

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y DETERMINACIÓN  
DE LAS PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS DE LOS CONSTITUYENTES  
DE LOS FRUTOS DE *Acacia farnesiana***

**POR**

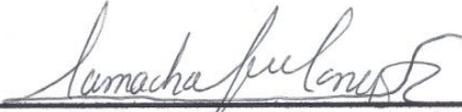
**QFB. ERIKA HERNÁNDEZ GARCÍA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAestrÍA  
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA**

**AGOSTO 2017**

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y DETERMINACIÓN  
DE LAS PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS DE LOS CONSTITUYENTES  
DE LOS FRUTOS DE *Acacia farnesiana***

**Aprobación de la tesis:**



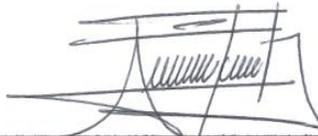
---

**Dra. María del Rayo Camacho Corona  
Presidente**



---

**Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas  
Secretario**



---

**Dr. Eugenio Hernández Fernández  
Vocal**



---

**Dra. Ma. Aracely Hernández Ramírez  
Subdirectora de estudios de posgrado**

Revisión y aprobación de la tesis:

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y DETERMINACIÓN  
DE LAS PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS DE LOS CONSTITUYENTES  
DE LOS FRUTOS DE *Acacia farnesiana***



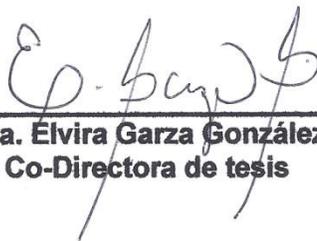
---

**Dra. María del Rayo Camacho Corona**  
Directora de tesis



---

**Dr. Edgar Abraham García Zepeda**  
Co-Director de tesis



---

**Dra. Elvira Garza González**  
Co-Directora de tesis



---

**Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas**  
Comité Tutorial



---

**Dr. Eugenio Hernández Fernández**  
Comité tutorial



---

**Dra. Patricia Cristina Esquivel Ferriño**  
Comité tutorial

## **DEDICATORIA**

**A Dios**

**A mis padres y familia**

## AGRADECIMIENTOS

**Dra. Ma. Del Rayo Camacho Corona**

Facultad de Ciencias Químicas UANL

Por el asesoramiento y el apoyo en la realización de este proyecto de investigación.

**Dr. Edgar Abraham García Zepeda**

Facultad de Ciencias Químicas UANL

Por el apoyo brindado en la derivatización de algunos productos naturales, en la elucidación estructural del éster de glicerol y en la asignación correcta de los metilos de los esteroides.

**Dra. Elvira Garza González**

Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González.

Por la infraestructura y el apoyo brindado en la realización de las pruebas antibacterianas de los compuestos obtenidos

Comité tutorial

**Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas**

**Dra. Patricia Cristina Esquivel Ferriño**

**Dr. Eugenio Hernández Fernández**

Facultad de Ciencias Químicas UANL

Por las observaciones y sugerencias realizadas en las reuniones tutoriales y seminarios departamentales.

**Dra. Claudia Delgadillo Puga**

Departamento de nutrición animal "Fernando Pérez-Gil Romo". Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

Por proporcionar la planta *A. farnesiana* para este proyecto

**Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo**

Departamento de Analítica, Facultad de Medicina UANL.

Por la realización de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear.

**Dr. José Rodríguez Rodríguez, Dra. Magdalena de Jesús Rostro Alanís**  
School of Engineering and Science, Tecnológico de Monterrey, Campus  
Monterrey.

Por su apoyo en la realización de Cromatografía de Gases y Cromatografía de gases acoplado a Masas.

**M.C. María Elena Heras Ramírez, Q.F.B. Víctor Manuel Alcántar Rosales.**  
Servicios analíticos del Centro de investigación y asistencia en tecnología y  
diseño del estado de Jalisco, A.C. Unidad Noreste.

Por haber realizado el análisis de HPLC-MS de los extractos metanólico y  
acuoso de *A. farnesiana*.

**Dr. Javier Vargas Villarreal**

Centro de Investigación Biomédica del Noreste

Por el apoyo en la realización de la citotoxicidad de los productos naturales.



**Facultad de Ciencias Químicas**  
**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**y**

**Laboratorio de Química de Productos Naturales**  
**División de Estudios de Posgrado en Ciencias**

Por la infraestructura y el apoyo brindado durante el presente proyecto de  
investigación.



Por la beca de manutención 585267 provista durante este proyecto

Quiero agradecer primeramente a Dios por darme la oportunidad de empezar y terminar este proyecto, porque en todo momento estuvo conmigo dándome apoyo, ánimo, fortaleza y solución cuando sentía que ya no podía más.

Gracias a mis papás por todo su amor, apoyo incondicional, por sus oraciones, por abrazarme en mis momentos débiles e infundirme ánimo aunque nos encontrábamos lejos, gracias por ser mi mayor ejemplo a seguir. A toda mi familia muchas gracias por todo su cariño y por siempre estar al pendiente de mí, los amo.

Dra. Rayito muchas gracias por haberme confiado este proyecto, por darme su dirección, compartirme sus conocimientos y siempre estar al pendiente de todo, gracias por tenerme paciencia y dejarme tomar decisiones que aunque no fueron todas las correctas me sirvieron como experiencia.

Dr. Abraham muchas gracias por su apoyo en la derivatización de algunos productos naturales, en la elucidación estructural del éster de glicerol, y en la asignación correcta de los metilos de los esteres y por todos sus comentarios y sugerencias realizadas en las reuniones tutoriales.

Dra. Elvira muchas gracias por todo el apoyo y sus sabios consejos durante las juntas, aprendí con usted que la comunicación es la base para tener mejores resultados, que todos podemos compartir nuestras experiencias y que se puede tener humor al mismo tiempo, muchas gracias por todo.

Dra. Lucy, Dr. Eugenio y Dra. Paty muchas gracias por compartirme sus conocimientos, por sus sugerencias que me hicieron reflexionar acerca de mis resultados y ver más allá de lo que tenía frente, fue muy grato y todo un honor el compartir con ustedes esta experiencia.

Dra. Magda y Dr. José muchas gracias por abrirme sus puertas para la obtención de resultados de CG y CG-EM.

A todos los integrantes del laboratorio de Gastroenterología Carlos Páez Castro por esterilizarnos el material, a María de la Luz Acevedo por enseñarme a trabajar con TB (todo un reto), Dra. Samantha Flores por siempre estar al pendiente del material que se necesitaba, Dra. Soraya Mendoza y Dra. Paola Bocanegra gracias por sus sabios consejos, a Laurita, Huguito, Florita y Verito muchas gracias por todo su apoyo en varias ocasiones muchas gracias, a Jessi, Adrián, Gregorio muchas gracias por apoyarme cuando se necesitó.

A mis amigos y compañeros de QPN, que hicieron sentirme en familia, Adri Romo y Karencita Chávez gracias por permitirme ser su amiga, por su apoyo incondicional, sus sabios consejos y por supuesto por enseñarme que no todo es trabajo y que hay una hora de veneno jajajaja las quiero muchísimo, las extrañaré mucho, Adri Pedraza gracias por ser mi compañerita de la materia de QPN, así no estuve tan solita jajaja, Memo no olvidaré que me dijiste que mis compuestos eran niñas jajaja que por eso no

se querían separar jaja, extrañaré molestarte y que Carito se me uniera jajaja y que Lalo mejor te dejara solo para no ser atacado, Lauris gracias por mostrarme ese lugar donde venden los mejores tacos y siempre ver las cosas con mucho optimismo, me diste una gran lección al ser tan risueña, me hiciste ver que a pesar de todo puedo sonreír, Reynita muchas gracias por escucharme ensayar mis presentaciones cuando se pudo, mimaaa (Deyita) pequeñuela muchas gracias por creer en mí y siempre decirme que podía hacerlo, sé que no eres mi mamá pero tuviste cierto efecto, muchas gracias ¡te quiero mil mima!, Fernando gracias por compartirme tus experiencias y permitirme apoyarte un poco en tu proyecto, a Alexia y Fernando muchas gracias por apoyarme una pequeña parte de mi proyecto, a Areli mi alumna oficial muchas gracias por todo tu esmero y apoyo en la última parte de mi proyecto, siempre recordaré tus sarcasmos y como te reías de mí, algún día haré revancha, jajaja te quiero mucho.

Agradezco a los nuevos amigos que formé en esta etapa, Magy mi roomie y amiga, sin querer llegamos al mismo lugar y de ahí creció una gran amistad, acompañándonos en las arduas horas de trabajo, dándonos ánimo diciendo que nosotras terminaríamos con la maestría y no ella con nosotros, te voy a extrañar sobre todo extrañaré molestarte con las cucarachas jajaja. Mabis te uniste a nosotras no cabe duda que eres un gran amigo y con un excelente humor, gracias por escucharme en mis momentos críticos y por tenerme confianza, gracias por defenderme de Magy y Tommy cuando me molestaban, Tommy el último en entrar en nuestro pequeño grupo eres una persona excepcional, con un gran corazón, extrañaré que me molestes en el laboratorio y tus travesuras por exceso de confianza (sabes a lo que me refiero, vaya que ese día morías de risa al ver mi reacción), con ustedes aprendí que no importa de dónde seamos y adonde vayamos siempre podemos contar con todos, los quiero muchísimo.

Dr. Alejandro muchas gracias por su apoyo y por sus sabios consejos, por formar parte de nuestro pequeño grupo muy trabajador y darnos en fin de semana un pequeño grupo familiar, se le aprecia mucho.

A mis amigos y compañeros de generación Cynthia, Eli, Felipe, Rodo y Jorge, que siempre batallamos para poder reunirnos un fin de semana, por diferentes cuestiones, muchas gracias por todo su apoyo y amistad los quiero mucho, aunque siempre me hacían bullying jajaja me la pasé genial con ustedes.

Por último, pero no menos importante quiero agradecer a la Dra. Elizabeth Orozco que siempre estuvo al pendiente de mi desde la facultad, sin duda un gran ser humano, con una calidez inigualable, muchas gracias por sus sabios consejos.

A todos mis profesores de la UANL, muchas gracias por brindarme de sus conocimientos.

A todos muchas gracias por formar parte de esta gran aventura, los llevaré en mi corazón y los recordaré con mucho cariño.

## RESUMEN

**QFB. Erika Hernández García**  
**Universidad Autónoma de Nuevo León**  
**Facultad de Ciencias Químicas**

**Fecha de graduación:**  
**Agosto 2017**

**Título de estudio: AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS DE LOS CONSTITUYENTES DE LOS FRUTOS DE *Acacia farnesiana***

Número de páginas: 145

**Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia.**

**Área de estudio: Farmacia**

### **Propósito y método de estudio:**

La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas que ha resaltado por causa de la fármacoresistencia es la provocada por *M. tuberculosis*. Actualmente la tuberculosis pulmonar es una de las 10 principales causas de mortalidad en el mundo. La OMS reportó que en el 2015 hubo 10.4 millones casos nuevos y 1.8 millones fallecieron por esta causa. También se estimó que en 2015 desarrollaron tuberculosis multifarmacoresistente (TB-MFR) unas 480 000 personas.

Por otra parte las enfermedades infecciosas gastrointestinales son la segunda causa de muerte de niños menores de cinco años a nivel mundial con una cifra de 760, 000 niños cada año. En todo el mundo cada año se producen unos 1,700 millones de casos de enfermedades diarreicas infecciosas y no infecciosas.

En la actualidad la farmacoresistencia es un gran problema, por lo que se busca el desarrollo de nuevos tratamientos más eficaces y seguros. Una de las alternativas es el uso de productos naturales, ya que son una fuente invaluable de agentes antimicrobianos. Es por ello que en el presente trabajo se planteó llevar a cabo un estudio fitoquímico de las vainas y semillas (frutos) de *A. farnesiana* debido a su uso en la medicina tradicional mexicana como agente antituberculoso y antidisentérico. Para ello se obtuvieron los extractos hexánico, clorofórmico, metanólico y acuoso de los frutos, los cuales fueron analizados por diferentes técnicas cromatográficas para aislar y purificar los fitocompuestos y su estructura química se elucidó por Resonancia Magnética Nuclear. Posteriormente los cuatro extractos y los compuestos aislados y caracterizados fueron evaluados frente a tres cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, una sensible (H37Rv) y dos multifarmacoresistentes (MFR G122 y G133), así como también contra cinco cepas bacterianas causantes de disentería: *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* enterohemorrágica y *Campylobacter jejuni*. A los compuestos más activos se les determinó la citotoxicidad con células Vero.

### **Conclusiones y contribuciones:**

De la mezcla del extracto hexánico y clorofórmico se aislaron el (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol, el tetracosanoato de (2S)-2,3-dihidroxipropilo y el  $\beta$ -D-glucopiranosido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5, 22- dien-3-ilo, los cuales no han sido reportados previamente en esta planta. Se caracterizaron por cromatografía de gases 19 ácidos grasos metilados de los dos extractos, de los cuales seis ya han sido reportados previamente en *A. farnesiana*: ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido araquídico, los 13 ácidos grasos restantes es la primera vez que se reportan en esta planta: ácido laurico, ácido pentadecanoico, ácido cis-10 pentadecenoico, ácido palmitoleico, ácido heptadecanoico, ácido cis-10 heptadecenoico, ácido linolelaídico, ácido

$\gamma$ -linolénico, ácido  $\alpha$ -linolénico, ácido cis-11-eicosenoico, ácido behénico, ácido cis-8,11,14-eicosatrienoico y ácido lignocérico. Los ácidos grasos más abundantes en ambos extractos son el ácido linoleico, el ácido oleico y el ácido palmítico, los cuales tienen actividad antimicobacteriana.

Del extracto metanólico se aisló y caracterizó el galato de metilo, el ácido gálico, el pinitol, 7-O- $\beta$ -glucopiranosido de (2S) naringenina, el  $\beta$ -D-glucopiranosido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5, 22- dien-3-ilo y sacarosa, de los cuales los últimos dos no han sido reportados en *A. farnesiana*. El análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas de los extractos metanólico y acuoso resultó en la caracterización de 15 compuestos en cada extracto. Del total de compuestos caracterizados, nueve ya han sido reportados previamente en *A. farnesiana*: ácido digálico, galato de metilo, galato de etilo, ácido elágico, naringina, kaempferol, naringenina, 7-O- $\beta$ -(4",6"-digaloil glucopiranosido) de naringenina y 7-O- $\beta$ -glucopiranosido de naringenina, los ocho compuestos restantes es la primera vez que se reportan en la planta objeto de estudio: ácido málico, ácido cumárico, digalato de metilo, eriodictiol, acacetina, criseriol, ácido cítrico y taxifolina.

Los extractos hexánico, clorofórmico, metanólico y acuoso mostraron actividad contra la cepa sensible y al menos una cepa MFR de *M. tuberculosis* con una CMI de 100-200  $\mu$ g/mL. El galato de metilo (CMI 50  $\mu$ g/mL) fue el único que presentó actividad frente a *M. tuberculosis* H37Rv. La flavanona 7-O- $\beta$ -glucopiranosido de (2S)-naringenina presentó actividad (CMI 50  $\mu$ g/mL) contra la cepa G122 siendo igualmente activa que el estándar positivo etambutol (CMI 50  $\mu$ g/mL) y no fue citotóxica (CI<sub>50</sub> 142.39  $\mu$ g/mL). El derivado galato metilo triacetilado presentó mejor actividad (CMI 25  $\mu$ g/mL) que el producto natural frente a las tres cepas de *M. tuberculosis*, por lo que es dos veces más activo que el etambutol (CMI 50  $\mu$ g/mL) frente a la cepa G122, sin embargo se incrementó su citotoxicidad (CI<sub>50</sub> 36.05  $\mu$ g/mL) contra células Vero comparado con el producto natural (IC<sub>50</sub> 187.5  $\mu$ g/mL).

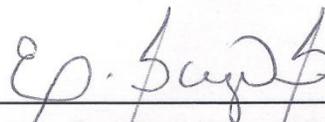
Los extractos metanólico y acuoso presentaron una CMI de 200  $\mu$ g/mL frente a *Y. enterocolitica*, *E. coli* enterohemorrágica, *S. enteritidis* y *S. flexneri*. Los extractos metanólico y acuoso presentaron actividad (CMI 100  $\mu$ g/mL) frente a *C. jejuni*. El galato de metilo, ácido gálico y 7-O- $\beta$  glucopiranosido de (2S)-naringenina fueron activos contra *C. jejuni* con un CMI 50  $\mu$ g/mL.



**DRA. MARÍA DEL RAYO CAMACHO CORONA**  
Directora de tesis



**DR. EDGAR ABRAHAM GARCÍA ZEPEDA**  
Co-director de tesis



**DRA. ELVIRA GARZA GONZÁLEZ**  
Co-directora de tesis

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Enfermedades infecciosas	1
1.1.1 Enfermedades infecciosas respiratorias: tuberculosis	2
1.1.1.1 Sintomatología y epidemiología	2
1.1.1.2 Tratamiento	3
1.1.2 Enfermedades infecciosas gastrointestinales	4
1.1.2.1 Sintomatología y epidemiología	6
1.1.2.2 Tratamiento	7
1.2 Investigación de nuevos tratamientos farmacológicos	7
2. ANTECEDENTES	10
2.1 Medicina tradicional	10
2.2 Género <i>Acacia</i>	11
2.2.1 <i>Acacia farnesiana</i>	12
2.3 Justificación	18
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
3.1 Hipótesis	19
3.2 Objetivos	19
3.3.1 Objetivo general	19
3.3.2 Objetivos específicos	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1. Estudio fitoquímico de los frutos de <i>A. farnesiana</i>	21
4.1.1 Material y equipo	21
4.1.2 Materia vegetal	22
4.1.3 Obtención de los extractos	22
4.2 Fraccionamiento del extracto hexánico y clorofórmico	25
4.2.1 Aislamiento y purificación de los compuestos del extracto hexánico- clorofórmico	27
4.2.1.1 Aislamiento y purificación de (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol (AF1)	27

4.2.1.2 Aislamiento y purificación de tetracosanoato de (2S)-2,3-dihidroxi-propilo (AF2)	27
4.2.1.3 Aislamiento y purificación del $\beta$ -D-Glucopiranosido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5,22- dien-3-ilo (AF3)	27
4.3 Análisis del extracto hexánico y clorofórmico por Cromatografía de gases (CG) y CG- acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM)	28
4.3.1 Metilación del extracto hexánico y clorofórmico	28
4.3.2 Análisis por CG y CG-EM	28
4.4 Fraccionamiento del extracto metanólico	30
4.4.1 Aislamiento y purificación de los compuestos del extracto metanólico.	31
4.4.1.1 Aislamiento y purificación del galato de metilo (AF4)	31
4.4.1.2 Aislamiento y purificación de galato de metilo (AF4) y ácido gálico (AF5)	31
4.4.1.3 Aislamiento y purificación de $\beta$ -D-Glucopiranosido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5,22- dien-3-ilo (AF8), ácido gálico (AF9) y 7-O- $\beta$ -D glucopiranosido de (2S)-naringenina (AF10)	32
4.4.1.4 Aislamiento y purificación de sacarosa (AF6) y pinitol (AF7)	33
4.5 Acetilación	34
4.5.1 Proceso de purificación de las reacciones de acetilación	35
4.6 Análisis del extracto metanólico y acuoso por Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas (CLAR-EM)	37
4.6.1 Material y equipo	37
4.7 Ensayos biológicos	38
4.7.1 Material y equipo	38
4.7.2 Actividad antimicobacteriana	39
4.7.2.1 Cepas y cultivo	39
4.7.2.2 Preparación del inóculo	40
4.7.2.3 Ensayo biológico	40
4.7.3 Actividad antibacteriana	42
4.7.3.1 Cepas y cultivo	42
4.7.3.2 Preparación del inóculo	43
4.7.3.3 Ensayo biológico	43
4.8 Actividad citotóxica.	44

4.8.1 Cultivo de células Vero.	44
4.8.2 Ensayo	45
4.8.3 Concentración inhibitoria media (CI50)	47
4.9 Disposición de residuos	47
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
5.1. Estudio fitoquímico	48
5.1.1 Elucidación estructural de compuestos del extracto hexánico-clorofórmico	49
5.1.1.1 Propiedades físicas y espectroscópicas de (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol (AF1)	49
5.1.1.1.1 Elucidación estructural de (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol (AF1)	50
5.1.1.2 Propiedades físicas y espectroscópicas de (3 $\beta$ , 22E)-acetilestigmasta-5,22-dieno (AF1Ac)	55
5.1.1.2.1 Elucidación estructural del (3 $\beta$ , 22E)-acetilestigmasta-5,22-dieno	56
5.1.1.2 Análisis de AF1Ac por CG-EM	61
5.1.1.4 Propiedades físicas y espectroscópicas del tetracosanoato de (2S)- 2,3-dihidroxiopilo (AF2)	63
5.1.1.4.1 Elucidación estructural de tetracosanoato de (2S)-2,3-dihidroxiopilo (AF2)	63
5.1.1.5 Propiedades físicas y espectroscópicas del $\beta$ -D-Glucopiranosido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5,22- dien-3-ilo (AF3)	67
5.1.1.5.1 Elucidación estructural de $\beta$ - D- Glucopiranosido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5, 22- dien-3-ilo (AF3)	68
5.1.1.6 Propiedades físicas y espectroscópicas del $\beta$ -D-tetraacetilglucopiranosido de (3 $\beta$ ,22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ilo (AF3Ac)	73
5.1.1.6.1 Elucidación estructural de $\beta$ -D-tetraacetilglucopiranosido de (3 $\beta$ ,22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ilo (AF3Ac)	74
5.1.2 Caracterización y elucidación estructural de compuestos del extracto metanólico	79
5.1.2.1 Propiedades físicas y espectroscópicas del galato de metilo (AF4)	79
5.1.2.1.1 Elucidación estructural de galato de metilo (AF4)	79
5.1.2.2 Propiedades físicas y espectroscópicas del galato de metilo triacetilado (AF4 Ac)	83

5.1.2.2.1 Elucidación estructural del galato de metilo triacetilado	83
5.1.2.3 Propiedades físicas y espectroscópicas del ácido gálico (AF5)	86
5.1.2.3.1 Elucidación estructural del ácido gálico (AF5)	86
5.1.2.4 Propiedades físicas y espectroscópicas de la sacarosa (AF6)	89
5.1.2.4.1 Elucidación estructural de sacarosa (AF6)	90
5.1.2.5 Propiedades físicas y espectroscópicas del pinitol (AF7)	93
5.1.2.5.1 Elucidación estructural de pinitol (AF7)	93
5.1.2.6 Propiedades físicas y espectroscópicas del 7-O-β-D-Glucopiranosido de (2S) naringenina (AF10)	97
5.1.2.6.1 Elucidación estructural de 7-O-β glucopiranosido de (2S)-naringenina (AF10)	98
5.2 Análisis del extracto hexánico y clorofórmico por Cromatografía de gases (CG) y CG acoplado a espectrometría de masas (CG-EM).	104
5.3 Análisis del extracto metanólico y acuoso por Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas (CLAR-EM)	107
5.4 Ensayos biológicos	111
5.4.1 Ensayo antimicobacteriano.	111
5.4.2 Ensayo antibacteriano	114
5.4.3 Citotoxicidad e índice de selectividad	121
6. CONCLUSIONES	124
7. PERSPECTIVAS	127
8. REFERENCIAS	128
APÉNDICE A	136
APÉNDICE B	143

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Arbusto, flores y fruto de <i>A. farnesiana</i>	13
2. Estructuras químicas de algunos compuestos aislados y caracterizados de los frutos de <i>A. farnesiana</i>	17
3. Diagrama de flujo del proceso de extracción	24
4. Reacción general de la acetilación	35
5. Reducción de Resazurina a Resorufina	40
6. Distribución de placa de 96 pocillos en ensayo antimicobacteriano	42
7. Distribución de placa de 96 pocillos en ensayo antibacteriano	44
8. (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol (AF1)	49
9. Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol (AF1)	52
10. Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol (AF1)	53
11. Expansión del espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol (AF1)	54
12. (3 $\beta$ , 22E)-acetilestigmasta-5,22-dieno (AF1Ac)	55
13. Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de (3 $\beta$ , 22E)-acetilestigmasta-5,22-dieno (AF1 Ac)	58
14. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de (3 $\beta$ , 22E)-acetilestigmasta-5,22-dieno (AF1 Ac)	59
15. Expansión del espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de (3 $\beta$ , 22E)-acetilestigmasta-5,22-dieno (AF1Ac)	60
16. Cromatograma de la muestra AF1Ac	61
17. Estructura química de los esteroides caracterizados por CG-EM de la muestra AF1Ac	62
18. Tetracosanoato de (2S)-2,3-dihidroxiopropilo (AF2)	63
19. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de Tetracosanoato de (2S)-2,3-dihidroxiopropilo (AF2)	65
20. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de Tetracosanoato de (2S)-2, 3-dihidroxiopropilo (AF2)	66

<b>21.</b> $\beta$ - D- Glucopiranosido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5, 22- dien-3-ilo (AF3)	67
<b>22.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) del $\beta$ - D- Glucopiranosido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5, 22- dien-3-ilo (AF3)	70
<b>23.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, DMSO- $d_6$ ) del $\beta$ - D- Glucopiranosido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5, 22- dien-3-ilo (AF3)	71
<b>24.</b> Expansi3n del espectro de de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, DMSO- $d_6$ ) del $\beta$ - D- Glucopiranosido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5, 22- dien-3-ilo (AF3)	72
<b>25.</b> $\beta$ -D-tetraacetilglucopiranosido de (3 $\beta$ ,22E)-estigmasta-5,22- dien-3-ilo (AF3Ac)	73
<b>26.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) del $\beta$ -D- tetraacetilglucopiranosido de (3 $\beta$ ,22E)-estigmasta-5,22- dien-3-ilo (AF3Ac)	76
<b>27.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) del $\beta$ -D- tetraacetilglucopiranosido de (3 $\beta$ ,22E)-estigmasta-5,22- dien-3-ilo	77
<b>28.</b> Expansi3n del espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CHCl}_3$ ) del $\beta$ - D-tetraacetilglucopiranosido de (3 $\beta$ ,22E)-estigmasta-5,22- dien-3-ilo	78
<b>29.</b> Galato de metilo (AF4)	79
<b>30.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, Acetona- $D_6$ ) del galato de metilo (AF4)	81
<b>31.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, Acetona- $d_6$ ) del galato de metilo (AF4)	82
<b>32.</b> Galato de metilo triacetilado (AF4 Ac)	83
<b>33.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) del galato de metilo triacetilado (AF4 Ac)	84
<b>34.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) del galato de metilo triacetilado (AF4 Ac)	85
<b>35.</b> 3cido g3lico (AF5)	86
<b>36.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, Acetona- $d_6$ ) de 3cido g3lico (AF5)	87
<b>37.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, Acetona- $d_6$ ) del 3cido g3lico (AF5)	88
<b>38.</b> Sacarosa (AF6)	89
<b>39.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de Sacarosa (AF6)	91
<b>40.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de Sacarosa (AF6)	92
<b>41.</b> Pinitol (AF7)	93

<b>42.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de Pinitol (AF7)	95
<b>43.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de Pinitol (AF7)	96
<b>44.</b> 7-O- $\beta$ -D- Glucopiranosido de (2S) naringenina (AF10)	97
<b>45.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) de 7-O- $\beta$ -D- Glucopiranosido de (2S) naringenina (AF10)	101
<b>46.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) de 7-O- $\beta$ -D- Glucopiranosido de (2S) naringenina (AF10)	102
<b>47.</b> Espectro de HMBC (400 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) de 7-O- $\beta$ -D- Glucopiranosido de (2S) naringenina (AF10)	103
<b>48.</b> Cromatograma obtenido del extracto metanólico y del extracto acuoso	110

## LISTA DE TABLAS

<b>Tablas</b>	<b>Página</b>
1. Mecanismo de acción de fármacos de primera línea	4
2. Mecanismo de acción de fármacos de segunda línea	4
3. Extractos y actividades biológicas de <i>A. farnesiana</i>	15
4. Compuestos aislados y caracterizados de <i>A. farnesiana</i>	16
5. Fracciones del extracto hexánico-clorofórmico	26
6. Condiciones de CG y CG-EM	29
7. Fracciones del extracto metanólico	30
8. Condiciones de reacción de acetilación	35
9. Propiedades de los compuestos acetilados	36
10. Condiciones de CLAR-EM	38
11. Datos espectroscópicos de (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol	51
12. Datos espectroscópicos de (3 $\beta$ , 22E)-acetilestigmasta-5,22-dieno	57
13. Resultados de CG-EM de la muestra AF1Ac	62
14. Datos espectroscópicos de $\beta$ -D-Glucopiranosido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5,22-dien-3-ilo (AF3).	69
15. Datos espectroscópicos de $\beta$ -D-tetraacetilglucopiranosido de (3 $\beta$ ,22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ilo (AF3Ac)	75
16. Datos espectroscópicos de Pinitol AF7	94
17. Datos espectroscópicos de 7-O- $\beta$ glucopiranosido de (2S) naringenina (AF10)	100
18. Resultados obtenidos por CG de los extractos hexánico y clorofórmico	105
19. Resultados obtenidos por CG-EM de los extractos hexánico y clorofórmico metilados	106
20. Resultados obtenidos por CLAR-EM del extracto metanólico	108
21. Resultados obtenidos por CLAR-EM del extracto acuoso	109
22. Actividad antimicobacteriana de extractos y compuestos de <i>A. farnesiana</i>	113
23. Actividad antibacteriana de extractos y compuestos de <i>A. farnesiana</i> .	116

<b>24.</b> Citotoxicidad e Índice de selectividad de los compuestos con actividad antimicobacteriana.	122
<b>25.</b> Citotoxicidad e Índice de Selectividad de los compuestos con actividad contra bacterias causantes de disentería	123

## ABREVIATURAS

<b>AcOEt</b>	<b>Acetato de etilo</b>
<b>ATCC</b>	<b>American Type Culture Collection</b>
<b>CC</b>	<b>Cromatografía en Columna</b>
<b>CCF</b>	<b>Cromatografía en Capa Fina</b>
<b>CG</b>	<b>Cromatografía de Gases</b>
<b>CG-EM</b>	<b>Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas</b>
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	<b>Cloroformo</b>
<b>CIATEJ</b>	<b>Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco</b>
<b>CLAR-EM</b>	<b>Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a Espectrometría de Masas</b>
<b>CMI</b>	<b>Concentración Mínima Inhibitoria</b>
<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>Dióxido de Carbono</b>
<b>DCM</b>	<b>Diclorometano</b>
<b>DEPT</b>	<b>Distortionless Enhancement by Polarization</b>
<b>DMSO</b>	<b>Dimetilsulfóxido</b>
<b>FE</b>	<b>Fase estacionaria</b>
<b>FM</b>	<b>Fase móvil</b>
<b>°C</b>	<b>Grados Celcius</b>
<b>g</b>	<b>Gramos</b>
<b>H</b>	<b>Hora</b>
<b>Hex</b>	<b>Hexano</b>
<b>HU</b>	<b>Hospital Universitario</b>
<b>Hz</b>	<b>Hertz</b>
<b>IMSS</b>	<b>Instituto Mexicano del Seguro Social</b>
<b><i>J</i></b>	<b>Constante de acoplamiento</b>
<b>Kg</b>	<b>Kilogramos</b>
<b>L</b>	<b>Litro</b>
<b>MeOH</b>	<b>Metanol</b>

<b>μL</b>	<b>Microlitro</b>
<b>Meq</b>	<b>Miliequivalente</b>
<b>mg</b>	<b>Miligramos</b>
<b>min</b>	<b>Minutos</b>
<b>mL</b>	<b>Mililitro</b>
<b>NaCl</b>	<b>Cloruro de sodio</b>
<b>NaOH</b>	<b>Hidróxido de sodio</b>
<b>OMS</b>	<b>Organización Mundial de la Salud</b>
<b>PABA</b>	<b>Ácido para aminobenzoico</b>
<b>pf</b>	<b>Punto de fusión</b>
<b>PM</b>	<b>Peso molecular</b>
<b>ppm</b>	<b>Partes por millón</b>
<b>%</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Rf</b>	<b>Factor de retención</b>
<b>RMN</b>	<b>Resonancia Magnética Nuclear</b>
<b>SSa</b>	<b>Secretaría de Salud</b>
<b>TB-MDR</b>	<b>Tuberculosis multidrogoresistente</b>
<b>UFC</b>	<b>Unidades Formadoras de Colonias</b>
<b>UNAM</b>	<b>Universidad Autónoma de México</b>
<b>UV</b>	<b>Ultravioleta</b>
<b>VIH</b>	<b>Virus de Inmundeficiencia Humana</b>

# **CAPÍTULO 1**

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Enfermedades infecciosas**

Las enfermedades se clasifican en dos tipos según su origen: infecciosas y no infecciosas.

Las enfermedades infecciosas son causadas por diversos microorganismos patógenos o patógenos oportunistas como bacterias, virus, hongos o parásitos y ocasionan un cuadro clínico con signos y síntomas que pueden ser específicos para cada agente causal. Estas enfermedades se pueden transmitir de forma directa o indirecta de una persona a otra (1).

Los microorganismos patógenos pueden afectar diferentes órganos o sistemas en un huésped, desarrollando infecciones de vías respiratorias altas y bajas, infecciones gastrointestinales, dermatológicas y renales.

Pese a los esfuerzos realizados en el desarrollo de nuevos tratamientos más eficaces y seguros, no se ha logrado erradicar las enfermedades infecciosas; por el contrario, se ha observado que hay un incremento en la farmacorresistencia, debido en parte a la falta de apego del paciente al tratamiento, el mal diagnóstico, la mutación de los microorganismos, entre otros factores. Lo anterior tiene como consecuencia las pocas opciones terapéuticas disponibles para el tratamiento de dichas enfermedades, lo que puede ocasionar la muerte.

### **1.1.1 Enfermedades infecciosas respiratorias: tuberculosis**

Hay muchos agentes bacterianos que afectan las vías respiratorias, por ejemplo *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, etc. Todos ellos tienen importancia clínica debido a que causan gran morbilidad y mortalidad.

Una de las enfermedades infecciosas que ha resaltado por causa de la fármacoresistencia es la provocada por *M. tuberculosis*, este es un bacilo Gram positivo, aeróbico estricto, inmóvil, no esporulado y ácido-alcohol resistente debido a su pared celular que contiene peptidoglicano y ácidos micólicos (2) lo que le brinda una apariencia cerosa, confiriéndole alta hidrofobicidad y con ello resistencia a detergentes y a la mayoría de los antibióticos. Esta característica también le proporciona afinidad por la tinción Ziehl Neelsen y no por las tinciones convencionales (3). Aunque este bacilo puede dañar varios órganos, afecta principalmente a los pulmones. Esta enfermedad es altamente contagiosa que se transmite de persona a persona a través del aire, cuando un enfermo de tuberculosis pulmonar expulsa los bacilos al toser, estornudar o escupir y estos son inhalados por un sujeto sano.

#### **1.1.1.1 Sintomatología y epidemiología**

La tuberculosis pulmonar activa se manifiesta principalmente con tos productiva, dolores torácicos, debilidad, pérdida de peso, fiebre y sudores nocturnos (4).

Se calcula que una tercera parte de la población mundial tiene tuberculosis latente, este término es aplicado a las personas infectadas por el bacilo pero que no tienen enfermedad activa y no pueden transmitir la infección. Actualmente la tuberculosis pulmonar es una de las 10 principales causas de mortalidad en el mundo. La OMS reportó que en el 2015 hubo 10.4 millones casos nuevos y 1.8 millones murieron por esta enfermedad (entre ellos, 0.4 millones de personas infectadas con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)). También se estimó que en 2015 desarrollaron tuberculosis multifarmacorresistente (TB-MFR) unas 480 000 personas. Más del 95% de las muertes por tuberculosis se producen en países de ingresos bajos y medianos (4).

En México la Secretaría de Salud reportó que en el 2015 se presentaron 16,462 casos nuevos a nivel nacional, teniendo más de mil reportes los estados de Veracruz, Baja California, Guerrero, Nuevo León y Chiapas. En el 2014 se presentaron 1733 defunciones (5).

#### **1.1.1.2 Tratamiento**

Cuando un paciente con tuberculosis no ha recibido tratamiento, se maneja inicialmente con fármacos denominados de primera línea, los cuales incluyen la isoniazida, rifampicina, pirazinamida y estreptomina quienes presentan actividad bactericida y el etambutol tiene actividad bacteriostática (Tabla 1) (6).

Cuando hay falla en la terapia, se maneja la terapia de segunda línea la cual incluye a las quinolonas, capreomicina, protionamida, etionamida, kanamicina y

rifabutina que tienen actividad bactericida, y el ácido *para*-aminosalicílico, cicloserina, clofasimina y macrólidos que presentan actividad bacteriostática. (Tabla 2) (6).

**Tabla 1.** Mecanismo de acción de fármacos de primera línea

<b>Fármaco</b>	<b>Mecanismo de acción</b>
Isoniazida	Inhíbe la síntesis de ácidos micólicos de la pared celular a través de vías dependientes de oxígeno.
Rifampicina	Inhíbe al ácido ribonucleico (ARN) polimerasa dependiente de ácido desoxirribonucleico (ADN) de la micobacteria para formar un complejo enzima-fármaco estable que suprime el comienzo de la formación en cadena en la síntesis de ARN.
Pirazinamida	Disminución de los niveles óptimos de pH celular, inhibiendo así la ácido graso sintasa y el transporte de membrana
Estreptomina	Inhibición de la síntesis de proteínas uniéndose a un sitio activo de rRNA 16S en la subunidad ribosomal 30s.
Etambutol	Inhibición de la síntesis de arabinogalactanos y arabinomananos

**Tabla 2.** Mecanismo de acción de fármacos de segunda línea

<b>Fármaco</b>	<b>Mecanismo de acción</b>
Ciprofloxacina	Inhíbe la topoisomerasa bacteriana IV y la DNA girasa, enzimas que son requeridas para la transcripción, reparación y recombinación.
Capreomicina Kanamicina	Interfiere en la síntesis de proteínas bacterianas al unirse a la subunidad 30S de los ribosomas.
Etionamida	No ha sido descrito con exactitud su mecanismo, pero se ha comprobado que inhibe la síntesis de péptidos.
Ácido <i>para</i> -aminosalicílico	Es un antagonista del ácido <i>para</i> aminobenzóico (PABA) e impide la utilización de este compuesto para la síntesis de ácido fólico. .
Cicloserina	Inhíbe la síntesis de pared celular.

### 1.1.2 Enfermedades infecciosas gastrointestinales

Las enfermedades gastrointestinales se transmiten ya sea por vía fecal-oral o por consumo de alimentos y/o agua contaminados. Los cuadros gastrointestinales pueden presentarse en cualquier época del año, pero el

riesgo de sufrir estas enfermedades se incrementa en la temporada de calor. Las manifestaciones clínicas más destacadas de la gastroenteritis son: fiebre, vómito, dolor abdominal, y diarrea moderada o intensa (7).

Se define como diarrea la deposición de tres o más veces al día (o con una frecuencia mayor a la normal para la persona) de heces sueltas o líquidas. Las causas pueden ser muy variadas, la gran mayoría tienen su origen en un proceso infeccioso por bacterias, virus o parásitos.

La población en mayor riesgo son los niños menores de 5 años, los adultos de la tercera edad, las mujeres embarazadas, las personas inmunodeprimidas y/o con enfermedades crónicas (8, 9).

Hay tres tipos clínicos de enfermedades diarréicas (9):

- La diarrea acuosa aguda, que dura varias horas o días, y comprende el cólera.
- La diarrea con sangre aguda, también llamada diarrea disentérica o disentería.
- La diarrea persistente, que dura 14 días o más.

La disentería es una enfermedad intestinal contagiosa que se transmite de forma directa y que se registra sobre todo en las estaciones de verano y otoño; es muy común en los países en vías de desarrollo que presentan condiciones de higiene insuficientes, lo cual contamina con facilidad el agua y los alimentos. Esta enfermedad se caracteriza por abdominalgia, tenesmo y diarreas

frecuentes e intensas que están acompañadas con sangre, moco y pus que de no ser tratada a tiempo puede tener un desenlace fatal (10).

La disentería puede ser provocada por varios factores, la causa más común son las bacterias y amebas. Las bacterias que causan disentería bacteriana son: *Escherichia coli* enteroinvasiva, *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Clostridium difficile*, *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* y *Shigella* en sus cuatro especies: *boydii*, *flexneri*, *soneii* y *dysenteriae* (11). Estos microorganismos causan un daño invasivo directo a la mucosa (diarrea inflamatoria) del colon o porción distal del intestino delgado (12–14). Entre los protozoos que también causan disentería podemos encontrar la *E. histolytica* y *Balantidium coli*.

Generalmente la disentería causada por bacterias del género de *Shigella* se le conoce como disentería bacilar y la causada por la ameba *Entamoeba histolytica* es conocida como disentería amebiana.

### **1.1.2.1 Sintomatología y epidemiología**

Las enfermedades diarréicas agudas son prevenibles y curables, sin embargo fueron la octava causa de muerte a nivel mundial en el 2015 (1.4 millones de casos) (15), en el 2016 fueron la segunda causa de muerte en niños menores de cinco años a nivel mundial con una cifra de 525, 000 niños cada año. En todo el mundo cada año se producen unos 1,700 millones de casos de enfermedades diarréicas infecciosas y no infecciosas (9).

En México las enfermedades infecciosas gastrointestinales incluyendo la disentería en el 2015 provocaron 3754 muertes (16). En el 2010 ocuparon el 5° sitio como causa de muerte en los niños de 1 a 4 años de edad (266 muertes con tasa de 3.5 por 100,000 nacimientos estimados) (17).

Aunque no se muestran datos específicos de la incidencia de cada una de las causas de la diarrea, la campilobacteriosis es una de las cuatro principales causas mundiales de enfermedad diarreica y está considerada como la causa bacteriana más frecuente de gastroenteritis en el mundo (18).

### **1.1.2.2 Tratamiento**

El tratamiento de la disentería es establecido según el cuadro clínico que se presente. Por lo general el tratamiento es empírico, debido a que los estudios de laboratorio microbiológico del agente patógeno sospechoso tardan para confirmarse. Principalmente se administran electrolitos orales para evitar la deshidratación por la pérdida excesiva de líquidos y electrolitos, se dosifican los antibióticos como trimetoprima con sulfametoxazol, vancomicina, eritromicina, ciprofloxacino para disentería bacilar y en caso de no lograr una mejoría se procede a dar tratamiento contra la amebiasis (metronidazol). Algunas veces se administran en conjunto para tener una respuesta más rápida, esto depende de la severidad del caso (19, 20).

## **1.2 Investigación de nuevos tratamientos farmacológicos**

Por otra parte, diferentes organizaciones han realizado investigaciones para un mejor diagnóstico y tratamiento, entre ellos ha destacado la investigación con

productos naturales de origen animal, vegetal, mineral y biotecnológico. Debido a que han sido una de las fuentes principales de los fármacos actuales. De ellos ha resaltado el uso de las plantas medicinales por nuestros antepasados, desarrollando un conocimiento empírico, el cual fue transmitido de generación en generación, a lo que en la actualidad se le conoce como etnomedicina o medicina tradicional.

Existen varios criterios para iniciar una investigación con plantas medicinales, ya sea por el uso etnomédico, quimiotaxonómico, ecológico y/o al azar (21), para posteriormente mostrar su actividad *in vitro* o *in vivo* de un extracto crudo y/o compuestos aislados y caracterizados.

Si bien es cierto que las plantas tienen un gran potencial en propiedades curativas, algunas de ellas pueden llegar a ser tóxicas dependiendo de la dosis administrada y/o de los tipos de metabolitos secundarios presentes (22), es por ello que al realizar una investigación en este campo se deben de tomar en cuenta diversos factores en el tiempo de la recolección como lo es el clima, la estación del año, el grado de madurez de la planta o fruto, entre otros, puesto que estos factores influyen mucho en el metabolismo de la planta, de ahí la importancia de la caracterización correcta de los fitocompuestos a través de técnicas analíticas como lo es la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Espectrometría de Masas, infrarrojo, Cromatografía de gases, rotación óptica, entre otras; otro punto muy importante es la evaluación de la citotoxicidad de un compuesto que muestra actividad biológica.

Las técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en una y dos dimensiones nos ayudan a establecer la estructura de una molécula con mucha precisión, sin embargo cuando una molécula presenta centros quirales es necesario saber la rotación óptica, ya que a través de ella podemos saber si se presenta una mezcla racémica o predomina un enantiómero, es de suma importancia identificar el enantiómero presente, debido a que dichos enantiómeros puede presentar actividad biológica diferente o inclusive uno de ellos puede no presentar dicha actividad farmacológica, como es el caso del D-timolol y L-timolol el enantiómero *R* incrementa el flujo sanguíneo coroidal y retiniano, mientras que el enantiómero *S* produce el efecto contrario (23).

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas, desembocando en un daño que puede ser detectado a partir de diferentes pruebas *in vitro*. Para poder predecir efectos tóxicos de diferentes tipos de compuestos químicos naturales o sintéticos se utilizan modelos experimentales como líneas celulares, cultivos primarios y cultivo de órganos aislados, estos ensayos se basan en diversas funciones celulares como la actividad enzimática, la permeabilidad de la membrana celular, adherencia celular, producción de ATP y co-enzimas. Ejemplos de estos ensayos son ensayo de captación de rojo neutro, ensayo con sulforrodamina, ensayo con azul de tripano, el ensayo de reducción de bromuro de 3-(4,5 dimetil-2-tiazol)-difeniltetrazólico (MTT) y la prueba con la sal de tetrazolio (4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno) (WST-1) (24).

