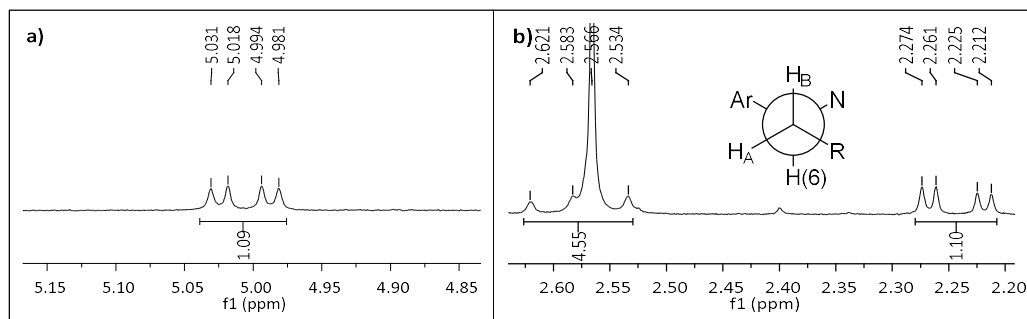


**Figura 40.** Caracterización de arnottianamida.

### 5.2.8 Caracterización de (-)-6-acetonil-12-metoxidihidroqueleritrina

De la fracción principal O se separaron distintas subfracciones, de una de ellas, la 18, se realizó otra columna y de la fracción 7 se aisló y purificó un sólido blanco. Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de dicho sólido exhibieron patrones de señales muy similares a los observados para dihidroqueleritrina, lo cual permitió inferir que su estructura molecular corresponde a una benzo[c]fenantridina. Las similitudes espectroscópicas son las señales características del grupo *N*-metilo ( $\delta_{\text{H}}$  2.57 y  $\delta_{\text{C}}$  42.86 ppm), de los dos grupos *O*-metilo ( $\delta_{\text{H}}$  3.93 y 3.96 ppm;  $\delta_{\text{C}}$  55.77 y 55.91 ppm), del grupo dioximetileno ( $\delta_{\text{H}}$  6.05 y  $\delta_{\text{C}}$  100.55 ppm), los dos grupos metinos *orto* aromáticos ( $\delta_{\text{H}}$  6.96 y 7.52 ppm;  $\delta_{\text{C}}$  111.67, 118.91 ppm) y dos grupo metinos *para* aromáticos ( $\delta_{\text{H}}$  7.49 y 7.54 ppm;  $\delta_{\text{C}}$  98.45 y 100.25 ppm). Las diferencias espectroscópicas con respecto de dihidroqueleritrina radican en la presencia de una señal extra de un grupo *O*-metilo ( $\delta_{\text{H}}$  4.04 ppm;  $\delta_{\text{C}}$  61.07 ppm), un metileno aromático ( $\delta_{\text{H}}$  7.06 ppm;  $\delta_{\text{C}}$  99.63 ppm), además de las señales debidas a un sistema AMX de protones y a un fragmento de metilcetona (Figura 41). El sistema AMX de protones se conforma por tres sistemas de señales dobles de dobles centrados en  $\delta_{\text{H}}$  5.00 ( $J = 11.1, 3.9$  Hz), 2.58 ( $J = 14.7, 11.4$  Hz)

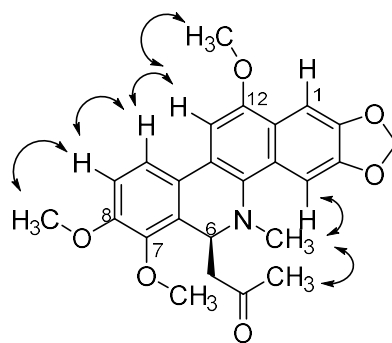
y 2.24 ppm ( $J = 14.7, 3.9$  Hz), los cuales integran para un hidrógeno cada uno y corresponden al metino H-6 y a un metileno vecino a carbonilo, respectivamente. La constante de acoplamiento de 11.1 Hz exhibida por H-6 sugiere que dicho hidrógeno adopta una conformación *anti* con relación a uno de los hidrógenos del grupo metileno ( $\delta_H$  2.58,  $J = 14.7, 11.4$  Hz) y que por consiguiente, el otro hidrógeno ( $\delta_H$  2.24 ppm,  $J = 14.7, 3.9$  Hz) adopta una conformación *gauche* con relación a H-6 (Figura 41). El desplazamiento químico observado para los hidrógenos del grupo metileno ( $\delta_H$  2.58 y 2.24 ppm) sugirió que éste se encuentra en posición  $\alpha$  a grupo carbonilo. Adicionalmente, se dedujo que el grupo carbonilo también se encuentra unido a un grupo metilo, ya que el espectro de RMN  $^1H$  mostró una señal simple en  $\delta_H$  2.06 ppm, que integra para tres hidrógenos.



**Figura 41.** Acercamiento de las señales del sistema AMX (espectro de RMN  $^1H$ ).

De acuerdo a los fragmentos descritos se propone una estructura con sistema de tipo benzo[c]fenantridina, la cual presenta un grupo dioximetileno, tres metoxilos y un grupo acetoniolo en el C-6 (Figura 42). La composición elemental

deducida de RMN fue confirmada con el valor de la relación *masa/carga* observada ( $m/z = 436.1755$ ) para el ion cuasimolecular  $[M + H]^+$ . La estructura molecular fue confirmada mediante el experimento bidimensional NOESY (correlaciones espaciales  $^1H-^1H$ ), cuyas interacciones se muestran en la Figura 42. Las correlaciones más importantes se observaron entre los grupos metilos  $CO-CH_3$  y  $N-CH_3$  y entre H(4) y  $N-CH_3$ ; mientras que, en el lado opuesto de la molécula se observó la correlación de H(11) con C(12)- $OCH_3$ , la interacción de H(10) con H(9) y H(11) y de H(9) con C(8)- $OCH_3$ , las cuales serían inexistentes en el caso de que el grupo metoxilo se encontrara en otra posición. Las interacciones observadas en el espectro NOESY confirmaron las posiciones de los tres grupos metoxilo, estableciéndose la presencia de un nuevo producto natural perteneciente a la familia de alcaloides de tipo benzo[*c*]fenantridina.



**Figura 42.** Interacciones NOE relevantes para (-)-6-acetonil-12-metoxidihidroqueleritrina.

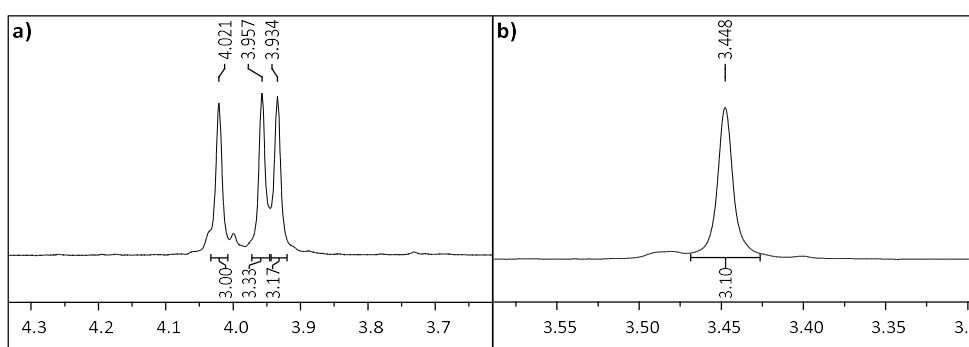
Considerando el valor de rotación específica obtenido en el presente trabajo ( $[\alpha]_D: -1.18^\circ$ ,  $c 5.10$   $CHCl_3$ ) se puede establecer que corresponde al isómero levógiro, además tomando en cuenta que (-)-6-

acetonildihidroqueleritrina exhibió también un signo negativo ( $[\alpha]_D$ :  $-13.59^\circ$ ,  $c$  1  $\text{CHCl}_3$ ), es factible suponer que el nuevo producto natural proviene de la misma ruta biogénica y que por consiguiente tiene la estereoquímica (6*S*) mostrada en la Figura 42. Se propone que, para futuras referencias, el nuevo compuesto sea denominado de la siguiente forma: (–)-6-acetonil-12-metoxidihidroqueleritrina.

### 5.2.9 Caracterización de (–)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina

Un polvo de color blanco-crema fue aislado de la subfracción 18 de la fracción O. Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de dicho sólido resultaron muy similares a los de dihidroqueleritrina, por lo tanto se puede inferir que corresponde a una benzo[*c*]fenantridina; es decir, se observaron señales a desplazamientos muy similares que corresponden a fragmentos previamente descritos: las señales características del grupo *N*-metilo ( $\delta_{\text{H}}$  2.67 y  $\delta_{\text{C}}$  40.52 ppm), de los dos grupos *O*-metilo ( $\delta_{\text{H}}$  3.93 y 3.96 ppm;  $\delta_{\text{C}}$  56.07 y 61.77 ppm), del grupo dioximetileno ( $\delta_{\text{H}}$  6.06 y  $\delta_{\text{C}}$  101.13 ppm), de los dos grupos metinos aromáticos en posición *orto* ( $\delta_{\text{H}}$  7.04 y 7.58 ppm;  $\delta_{\text{C}}$  112.83, 118.87 ppm) y de dos grupos metinos aromáticos en posición *para* ( $\delta_{\text{H}}$  7.56 y 7.68 ppm;  $\delta_{\text{C}}$  99.84 y 100.63 ppm). Las diferencias espectroscópicas con respecto de dihidroqueleritrina radican en la presencia de: dos singuletes que integran para tres hidrógenos cada uno y que resuenan en desplazamientos químicos ( $\delta_{\text{H}}$  3.45 y 4.02 ppm) característicos de grupos *O*-metilo, una señal simple que integra para un hidrógeno y que se atribuye a un metino bencílico unido a dos heteroátomos por su resonancia en  $\delta_{\text{H}}$  5.50 ppm, un

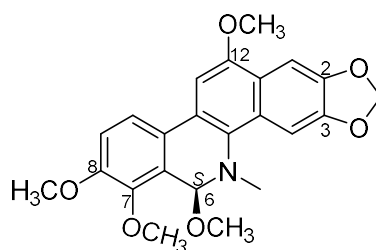
singulete que integra para un hidrógeno ( $\delta_H$  7.13 ppm) y se atribuye a un metino aromático (Figura 43). Las señales resonantes en  $\delta_H$  7.13 y 5.50 ppm permitieron suponer que el esqueleto de dihidroqueleritrina presentaba un grupo metoxilo en el anillo B o D y otro grupo metoxilo en C-6.



**Figura 43.** Acercamiento de las señales de los metoxilos aromáticos (a) y alifático (b) en el espectro de RMN  $^1H$ .

La comparación de estos datos espectroscópicos con los reportados en la literatura [45], permitieron deducir que la estructura corresponde a (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina (Figura 44). Además, el resultado obtenido por medio de rotación óptica ( $-10.6^\circ$  c 1.6,  $CHCl_3$ ), permite confirmar que se trata de un isómero levógiro y que dicho alcaloide corresponde al enantiómero S, de acuerdo con lo reportado [45]. Este alcaloide ya ha sido aislado de *B. arborea* [4, 35] y es la primera vez que se reporta su aislamiento en *Bocconia latisejala*.



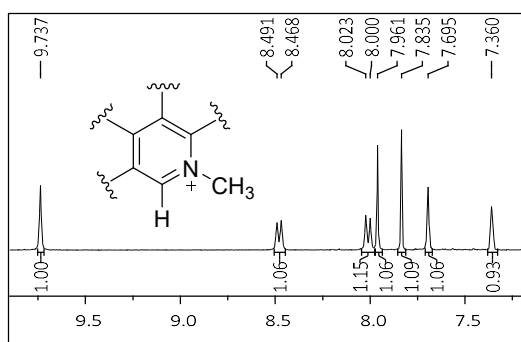


**Figura 44.** Caracterización de (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina.

### 5.2.10 Caracterización de 12-metoxiqueleritrina

Se recuperó un sólido color amarillo mostaza del licor madre de la purificación de (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina. Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de dicho sólido exhibieron patrones de señales muy similares a los de queleritrina y (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ ), se observaron cuatro señales simples con integraciones para tres hidrógenos cada una, de las cuales tres singuletes ( $\delta_{\text{H}}$  4.09, 4.23 y 4.26 ppm) presentaron desplazamientos químicos típicos de grupos metoxilos unidos a sistemas aromáticos y el cuarto singulete ( $\delta_{\text{H}}$  4.95 ppm) presentó el desplazamiento químico típico de grupo metilo unido a nitrógeno aromático como en queleritrina. Aunado a lo anterior, en el espectro se observó un singulete que integra para dos hidrógenos y que resuena en la región característica de un grupo dioximetileno ( $\delta_{\text{H}}$  6.22 ppm). Al igual que (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina, en este espectro también se observaron dos dobletes de un sistema AB de metinos aromáticos ( $\delta_{\text{H}}$  8.01 y 8.48 ppm) y tres singuletes de metinos aromáticos ( $\delta_{\text{H}}$  7.84, 7.96 y 7.70 ppm), lo cual indica que ésta molécula también posee un grupo

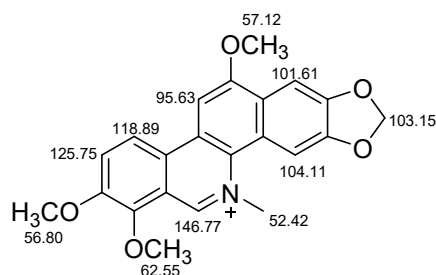
metoxilo en el anillo B o D. A diferencia de (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina, en este espectro no se observó el singulete en  $\delta_H$  5.50 ppm del grupo N-metino de hibridación  $sp^3$ , pero si se observó un singulete en  $\delta_H$  9.74 ppm atribuible a grupo metino de imina como en queleritrina (Figura 45).



**Figura 45.** Acercamiento de la señal de H(6) en el espectro de RMN  $^1H$ .

Lo observado en el espectro de RMN  $^1H$  se confirmó con la información del espectro de RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ - $CD_3OD$ ) y del experimento DEPT, de los cuales se dedujo la presencia de cuatro grupos metilo ( $\delta_C$  52.42, 56.80, 57.12 y 62.55), un grupo metileno ( $\delta_C$  103.15 ppm), seis grupos metinos y nueve carbonos cuaternarios con hibridación  $sp^2$  de acuerdo con sus desplazamientos químicos.

Mediante el experimento HSQC fue posible establecer las correlaciones carbono-hidrógeno a un enlace, lo que permitió determinar los desplazamientos de los carbonos protonados (Figura 46).



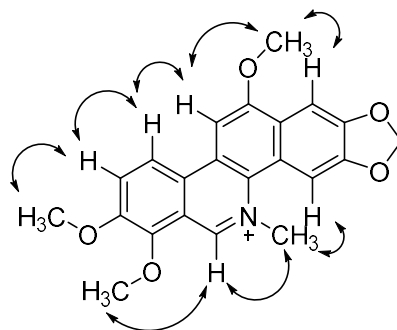
**Figura 46.** Desplazamientos químicos de carbonos protonados.

Asimismo, el experimento HMBC permitió establecer las correlaciones heteronucleares a dos o tres enlaces necesarias para confirmar la propuesta estructural (Tabla 3).

**Tabla 3.** Correlaciones observadas mediante el experimento HMBC.

H ( $\delta_H$ )	C ( $\delta_C$ )	Carbonos con los que correlaciona ( $\delta_C$ )
H-6 (9.74)	C-6 (146.77)	N-CH <sub>3</sub> (52.42), C-6a (119.96), C-4b (127.82)
H-10 (8.48)	C-10 (118.89)	C-6a (119.96), C-10b (128.03)
H-9 (8.01)	C-9 (125.75)	C-10b (128.03), C-7 (146.13)
H-4 (7.96)	C-4 (104.11)	C-1 (101.61), C-12a (125.85), C-4b (127.82), C-3 (149.87) C-12 (157.30)
H-1 (7.84)	C-1 (101.61)	OCH <sub>2</sub> O (103.15), C-4a (121.63), C-4b (127.82), C-3 (149.87), C-12 (157.30)
H-11 (7.70)	C-11 (95.63)	C-12a (125.85), C-4b (127.82), C-10b (128.03), C-12 (157.30)
OCH <sub>2</sub> O (6.22)	OCH <sub>2</sub> O (103.15)	C-3 (149.87)
N-CH <sub>3</sub> (4.95)	N-CH <sub>3</sub> (52.42)	C-4 (104.11), C-4b (127.82), C-6 (146.77)
7-OCH <sub>3</sub> (4.26)	7-OCH <sub>3</sub> (62.55)	
12-OCH <sub>3</sub> (4.23)	12-OCH <sub>3</sub> (57.12)	C-12 (157.30)
8-OCH <sub>3</sub> (4.09)	8-OCH <sub>3</sub> (56.80)	

La estructura molecular fue confirmada mediante el experimento bidimensional NOESY, cuyas interacciones se muestran en la Figura 47. Las correlaciones más importantes se observaron entre el grupo *N*-metilo con H(4) y H(6) y entre el protón H(6) y el metoxilo C(7)-OCH<sub>3</sub>; mientras que, en el lado opuesto de la molécula se observó la correlación de C(12)-OCH<sub>3</sub> con H(1) y H(11), la interacción de H(10) con H(9) y H(11) y de H(9) con C(8)-OCH<sub>3</sub>, las cuales serían inexistentes en el caso de que el grupo metoxilo se encontrara en otra posición. (Figura 47) Las interacciones observadas en el espectro NOESY confirmaron las posiciones de los tres grupos metoxilo, estableciéndose la presencia de un nuevo producto natural que en adelante debe ser nombrado como 12-metoxiqueleritrina.



**Figura 47.** Interacciones NOE relevantes para 12-metoxiqueleritrina

### 5.3 Actividad antimicobacteriana

Se realizaron los ensayos antimicobacterianos de los metabolitos aislados, por el ensayo de Microplaca de Alamar Azul [53–56]. Evaluando cada uno de los alcaloides frente a tres cepas de *M. tuberculosis*, la cepa H37Rv sensible a los fármacos de primera línea y dos aislados clínicos MFR: G122 (resistente a isoniacida, rifampicina y etambutol) y G133 (resistente a isoniacida, rifampicina y estreptomicina) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Actividad antimicobacteriana de los metabolitos secundarios de *B. latisejala*.