## CAPÍTULO 2

### 2. ANTECEDENTES

#### 2.1 Medicina tradicional

Como se ha mencionado anteriormente la fármacoresistencia ha dado lugar a la investigación de nuevos antibióticos más eficaces y con menos efectos adversos, recurriendo a diferentes medios como lo es la medicina tradicional. Por ejemplo, de *Larrea tridentata* (Zygophyllaceae) se han aislado y caracterizado estructuralmente algunos lignanos y flavonoides que mostraron actividad antibacteriana y antituberculosa contra *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* y *M. tuberculosis*, respectivamente (25). Otro ejemplo con actividad antibacteriana y contra la disentería es el flavonoide 2-(3,5-dihidroxi-4-metoxi-fenil)-3,5-dihidroxi-8,8-dimetil-2,3-dihidro-8H-pirano (3,2)cromen-4-ona aislado de la corteza de *Commiphora pedunculata*, (Burseraceae) que actúa contra el Enterococo resistente a la vancomicina (VRE), *E. coli*, *S. aureus*, *Candida albicans*, *S. dysenteriae*, *Bacillus cereus* y *P. aeruginosa* (26). También se estudió la actividad de los terpenos aislados de la *Salvia gesneriflora* (Lamiaceae), donde se mostró la actividad antidiarréica provocada por *E. histolytica* y *Giardia lamblia* (27). En otro estudio realizado para comprobar el uso etnomédico de *Crataegus mexicana* (Rosaceae), *Hyptis albida* (Lamiaceae), *L. tridentata*, *Ocimum basilicum* (Lamiaceae), *Prunus serotina* (Rosaceae), y *Smilax* spp (Smilacaceae) empleadas en México contra las enfermedades respiratorias y diarréicas, se realizaron extracciones con

disolventes orgánicos y agua de las plantas antes mencionadas. Los resultados indicaron que los extractos de *H. albida*, *Smilax* spp, y *C. mexicana* mostraron actividad contra *S. aureus* resistente a la meticilina, *S. aureus* y *E. faecalis*; mientras que *C. mexicana*, *H. albida*, *O. basilicum* y *L. tridentata* tienen actividad anti protozoaria contra *E. histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, y *G. lamblia* (28).

## 2.2 Género *Acacia*

El género de *Acacia* fue descrito por primera vez por Philip Miller en 1754, se estima que hay aproximadamente 1380 especies de este género alrededor del mundo, aproximadamente dos tercios de ellos son nativos de Australia, y el resto provienen de regiones tropicales y subtropicales del mundo (29).

Los usos medicinales tradicionales varían dependiendo de la región en la que se encuentre, dándole usos como antiparasitario, antimalárico, antiinflamatorio, antihemorrágico, antidiarréico, antidisentérico y como agente antiséptico entre otros.

Se han realizado diversos estudios tratando de justificar el uso etnomédico de *Acacia*, uno de ellos es el realizado por Saini y colaboradores haciendo una evaluación antimicrobiana de los extractos hexánico y metanólico de *Acacia nilotica* y *Acacia catechu*, contra *Salmonella typhi*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *Aspergillus niger*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* y *Microsporum canis*, observando que fueron muy activas contra *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhi*, *C.*

*albicans* y *A. niger*. También encontraron que la corteza y vainas de las dos especies contienen alcaloides, taninos, flavonoides y saponinas (30).

Cock y colaboradores en el 2012 determinaron la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *Acacia aulacocarpa* y *Acacia complanta*, empleando hojas y flores, *A. aulacocarpa* fue activa contra *Aeromonas hydrophilia*, *Alcaligenes faecalis*, *P. fluorescens*, *Y. enterocolitica*, *B. cereus*, *S. aureus* y *A. complanta* fue activa contra *A. niger* y *B. subtilis* (31).

### **2.2.1 *Acacia farnesiana***

*A. farnesiana* es una planta conocida comúnmente como huizache, pertenece a la familia Fabaceae, es un arbusto o árbol muy ramificado de tallos lisos con muchas espinas blancas o blanquecinas. Sus hojas son pequeñas en forma plumosa, tiene flores como motitas amarillas muy aromáticas y sus frutos son vainas con semillas numerosas en forma de riñón de color pardo-amarillo (32). (Figura 1).

Es originaria de los trópicos y subtrópicos de América. Crece en climas cálidos, semicálidos y templados. Por lo general se desarrolla en la orilla de caminos y arroyos. En México se localiza en la mayoría de los estados excepto Estado de México y Ciudad de México (33).



**Figura 1.** Arbusto, flores y fruto de *A. farnesiana*.

En la medicina tradicional mexicana se usa para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca ejerciendo un efecto inotrópico y cronotrópico positivos, tifoidea, esplenomegalia, catarro, inflamación de la garganta, dolor de cabeza, y contra la diarrea. Algunas partes de este arbusto se utilizan para un padecimiento en particular por ejemplo: las raíces se emplean para tratar el empacho y la hemorragia vaginal; la corteza se ocupa para remediar los dolores de estómago constantes, para estimular el apetito y parar la hemorragia nasal; la resina la utilizan como antitusígeno; las flores se usan para la disentería,

dispepsia e inflamaciones de la piel y mucosas; las semillas se ocupan para curar el herpes bucal, para fortalecer la dentadura, tratamiento contra la disentería, como antiespasmódico, antituberculoso y astringente (32).

De este arbusto se han realizado varios estudios farmacológicos para validar algunos de los usos etnomédicos, realizando extracciones con diferentes disolventes como agua, metanol, etanol y éter de petróleo utilizando las hojas, semillas, vainas, flores y tallos, donde se determinó su actividad como antidiarréico, antibacteriano, antioxidante e hipoglucémico [34-43] (Tabla 3).

También se han aislado y caracterizado diferentes tipos de compuestos como flavonoides, compuestos fenólicos, terpenos, esteroides, polialcoholes y proteínas; a algunos de estos compuestos se les ha determinado su actividad biológica [44-60] (Tabla 4, Figura 2).

**Tabla 3.** Extractos y actividades biológicas de *A. farnesiana*

<b>Parte usada</b>	<b>Disolventes para la extracción</b>	<b>Actividad biológica</b>	<b>Bacterias ensayadas</b>	<b>Referencias</b>
Hojas y tallos	Agua Etanol	Antidiarréico	-	(34)
Semillas	Agua destilada NaCl 5% Etanol 70 % NaOH 0.2 %	Antioxidante	-	(35)
Corteza	Metanol	Antibacteriano	<i>C jejuni</i> <i>Campylobacter coli</i>	(36)
Corteza	Metanol	Antidiarréico Antimicrobiano	-	(37)
Corteza	Metanol Etanol Agua	Antibacteriano	<i>V. cholerae</i>	(38)
Vaina	Etanol	Hipoglucémico Antibacteriano	<i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Sarcina lutea</i> <i>E. coli</i>	(39)(40)
Flores	Éter de petróleo	ND	-	(41)
-	Agua	Hipoglucémico	-	(42)
Tallo Raíz	Etanol	Antiinflamatorio Antibacteriano Antioxidante	<i>S. aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	(43)

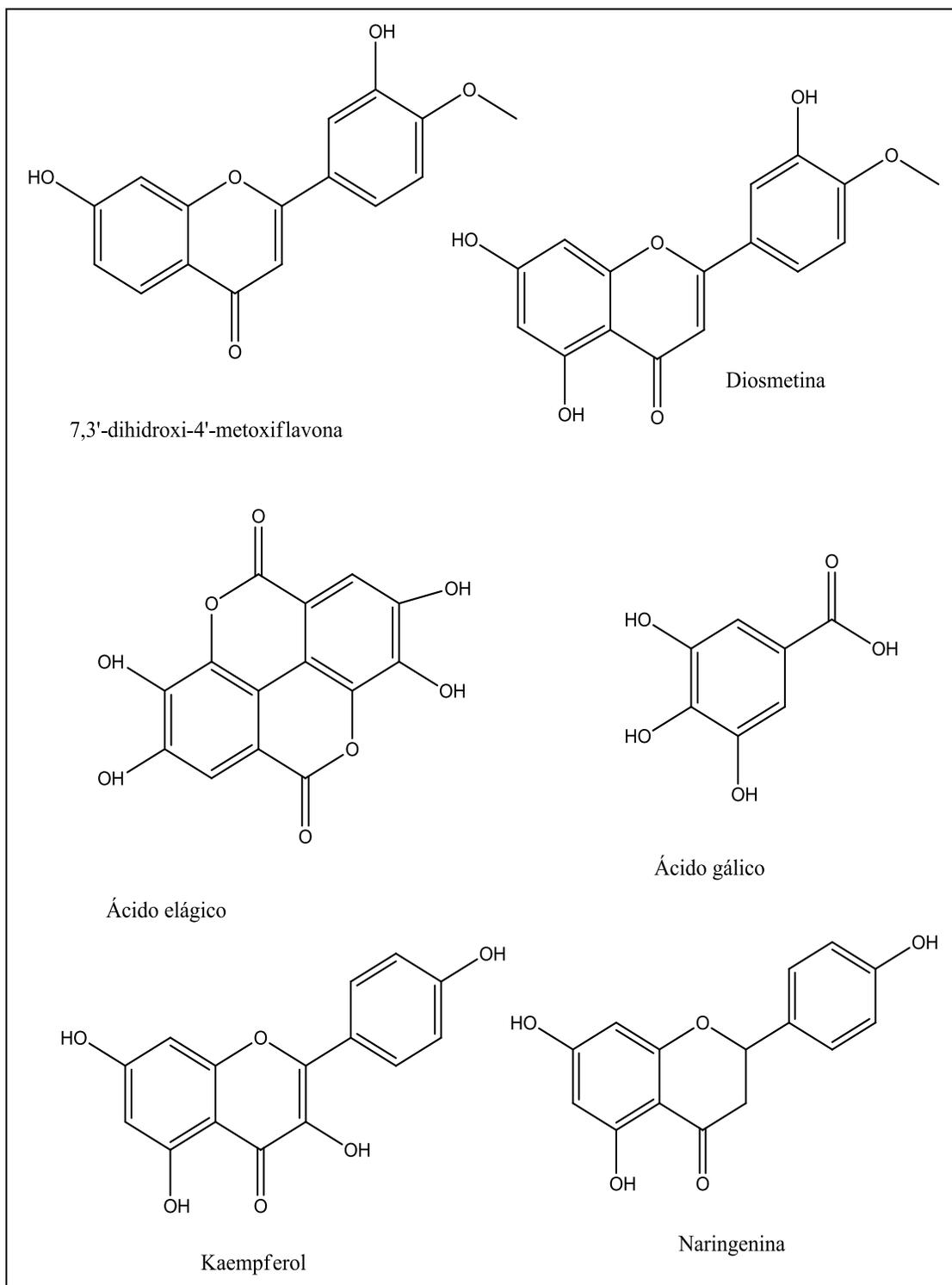
ND: No determinada

(-) No reportado.

**Tabla 4. Compuestos aislados y caracterizados de *A. farnesiana***

Nombre del compuesto	Tipo de compuesto	Actividad biológica	Bacterias o línea celular ensayada	Referencia
7-O-β-6"-Galoilglucopiranosido de 3',7-dihidroxi-4'-metoxiflavona	Flavonoide	ND		(44)*
7-O-β-6"-Galoilglucopiranosido de quercetina	Flavonoide	ND		(45)*
7-O-β-6"-Galoilglucopiranosido de miricetina	Flavonoide	ND		
7-O-β-4",6"-Digaloilglucopiranosido de naringenina	Flavonoide	ND		
7-6"-Galoilglucopiranosido de kaempferol	Flavonoide	ND		
7-6"-Galoilglucopiranosido de naringenina	Flavonoide	ND		
7,3'-Dihidroxi-4'-metoxiflavona	Flavonoide	ND		(46)**
4'-metoxiluteolina	Flavonoide	ND		
7-O-β-D-Glucopiranosido de kaempferol	Flavonoide	ND		(46, 47)*a
7-O-β-D-6"-Galoilglucopiranosido de kaempferol	Flavonoide	ND		(47)*
7-O-β-D-6"-Galoilglucopiranosido de naringenina	Flavonoide	ND		(49)*
Kaempferol	Flavonoide	ND		(48)*a
Aromadendrina	Flavonoide	ND		
Naringenina	Flavonoide	ND		
Naringina	Flavonoide	ND		
7-O-β-glucoipiranosido de naringenina	Flavonoide	ND		
6,8-Bis-C-β-D-glucoipiranosido de apigenina	Flavonoide	ND		(50)
3-O-glucoipiranosil-7-O-β-ramnósido de isoramnetina	Flavonoide	ND		(51)
Ácido gálico	Fenólico	ND		(48)*
Ácido elágico	Fenólico	ND		
<i>m</i> -Ácido digálico	Fenólico	ND		
Galato de metilo	Fenólico	ND		
Galato de metilo	Fenólico	Antibacteriano	<i>V. cholerae</i>	(52)
Galato de etilo	Fenólico	ND		(53)*
Galato de metilo	Fenólico	ND		
Ácido gálico	Fenólico	ND		
<i>m</i> -Ácido digálico	Fenólico	ND		
Ácido elágico	Fenólico	ND		
Acasiano A y B	Diterpeno	Citotóxico	Células cancerígenas humanas de mama MCF-7 y MDA-MB-231	(54)
Farnesirano A y B	Diterpeno		Células cancerígenas humanas de hígado HepG2 y Hep3B	
Lupeol	Triterpeno		Células cancerígenas humanas de pulmón A549	
Ácido betulínico	Triterpeno		Células cancerígenas humanas orales Ca9-22	
Farnesiasida	Diterpeno	ND		(55)**
β-Sitosterol	Esterol	ND		(56), (57)
Pinitol	Polialcohol	ND		(58)
AFAL (Proteína de tipo lectina)	Proteína	Antiinflamatorio		(59)*
Ácido <i>N</i> -Acetil- <i>L</i> -djenkólico	Aminoácido	ND		(60)*

ND: No determinada. a: no se caracterizó por RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C. \*Estudios realizados en semillas \*\* Estudios realizados en vainas



**Figura 2.** Estructuras químicas de algunos compuestos aislados y caracterizados de los frutos de *A. farnesiana*

### 2.3 Justificación

En el presente proyecto se busca aportar nuevas formas de tratamiento para afrontar la problemática de la fármacoresistencia, es por ello que la investigación se enfoca hacia los frutos de *A. farnesiana*, los cuales son empleados en la Medicina Tradicional Mexicana para el tratamiento de la disentería y la tuberculosis. En la literatura se reporta el aislamiento y caracterización de varios fitocompuestos; sin embargo, no se han determinado sus efectos sobre estas enfermedades, por lo que se pretendió en este estudio encontrar los compuestos responsables de las actividades atribuidas a las semillas de esta planta, justificando científicamente su uso etnomédico.

## **CAPÍTULO 3**

### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1 Hipótesis**

Algunos compuestos aislados y caracterizados de los frutos de *A. farnesiana* tienen propiedades antibacterianas.

#### **3.2 Objetivos**

##### **3.3.1 Objetivo general**

Aislar y caracterizar estructuralmente los compuestos de los frutos de *A. farnesiana* y determinar sus propiedades antibacterianas.

### 3.3.2 Objetivos específicos

1. Obtener los extractos hexánico, clorofórmico, metanólico y acuoso de los frutos de *A. farnesiana*
2. Aislar, purificar y caracterizar los compuestos de los extractos hexánico y clorofórmico
3. Caracterizar los componentes del extracto hexánico y clorofórmico por Cromatografía de Gases (CG) y CG acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM)
4. Aislar, purificar y caracterizar los compuestos del extracto metanólico
5. Caracterizar los compuestos del extracto metanólico y acuoso por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplado a Espectrometría de Masas (CLAR-EM)
6. Determinar la actividad antibacteriana de los compuestos aislados y caracterizados.
7. Determinar la citotoxicidad de los compuestos que presentaron actividad antibacteriana.

## CAPÍTULO 4

### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1. Estudio fitoquímico de los frutos de *A. farnesiana*

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

##### 4.1.1 Material y equipo

Para la realización de cromatografías en columna se utilizaron como fase estacionaria: gel de sílice ( $\text{SiO}_2$ ) marca EMD chemicals Inc. con un tamaño de partícula 0.040-0.063 mm y Sephadex LH-20 de Sigma Aldrich de tamaño de partícula 25-100 micras. Los disolventes empleados como fase móvil fueron hexano (Hex), cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ), acetato de etilo (AcOEt), acetona y metanol (MeOH) grado reactivo marca Baker y diclorometano (DCM) grado reactivo marca Macron Chemicals.

Para la realización de cromatografía en capa fina se utilizaron cromatofolios de gel de sílice 60 F254 de 20 x 20 cm sobre aluminio con un grosor de 0.2 mm marca Merck KGA. Como reveladores se usaron lámpara de UV marca Spectroline ( $\lambda$  254nm y 365 nm), solución de sulfato cérico amoniacal en ácido sulfúrico y solución de vainillina en ácido sulfúrico. La determinación del punto de fusión se realizó en aparato Fischer-Johns. La elucidación estructural de los compuestos aislados se realizó por Resonancia Magnética Nuclear de

hidrógeno y de carbono trece (RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$ ) en el equipo de BRUKER NMR400 de 400 MHz utilizando disolventes deuterados y como referencia interna tetrametilsilano (TMS).

#### **4.1.2 Materia vegetal**

En este proyecto se usaron vainas con semillas de *A. farnesiana* las cuales fueron recolectadas manualmente, secadas bajo sombra. Una vez secos los frutos fueron molidos con un molino de cuchillas y pasados por una criba de 2 mm, por lo que el material tiene una característica harinosa.

El lugar de colecta fue en el Rancho Guadalupe, ubicado en el municipio de Acatlán de Osorio, localizado al sur sureste del estado de Puebla, entre los paralelos  $18^\circ 04' 24''$   $18^\circ 21' 30''$  de latitud Norte y los meridianos  $97^\circ 55' 18''$  y  $98^\circ 11' 24''$  de longitud Oeste. Una muestra de referencia se localiza en el Herbario de FES-Cuautitlán Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) con número de Voucher: 8757.

#### **4.1.3 Obtención de los extractos**

Se obtuvieron cuatro extractos mediante maceración secuencial para lo cual se empleó 1.5 kg de las vainas con semillas secas y molidas las cuales se distribuyeron de manera equitativa (500 g) en tres matraces Erlenmeyer de 2 L.

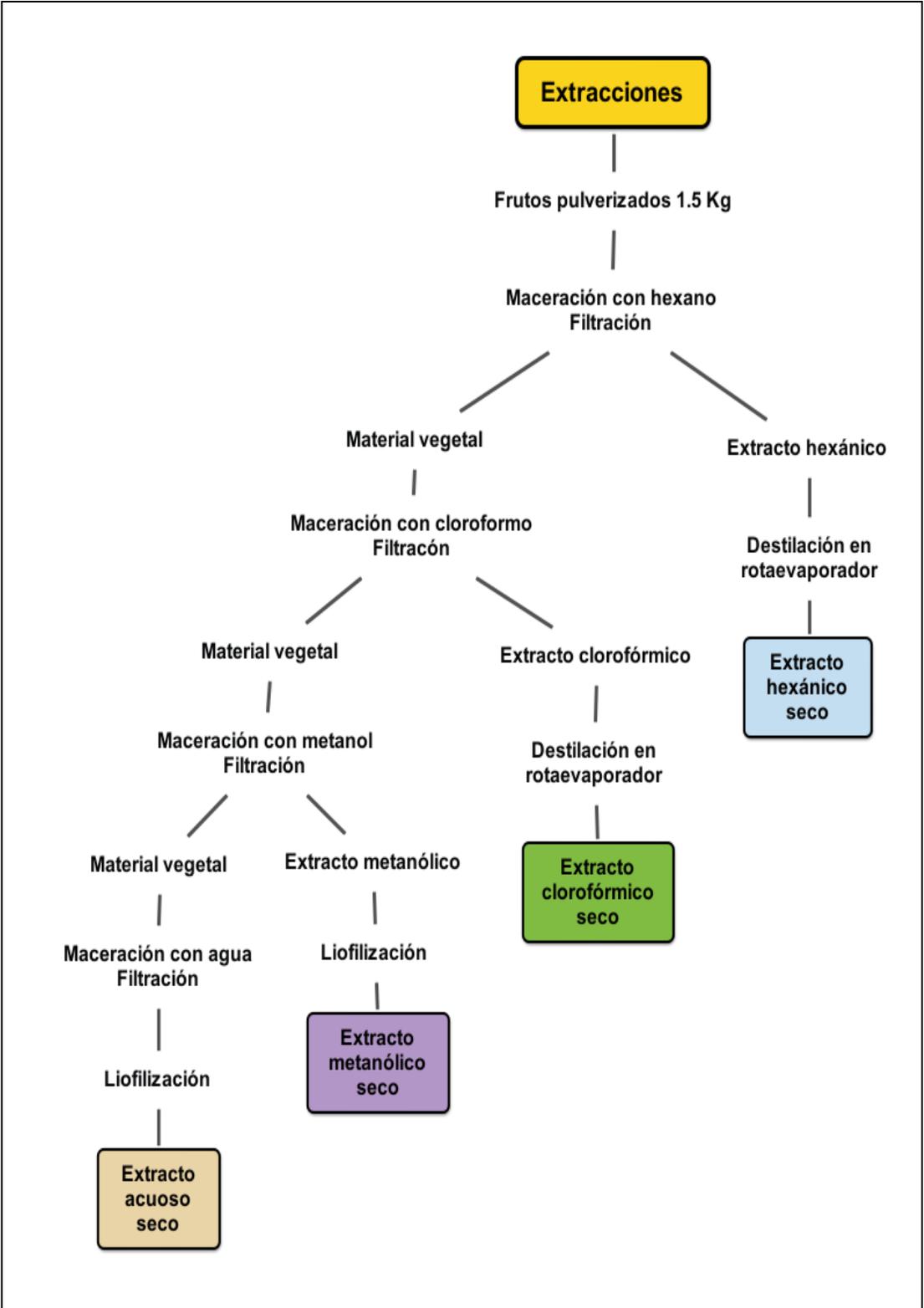
En la maceración con hexano se ocupó un volumen total de 5 L, se maceró por 24 horas, se filtró al vacío y se concentró con el rota-evaporador obteniendo un

extracto hexánico seco. El material vegetal extraído se dejó secar a temperatura ambiente.

El material vegetal seco se maceró con cloroformo por 48 horas, este procedimiento se hizo por duplicado, usándose un total de 9 L de cloroformo. Los extractos se filtraron al vacío y concentraron en el rota-evaporador obteniendo el extracto clorofórmico seco.

El material vegetal obtenido de la extracción con cloroformo se dejó secar y se extrajo por maceración con metanol por 48 horas, este proceso se realizó por duplicado empleándose un total de 9.5 L de disolvente. Los extractos se filtraron, concentraron en el rota-evaporador y liofilizaron, obteniéndose de esta forma el extracto metanólico seco.

El material vegetal obtenido de la extracción con metanol se dejó secar y se maceró con 5 L de agua destilada por 24 h, el extracto se filtró al vacío y liofilizó obteniéndose el extracto acuoso seco (Figura 3).



**Figura 3.** Diagrama de flujo del proceso de extracción.

## **4.2 Fraccionamiento del extracto hexánico y clorofórmico**

Antes de someter el extracto hexánico y clorofórmico en cromatografía en columna (CC) se realizó una cromatografía en capa fina (CCF) de los dos extractos observando una similitud en la composición química, por lo que se decidió unirlos y realizar una sola CC, empleando una fase estacionaria (FE) gel de sílice (508 g) y fase móvil (FM) gradiente de Hex/ AcOEt y AcOEt/MeOH, se obtuvieron un total de 344 fracciones de 100 mL cada una. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por cromatografía en capa fina observando bajo luz ultravioleta a 254 nm y 365 nm, y revelando con sulfato cérico amoniacal. Las fracciones fueron reunidas en 21 fracciones por similitud cromatográfica, fracciones A-U (Tabla 5).

**Tabla 5.** Fracciones del extracto hexánico-clorofórmico

<b>Fracción</b>	<b>Fase móvil</b>	<b>Fracciones reunidas</b>
1-16	Hex 100	} A
17-35	Hex/AcOEt 95:5	
36-43	Hex/AcOEt 90:10	B
44-48	Hex/AcOEt 90:10	C
49-51	Hex/AcOEt 90:10	D
52-55	Hex/AcOEt 90:10	E
56-64	Hex/AcOEt 85:15	F
65-71	Hex/AcOEt 80:20	G
72-79	Hex/AcOEt 80:20	H
80-96	Hex/AcOEt 80:20	I
97-110	Hex/AcOEt 75:25	J
111-144	Hex/AcOEt 70:30	K
145-168	Hex/AcOEt 60:40	L
169-176	Hex/AcOEt 50:50	M
177-192	Hex/AcOEt 50:50	N
193-208	Hex/AcOEt 40:60	O
209-224	Hex/AcOEt 30:70	} P
225-240	Hex/AcOEt 20:80	
241-256	Hex/AcOEt 10:90	Q
257-272	AcOEt 100	R
273-288	AcOEt/ MeOH 90:10	S
289-304	AcOEt/ MeOH 80:20	} T
305-320	AcOEt/ MeOH 70:30	
321-328	AcOEt/ MeOH 60:40	} U
329-336	AcOEt/ MeOH 50:50	
337-344	MeOH 100	

#### **4.2.1 Aislamiento y purificación de los compuestos del extracto hexánico-clorofórmico**

##### **4.2.1.1 Aislamiento y purificación de (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol (AF1)**

De la fracción I precipitó un sólido color blanco (10.3 mg), el cual se sometió a una CC con FE: gel de sílice (0.309g) y FM un gradiente de Hex/AcOEt. De la sub-fracción 3 (Hex/AcOEt 96:4) se obtuvo 5.7 mg (0.00038%) de un sólido amorfo color blanco que no revela bajo luz UV pero reveló color violeta con sulfato cérico amoniacal.

##### **4.2.1.2 Aislamiento y purificación de tetracosanoato de (2S)-2,3-dihidroxi-propilo (AF2)**

De la fracción N eluída con Hex/AcOEt 5:5 precipitó un sólido color blanco el cual se separó por filtración al vacío obteniendo una cantidad de 18.7mg (0.0012 %). En CCF el compuesto no revela bajo luz UV pero con sulfato cérico amoniacal se observa una mancha ligeramente oscura.

##### **4.2.1.3 Aislamiento y purificación del $\beta$ -D-Glucopiranosido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5,22- dien-3-ilo (AF3)**

De la fracción T eluída con AcOEt/MeOH (80:20 y 70:30) precipitó un sólido verdoso que se lavó con CHCl<sub>3</sub> varias veces para eliminar el exceso de pigmento. Se realizó una CCF del sólido y al revelar con luz UV no se observa pero con sulfato cérico se observó una mancha de color violeta. Se obtuvo un total de 85.8 mg (0.0057%) de sólido color beige.

### **4.3 Análisis del extracto hexánico y clorofórmico por Cromatografía de gases (CG) y CG- acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM)**

La caracterización y cuantificación de los ácidos grasos de los extractos hexánico y clorofórmico se realizó en el Centro de Estudios para el Desarrollo Sostenible, Tecnológico de Monterrey.

#### **4.3.1 Metilación del extracto hexánico y clorofórmico**

Se pesaron 42.3 mg de extracto clorofórmico y 40.9 mg de extracto hexánico y se colocaron cada uno en un vial de 20 mL por separado. A cada vial se le añadió 1 mL de tolueno, 1 mL de la solución de estándar interno triundecanoato de glicerilo (0.1005 g del estándar interno en 25 mL de tolueno) y 2 mL de ácido sulfúrico al 7% en metanol. Se colocó el vial en un baño de agua a 80 °C por una hora y media. Al terminar el tiempo de reacción se dejó enfriar el vial a temperatura ambiente. Se añadió 4 mL de hexano, se agitó por 1 minuto en un vortex, se dejó reposar para la separación de fases, la fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se transfirió a un matraz de aforación de 10 mL. A la fase acuosa se le agregó 4 mL de hexano, se agitó en un vortex por 1 minuto, la fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se reunió con la fase orgánica anterior llevando a aforación a 10 mL con hexano.

#### **4.3.2 Análisis por CG y CG-EM**

Las muestras se analizaron por cromatografía de gases con detector de ionización de flama (FID por sus siglas en inglés) y cromatografía de gases

acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) las condiciones instrumentales se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Condiciones de CG y CG-EM

CG- FID		CG-EM	
Cromatógrafo	Agilent GC 7820 <sup>a</sup>	Cromatógrafo	Agilent. GC 6890, MSD 5973N
Columna	SP-2380, (30 m *0.25mm x 20 µm)	Columna	HP-5 (30 m *0.25 mm x 0.25 µm)
Inyector	Split 1:20	Inyector	Split 1:15
Gas acarreador	Helio	Gas acarreador	Helio
Flujo de gas acarreador	1.0 mL/min	Flujo de gas acarreador	1mL/min
Gas auxiliar	Helio	Temperatura del inyector	270°C
Flujo de gas auxiliar	50mL/min	Temperatura de Fuente y Detector	230 y 250 °C, respectivamente.
Temperatura del inyector	260°C	Temperatura Inicial	70°C, 2.0 min
Temperatura del detector	280°C	Programa de temperaturas	70° a 200°C a 10°C/min 200°C a 310°C a 10°C/min
Temperatura Inicial	50°C, 2.0 min	Temperatura Final	310°C, 5 min.
Programa de temperaturas	50° a 240°C a 4°C/min		
Temperatura Final	240°C min.		

#### 4.4 Fraccionamiento del extracto metanólico

El extracto metanólico (277.7 g) se sometió a una CC, empleando como FE: gel de sílice (2 kg) y FM: AcOEt/MeOH en gradiente, se colectaron un total de 296 fracciones de 400 mL cada una. Las fracciones fueron analizadas por CCF bajo luz UV a 254 nm y 365 nm y se revelaron con sulfato cérico amoniacal. Las fracciones se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica en siete subfracciones de la A-G (Tabla 7).

**Tabla 7.** Fracciones del extracto metanólico

Fracción	Fase móvil	Fracciones reunidas
1-5	AcOEt 100	A
6-16	AcOEt 100	B
17-24	AcOEt 100	C
25-80	AcOEt 100	D
81-112	AcOEt 100	E
113-120	AcOEt/MeOH 95:5	
121-152	AcOEt/MeOH 90:10	
153-168	AcOEt/MeOH 80:20	F
169-184	AcOEt/MeOH 70:30	G
185-200	AcOEt/MeOH 60:40	
201-216	AcOEt/MeOH 50:50	
217-232	AcOEt/MeOH 40:60	
233-240	AcOEt/MeOH 30:70	
241-296	MeOH 100	

#### **4.4.1 Aislamiento y purificación de los compuestos del extracto metanólico.**

##### **4.4.1.1 Aislamiento y purificación del galato de metilo (AF4)**

En la fracción A eluída con AcOEt 100%, precipitó un sólido cristalino impuro el cual se purificó por recristalizaciones sucesivas con Hex/acetona (7:3), obteniéndose un total de 3.0259 g (0.201%) de cristales transparentes (**AF4**), los cuales en CCF revelan como una mancha oscura en ambas longitudes de onda de la luz UV y con sulfato cérico como una mancha de color café.

La fracción B (3.513 g) se sometió a una CC usando como FE: gel de sílice (70 g) y FM: Hex/AcOEt en gradiente. Se obtuvieron ocho subfracciones (B1-B8), de la fracción B2-B6 (Hex/AcOEt 50:50 y 45:55) precipitó un sólido el cual se purificó por recristalización con Hex/acetona (7:3) obteniéndose 0.4235 g de **AF4**.

##### **4.4.1.2 Aislamiento y purificación de galato de metilo (AF4) y ácido gálico (AF5)**

La fracción C (7.0320 g) se sometió a una CC usando como FE: gel de sílice y FM: Hex/AcOEt en gradiente, se obtuvieron seis subfracciones (C1-C6). De las subfracciones C2-C3 (Hex/AcOEt 55:45) cristalizó **AF4** (0.6212 g).

La subfracción C4 (0.3417 g) se sometió a una CC usando como FE: gel de sílice (10.2510 g) y FM: CHCl<sub>3</sub>/MeOH en gradiente, se obtuvieron 5 subfracciones. De la subfracción C.4.4 cristalizó (69 mg) un sólido color blanco

en forma de agujas **AF5**, el cual revela bajo luz UV en ambas longitudes de onda una mancha oscura y con sulfato cérico como una mancha de color café.

La subfracción C5 (1.0736 g) se sometió a una CC usando como FE: gel de sílice (32.208g) y FM: CHCl<sub>3</sub>/MeOH en gradiente, se obtuvieron seis subfracciones, de la subfracción C.5.5 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 90:10 a 86:14) cristalizó 58 mg de **AF5**.

La subfracción C.5.4 (0.7888 g) se sometió a una CC con FE: gel de sílice y FM: CHCl<sub>3</sub>/Acetona en gradiente. De las subfracciones C5.4.1-C5.4.5 (CHCl<sub>3</sub>/Acetona 85:15 y 83:17) precipitó un sólido cristalino (9.8 mg) que correspondió a **AF4**.

#### **4.4.1.3 Aislamiento y purificación de $\beta$ -D-Glucopiranosido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5,22- dien-3-ilo (AF8), ácido gálico (AF9) y 7-O- $\beta$ -D glucopiranosido de (2S) naringenina (AF10)**

La fracción D (24.8 mg) se sometió a CC con FE: gel de sílice y FM: CHCl<sub>3</sub>/MeOH en gradiente, se obtuvieron 13 subfracciones (D1-D14).

De la subfracción D8 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 92:8) se obtuvieron dos sólidos, el primero precipitó como un sólido el cual fue lavado con acetona y metanol varias veces hasta que quedó de color blanco (17 mg, 0.0011%). Este compuesto no revela bajo luz UV, por lo que se confirmó su pureza al revelar con sulfato cérico, mostrando una mancha definida en color violeta oscuro. La determinación de la estructura química de **AF8** por RMN demostró que corresponde al  $\beta$ -D-

Glucopiranosido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5,22- dien-3-ilo el cual ya había sido obtenido anteriormente en el extracto hexánico-clorofórmico (**AF3**).

El segundo sólido de la subfracción D8 se obtuvo por recristalización con CHCl<sub>3</sub>/Acetona 92:8, obteniéndose 65.7 mg (0.0043%) de un sólido beige el cual se observa como una mancha oscura bajo la luz UV y revela con sulfato cérico como una mancha en color café oscuro. Los datos espectroscópicos indican que **AF9** corresponde al ácido gálico, que ya había sido aislado en la fracción C (**AF5**).

De la subfracción D9 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 92:8) se obtuvo un sólido por recristalización con CHCl<sub>3</sub>/Acetona 9:1, el cual fue lavado con AcOEt varias veces, como resultado final se obtuvo 227.6 mg (0.015%) de un sólido blanco observándose como una mancha oscura bajo la luz UV de  $\lambda$  254 nm, mientras que en la  $\lambda$  365 nm se observa una mancha en color amarillo, con sulfato cérico revela en color rojo. Se le proporcionó la clave (**AF10**), correspondiendo a 7-O- $\beta$ -D glucopiranosido de (2S) naringenina de acuerdo a sus datos espectroscópicos.

#### 4.4.1.4 Aislamiento y purificación de sacarosa (**AF6**) y pinitol (**AF7**)

La fracción G (10 g) se sometió a una CC empleando como FE: Sephadex LH20 (197g) y FM: MeOH (100 %), obteniendo siete subfracciones (G1-G7). La subfracción G3 (500 mg) se sometió a una CC usando como FE: gel de sílice

(15 g) y FM: CHCl<sub>3</sub>/MeOH en gradiente, se obtuvieron seis subfracciones (G3.1-G3.6).

De la subfracción G3.1 (CHCl<sub>3</sub> 100 a CHCl<sub>3</sub>/MeOH 86:14) precipitó un sólido el cual fue lavado varias veces con metanol quedando un sólido color blanco (18.4 mg, 0.0012%), este sólido no se observa bajo luz UV, pero revela con sulfato cérico como una mancha de color café oscuro, a este compuesto se le asignó la clave **AF7** que corresponde al pinitol de acuerdo a sus datos espectroscópicos.

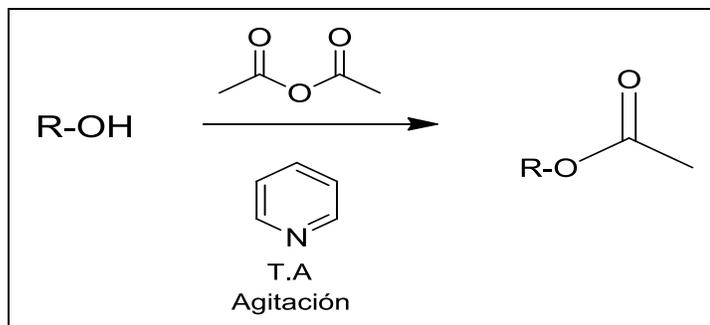
La subfracción G3.3 se recrystalizó con CHCl<sub>3</sub>/MeOH 8:2 obteniéndose un sólido color blanco (24 mg, 0.0016 %). Este sólido se comparó por CCF (FM CHCl<sub>3</sub>/MeOH/ ácido acético 5:4.5:0.5) con varios disacáridos (sacarosa, palatinosa, melibiosa y trehalosa), esta placa se reveló con sulfato cérico mostrando manchas en color café oscuro, teniendo como resultado un R<sub>f</sub> (0.325) similar con la sacarosa (**AF6**) el cual fue confirmado por RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C.

#### 4.5 Acetilación

Se realizó la acetilación del (3β, 22E)-estigmasta-5,22- dien-3-ol, tetracosanoato de (2S)-2,3-dihidroxipropilo, β-D-Glucopiranosido de (3β, 22E)-estigmasta-5,22- dien-3-ilo y el galato de metilo.

Se disolvieron cada una de las muestras por separado con piridina y se adicionó anhídrido acético, se dejó reaccionar a temperatura ambiente con

agitación. La reacción se monitoreó por CCF a 1 y 8 horas, excepto en el galato de metilo, este se monitoreó a los 30 y 90 min (Figura 4, Tabla 8).



T.A.: temperatura ambiente

**Figura 4.** Reacción general de la acetilación.

**Tabla 8.** Condiciones de reacción de acetilación

Compuesto	Condición de reacción
(3β,22E)-estigmasta-5,22- dien-3-ol (AF1)	AF1 1 meq (5.7 mg), Piridina 449 meq (0.5 mL), Anhídrido acético 382 meq (0.5 mL), temperatura ambiente, 8 horas.
Tetracosanoato de (2S)-2,3-dihidroxipropilo (AF2)	AF2 1 meq (10 mg), Piridina 275 meq (0.5 mL), Anhídrido acético 234 meq (0.5 mL), temperatura ambiente, 8 horas.
β-D-Glucopiranosido de (3β,22 E)-estigmasta-5,22- dien-3-ilo (AF3)	AF3 1 meq (8 mg), Piridina 300 meq (0.5 mL), Anhídrido acético 445 meq (0.5 mL), temperatura ambiente, 8 horas.
Galato de metilo (AF4)	AF2 1 meq (50 mg), Piridina 92 meq (2 mL), Anhídrido acético 3 meq (0.076 mL), temperatura ambiente, 1.5 horas.

#### 4.5.1 Proceso de purificación de las reacciones de acetilación

Una vez concluida la reacción, a la mezcla de reacción se le agregó 1 mL de HCl al 10 % pasando la mezcla a un embudo de separación, posteriormente se agregaron 2 mL de AcOEt y se agitó suavemente, se retiró la fase acuosa y se recuperó la fase orgánica, este proceso se realizó tres veces. La fase orgánica

recuperada se filtró sobre sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) para eliminar el agua y se concentró en el rota-evaporador.

La única reacción que requirió purificación fue la acetilación de **AF4** debido a que se visualizaron por CCF cuatro componentes, por lo que se procedió a la purificación de la muestra (73 mg) por CC con FE gel de sílice (2 g) y FM Hex/AcOEt en gradiente, las fracciones se reunieron en siete subfracciones (A-G). En la subfracción B (Hex/AcOEt 98:2) se obtuvo un compuesto al que se le asignó la clave **AF4Ac**, con los datos espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se verificó que corresponde al galato de metilo totalmente acetilado. Las características los compuestos acetilados se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Propiedades de los compuestos acetilados

Compuesto acetilado	Propiedades	Aspecto físico	Punto de fusión	Solubilidad	Rendimiento % (mmol)
(3 $\beta$ , 22E)-acetoxiestigmasta-5,22-dieno		Sólido color blanco	96-100°C	$\text{CHCl}_3$	95%
Tetracosanoato de (2S)-2,3-diacetoxipropilo		Sólido color blanco	80-90°C	$\text{CHCl}_3$	90%
$\beta$ -D-tetraacetilglucopiranosido de (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dieno		Sólido color blanco	144-147°C	$\text{CHCl}_3$	86%
Galato de metilo triacetilado		Sólido color blanco	121-123°C	$\text{CHCl}_3$	27%

## **4.6 Análisis del extracto metanólico y acuoso por Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas (CLAR-EM)**

La caracterización de los compuestos del extracto metanólico y acuoso por CLAR-EM se llevó a cabo en el Laboratorio Unidad Noreste del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ).

### **4.6.1 Material y equipo**

Para el análisis por CLAR-EM se requirió una dilución madre de los extractos el cual se preparó con 100 mg del extracto metanólico u acuoso disolviéndolo en 10 mL de agua/metanol 90:10. Posteriormente fue analizado bajo las condiciones mostradas en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Condiciones de CLAR-EM

Cromatógrafo	Agilent Technologies serie 1200	
Espectrómetro	Q-TOF Agilent Technologies modelo 6530A	
Columna	Phenomenex Kinetex Biphenyl 50x2.1 mm, 2.6 µm	
Polaridad	Negativa	
Modo	Auto MS/MS	
Rango de adquisición	40-2000	
Fuente de ionización	Electrospray, Agilent JetStream	
Radiofrecuencia de octapolo	750 V	
Voltaje de capilar	4000 V	
Voltaje de fragmentador	150 V	
Fase móvil (FM)	Fase A: Agua con ácido fórmico al 0.1% Fase B: Metanol con ácido fórmico al 0.1%	
Gradiente	%B	Tiempo (min)
	10	0
	100	8
	100	9.5
	10	9.6
Flujo de FM	0.4 mL/min	

#### 4.7 Ensayos biológicos

La actividad contra *M. tuberculosis* y contra las bacterias causantes de disentería se realizó en el Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

##### 4.7.1 Material y equipo

Para la actividad antibacteriana se ocupó agua bidestilada, dimetilsulfóxido (DMSO) (J.T.Baker, USA), Incubadora INC-80 (Prendo), Congelador -80°C (Panasonic.).

Para la actividad antimicobacteriana se ocuparon microplacas estériles de 96 pocillos de fondo plano con tapa (Corning Costar, New York), medio Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), resazurina (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 15 y 50 mL (Falcon, USA). Para actividad contra las bacterias causantes de disentería se emplearon microplacas estériles de 96 pocillos de fondo redondo (Corning Costar, New York) y medio Mueller Hinton (Becton Dickinson).

#### **4.7.2 Actividad antimicobacteriana**

##### **4.7.2.1 Cepas y cultivo**

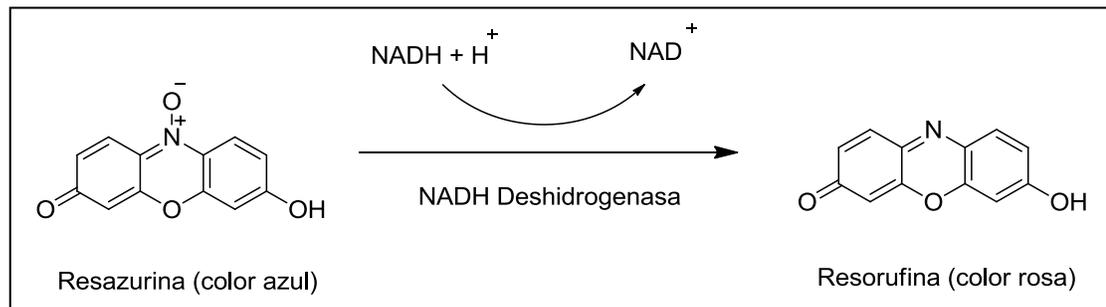
Se empleó *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294, la cual es sensible a isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida, y dos aislados clínicos multifarmacorresistentes (MFR) con clave G122 (resistente a isoniazida, rifampicina y etambutol) y G133 (resistente a isoniazida, rifampicina y estreptomina). Las cepas se cultivaron en agar Lowenstein-Jensen durante un mes, posteriormente las cepas se pasaron en medio líquido Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC, se incubó a 37 °C durante 2 semanas, con el fin de alcanzar la fase logarítmica de crecimiento.

#### 4.7.2.2 Preparación del inóculo

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.

#### 4.7.2.3 Ensayo biológico

El ensayo se realizó de acuerdo a lo descrito por FranzBlau *et al.* (61) y Camacho-Corona *et al.* (62). El método se basa en que los microorganismos en crecimiento liberan deshidrogenasas (NADH) al medio, que reducen la resazurina que es de color azul a resorufina que es de color rosa (Figura 5).

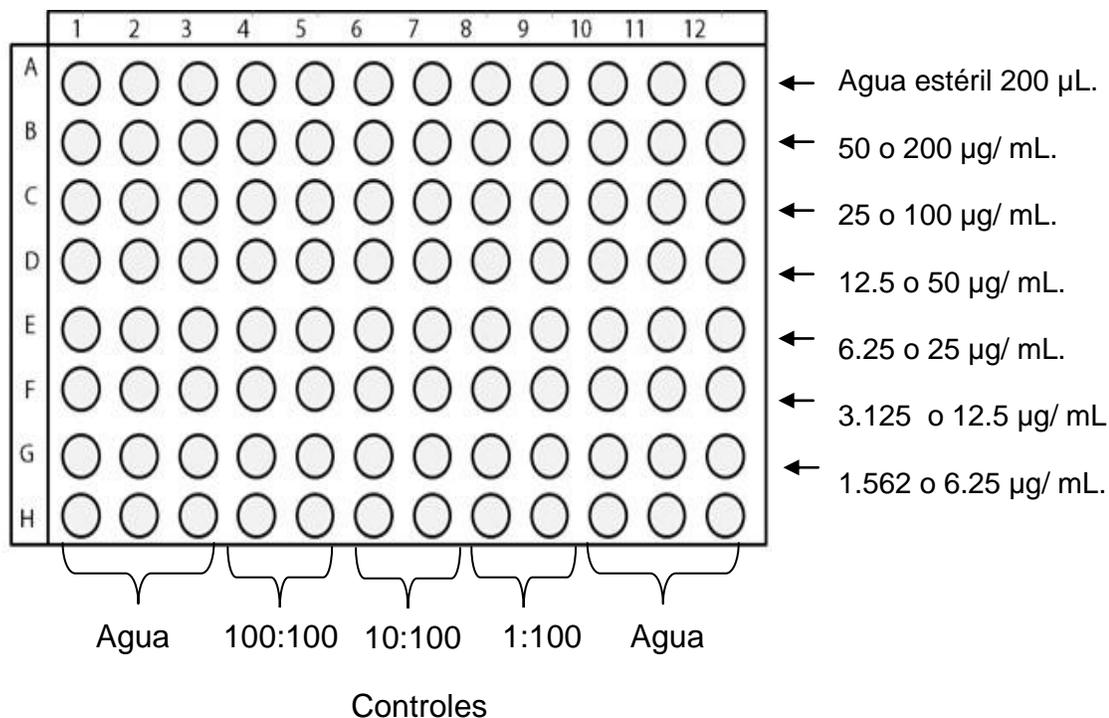


**Figura 5.** Reducción de Resazurina a Resorufina

El ensayo se llevó a cabo en microplacas de 96 pocillos (Figura 6). Cada compuesto se evaluó a partir de 50 µg/mL y los extractos a 200 µg/mL, cada concentración se realizó por duplicado. Se colocaron 200 µL de agua estéril en todos los pozos de la fila A y en los pozos H1, H2, H3, H10, H11 y H12, dejando los pozos del centro sin agua. A los pozos de la fila B hasta la G se les agregó

100  $\mu$ L de medio Middlebrook. Después en la fila B se añadieron 100  $\mu$ L de la solución de trabajo 4X (200  $\mu$ g/mL y 800  $\mu$ g/mL) obteniendo una concentración de DMSO < 1% v/v en los pozos. Se prosiguió con las diluciones 1:2 de la fila B a la G, posteriormente se añadieron 100  $\mu$ L del inóculo bacteriano previamente preparado. En los pocillos que quedaron de la fila H (H-4 a H-10) se prepararon tres controles 100:100, 10:100 y 1:100, 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 de este tiempo se le adicionaron 20  $\mu$ L de reactivo Alamar azul y 12  $\mu$ L de Tween 80 al 10% a los controles, se incubó nuevamente y a las 24 horas se le agregó el reactivo de Alamar azul y 12  $\mu$ L de Tween 80 al 10% a toda la placa, re-incubando a 37 °C por 48 horas. Al término de la incubación se evaluó de forma visual el crecimiento o inhibición de la bacteria, tomándose como inhibición los pocillos donde permaneció el color azul, mientras que en los pocillos donde cambió a color rosa se tomó como no inhibición. Se utilizó isoniazida, rifampicina, etambutol y levofloxacin como controles positivos de referencia. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) como la mínima concentración del compuesto que inhibe el crecimiento de la bacteria.



**Figura 6.** Distribución de placa de 96 pocillos en ensayo antimicobacteriano.

### 4.7.3 Actividad antibacteriana

#### 4.7.3.1 Cepas y cultivo

Se utilizaron las siguientes cepas de American Type Culture Collection (ATCC). Especies Gram negativas: *Escherichia.coli* enterohemorrágica (ATCC 05747) y *Salmonella enteritidis* (ATCC857); *Yersinia enterocolitica* (Reg. HU 170554) y *Campylobacter jejuni* (Reg. HU 170553) fueron adquiridas en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología, Laboratorio de Bacteriología Médica del Instituto Politécnico Nacional (IPN), Ciudad de México. *Shigella flexneri* (Reg. HU 287) provino de un aislado clínico del

Hospital Universitario, Eleuterio González, UANL, es una cepa sensible a antibióticos. *E. coli* enterohemorrágica, *S. enteritidis*, *S. dysenteriae*, *Y. enterocolitica* se cultivaron en agar sangre al 5% a 37°C por 24 horas. *C. jejuni* se cultivó en agar sangre al 5% a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, por 48 horas.

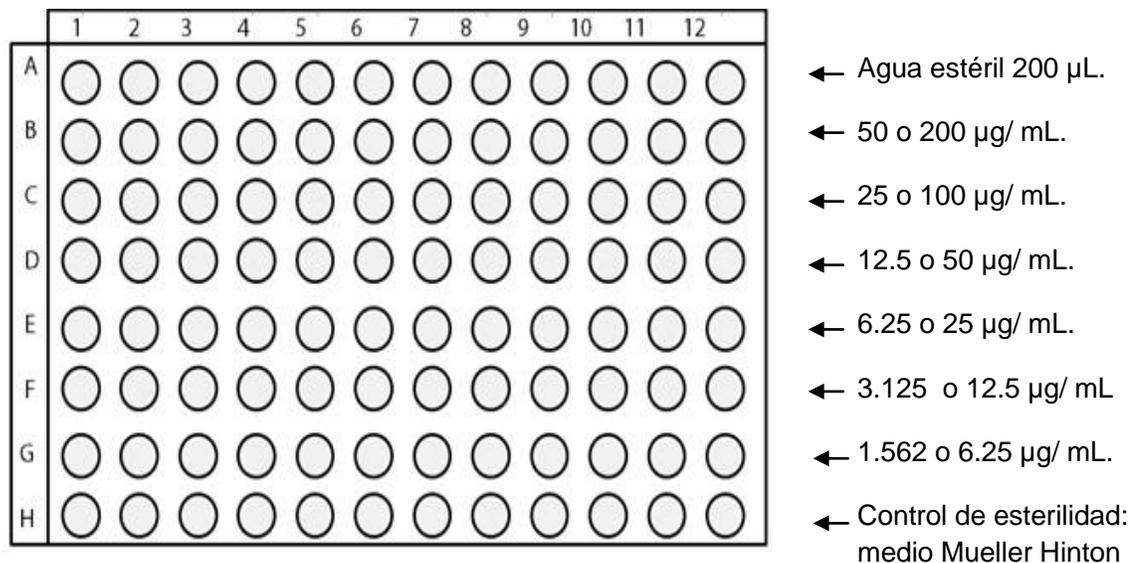
#### **4.7.3.2 Preparación del inóculo**

Para la preparación del inóculo se transfirieron de tres a cinco colonias de cada cultivo a tubos con solución salina estéril, la turbidez fue ajustada a 0.5 del estándar de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC (unidades formadoras de colonias)/mL). Posteriormente, 10  $\mu$ L se depositaron en 11 mL de caldo Mueller Hinton, para alcanzar  $5 \times 10^5$  UFC/mL.

#### **4.7.3.3 Ensayo biológico**

Para la realización de este ensayo se utilizó como referencia lo reportado por Zgoda *et al.*, (63) empleando el método de microdilución. Este método consistió en utilizar microplacas de 96 pocillos estériles de fondo redondo con tapa, a las cuales se le adicionaron 100  $\mu$ L de caldo Mueller Hinton en toda la placa. Posteriormente, en el primer y segundo pocillo de la fila A se le adicionaron 100  $\mu$ L de la solución de trabajo (por duplicado) con la concentración de 4X (200  $\mu$ g/mL para los compuestos y 800  $\mu$ g/mL para los extractos crudos), a partir de la fila A se comenzó a realizar la dilución 1:2 empleando una micropipeta multicanal hasta llegar a la fila G, desechando los últimos 100  $\mu$ L. Después, se tomaron 100  $\mu$ L de la suspensión bacteriana ajustada al tubo 0.5 de McFarland y se adicionaron a los pozos con muestra, así como los controles positivos. La

microplaca se sometió a incubación a 37 °C durante 24 horas, a excepción de la cepa *C. jejuni*, la cual se incubó 48 horas con cámara de CO<sub>2</sub> al 5%. Al término de la incubación se evaluó de forma visual el crecimiento o inhibición de la bacteria, tomándose como inhibición los pocillos donde no se observó turbidez ni depósito de bacterias en el fondo. Se utilizó Levofloxacin como control positivo de referencia. Se determinó la CMI como la mínima concentración del compuesto que inhibe el crecimiento de la bacteria (Figura 7).



**Figura 7.** Distribución de placa de 96 pocillos en ensayo antibacteriano.

#### 4.8 Actividad citotóxica.

##### 4.8.1 Cultivo de células Vero.

Se hizo crecer las células Vero en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y se incubó a 37 °C en atmosfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.8.2 Ensayo

Se despegaron las células adheridas a través de tripsinización adicionando 1 mL de tripsina-EDTA 0.25 % por caja, se dejó actuar la tripsina durante 30 minutos hasta que la mayoría de las células se despegaran, confirmándose por observación al microscopio. Pasados los 30 minutos se traspasaron las células a tubos Eppendorf estériles y se sometieron a centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró la tripsina y se adicionó 1 mL de medio RPMI a cada tubo Eppendorf para resuspender las células. Se realizó un conteo de la cantidad de células presentes en la suspensión con una cámara de Neubauer. La cantidad de células fue de  $12.625 \times 10^4$ /mL. Posteriormente se adicionaron 200  $\mu$ L de la suspensión celular a cada pocillo de las placas de 96 pocillos quedando una cantidad de 25, 250 células por pocillo. Se sometieron las placas a incubación durante 24h a 37° C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurridas las 24 horas de incubación se observó que las células estuvieran adheridas y se retiró el medio de cultivo. Se adicionó 200  $\mu$ L de medio RPMI fresco y 5  $\mu$ L de cada compuesto a sus diferentes concentraciones así como con controles positivo (SDS al 1%) y negativo (caldo de cultivo sólo). Cada concentración se evaluó por triplicado. Se sometieron nuevamente las placas a incubación en las condiciones ya mencionadas durante 24 horas. Posteriormente se retiró el medio de cada pocillo y se adicionaron 50  $\mu$ L de tripsina-EDTA 0.25 % a cada pocillo y se dejó actuar durante 30 min. Se aspiró la tripsina junto con las células de cada pozo y se traspasó el contenido de cada pozo a tubos Eppendorf para centrifugar. Se retiró la tripsina y se adicionó 50

μL de medio RPMI para lavar, y se retiró el medio. Posteriormente se adicionó 200 μL para re-suspender las células en cada uno de los Eppendorf. Las células de cada uno de los tres pocillos del control negativo se contaron individualmente en la cámara de Neubauer.

Se determinó el porcentaje de viabilidad de cada pocillo a través del método azul de tripano, para esto se tomaron 60 μL de cada tubo de Eppendorf y se adicionó 20 μL de azul de tripano al 0.2 %, se dejó transcurrir 15 minutos a temperatura ambiente, se tomaron 20 μL de esta mezcla y se colocó en un portaobjetos para realizar el conteo de células viables y no viables. Para lo cual se contó un total de 100 células por cada Eppendorff conteniendo las células de cada pocillo. De estas 100 células las que se tiñeron color azul oscuro se contaron como células no viables (células muertas) y las que no se tiñeron y presentaban anillo de refractancia se contaron como células viables (células vivas)(64, 65).

Se determinó el % de viabilidad de la siguiente forma:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{número de células teñidas}}{\text{número de células vivas (control)}} \times 100$$

### **4.8.3 Concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>)**

Se determinó la Concentración Inhibitoria Media (CI<sub>50</sub>) a través del análisis estadístico Probit, el cual consiste en transformar la curva dosis-respuesta sigmoidea a una línea recta en dónde se puede analizar por regresión lineal dándonos una ecuación de la recta que nos permite determinar la Concentración Inhibitoria 50 de cada compuesto ensayado. El % de viabilidad (eje Y) se transforma a unidades probit y la concentración del compuesto evaluado (eje X) se transformó a su logaritmo (Log<sub>10</sub>), de esta forma obtenemos la línea recta de la cual podemos obtener la ecuación de la recta que nos permite conocer la concentración.

### **4.9 Disposición de residuos**

La disposición de residuos se realizó en base a las normas establecidas por el departamento de manejo y control de residuos de la Facultad de Ciencias Químicas UANL, Servicio de Gastroenterología de la Facultad de Medicina UANL, Centro de Estudios para el Desarrollo Sostenible del Tecnológico de Monterrey y Laboratorio Unidad Noreste del CIATEJ.

## CAPÍTULO 5

### 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

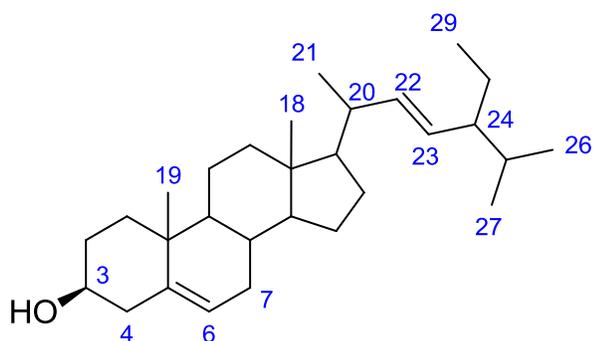
#### 5.1. Estudio fitoquímico

De la planta *A. farnesiana* se obtuvieron cuatro extractos: hexánico, clorofórmico, metanólico y acuoso. De los cuales el extracto hexánico y clorofórmico se fraccionaron juntos debido a la similitud química apreciada en CCF obteniendo tres compuestos por diferentes técnicas de purificación:  $\beta$ -( $3\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol (AF1), tetracosanoato de (2S)-2,3-dihidroxiopropilo (AF2) y  $\beta$ -D-Glucopiranosido de ( $3\beta$ , 22 E)-estigmasta-5,22-dien-3-ilo (AF3). El extracto metanólico se fraccionó por separado, las fracciones fueron sometidas a diferentes técnicas cromatográficas lográndose aislar siete compuestos: galato de metilo (AF4), ácido gálico (AF5), sacarosa (AF6), pinitol (AF7),  $\beta$ -D-Glucopiranosido de ( $3\beta$ , 22 E)-estigmasta-5,22- dien-3-ilo (AF8), ácido gálico (AF9) y 7-O- $\beta$ -D-Glucopiranosido de (2S) naringenina (AF10). La elucidación estructural de los compuestos se llevó a cabo por RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . De manera adicional se llevó a cabo la acetilación de  $\beta$ -( $3\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol, Tetracosanoato de (2S)-2,3-dihidroxiopropilo,  $\beta$ -D-Glucopiranosido de ( $3\beta$ , 22 E)-estigmasta-5,22- dien-3-ilo y galato de metilo

El extracto hexánico y clorofórmico fueron metilados por separado para su análisis por CG y CG-EM. El extracto metanólico y acuoso fueron analizados por CLAR-EM.

## 5.1.1 Elucidación estructural de compuestos del extracto hexánico-clorofórmico

### 5.1.1.1 Propiedades físicas y espectroscópicas de (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol (AF1)



**Figura 8.** (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol (AF1)

Sólido color blanco, soluble en  $\text{CHCl}_3$ , pf 137-140°C,  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ , PM: 412.69 g/mol. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.69 (s, 3H, Me-18), 0.79 (d,  $J=6.92$  Hz, 3H, Me-27), 0.80 (t,  $J=7.1$  Hz, 3H, Me-29), 0.83 (d,  $J=7.32$  Hz, 3H, Me-26), 1.01 (s, 3H, Me-19), 1.02 (d,  $J=7.72$  Hz, 3H, Me-21), 3.52 (m, 1H, H-3), 5.01 (dd,  $J=15.1, 8.6$  Hz, 1H, H-23), 5.15 (dd,  $J=15.1, 8.5$  Hz, 1H, H-22), 5.35 (da,  $J=4.72$  Hz, 1H, H-6). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 12.05 (C18), 12.25 (C29), 19.03 (C27), 19.40 (C19), 21.08 (C11, C26), 21.21 (C21), 24.36 (C15), 25.41 (C28), 28.92 (C16), 31.67 (C2), 31.88 (C7, C8), 31.90 (C25), 36.51 (C10), 37.26 (C1), 39.78 (C12), 40.49 (C20), 42.22 (C13), 42.31 (C4), 50.14 (C9), 51.24 (C24), 55.96 (C17), 56.87 (C14), 71.81 (C3), 121.71 (C6), 129.28 (C23), 138.32 (C22), 140.76 (C5).

#### 5.1.1.1.1 Elucidación estructural de (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol (AF1)

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de AF1 mostraron un perfil de señales que son características de estructuras relacionadas a fitoesteroides. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 9) en la región de campo alto (0.69-1.02 ppm) se observó un patrón complejo de señales, de las que destacan las señales de mayor intensidad atribuibles a seis grupos metilos  $\delta$  (ppm): 0.69- Me-18, 0.79 - Me-27, 0.80- Me-29, 0.83- Me-26, 1.01- Me-19, 1.02- Me-21. Los grupos metilos fueron confirmados mediante el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 10, Figura 11) los cuales mostraron las seis señales en  $\delta$  (ppm): 12.05 (C18), 12.25 (C29), 19.03 (C27), 19.40 (C19), 21.08 (C26), 21.21 (C21). Los carbonos restantes de RMN  $^{13}\text{C}$  (figura 10, figura11) se atribuyen a nueve grupos metilenos y a cuatro grupos metinos, de los cuales tres corresponden a metinos vinílicos  $\delta$  (ppm): 121.71 (C6), 129.28 (C23), 138.32 (C22), y uno es base de un grupo hidroxilo en  $\delta$  71.81 ppm (C3). Esto fue congruente con lo observable en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 9) donde se apreció en  $\delta$  5.01 y 5.15 ppm dos dobletes de dobletes que corresponden a los hidrógenos vinílicos H-23 y H-22, respectivamente y un doblete ancho en  $\delta$  5.35 ppm del hidrógeno olefínico H-6. En  $\delta$  3.52 ppm se visualizó un multiplete que corresponde a H-3. La comparación de estos datos espectroscópicos con los reportados en la literatura (66) permitió establecer la identidad del compuesto mayoritario de AF1 como (3 $\beta$ ,22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol (Tabla 11). Este compuesto tiene una fórmula molecular  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ , sin embargo aparte de las señales características del (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol se observaron en RMN  $^1\text{H}$  señales que

integran para un total de sesenta y siete protones, mientras que en RMN  $^{13}\text{C}$  se observan cincuenta y cuatro señales, esto nos indicó que hay una mezcla de compuestos, un ejemplo de señales extras es la observada en  $\delta$  4.15 ppm como un multiplete, por ello se procedió a realizar una acetilación para corroborar la estructura del (3 $\beta$ ,22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol, y para caracterizar los demás compuestos presentes en esta muestra por medio de CG-EM.

**Tabla 11.** Datos espectroscópicos de (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol

	RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )		RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	
	RMN $^1\text{H}$ (66) $\delta_{\text{ppm}}$	RMN $^1\text{H}$ AF1 $\delta_{\text{ppm}}$	RMN $^{13}\text{C}$ (66) $\delta_{\text{ppm}}$	RMN $^{13}\text{C}$ AF1 $\delta_{\text{ppm}}$
1			37.2	37.26
2			31.6	31.67
3	3.52 (m, 1H)	3.52 (m, 1H)	71.8	71.81
4			42.3	42.31
5			140.7	140.76
6	5.35 (m, 1H)	5.35 (da, $J=4.72$ Hz, 1H)	121.7	121.71
7			31.9	31.88
8			31.9	31.88
9			50.1	50.14
10			36.5	36.51
11			21.1	21.08
12			39.7	39.78
13			42.2	42.22
14			56.8	56.87
15			24.4	24.36
16			28.9	28.92
17			55.9	56.96
18	0.69 (s, 3H)	0.69 (s, 3H)	12.0	12.05
19	1.01 (s, 3H)	1.01 (s, 3H)	19.4	19.40
20			40.5	40.49
21	1.02 (d, $J=6.5$ Hz, 3H)	1.02 (d, $J=7.72$ Hz, 3H)	21.2	21.21
22	5.15 (dd, $J=9$ Hz, 15 Hz, 1H)	5.15 (dd, $J=15.1, 8.5$ Hz, 1H)	138.3	138.32
23	5.01 (dd, $J=9$ Hz, 15 Hz, 1H)	5.01 (dd, $J=15.2, 8.6$ Hz, 1H)	129.2	129.28
24			51.2	51.24
25			31.9	31.90
26	0.84 (d, $J=6.5$ Hz, 3H)	0.83 (d, $J=7.32$ Hz, 3H)	21.1	21.08
27	0.79 (d, $J=6.5$ Hz, 3H)	0.79 (d, $J=6.92$ Hz, 3H)	19.0	19.03
28			25.4	25.41
29	0.80 (t, $J=7.5$ Hz, 3H)	0.80 (t, $J=7.1$ Hz, 3H)	12.3	12.25

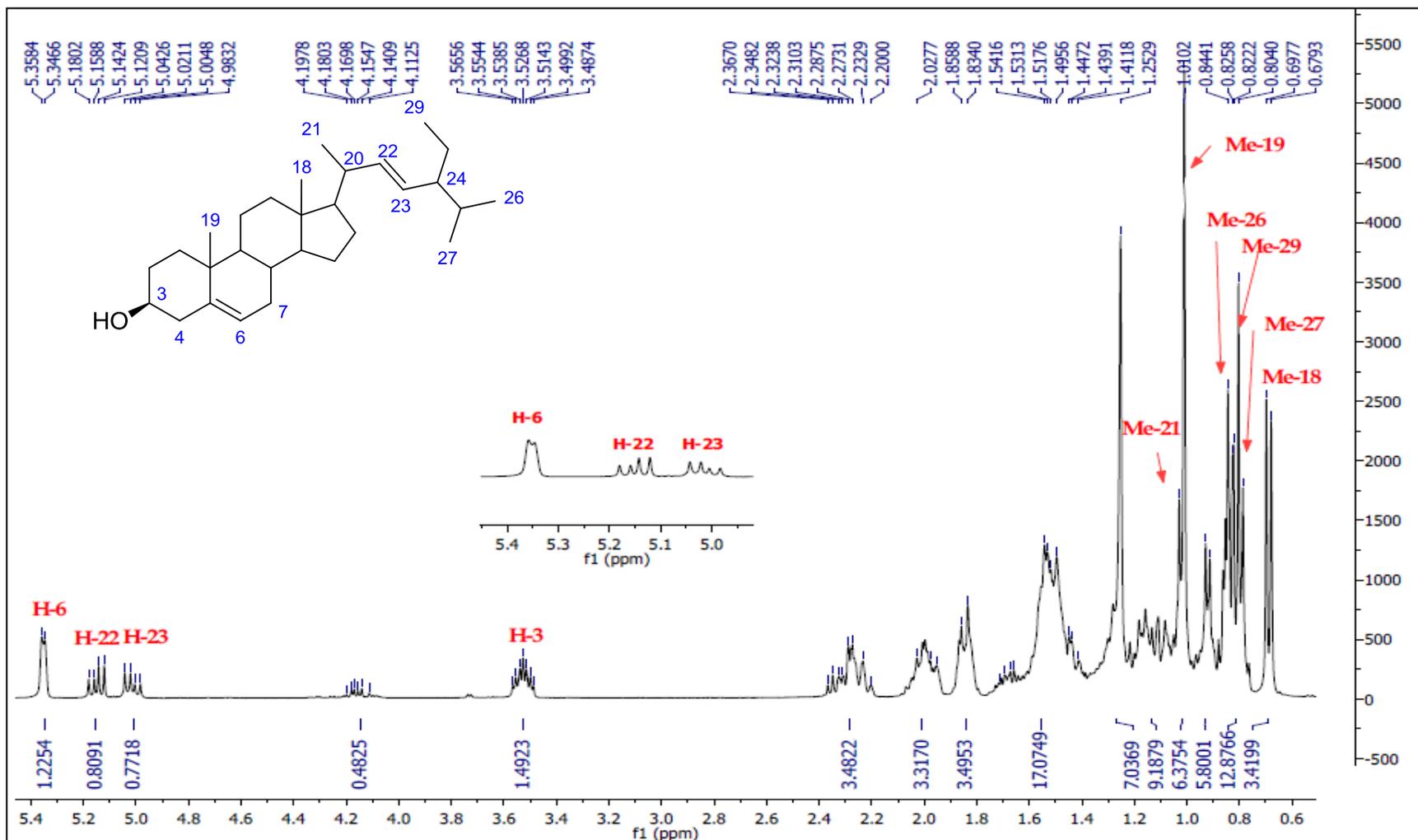


Figura 9. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol (AF1)

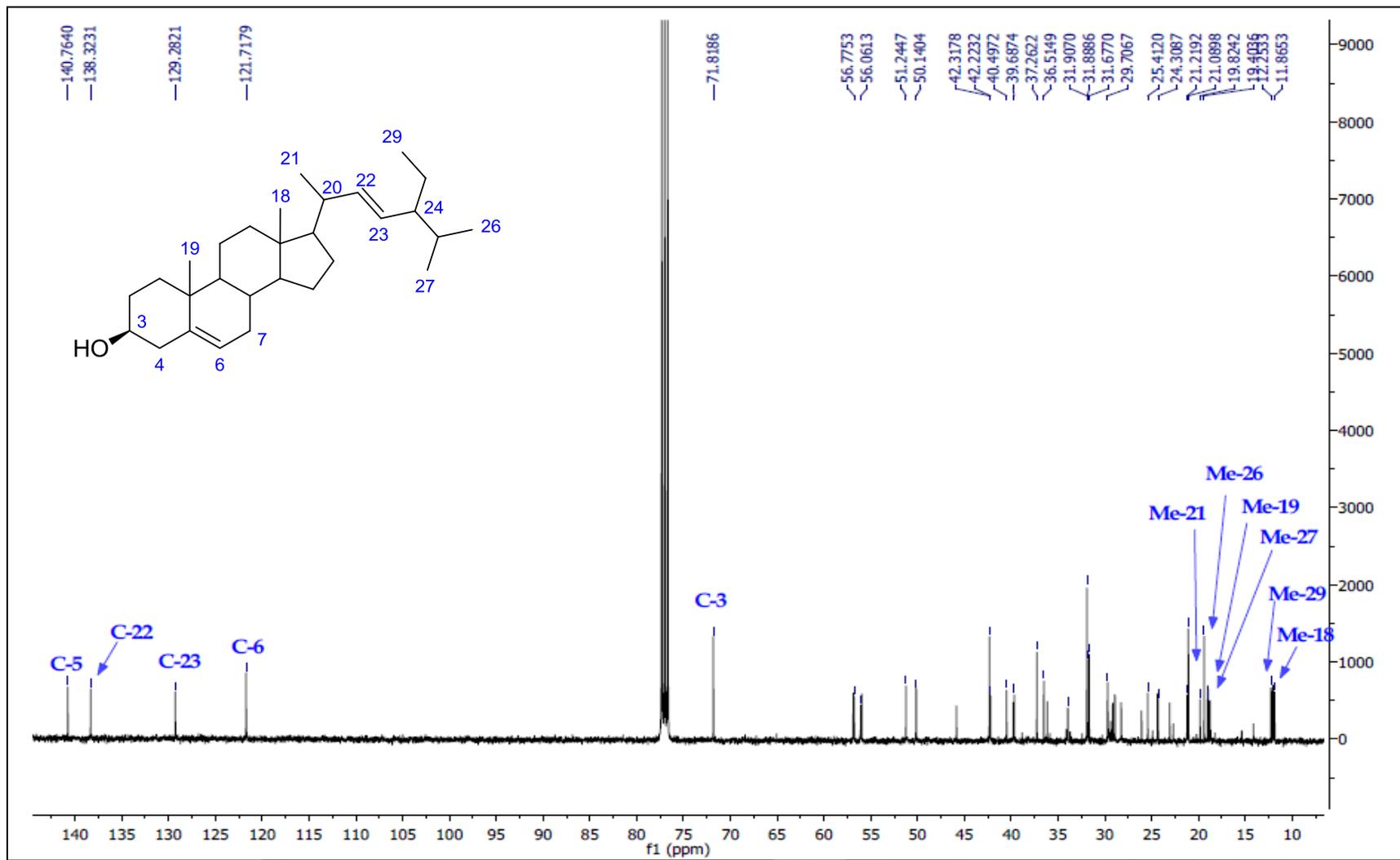


Figura 10. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol (AF1)

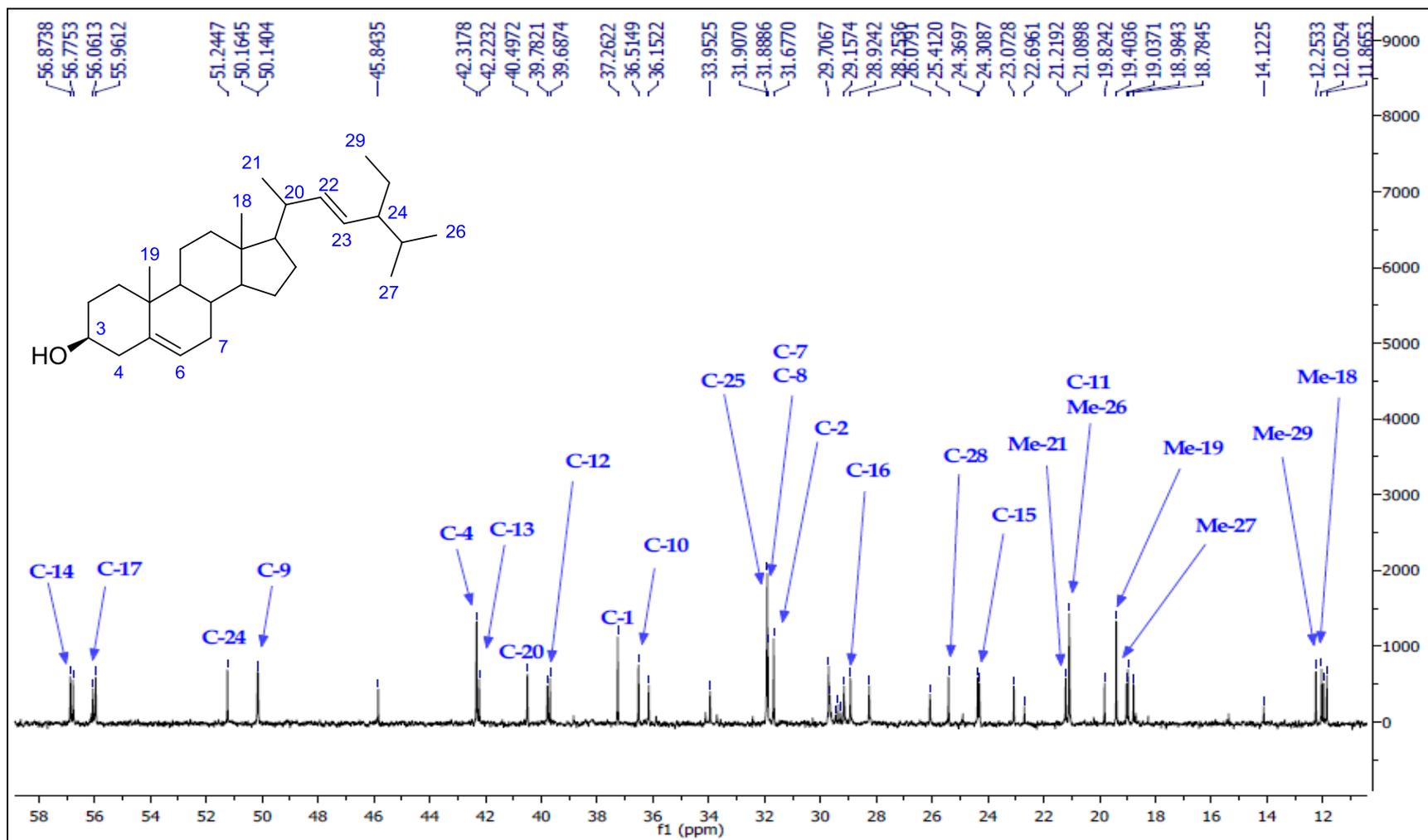
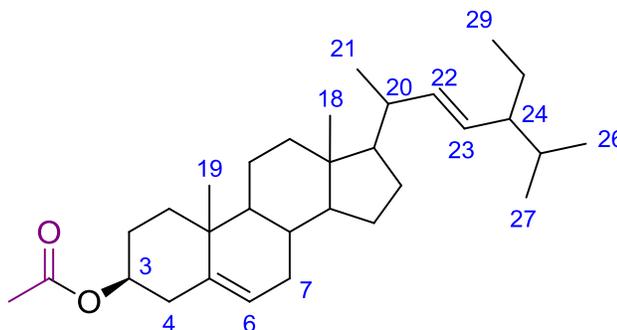


Figura 11. Expansión del espectro de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de (3β, 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol (AF1)

### 5.1.1.2 Propiedades físicas y espectroscópicas de (3 $\beta$ , 22E)-acetilestigmasta-5,22-dieno (AF1Ac)



**Figura 12.** (3 $\beta$ , 22E)-acetilestigmasta-5,22-dieno (AF1Ac)

Sólido color blanco, soluble en  $\text{CHCl}_3$ , pf 96-100 °C,  $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_2$ , PM: 454.73 g/mol. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.69 (s, 3H, Me-18), 0.79 (d,  $J= 6.96$  Hz, 3H, Me-27) 0.80 (t,  $J= 7.04$  Hz, 3H, Me-29), 0.83 (d,  $J= 7.2$  Hz, 3H, Me-26), 1.02 (s, 3H, Me-19), 1.021 (d,  $J= 6.36$  Hz, 3H, Me-21), 2.03 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 4.6 (m, 1H, H-3), 5.01 (dd,  $J= 15.16, 8.64$  Hz, 1H, H-23), 5.15 (dd,  $J= 15.16, 8.6$  Hz, 1H, H-22), 5.37 (da,  $J= 4.64$ , 1H, H-6). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 12.04 (C18), 12.24(C29), 18.98 (C27), 19.30 (C19), 21.01 (C11), 21.08 (C26), 21.21 (C21), 21.44 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 24.35 (C15), 25.40 (C28), 27.77 (C2), 28.90 (C16), 31.86 (C7, C8), 31.88 (C25), 36.59 (C10), 36.99 (C1), 38.12 (C4), 39.62 (C12), 40.49 (C20), 42.20 (C13), 50.05 (C9), 51.23 (C24), 55.93 (C17), 56.78 (C14), 74.0 (C3), 122.63 (C6), 129.28 (C23), 138.31 (C22), 139.65 (C5), 170.56 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

#### 5.1.1.2.1 Elucidación estructural del (3 $\beta$ , 22E)-acetilestigmasta-5,22-dieno

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del (3 $\beta$ , 22E)-acetilestigmasta-5,22-dieno (Figura 13), se observó un patrón de señales muy similar al espectro del (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol (AF1), en la región de campo alto se observa seis grupos metilos  $\delta$  (ppm): 0.69 -Me-18, 0.79 -Me-27, 0.80 -Me-29, 0.83 -Me-26, 1.02 -Me-19, 1.021 -Me-21. Se observó la presencia de dos dobletes de dobletes que corresponden a los hidrógenos vinílicos H-23 y H-22 en  $\delta$  5.01 (dd,  $J= 15.16, 8.64$  Hz, 1H, H-23) y 5.15 (dd,  $J= 15.16, 8.6$  Hz, 1H, H-22), respectivamente, y un doblete ancho  $\delta$  5.37 (da,  $J= 4.64$ , 1H, H-6) que corresponde al hidrógeno olefínico H-6. Se observó que la señal del protón H-3 se encontraba a campos más bajos apareciendo en  $\delta$  4.6 ppm porque se encuentra geminal a un grupo éster. De manera adicional se observa un singulete en 2.03 ppm que corresponde al metilo del grupo acetilo en la posición 3. Estas señales fueron confirmadas en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 14, Figura 15) apreciándose en  $\delta$  21.45 ppm (CH<sub>3</sub>CO) y en  $\delta$  170.57 ppm (CH<sub>3</sub>CO), también se observaron las seis señales de los metilos en  $\delta$  (ppm): 12.04 (C18), 12.24 (C29), 18.98 (C27), 19.30 (C19), 21.08 (C26), 21.21 (C21) y las señales de los carbonos de las dos dobles ligaduras en  $\delta$  (ppm): 122.63 (C6), 129.28 (C23), 138.31 (C22) y 139.65 (C5), se apreció el desplazamiento a campo bajo del (C3) apareciendo en  $\delta$  74.0 ppm. Se observaron tres señales ( $\delta$  127.08, 142.09 y 145.03 ppm) que corresponden a otro compuesto. Estos datos espectroscópicos se compararon con los reportados en la literatura (67) (Tabla 12) con ello se pudo confirmar el compuesto mayoritario de AF1 como (3 $\beta$ ,

22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol. Sin embargo el espectro de RMN  $^1\text{H}$  muestra en  $\delta$  4.15 y 4.30 ppm hidrógenos adicionales y en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observan tres carbonos vinílicos en  $\delta$  127.08, 142.09 y 145.03 ppm adicionales por lo que se llevó a cabo la CG-EM y de esta forma poder caracterizar los componentes adicionales de AF1.

**Tabla 12.** Datos espectroscópicos de (3 $\beta$ , 22E)-acetilestigmasta-5,22-dieno

	RMN $^1\text{H}$ (270 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta_{\text{ppm}}$ (67)	RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) AF1Ac $\delta_{\text{ppm}}$	RMN $^{13}\text{C}$ (77 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta_{\text{ppm}}$ (67)	RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) AF1Ac $\delta_{\text{ppm}}$
1			36.98	36.99
2			27.75	27.77
3	4.60 (m, 1H)	4.60 (m, 1H)	73.98	74.00
4			38.10	38.12
5			139.64	139.65
6	5.37 (m, 1H)	5.35 (da, $J= 5.37$ Hz, 1H)	122.62	122.63
7			31.86	31.86
8			31.86	31.86
9			50.03	50.05
10			36.59	36.59
11			20.99	21.01
12			39.61	39.62
13			42.19	42.29
14			56.77	56.78
15			24.33	24.35
16			28.90	28.90
17			55.90	55.93
18	0.69 (s, 3H)	0.69 (s, 3H)	12.02	12.04
19	1.02 (s, 3H)	1.02 (s, 3H)	19.30	19.30
20			40.49	40.49
21	1.02 (d, $J=6.6$ Hz, 3H)	1.021 (d, $J= 6.36$ Hz, 3H)	21.21	21.21
22	4.96-5.20 (m, 1H)	5.15(dd, $J= 15.16, 8.6$ Hz, 1H)	138.31	138.31
23	4.96-5.20 (m, 1H)	5.01 (dd, $J= 15.16, 8.64$ Hz, 1H)	129.25	129.28
24			51.21	51.23
25			31.86	31.88
26	0.84 (d, $J= 6.6$ Hz, 3H)	0.83 (d, $J=7.2$ Hz, 3H)	21.08	21.08
27	0.79 (d, $J= 6.6$ Hz, 3H)	0.79 (d, $J=6.96$ Hz, 3H)	18.96	18.98
28			25.39	25.40
29	0.80 (t, $J=7.3$ Hz, 3H)	0.80 (t, $J=7.04$ Hz, 3H)	12.24	12.24
$\text{COCH}_3$	2.03 (s, 3H)	2.03 (s, 3H)	21.44	21.44
$\text{COCH}_3$			170.55	170.56

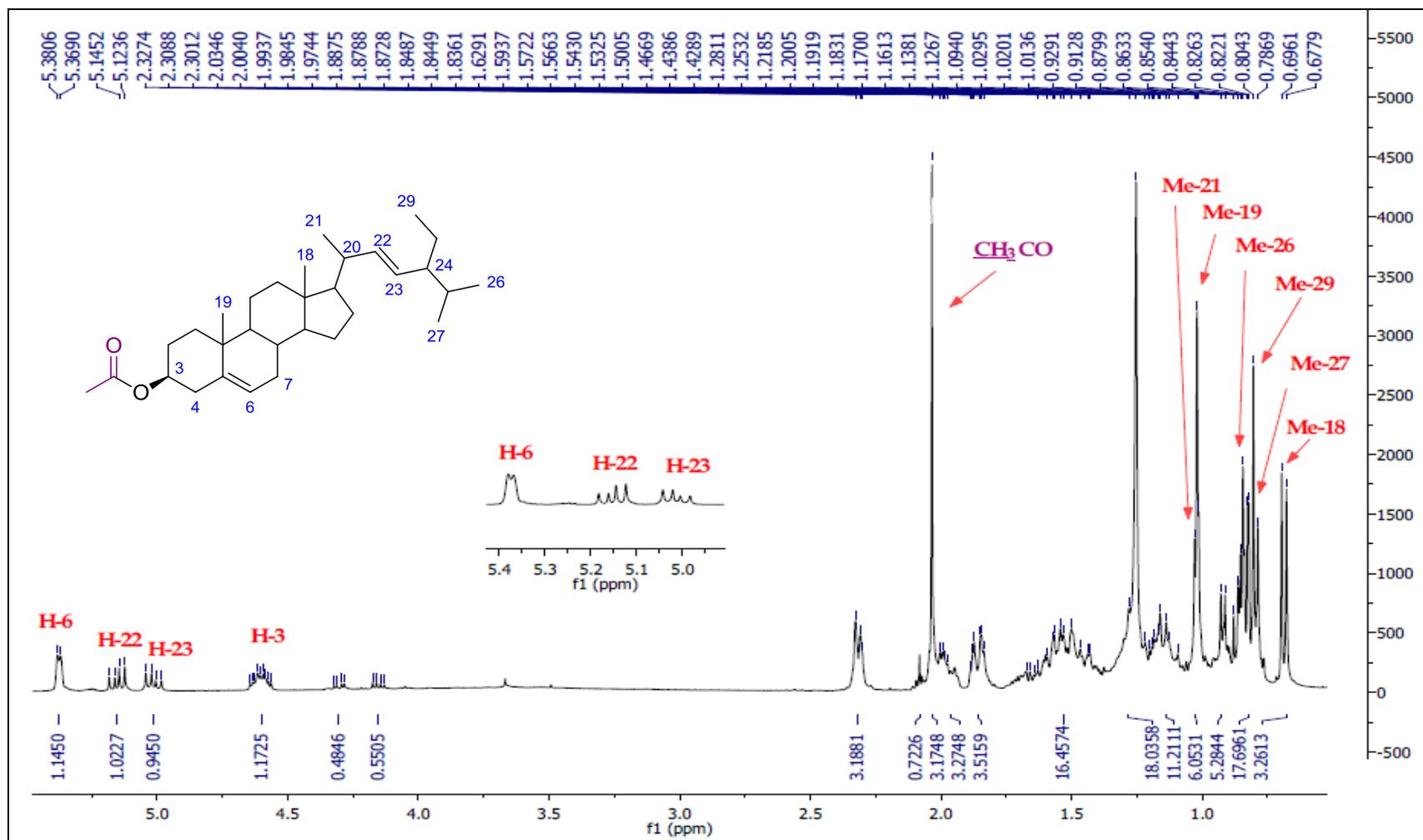


Figura 13. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de (3β, 22E)-acetilestigmasta-5,22-dieno (AF1 Ac)

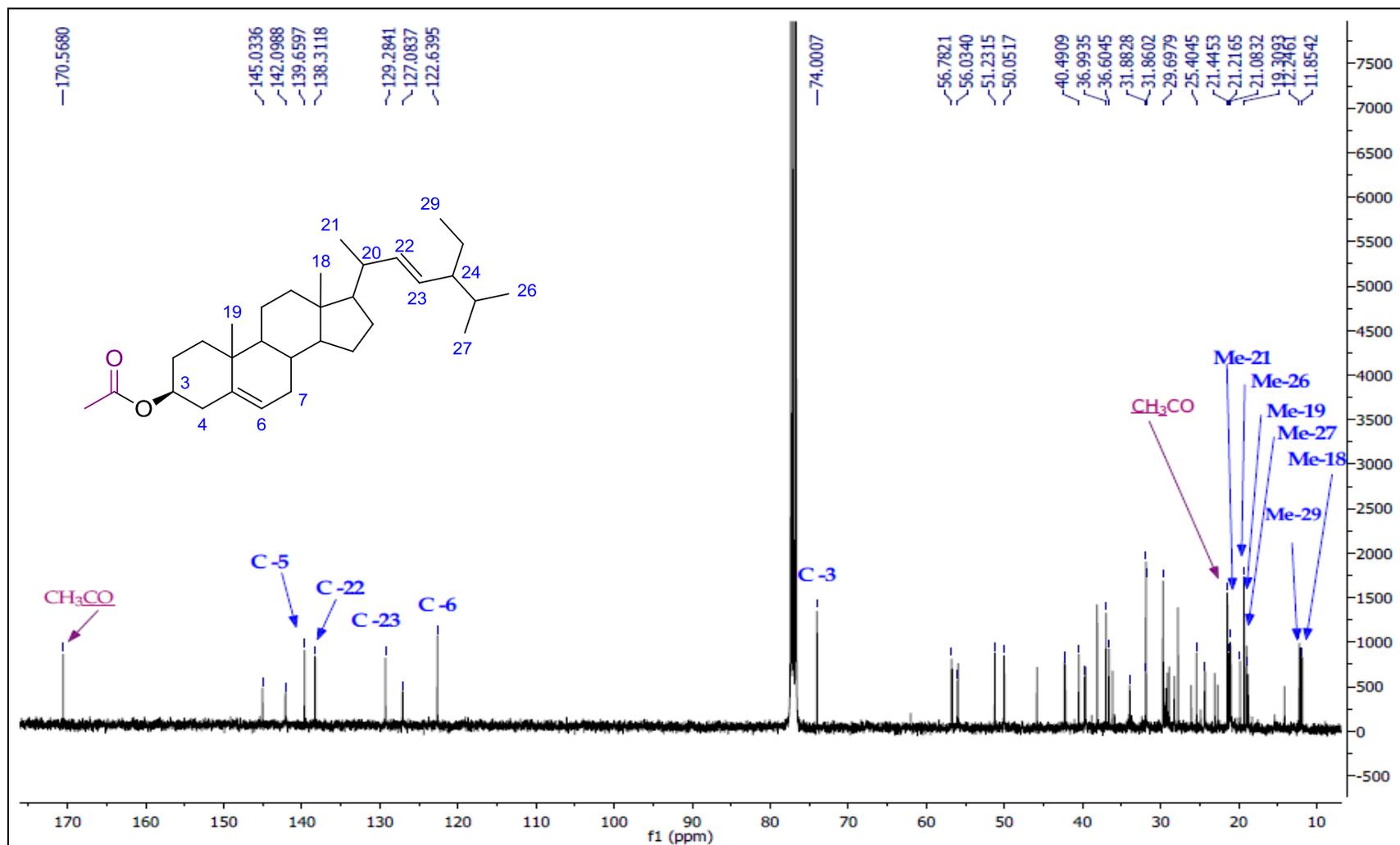


Figura 14. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de (3β, 22E)-acetilestigmas-5,22-dieno (AF1 Ac)