Compuestos	<i>M. tuberculosis</i>		
	CMI (µg/mL)		
	H37Rv	G122	G133
Dihidrosanguinarina	>50	>50	>50
Oxisanguinarina	NE	NE	NE
Dihidroqueleritrina	>50	50	>50
(–)-6-acetonildihidroqueleritrina	>50	>50	>50
(–)-queleritridimerina	>50	>50	>50
Queleritrina	<b>12.5</b>	<b>6.25</b>	<b>6.25</b>
Arnottianamida	>50	>50	>50
(–)-6-acetonil-12-metoxidihidroqueleritrina	>50	>50	>50
(–)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina	50	<b>6.25</b>	<b>12.5</b>
12-metoxiqueleritrina	<b>12.5</b>	<b>12.5</b>	<b>6.25</b>
Isoniacida	0.098	0.195	0.098
Rifampicina	0.195	1.562	0.195
Etambutol	3.125	6.250	0.781
Levofloxacina	0.195	1.562	0.195

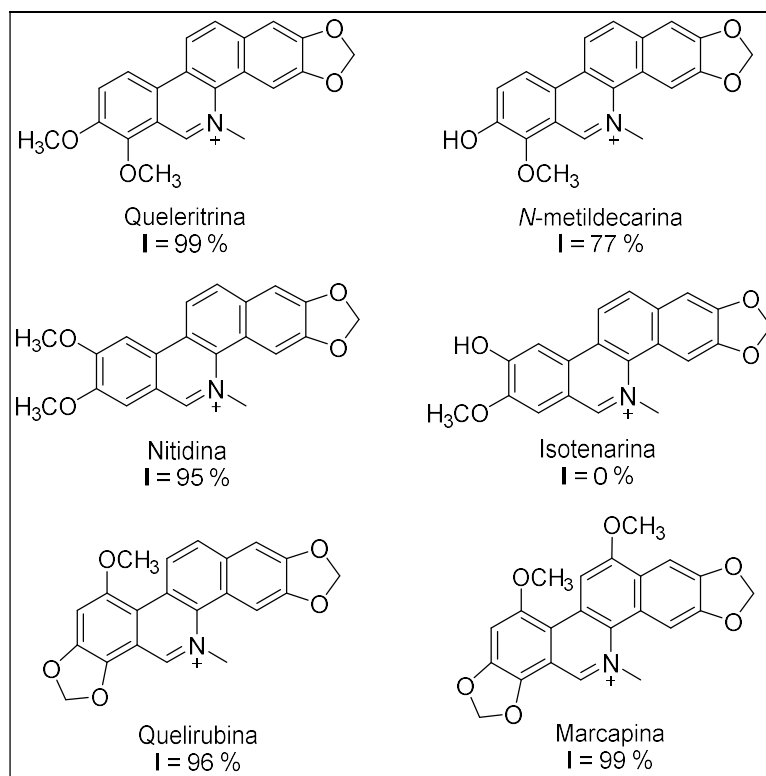
NE: No evaluado

Los resultados de la Tabla 4 muestran que cuatro compuestos evaluados presentan actividad frente a las cepas de *M. tuberculosis*. Los compuestos más activos frente a *M. tuberculosis* H37Rv fueron 12-metoxiqueleritrina y queleritrina, los dos con una CMI = 12.5 µg/mL. Tomando en cuenta los aislados clínicos MDR se encontraron resultados similares. Para el aislado clínico G122 los compuestos más activos fueron 12-metoxiqueleritrina (CMI = 12.5 µg/mL), (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina y queleritrina, los dos últimos con una CMI de 6.25 µg/mL. Para el aislado clínico G133 los compuestos más activos fueron (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina (CMI = 12.5 µg/mL), 12-metoxiqueleritrina, y queleritrina, los dos últimos con una CMI de 6.25 µg/mL.

El compuesto dihidroqueleritrina mostró actividad modesta (CMI = 50 µg/mL) frente al aislado clínico G133, tomando esto en cuenta, y que los demás metabolitos secundarios aislados de *B. latisejala* son análogos a dicho alcaloide (exceptuando a dihidrosanguinarina), es posible reconocer una relación entre la actividad antimicobacteriana y la estructura química de dicho esqueleto. En concordancia con los resultados obtenidos en el presente proyecto, la actividad de los análogos de dihidroqueleritrina frente a *M. tuberculosis* se puede incrementar por dos vías: una de ellas es introduciendo funciones alcoxi en las posiciones 6 y 12 como en el caso de (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina y la otra es generando benzo[c]fenantridinas completamente aromatzadas como en el caso de 12-metoxiqueleritrina y queleritrina.

De los resultados biológicos se puede deducir que, aquellos alcaloides con sustituyentes en C-6 unidos a través de enlaces carbono-carbono no presentan actividad, tal como se observa en el dímero (–)-queleritridimerina y en los acetónidos (–)-6-acetonildihidroqueleritrina y (–)-6-acetonil-12-metoxidihidroqueleritrina. También se observó que dihidrosanguinarina no presenta actividad a las concentraciones evaluadas, lo que nos permite suponer que es muy importante la presencia de los metoxilos en la estructura. Aunque la *seco*-benzo[c]fenantridina contiene metoxilos es probable que la ausencia del esqueleto benzo[c]fenantridínico sea responsable de que no presente actividad a las concentraciones evaluadas.

En el año 2001 Ishikawa [72] reportó la actividad antimicobacteriana (frente a *M. tuberculosis* H37Rv) de distintos alcaloides benzo[c]fenantridínicos completamente aromatzados, realizando un *screening* (rastreo) a una concentración de 12 µg/mL (Figura 48), llegando a las siguientes conclusiones: la presencia de funciones fenólicas libres disminuye la actividad, la introducción de metoxilo en la posición 12 incrementa la actividad y las funciones alcoxi en los anillos A y D del esqueleto (Figura 3) tienen un papel importante en la actividad.



**Figura 48.** Inhibición de crecimiento (I) de *M. tuberculosis* H37Rv para benzo[c]fenantridinas cuaternarias.

Contrastando esta información con los resultados de la presente investigación y lo reportado por Camacho-Corona [4] podemos reforzar lo descrito anteriormente, es decir que presentan actividad: aquellos alcaloides de tipo benzo[c]fenantridina cuaternarios, aquellos alcaloides que contengan en su estructura grupos metoxilo en los anillos A y D. En cambio, la ausencia de metoxilos en la molécula (dihidrosanguinarina), el bloqueo de la posición 6 por un grupo sin función alcoxi (el dímero y los acetónidos) y la ausencia del esqueleto benzo[c]fenantridínico (arnottianamida) impide la actividad de dichos compuestos frente a cepas de *M. tuberculosis* a concentraciones menores a 50  $\mu\text{g/mL}$ .



## 5.4 Citotoxicidad

Las propiedades citotóxicas de los compuestos puros se evaluaron utilizando Fibroblastos Gingivales Humanos (HGF) pertenecientes al panel del NCI mediante un *screening* (rastreo) con el Método Colorimétrico de la Sulforodamina B (SRB, un colorante de unión a proteínas) de acuerdo con el protocolo descrito en la literatura [57-59], a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ . Los resultados expresan el porcentaje de inhibición de crecimiento celular (Tabla 5).

**Tabla 5.** Citotoxicidad de los metabolitos secundarios de *B. latisejala*.

Compuestos	Concentración $\mu\text{g/mL}$	% IC
Dihidrosanguinarina	16.65 $\mu\text{g/mL}$	18.2
Oxisanguinarina	--	NE
Dihidroqueleritrina	17.45 $\mu\text{g/mL}$	40.5
(-)-6-acetonildihidroqueleritrina	20.26 $\mu\text{g/mL}$	29.2
(-)-queleritridimerina	37.61 $\mu\text{g/mL}$	31.0
Queleritrina	17.41 $\mu\text{g/mL}$	84.9
Arnottianamida	19.06 $\mu\text{g/mL}$	9.4
(-)-6-acetonil-12-metoxidihidroqueleritrina	21.76 $\mu\text{g/mL}$	70.5
(-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina	20.46 $\mu\text{g/mL}$	49.4
12-metoxiqueleritrina	18.91 $\mu\text{g/mL}$	38.9
Adriamicina (0.5 $\mu\text{M}$ )	0.27 $\mu\text{g/mL}$	33.8

NE: No evaluado

Los resultados muestran que los compuestos con una mayor inhibición de crecimiento de células normales fueron (-)-6-acetonil-12-

metoxidihidroqueleritrina y queleritrina, con porcentajes de inhibición de crecimiento de 70.5 y 84.9, respectivamente. De manera contraria, los compuestos con una menor influencia en el crecimiento de células normales fueron dihidrosanguinarina y arnottianamida, con porcentajes de inhibición de crecimiento de 18.2 y 9.4, respectivamente.

Es de esperarse que queleritrina presente un alto porcentaje de inhibición de crecimiento ya que anteriormente ha sido reportado en literatura que dicha estructura presenta propiedades citotóxicas [16, 35, 40]. Al agregar un grupo metoxilo en la posición 12 de queleritrina la citotoxicidad disminuyó de manera significativa, tal como fue observado para 12-metoxiqueleritrina (%IC = 38.9).

Al analizar los cuatro compuestos que mostraron actividad frente a las cepas de *M. tuberculosis* evaluadas se encuentra que los porcentajes de inhibición de crecimiento de fibroblastos fueron los siguientes: queleritrina (84.9 %), (–)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina (49.4 %), dihidroqueleritrina (40.5 %) y 12-metoxiqueleritrina (38.9 %). La menor citotoxicidad observada para 12-metoxiqueleritrina incita a considerarla una molécula promisoría para seguir siendo estudiada como agente antituberculoso.

Llama la atención que arnottianamida fue el compuesto que presentó el menor porcentaje de inhibición de crecimiento (9.4 %), tomando en cuenta que presumiblemente, la ausencia de actividad frente a cepas de *M. tuberculosis* se debe a la presencia de un grupo –OH aromático [72], por lo cual será interesante

la eterificación de dicho hidroxilo, para tener un grupo alquiloxi que provea lipofilicidad y actividad antimicobacteriana y que permita aprovechar su baja citotoxicidad en células normales.

Por otro lado, se sabe que los grupos amino cuaternarios poseen una capacidad limitada para atravesar membranas, no se absorben vía oral, si no vía intramuscular o intravenosa; por lo tanto, al considerar 12-metoxiquelertina como un posible fármaco antituberculoso, su administración dificultaría el tratamiento tomando en cuenta los periodos prolongados del mismo. Entonces es conveniente la búsqueda de agentes antituberculosos que no presenten este problema. Para ello se debe optar por alcaloides benzo[c]fenantridínicos que no presenten grupos amino cuaternario, como las dihidrobenzo[c]fenantridinas.

## CAPITULO 6

### CONCLUSIONES

Se aislaron, caracterizaron y purificaron del extracto metanólico de las semillas de *B. latisepala* alcaloides del tipo benzo[c]fenantridina: dihidrosanguinarina, oxisanguinarina, dihidroqueleritrina, (-)-6-acetonildihidroqueleritrina, (-)-queleritridimerina, arnottianamida, queleritrina, (-)-6-acetonil-12-metoxidihidroqueleritrina, (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina y 12-metoxiqueleritrina.

Los alcaloides dihidrosanguinarina, dihidroqueleritrina, (-)-6-acetonildihidroqueleritrina, queleritridimerina, arnottianamida, (-)-6-acetonil-12-metoxidihidroqueleritrina, (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina y 12-metoxiqueleritrina fueron aislados por primera vez de *B. latisepala*.

Se caracterizaron dos nuevos alcaloides de origen natural: (-)-6-acetonil-12-metoxidihidroqueleritrina y 12-metoxiqueleritrina.

Los compuestos más activos frente a *M. tuberculosis* H37Rv fueron 12-metoxiqueleritrina y queleritrina, los dos con una CMI de 12.5 µg/mL.

Para el aislado clínico G122 los compuestos más activos fueron 12-metoxiqueleritrina (CMI = 12.5 µg/mL), (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina y queleritrina, los dos últimos con una CMI de 6.25 µg/mL.

Para el aislado clínico G133 los compuestos más activos fueron (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina (CMI = 12.5 µg/mL), 12-metoxiqueleritrina, y queleritrina, los dos últimos con una CMI de 6.25 µg/mL.

El producto natural arnottianamida fue el menos citotóxico para los fibroblastos gingivales humanos (HGF) (IC = 9.4 %).

## REFERENCIAS

1. Bruton, L.L., Lazo, J.S., and Parker, K.L. Godman & Gilman. Las bases farmacológicas de la Terapéutica. 11th ed., Mc Graw Hill, México, ISBN 9701057392, (2007).
2. World Health Organization, <http://www.who.int/es/>. Consultada en Septiembre de 2015.
3. García, A., Bocanegra-García, V., Palma-Nicolás, J.P., and Rivera, G. Recent Advances in Antitubercular Natural Products. *Eur. J. Med. Chem.* 49:1–23, (2012).
4. Camacho-Corona, M. del R., Favela-Hernández, J. M. de J., González-Santiago, O., Garza-González, E., Molina-Salinas, G. M., Said-Fernández, S., Delgado, G., and Luna-Herrera, J. Evaluation of Some Plant-derived Secondary Metabolites Against Sensitive and Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mex. Chem. Soc.* 53(2):71–75, (2009).
5. Borrero, R., Álvarez, N., Reyes, F., Sarmiento, M.E., and Acosta, A. *Mycobacterium tuberculosis*: factores de virulencia. *Vaccimonitor* 20(1):34–38, (2011).
6. Dube, D., Agrawal, G. P., and Vyas, S. P. Tuberculosis: From Molecular Pathogenesis to Effective Drug Carrier Design. *Drug Discov. Today* 17:760–773, (2012).
7. WHO, Global Tuberculosis Report 2014, World Health Organization, Geneva, ISBN 978 92 4 156480 9, (2014).
8. Dover, L. G. and Coxon, G. D. Current Status and Research Strategies in Tuberculosis Drug Development Miniperspective. *J. Med. Chem.* 54:6157–6165, (2011).
9. Gutierrez-Lugo, M. T. and Bewley, C. A. Natural Products , Small Molecules , and Genetics in Tuberculosis Drug Development. *J. Med. Chem.* 51(9):2606–2612, (2008).
10. Coll, P. Fármacos con Actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enfermedades Infecc. y Microbiología Clínica* 27(8):474–80, (2009).
11. Clemente Soto, A. F. Aportaciones al Mecanismo de Acción del Ácido meso-dihidroguaiarético sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Universidad Autónoma de Nuevo León*, Tesis de Maestría, (2013).

12. Guo, S., Song, Y., Huang, Q., Yuan, H., Wan, B., Wang, Y., He, R., Beconi, M. G., Franzblau, S. G., and Kozikowski, A. P. Identification, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Tetrahydroindazole Based Ligands as Novel Antituberculosis Agents. *J. Med. Chem.* 53(2):649–59, (2010).
13. Newman, D. J. and Cragg, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75:311–335, (2012).
14. Molina Salinas, G. M. Aislamiento y Caracterización de Compuestos con Actividad Bactericida y/o Bacteriostática de Plantas del Noreste de México sobre Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* Sensibles y Mutidrogorresistentes. *Universidad Autónoma de Nuevo León*, Tesis Doctoral, (2004).
15. Ishihara, Y., Azuma, S., Choshi, T., Kohno, K., Ono, K., Tsutsumi, H., Ishizu, T., and Hibino, S. Total Synthesis of Benzo[c]phenanthridine Alkaloids Based on a Microwave-assisted Electrocyclic Reaction of the Aza 6 $\pi$ -electron System and Structural Revision of Broussonpapyrine. *Tetrahedron* 67:1320–1333, (2011).
16. Watanabe, T., Ohashi, Y., Yoshino, R., Komano, N., Eguchi, M., Maruyama, S., and Ishikawa, T. Total Synthesis of 12-Methoxydihydrochelerythrine and Antitumour Activity of its Quaternary Base: Toward an Efficient Synthetic Route for 12-alkoxybenzo[c]phenanthridine Bases via Naphthoquinone Monooxime from 2-benzofuranyl-1-tetralone Derivative. *Org. Biomol. Chem.* 1:3024–3032, (2003).
17. Evans, W.C. Trease and Evans. *Pharmacognosy*. 15th ed., Elsevier, USA, ISBN 0-7020-26-17-4, (2002).
18. Julián Hermenegildo, J. A. Aislamiento y Elucidación Estructural de los Alcaloides Presentes en *Bocconia arborea* (Papaveraceae), una Planta empleada en la Medicina Tradicional,” *Universidad Nacional Autónoma de México*, Tesis de Licenciatura, (2000).
19. Phillipson, J. D. “Phytochemistry and Medicinal Plants,” *Phytochemistry* 56:237–243, (2001).
20. Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D., and Gupta, A., “Phytochemistry of Medicinal Plants,” *J. Pharmacogn. Phytochem.* 1(6):168–182, (2013).
21. Nascimento, G. G. F., Locatelli, J., Freitas, P. C., and Silva, G. L., “Antibacterial Activity of Plants Extracts and Phytochemicals on Antibiotic-Resistant Bacteria,” *Brazilian J. Microbiol.* 31:247–256, (2000).
22. Céspedes, C. L., Ávila, J. G., Martínez, A., Serrato, B., Calderón-Mugica, J. C., and Salgado-Garciglia, R. Antifungal and Antibacterial Activities of Mexican Tarragon (*Tagetes lucida*). *J. Agric. Food Chem.* 54(10):3521–3527, (2006).

23. Molina-Salinas, G. M., Pérez-López, A., Becerril-Montes, P., Salazar-Aranda, R., Said-Fernández, S., and Waksman de Torres, N. Evaluation of the Flora of Northern Mexico for in Vitro Antimicrobial and Antituberculosis Activity. *J. Ethnopharmacol.* 109:435–441, (2007).
24. Topcu, G. Bioactive Triterpenoids from *Salvia* Species. *J. Nat. Prod.* 69:482–487, (2006).
25. Estrada, E., Villarreal, J. a, Cantú, C., Cabral, I., Scott, L., and Yen, C. Ethnobotany in the Cumbres de Monterrey National Park, Nuevo León, México. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 3(8):1–8, (2007).
26. Instituto Nacional de Estadística y Geografía, <http://www.inegi.org.mx/>. Consultado en Septiembre de 2015.
27. Katzung, B., Farmacología Básica Clínica. Editorial el Manual Moderno, México, ISBN 968-426-945-5, (2002).
28. Pascuzzo-Lima, C. Farmacología Básica. ISBN 978-980-12-3246-9, (2008).
29. Cordell, G., Kinghorn, A., and Pezzuto, J. Structure Elucidation, and Bioassay of Cytotoxic Natural Products. *Bioact. Nat. Prod. Detect. Isol. Struct. Determ.* 198–201, (1993).
30. Julian, A. and Delgado, G. (±)-Bocconarborines A and B, Novel 1,3-Bis-Benzo[c]phenanthridinyl Acetone Alkaloids from *Bocconia arborea*. *Rev. La Soc. Quim. Mex.* 45(4):189–194, (2001).
31. Díaz, J. Usos de las Plantas Medicinales en México. Editorial Libros de México, México, (1976).
32. Manske, R., Marion, L., and Ledingham, A. Alkaloids of Papaveraceus Plants. *Can. J. Res.* 21:140–143, (1943).
33. Beuria, T. K., Santra, M. K., and Panda, D. Sanguinarine Blocks Cytokinesis in Bacteria by Inhibiting FtsZ Assembly and Bundling. *Biochemistry* 44:16584–16593, (2005).
34. Anderson, D. E., Kim, M. B., Moore, J. T., O'Brien, T. E., Sorto, N. A., Grove, C. I., Lackner, L. L., Ames, J. B., and Shaw, J. T. Comparison of small molecule inhibitors of the bacterial cell division protein FtsZ and identification of a reliable cross-species inhibitor. *ACS Chem. Biol.* 7(11):1918–28, (2012).
35. Yu, X., Gao, X., Zhu, Z., Cao, Y., Zhang, Q., Tu, P., and Chai, X. Alkaloids from the Tribe Bocconieae (Papaveraceae): A Chemical and Biological Review. *Molecules* 19:13042–13060, (2014).



36. Lei, Q., Zhao, X., Xu, L., Peng, Y., and Xiao, P. Chemical Constituents of Plants from Tribe Chelidoneieae and their Bioactivities. *Chinese Herb. Med.* 6(1):1–21, (2014).
37. Yang, Z., Liu, Z., Jiang, B., Teng, F., Wang, Y., Han, N., Guo, D., and Yin, J. Ambidalmines A-E and Ambidimerine F: Bioactive Dihydrobenzophenanthridine Alkaloids from *Corydalis ambigua* var. *amurensis*. *Eur. J. Med. Chem.* 84:417–424, (2014).
38. Deng, A. and Qin, H. Cytotoxic Dihydrobenzophenanthridine Alkaloids from the Roots of *Macleaya microcarpa*. *Phytochemistry* 71:816–22, (2010).
39. Fotie, J., Bohle, D. S., Olivier, M., Gomez, M. A., and Nzimiro, S. Trypanocidal and Antileishmanial Dihydrochelerythrine Derivatives from *Garcinia lucida*. *J. Nat. Prod.* 70:1650–1653, (2007).
40. Slunská, Z., Gelnarová, E., Hammerová, J., Táborská, E., and Slaninová, I. Effect of Quaternary Benzo[c]phenanthridine Alkaloids Sanguilutine and Chelilutine on Normal and Cancer Cells. *Toxicol. Vitro.* 24(3):697–706, (2010).
41. Kosina, P., Gregorova, J., Gruz, J., Vacek, J., Kolar, M., Vogel, M., Roos, W., Naumann, K., Simanek, V., and Ulrichova, J. Phytochemical and Antimicrobial Characterization of *Macleaya cordata* herb. *Fitoterapia* 81:1006–1012, (2010).
42. Pěňčíková, K., Urbanová, J., Musil, P., Táborská, E., and Gregorová, J. Seasonal Variation of Bioactive Alkaloid Contents in *Macleaya microcarpa* (Maxim.) Fedde. *Molecules* 16:3391–3401, (2011).
43. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>. Consultada en Septiembre de 2015.
44. Rodríguez, C. Chipinque: Testigo de la Naturaleza. Fondo Editorial de Nuevo León, Monterrey, ISBN 978-970-9715-42-2, (2007).
45. Julián Hermenegildo, J. A. Caracterización Estructural y Evaluación Biológica de los Metabolitos Secundarios de *Bocconia arborea* (Papaveraceae). *Universidad Nacional Autónoma de México*, Tesis de Maestría, (2002).
46. Iwasa, K. The Biotransformation of Protoberberine Alkaloids by Plant Tissue Cultures. *The Alkaloids* 46:273–346, (1995).
47. Hagel, J. M. and Facchini, P. J. Benzylisoquinoline Alkaloid Metabolism: A Century of Discovery and a Brave New World. *Plant Cell Physiol.* 54(5):647–672, (2013).

48. Zenk, M. H. The Formation of Benzophenanthridine Alkaloids. *Pure Appl. Chem.* 66:2023–2028, (1994).
49. Zenk, M. H. and Frenzel, T. S-Adenosyl-L-Methionine: 3-Hidroxy-N-Methyl-(S)-Coclaurine-4'-O-Methyl Transferase, A Regio-and Stereoselective Enzyme of The (S)-Reticuline Pathway. *Phytochemistry* 29:3505–3511, (1990).
50. De-La-Cruz Chacón, I., González-Esquinca, A. R., and Riley-Saldaña, C. A., Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos. *Univ. Sci.* 17(2):189–202, 2012.
51. Dominguez, X. A., García Delgado, J., Monroy C., A., Armendáriz, L. G., Alcalá, A., Quevedo, J., and Rojas, P. A Chemical Study of *Bocconia Latisepala* Wats. *Can. J. Chem.* 43:679–682, (1965).
52. Krane, B.D., Fagbule, M.O., and Gözler, B. The Benzophenanthridine Alkaloids. *J. Nat. Prod.* 4(1):1–43, (1984).
53. Franzblau, S. G., Witzig, R. S., McLaughlin, J. C., Torres, P., Madico, G., Hernandez, A., Degnan, M. T., Cook, M. B., Quenzer, V. K., Ferguson, R. M., and Gilman, R. H. Rapid, Low-Technology MIC Determination with Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by Using the Microplate Alamar Blue Assay. *J. Clin. Microbiol.* 36(2):362–366, (1998).
54. Camacho-Corona, M. D. R., Ramírez-Cabrera, M. A., Santiago, O. G., Garza-González, E., Palacios, I. D. P., and Luna-Herrera, J. Activity against Drug Resistant-Tuberculosis Strains of Plants used in Mexican Traditional Medicine to treat Tuberculosis and Other Respiratory Diseases. *Phyther. Res.* 22(1):82–5, (2008).
55. Mendoza-Aguilar, M., Almaguer-Villagrán, L., Arce-Paredes, P., Cid-Gutiérrez, J. L., Rojas-Espinosa, O., and Jiménez-Arellanes, A. The Use of the Microplate Alamar Blue Assay (MABA) to Assess the Susceptibility of *Mycobacterium lepraemurium* to Anti-leprosy and Other Drugs. *J. Infect. Chemother.* 18:652–661, (2012).
56. Favela-Hernández, J. M. J., Garcia, A., Garza-González, E., Rivas-Galindo, V. M., and Camacho-Corona, M. R. Antibacterial and Antimycobacterial Lignans and Flavonoids from *Larrea tridentata*. *Phyther. Res.* 1957–1960, (2012).
57. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82(13):1107-1112, (1990).

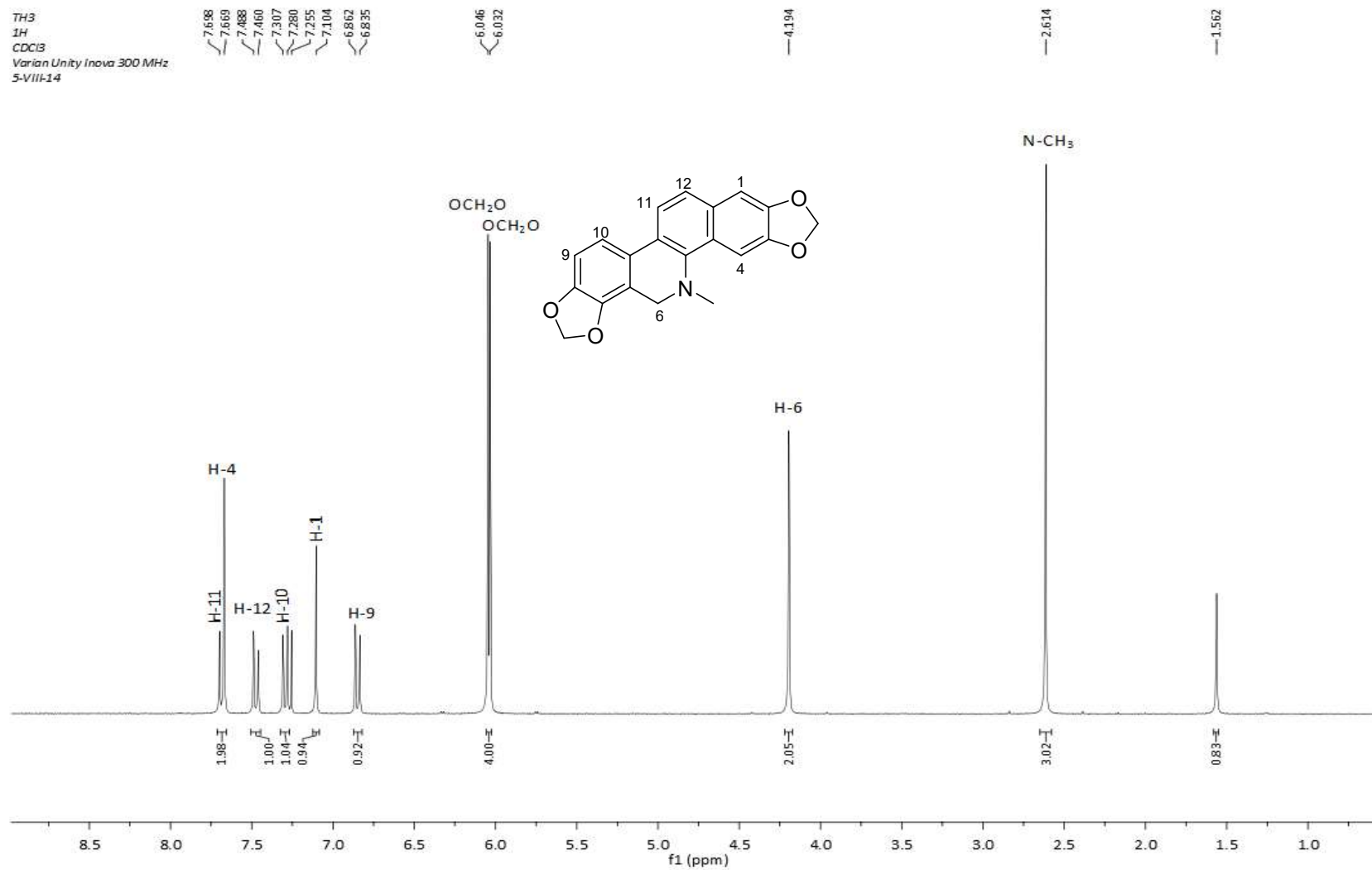
58. García, A.; Ramírez-Apan, T.; Cogordan, J. A.; and Delgado, G. Absolute Configuration Assignments by Experimental and Theoretical Approaches of *ent*-Labdane- and *cis-ent*-Clerodane-Type Diterpenoids Isolated from *Croton glabellus*. *Can. J. Chem.* 84:1593-1602, (2006).
59. Rodríguez-Chavez, J. L.; Coballase-Urrutia, E.; Sicilia-Argumedo, G.; Ramírez-Apan, T.; Delgado, G. Toxicological Evaluation of the Natural Products and Some Semisynthetic Derivatives of *Heterotheca inuloides* Cas (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* 175:256–265, (2015).
60. Oechslin, S. M., Köning, G. M., Oechslin-Merkel, K., Wright, A. D., Kinghorn, A. D. and Sticher, O. An NRM Study of Four Benzophenanthridine Alkaloids. *J. Nat. Prod.* 54(2):519–524, (1991).
61. Navarro, V. and Delgado, G. Two Antimicrobial Alkaloids from *Bocconia arborea*. *J. Ethnopharmacol.* 66:223–226, (1999).
62. McLean, D. B., Gracey, D. E. F., Saunders, J. K., Rodrigo, R. and Manske, R. H. F. Some benzophenanthridine alkaloids from *Bocconia arborea*. *Can. J. Chem.* 47:1951–1956, (1969).
63. Fuchino, H., Kzwano, M., Mori-Yasumoto, K., Sekita, S., Satake, M., Ishikawa, T., Kiuchi, F., and Kawahara, N. In Vitro Leishmanicidal Activity of Benzophenanthridine Alkaloids from *Bocconia pearcei* and Related Compounds. *Chem. Pharm. Bull.* 58(8):1047–1050, (2010).
64. Williams, R. D., Ellis, B. E. Alkaloids from *Agrobacterium rhizogenes*-transformed *Papaver somniferum* cultures. *Phytochemistry.* 32(3):719–723, (1993).
65. Sánchez-Arreola, E., Hernández-Molina, L. R. Sánchez-Salas, J. L., and Martínez-Espino, G. Alkaloids from *Bocconia frutescens* and Biological Activity of their Extracts. *Pharm. Biol.* 44(7):540–543, (2006).
66. Sreelekha, M., Anto, N. P., Anto, R. J. and Shafi, P. M. Cytotoxicity of 6-acetonyldihydrochelerythrin, Arnottianamide and Towards Human Cancer Cell Lines. *Indian J. Chem.* 53:647–651, (2014).
67. Eliel, E. L. and Wilen, S. H. Stereochemistry of Organic Compounds. John Wiley & Sons. New York, ISBN: 978-0-471-01670-0, (1994).
68. Martínez-Martínez, F. J.; Padilla-Martínez, I. I.; Hernández-Carlos, B.; Pérez-Gutiérrez, R. M. and García-Báez, E. V. X-ray diffraction and total <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignment of (*RS*)-5,6-dihydro-7,8-dimethoxy-5-methyl-6-(2-oxopropyl)-(2,3-methylenedioxyphenyl)-[c]-phenanthridine ((*RS*)-6-acetonyldihydrochelerythrine). *Journal of Chemical Crystallography*, 32:63-68, (2002).

69. Sharma, P. N., Shoeb, A., Kapil, R. S., and Popli, S. P. Toddalidimerine, a Dimeric Benzophenanthridine Alkaloid from *Toddalia asiatica*. *Phytochemistry* 20(12):2781–2783, (1981).
70. Perez Gutierrez, R. M., Vargas Solis, R., Diaz Gutierrez, G., and Martinez-Martinez, F. J. Identification of Benzophenanthridine Alkaloids from *Bocconia arborea* by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Phytochemical* 13:177–180, (2002).
71. Alcaraz González, F. Nomenclatura de Química Orgánica. Universidad de Murcia, Murcia, España, ISBN 84-7684-242-2, (1991).
72. Ishikawa, T. Benzo[c]phenanthridine Bases and their Antituberculosis Activity. *Med. Res. Rev.* 21(1):61–72, (2001).