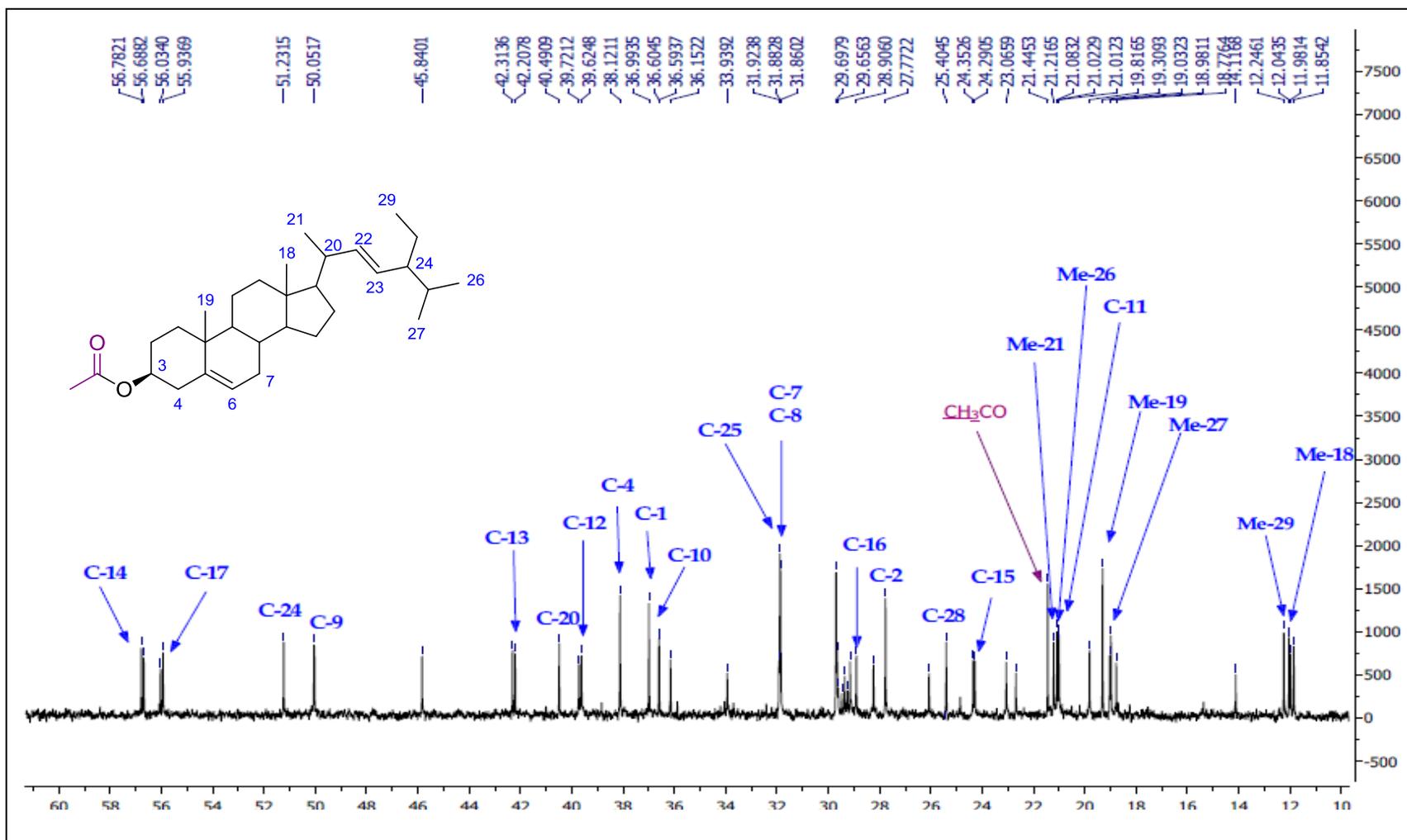


Figura 15. Expansión del espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de (3β, 22E)-acetilestigmas-5,22-dieno (AF1Ac)

### 5.1.1.2 Análisis de AF1Ac por CG-EM

Para determinar la composición química de AF1 Ac, esta se analizó por CG-EM. En el cromatograma se observaron tres picos con diferentes tiempos de retención y área (Figura 10), los cuales se caracterizaron como dos esteroides acetilados y un estigmasteno: 3-acetil-colest-5-en-22-ino, (3 $\beta$ , 22E)-acetilestigmasta-5,22-dieno y estigmastan-3,5-dieno (Figura 16) siendo el (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol el más abundante (Tabla 13). Debido a que las estructuras de los tres compuestos son muy similares no se pudieron separar de manera individual por CC sin embargo se lograron apreciar algunas de sus señales en los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

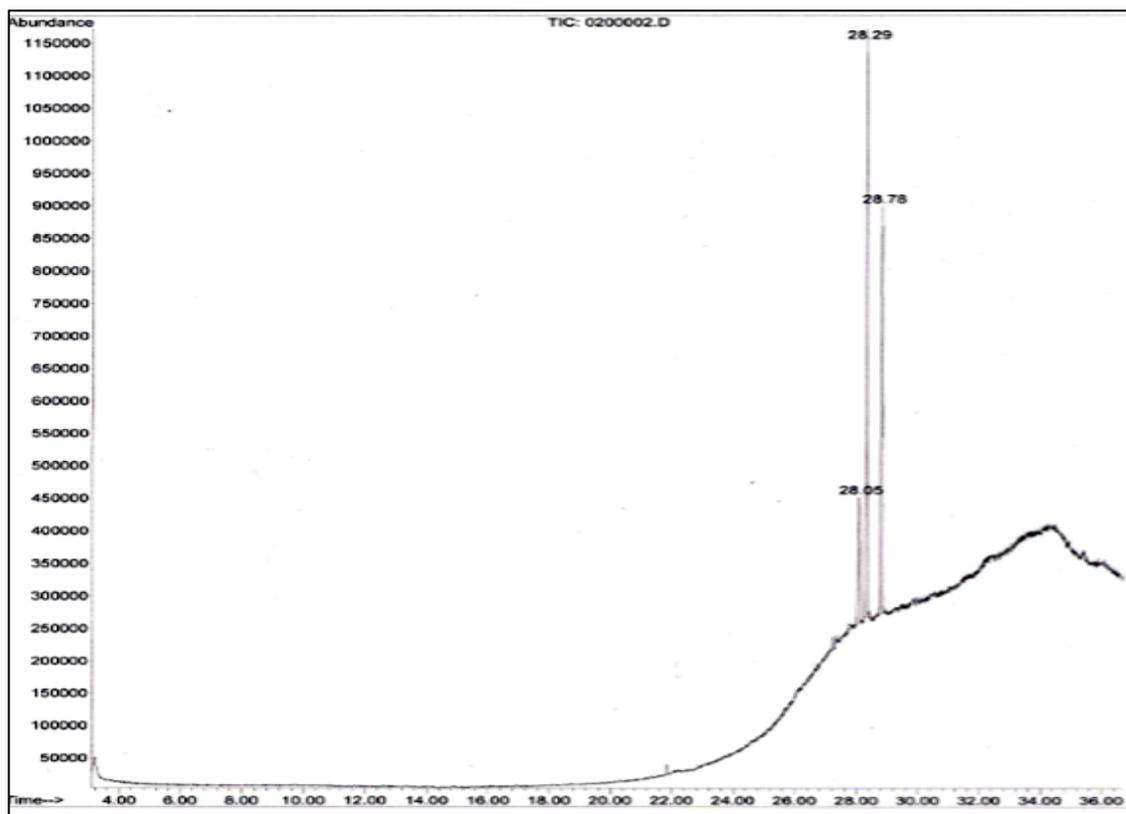
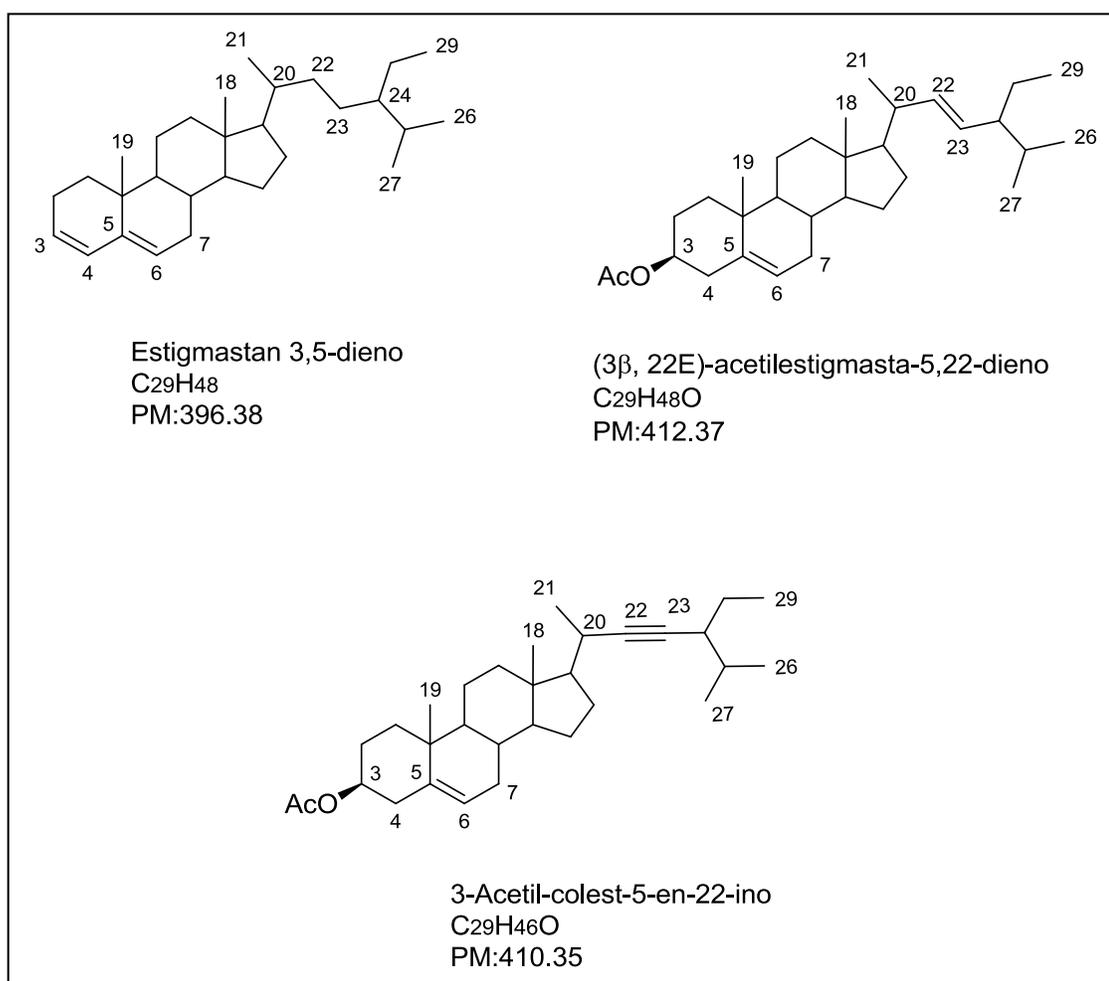


Figura 16. Cromatograma de la muestra AF1Ac.

**Tabla 13.** Resultados de CG-EM de la muestra AF1Ac

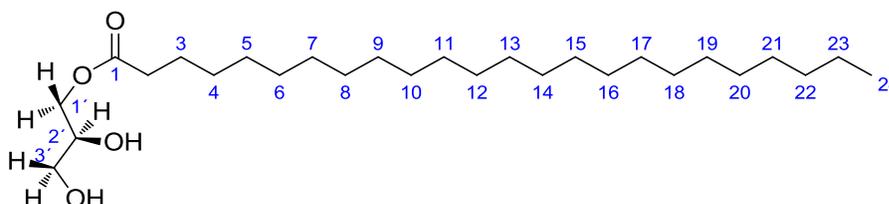
Tiempo de retención (min)	Esterol	Porcentaje %
28.05	3-Acetil-colest-5-en-22-ino	11.50
28.29	(3 $\beta$ , 22E)-Acetilestigmasta-5,22-dieno	51.08
28.78	Estigmastan-3,5-dieno	37.42



**Figura 17.** Estructura química de los esteroides caracterizados por CG-EM de la muestra AF1Ac.

Las señales observadas en los espectros de RMN del (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ol muy probablemente correspondan al Estigmastan-3,5-dieno, ya que es el segundo compuesto mayoritario, además al realizar la acetilación no se observaron señales adicionales ya que el tercer compuesto se encuentra en menor cantidad.

#### 5.1.1.4 Propiedades físicas y espectroscópicas del tetracosanoato de (2S)-2,3-dihidroxi-propilo (AF2)



**Figura 18.** Tetracosanoato de (2S)-2,3-dihidroxi-propilo (AF2)

Sólido color blanco, soluble en  $\text{CHCl}_3$ , pf 67-68°C,  $\text{C}_{27}\text{H}_{54}\text{O}_4$ , PM: 442.40 g/mol. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.88 (t,  $J = 6.78$  Hz, 3H, Me-24), 1.25 (sa, 38H,  $(\text{CH}_2)_{19}$ , C4-C22), 1.50 (sa, 1H, OH-3'), 1.63 (m, 4H, H-3, H-23), 2.04 (s, 1H, OH-2'), 2.35 (t,  $J = 7.58$  Hz, 2H, H-2), 3.60 (dd,  $J = 11.46, 5.78$  Hz, 1H, H-3' $\beta$ ), 3.70 (dd,  $J = 11.46, 3.98$  Hz, 1H, H-3' $\alpha$ ), 3.94 (m, 1H, H-2'), 4.15 (dd,  $J = 11.68, 6.12$  Hz, 1H, H-1' $\beta$ ), 4.21 (dd,  $J = 11.64, 4.6$  Hz, 1H, H-1' $\alpha$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 14.35 (C24), 22.91 (C23), 25.13 (C3), 29.34 (C4), 29.46 (C5), 29.58 (C8), 29.67 (C9), 29.82 (C21), 29.86 (C6), 29.88 (C7), 29.92 (C10-C20), 32.14 (C22), 34.37 (C2), 63.53 (C3'), 65.38 (C1'), 70.48 (C2'), 174.61 (C1).

##### 5.1.1.4.1 Elucidación estructural de tetracosanoato de (2S)-2,3-dihidroxi-propilo (AF2)

Los espectros de RMN de **AF2** muestran señales características de un monoacilglicerol, en este caso del ácido graso de veinticuatro carbonos sin

insaturaciones, que corresponde al ácido lignocérico. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 19) se observa en campos altos un triplete en  $\delta$  0.88 ppm que corresponde al metilo terminal del ácido graso en  $\delta$  1.25 ppm, se observa un singulete ancho que integra para 38 protones los que corresponden a 19 metilenos (H4-H22), en  $\delta$  1.63 ppm se observa un multiplete que integra para cuatro protones de la posición tres y veintitrés de la cadena lateral saturada, el metileno de la posición dos vecino al carbonilo se observa como un triplete en  $\delta$  2.35 ppm. En la región que corresponde al glicérido se observan dos dobles de dobles en  $\delta$  3.6 ppm ( $J = 11.46, 5.78$  Hz) y  $\delta$  3.7 ppm ( $J = 11.46, 3.98$  Hz) que corresponden a los  $\text{H-3}'\beta$  y  $\text{H-3}'\alpha$ , respectivamente, la constante de acoplamiento indica que hay un acoplamiento vecinal y uno geminal, lo mismo sucede para  $\text{H-1}'\beta$  y  $\text{H-1}'\alpha$  que aparecen como dos dobletes de dobletes en  $\delta$  4.15 ppm ( $J = 11.68, 6.12$  Hz) y  $\delta$  4.21 ppm ( $J = 11.64, 4.6$  Hz), en  $\delta$  3.94 se encuentra un multiplete que corresponde a  $\text{H-2}'$ , estas cinco señales confirmaron que era un monoacilglicerol que forma el enlace éster en el  $\text{C1}'$ . Los protones de los dos hidroxilos aparecen como singuletes anchos en  $\delta$  1.50 y 2.04 ppm. Con el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 20) se pudo confirmar estos datos, en el que se observa en  $\delta$  14.35 una señal de metilo terminal, de  $\delta$  22 a 34 ppm se observan señales de veintidós metilenos, de  $\delta$  63 a 70 se observan tres señales de los carbonos del glicérido y en  $\delta$  174 ppm una señal que corresponde al carbonilo del éster. Los datos espectroscópicos correspondieron a los previamente reportados en la literatura para Tetracosanoato de (2S)-2,3-dihidroxipropilo (68, 69).

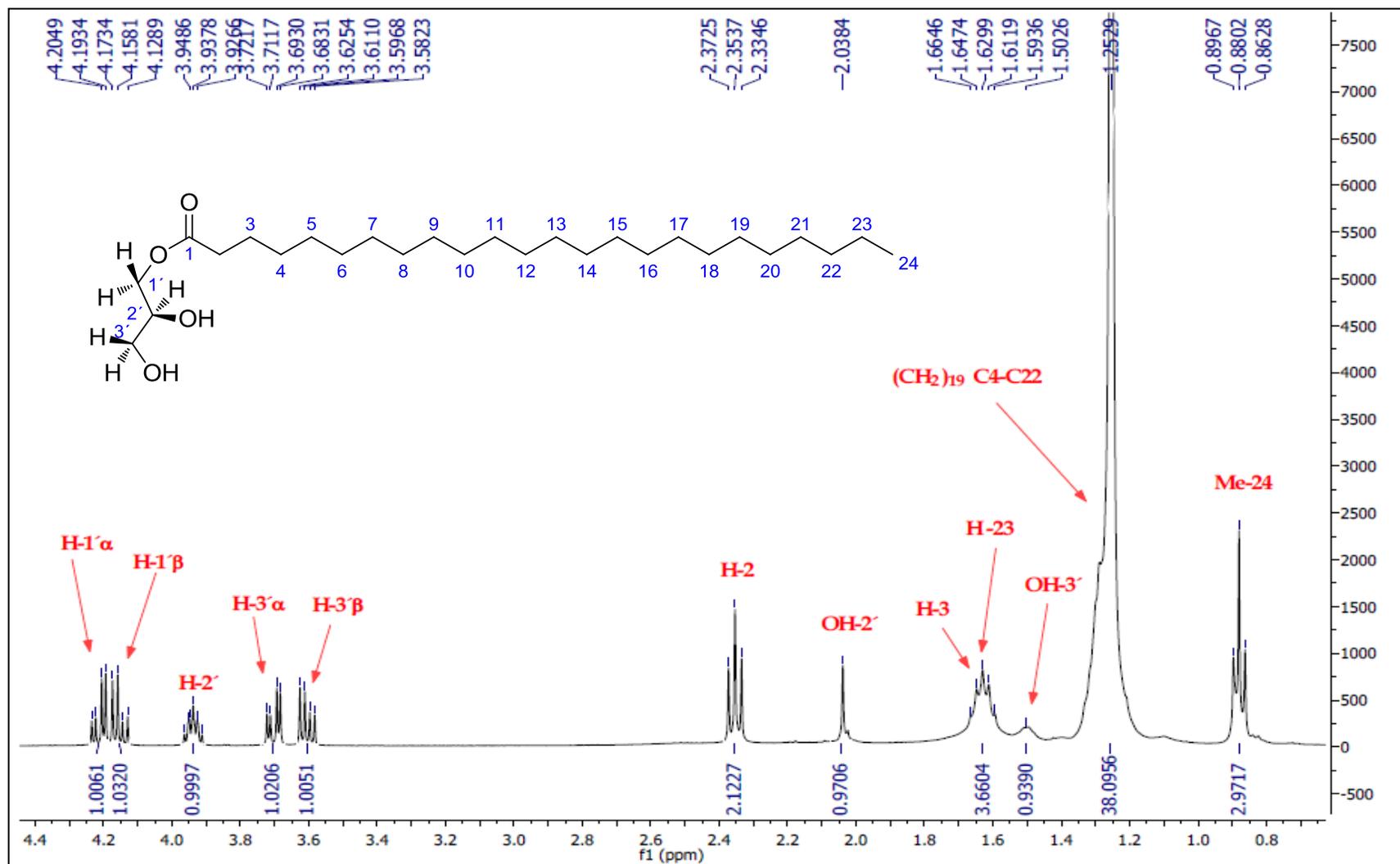


Figura 19. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de Tetracosanoato de (2S)-2,3-dihidroxipropilo (AF2)

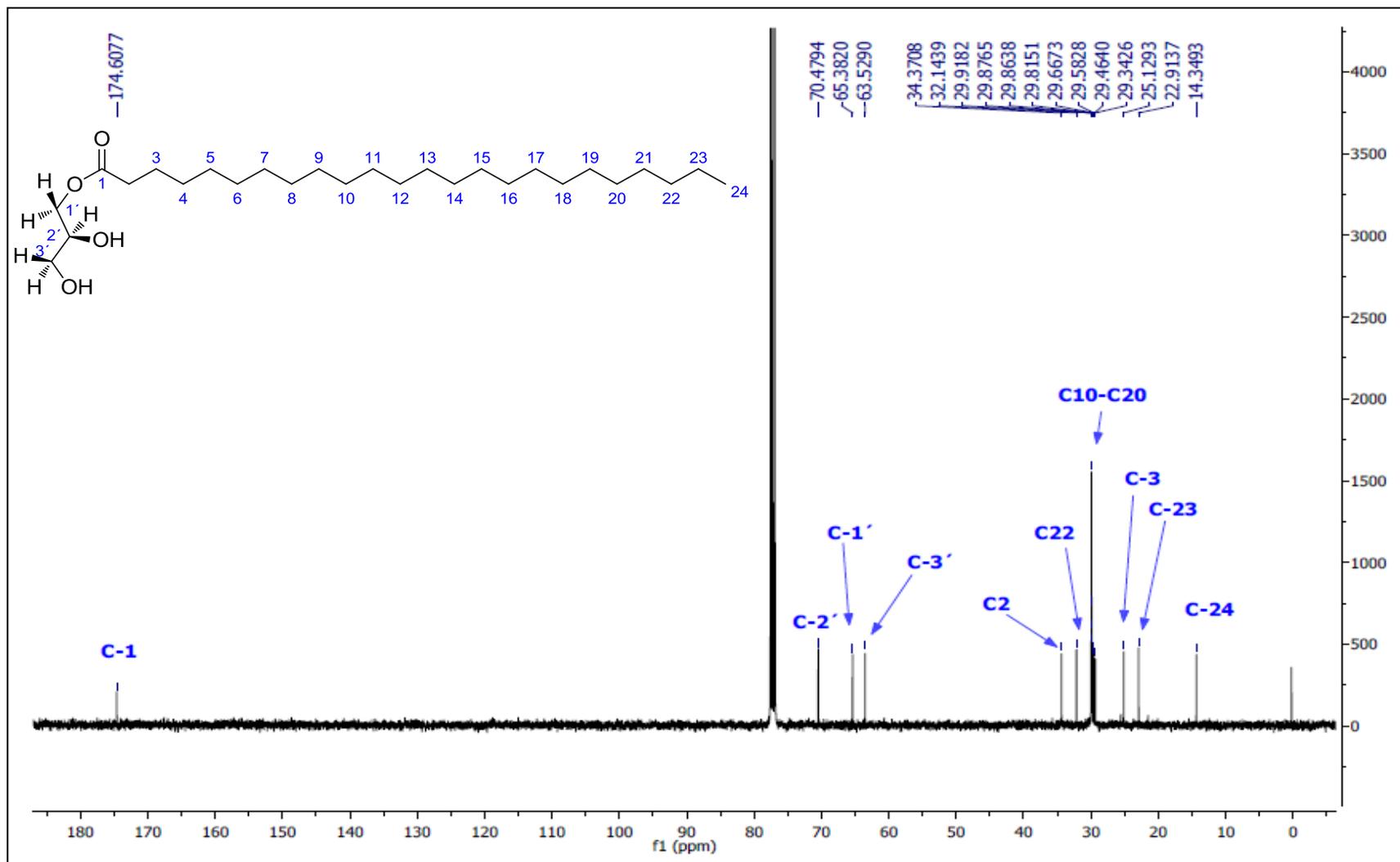
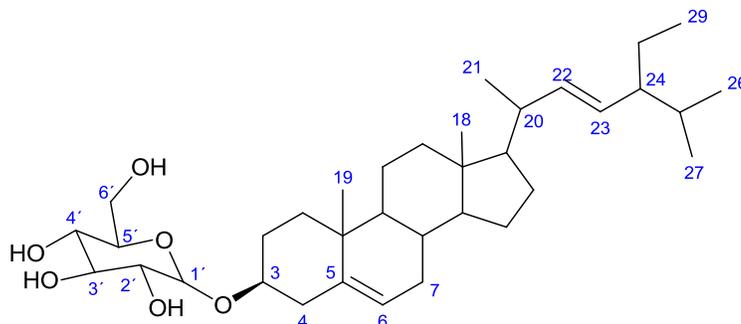


Figura 20. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de Tetracosanoato de (2S)-2, 3-dihidroxiopropilo (AF2)

**5.1.1.5 Propiedades físicas y espectroscópicas del  $\beta$ -D-Glucopiranosido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5,22- dien-3-ilo (AF3)**



**Figura 21.**  $\beta$ - D- Glucopiranosido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5, 22- dien-3-ilo (AF3)

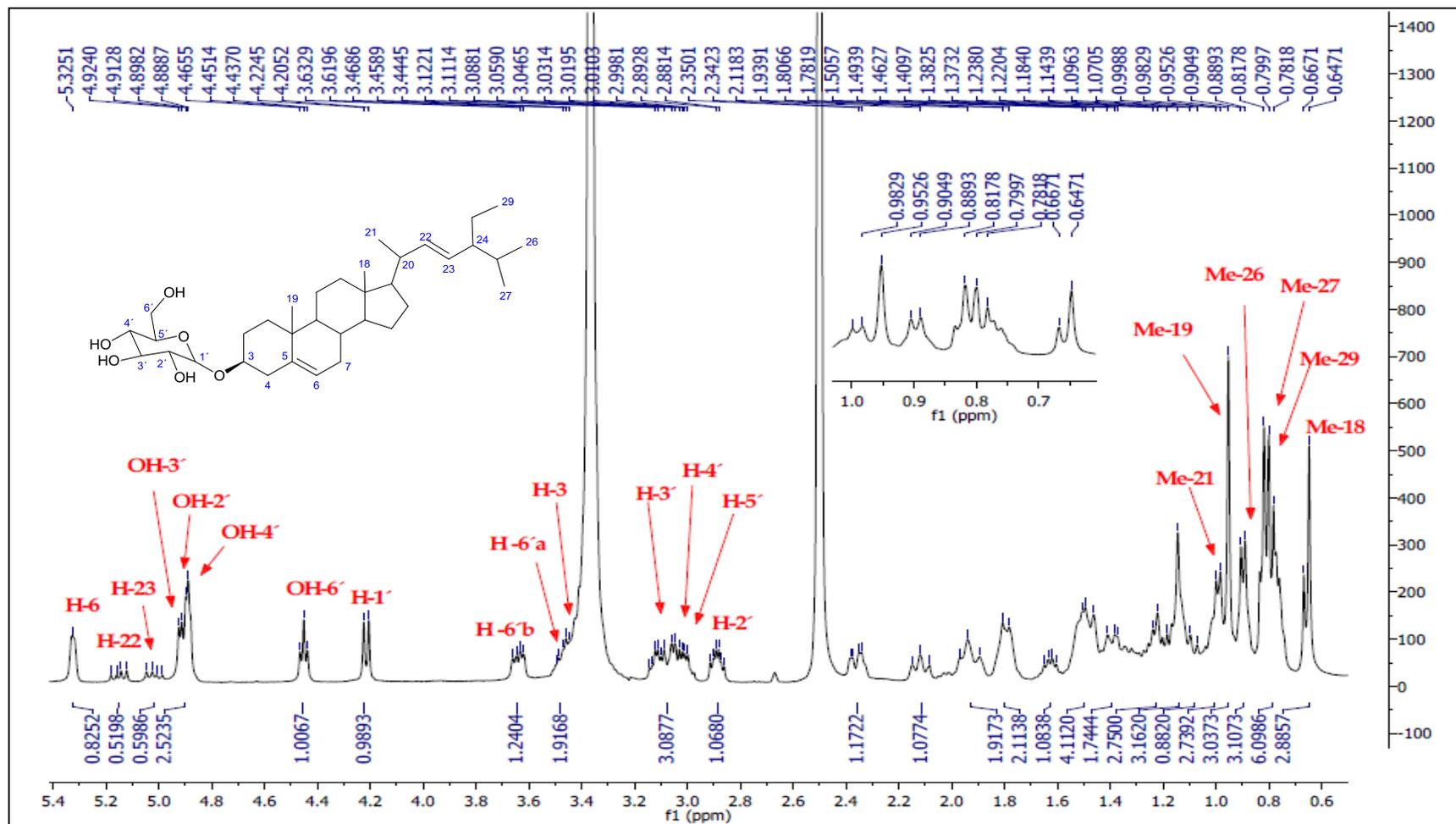
Sólido color beige, soluble en dimetilsulfóxido (DMSO) o piridina, pf 288- 290°C, C<sub>35</sub>H<sub>58</sub>O<sub>6</sub>, PM: 574.42 g/mol. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 0.64 (s, 3H, Me-18), 0.79 (t,  $J$ = 7.40 Hz, 3H, Me-29), 0.80 (d,  $J$ = 7.64 Hz, 3H, Me-27), 0.89 (d,  $J$ = 6.24 Hz, 3H, Me-26), 0.95 (s, 3H, Me-19), 0.99 (d,  $J$ = 6.36 Hz, 3H, Me-21), 2.88 (m, 1H, H-2'), 3.01 (m, 2H, H-5'), 3.04 (m, 2H, 4'), 3.11 (m, 1H, H-3'), 3.46 (m, 1H, H-3), 3.48 (m, 1H, H-6'a), 3.63 (dd,  $J$ = 10.7, 5.4 Hz, 1H, H-6'b), 4.21 (d,  $J$ = 7.72 Hz, 1H, H-1'), 4.45 (t,  $J$ = 5.6 Hz, 1H, OH-6'), 4.88 (sa, 1H, OH-4'), 4.89 (sa, 1H, OH-2'), 4.91 (d,  $J$ = 4.5 Hz, 1H, OH-3'), 5.01 (dd,  $J$ = 15, 8.72, Hz, 1H, H-23), 5.15 (dd,  $J$ = 15.04, 8.62 Hz, 1H, H-22), 5.32 (sa, 1H, H-6). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm): 11.69 (C29), 11.80 (C18), 18.63 (C21), 18.85 (C27), 18.95 (C19), 19.12 (C26), 22.62 (C11), 23.88 (C28), 24.88 (C15), 29.26 (C16), 31.38 (C7, C8), 31.43 (C24, C25), 33.35 (C2), 35.49 (C20), 36.23 (C10), 36.83 (C4), 38.30 (C1), 39 (C12), 41.87 (C13), 49.61 (C9), 55.43 (C17), 56.27 (C14), 61.11 (C6'), 70.12 (C2'), 73.48 (C4'), 76.76 (C5'), 76.92 (C3'), 76.98 (C3), 100.78 (C1'), 121.24 (C6), 130.74 (C23), 138.06 (C22), 140.47 (C5).

#### 5.1.1.5.1 Elucidación estructural de $\beta$ - D- Glucopiranosido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5, 22- dien-3-ilo (AF3)

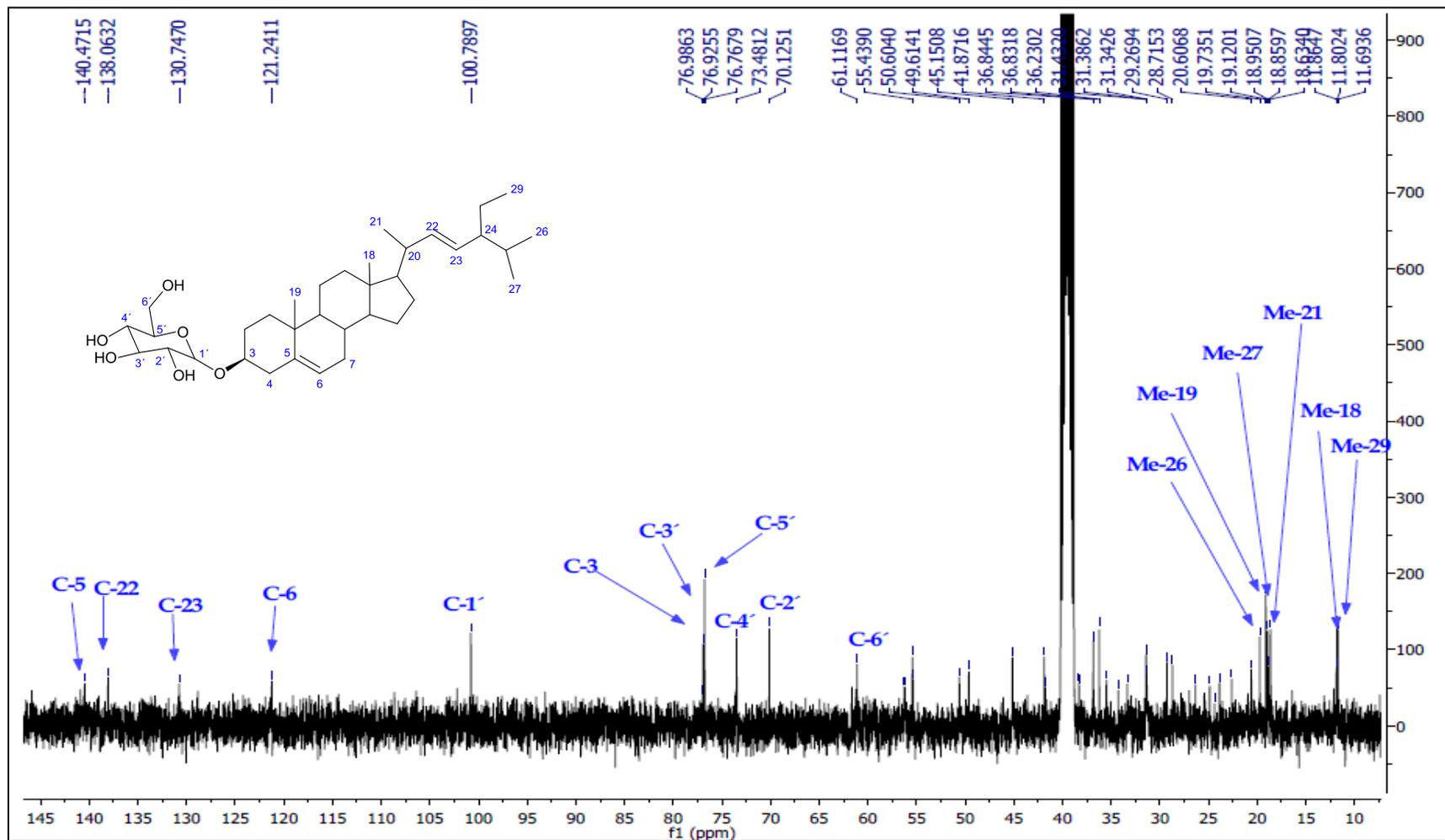
Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de **AF3** exhibieron patrones espectroscópicos relacionados a los glucósidos de fitoesteres, encontrando una similitud con los espectros de RMN del (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22- dien-3-ol. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 22) se apreciaron a campos altos seis señales correspondientes a los seis metilos del (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22- dien-3-ol  $\delta$  (ppm): 0.64 (Me-18), 0.79 (Me-29), 0.80 (Me-27), 0.89 (Me-26), 0.95 (Me-19), 0.99 (Me-21). En  $\delta$  5.01 y 5.15 ppm se observaron dos dobletes de dobletes que corresponden a los a los hidrógenos olefínicos H-23 ( $J= 15, 8.72$  Hz) y H-22 ( $J= 15.04, 8.62$  Hz), en  $\delta$  5.32 ppm se observó un singulete ancho correspondiente al hidrógeno olefínico H-6, en  $\delta$  3.46 ppm se visualizó un multiplete que corresponde al protón H-3. En el rango de  $\delta$  2.88 a 4.21 ppm resuenan seis señales de protones base de alcohol que integran para siete hidrógenos,  $\delta$  2.88 (H-2'), 3.01 (H-5'), 3.04 (H-4'), 3.11 (H-3'), 3.48 (H-6'a), 3.63 (H-6'b), y 4.21 (H-1'), de los cuales la señal en  $\delta$  4.21 ppm es un doblete ( $J = 7.72$  Hz) que corresponde al protón anomérico de una  $\beta$ -D-glucosa. Los datos espectroscópicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 23, Figura 24) corroboran la presencia de la glucosa:  $\delta$  (ppm) 61.11 (C6'), 70.14 (C2'), 73.43 (C4'), 76.75 (C3'), 76.63 (C5'), 100.77 (C1'). Los datos espectroscópicos fueron corroborados con lo reportado en la literatura (70, 71) (Tabla 14). El compuesto **AF8** resultó ser el mismo compuesto que **AF3**, el espectro de RMN también se analizó en piridina deuterada (apéndice A).

**Tabla 14.** Datos espectroscópicos de  $\beta$ -D-Glucopiranosido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5,22-dien-3-ilo (AF3).

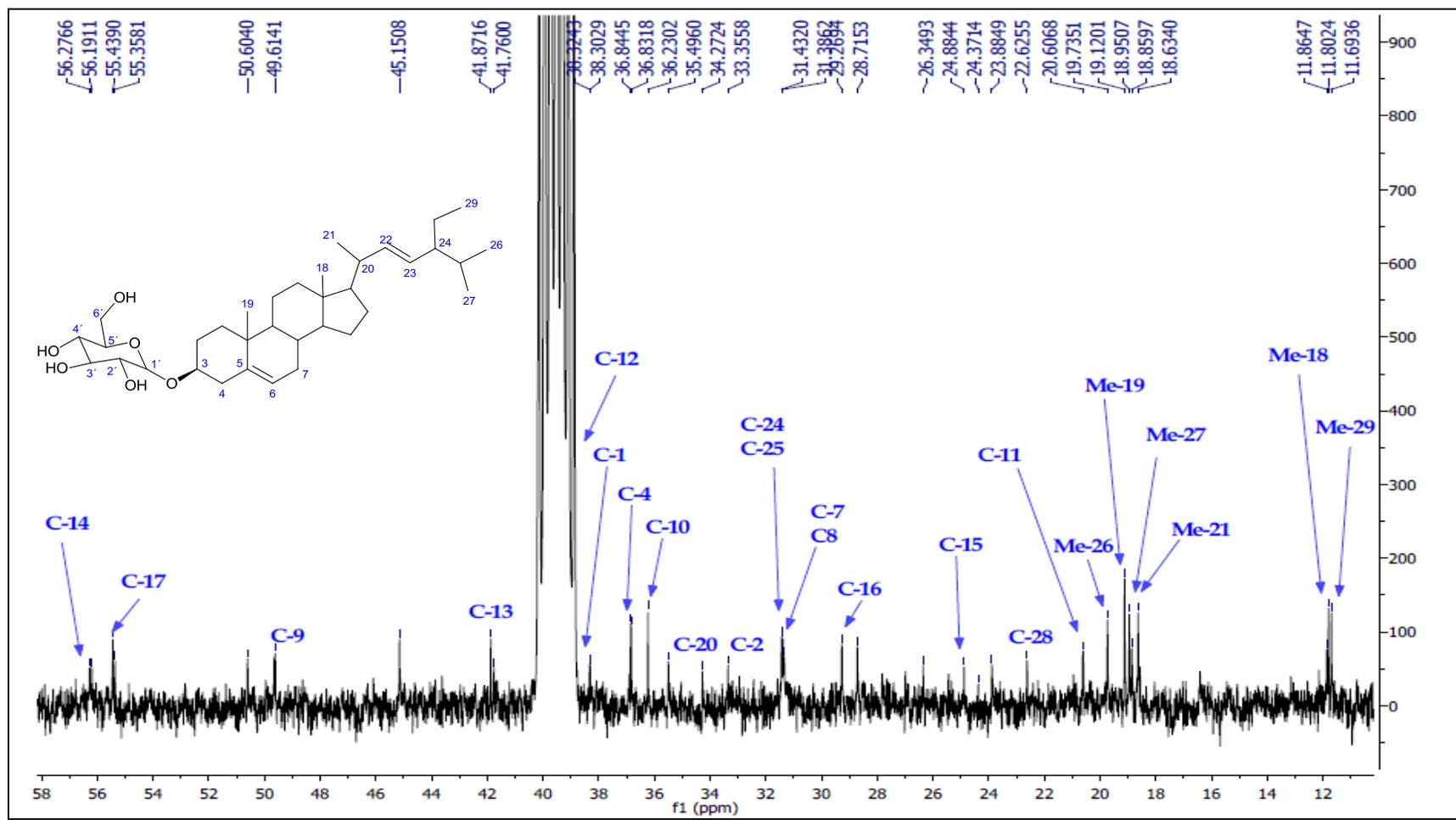
	RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ )		RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, DMSO- $d_6$ )	
	RMN $^1\text{H}$ (70, 71) $\delta_{\text{ppm}}$	RMN $^1\text{H}$ AF3 $\delta_{\text{ppm}}$	RMN $^{13}\text{C}$ (70, 71) $\delta_{\text{ppm}}$	RMN $^{13}\text{C}$ AF3 $\delta_{\text{ppm}}$
1			38.28	38.30
2			33.33	33.35
3	3.46 (m, 1H)	3.46 (m, 1H)	76.95	76.98
4			36.76	36.83
5			140.43	140.47
6	5.31 (sa, 1H)	5.35 (sa, 1H)	121.04	121.24
7			31.30	31.38
8			31.38	31.38
9			49.57	49.61
10			36.15	36.23
11			22.59	22.62
12			41.69	39
13			41.80	41.87
14			56.20	56.27
15			24.72	24.88
16			29.20	29.26
17			56.11	55.43
18	0.64 (s, 3H)	0.64 (s, 3H)	11.76	11.80
19	1.00 (s, 3H)	0.95 (s, 3H)	18.99	18.95
20			35.37	35.49
21	0.97 (d, J=6.23 Hz, 3H)	0.99 (d, J=6.36 Hz, 3H)	18.76	18.63
22	5.14 (m, 1H)	5.15 (dd, J= 15.04, 8.62 Hz, 1H)	137.85	138.06
23	5.00 (m, 1H)	5.01 (dd, J= 15.0, 8.72 Hz, 1H)	128.79	130.74
24			31.20	31.43
25			31.20	31.43
26	0.88 (d, J=6.59 Hz, 3H)	0.89 (d, J= 6.24 Hz, 3H)	19.28	19.12
27	0.81 (d, J=6.96 Hz, 3H)	0.80 (d, J= 7.64 Hz, 3H)	18.89	18.85
28			23.76	23.88
29	0.82 (t, J=7.33 Hz, 3H)	0.79 (t, J=7.40 Hz, 3H)	11.58	11.69
1'	4.23 (d, J=7.8 Hz, 1H)	4.21 (d, J=7.72 Hz, 1H)	100.77	100.78
2'	2.91 (m, 1H)	2.88 (m, 1H)	70.14	70.12
3'	3.15 (m, 1H)	3.11 (m, 1H)	76.75	76.92
4'	3.08 (m, 1H)	3.04 (m, 1H)	73.43	73.48
5'	3.04 (m, 1H)	3.01 (m, 1H)	76.63	76.76
6'a	3.50 (m, 1H)	3.48 (m, 1H)	61.10	61.11
6'b	3.66 (m, 1H)	3.63 (dd, J= 10.7, 5.4 Hz, 1H)		
OH-2'	4.73 (sa, 1H)	4.89 (sa, 1H)		
OH-3'	4.75 (sa, 1H)	4.91 (d, J=4.5 Hz, 1H)		
OH-4'	4.71 (sa, 1H)	4.88 (sa, 1H)		
OH-6'	4.30 (t, J=6.0 Hz, 1H)	4.45 (t, J=5.6 Hz, 1H)		



**Figura 22.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) del β- D- Glucopiranosido de (3β, 22 E)-estigmasta-5, 22- dien-3-ilo (AF3)

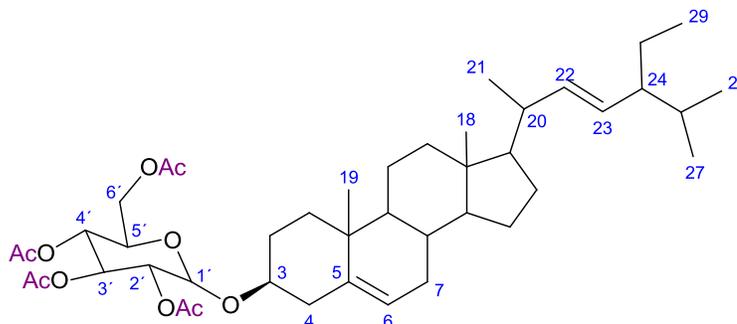


**Figura 23.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ) del  $\beta$ -D-Glucopiranosido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5, 22-dien-3-ilo (AF3)



**Figura 24.** Expansión del espectro de de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ) del  $\beta$ - D- Glucopiranosido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5, 22- dien-3-ilo (AF3)

### 5.1.1.6 Propiedades físicas y espectroscópicas del $\beta$ -D-tetraacetilglucopiranosido de (3 $\beta$ ,22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ilo (AF3Ac)



**Figura 25.**  $\beta$ -D-tetraacetilglucopiranosido de (3 $\beta$ ,22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ilo (AF3Ac)

Sólido color blanco, soluble en  $\text{CHCl}_3$ , punto de fusión de 144-147 °C,  $\text{C}_{43}\text{H}_{66}\text{O}_{10}$ , PM: 742.98 g/mol. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.67 (s, 3H, Me-18), 0.80 (t,  $J=7.24$  Hz, 3H, Me-29), 0.83 (d,  $J=7.04$  Hz, 3H, Me-27), 0.91 (d,  $J=6.44$  Hz, 3H, Me-26), 0.98 (s, 3H, Me-19), 1.02 (d,  $J=6.64$  Hz, 3H, Me-21), 2.00 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO-3}'$ ), 2.02 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO-2}'$ ), 2.05 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO-4}'$ ), 2.08 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO-6}'$ ), 3.48 (m, 1H, H-3), 3.67 (m, 1H, H-2'), 4.1 (dd,  $J=12.2, 2.88$  Hz, 1H, H-6'a), 4.26 (dd,  $J=12.22, 4.82$  Hz, 1H, H-6'b), 4.59 (d,  $J=8.0$  Hz, 1H, H-1'), 4.96 (t,  $J=9.48$  Hz, 1H, H-3'), 5.03 (dd,  $J=14.16, 5.56$  Hz, 1H, H-23), 5.07 (t,  $J=9.68$  Hz, 1H, H-5'), 5.13 (dd,  $J=15.16, 6.52$  Hz, 1H, H-22), 5.20 (t,  $J=9.52$  Hz, 1H, H-4') 5.36 (da,  $J=4.84$  Hz, 1H, H-6). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 11.89(C29), 12.02 (C18), 18.81 (C21), 19.07(C27), 19.39 (C19), 19.85 (C26), 20.65 ( $\text{CH}_3\text{CO-6}'$ ), 20.68 ( $\text{CH}_3\text{CO-4}'$ ), 20.76 ( $\text{CH}_3\text{CO-3}'$ ), 20.80 ( $\text{CH}_3\text{CO-2}'$ ), 21.08 (C11), 23.10 (C28), 24.33 (C15), 28.27 (C16), 29.48 (C24), 31.90 (C8, C25), 31.98 (C7), 33.98 (C-2), 36.16 (C20), 36.76 (C10), 37.23 (C1), 38.95 (C4), 39.77 (C12), 42.36 (C13), 50.20 (C9), 56.09 (C17), 56.79 (C14), 62.15 (C6'), 68.53 (C4'), 71.54 (C3'), 71.73 (C5'), 72.96 (C3), 80.12 (C2'), 99.68 (C1'), 122.20 (C6), 129.34 (C23), 138.32 (C22), 140.40 (C5), 169.34 ( $\text{CH}_3\text{CO-3}'$ ), 169.44 ( $\text{CH}_3\text{CO-4}'$ ), 170.40 ( $\text{CH}_3\text{CO-2}'$ ), 170.74 ( $\text{CH}_3\text{CO-6}'$ ).