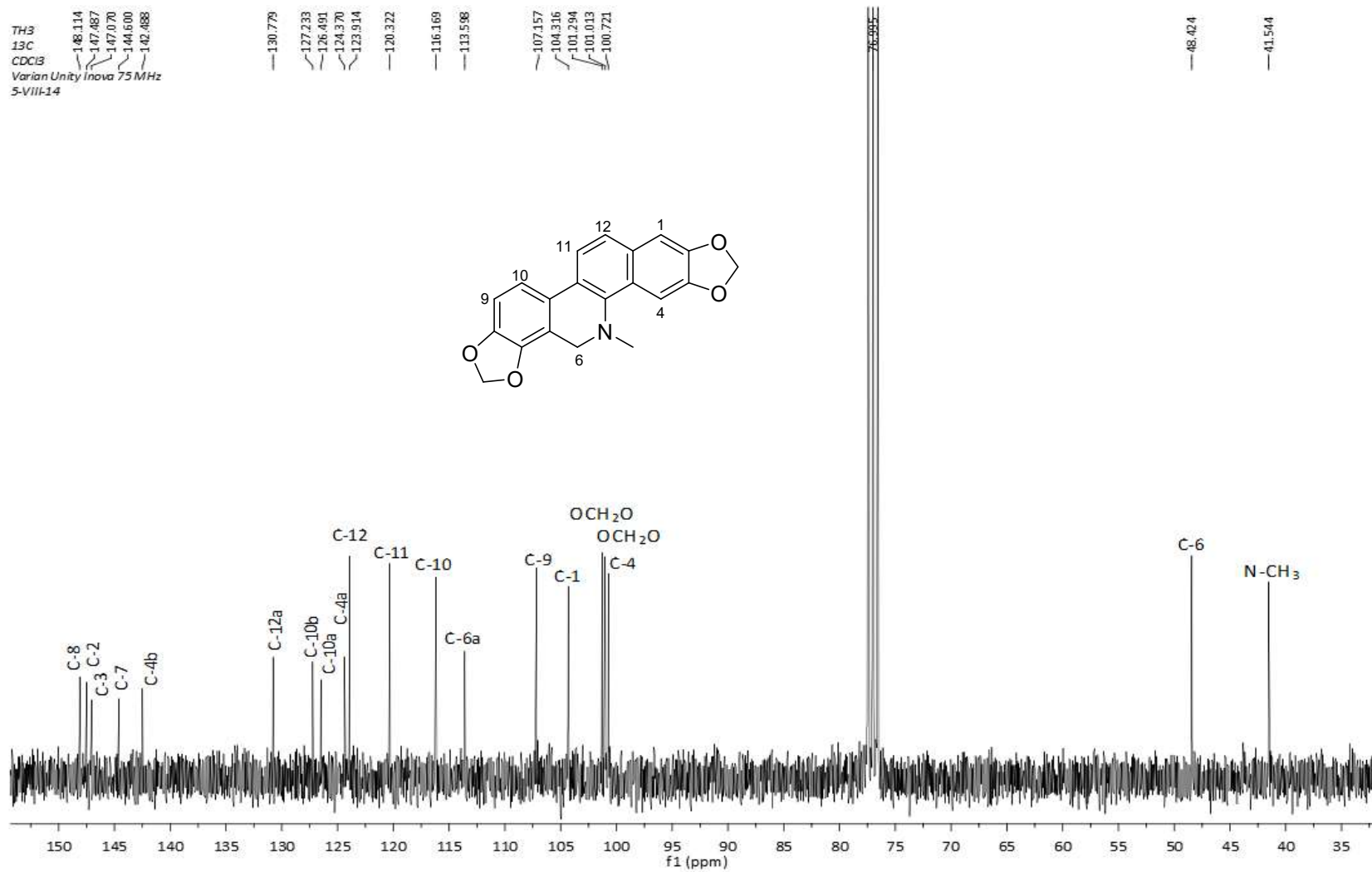
## **APÉNDICES**

### **APÉNDICE A**

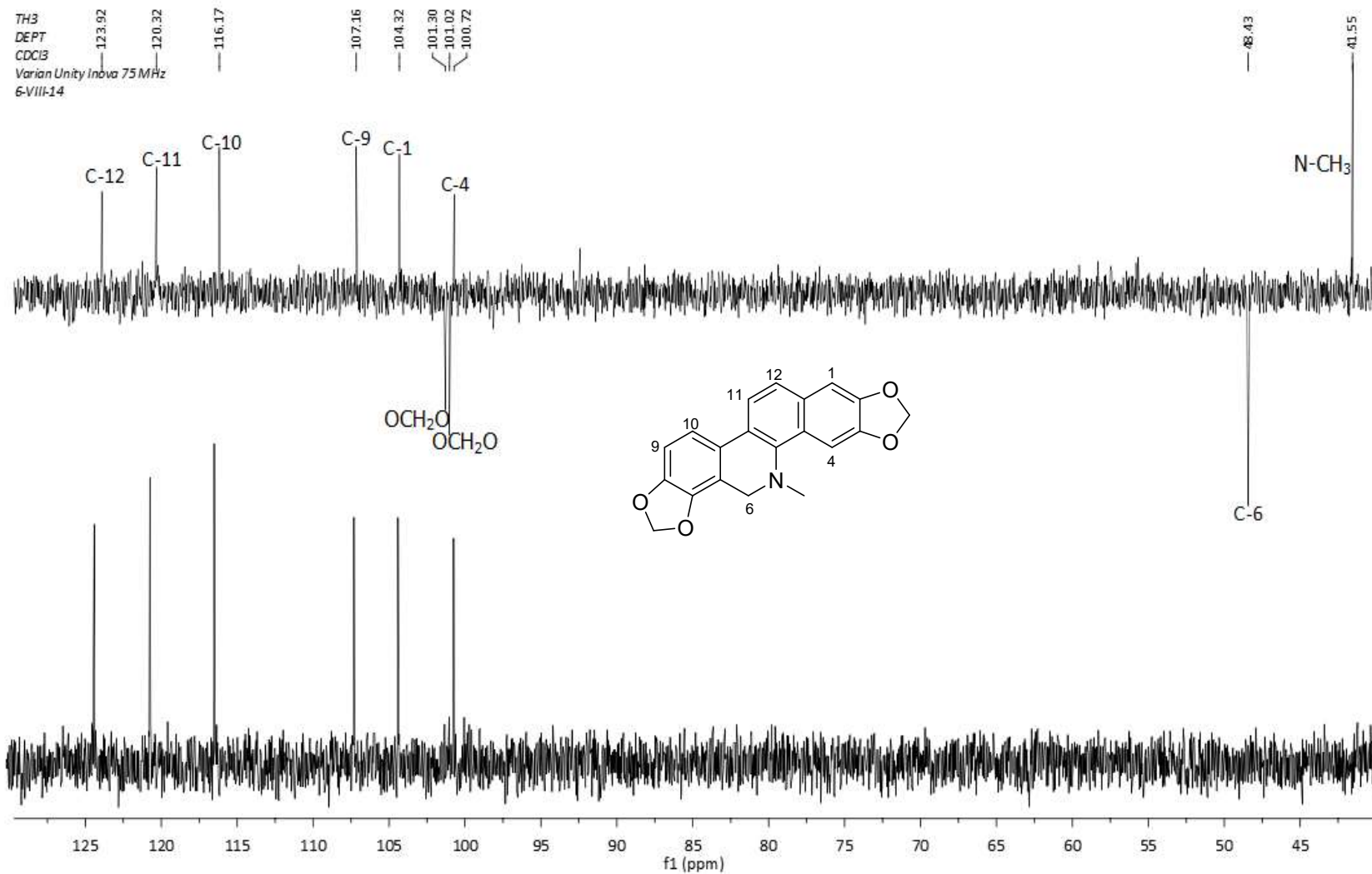
#### **ESPECTROS**

Espectro 1. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) Dihydrosanguinarina.

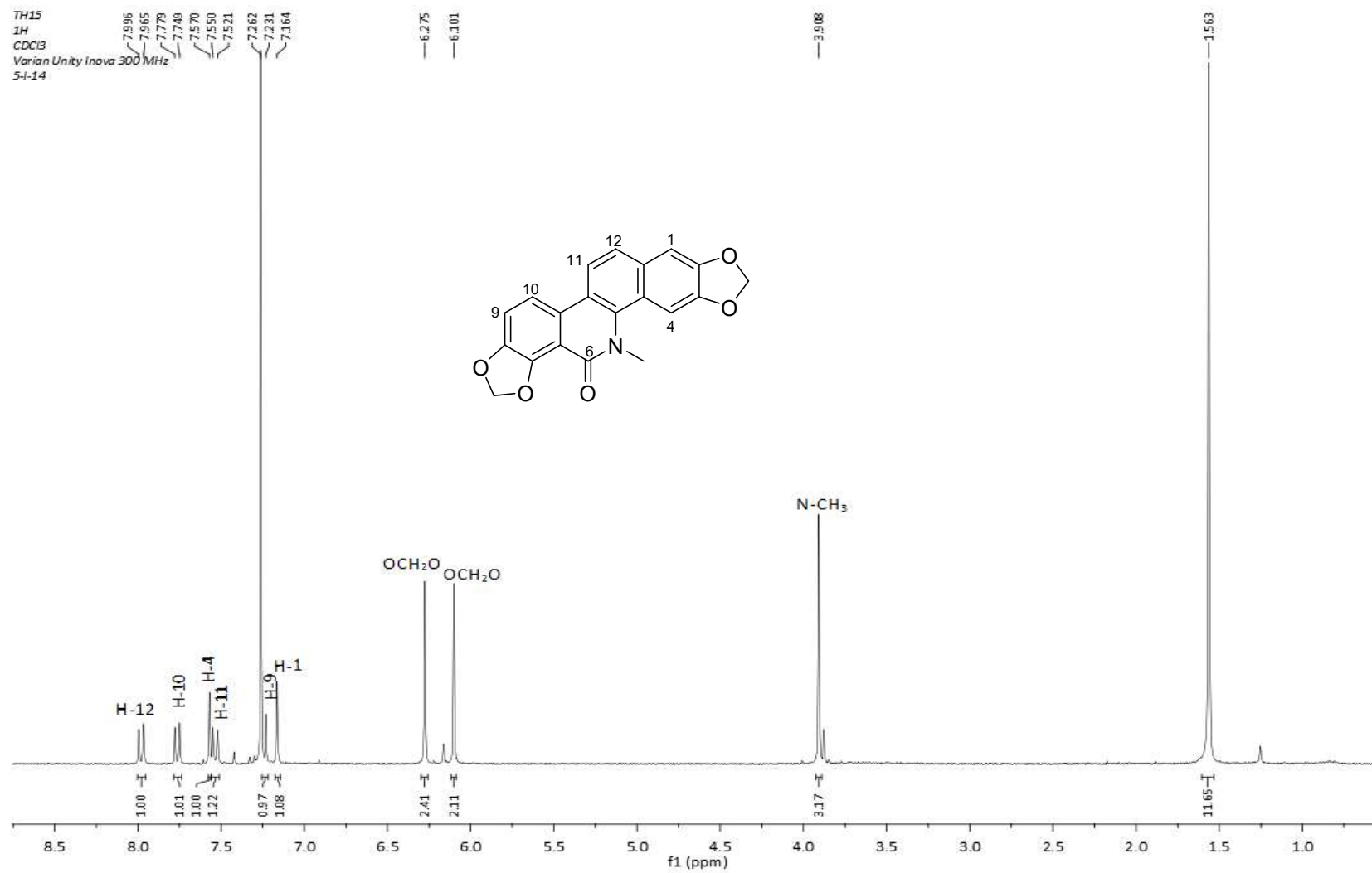
TH3  
13C  
CDCl3  
Varian Unity Inova 75 MHz  
5-VIII-14

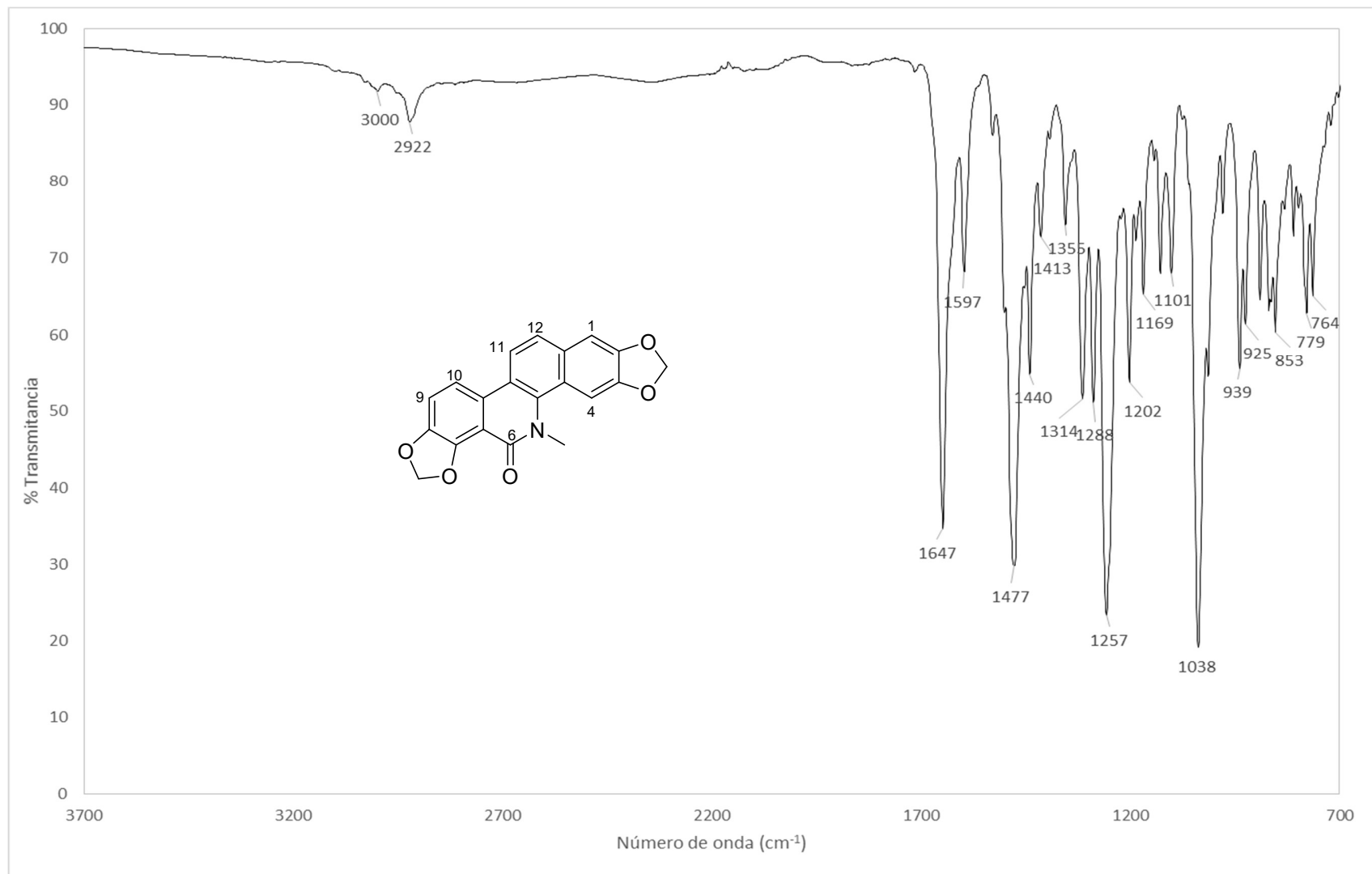


Espectro 2. RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) Dihydrosanguinarina.

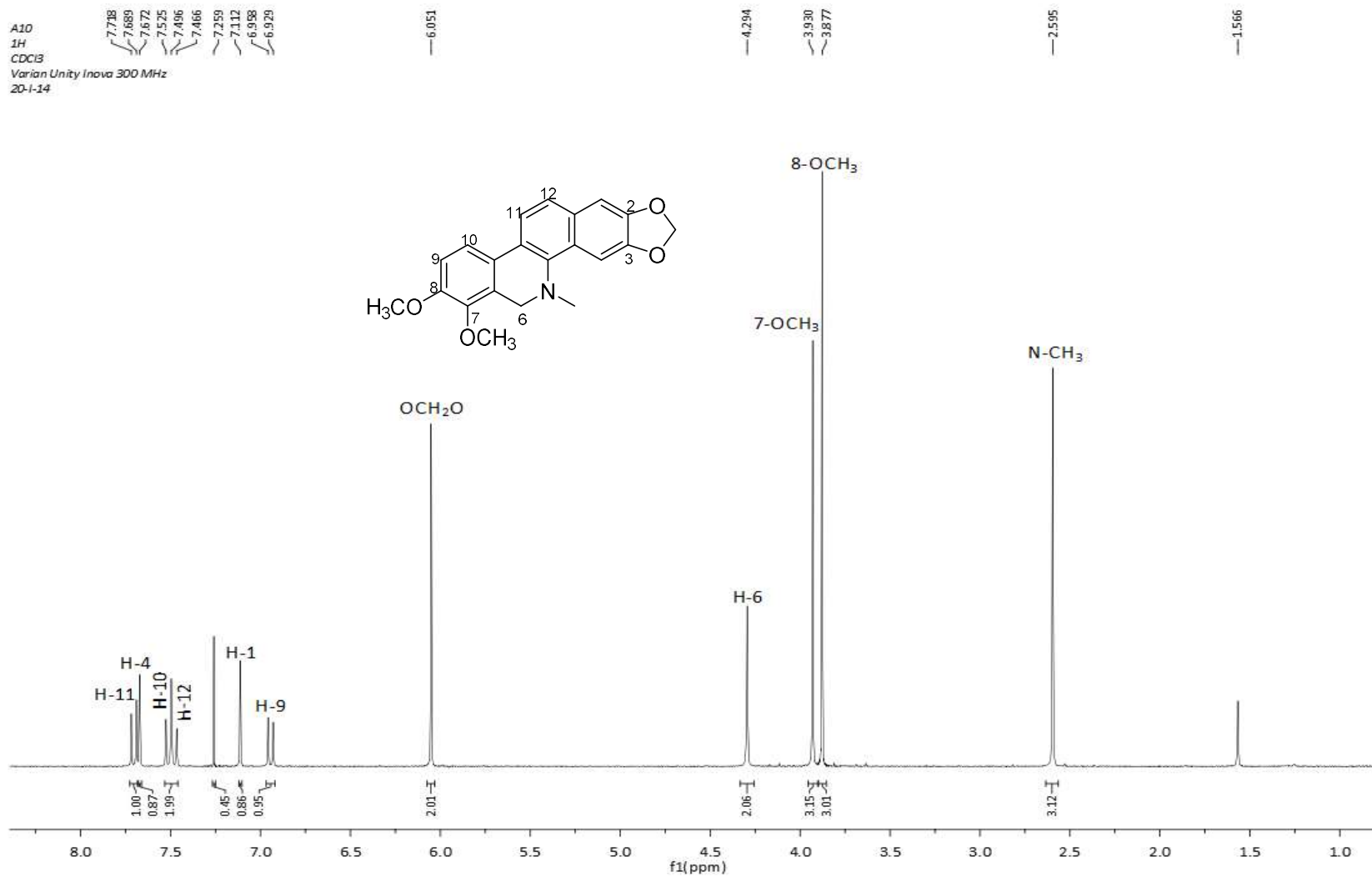
Espectro 3. RMN <sup>13</sup>C DEPT (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) Dihydrosanguinarina.

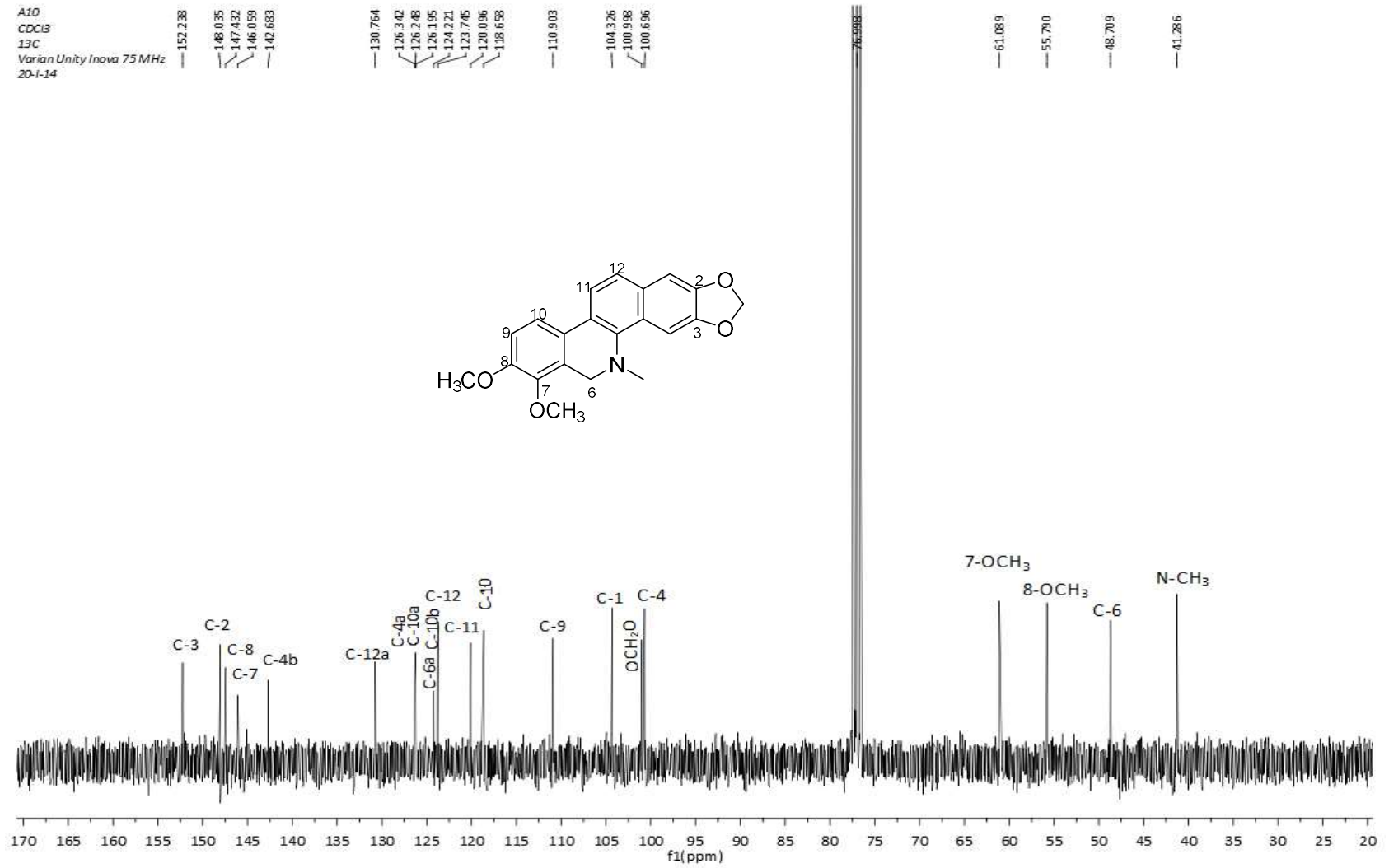


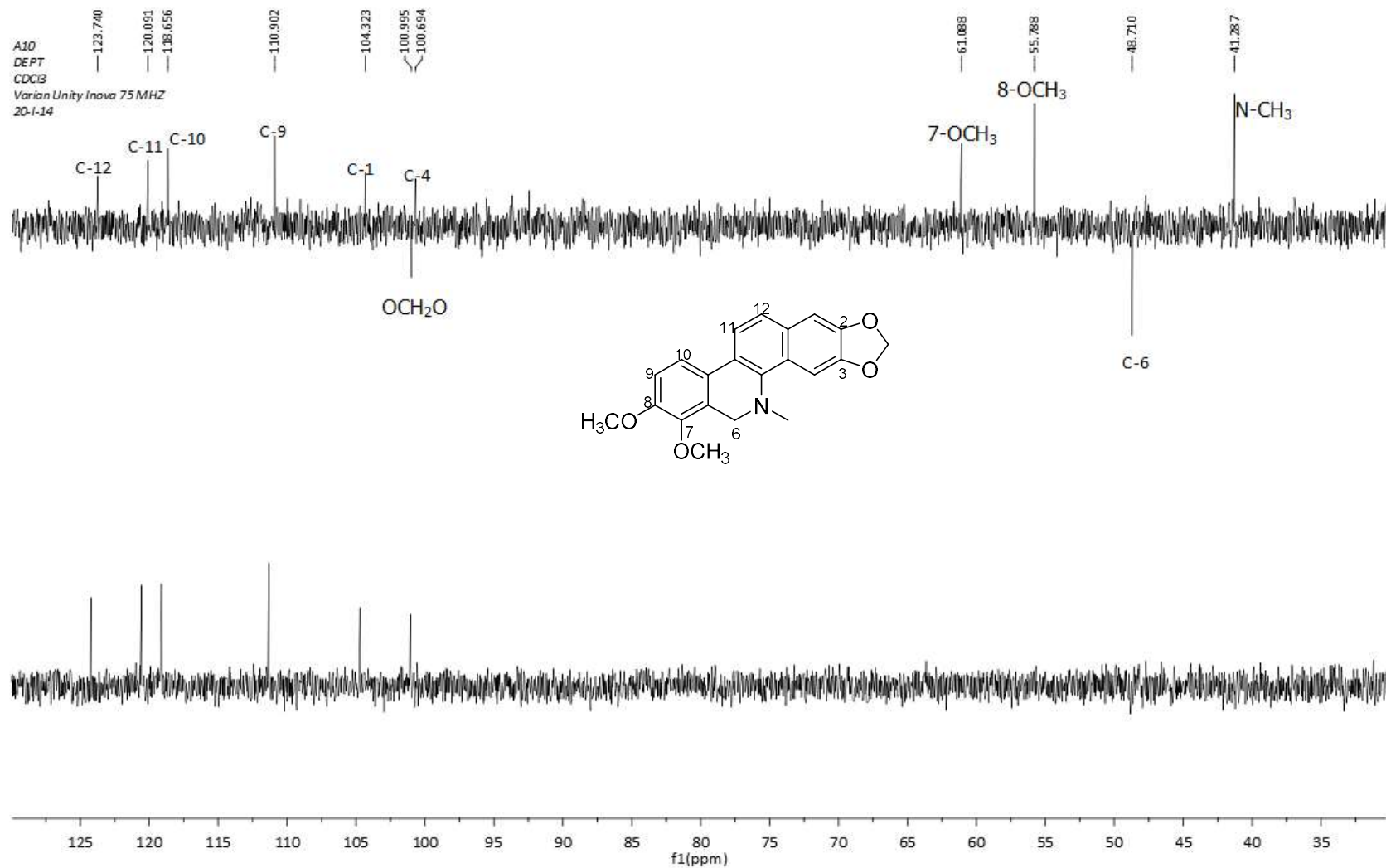
Espectro 4. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) Oxisanguinarina

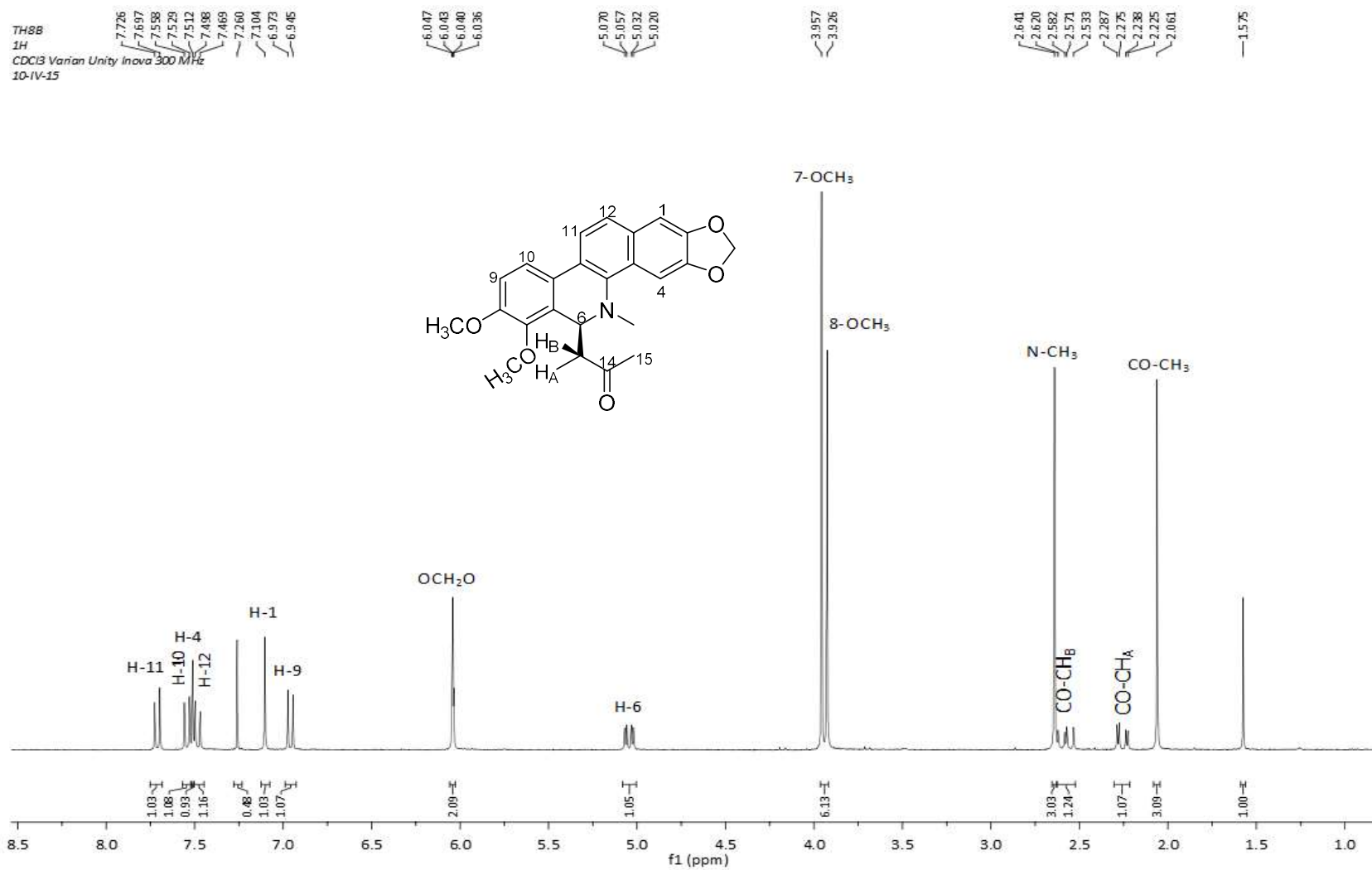


Espectro 5. Infrarrojo (ATR) Oxisanguinarina.

Espectro 6. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) Dihidroqueleritina.

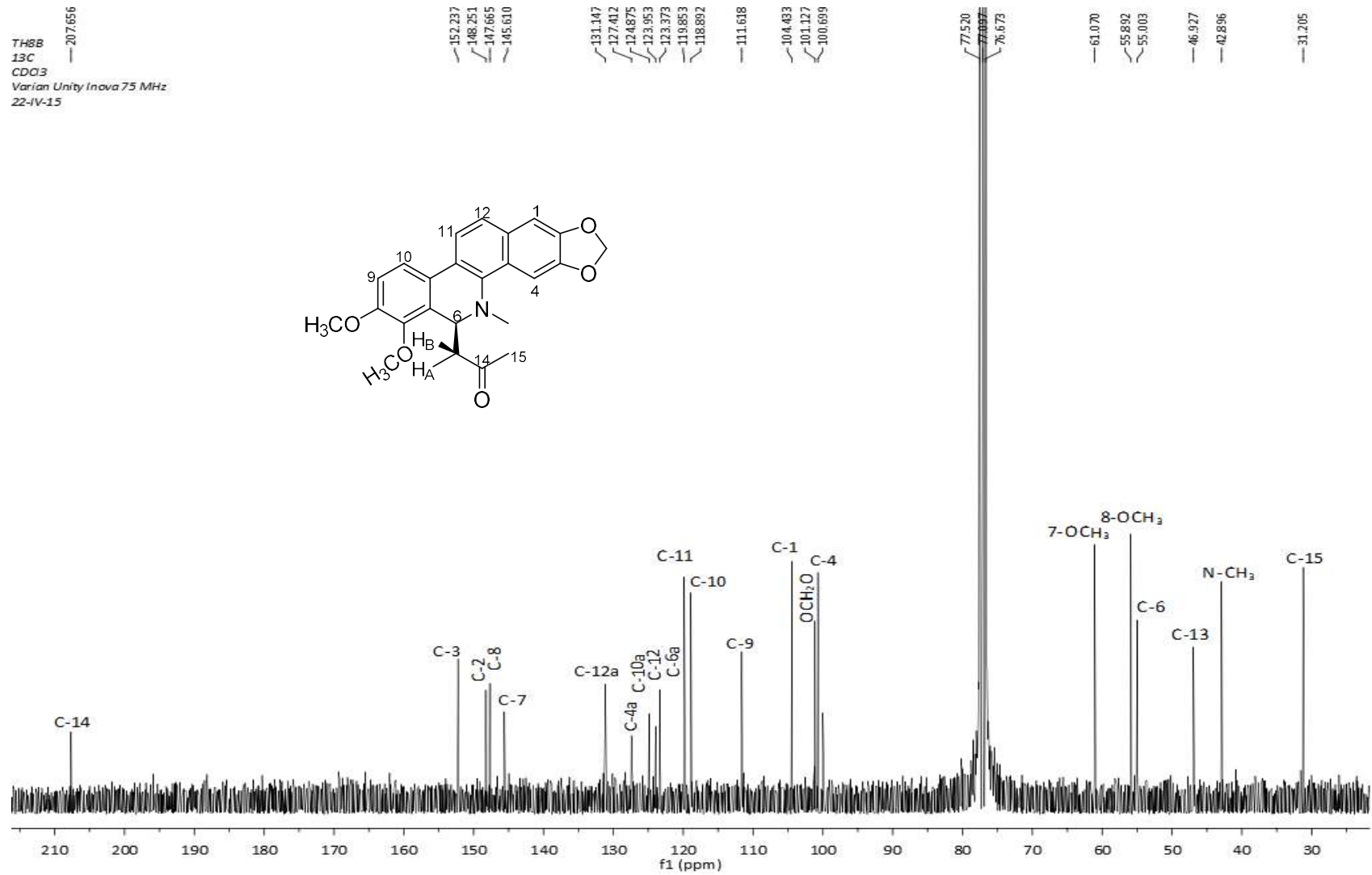
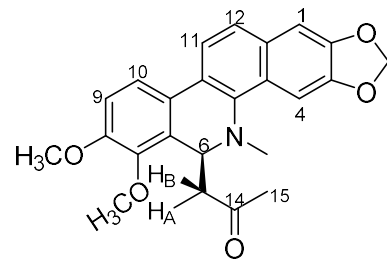
Espectro 7. RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) Dihidroqueleritina.

Espectro 8. RMN <sup>13</sup>C DEPT (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) Dihidroqueleritina.

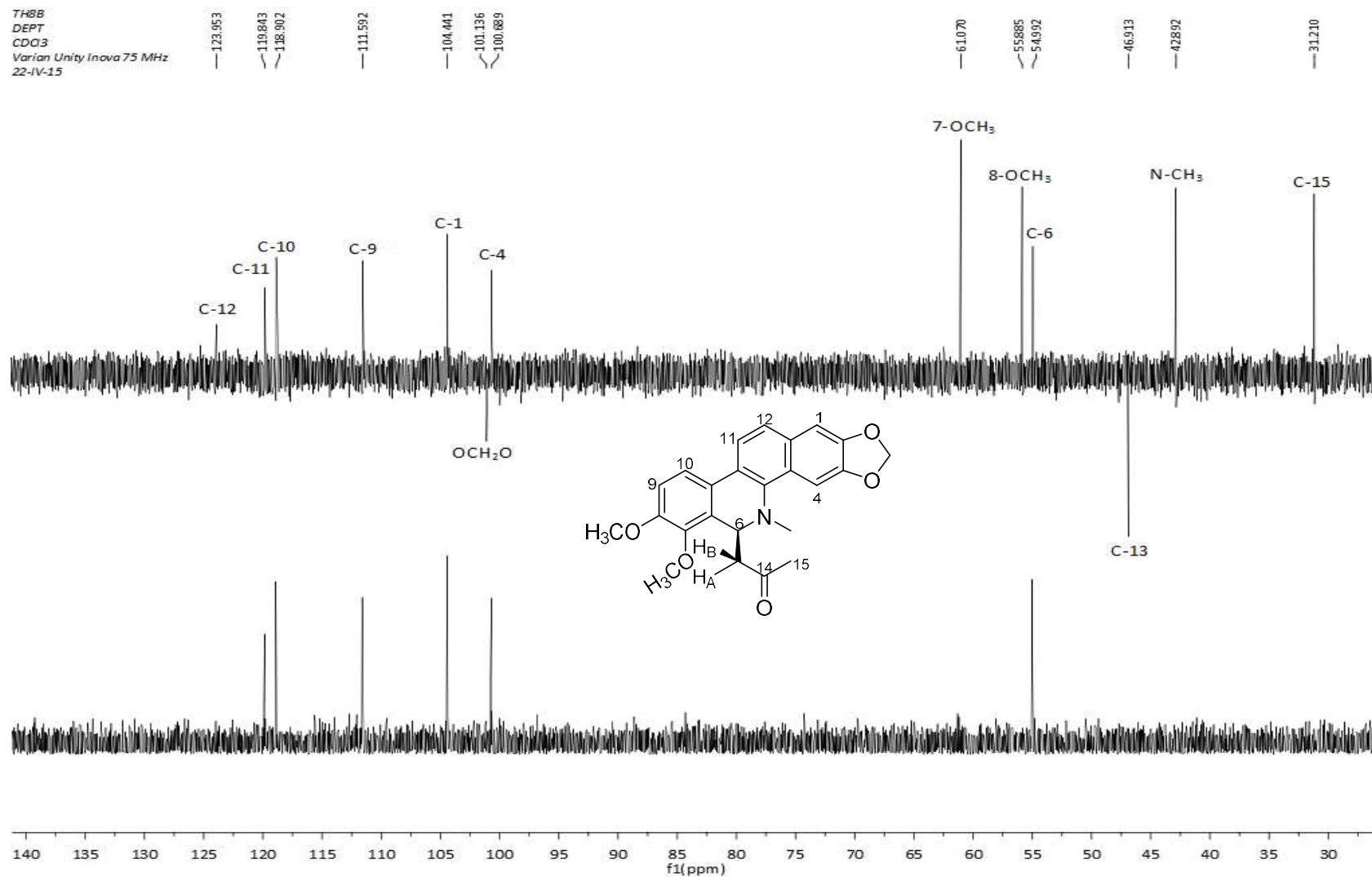


Espectro 9. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (-)-6-acetonildihydroqueleritina.

TH8B  
 13C  
 CDO3  
 Varian Unity Inova 75 MHz  
 22-IV-15

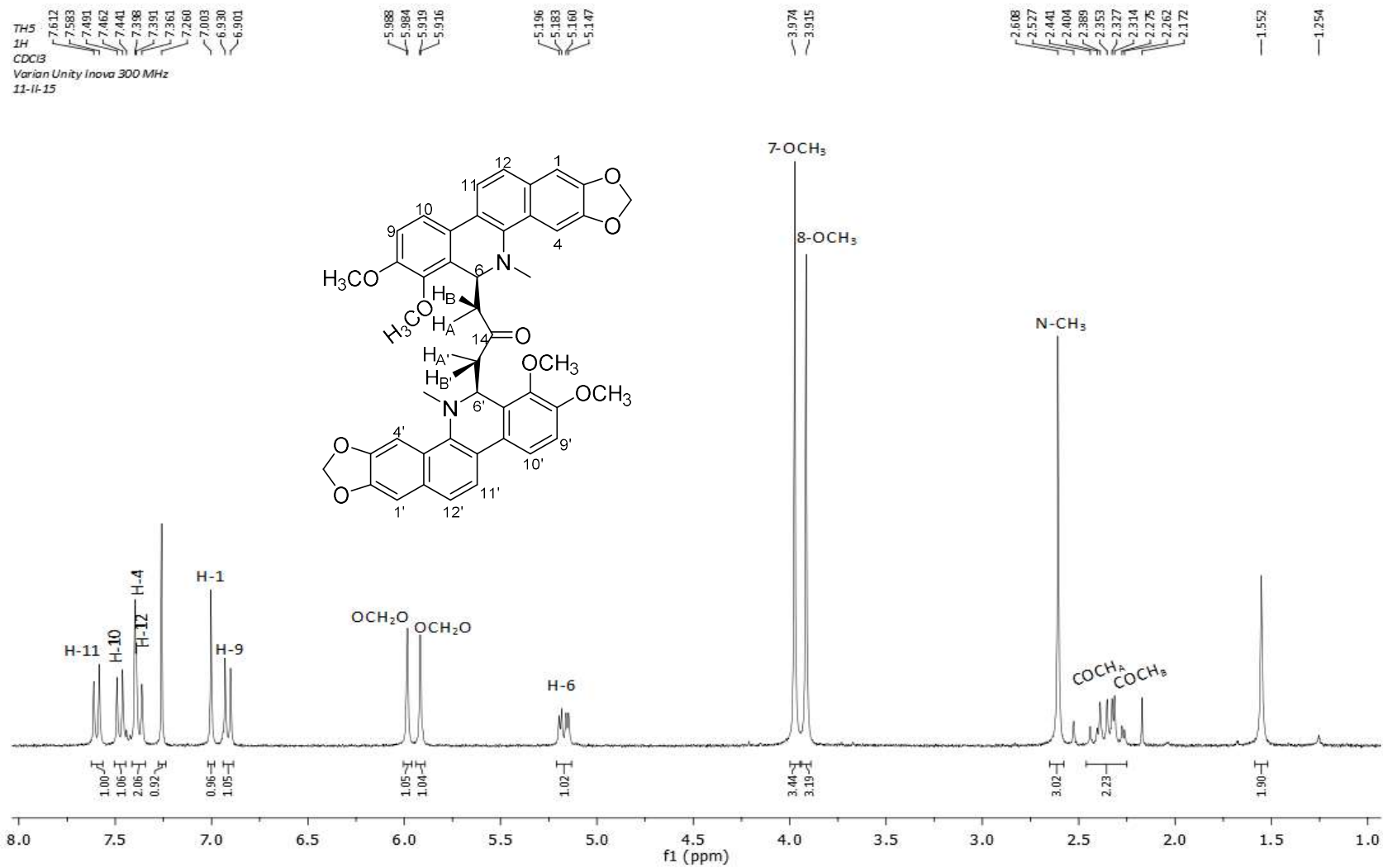


Espectro 10. RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (-)-6-acetonildihidroqueleritina.