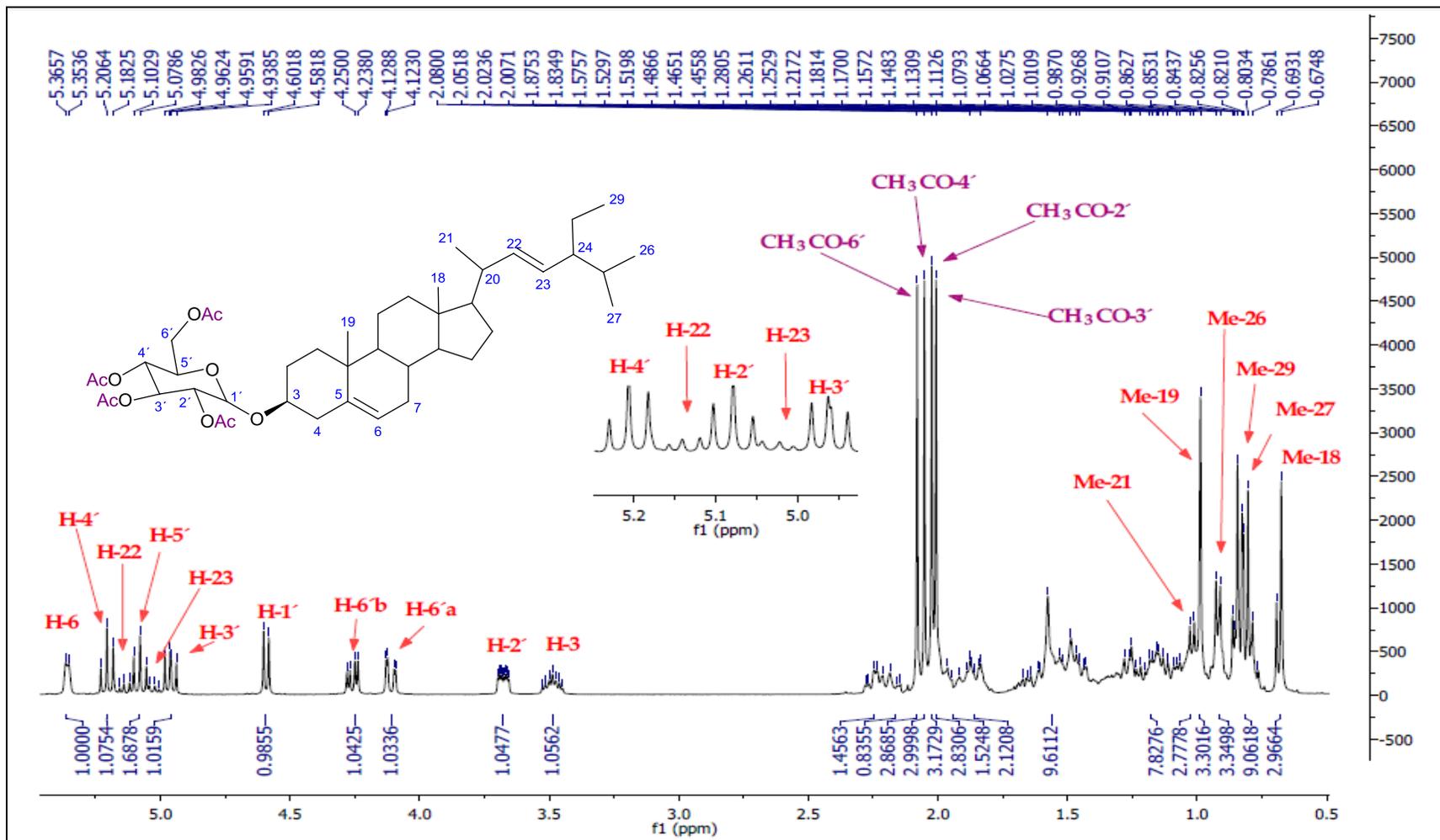
### 5.1.1.6.1 Elucidación estructural de $\beta$ -D-tetraacetilglucopiranosido de (3 $\beta$ ,22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ilo (AF3Ac)

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 26) mostró datos espectroscópicos similares al (3 $\beta$ ,22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ilo, teniendo en campos altos seis señales correspondientes a seis metilos en  $\delta$  (ppm): 0.67 (Me-18), 0.80 (Me-29), 0.83 (Me-27), 0.91 (Me-26), 0.98 (Me-19), 1.02 (Me-21). En  $\delta$  5.03 y en 5.13 ppm se presentaron dos dobletes de dobletes que corresponden a los protones olefínicos H-23 ( $J= 5.56, 14.16$  Hz) y H-22 ( $J= 15.16, 6.52$  Hz), respectivamente y en  $\delta$  5.36 ppm se presentó un doblete ancho del protón olefínico H-6. De forma adicional se observan cuatro singuletes de grupos acetilo de la azúcar acetilada  $\delta$  (ppm): 2.00 ( $\text{CH}_3\text{CO-3}'$ ), 2.02 ( $\text{CH}_3\text{CO-2}'$ ), 2.05 ( $\text{CH}_3\text{CO-4}'$ ), 2.08 ( $\text{CH}_3\text{CO-6}'$ ), siete hidrógenos vecinos a un grupo éster  $\delta$  (ppm): 3.67 (m, H-2'), H-6' se observó a  $\delta$  4.1 ppm (dd,  $J=12.2, 2.88$  Hz, H-6'a) y 4.26 (dd,  $J=12.22, 4.82$  Hz, H-6'b), el protón anomérico (H-1') resuena en 4.59 ppm con una  $J = 8.0$  Hz confirmando la orientación  $\beta$  de la glucosa por el acoplamiento axial-axial con el protón H-2', además se observó las otras señales del azúcar:  $\delta$  (ppm): 4.96 (t,  $J= 9.48$  Hz, H-3'), 5.07 (t,  $J= 9.68$  Hz, H-5'), y 5.20 (t,  $J=9.52$  Hz, H-4'). Se confirmó con el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 27, Figura 28), la acetilación de la glucosa con las señales de los cuatro metilos unidos al grupo carbonilo del éster en  $\delta$  (ppm): 20.65 ( $\text{CH}_3\text{CO-6}'$ ), 20.68 ( $\text{CH}_3\text{CO-4}'$ ), 20.76 ( $\text{CH}_3\text{CO-3}'$ ), 20.80 ( $\text{CH}_3\text{CO-2}'$ ) y cuatro carbonilos de éster en  $\delta$  (ppm): 169.34 ( $\text{CH}_3\text{CO-3}'$ ), 169.44 ( $\text{CH}_3\text{CO-4}'$ ), 170.40 ( $\text{CH}_3\text{CO-2}'$ ), y 170.74 ( $\text{CH}_3\text{CO-6}'$ ). Los

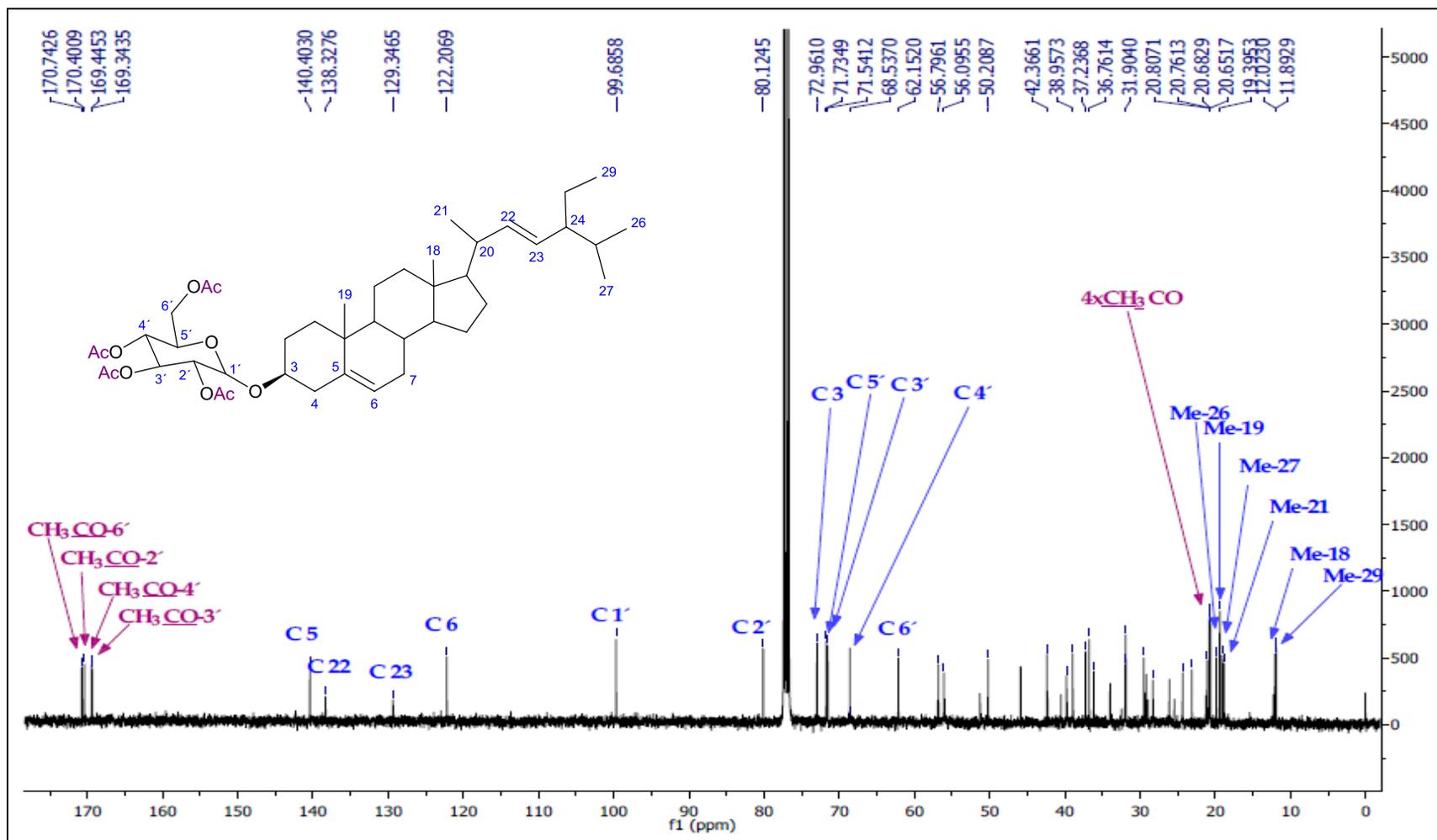
datos espectroscópicos de este derivado están de acuerdo con reportadas previamente por Alam y colaboradores (71)(Tabla 15).

**Tabla 15.** Datos espectroscópicos de  $\beta$ -D-tetraacetilglucopiranosido de (3 $\beta$ ,22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ilo (AF3Ac)

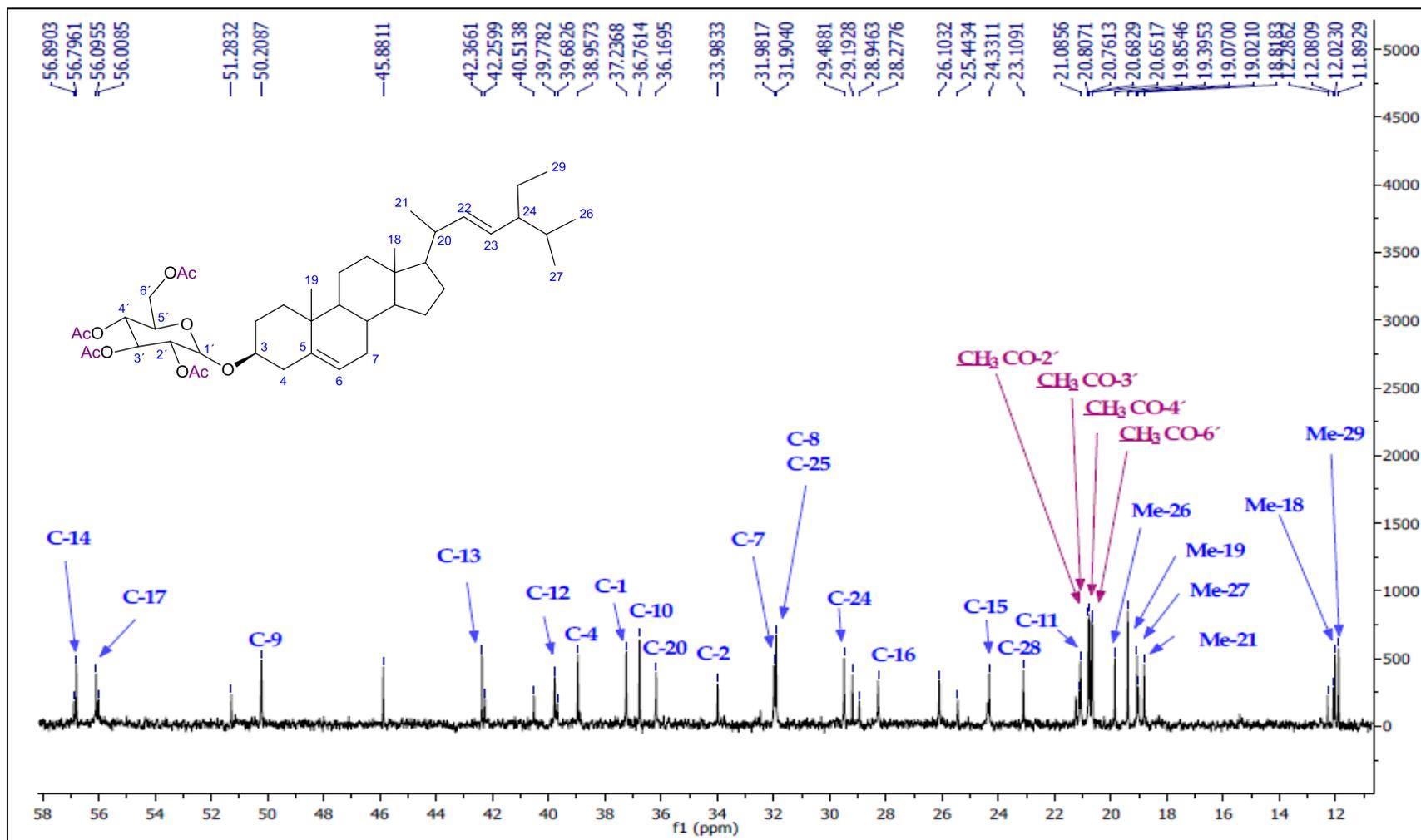
	RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ )		RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, DMSO- $d_6$ )	
	RMN $^1\text{H}$ (71) $\delta_{\text{ppm}}$	RMN $^1\text{H}$ AF3 $\delta_{\text{ppm}}$	RMN $^{13}\text{C}$ (71) $\delta_{\text{ppm}}$	RMN $^{13}\text{C}$ AF3 $\delta_{\text{ppm}}$
1			37.20	37.23
2			33.94	33.98
3	3.45 (m, 1H)	3.48 (m, 1H)	72.92	72.96
4			39.73	38.95
5			140.36	140.40
6	5.33 (sa, 1H)	5.36 (da, $J= 4.84\text{Hz}$ , 1H)	122.16	122.20
7			31.94	31.98
8			31.87	31.90
9			50.17	50.20
10			36.13	36.76
11			21.20	21.08
12			40.45	39.77
13			42.33	42.36
14			56.75	56.79
15			24.29	24.33
16			28.22	28.27
17			56.05	56.09
18	0.65 (s, 3H)	0.67 (s, 3H)	11.98	12.02
19	1.00 (s, 3H)	0.98 (s, 3H)	19.34	19.39
20			36.72	36.16
21	0.99 (d, $J=6.60\text{ Hz}$ , 3H)	1.02 (d, $J= 6.64\text{ Hz}$ , 3H)	18.77	18.81
22	5.16 (m, 1H)	5.13 (dd, $J= 15.16, 6.52\text{ Hz}$ , 1H)	137.27	138.32
23	5.05 (m, 1H)	5.03 (dd, $J= 14.16, 5.56\text{ Hz}$ , 1H)	129.31	129.34
24			29.16	29.48
25			31.87	31.90
26	0.89 (d, $J=6.59\text{ Hz}$ , 3H)	0.91 (d, $J= 6.44\text{ Hz}$ , 3H)	19.80	19.85
27	0.81 (d, $J=6.96\text{ Hz}$ , 3H)	0.83 (d, $J= 7.04\text{ Hz}$ , 3H)	19.03	19.07
28			23.07	23.10
29	0.83 (t, $J=7.32\text{ Hz}$ , 3H)	0.80 (t, $J=7.24\text{ Hz}$ , 3H)	11.85	11.89
1'	4.57 (d, $J=8.06\text{ Hz}$ , 1H)	4.59 (d, $J= 8.0\text{ Hz}$ , 1H)	99.64	99.68
2'	3.45 (m, 1H)	3.67 (m, 1H)	80.07	80.12
3'	3.48 (m, 1H)	4.96 (t, $J=9.48\text{ Hz}$ , 1H)	71.51	71.54
4'	5.03 (m, 1H)	5.20 (t, $J= 9.52\text{ Hz}$ , 1H)	68.55	68.53
5'	4.91 (m, 1H)	5.07 (t, $J= 9.68\text{ Hz}$ , 1H)	71.55	71.73
6'a	4.81 (m, 1H)	4.26 (dd, $J= 12.22, 4.82\text{ Hz}$ , 1H)	62.10	62.15
6'b	4.08 (m, 1H)	4.11 (dd, $J= 12.2, 2.88\text{ Hz}$ , 1H)		
CH <sub>3</sub> CO-2'	1.99 (s, 3H)	2.02 (s, 3H)	21.20	20.80
CH <sub>3</sub> CO-3'	1.98 (s, 3H)	2.00 (s, 3H)	21.04	20.76
CH <sub>3</sub> CO-4'	2.02 (s, 3H)	2.05 (s, 3H)	20.76	20.68
CH <sub>3</sub> CO-6'	2.05 (s, 3H)	2.08 (s, 3H)	20.71	20.65
CH <sub>3</sub> CO-2			170.35	170.40
CH <sub>3</sub> CO-3			169.30	169.34
CH <sub>3</sub> CO-4			169.40	169.44
CH <sub>3</sub> CO-6			170.69	170.74



**Figura 26.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del  $\beta$ -D-tetraacetilglucopiranosido de (3 $\beta$ ,22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ilo (AF3Ac)



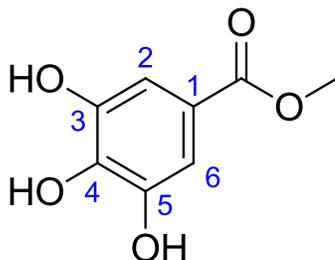
**Figura 27.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del  $\beta$ -D-tetraacetilglucopiranosido de (3 $\beta$ ,22E)-estigmasta-5,22-dien-3-ilo



**Figura 28.** Expansión del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CHCl}_3$ ) del  $\beta$ -D-tetraacetilglucopiranosido de (3 $\beta$ ,22E)-estigma-5,22-dien-3-ilo

## 5.1.2 Caracterización y elucidación estructural de compuestos del extracto metanólico

### 5.1.2.1 Propiedades físicas y espectroscópicas del galato de metilo (AF4)



**Figura 29.** Galato de metilo (AF4)

Sólido o cristales color blanco, soluble en acetona, pf 198- 200°C, C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>5</sub>, PM: 184.15 g/mol. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 3.78 (s, 3H, OMe), 7.11 (s, 2H, H-2, H-6), 8.17 (s, 3H, OH). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 51.01 (OMe), 108.92 (C2, C6), 120.93 (C1), 137.82 (C4), 145.16 (C3, C5), 166.27 (C=O).

#### 5.1.2.1.1 Elucidación estructural de galato de metilo (AF4)

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 30) se observaron tres singuletes que integran para un total de 8 protones, dos de esas señales se localizan en la región aromática, en δ 7.11 ppm se encuentra un singulete que integra para dos protones magnéticamente iguales H-2 y H-6, y en δ 8.17 ppm se observó un singulete ancho que integra para 3 protones de hidroxilos fenólicos. En δ 3.78

ppm resuena un singulete que corresponde a un metilo de éster. Estos datos fueron corroborados con el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 31) donde se observan un total de seis señales: en  $\delta$  51.01 ppm resuena el metilo de un éster, en  $\delta$  108.92 ppm dos carbonos aromáticos magnéticamente iguales (C2, C6), en  $\delta$  120.93 ppm un carbono aromático que soporta un carbonilo, en  $\delta$  137.82 ppm un carbono aromático que está unido a un grupo hidroxilo, en  $\delta$  145.16 ppm dos carbonos aromáticos magnéticamente iguales que están unidos cada uno a un grupo hidroxilo y en  $\delta$  166.27 ppm resuena el grupo carbonilo de un éster. La comparación de los datos observados en RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  con los reportados en la literatura (52, 72) permitieron establecer que la estructura corresponde al galato de metilo

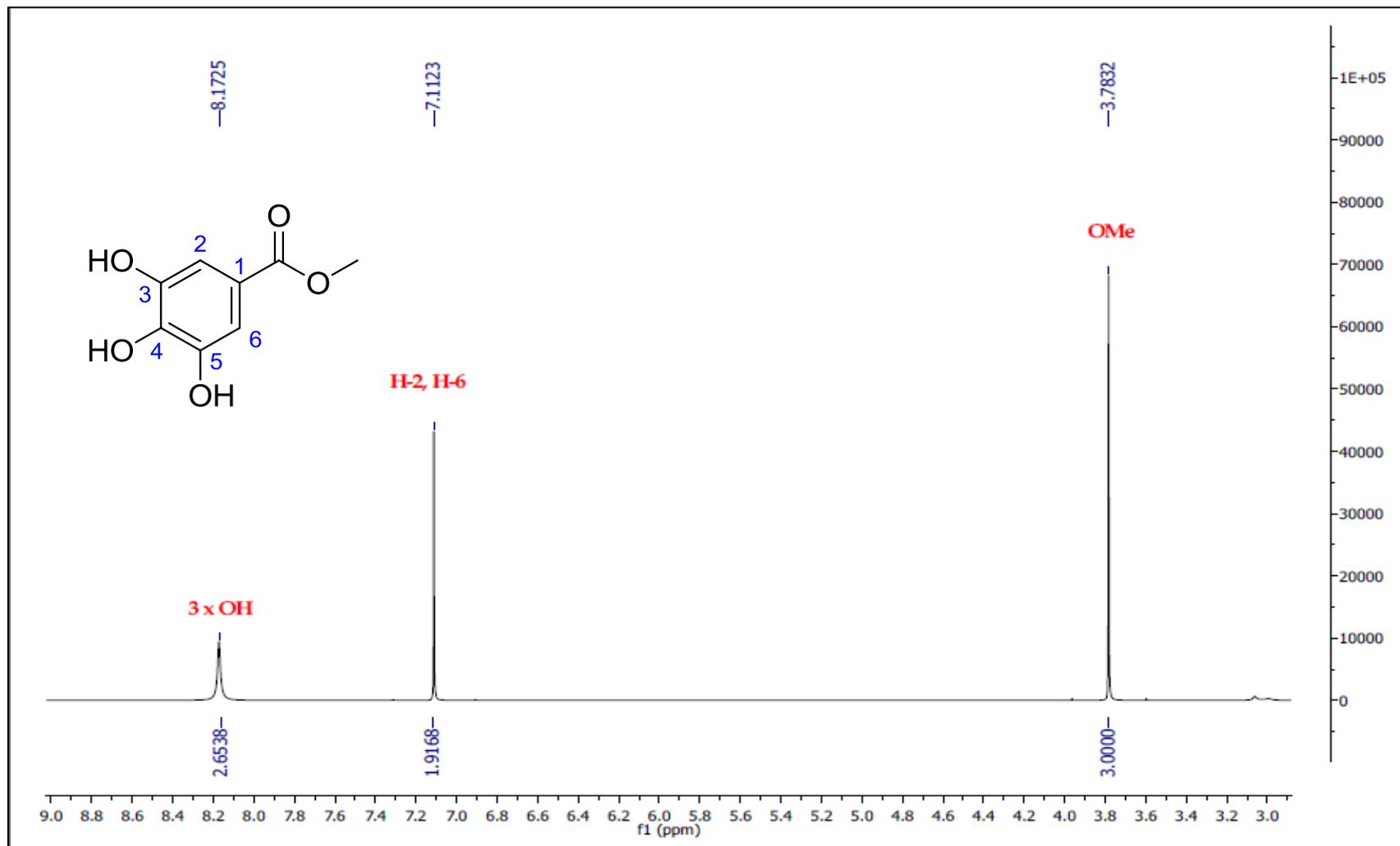
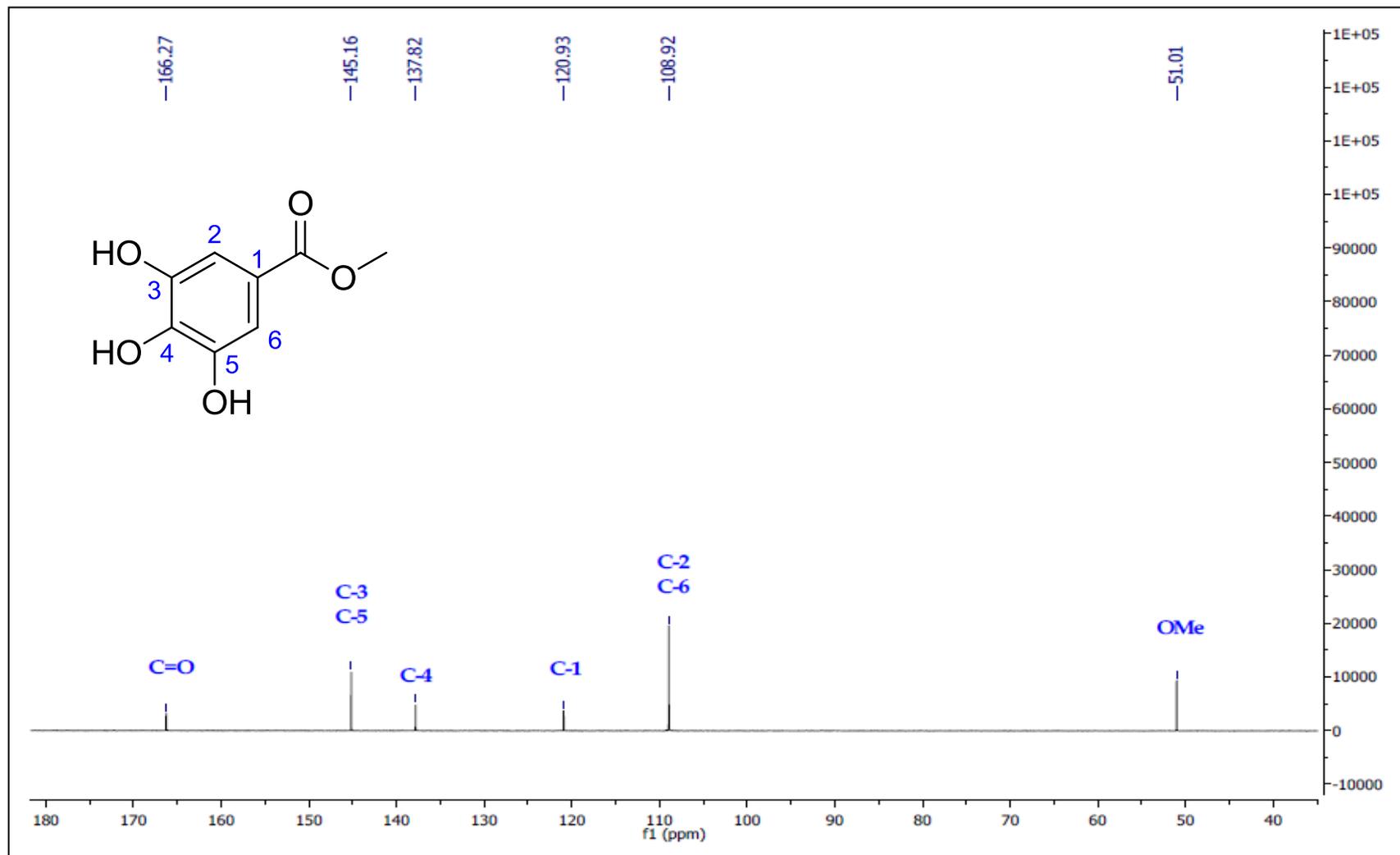
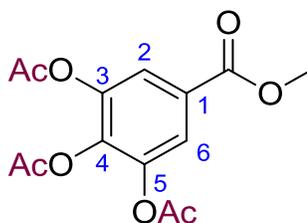


Figura 30. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, Acetona- $d_6$ ) del galato de metilo (AF4)



**Figura 31.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, Acetona- $d_6$ ) del galato de metilo (AF4)

### 5.1.2.2 Propiedades físicas y espectroscópicas del galato de metilo triacetilado (AF4 Ac)



**Figura 32.** Galato de metilo triacetilado (AF4 Ac)

Sólido color blanco, soluble en  $\text{CHCl}_3$ , pf 121-123 °C,  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_8$ . PM: 184.15 g/mol. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.32 (s, 9H, 3x  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 3.92 (s, 3H, OMe), 7.82 (s, H-2, H-6). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 20.17 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ -4), 20.58 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ -3,  $\text{CH}_3\text{CO}$ -5), 52.57 (OCH<sub>3</sub>), 122.22 (C2, C6), 128.29 (C1), 138.58 (C4), 143.39 (C3, C5), 164.90 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ -1), 166.44 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ -4), 167.61 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ -3,  $\text{CH}_3\text{CO}$ -5).

#### 5.1.2.2.1 Elucidación estructural del galato de metilo triacetilado

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del galato de metilo triacetilado muestra un patrón de señales muy similar al galato de metilo, en el espectro RMN de  $^1\text{H}$  (figura 33) se observó el singulete del metilo de un éster en  $\delta$  3.92 ppm, en la región aromática se observaron dos hidrógenos magnéticamente equivalentes ( $\delta$  7.82 ppm, H-2, H-6), de forma adicional aparece un singulete en  $\delta$  2.32 ppm que integra para nueve protones, indicando que el galato de metilo se acetiló en los tres hidroxilos, lo anterior se corroboró con el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (figura 34), donde se apreciaron dos señales en  $\delta$  20.17 y 20.58 ppm que corresponden a los  $\text{CH}_3\text{CO}$ , y sus correspondientes carbonilos resuenan en  $\delta$  164.90, 166.44 y 167.61 ppm.

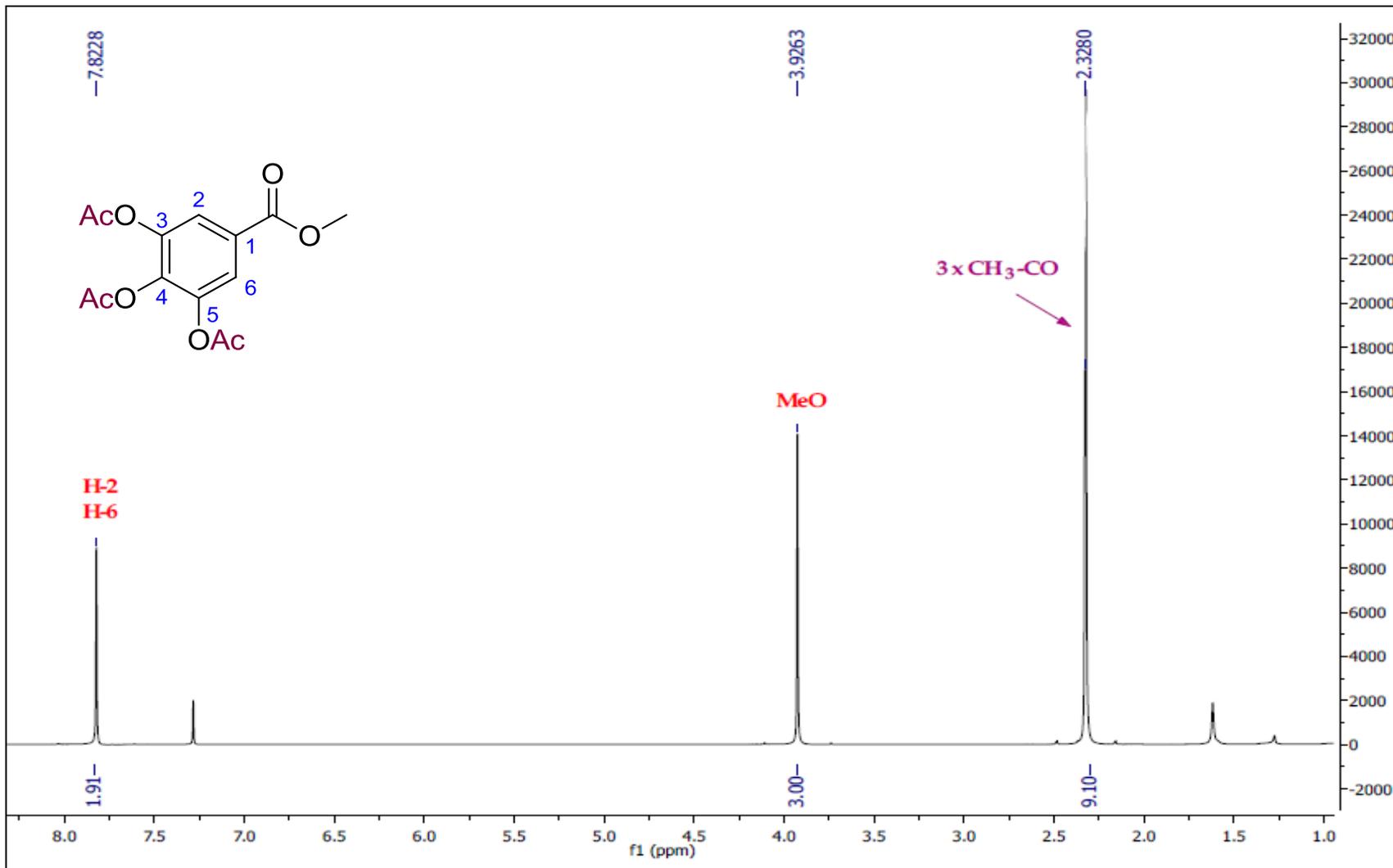
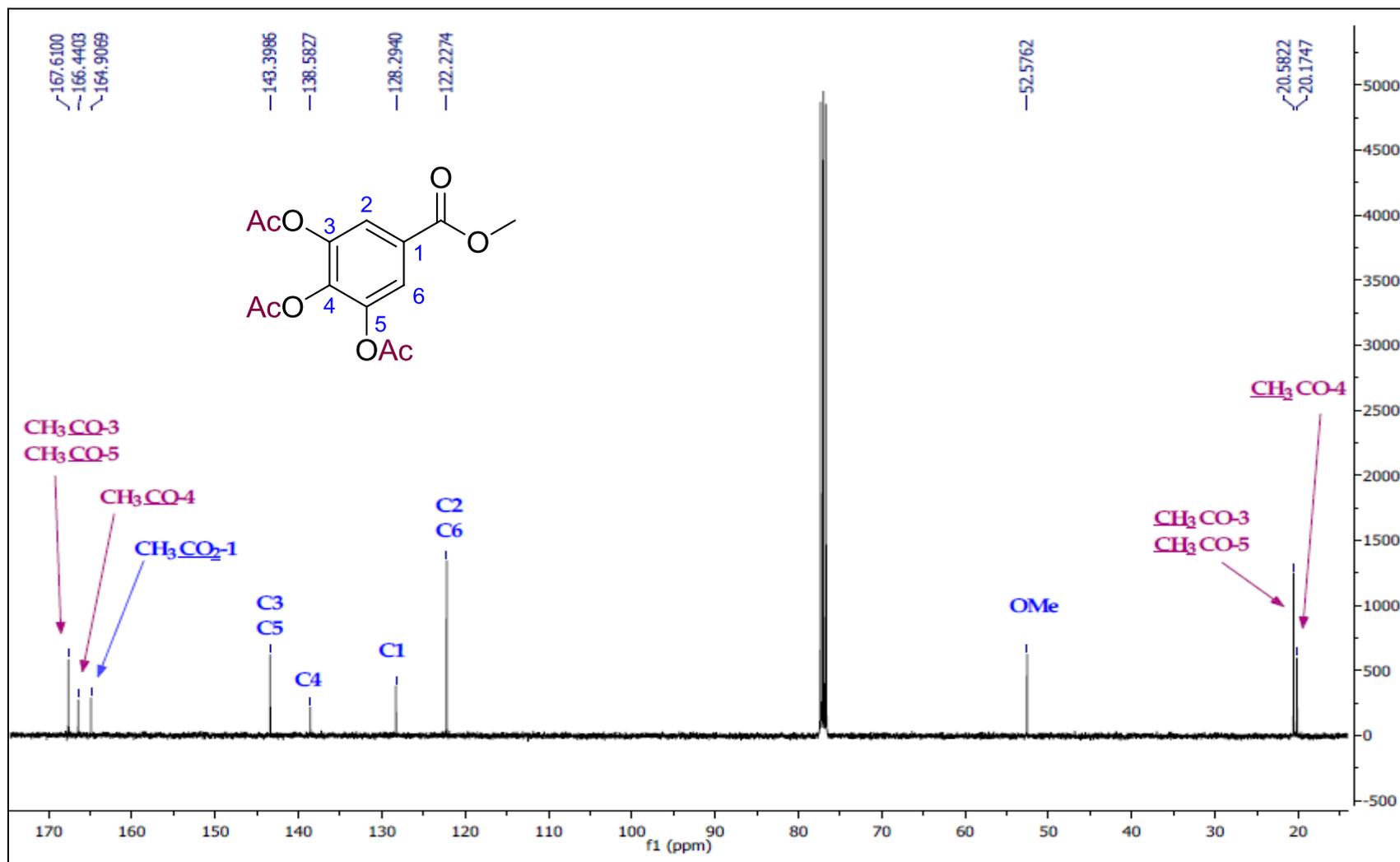
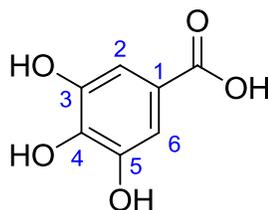


Figura 33. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del galato de metilo triacetilado (AF4 Ac)



**Figura 34.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del galato de metilo triacetilado (AF4 Ac)

### 5.1.2.3 Propiedades físicas y espectroscópicas del ácido gálico (AF5)



**Figura 35.** Ácido gálico (AF5)

Sólido o cristal en forma de agujas de color blanco, soluble en acetona, pf 208-210°C, C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>, PM: 170.12 g/mol. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 3.08 (sa, 4H, OH-4), 7.14 (s, 2H, H-2, H-6), 8.22 (sa, 2H, OH-3, OH-5). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 109.22 (C2, C6), 121.15 (C1), 137.77 (C4), 145.11 (C3, C5), 166.82 (COOH).

#### 5.1.2.3.1 Elucidación estructural del ácido gálico (AF5)

El compuesto AF5 mostró en el espectro de RMN señales muy similares al galato de metilo, el espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 36) integra para cinco protones, en la región aromática se observa un singulete δ 7.14 ppm que integra para dos protones magnéticamente iguales, los cuales pertenecen a H-2 y H-6, se observaron dos singuletes anchos, uno en δ 3.08 ppm integrando para un hidrógeno del OH-4, mientras que la señal en δ 8.22 ppm integra para dos hidrógenos de los hidroxilos en la posición meta (OH-3 y OH-5).

El espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 37) presenta cuatro señales en la región aromática δ ppm: 109.22 (C2, C6), 121.15 (C1), 137.77 (C4), 145.11 (C3, C5) que corresponden a seis carbonos aromáticos, en δ 166.82 ppm se observa una señal que corresponde al carbonilo de un ácido carboxílico. Las constantes espectroscópicas de este compuesto corresponden a las previamente reportadas para el ácido gálico (73).