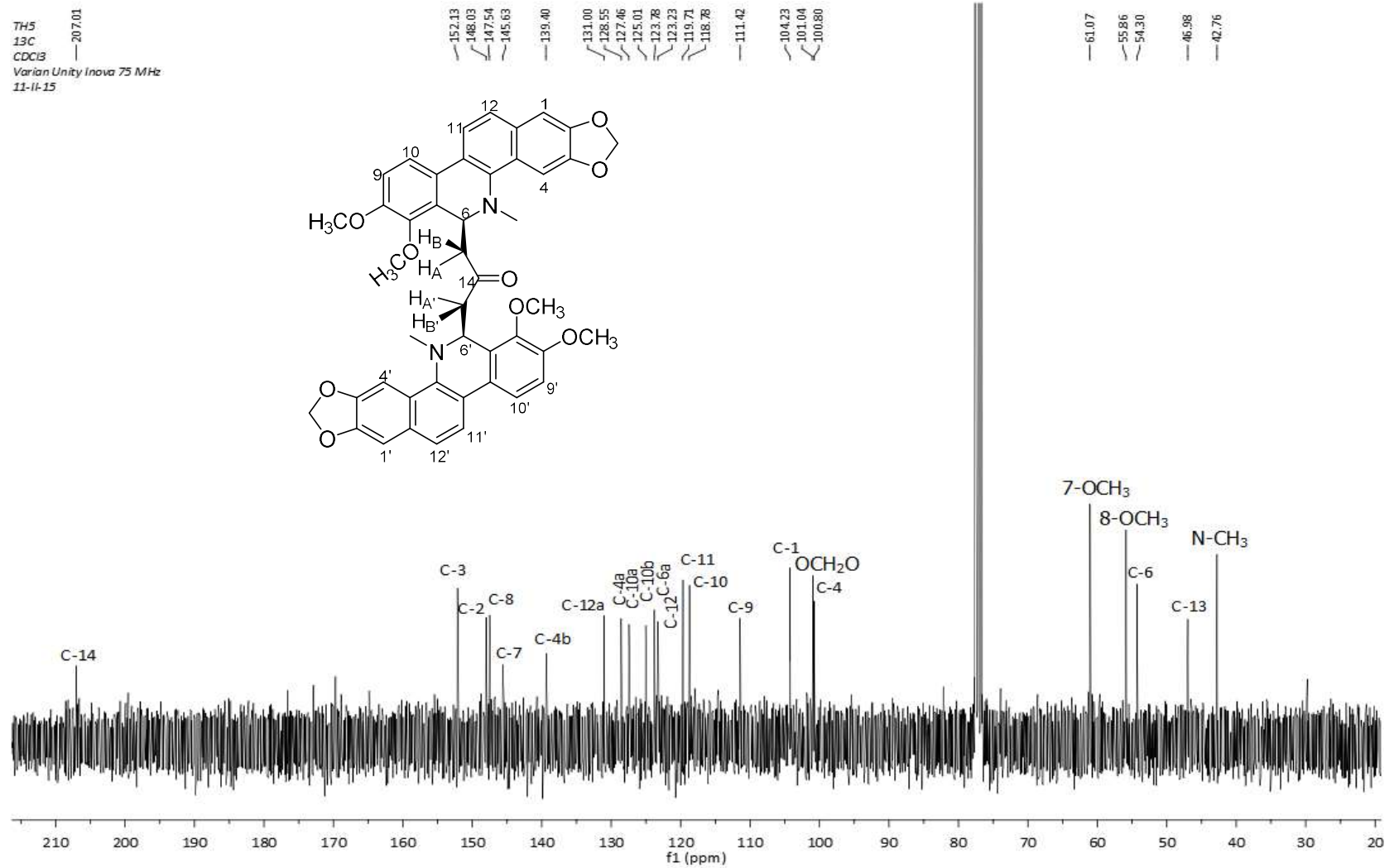


Espectro 11. RMN <sup>13</sup>C DEPT (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (-)-6-acetonildihidroqueleritina.





THS  
 13C  
 CDCl<sub>3</sub>  
 Varian Unity Inova 75 MHz  
 11-II-15



Espectro 13. RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (-)-queleritridimerina.

TH10  
 1H  
 TFA-d  
 Varian Unity Inova 300 MHz  
 8-IV-15

8.798  
 8.767  
 8.729  
 8.699

8.366  
 8.335  
 8.319  
 8.288  
 8.195

7.650

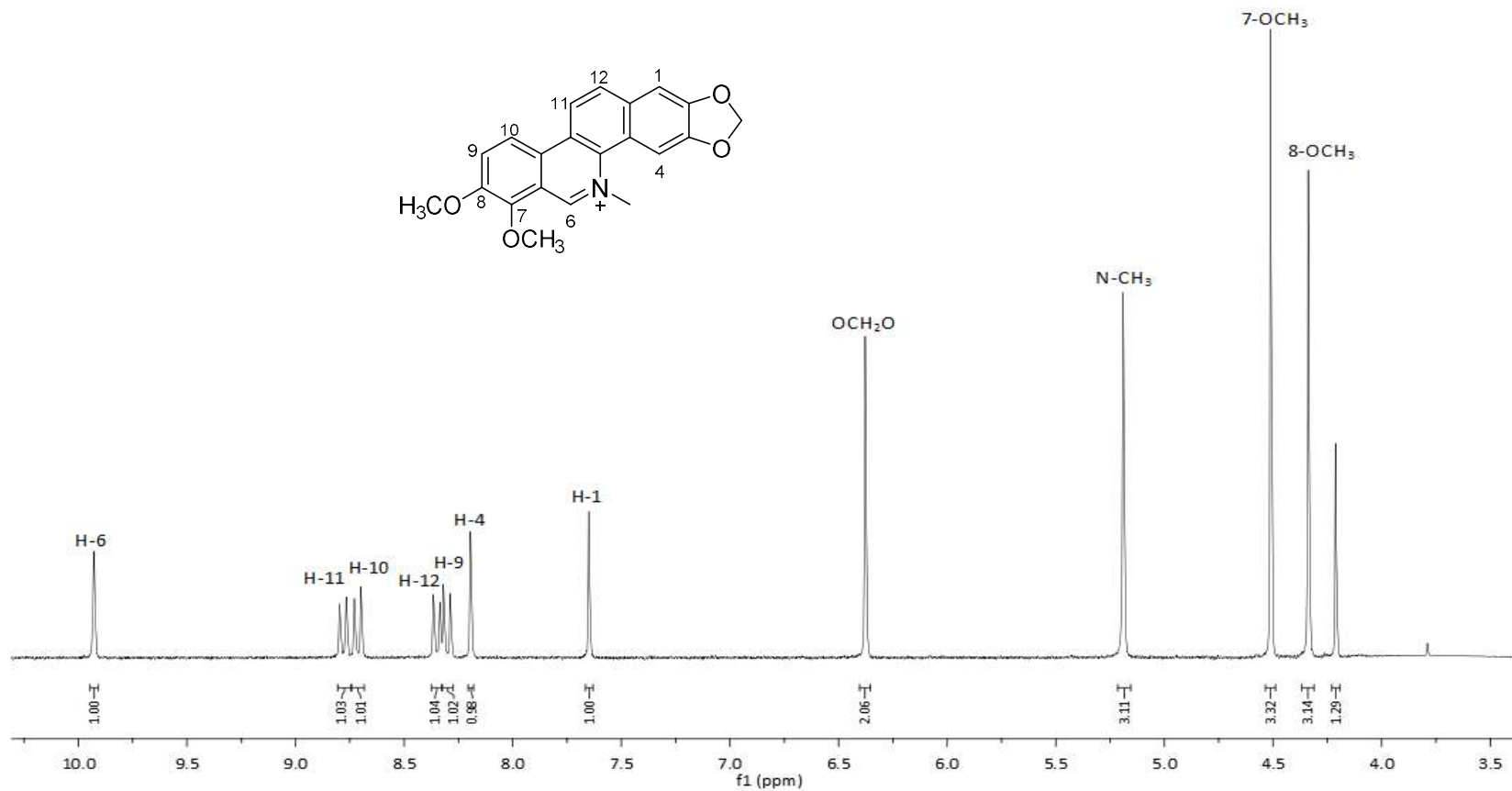
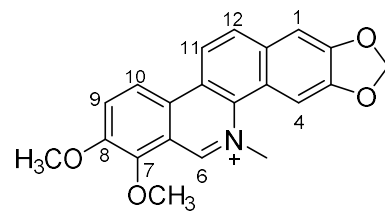
6.377

5.190

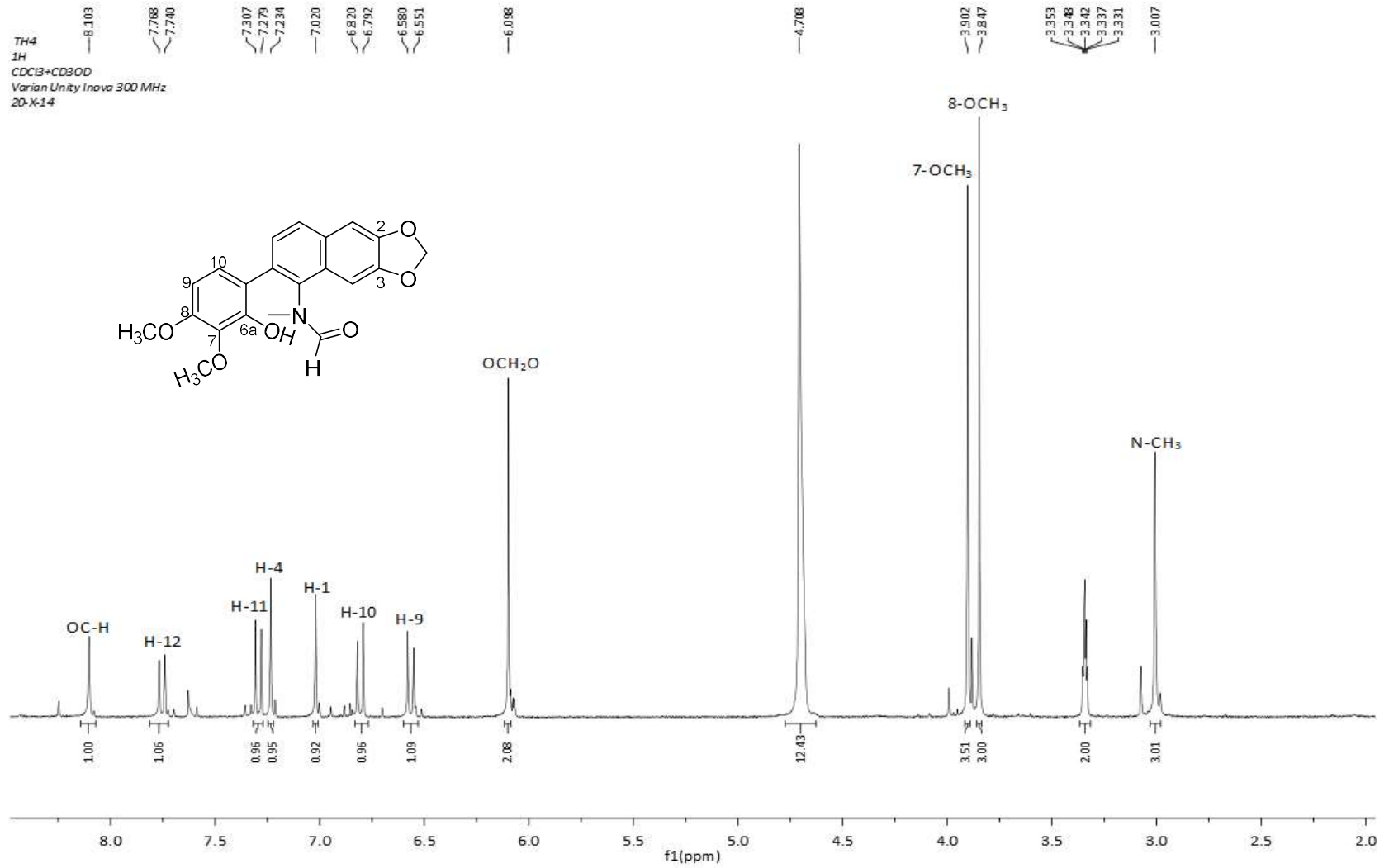
4.512

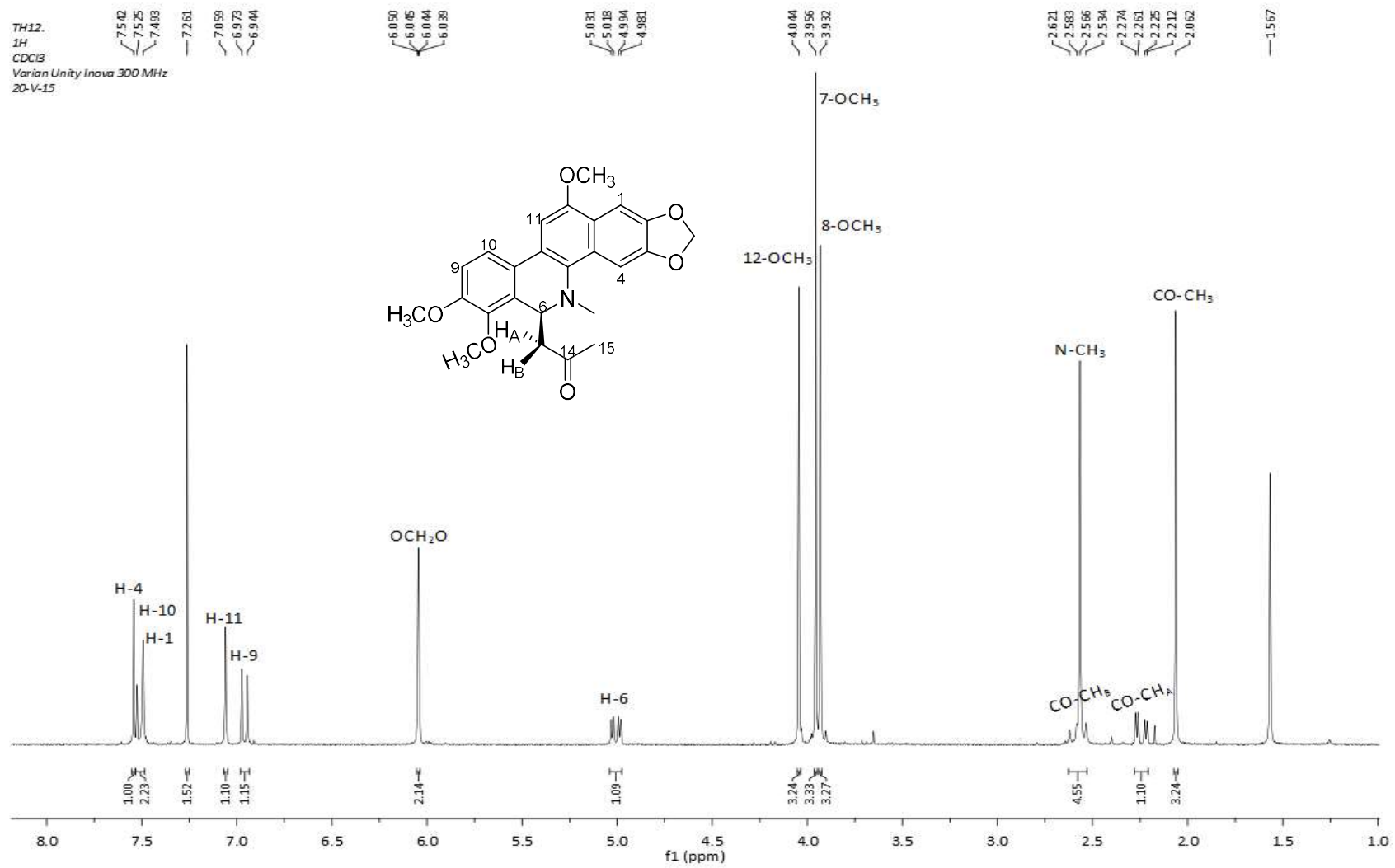
4.338

4.213



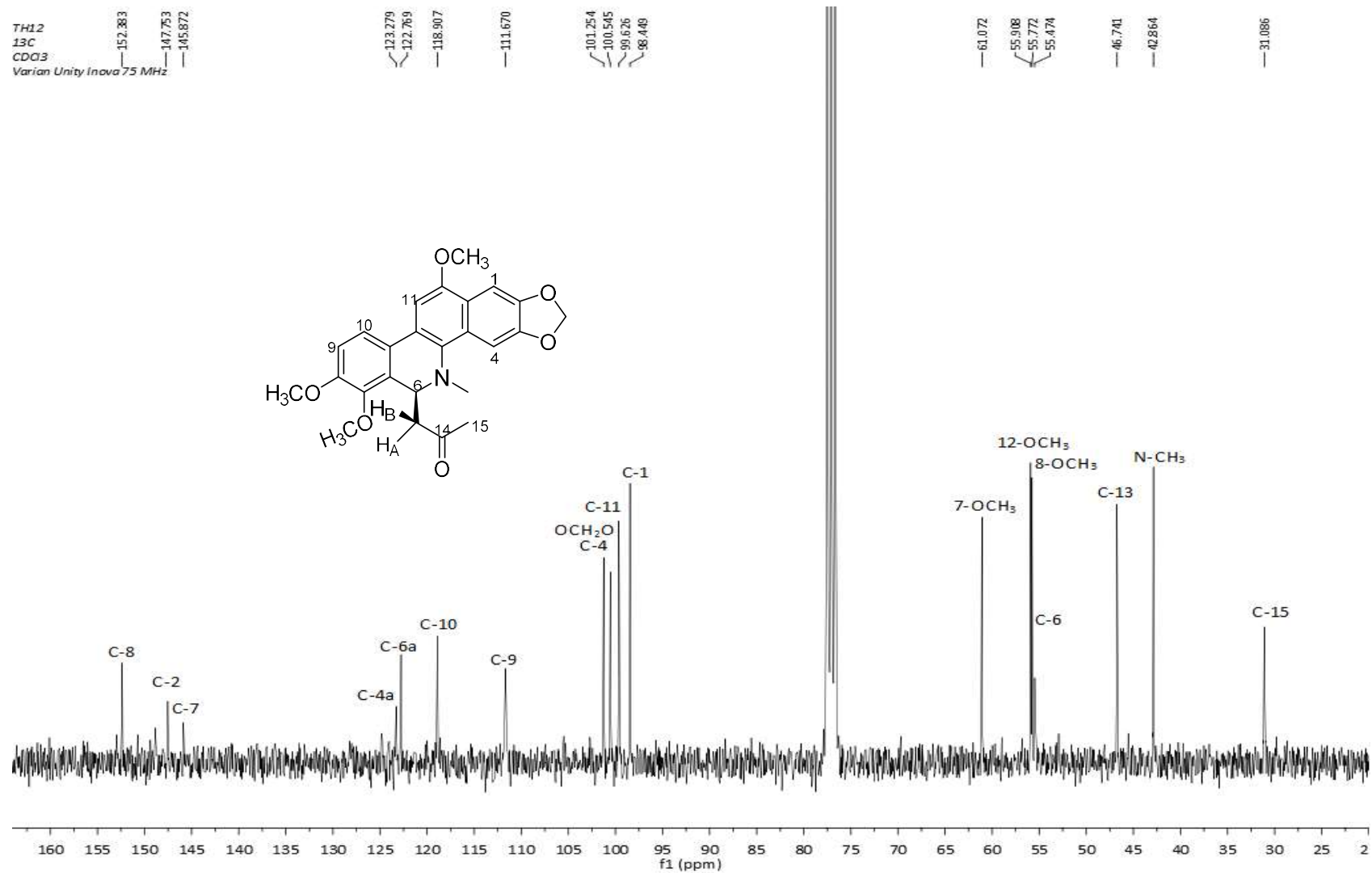
Espectro 14. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, TFA-d) Queleritina.