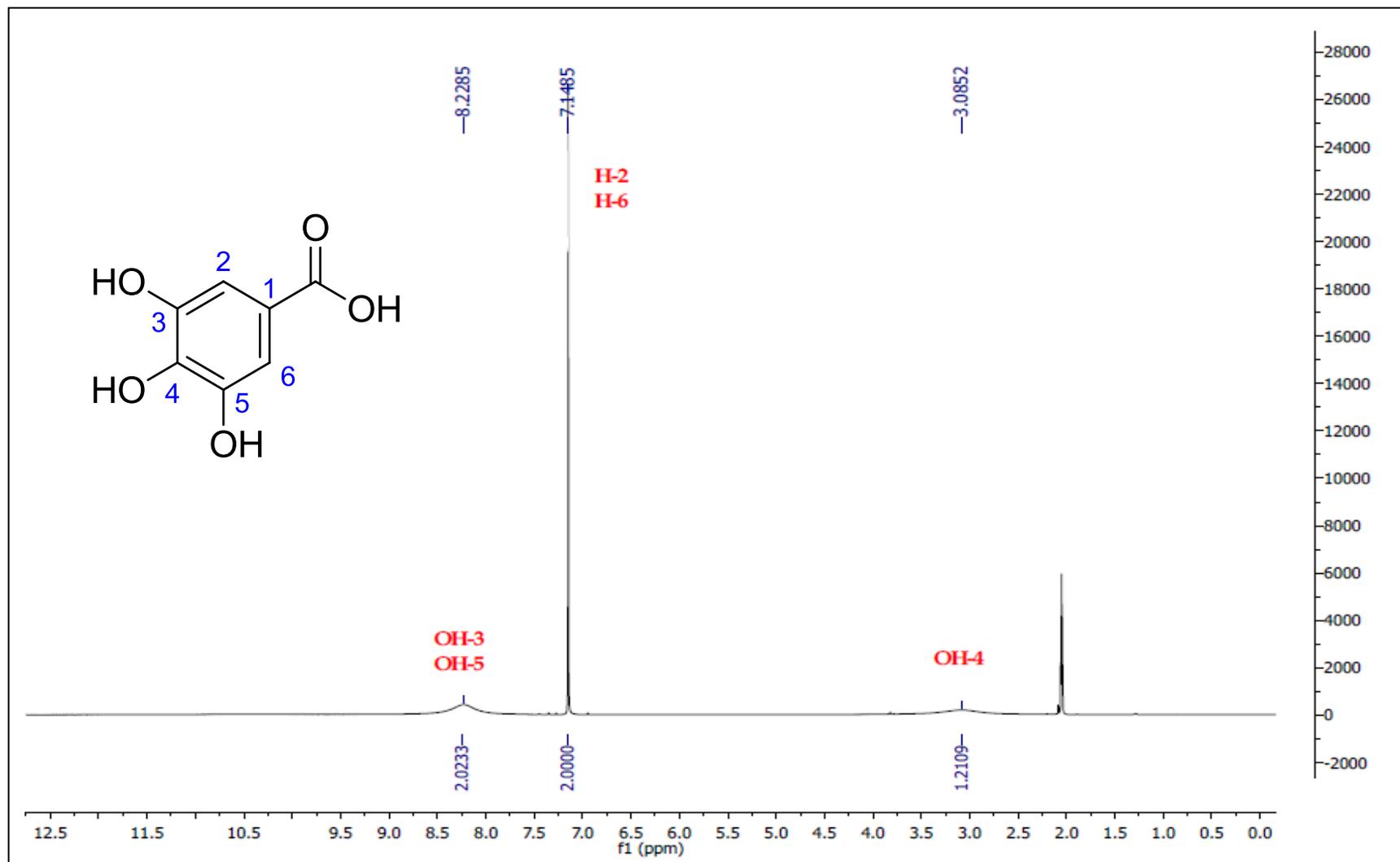
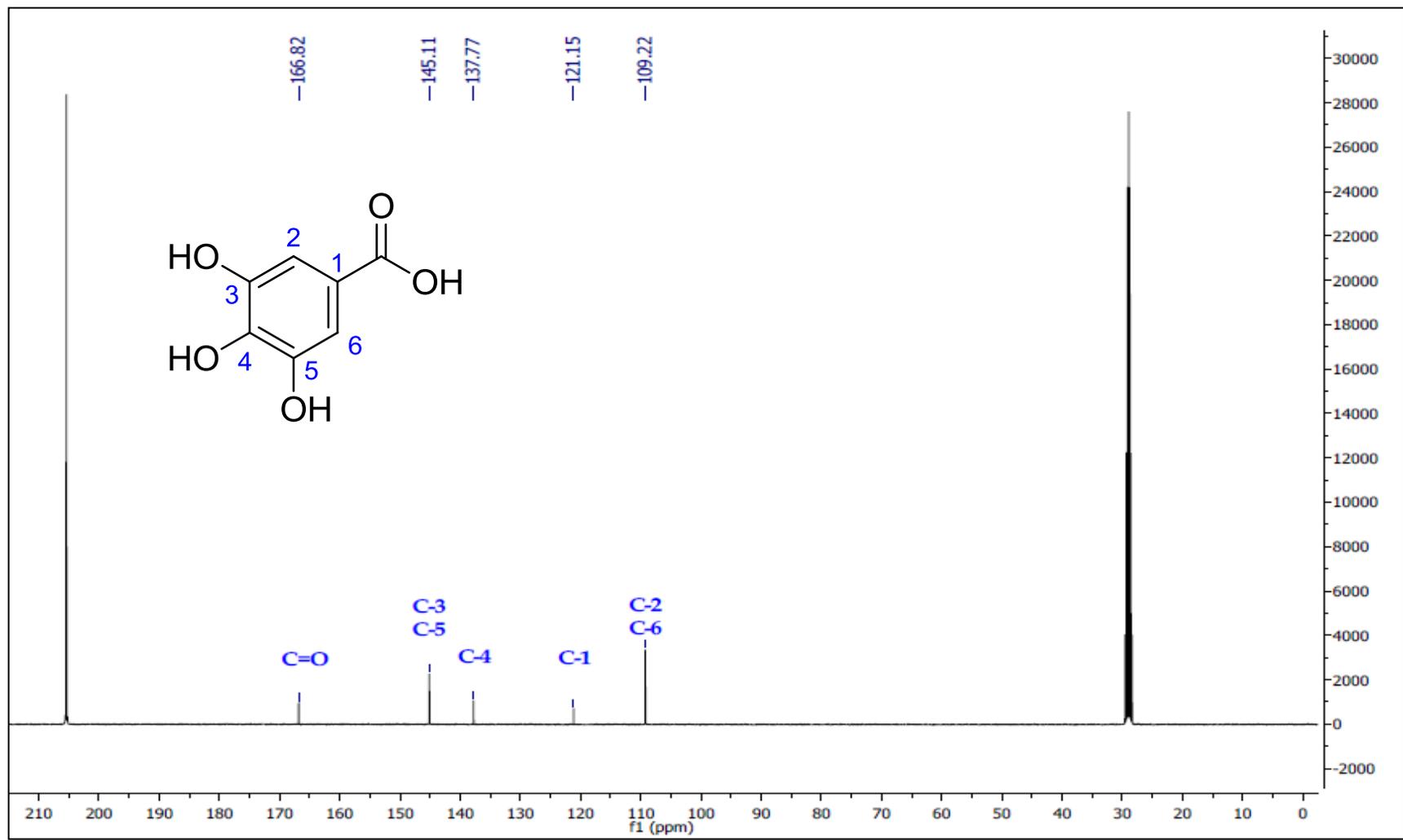
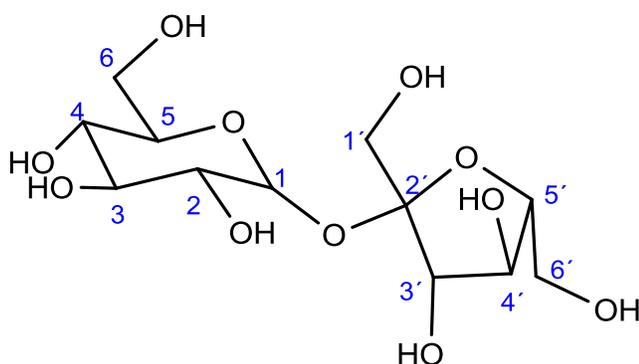


Figura 36. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, Acetona- $d_6$ ) de ácido gálico (AF5)



**Figura 37.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, Acetona- $d_6$ ) del ácido gálico (AF5)

#### 5.1.2.4 Propiedades físicas y espectroscópicas de la sacarosa (AF6)



**Figura 38.** Sacarosa (AF6)

Sólido color blanco, soluble en agua, pf 185-186°C,  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , PM: 342.30 g/mol. RMN  $^1H$  (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm): 3.43 (t,  $J=9.42$  Hz, 1H, H-4), 3.52 (dd,  $J=10, 3.84$  Hz, 1H, H-2), 3.63 (s, 2H, H-1'), 3.72 (t,  $J=9.56$  Hz, 1H, H-3), 3.78 (d,  $J=2.96$  Hz, 2H, H-6), 3.79 (d,  $J=2.8$  Hz, 2H, H-6'), 3.83 (m, 1H, H-5), 3.86 (m, 1H, H-5'), 4.01 (t,  $J=8.56$  Hz, 1H, H-4'), 4.18 (d,  $J=8.76$  Hz, 1H, H-3'), 5.38 (d,  $J=3.88$  Hz, 1H, H-1). RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm): 62.59 (C6), 63.82 (C1'), 64.84 (C6'), 71.70 (C4), 73.55 (C2), 74.88 (C5), 75.05 (C3), 76.47 (C4'), 78.88 (C3'), 83.85 (C5'), 94.66 (C1), 106.17 (C2').

#### 5.1.2.4.1 Elucidación estructural de sacarosa (AF6)

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 39) de AF6 presentó un patrón espectroscópico de un disacárido, integrando para catorce protones, se observa un doblete en  $\delta$  5.38 ppm del protón anomérico con  $J= 3.88$  Hz lo que indica que está en posición alfa, en la región de  $\delta$  3.43 a 4.18 ppm se observa once señales de protones base de alcohol, en  $\delta$  3.43 ppm se observa un triplete que corresponde a H-4 ( $J= 9.42$  Hz), en  $\delta$  3.52 ppm resuena un doblete de doblete con  $J= 10.0, 3.84$  Hz correspondiendo al H-2, se observa un singulete en 3.63 ppm de H-1', el protón H-3 resuena en  $\delta$  3.72 ppm (t,  $J= 9.56$  Hz), en  $\delta$  3.78 ( $J= 2.96$  Hz) y 3.79 ppm ( $J= 2.8$  Hz) se observan dos dobletes atribuibles a H-6 y H-6', para los protones H-5 y H-5' se observan dos multipletes resonando en  $\delta$  3.83 y 3.86 ppm, en  $\delta$  4.01 ppm se muestra un triplete de H-4' ( $J= 8.56$  Hz), en  $\delta$  4.18 ppm resuena un doblete atribuible a H-3' ( $J= 8.76$  Hz). Estos datos fueron corroborados con el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 40), en la que se muestra en campos bajos el carbón anomérico en 94.66 ppm (C1) y en 106.17 ppm el carbón ipso (C2'), se observan siete señales en la región de  $\delta$  71.70 a 83.85 ppm, correspondiendo a los siete metinos restantes, 71.70 (C4), 73.55 (C2), 74.88 (C5), 75.05 (C3), 76.47 (C4'), 78.88 (C3'), 83.85 (C5'), también se observan en 62.59 a 64.84 tres señales de tres los metilenos presentes en la sacarosa 62.59 (C6), 63.82 (C1'), 64.84 (C6'). Estos datos espectroscópicos fueron comparados con la literatura (74) corroborando la estructura de la sacarosa.

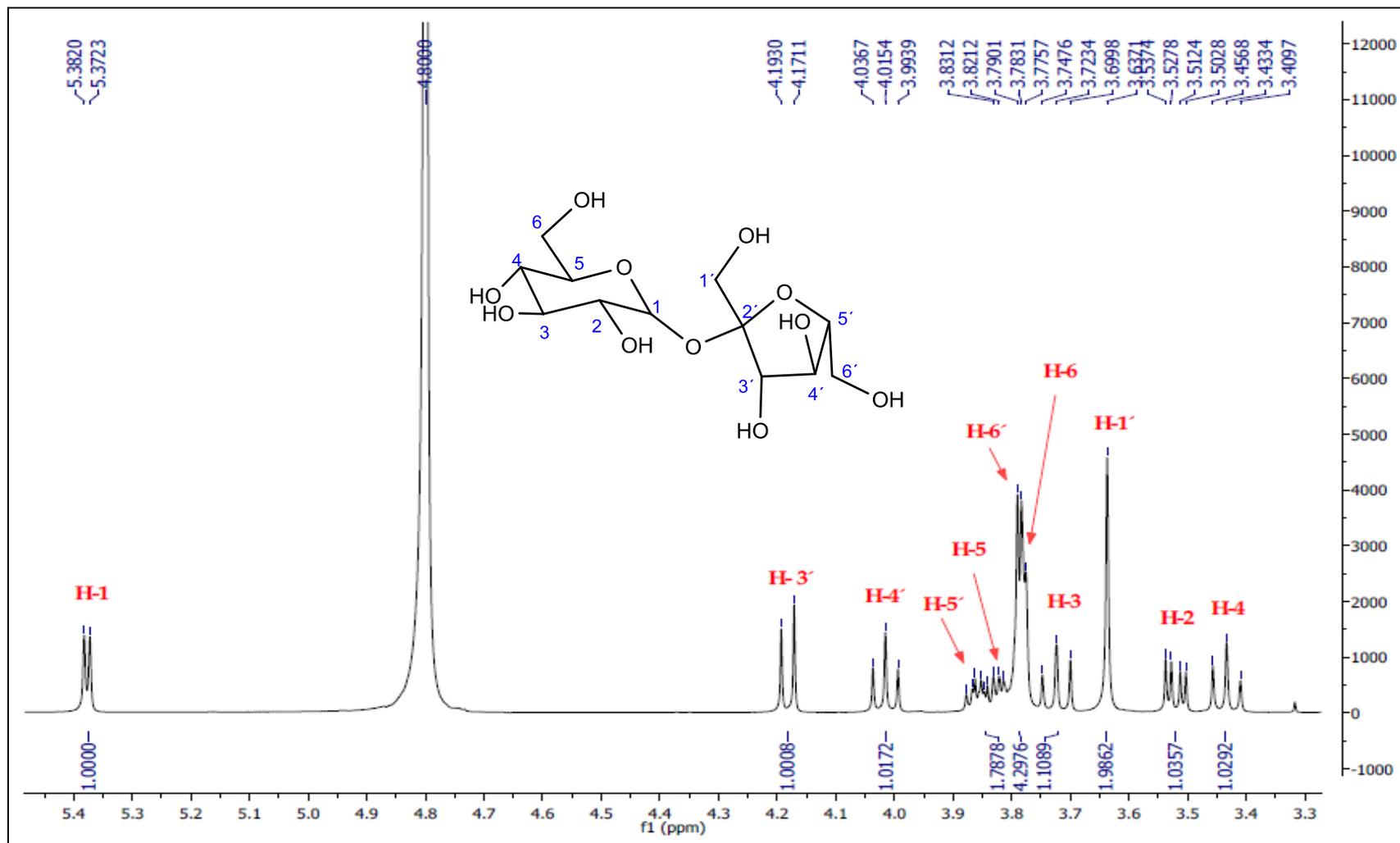


Figura 39. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de Sacarosa (AF6)

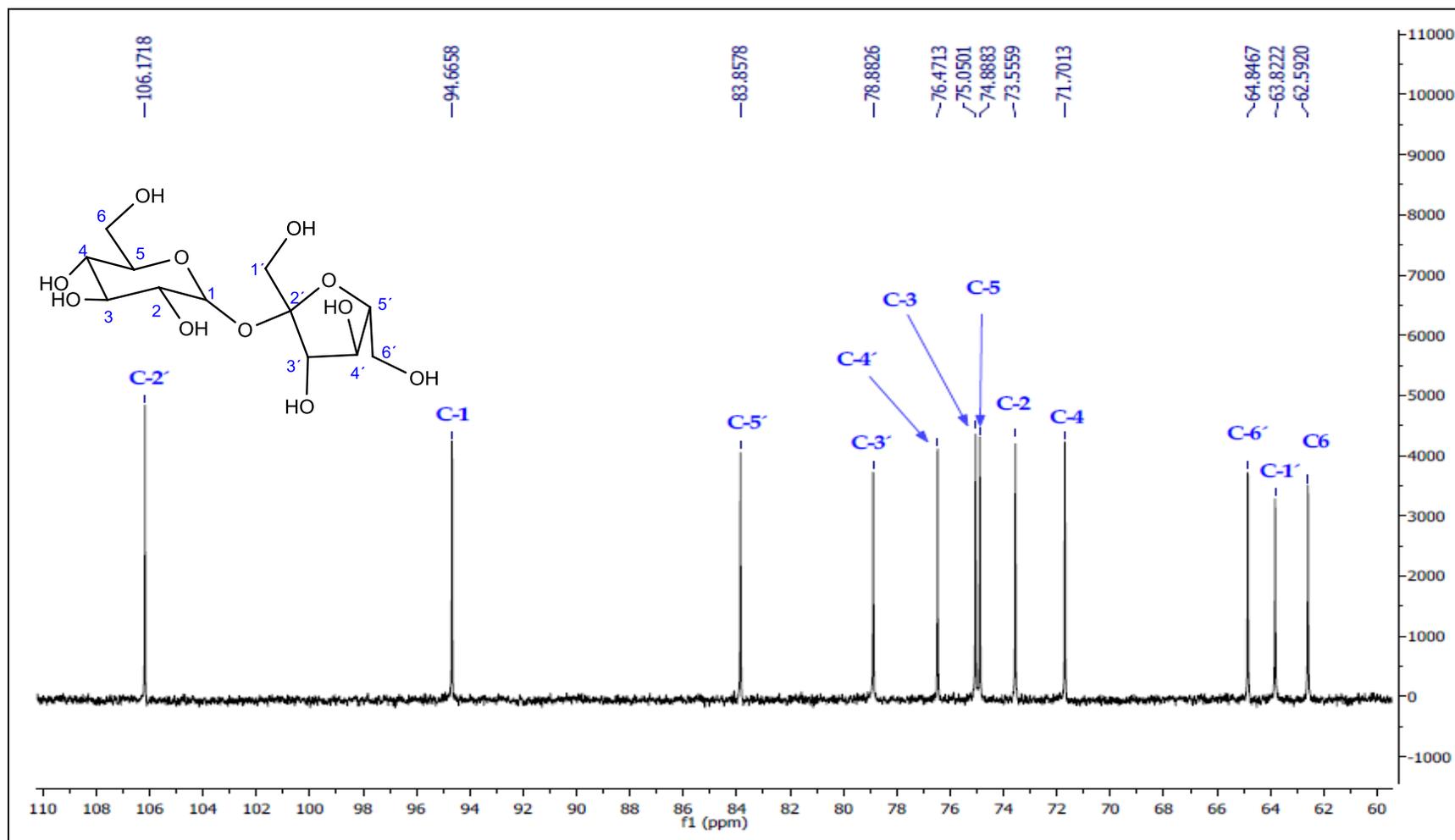
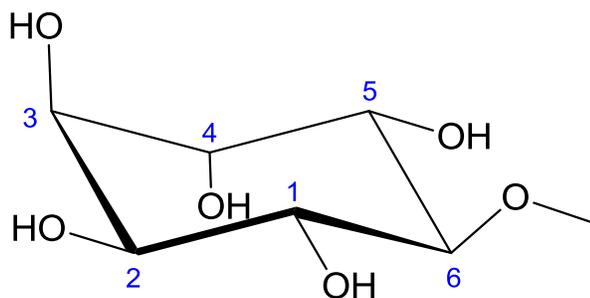


Figura 40. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de Sacarosa (AF6)

### 5.1.2.5 Propiedades físicas y espectroscópicas del pinitol (AF7)



**Figura 41.** Pinitol (AF7)

Sólido color blanco, soluble en agua, pf 179-180 °C,  $C_7H_{14}O_6$ , PM: 194.18 g/mol. RMN  $^1H$  (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm): 3.18 (t,  $J=9.64$  Hz, 1H, H-6), 3.44 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 3.49 (t,  $J=9.64$  Hz, 1H, H-1), 3.55 (dd,  $J=9.94, 2.38$  Hz, 1H, H-2), 3.65 (dd,  $J=9.98, 2.42$  Hz, 1H, H-5), 3.84 (m, 2H, H-3, H-4). RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm): 59.67 ( $OCH_3$ ), 69.76 (C5), 70.47 (C2), 71.40 (C3), 71.61 (C4), 72.07 (C1), 82.72 (C6).

#### 5.1.2.5.1 Elucidación estructural de pinitol (AF7)

El espectro de RMN  $^1H$  (Figura 42) de AF7 integró para nueve protones, se observó un triplete en  $\delta$  3.18 ppm ( $J=9.64$  Hz), que corresponde a H-6, en  $\delta$  3.44 ppm hay un singulete que integra para tres protones de un metoxilo, en  $\delta$  3.49 ppm resuena un triplete ( $J=9.64$  Hz) de H-1, en  $\delta$  3.55 ppm ( $J=9.94, 2.38$  Hz) y 3.65 ppm ( $J=9.98, 2.42$  Hz) resuenan los hidrógenos H-2 y H-5, sus constantes de acoplamiento son muy similares debido a que se presenta un acoplamiento axial-axial y axial-ecuatorial, se observó en  $\delta$  3.84 ppm un

multiplete para los hidrógenos H-3 y H-4. En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 43) se observaron siete señales, en  $\delta$  59.67 ppm resuena el carbono de un metoxilo, en la región  $\delta$  69.76 a 72.07 ppm se observan cinco señales de carbonos base de alcohol (C5, C2, C3, C4, C1), mientras que en  $\delta$  82.72 ppm resuena el carbono base de éter (C6). Los datos espectroscópicos corresponden a los previamente reportados para el pinitol (Tabla 16) (75). Este compuesto se analizó por RMN con DMSO deuterado confirmando dicha estructura (apéndice A)

**Tabla 16.** Datos espectroscópicos de Pinitol AF7

	RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) (75) $\delta_{\text{ppm}}$	RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) AF7 $\delta_{\text{ppm}}$	RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) (75) $\delta_{\text{ppm}}$	RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) AF7 $\delta_{\text{ppm}}$
<b>1</b>	3.58 (t, $J= 9.8$ Hz, 1H)	3.49 (t, $J= 9.64$ Hz, 1H)	72.05	72.07
<b>2</b>	3.69 (dd, $J=9.98$ , 2.8 Hz, 1H)	3.55 (dd, $J= 9.94$ , 2.38 Hz, 1H)	70.9	70.47
<b>3</b>	3.94 (m, 1H)	3.84 (m, 1H)	71.8	71.40
<b>4</b>	3.94 (m, 1H)	3.84 (m, 1H)	72.0	71.61
<b>5</b>	3.75 (dd, $J= 9.8$ , 2.8 Hz, 1H)	3.65 (dd, $J= 9.98$ , 2.42 Hz, 1H)	70.2	69.76
<b>6</b>	3.27 (t, $J= 9.7$ Hz, 1H)	3.18 (t, $J= 9.64$ Hz, 1H)	83.1	82.72
<b>OCH<sub>3</sub></b>	3.53 (s, 3H)	3.44 (s, 3H)	60.1	59.67

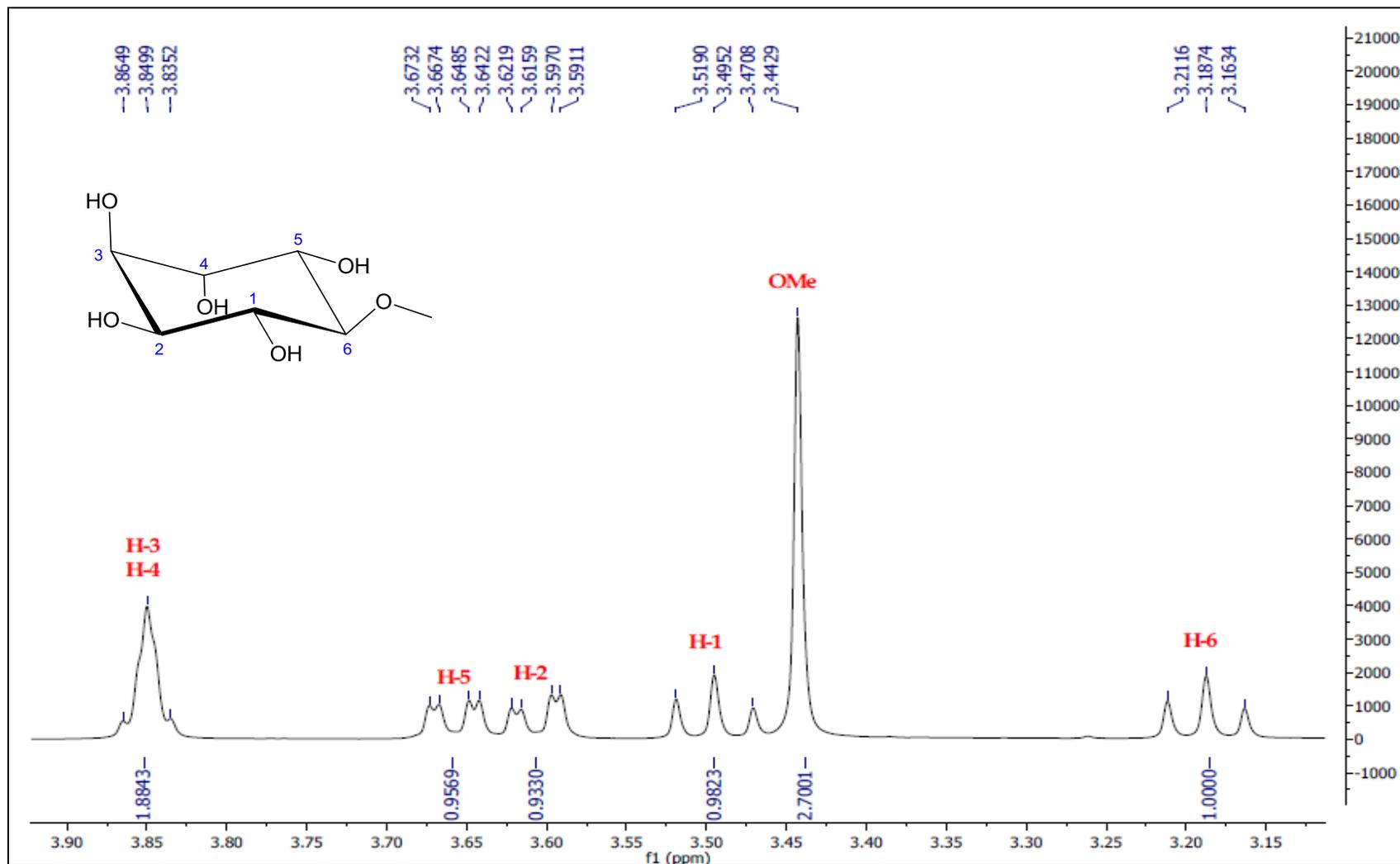


Figura 42. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O) de Pinitol (AF7)

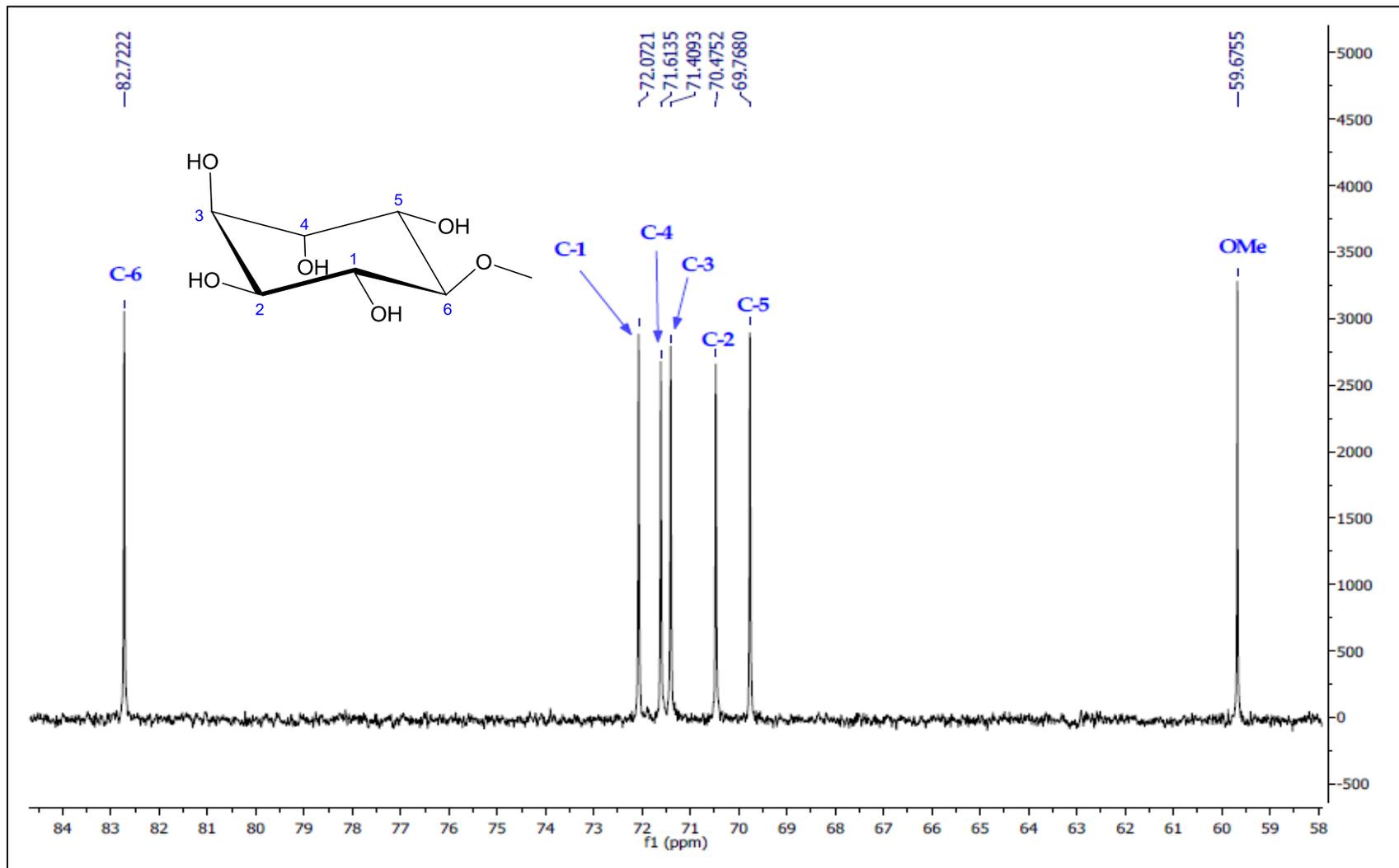
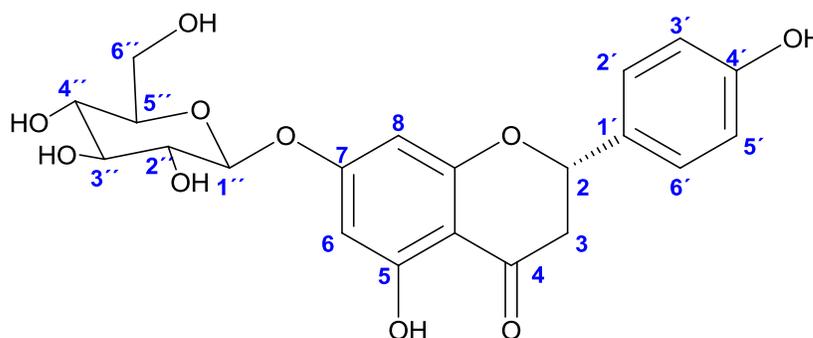


Figura 43. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de Pinitol (AF7)

### 5.1.2.6 Propiedades físicas y espectroscópicas del 7-O-β-D-Glucopiranosido de (2S)-naringenina (AF10)



**Figura 44.** 7-O-β-D- Glucopiranosido de (2S)-naringenina (AF10)

Cristal en forma de agujas color blanco, soluble en MeOH, pf 230-231°C, C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>, PM: 434.12 g/mol.  $[\alpha]_D^{25} = -70.27^{\circ}\text{mL/dm g}$ , RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 2.73 (dd, *J*= 17.1, 2.62 Hz, 1H, H-3β), 3.14 (m, 1H, H-3α), 3.22 (m, 2H, H-4'', H-2''), 3.37 (m, 2H, H-3'', H-5''), 3.42 (dd, *J*= 11.68, 5.64 Hz, 1H, H-6a''), 3.65 (dd, *J*= 11.04, 4.68 Hz, 1H, H-6b''), 4.54 (t, *J*= 5.56, 1H, OH-6''), 4.95 (d, *J*= 7.4 Hz, 1H, H-1''), 5.01 (d, *J*= 5.2 Hz, 1H, OH-4''), 5.08 (d, *J*= 4.72 Hz, 1H, OH-3''), 5.33 (d, *J*= 4.88 Hz, 1H, OH-2''), 5.50 (dd, *J*= 12.6, 2.48 Hz, 1H, H-2), 6.13 (d, *J*= 2.2, 1H, H-6), 6.15 (d, *J*= 1.96, 1H, H-8), 6.79 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.32 (d, *J*= 8.44 Hz, 2H, H-2', H-6'), 9.59 (s, 1H, OH-4'), 12.05 (s, 1H, OH-5). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 42.55 (C3), 61.05 (C6''), 69.98 (C4''), 73.50 (C2''), 76.80 (C3''), 77.56 (C5''), 79.13 (C2), 95.92 (C8), 96.97 (C6), 100.10 (C1''), 103.73 (C10), 115.65 (C3', C5'), 128.89 (C2', C6'), 129.11 (C1'), 158.28 (C4'), 163.25 (C5), 163.41 (C9), 165.79 (C7), 197.67 (C4).

#### 5.1.2.6.1 Elucidación estructural de 7-O- $\beta$ glucopiranosido de (2S)-naringenina (AF10)

Esta muestra fue elucidada por RMN en MeOD (apéndice A) y DMSO-d<sub>6</sub>. Los espectros de RMN muestran señales características de una flavanona glucosilada. El espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 45) integró para veintidós protones, once corresponden a la glucosa y once para a la flavanona. En el anillo C se observa para los protones H-3 un doblete de doblete en  $\delta$  2.73 ppm ( $J= 17.1, 2.62$  Hz, H-3 $\beta$ ) y un multiplete en  $\delta$  3.14 ppm para H-3 $\alpha$ , en  $\delta$  5.50 ppm resuena para H-2 un doblete de doblete ( $J= 12.6, 2.48$  Hz), el anillo B se encuentra *para* disustituido con un grupo hidroxilo en la posición 4' mostrando dos dobletes en  $\delta$  6.79 ppm ( $J= 8.4, H-3'$  y H-5') y  $\delta$  7.32 ppm ( $J= 8.44, H-2'$  y H-6'), mientras que el singulete del OH-4' aparece en  $\delta$  9.59 ppm. Para los protones *meta* relacionados H-6 y H-8 presentes en el anillo A se muestran dos dobletes en  $\delta$  6.13 ppm ( $J= 2.2$  Hz) y  $\delta$  6.15 ppm (1.96 Hz) respectivamente, en  $\delta$  12.05 ppm se presenta un singulete que se atribuye al protón del OH-5 debido a que forma un puente de hidrógeno con el carbonilo. La glucosa se encuentra en el anillo A enlazado al carbono 7 la cual se corroboró con el espectro de 2D HMBC (Figura 47) en el que el protón anomérico se encuentra relacionado a tres enlaces con el C-7. Para la glucosa se observan dos multipletes que integran para dos protones cada uno en  $\delta$  3.22 (H-2'', H-4'') y 3.37 (H-3'', H-5'') ppm, en  $\delta$  3.42 y 3.65 ppm se mostró dos dobletes de dobletes para los protones H-6a'' ( $J = 11.68, 5.64$  Hz) y H-6b'' ( $J = 11.04, 4.68$  Hz) respectivamente, en  $\delta$  4.95 ppm se observó un doblete para el protón

anomérico H-1'' ( $J = \delta 7.4$  Hz). El protón del OH-6'' resonó como un triplete en  $\delta 4.56$  ppm ( $J = 5.56$  Hz), también se observaron tres dobletes en  $\delta 5.01$  ppm ( $J = 5.2$  Hz, OH-4''),  $\delta 5.08$  ppm ( $J = 4.72$  Hz, OH-3'') y  $\delta 5.33$  ppm ( $J = 4.88$  Hz, OH-2''). En RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 46) se corroboró la presencia de la glucosa entre  $\delta 60.05$  y  $100$  ppm, el carbón del carbonilo (C-4) resuena en  $\delta 197.67$  ppm, el metileno (C-3) resuena en  $\delta 42.55$  ppm, el metino (C-2) resuena en  $\delta 79.13$  ppm. Los carbonos de los anillos A y B resuenan entre  $\delta 95.92$  y  $165.79$  ppm. Los datos espectroscópicos obtenidos en RMN en DMSO- $d_6$  y en MeOD fueron comparados con lo previamente reportado (76–78), determinando con ello que el compuesto aislado corresponde a 7-O- $\beta$  glucopiranosido de (2S)-naringenina (Tabla 17).

**Tabla 17.** Datos espectroscópicos de 7-O-β glucopiranosido de (2S)-naringenina (AF10)

	RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> )		RMN <sup>13</sup> C (DMSO-d <sub>6</sub> )		HMBC <sup>13</sup> C- <sup>1</sup> H
	RMN 600 MHz <sup>1</sup> H δ <sub>ppm</sub> (76, 78)	RMN 400 MHz <sup>1</sup> H δ <sub>ppm</sub> AF10	RMN 100 MHz <sup>1</sup> H δ <sub>ppm</sub> (76, 78)	RMN 400 MHz <sup>13</sup> C AF10 δ <sub>ppm</sub>	
<b>2</b>	5.51 (dd, <i>J</i> =12.7, 3.0 Hz, 1H)	5.50 (dd, <i>J</i> = 12.6, 2.48 Hz, 1H)	78.63	79.13	
<b>3α</b>	2.76 (dd, <i>J</i> =17.1, 12.7 Hz, 1H)	3.14 (m, 1H)	42.03	42.55	
<b>3β</b>	2.75 (da, <i>J</i> =17.1, 3.0 Hz, 1H)	2.73 (dd, <i>J</i> = 17.1, 2.62 Hz, 2H)			
<b>4</b>			197.18	197.67	H-3
<b>5</b>			162.91	163.25	H-6, H-8
<b>6</b>	6.14 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H)	6.13 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz, 1H)	96.46	96.97	
<b>7</b>			165.28	165.79	H-1'',H-6, H8
<b>8</b>	6.16 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H)	6.15 (d, <i>J</i> = 1.96, 1H)	95.41	95.92	
<b>9</b>			162.71	163.41	H-6, H8
<b>10</b>			103.22	103.73	
<b>1'</b>			128.59	129.11	H-2
<b>2'</b>	7.33 (d, <i>J</i> =8.5 Hz, 1H)	7.32 (d, <i>J</i> = 8.44 Hz, 1H)	128.40	128.89	
<b>3'</b>	6.81 (d, <i>J</i> =8.5 Hz, 1H)	6.79 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H)	115.16	115.65	
<b>4'</b>			157.77	158.28	H-2',H-3', H-5', H-6'
<b>5'</b>	6.81 (d, <i>J</i> =8.5 Hz, 1H)	6.79 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H)	115.16	115.65	
<b>6'</b>	7.33 (d, <i>J</i> =8.5 Hz, 1H)	7.32 (d, <i>J</i> = 8.44 Hz, 1H)	128.40	128.89	
<b>1''</b>	4.97 (d, <i>J</i> =7.7 Hz, 1H)	4.95 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H)	99.57	100.10	
<b>2''</b>	3.23 (dd, <i>J</i> = 9.2, 7.7 Hz, 1H)	3.22 (m, 1H)	72.98	73.50	
<b>3''</b>	3.28 (t, <i>J</i> =9.2 Hz, 1H)	3.37 (m, 1H)	76.28	76.80	
<b>4''</b>	3.16 (dd, <i>J</i> =9.2, 9.1 Hz, 1H)	3.22 (m, 1H)	69.46	69.98	
<b>5''</b>	3.39 (m, 1H)	3.37 (m, 1H)	77.04	77.56	
<b>6''a</b>	3.68 (dd, <i>J</i> =12.4, 3.3 Hz, 1H)	3.65 (dd, <i>J</i> =11.04, 4.68 Hz, 1H)	60.53	61.05	
<b>6''b</b>	3.46 (dd, <i>J</i> = 13.0, 5.8 Hz, 1H)	3.42 (dd, <i>J</i> = 11.68, 5.64 Hz, 1H)			
<b>OH-5</b>	12.06 (sa, 1H)	12.05 (s, 1H)			
<b>OH-4'</b>	9.61 (sa, 1H)	9.59 (s, 1H)			
<b>OH-2''</b>		5.33 (d, <i>J</i> = 4.88 Hz, 1H)			
<b>OH-3''</b>		5.08 (d, <i>J</i> = 4.72 Hz, 1H)			
<b>OH-4''</b>		5.01 (d, <i>J</i> = 5.2 Hz, 1H)			
<b>OH-6''</b>		4.54 (t, <i>J</i> = 5.56 Hz, 1H)			

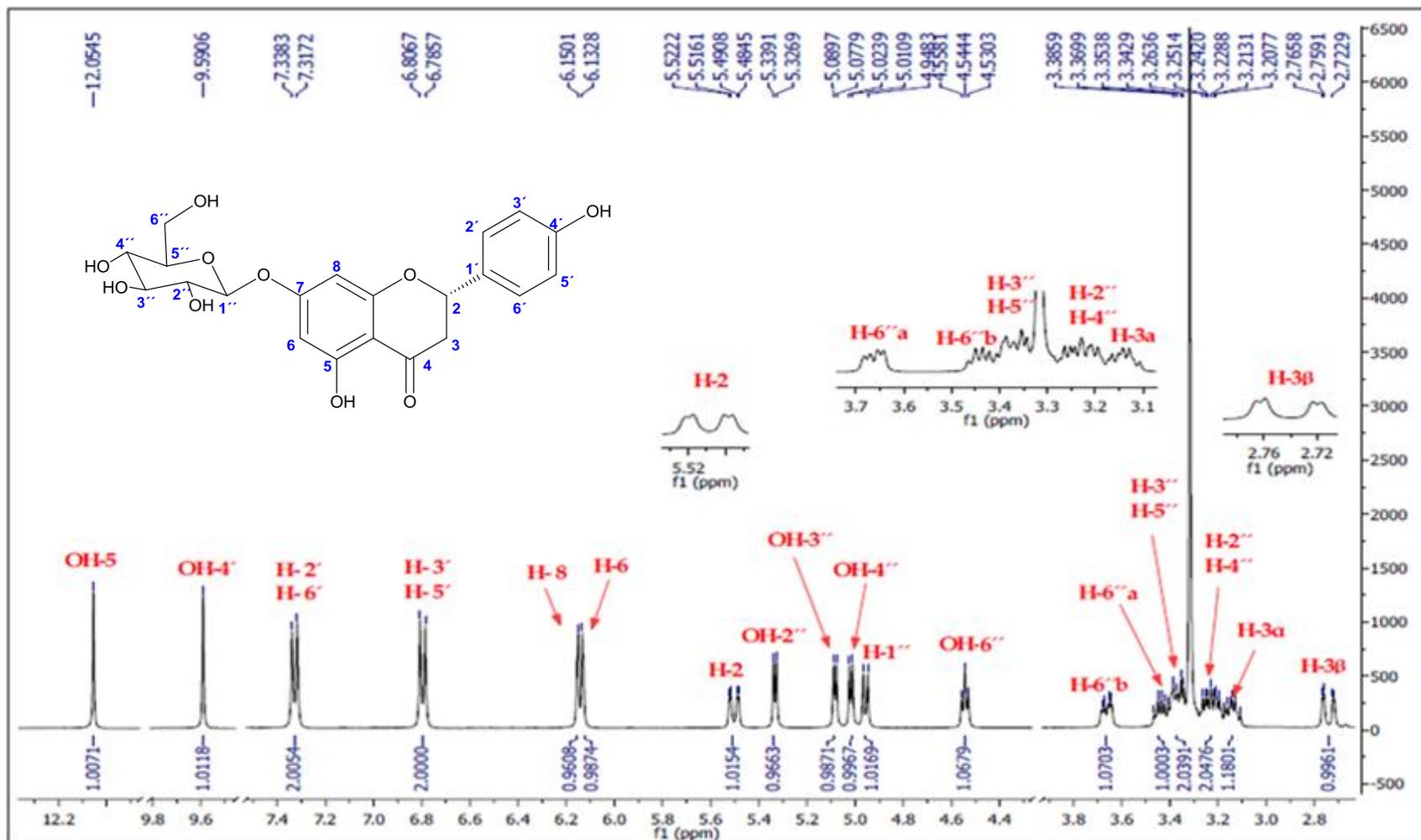


Figura 45. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 7-O- $\beta$ -D- Glucopiranósido de (2S)-naringenina (AF10)

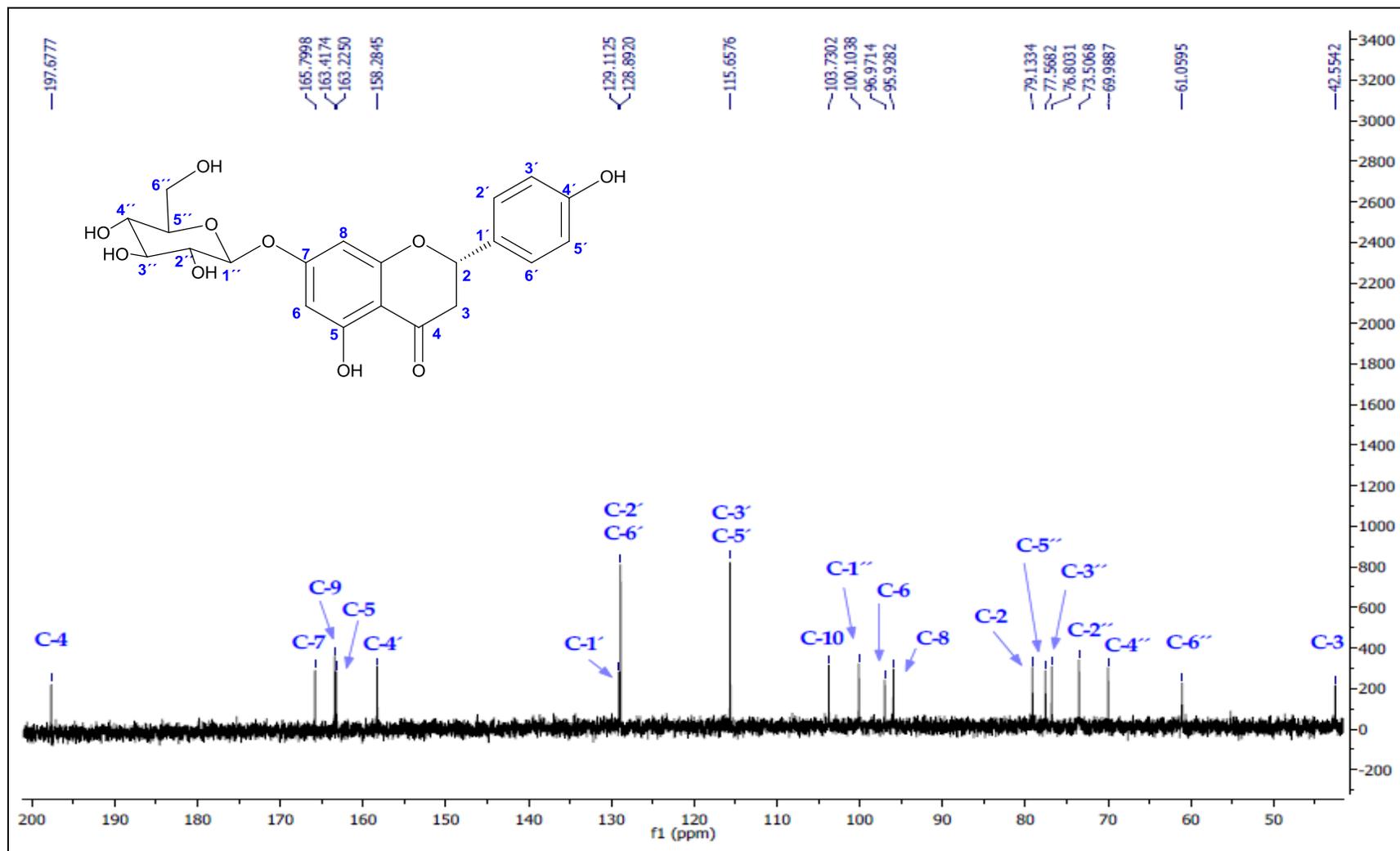


Figura 46. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) de 7-O-β-D- Glucopiranosido de (2S)-naringenina (AF10)

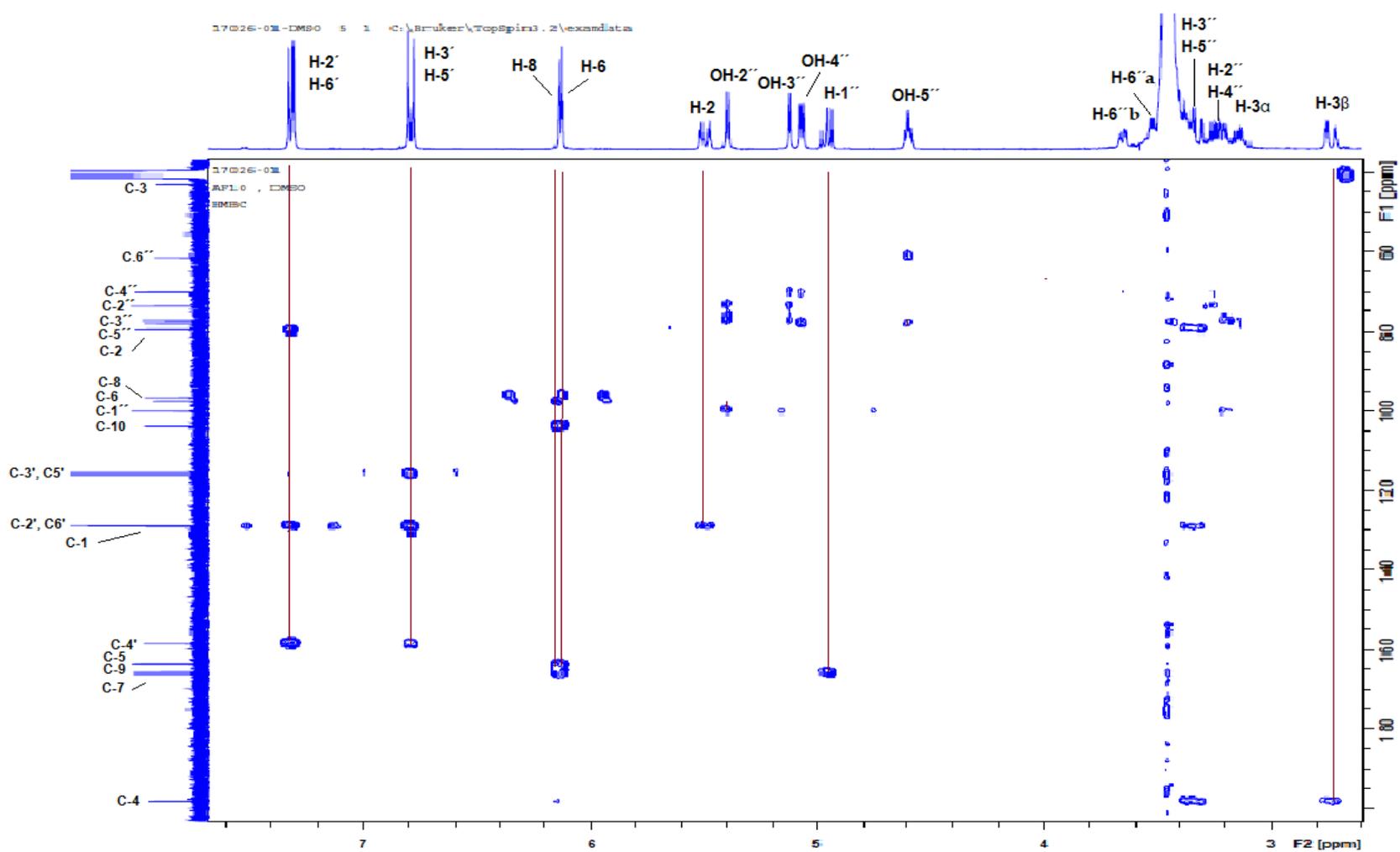


Figura 47. Espectro de HMBC (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) de 7-O-β-D- Glucopiranosido de (2S)-naringenina (AF10)

## 5.2 Análisis del extracto hexánico y clorofórmico por Cromatografía de gases (CG) y CG acoplado a espectrometría de masas (CG-EM).