 Espectro 15. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD) Arnottianamida.

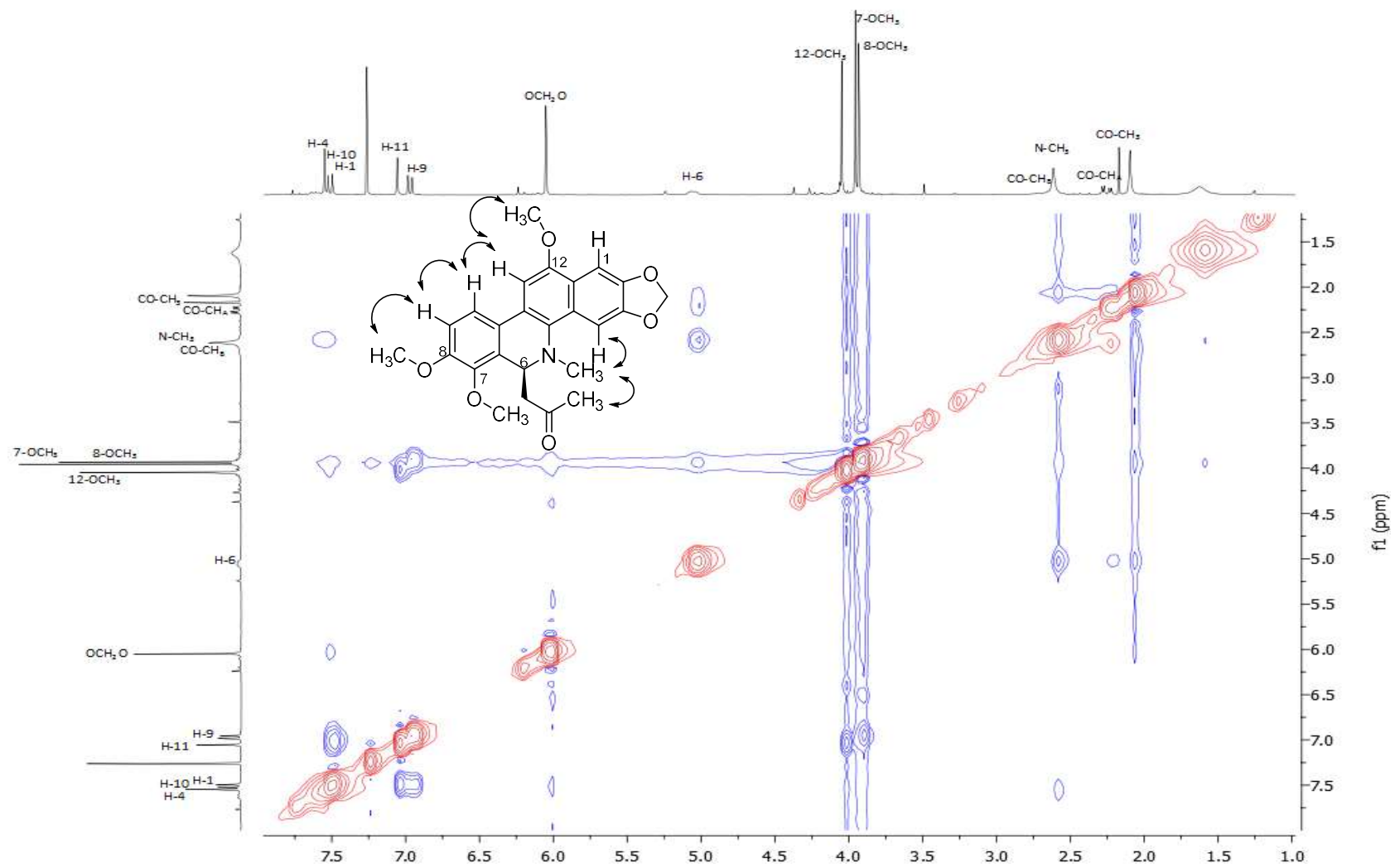


Espectro 16. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (-)-6-acetonil-12-metoxidihidroqueleritina.

TH12  
13C  
CDCl3  
Varian Unity Inova 75 MHz

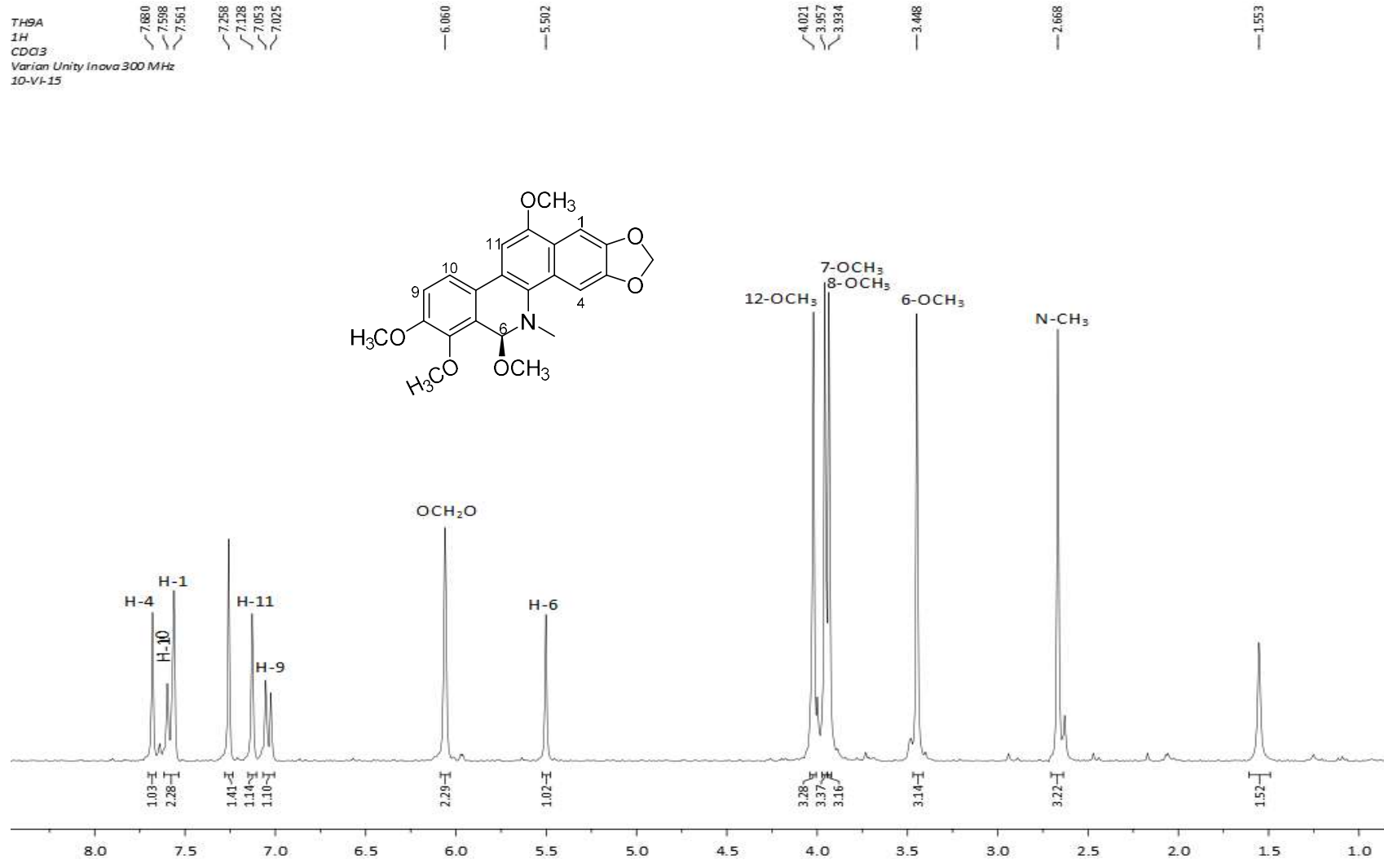
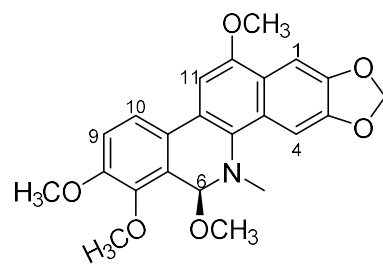


Espectro 17. RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (-)-6-acetonil-12-metoxidihidroqueleritrina.



Espectro 18. RMN NOESY (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (-)-6-acetonil-12-metoxidihidroqueleritina.

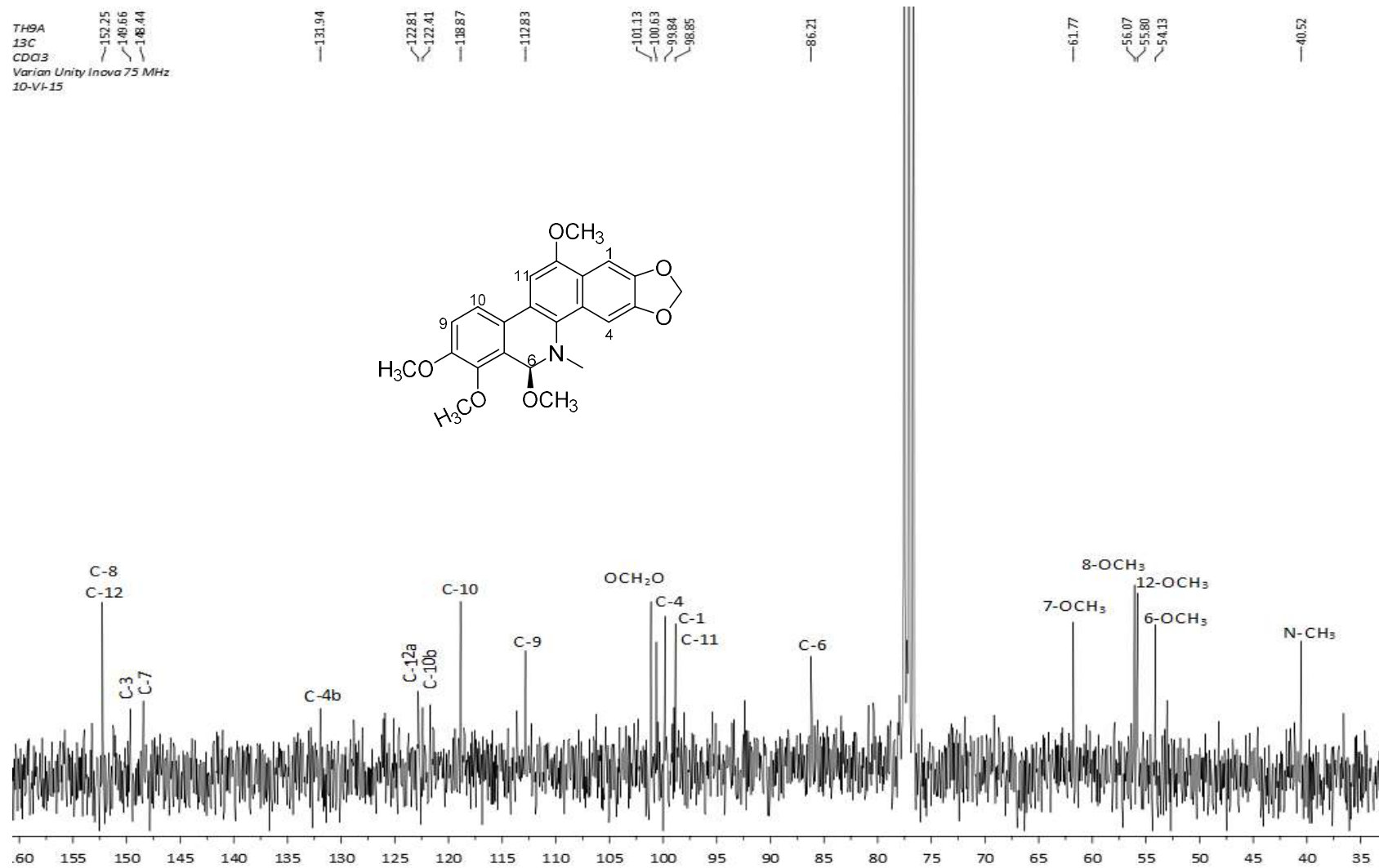
TH9A  
 1H  
 CDCl3  
 Varian Unity Inova 300 MHz  
 10-VI-15



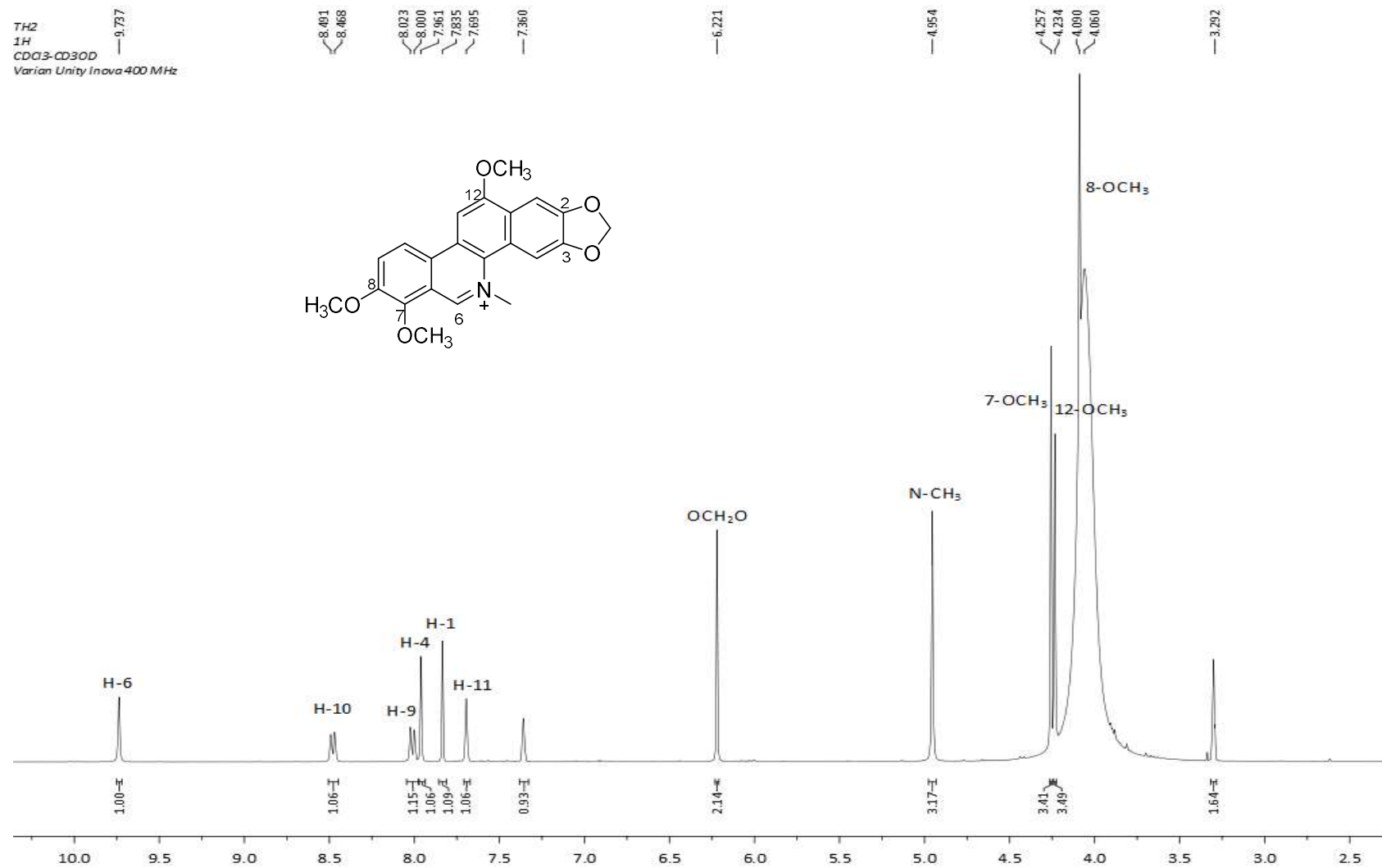
Espectro 19. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritina.



TH9A  
 13C  
 CDCl3  
 Varian Unity Inova 75 MHz  
 10-VI-15

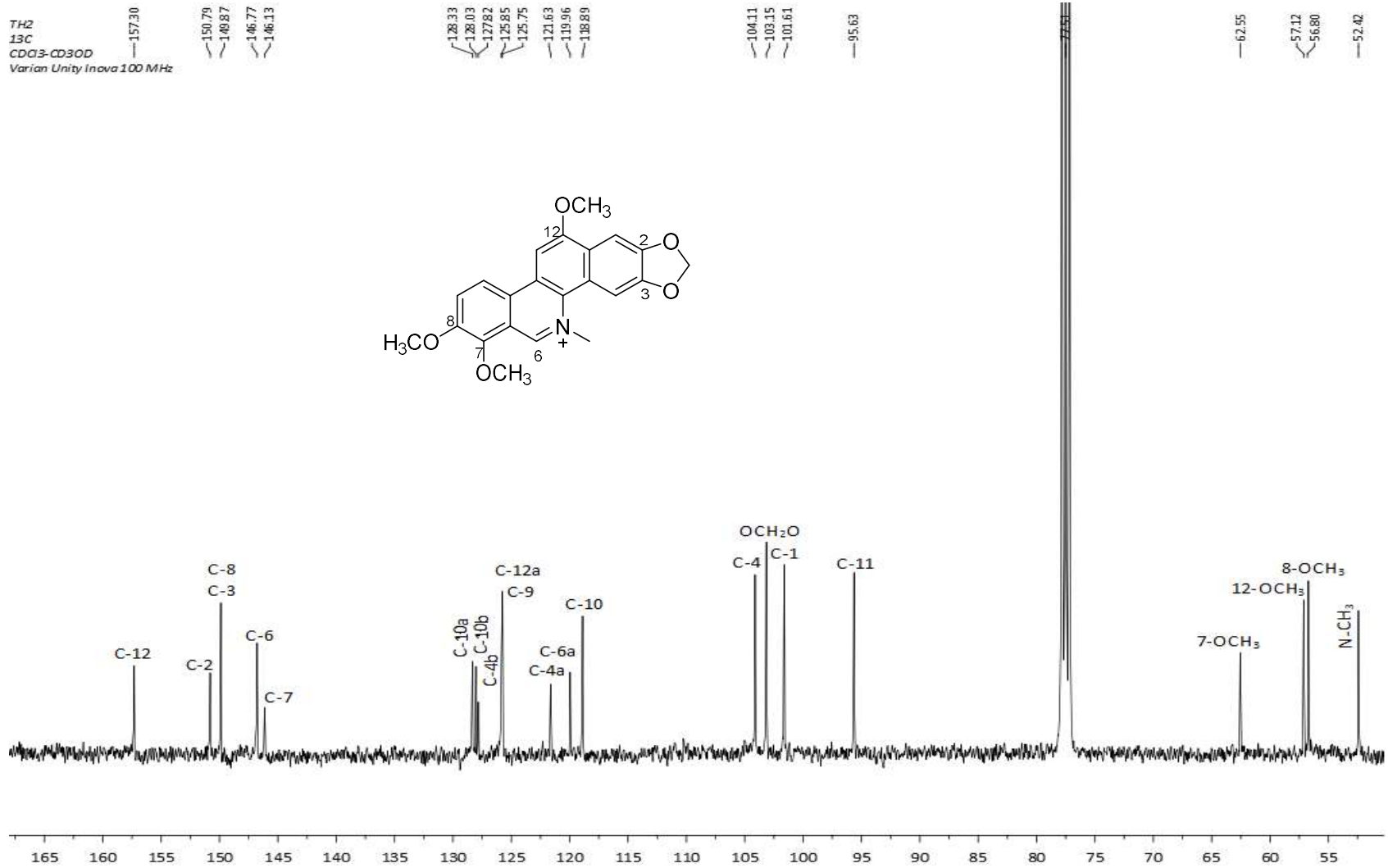


Espectro 20. RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritina.

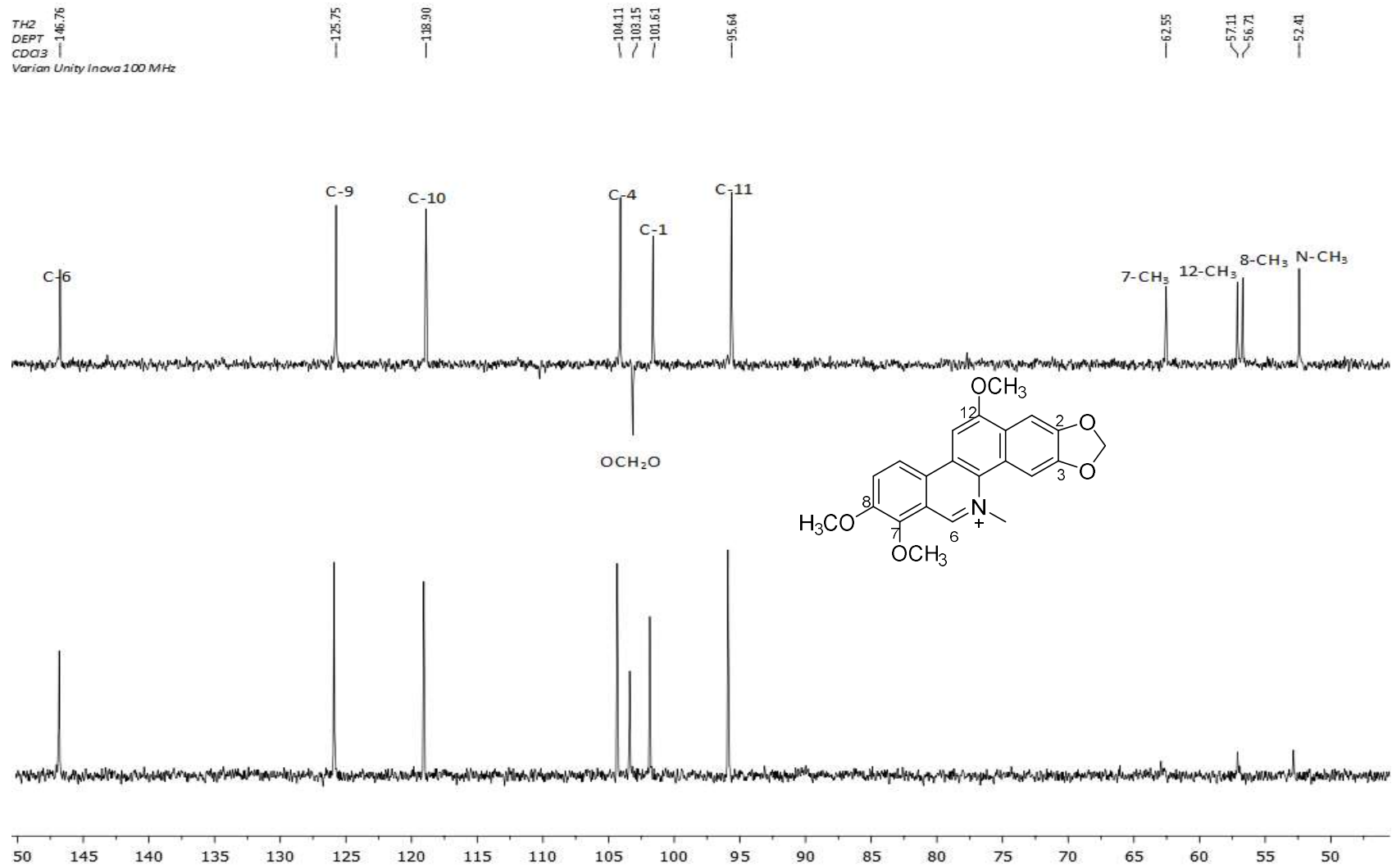


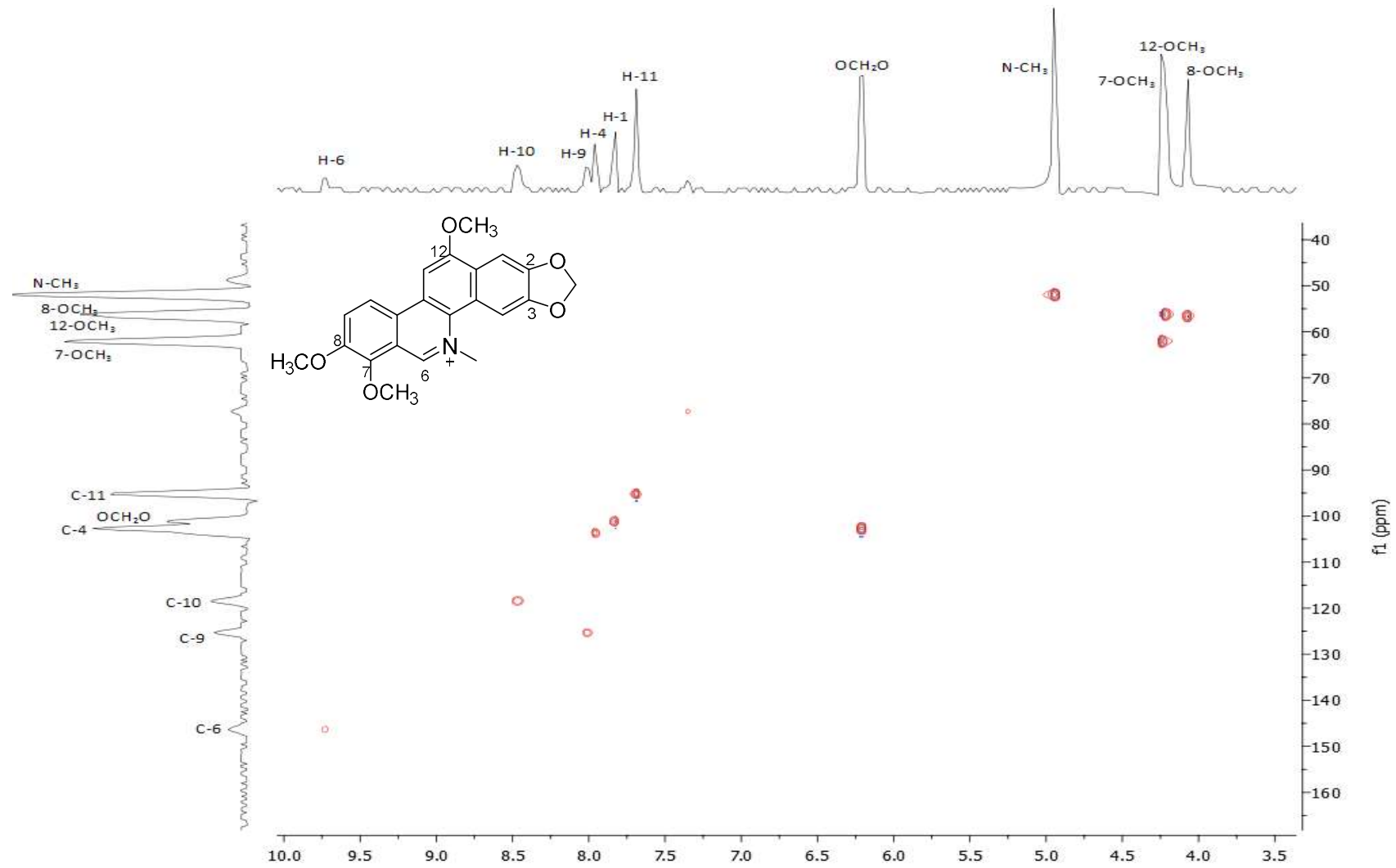
Espectro 21. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD) 12-metoxiqueleritina.

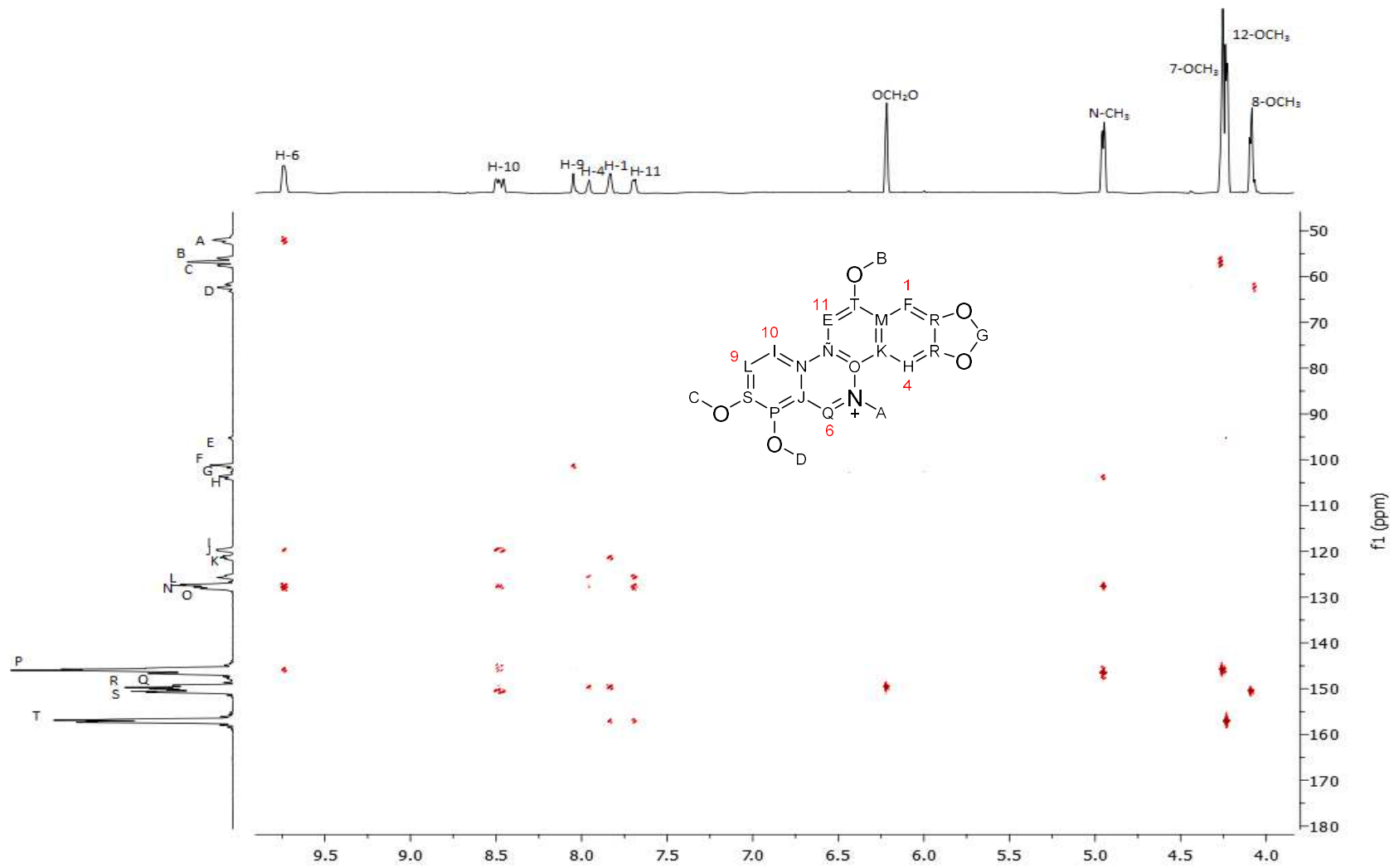
TH2  
 13C  
 CDCl3-CD3OD  
 Varian Unity Inova 100 MHz



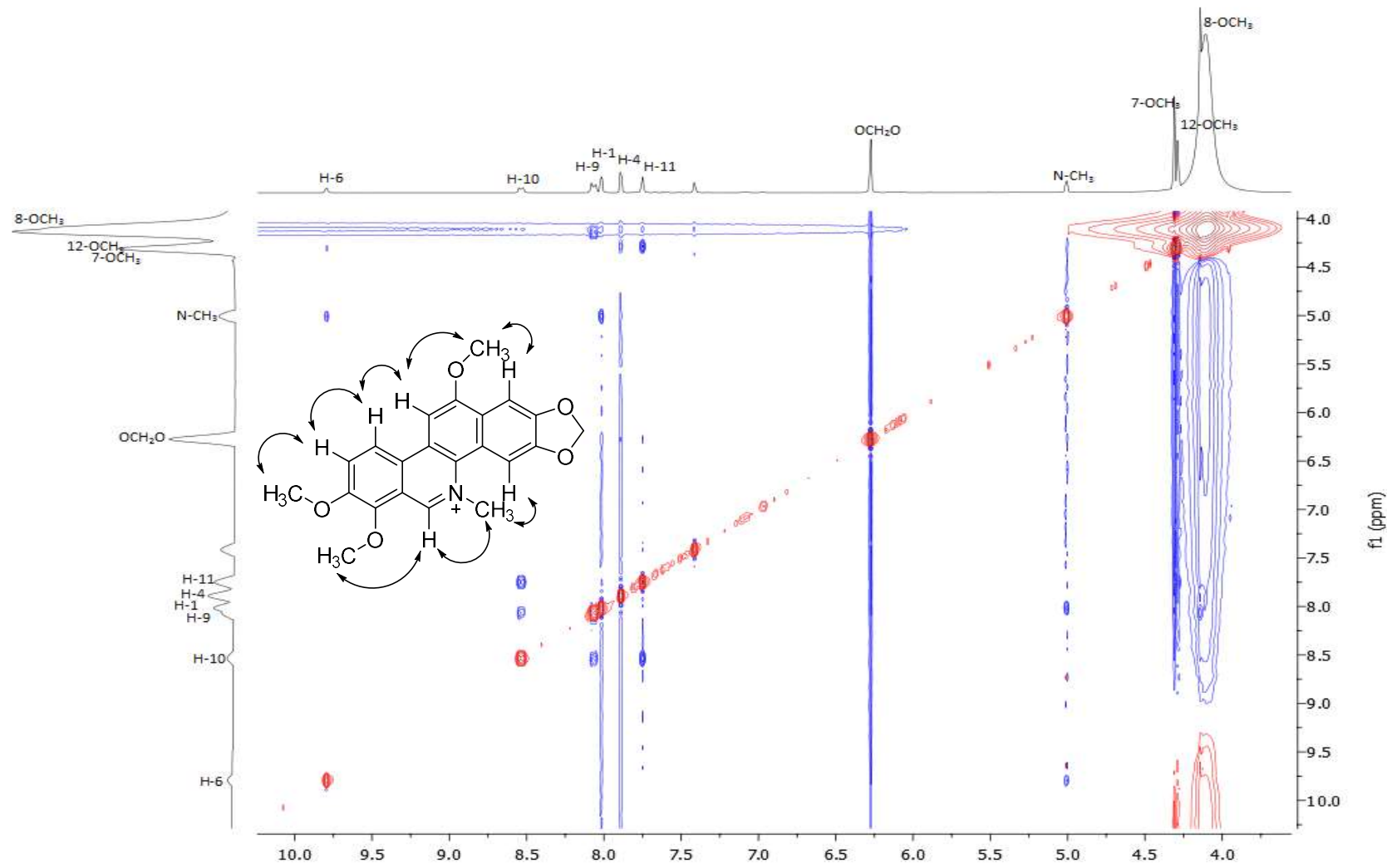
Espectro 22. RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>.CD<sub>3</sub>OD) 12-metoxiqueleritina.

Espectro 23. RMN DEPT (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD) 12-metoxiqueleritina.

Espectro 24. RMN HSQC (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD) 12-metoxiqueleritrina.



Espectro 25. RMN HMBC (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD) 12-metoxiqueleritina.

Espectro 26. RMN NOESY (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>.CD<sub>3</sub>OD) 12-metoxiqueleritina.