Se caracterizaron 19 ácidos grasos metilados para cada extracto por CG, esto se logró por comparación con los estándares de ácidos grasos metilados. Estos extractos tienen 17 ácidos grasos en común, el porcentaje de área de cada ácido graso es muy similar (Tabla 18). En el extracto hexánico se observó el ácido linoleilaidico (C18:2,  $\Delta^{9t, 12t}$ ) con un porcentaje de área de 0.02 %, este ácido graso está ausente en el extracto clorofórmico, en su lugar en el extracto clorofórmico se observó el ácido 8, 11, 14-eicosatrienoico (C20:3  $\Delta^{8c, 11c, 14c}$ ) con un porcentaje de área de 0.09%

Los ácidos grasos que se encuentran en mayor abundancia de acuerdo con el área normalizada en el extracto hexánico son el ácido linoleico (C18:2,  $\Delta^{9c, 12c}$ ) con 39.94 %, seguido por el ácido oleico (C18:1,  $\Delta^{9c}$ ) con 30.09% y por último el ácido palmítico (C16:0) con 13.15%. En el extracto clorofórmico los más abundantes fueron ácido linoleico (C18:2,  $\Delta^{9c, 12c}$ ) con 40.50 %, el ácido oleico (C18:1,  $\Delta^{9c}$ ) con 30.73% y el ácido palmítico (C16:0) con 13.05% (Tabla 18).

De los 19 ácidos grasos caracterizados en los dos extractos, 6 ya han sido reportados previamente en semillas de la *A. farnesiana* (ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido araquídico) (79), los 13 restantes (ácido laurico, ácido pentadecanoico, ácido cis-10 pentadecenoico, ácido palmitoleico, ácido heptadecanoico, ácido cis-10 heptadecenoico, ácido linoleilaidico, ácido  $\gamma$ -linolénico, ácido  $\alpha$ -linolénico, ácido

cis-11-eicosenoico, ácido behénico, ácido cis-8,11,14-eicosatrienoico y ácido lignocérico) son la primera vez que se reportan en esta planta objeto de estudio. Por CG-EM se corroboró la presencia de dichos ácidos grasos, además se logró caracterizar 3 fitoesteroles: campesterol, estigmasterol y gamma-sitosterol (Tabla 19).

**Tabla 18.** Resultados obtenidos por CG de los extractos hexánico y clorofórmico metilados

Tiempo de retención (min)	Ácido graso metilado	Extracto hexánico % área	Extracto clorofórmico % área
21.79	Ácido láurico (C12:0)	0.09	0.07
25.85	Ácido mirístico (C14:0)	0.22	0.18
27.74	Ácido pentadecanoico (C15:0)	0.05	0.05
28.893	Ácido cis-10 pentadecenoico (C15:1 $\Delta^{10c}$ )	0.05	0.04
29.597	Ácido palmítico (C16:0)	13.15	13.05
30.493	Ácido palmitoleico (C16:1 $\Delta^{9c}$ )	0.29	0.27
31.283	Ácido heptadecanoico (C17:0)	0.18	0.16
32.107	Ácido cis-10 heptadecenoico (C17:1 $\Delta^{10c}$ )	0.06	0.07
33.007	Ácido esteárico (C18:0)	8.16	8.01
33.757	Ácido oleico (C18:1, $\Delta^9$ )	30.09	30.73
34.567	Ácido linolelaídico (C18:2, $\Delta^{9t,12t}$ )	0.02	-
35.033	Ácido linoleico (C18:2, $\Delta^{9c,12c}$ )	39.94	40.50
35.87	Ácido $\gamma$ -linolénico (C18:3 $\Delta^{6c,9c,12c}$ )	0.12	0.11
36.09	Ácido araquídico (C20:0)	2.31	2.14
36.45	Ácido $\alpha$ -linolénico (C18:3, $\Delta^{9c,12c,15c}$ )	2.62	2.07
36.73	Ácido cis-11-eicosenoico (C20:1 $\Delta^{11c}$ )	0.31	0.31
38.997	Ácido behénico (C22:0)	1.42	1.30
39.29	Ácido cis-8,11,14-eicosatrienoico (C20:3 $\Delta^{8c,11c,14c}$ )	-	0.09
41.72	Ácido lignocérico (C24:0)	0.89	0.85

**Tabla 19.** Resultados obtenidos por CG-EM de los extractos hexánico y clorofórmico metilados

Tiempo de retención (min)	Ácido graso metilado	Extracto hexánico % área	Extracto clorofórmico % área
8.22	Ácido caproico (C6:0)	6.10	6.52
13.32	Ácido palmítico (C16:0)	13.96	14.11
16.50	Ácido linoleico (C18:2, $\Delta^{9,12}$ )	32.36	33.25
16.60	Ácido oléico (C18:1, $\Delta^9$ )	29.65	28.38
16.93	Ácido esteárico (C18:0)	9.39	9.44
19.57	Ácido araquídico (C20:0)	2.90	2.80
21.62	Ácido behénico (C22:0)	1.86	1.74
23.34	Ácido lignocérico (C24:0)	1.17	1.12
27.09	Campesterol	0.51	0.41
27.32	Estigmasterol	1.05	1.15
27.75	gamma-sitosterol	1.04	1.07

El ácido linoleico es un ácido graso del tipo omega-6, el ácido  $\alpha$ -linolénico (2.07-2.62% en área) es un ácido graso del tipo omega-3, estos son considerados ácidos grasos esenciales, por que el ser humano no tiene la capacidad de sintetizarlos y los adquiere a través de los alimentos (80). Estos ácidos grasos son precursores de hormonas, tienen efecto antiinflamatorio y protegen de las enfermedades cardiacas (81). El ácido linoleico es el más abundante, por lo que tiene un gran valor nutricional.

### 5.3 Análisis del extracto metanólico y acuoso por Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas (CLAR-EM)

El análisis por CLAR-EM arrojó la caracterización de 15 compuestos para el extracto metanólico (Tabla 20) y 15 para el extracto acuoso (Tabla 21) de acuerdo a la base de datos disponible. De los cuales 13 compuestos son comunes en ambos extractos. En el extracto metanólico se observó 7-O- $\beta$ -glucopiranosido de (2S) naringenina ( $C_{21}H_{22}O_{10}$ , PM 433.1157 g/mol) y el criseriol ( $C_{16}H_{12}O_6$ , PM 299.0556 g/mol), estos dos compuestos no se observan en el extracto acuoso, sin embargo se pueden observar en su lugar dos compuestos ausentes en el extracto metanólico que son el ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ , PM 191.0187 g/mol) y la taxifolina ( $C_{15}H_{12}O_7$ , 303.0519 g/mol) (Figura 48).

Un total de 17 compuestos fueron caracterizados en el extracto metanólico y acuoso, de los cuales nueve se han aislado y caracterizados previamente en *A. farnesiana*: ácido digálico, galato de metilo, galato de etilo, ácido elágico, naringina, kaempferol, naringenina, 7-O- $\beta$ -(4",6"-Digaloil glucopiranosido) de naringenina y 7-O- $\beta$ -glucopiranosido de naringenina, este último se identificó por cromatografía y UV, los ocho restantes (ácido málico, ácido cumárico, digalato de metilo, eriodictiol, acetina, criseriol, ácido cítrico y taxifolina) es la primera vez que se reportan en la planta objeto de estudio, los cuales se indican en las Tablas 20 y 21.

**Tabla 20.** Resultados obtenidos por CLAR-EM del extracto metanólico

Tr (min)	Compuesto	Fórmula molecular	m/z encontrada
0.559	Ácido málico <sup>b</sup>	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	133.014
1.363	Ácido digálico	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>9</sub>	321.026
1.855	Galato de metilo	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	183.0305
4.185	Galato de etilo	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	197.0457
4.3	Ácido cumárico <sup>b</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	163.0395
4.415	Digalato de metilo <sup>b</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub>	335.0414
5.449	Ácido elágico	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	300.9999
5.93	Eriodictiol <sup>b</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	287.0563
6.367	Naringina	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	579.1731
6.367	7-O-β-glucopiranosido de (2S) naringenina <sup>a</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	433.1157
6.712	7-O-β-(4",6"-Digaloil glucopiranosido) de naringenina	C <sub>28</sub> H <sub>26</sub> O <sub>14</sub>	585.1238
6.827	Kaemferol	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	285.0412
7.171	Naringenina	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	271.0617
7,286	Acacetina <sup>b</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	283.0616
7.746	Crisoeriol <sup>ab</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	299.0556

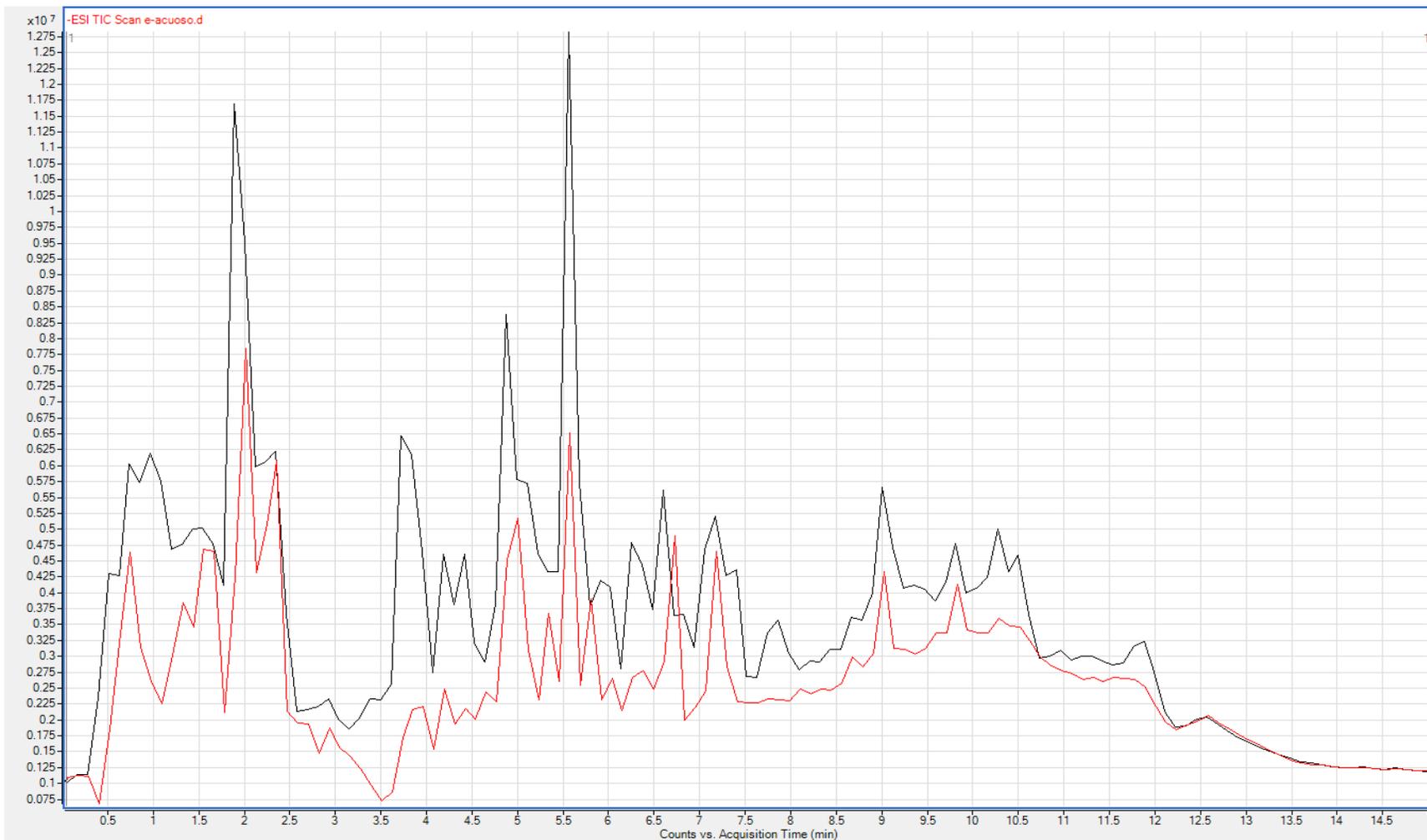
<sup>a</sup> Compuestos ausentes en el extracto acuoso. <sup>b</sup> Compuestos que no han sido reportados previamente en *A. farnesiana*

**Tabla 21.** Resultados obtenidos por CLAR-EM del extracto acuoso

Tr (min)	Compuesto	Fórmula molecular	m/z encontrada
0.555	Ácido málico <sup>b</sup>	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	133.0133
0.555	Ácido cítrico <sup>ab</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	191.0187
1.326	Ácido digálico	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>9</sub>	321.0256
1.9	Galato de metilo	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	183.0293
4,197	Galato de etilo	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	197.0452
4.312	Ácido cumárico <sup>b</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	163.0395
4.427	Digalato de metilo <sup>b</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub>	335.0414
5.001	Taxifolina <sup>ab</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	303.0519
5.462	Ácido elágico	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	300.9995
5.806	Eriodictiol <sup>b</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	287.0561
6.38	Naringina	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	579.1741
6,725	7-O-β-(4",6"-Digaloil glucopiranosido) de naringenina <sup>b</sup>	C <sub>28</sub> H <sub>26</sub> O <sub>14</sub>	585.1286
6.84	Kaemferol	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	285.0413
7,184	Naringenina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	271.0614
7,299	Acacetina <sup>b</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	283.0623

<sup>a</sup> Compuestos ausentes en el extracto metanólico. <sup>b</sup> Compuestos que no han sido reportados previamente en *A. farnesiana*

En el Cromatograma (Figura 48) se observa que en el extracto metanólico (línea negra) y el extracto acuoso (línea roja) tienen composición similar. En el caso del extracto metanólico las señales se ven más intensas con respecto a las señales del extracto acuoso, con ello nos da una idea de que los compuestos caracterizados en ambos extractos se encuentran en mayor proporción en el extracto metanólico.



**Figura 48.** Cromatograma obtenido del extracto metanólico ( — ) y del extracto acuoso ( — )

## 5.4 Ensayos biológicos

Se determinó la actividad antibacteriana de cuatro extractos (extracto hexánico, clorofórmico, metanólico y acuoso) , seis compuestos aislados y caracterizados de *A. farnesiana* (tetracosanoato de (2S) 2,3- dihidroxipropilo,  $\beta$ -D-Glucopiranosido de (3 $\beta$ ,22 E)-estigmasta-5, 22- dien-3-ilo, galato de metilo, ácido gálico, pinitol y 7-O- $\beta$ -glucopiranosido de (2S)-naringenina) y dos derivados acetilados ( $\beta$ -D-tetraacetilglucopiranosido de (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dieno y galato de metilo triacetilado)

### 5.4.1 Ensayo antimicobacteriano.

Se evaluaron las 12 muestras (mencionadas en el apartado 5.4) frente a tres cepas de *M. tuberculosis*: la cepa H37Rv sensible a los fármacos de primera línea y dos aislados clínicos MFR: G122 y G133. Los resultados en la Tabla 22 muestran que los cuatro extractos presentan una CMI de 200  $\mu$ g/mL frente a las cepas H37Rv y G133, mientras que para la cepa G122 el extracto hexánico y acuoso tienen una CMI de 100  $\mu$ g/mL y el extracto clorofórmico y metanólico fueron inactivos a las concentraciones ensayadas (CMI > 200  $\mu$ g/mL). La mayoría de los compuestos fueron inactivos en las concentración ensayadas (CMI > 50  $\mu$ g/mL) frente a las tres cepas, sólo el compuesto aislado galato de metilo presentó actividad contra la cepa H37Rv con una CMI de 50  $\mu$ g/mL por lo que se puede decir que el galato de metilo es el principio antimicobacteriano del extracto metanólico. El derivado galato metilo triacetilado presentó mejor actividad (CMI 25  $\mu$ g/mL) que el producto natural frente a las tres cepas de *M. tuberculosis*, y fue dos veces más activo que el etambutol (CMI 50  $\mu$ g/mL) frente a la cepa G122. El

compuesto aislado 7-O- $\beta$ -glucopiranosido de (2S)-naringenina presentó una CMI de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  frente a la cepa G122, siendo igualmente activa que el estándar positivo etambutol (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Cabe mencionar que el galato de metilo pueda ser también el principio antimicobacteriano del extracto acuoso de *A. farnesiana*, ya que este compuesto fue caracterizado en el extracto metanólico y acuoso por CLAR, es probable que existan aun en el extracto metanólico otros compuestos con actividad antimicobacteriana que no se pudieron aislar.

Por otro lado, cabe resaltar que los compuestos aislados del extracto hexánico-clorofórmico no presentaron actividad contra *M. tuberculosis*, por lo que se atribuye que la actividad antimicobacteriana se deba a presencia de los ácidos grasos presentes en los extractos. En este respecto Sandoval y colaboradores en el 2012 (82) reportaron la actividad antimicobacteriana del ácido oleico (CMI 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en H37Rv y tres cepas MFR de *M. tuberculosis*), ácido palmítico (CMI 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en H37RV y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en 3 cepas MFR de *M. tuberculosis*) y ácido linoleico (CMI 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en H37RV y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en 3 cepas MFR de *M. tuberculosis*), contra la cepa sensible H37Rv y tres cepas MFR (H10, M15, M26). Estos ácidos grasos se encuentran en forma mayoritaria en extracto hexánico y clorofórmico de *A. farnesiana* de acuerdo a la caracterización realizada por CG y CG-EM.

Deng y colaboradores reportaron que el ácido gálico presentó una CMI de 66.67  $\mu\text{g}/\text{ml}$  frente a *M. tuberculosis* H37Rv (83). Este compuesto fue aislado del extracto metanólico de *A. farnesiana*, por lo que también contribuye con la actividad antimicobacteriana presentada por el extracto.

**Tabla 22.** Actividad antimicobacteriana de extractos y compuestos de *A. farnesiana*

Extracto/ Compuesto	<i>M. tuberculosis</i> CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	H37Rv	G122	G133
Extracto hexánico	200	100	200
Extracto clorofórmico	200	>200	200
Extracto metanólico	200	>200	200
Extracto acuoso	200	100	200
Tetacosanoato de (2S)-2,3-dihidroxiopilo	>50	>50	>50
$\beta$ -D-Glucopiranosido de (3 $\beta$ ,22 E)-estigmasta-5, 22- dien-3-ilo	>50	>50	>50
$\beta$ -D- Tetraacetilglucopiranosido de (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dieno	>50	>50	>50
Galato de metilo	50	>50	>50
Galato de metilo triacetilado	25	25	25
Ácido gálico	>50	>50	>50
Pinitol	>50	>50	>50
7-O- $\beta$ -glucopiranosido de (2S) naringenina	>50	50	-
Isoniazida	0.195	>50	-
Rifampicina	0.195	>50	-
Etambutol	3.12	50	-
Levofloxacino	-	6.25	-

(-) No determinada

Por otra parte la relación entre la estructura química y la actividad biológica de un compuesto han dado lugar a la síntesis de moléculas agregando sustituyentes a la molécula base que le confieran incrementar su eficacia, potencia, su espectro antimicrobiano y por supuesto disminución de los efectos adversos como se ha realizado con algunos antibióticos como las quinolonas (84). Esta propiedad se ve claramente en los resultados obtenidos entre el galato de metilo y su derivado (galato de metilo triacetilado), en el que se observa que el galato de metilo presenta una CMI de 50 µg/mL frente a H37Rv, mientras que el derivado mejoró la actividad (CMI 25 µg/mL) frente a las tres cepas ensayadas de *M. tuberculosis*. Se realizó el cálculo del LogP del galato de metilo (0.86) y del galato de metilo triacetilado (1.03) con lo que se observa que el galato de metilo triacetilado es más lipofílico lo que conlleva que penetre con mayor facilidad la membrana lipofílica de la micobacteria que contiene ácido micólicos.

#### 5.4.2 Ensayo antibacteriano

Se determinó la actividad antibacteriana de 12 muestras (mencionadas en el apartado 5.4) contra cinco bacterias entéricas causantes de disentería (*E. coli* enterohemorrágica, *Y. enterocolitica*, *S. enteritidis*, *S. flexneri* y *C. jejuni*). En la Tabla 23 se observa que el extracto hexánico presentó una CMI de 200 µg/mL contra *E. coli* enterohemorrágica, siendo inactivo frente a las otras cepas, el extracto clorofórmico presentó una CMI de 200 µg/mL contra *Y. enterocolitica*, *E. coli* enterohemorrágica y *S. enteritidis*, el extracto metanólico y el extracto acuoso presento CMI de 200 µg/mL frente a *Y. enterocolitica*, *E. coli* enterohemorrágica,

*S. enteritidis* y *S. flexneri*. El extracto metanólico y acuoso presentan actividad contra *C. jejuni* con una CMI de 100 µg/mL.

Como se mencionó en los antecedentes ya se han evaluado algunos extractos metanólicos y etanólicos obtenidos de diferentes partes del arbusto (Tabla 4 apartado 2.2.1) donde mostraron actividad antibacteriana contra *C. jejuni*, *C. coli*, *V. cholerae*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. lutea*, *E. coli*, *S. epidermidis*. De estas bacterias se tiene en común con este proyecto a *C. jejuni*, siendo la única bacteria sensible al galato de metilo, ácido gálico y 7-O-β glucopiranosido de (2S)-naringenina que presentaron valores de CMI de 50 µg/mL, mientras que todos los demás compuestos no fueron activos a las concentraciones ensayadas (CMI > 50 µg/mL). Cabe resaltar que estos compuestos fueron obtenidos del extracto metanólico lo que indica que podrían ser los principales principios activos de este extracto, aunque es posible que hay otros compuestos que no pudieron ser aislados en este estudio del extracto metanólico y de los otros extractos estudiados.

**Tabla 23.** Actividad antibacteriana de extractos y compuestos de *A. farnesiana*.

Extracto / Compuesto	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>E. coli</i> enterohemorrágica	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>C. jejuni</i>
Extracto hexánico	>200	200	> 200	> 200	> 200
Extracto clorofórmico	200	200	200	> 200	> 200
Extracto metanólico	200	200	200	200	100
Extracto acuoso	200	200	200	200	100
Tetracosanoato de (2S)-2,3 – dihidroxipropilo	>50	>50	>50	>50	>50
$\beta$ -D-Glucopiranosido de (3 $\beta$ ,22 E)-estigmasta-5, 22- dien-3-ilo	>50	>50	>50	>50	>50
$\beta$ -D- tetraacetilglucopiranosido de (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22-dieno	>50	>50	>50	>50	>50
Galato de metilo	>50	>50	>50	>50	50
Galato de metilo triacetilado	>50	>50	>50	>50	>50
Ácido gálico	>50	>50	>50	>50	50
Pinitol	>50	>50	>50	>50	>50
7-O- $\beta$ glucopiranosido de (2S) naringenina	>50	>50	>50	>50	50
Levofloxacino	0.0244	0.0488	0.1953	0.0244	0.0244

Se realizó una búsqueda en la literatura para tener un amplio conocimiento sobre los compuestos aislados en este proyecto, encontrando que también presentan otras actividades biológicas.

Los esteroides más comunes en plantas son el sitosterol, el estigmasterol y el campesterol. Se ha observado que los fitoesteroides tienen beneficios potenciales sobre el sistema cardiovascular debido a que reducen la absorción de colesterol intestinal y en el plasma de lipoproteínas de baja densidad (LDL)-colesterol (85).

Hasta el momento se ha comprobado que el (3 $\beta$ ,22 E)-estigmasta-5,22- dien-3-ol posee actividad anticancerígena (86), antimutagénica (87), antioxidante (88), anti-osteoartritis (89) y antiinflamatoria (90), mientras que al  $\beta$ -D-Glucopiranosido de (3 $\beta$ ,22 E)-estigmasta-5, 22- dien-3-ilo se le ha probado la actividad anti-fúngica (70). Donfack y colaboradores reportaron la actividad de este compuesto contra *S. flexneri* en un ensayo de microdilución en 24 pocillos con una CMI de 62.5  $\mu$ g/mL , debido a que este compuesto fue aislado en nuestro extracto metanólico se le adjudica que sea el responsable o uno de los responsables de la actividad presentada por el extracto metanólico frente a esta cepa (91).

Por otra parte se encontró que el tetracosanoato (2S) 2,3-dihidroxipropilo se clasifica como un monoglicérido. Los acilglicéridos o glicéridos son ésteres de ácidos grasos con glicerol, son muy abundantes en el tejido adiposo animal, en las semillas y frutos de las plantas oleaginosas. Los cuales pueden presentarse

como mono, di o triglicéridos, no se ha reportado alguna actividad biológica de este compuesto.

Los compuestos fenólicos son metabolitos esenciales que tienen funciones a nivel de la pared celular, actúan como agentes protectores secretándose en situaciones de estrés provocados por agentes patógenos y/o ambientales, estos compuestos provienen de la ruta ácido shikímico y son un grupo de antioxidantes muy importantes (92).

El galato de metilo es un compuesto muy promisorio, este es un compuesto fenólico con actividad antioxidante principalmente (72), anticancerígena (93), antiinflamatoria, se ha estudiado también su actividad como inhibidor del virus del herpes simple (94). Sánchez y colaboradores en el 2013 realizaron la evaluación de este compuesto contra *V. cholerae* observando que produce efectos en la integridad de la membrana celular causando disminución del pH citoplasmático y la hiperpolarización de la membrana (52). En el 2015 Acharyya y colaboradores determinaron el MIC en *Shigella ssp.* MFR (128–256 µg/mL), por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM por sus siglas en inglés) y por ensayo de perturbación de la membrana demostraron que el galato de metilo desintegra totalmente las membranas interna y externa, evaluaron también la farmacorresistencia de este compuesto exponiéndolo por 8 semanas frente a las cepas observando que no producía farmacorresistencia ya que el MIC no variaba (95). Debido al gran potencial que posee el galato de metilo se han realizado estudios contra aislados clínicos de *Salmonella* (*S. gallinarum*, *S. typhimurium* y *S. enteritidis*) teniendo una CMI de 3.9-125 µg/mL. El galato de

metilo en combinación con ciprofloxacino tiene actividad sinergista (CIM 0.24-7.8 µg/mL) (96).

El ácido gálico también es un compuesto fenólico y forma parte de la clasificación de los monómeros de los taninos hidrolizables (97), se ha evaluado su actividad de apoptosis (98), presenta actividad antioxidante (99), antiinflamatoria (100) y antibacterial (*S. enteritidis* CMI de 1.6 mg/ml) (101) y contra *E. coli* (CMI de 8 mg/ml) (102)), debida a su gran campo de aplicación se han obtenido patentes del ácido gálico y sus derivados (103).

Con la información anterior podemos deducir que la actividad mostrada por parte del extracto metanólico en este proyecto (CMI de 200 µg/mL) frente a *S. enteritidis* puede deberse a la presencia del metil galato y al ácido gálico aislados de este extracto.

Los flavonoides pertenecen a la familia de los compuestos fenólicos, están compuestos de dos anillos fenólicos (A y B), ligados mediante un anillo pirano (C), formando un esqueleto C6-C3-C6 en la mayoría de los flavonoides, se clasifican en flavonas, flavanoles, flavanonoles, flavanonas, chalconas, auronas y antocianidinas.

El compuesto aislado en este proyecto se trata de una flavanona: 7-O-β-glucopiranosido de (2S)-naringenina también conocida como prunina. Hassan El Sissi y colaboradores en 1973 la aislaron de *A. farnesiana*, su identificación fue únicamente por comparación cromatográfica y por UV, lo cual no es suficiente evidencia para caracterizar estructuralmente a un compuesto, en este

proyecto se empleó RMN de una y dos dimensiones para determinar la estructura química de la flavanona.

Se han realizado algunos estudios de esta flavanona encontrándose activo sobre células de leucemia humana HL-60 con un CMI de 21.4  $\mu\text{M}$  (104), también se le ha demostrado su efecto como antihiper glucémico (105), antihiperlipidémico (106), antiinflamatorio (107), presento actividad contra *K. pneumoniae* (CMI 32  $\mu\text{g/mL}$ ), *E. faecalis*, *S. epidemides*, *Enterobacter aerogenes*, *E.coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* y *P. aeruginosa* con un valor de CMI para todas estas bacterias de 64  $\mu\text{g/mL}$  (108). Por otra parte Céliz y colaboradores han investigado su efecto contra *B. cereus*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *E. faecium*, *S. aureus*, *S. auroginosa*, *S. enteritidis*, *E.coli*, pero fue inactivo, sin embargo sus derivados (butirato-O-6''-prunina, hexanoato-6''-prunina, octanoato-O-6''-prunina, decanoato-O-6''-prunina, laurato-O-6''-prunina) mostraron actividad contra las bacterias antes citadas (109).

Los carbohidratos, también conocidos como hidratos de carbono, glúcidos o sacáridos, son los principales componentes de casi todas las plantas. Los carbohidratos incluyen a los azúcares, almidones, celulosa y otras sustancias encontradas en raíces, tallos y hojas de las plantas siendo productos de síntesis. Se clasifican en monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos; la sacarosa se clasifica como un oligosacárido (disacárido), está compuesto por una unidad de  $\alpha$ -glucosa y una de  $\beta$ -fructosa enlazándose por el carbono 1 de la glucosa y por el carbono 2 de la fructosa formando un enlace O-glucosídico,

por ello se le puede llamar  $\alpha$ -D-glucopiranososa (1  $\rightarrow$ 2)  $\beta$ -D- fructofuranósido. (110).

Se definen como ciclitoles a la familia de cicloalcanos sustituidos con hidroxilos en todas sus posiciones. Los derivados de ciclohexano se denominan inositoles (111), el pinitol es un derivado metilado de D-*chiro*-inositol. El pinitol es un monosacárido encontrado en altas concentraciones en legumbres y comida (112). Se han hecho estudios en los que se demuestra que tienen un efecto similar a la insulina (113), se le ha determinado también actividad como antiinflamatorio (114).

*A. farnesiana* no se emplea con fines de tratamiento hiperglucémico, sin embargo podría emplearse para dicha actividad, en los antecedentes se encontró que los extractos etanólico y acuoso fueron evaluados para dicha actividad resultando efectivos, de los compuestos aislados en este proyecto se encontró que el pinitol y 7-O- $\beta$ -glucopiranosido de (2S)- naringenina en estudios previos se identifican como responsables de un efecto hipoglucémico.

#### **5.4.3 Citotoxicidad e índice de selectividad**

Se evaluó la citotoxicidad de los compuestos que presentaron actividad antimicrobacteriana y contra las bacterias causantes de disentería, siendo un total de tres compuestos aislados y un derivado que fueron evaluados sobre células Vero. Conociendo su valor de CI50 se calculó el Índice de Selectividad (IS), considerándose selectivos para las bacterias los compuestos con IS > 10 (115).

Con respecto a *M. tuberculosis* fueron dos compuestos aislados quienes presentaron actividad frente H37Rv, el galato de metilo presenta un  $CI_{50}$  de 187.5  $\mu\text{g/mL}$  contra células Vero, sin embargo su índice de selectividad es menor de 10 (IS 3.75) lo que indica que es más selectivo para células Vero que para *M. tuberculosis* H37Rv. Este compuesto fue acetilado lo cual mejoró su CMI (25  $\mu\text{g/mL}$ ) frente a las tres cepas de *M. tuberculosis* (H37Rv, G122, G133), sin embargo incrementa su citotoxicidad ( $CI_{50}$  36.05  $\mu\text{g/ml}$ ) y por consiguiente se ve afectado su índice de selectividad  $IS < 10$  (IS 1.44) (Tabla 24).

El otro compuesto aislado fue 7-O- $\beta$ -glucopiranosido de (2S)-naringenina que presentó actividad frente a G122 (CMI 50  $\mu\text{g/mL}$ ), su índice de selectividad es menor de 10 (IS 2.84) haciéndolo menos selectivo para *M. tuberculosis* que para células Vero (Tabla 24).

**Tabla 24.** Citotoxicidad e Índice de selectividad de los compuestos con actividad antimicobacteriana.

Compuesto	<i>M. tuberculosis</i> CMI $\mu\text{g/mL}$			Células vero $CI_{50}$ $\mu\text{g/mL}$	IS $CI_{50}/\text{CMI}$
	H37Rv	G122	G133		
Galato de metilo	50	>50	>50	187.5	3.75 (H37Rv)
Galato de metilo triacetilado	25	25	25	36.05	1.44 (H37Rv)
7-O- $\beta$ -glucopiranosido de (2S)-naringenina	>50	50	-	142.39	2.84 (G122)

La única bacteria causante de disentería que mostró sensibilidad ante los compuestos aislados fue *C. jejuni*, el galato de metilo, el ácido gálico y 7-O-β-glucopiranosido de (2S)-naringenina, presentaron una CMI de 50 µg/mL. El ácido gálico fue el compuesto más citotóxico (CI<sub>50</sub> de 79.68 µg/mL) comparado con el galato de metilo (CI<sub>50</sub> de 187.5 µg/mL) y la flavanona (CI<sub>50</sub> de 142.39 µg/mL), sin embargo su índice de selectividad de los tres compuestos es menor de 10, indicando con ello que afectan principalmente a las células Vero y no a la bacteria (Tabla 25).

**Tabla 25.** Citotoxicidad e Índice de Selectividad de los compuestos con actividad contra bacterias causantes de disentería

Compuesto	<i>C. jejuni</i> µg/mL	Células Vero CI <sub>50</sub> µg/mL	IS (CI <sub>50</sub> /CMI <i>C. jejuni</i> )
Galato de metilo	50	187.5	3.75
Ácido gálico	50	79.68	1.59
7-O-β-glucopiranosido de (2S)-naringenina	50	142.39	2.85

## CAPÍTULO 6

### 6. CONCLUSIONES

De la mezcla del extracto hexánico y clorofórmico se aislaron y caracterizaron 3 compuestos: el (3 $\beta$ , 22E)-estigmasta-5,22- dien-3-ol, el tetracosanoato de (2S)-2,3-dihidroxi y el  $\beta$ -D-glucopiranosido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5, 22- dien-3-ilo, los cuales no han sido reportados previamente en esta planta. Estos compuestos no presentaron actividad antibacteriana.

La muestra AF1 se analizó por CG-EM, la cual resultó ser una mezcla de dos esteroides acetilados y un derivado de estigmasteno: 3-acetil-colest-5-en-22-ino (11.5%), (3 $\beta$ , 22E)-acetilestigmasta-5,22-dieno (51.08%) y estigmastan-3,5-dieno (37.42%).

Se caracterizaron y cuantificaron por CG-FID y CG-EM, un total de 19 ácidos grasos en los extractos hexánicos y clorofórmicos, de los cuales 6 ya han sido reportados previamente en *A. farnesiana* (ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido araquídico), los otros 13 ácidos grasos (ácido laurico, ácido pentadecanoico, ácido cis-10 pentadecanoico, ácido palmitoleico, ácido heptadecanoico, ácido cis-10 heptadecenoico, ácido linoleilaidico, ácido  $\gamma$ -linolénico, ácido  $\alpha$ -linolénico, ácido cis-11-eicosenoico, ácido behénico, ácido cis-8,11,14-eicosatrienoico y ácido lignocérico) no han sido reportados previamente en la planta objeto de estudio.

Los ácidos grasos en mayor abundancia en ambos extractos son ácido linoleico (C18:2,  $\Delta^{9,12}$ ) (39.94 %-40.50%), el ácido oleico (C18:1, $\Delta^9$ ) (30.09% -30.73%) y

el ácido palmítico (C16:0) (13.05 -13.15%). A estos ácidos grasos se les atribuyen la actividad antimicobacteriana presentada por el extracto hexánico y cloroformico.

Del extracto metanólico se aislaron y caracterizaron seis compuestos: el galato de metilo, el ácido gálico, sacarosa, pinitol,  $\beta$ -D-glucopiranosido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5, 22- dien-3-ilo y 7-O- $\beta$ -glucopiranosido de (2S) naringenina, de los cuales la sacarosa y el  $\beta$ -D-glucopiranosido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5, 22- dien-3-ilo no han sido reportados previamente en *A. farnesiana*.

La flavanona 7-O- $\beta$ -glucopiranosido de (2S)-naringenina ya había sido reportada en *A. farnesiana* donde se identificó únicamente por cromatografía y UV, en este proyecto se caracterizó esta flavanona por medio de RMN de una y dos dimensiones.

El análisis por CLAR-EM del extracto metanólico y acuoso resultó en la caracterización de 15 compuestos en cada uno de los extractos. Los dos extractos tienen en común 13 compuestos.

Un total de 17 compuestos fueron caracterizados en el extracto metanólico y acuoso, de los cuales 9 ya han sido aislados y caracterizados previamente de *A. farnesiana* (ácido digálico, galato de metilo, galato de etilo, ácido elágico, naringina, kaemferol, naringenina, 7-O- $\beta$ -(4",6"-Digaloil glucopiranosido) de naringenina y 7-O- $\beta$ -glucopiranosido de (2S)-naringenina), los 8 restantes (ácido málico, ácido cumárico, digalato de metilo, eriodictiol, acacetina, criseriol, ácido cítrico y taxifolina) es la primera vez que se reportan en esta planta objeto de estudio.

Los cuatro extractos de *A. farnesiana* mostraron una CMI de 200 µg/mL frente a la cepa H37Rv y la cepa MFR G133 de *M. tuberculosis*. Los extractos hexánico y acuoso de *A. farnesiana* presentaron una CMI de 100 µg/mL contra la cepa MFR G122, mientras que el extracto clorofórmico y metanólico no mostraron actividad contra esta cepa a las concentraciones ensayadas (CMI > 200 µg/mL). El galato de metilo fue aislado del extracto metanólico presentando un valor de CMI 50 µg/mL frente a *M. tuberculosis* H37Rv. La flavanona presentó actividad frente a la cepa MFR G122 con una CMI de 50 µg/mL siendo igualmente activa que el estándar positivo etambutol (CMI 50 µg/mL) y no fue citotóxica (CI<sub>50</sub> 142.39 µg/mL).

El derivado galato metilo triacetilado presentó mejor actividad (CMI 25 µg/mL) que el producto natural frente a las tres cepas de *M. tuberculosis*, y es dos veces más activo que el etambutol (CMI 50 µg/mL) frente a la cepa G122, sin embargo se incrementó su citotoxicidad (CI<sub>50</sub> 36.05 µg/mL) contra células Vero comparado con el producto natural (IC<sub>50</sub> 187.5 µg/mL).

Los extractos activos frente a *Y. enterocolitica*, *E.coli* enterohemorrágica, *S. enteritidis* y *S. flexneri* fueron el metanólico y el acuoso con una CMI de 200 µg/mL.

Los extractos metanólicos y acuosos fueron activos contra *C. jejuni* con una CMI de 100 µg/mL. El galato de metilo, el ácido gálico y 7-O-β-glucopiranosido de (2S)-naringenina aislados del extracto metanólico fueron los únicos compuestos que presentaron actividad (CMI de 50 µg/mL) frente *C. jejuni*.

## **CAPÍTULO 7**

### **7. PERSPECTIVAS**

Debido a la complejidad observada en la separación y purificación de los constituyentes del extracto metanólico se recomienda implementar la técnica de CLAR con columnas de fase reversa para la separación de los compuestos minoritarios.

Realizar estudios de relación estructura-actividad realizando modificaciones estructurales tomando como prototipo molecular al galato de metilo, ácido gálico y 7-O- $\beta$ -glucopiranosido de (2S)-naringenina para mejorar la actividad antibacteriana.

## CAPÍTULO 8

### 8. REFERENCIAS

1. OMS | Enfermedades infecciosas. *WHO* (2015).
2. M. Vecchiola H, Mycobacterium tuberculosis. *Rev. Chil. infectología*. **27**, 539–540 (2010).
3. T. Uribarren Berrueta, TUBERCULOSIS, (available at <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/tuberculosis.html>).
4. OMS | Tuberculosis. *WHO* (2016).
5. Cenaprece, Cifras oficiales tuberculosis (2016), (available at [http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/tuberculosis/cifras\\_oficiales.html](http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/tuberculosis/cifras_oficiales.html)).
6. C. Silva *et al.*, Fármacos de primera línea utilizados en el tratamiento de la tuberculosis. *Arch. Venez. Farmacol. y Ter.* **26**, 21–26.
7. H. Cortez Cecilia, A. Arreola Ma Guadalupe, C. Escarpulli Graciela, Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecc. y Microbiol.* **31**, 137–151 (2011).
8. IMSS | Enfermedades Gastrointestinales, (available at <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/enfermedades-gastrointestinales>).
9. WHO | Diarrhoeal disease. *WHO* (2017).
10. V. Susana, Tratamiento Integrado. Medicina Interna en MTC (Fundación Europea de MTC, 2012).
11. R. R. Cabello, I. F. H. Benavente, Síndrome diarreico infeccioso (Ed. Médica Panamericana, 2002).
12. R. R. Cabello, Microbiología y parasitología humana / Microbiology and Human Parasitology: Bases etiologicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias / Etiological Basis of Infectious and Parasitic Diseases **26** (Ed. Médica Panamericana, 2007),
13. A. V. Martínez, Manual de medicina de urgencias (Editorial El Manual Moderno, México, 2002).
14. Longo, D. L., Harrison: gastroenterología y hepatología (McGraw Hill Mexico, México, Primera., 2013).
15. OMS | Las 10 principales causas de defunción, (2017).
16. Estadísticas de Mortalidad INEGI 2016, (available at <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107>).

17. Enfermedades diarreicas agudas en niños menores de cinco años: la respuesta es multifactorial (2012), (available at [http://ensanut.insp.mx/doctos/analiticos/EDA\\_EnfDiarAgu.pdf](http://ensanut.insp.mx/doctos/analiticos/EDA_EnfDiarAgu.pdf)).
18. OMS | Campylobacter, (2017).
19. A. Fica C., Manejo ambulatorio del síndrome diarreico agudo en adultos. *Rev. Chil. infectología*. **18**, 108–126 (2001).
20. C. Ximénez, P. Morán, F. Ramos, M. Ramiro, Amibiais intestinal: estado actual del conocimiento. *Med Int Mex*. **23**, 398–407 (2007).
21. L. A. Pérez López, Aislamiento y caracterización de compuestos de plantas del Noreste de México con actividad contra cepas de *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (2005).
22. N. Tamilselvan, T. Thirumalai, P. Shyamala, E. David, A review on some poisonous plants and their medicinal values. *J. Acute Dis*. **3**, 85–89 (2014).
23. G.C.Y Chiou, F. Zhao, Z.-F Shen, B.H.P LI, Effects of D-Timolol and L-Timolol on Ocular Blood Flow and Intraocular Pressure. *J. Ocul., Pharmacol. Ther.* **6**, 23–30, (1990).
24. D. F. Arencibia Arrebola, L. A. Rosario Fernández, D. Lazara Curveco Sánchez, Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Retel*, 40–52 (2003).
25. J. M. J. Favela-Hernández, A. García, E. Garza-González, V. M. Rivas-Galindo, M. R. Camacho-Corona, Antibacterial and Antimycobacterial Lignans and Flavonoids from *Larrea tridentata*. *Phyther. Res*. **26**, 1957–1960 (2012).
26. N. Tajuddeen *et al.*, A novel antimicrobial flavonoid from the stem bark of *Commiphora pedunculata* (Kotschy & Peyr.) Engl. *Nat. Prod. Res.*, 1–7 (2015).
27. F. Calzada, E. Bautista, L. Yépez-Mulia, N. García-Hernandez, A. Ortega, Antiamoebic and Antigiardial Activity of Clerodane Diterpenes from Mexican *Salvia* Species Used for the Treatment of Diarrhea. *Phytother. Res.* (2015).
28. M. del R. Camacho-Corona *et al.*, Screening for antibacterial and antiprotozoal activities of crude extracts derived from Mexican medicinal plants. *African J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **12** (2015), p. 104–112.
29. B. R. Maslin, J. T. Miller, D. S. Seigler, Overview of the generic status of *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae). *Aust. Syst. Bot.* **16**, 1 (2003).
30. M. L. Saini, R. Saini, S. Roy, A. Kumar, Comparative pharmacognostical and antimicrobial studies of acacia species (Mimosaceae). *J. Med. Plants Res.* **2**, 378–386 (2008).
31. I. Cock, Antimicrobial Activity of *Acacia aulacocarpa* and *Acacia complanta* Methanolic Extracts. *Pharmacogn. Commun.* **2**, 66–71 (2012).

32. A. Argueta, C. Leticia, Rodarte María E., Atlas de las plantas medicinales de la Medicina Tradicional Mexicana (2009), (available at <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Huizache&id=7841>).
33. S. N. de I. F. (SNIF), *Acacia farnesiana* (L.) Willd. *Com. Nac. For.*, 1–7 (2012).
34. S. de la Cruz, E. Rodríguez, H. N. Dávalos, A. Astudillo-Vázquez, Acute toxicity and decreased peristalsis in mice caused by *Taxodium mucronatum* and *Acacia farnesiana* extracts. *Rev. Latinoam. química*. **40**, 19–25 (2012).
35. Hédia Hannachi, Chemicals profiling and antioxidants activities of *Acacia* seeds. *J. Med. Plants Res.* (2011).
36. S. L. Castillo, N. Heredia, J. F. Contreras, S. García, Extracts of Edible and Medicinal Plants in Inhibition of Growth, Adherence, and Cytotoxin Production of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Food Sci.* **76**, M421–M426 (2011).
37. A. Misar, A. M. Mujumdar, Antidiarrhoeal activity of methanolic extract of *Acacia farnesiana* bark. *Asian J. Chem.* **23**, 1767–1770 (2011).
38. E. Sanchez, S. Garcia, N. Heredia, Extracts of Edible and Medicinal Plants Damage Membranes of *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 6888–6894 (2010).
39. G. M. Wassel, E. A. Abd El-Wahab, S. M. Aboutabl, M. S. Ammar, N. M.; Afifi, Phytochemical examination and biological studies of *Acacia nilotica* L. Willd and *Acacia farnesiana* L. Willd growing in Egypt. *Egypt. J. Pharm. Sci.* **33**, 327–40 (1992).
40. C. S. Letizia, J. Cocchiara, G. A. Wellington, A. M. Funk, C.; Api, Cassie absolute (*Acacia farnesiana* (L.) willd.). *Food Chem. Toxicol.* **38**, s27–s29 (2000).
41. H. Walbaum, Ethereal oil of cassia flowers. *J. fuer Prakt. Chemie.* **68**, 235–250 (1903).
42. K. Bino, K. S. B. P. S. Appian, Pharmacodynamic studies on the isolated active fraction of *Acacia farnesiana* (L.) willd. *Pharmacogn. Mag.* **10**, s283–s287 (2014).
43. M. Mueller *et al.*, Anti-inflammatory, antibacterial, and antioxidant activities of Thai medicinal plants. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **7**, 123–128 (2015).
44. S. A. M. Hussein, M. S. Afifi, A. M. D. El-Mousallami, Antimicrobial activity and phenolic constituents of *Acacia farnesiana* Willd., *Eugenia edulis* Vell. and *Euphorbia consobrina* (N.E.Br.). *Bull. Fac. Pharm. (Cairo Univ.)*. **40**, 129–134 (2002).
45. H. H. Barakat, A. M. Souleman, S. A. Hussein, O. A. Ibrahim, M. A. . Nawwar, Flavonoid galloyl glucosides from the pods of *Acacia farnesiana*. *Phytochemistry.* **51**, 139–142 (1999).
46. N. P. Sahu, B. Achari, S. Banerjee, 7,3'-Dihydroxy-4'-Methoxyflavone from seeds of *Acacia farnesiana*. *Phytochemistry.* **49**, 1425–1426 (1998).
47. S. I. El-Negoumy, M. A. El-Ansari, Kaempferol 7-galloylglucose from *Acacia farnesiana*. *Egypt. J. Chem.* **24**, 471–3 (1982).

48. H. I. El Sissi, M. A. El Ansari, S. I. El Negoumy, Phenolics of *Acacia farnesiana*. *Phytochemistry*. **12**, 2303 (1973).
49. H. I. El Sissi *et al.*, Prunin-0-6"-gallat, aus *Acacia farnesiana*. *Phytochemistry*. **13**, 2843–2844 (1974).
50. H. Thieme, A. Khogali, Isolation of apigenin-6,8-bis(C- $\beta$ -D-glucopyranoside) from leaves of *Acacia farnesiana*. *Pharmazie*. **29**, 352 (1974).
51. M. Ilyas, N. Hameed, W. Rahman, Flavonoids from the flowers of *Acacia farnesiana*. *J. Indian Chem. Soc.* **47**, 183–184 (1970).
52. E. Sánchez, N. Heredia, M. del R. Camacho-Corona, S. García, Isolation, characterization and mode of antimicrobial action against *Vibrio cholerae* of methyl gallate isolated from *Acacia farnesiana*. *J. Appl. Microbiol.* **115**, 1307–1316 (2013).
53. G. M. Wassel, E. A. Abd-El-Wahab, S. M. Aboutabl, N. M. Ammar, M. S. Affi, Study of phenolic constituents and tannins isolated from *Acacia nilotica* (L.) Willd and *Acacia farnesiana* (L.) Willd. growing in Egypt. *Herba Hungarica*. **29**, 43–9 (1990).
54. A.-S. Lin *et al.*, Acasiane A and B and Farnesirane A and B, Diterpene Derivatives From the Roots of *Acacia farnesiana*. *Planta Med.* **75**, 256–261 (2009).
55. N. P. Sahu *et al.*, A novel diterpene glycoside from the seeds of *Acacia farnesiana*. *Tetrahedron Lett.* **38**, 8405–8408 (1997).
56. A. Misar, A. M. Mujumdar, A. Ruikar, N. R. Deshpande, Quantification of  $\beta$ -sitosterol from barks of 3 *Acacia* species by HPTLC. *J. Pharm. Res.* **3**, 2595–2596 (2010).
57. A. Z. Daza Bereño, Estudio fitoquímico de la corteza de *Acacia farnesiana* utilizada tradicionalmente para el tratamiento de la malaria, (2014).
58. X. A. Dominguez, H. Farias Martinez, Isolation of pinitol from huizache (*Acacia farnesiana*) flowers. *Cienc. (Mexico City)*. **25**, 107–8 (1967).
59. V. E. F. Abrantes *et al.*, Molecular Modeling of Lectin-Like Protein from *Acacia farnesiana* Reveals a Possible Anti-Inflammatory Mechanism in Carrageenan-Induced Inflammation. *Biomed Res. Int.* **2013**, 1–9 (2013).
60. R. Gmelin, A. Kjaer, P. O. Larsen, N-acetyl-l-djenkolic acid, a novel amino acid isolated from *Acacia farnesiana* willd. *Phytochemistry*. **1**, 233–236 (1962).
61. S. G. Franzblau *et al.*, Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 362–366 (1998).
62. M. D. R. Camacho-Corona *et al.*, Activity against drug resistant-tuberculosis strains of plants used in Mexican traditional medicine to treat tuberculosis and other respiratory diseases. *Phyther. Res.* **22**, 82–85 (2008).
63. J. R. Zgoda, J. R. Porter, A Convenient Microdilution Method for Screening Natural Products Against Bacteria and Fungi. *Pharm. Biol.* **39**, 221–225 (2001).

64. A. H. Uc-Cachón *et al.*, Naphthoquinones isolated from *Diospyros anisandra* exhibit potent activity against pan-resistant first-line drugs *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **27**, 114–120 (2014).
65. G. Navarrete-Vázquez *et al.*, Synthesis and antimycobacterial activity of 4-(5-substituted-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyridines. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 5502–5508 (2007).
66. H. Kojima, N. Sato, A. Hatano, H. Ogura, Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry*. **29**, 2351–2355 (1990).
67. D. Itoh, K. Kawano, K. Nabeta, Biosynthesis of chloroplastidic and extrachloroplastidic terpenoids in liverwort cultured cells: <sup>13</sup>C serine as a probe of terpene biosynthesis via mevalonate and non-mevalonate pathways. *J. Nat. Prod.* **66**, 332–336 (2003).
68. L. U. Jiang, P. U. Xiao, T. U. Guang, Z. Yu, Iridoid Glycosides from *Buddleja lindleyana*. **13**, 151–154 (2004).
69. M. S. F. Lie Ken Jie, C. C. Lam, <sup>1</sup>H-Nuclear magnetic resonance spectroscopic studies of saturated, acetylenic and ethylenic triacylglycerols. *Chem. Phys. Lipids.* **77**, 155–171 (1995).
70. A. Ridhay, A. Noor, N. H. Soekamto, T. Harlim, I. Van Altena, A stigmasterol glycoside from the root wood of *Melochia umbellata* (Houtt) Stapf var. *degrabrata* K. *Indo. J. Chem.* **12**, 100–103 (2012).
71. M. S. Alam, N. Chopra, M. Ali, M. Niwa, Oleanen and stigmasterol derivatives from *Ambroma augusta*. *Phytochemistry*. **41**, 1197–1200 (1996).
72. M. Ekprasada, H. Nurdin, Antioxidant activity of methyl gallate isolated from the leaves of *Toona sureni*. *Indones. J. Chem.* **9**, 457–460 (2009).
73. O. a Eldahshan, Isolation and structure elucidation of phenolic compounds of carob leaves grown in Egypt. *J. Biol. Sci.* **3**, 52–55 (2011).
74. M. N. A. Mancilla, Caracterización molecular de fructanos en *Agave* y *Dasyilirion spp* identificación de fructosiltransferasas y su expresión en *Picha pastoris*, (2006).
75. C. Sridhar, A. V. Krishnaraju, G. V. Subbaraju, Antiinflammatory Constituents of *Teramnus labialis*. *Indian J. Pharm. Sci.* **68**, 111–114 (2006).
76. A. R. Ehab, H. Mohammed, A. K. Hazem, A. A. Hassan, Flavanone Glycosides from *Gleditsia caspia*. *J. Nat. Prod. Vol.* **3**, 35–46 (2010).
77. S. Rayyan, T. Fossen, H. Solheim Nateland, M. Andersen, Isolation and identification of flavonoids, including flavone rotamers, from the herbal drug “Crateagi folium cum flore” (hawthorn). *Phytochem. Anal.* **16**, 334–341 (2005).
78. S. H. Zekry *et al.*, Effect of metabolites isolated from *Cuscuta pedicellata* on high fat diet-fed rats. *Med. Chem. Res.* **24**, 1964–1973 (2015).

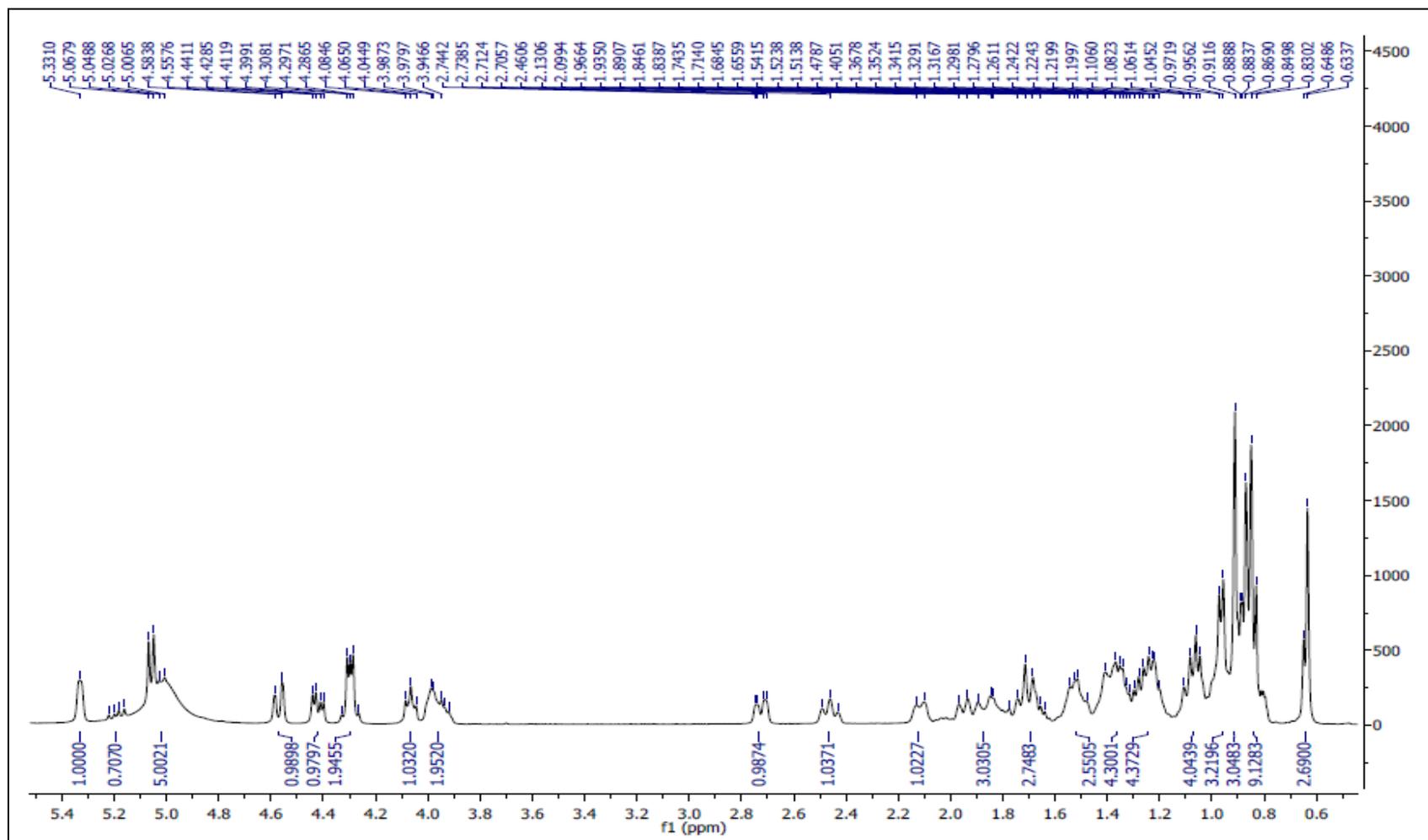
79. A. R. Chowdhury, R. Banerji, G. Misra, S. K. Nigam, N. Botanical, Short Communication Chemical Composition of *Acacia* Seeds & The Lipid Composition of Karaka Seeds. **60**, 1893–1894 (1893).
80. J. Higdon, V. J. Drake, G. Angelo, D. B. Jump, Essential Fatty Acids | Linus Pauling Institute | Oregon State University, (available at <http://lpi.oregonstate.edu/mic/other-nutrients/essential-fatty-acids>).
81. A. P. Simopoulos, The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. *Exp. Biol. Med.* **233**, 674–688 (2008).
82. N. E. Sandoval-Montemayor *et al.*, Chemical composition of hexane extract of *Citrus aurantifolia* and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of some of its constituents. *Molecules*. **17**, 11173–11184 (2012).
83. K.-Z. Deng, Y. Xiong, B. Zhou, Y.-M. Guan, Y.-M. Luo, Chemical Constituents from the Roots of *Ranunculus ternatus* and their Inhibitory Effects on *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecules*. **18**, 11859–11865 (2013).
84. A. Efraín, C. Sepúlveda, M. Elena, M. Enríquez, N. M. Patiño, Quinolonas. *Rev Fac Med UNAM*. **51**, 173–177 (2008).
85. L. Normén, P. Dutta, A. Lia, H. Andersson, Soy sterol esters and beta-sitostanol ester as inhibitors of cholesterol absorption in human small bowel. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**, 908–13 (2000).
86. H. Ali *et al.*, Isolation and evaluation of anticancer efficacy of stigmasterol in a mouse model of DMBA-induced skin carcinoma. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**, 2793–800 (2015).
87. J.-C. Lim *et al.*, Antimutagenic Constituents from the Thorns of *Gleditsia sinensis*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **53**, 561–564 (2005).
88. B. Shanthakumar, M. Sathish, A. J. Suresh, In Vitro Anti Oxidant Activity of Extracts and Stigmasterol from Leaves of *Clerodendrum inerme* Linn. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* **4**, 1411–1418 (2013).
89. O. Gabay *et al.*, Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. *Osteoarthr. Cartil.* **18**, 106–116 (2010).
90. M. D. García, M. T. Sáenz, M. A. Gómez, M. A. Fernández, Topical antiinflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation models. *Phyther. Res.* **13**, 78–80 (1999).
91. A. R. N. Donfack *et al.*, Stigmastane derivatives from the roots of *Vernonia guineensis* and their antimicrobial activity. *Phytochem. Lett.* **5**, 596–599 (2012).
92. Ana María, D. F. Ramos-Escudero, C. Alvarado-Ortiz Ureta, B. Castañeda Castañeda, Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Rev. la Soc. Química del Perú.* **73**, 142–149 (2007).

93. S. F. Nabavi *et al.*, Post-stroke depression modulation and in vivo antioxidant activity of gallic acid and its synthetic derivatives in a murine model system. *Nutrients*. **8** (2016).
94. C. J. M. Kane, J. H. Menna, C. C. Sung, Y. C. Yeh, Methyl gallate, methyl-3,4,5-trihydroxybenzoate, is a potent and highly specific inhibitor of herpes simplex virus in vitro. II. Antiviral activity of methyl gallate and its derivatives. *Biosci. Rep.* **8**, 95–102 (1988).
95. S. Acharyya , Intracellular and membrane-damaging activities of methyl gallate isolated from *Terminalia chebula* against multidrug-resistant *Shigella* spp. *J. Med. Microbiol.* **64**, 901–909 (2015).
96. D.-Y. Kwon, In Vitro Activity of Methyl Gallate Isolated from *Galla Rhois* Alone and in Combination with Ciprofloxacin Against Clinical Isolates of *Salmonella*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 1848–1852 (2008).
97. F. J. Olivas-Aguirre *et al.*, Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutr Hosp. Nutr Hosp.* **3131**, 55–6655 (2015).
98. B.-C. Ji *et al.*, Gallic Acid Induces Apoptosis via Caspase-3 and Mitochondrion-Dependent Pathways in Vitro and Suppresses Lung Xenograft Tumor Growth in Vivo. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 7596–7604 (2009).
99. S. F. Nabavi *et al.*, In Vivo Protective Effects of Gallic Acid Isolated from *Peltiphyllum peltatum* Against Sodium Fluoride-Induced Oxidative Stress in Rat Erythrocytes. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* **64**, 553–9 (2013).
100. S.-H. Kim *et al.*, Gallic Acid Inhibits Histamine Release and Pro-inflammatory Cytokine Production in Mast Cells. *Toxicol. Sci.* **91**, 123–131 (2006).
101. J. D. N. Guessan, a P. Bidié, B. N. Lenta, B. Weniger, P. André, In vitro assays for bioactivity-guided isolation of antisalmonella and antioxidant compounds in *Thonningia sanguinea* flowers. *African J. Biotechnol.* **6**, 1685–1689 (2007).
102. D. Shao *et al.*, Inhibition of Gallic Acid on the Growth and Biofilm Formation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans*. *J. Food Sci.* **80**, M1299–M1305 (2015).
103. S. Choubey, L. R. Varughese, V. Kumar, V. Beniwal, Medicinal importance of gallic acid and its ester derivatives: a patent review. *Pharm. Pat. Anal.* **4**, 305–315 (2015).
104. N. H. Tung *et al.*, Phenolic components from the leaves of *Panax ginseng* and their effects on HL-60 human leukemia cells. *Food Sci. Biotechnol.* **19**, 271–274 (2010).
105. J. S. Choi, T. Yokozawa, H. Oura, Improvement of hyperglycemia and hyperlipemia in streptozotocin-diabetic rats by a methanolic extract of *Prunus davidiana* stems and its main component, prunin. *Planta Med.* **57**, 208–211 (1991).
106. J. S. Choi, T. Yokozawa, H. Oura, Antihyperlipidemic Effect of Flavonoids from *Prunus davidiana*. *J. Nat. Prod.* **54**, 218–224 (1991).
107. H. V. Dung *et al.*, Megastigmane Glycosides from *Docynia indica* and their anti-inflammatory activities. *Helv. Chim. Acta.* **99**, 681–686 (2016).

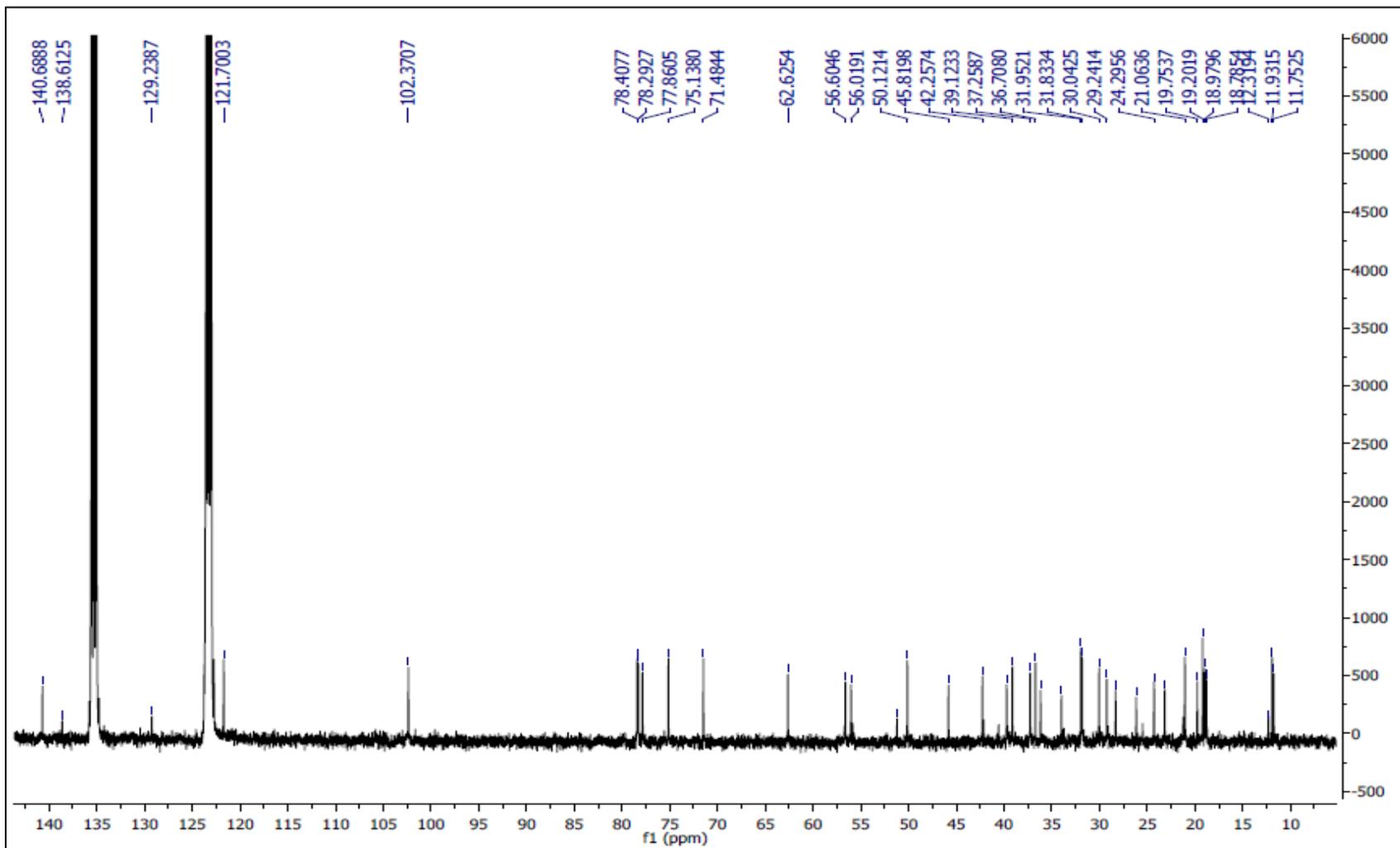
108. D. Cruz-Vega *et al.*, Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza radix* and its bioactive compounds. *Phyther. Res.* **22**, 557–559 (2007).
109. G. Céliz, F. F. Alfaro, C. Cappellini, M. Daz, S. V. Verstraeten, Prunin- and hesperetin glucoside-alkyl (C4–C18) esters interaction with Jurkat cells plasma membrane: Consequences on membrane physical properties and antioxidant capacity. *Food Chem. Toxicol.* **55**, 411–423 (2013).
110. V. Melo Ruiz, O. Cuamatzi Tapia, Bioquímica de los procesos metabólicos, *Reverté* (2007).
111. J. M. Otero, Síntesis y evaluación biológica de inhibidores peptídicos de la beta secretasa y de los nuevos derivados de nitroazúcares (benzocarbazaldionas polihidroxiladas, beta-aminoácidos cicloalcánicos polihidroxilados e iminoazúcares ramificados (2007).
112. W. W. Campbell *et al.*, Pinitol supplementation does not affect insulin-mediated glucose metabolism and muscle insulin receptor content and phosphorylation in older humans. *J. Nutr.* **134**, 2998–3003 (2004).
113. S. H. Bates, R. B. Jones, C. J. Bailey, Insulin-like effect of pinitol. *Br. J. Pharmacol.* **130**, 1944–8 (2000).
114. V. B. P. R.K. Singh, B.L. Pandey, M. Tripathi, Anti-inflammatory effect of (+)-pinitol. *Fitoterapia.* **2**, 168–170 (2001).
115. I. Orme *et al.*, Search for New Drugs for Treatment of Tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1943–1946 (2001).

## **APÉNDICE A**

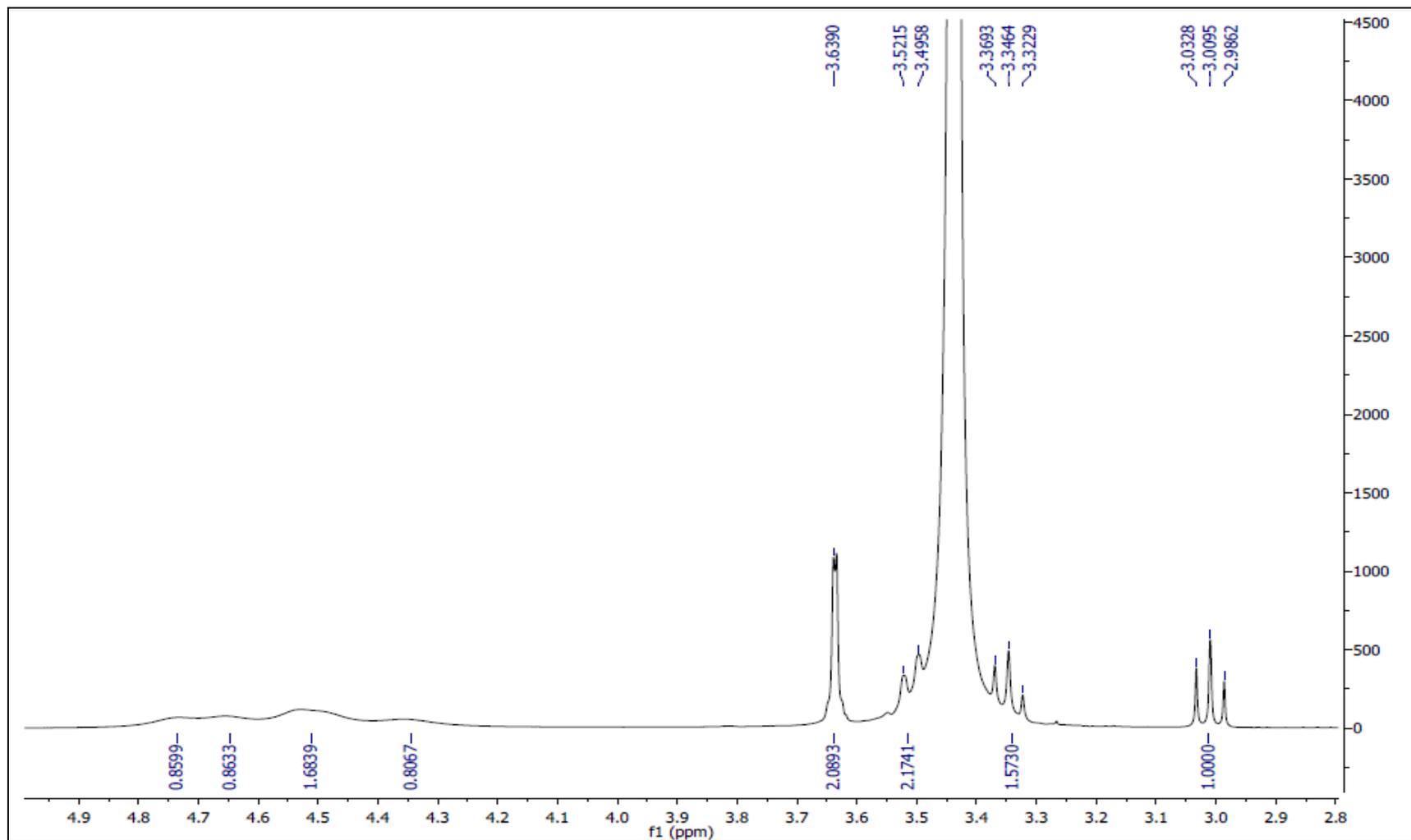
### **ESPECTROS ADICIONALES**



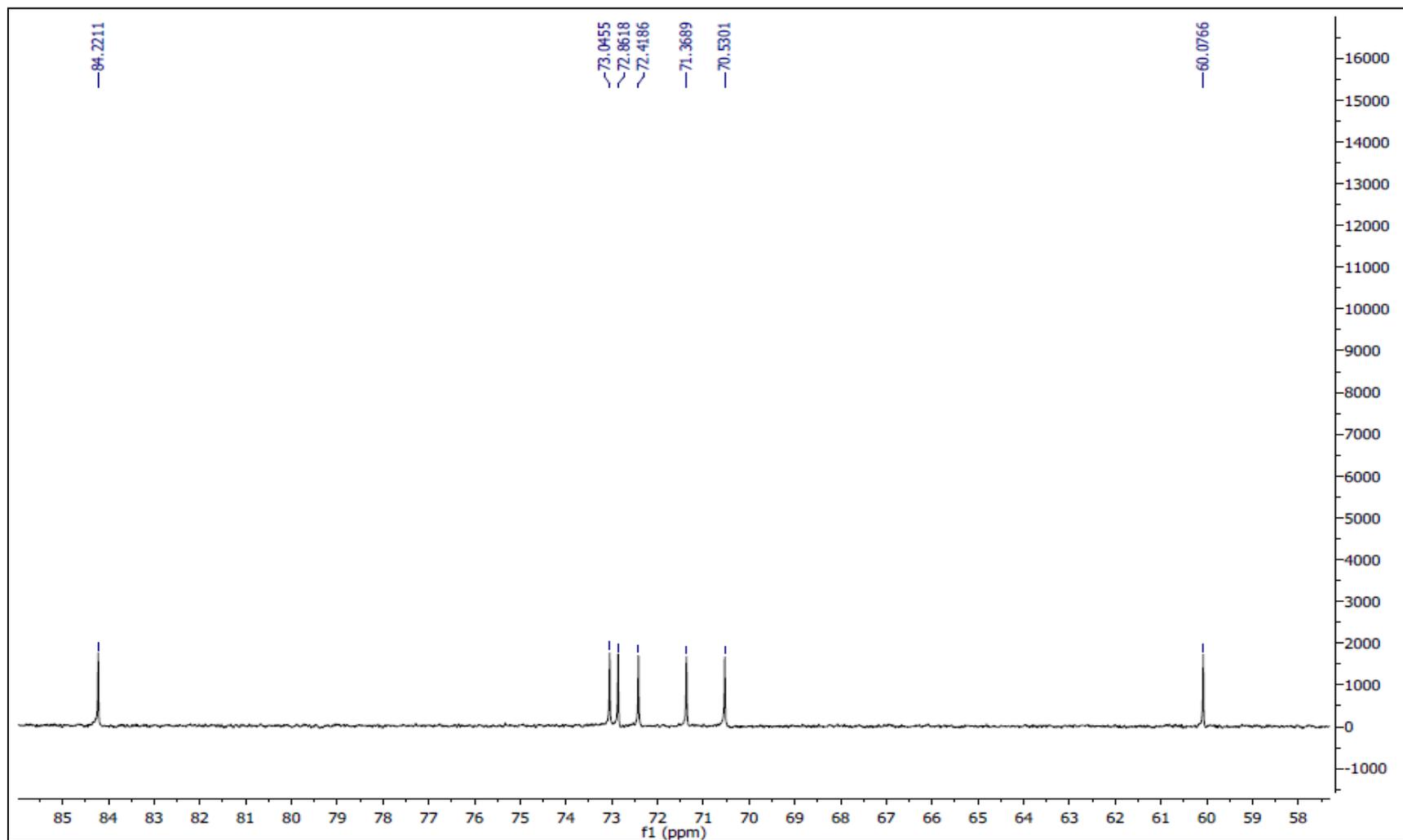
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Piridina- $d_6$ , 400 MHz) de  $\beta$ -D-Glucopiranosido de (3 $\beta$ ,22 E)-estigmasta-5, 22- dien-3-ilo (AF8)



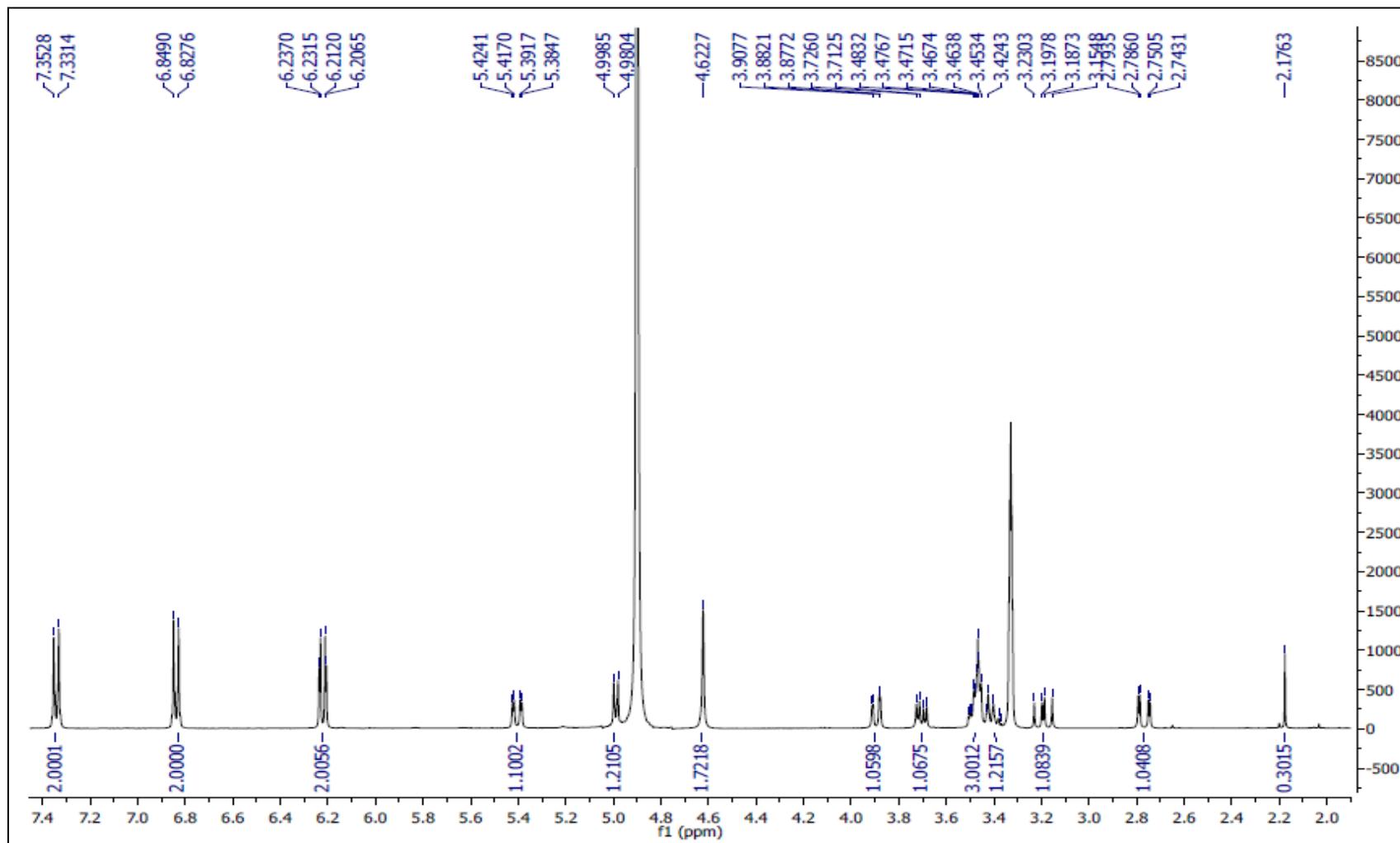
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Piridina- $\text{d}_6$ , 100 MHz) de  $\beta$ -D-Glucopiranósido de (3 $\beta$ , 22 E)-estigmasta-5, 22- dien-3-ilo (AF8)



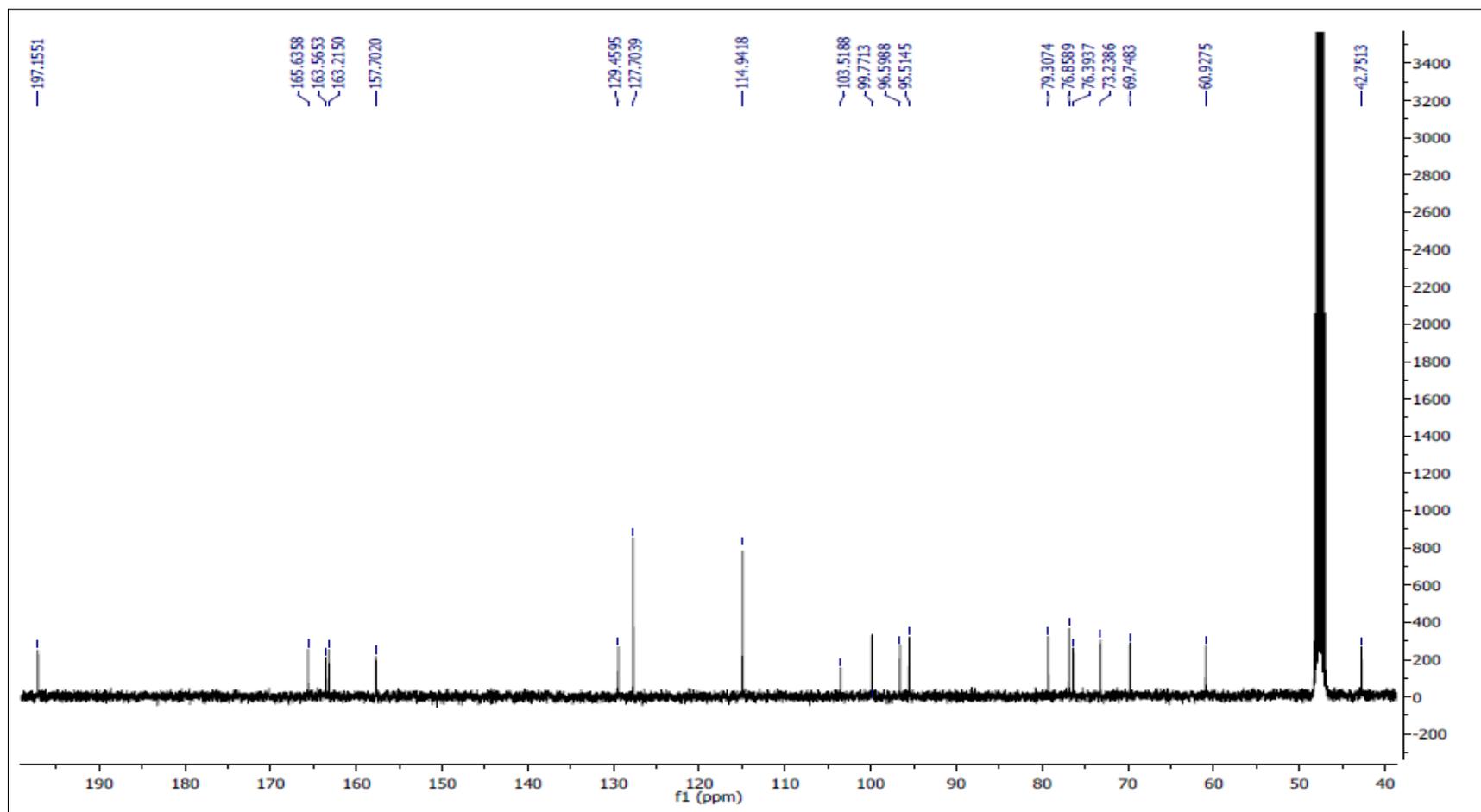
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ , 400 MHz) de Pinitol (AF7)



Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz) de Pinitol (AF7)



Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (MeOD, 400 MHz) de 7-O- $\beta$ -D- Glucopiranosido de naringenina (AF10)



Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (MeOD, 100 MHz) de 7-O- $\beta$ -D- Glucopiranosido de naringenina (AF10)

## **APÉNDICE B**

### **DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

UANL

Facultad de Ciencias Químicas  
Área y Cuerpos Académicos de Químico Farmacéutico Biólogo

OTORGAN EL PRESENTE

# RECONOCIMIENTO A

Erika Hernández García, Claudia Delgadillo Puga, José Rodríguez-Rodríguez, Magdalena de J. Rostro-Alanís, Roberto Parra, Abraham García, María del Rayo Camacho-Corona

POR SU DESTACADA PARTICIPACIÓN COMO PONENTES DEL TRABAJO LIBRE - ORAL:

“Composición química de los extractos hexánico y clorofórmico de los frutos de *Acacia farnesiana*”

DENTRO DEL

“III Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina  
y I Simposio Nacional de Microbiología Aplicada”

LLEVADO A CABO EN EL CENTRO DE CONVENCIONES DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, U.A.N.L.

EL 1 Y 2 DE SEPTIEMBRE DE 2016

*Alere Flammam Veritatis*

**Dr. Isaías Banderas Rentería**  
PRESIDENTE DEL COMITÉ ORGANIZADOR

**Dr. Eduardo Soto Regalado**  
DIRECTOR



**DAAD**  
Deutscher Akademischer Austausch Dienst  
German Academic Exchange Service



**UANL**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN®

Facultad de Ciencias Químicas  
Área y Cuerpos Académicos de Químico Farmacéutico Biólogo

OTORGAN EL PRESENTE

# RECONOCIMIENTO

A

**Erika Hernández García, Claudia Delgadillo Puga, José Rodríguez-Rodríguez,  
Magdalena de J. Rostro-Alanís, Roberto Parra, Abraham García,  
María del Rayo Camacho-Corona**

POR HABER OBTENIDO

## PRIMER LUGAR

EN LOS TRABAJOS LIBRES-ORALES TITULADO:

**“Composición química de los extractos hexánico y clorofórmico  
de los frutos de *Acacia farnesiana*”.**

DENTRO DEL

**“III Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina  
y I Simposio Nacional de Microbiología Aplicada”**

LLEVADO A CABO EN EL CENTRO DE CONVENCIONES DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, U.A.N.L.

EL 1 Y 2 DE SEPTIEMBRE DE 2016

*Alere Flammam Veritatis*

  
**Dr. Isaías Bolderas Rentería**  
PRESIDENTE DEL COMITÉ ORGANIZADOR

  
**Dr. Eduardo Soto Regalado**  
DIRECTOR

