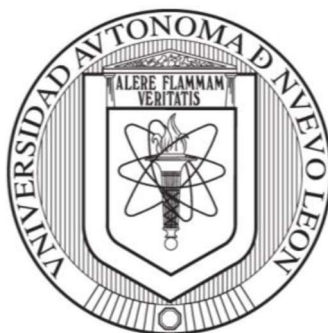


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



NUEVAS APORTACIONES A LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y

FARMACOLÓGICA DE *Larrea tridentata*

POR

QFB GUILLERMO NÚÑEZ MOJICA

Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRÍA EN

CIENCIAS con Orientación en Farmacia

ENERO 2018

**NUEVAS APORTACIONES A LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y
FARMACOLÓGICA DE *Larrea tridentata***

Aprobación de la tesis:



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



**Dra. Susana T. López Cortina
Secretario**



**Dra. Yolanda A. Gracia Vásquez
Vocal**



**Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
Sub-Directora de posgrado**


**NUEVAS APORTACIONES A LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y
FARMACOLÓGICA DE *Larrea tridentata***

Revisión y aprobación de la tesis:

Comité Tutorial



Dra. Yolanda Gracia Vásquez
Comité tutorial



Dra. Susana Thelma López Cortina
Comité tutorial



Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza
Comité tutorial

RESUMEN

QFB Guillermo Núñez Mojica
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Fecha de graduación:
Enero 2018

Título del estudio: NUEVAS APORTACIONES A LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y FARMACOLÓGICA DE *Larrea tridentata*

Número de páginas: 184

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Farmacia

Área de estudio: Farmacia

Propósito y Método de estudio:

La tuberculosis (TB) es una de las 10 principales causas de muerte en el mundo y en conjunto con el VIH es una de las enfermedades líder en muertes por infecciones. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2015 se reportaron 1.8 millones de muertes por TB, de las cuales 0.4 millones fueron resultado de coinfección con Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), y se estima que en el mismo periodo surgieron 10.4 millones de nuevos casos; adicionalmente la fármacorresistencia que desarrolla el agente causal de la tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, genera cepas resistentes del patógeno que al infectar a pacientes susceptibles produce tuberculosis multifármaco resistente (TB-MFR). De los pacientes que padecieron tuberculosis multifármaco resistente, en el año 2015 se contabilizaron 480 000 nuevos casos, y de los mismos el 9.5 % fueron tuberculosis extremadamente fármacorresistente (TB-ExFR), además, se reportaron 100 000 casos de tuberculosis resistente a rifampicina (TB-RR). Las cifras antes mencionadas indican que la tuberculosis aun es un problema serio de salud global, por lo que es imperativo encontrar alternativas terapéuticas que contrarresten la enfermedad. En México durante el año 2015 fue reportado un éxito del 85.3% en la cura de pacientes con tuberculosis; sin embargo, en los años subsecuentes se ha observado que en el país los decesos por la enfermedad van en aumento, reportándose en promedio 15 mil casos nuevos de tuberculosis pulmonar y aproximadamente 2000 defunciones, lo que da un indicativo de que la infección por *M. tuberculosis* va en aumento en el país.

Las enfermedades infecciosas ocasionadas por bacterias, al igual que la tuberculosis, son una de las crisis de salud globales que la OMS considera como prioritarias a controlar, en especial aquellas infecciones que son contraídas en hospitales y centros de salud, ya que los patógenos causales son bacterias fármacorresistentes a los antibióticos más prescritos, como carbapenémicos, oxacilinas, cefalosporinas, vancomicina, metilicina y linezolid. Las infecciones en

vías respiratorias son la principal causa de muerte en hospitales, y en México en el 2017, el boletín epidemiológico de la Secretaría de Salud reporta hasta la semana 37 del año en curso un total de 17 937 934 de casos de infecciones respiratorias agudas, 1 324 707 casos más que el año pasado, y si se considera la mortalidad por este tipo de infecciones, el panorama en el país no parece prometedor respecto al control epidemiológico de infecciones importantes.

Debido a las problemáticas anteriores, y con base en el antecedente de que la etnomedicina y los productos naturales de plantas son fuente potencial de nuevos fármacos antibacterianos; se plantea en el presente proyecto el aislamiento de nuevos productos naturales de *Larrea tridentata*, ya que dicho espécimen vegetal ha demostrado poseer moléculas activas con diversas actividades biológicas, de las cuales destacan la actividad antimicobacteriana y antibacteriana. Para lograr lo antes mencionado, de *L. tridentata* se obtuvo el extracto hexánico que se analizó por Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas, y se obtuvo del extracto clorofórmico mediante diversos métodos cromatográficos, siete lignanos y dos flavonoides. De los cuales tres ciclolignanos son nuevos productos naturales. Adicionalmente, se metilo uno de los lignanos nuevos para obtener 2 derivados semisintéticos. Todos los compuestos aislados y derivados semi-sintéticos fueron caracterizados estructuralmente mediante Resonancia Magnética Nuclear de una y dos dimensiones. Posteriormente fueron ensayados los compuestos contra nueve aislados clínicos farmacorresistentes: *Acinetobacter baumannii*; resistente a carbapenémicos, *Escherichia coli* resistente a oxacilinas, *E. coli* productora de BLEE, *Pseudomonas aureoginosa* resistente a carbapenémicos, *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos y cefalosporinas de amplio espectro, *K. pneumoniae* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *S. epidermidis* resistente a linezolid y contra *M. tuberculosis* H37Rv sensible a todos los fármacos de primera línea y un aislado clínico de *M. tuberculosis* resistente a rifampicina, etambutol y estreptomina (la cepa se indexó con la clave G122).

Conclusiones y Contribuciones:

Del extracto hexánico de *L. tridentata* se caracterizó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas un alcano, el nonacosano (11.12 %) y un esteroide, el β -sitosterol (24.61 %) como los compuestos más abundantes. Del extracto clorofórmico de *L. tridentata*, se aislaron y caracterizaron tres nuevos productos naturales, los ciclolignanos: Lt16:4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano, Lt18:3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano y Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano, adicionalmente, se aislaron y caracterizaron seis metabolitos secundarios previamente reportados en *L. tridentata*: los ciclolignanos Lt8:3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina y Lt21:3'-demetoxi-isoguaiacina, los lignanos de tipo butano, el Lt4:ácido meso-dihidroguaiarético y el Lt20:ácido nordihidroguaiarético, así como los flavonoides Lt5:5,4'-dihidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona y Lt3:5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona. Se observó de débil a moderada actividad antimicobacteriana contra ambas cepas ensayadas por parte de los lignanos nuevos: Lt16 con CMI:50 μ g/mL, Lt18 con CMI: 50 μ g/mL contra H37Rv e inactivo contra G122 y Lt17 con CMI 25 μ g/mL; y mostraron

actividad antibacteriana contra las bacterias gram positivas *E. faecium* resistente a vancomicina, *S. aureus* resistente a meticilina, *S. epidermidis* resistente a linezolid con las siguientes rangos de CMI: Lt16 (CMI: 25-12.5 µg/mL), Lt18 (CMI: 25 µg/mL) y Lt17 (CMI: 50-25 µg/mL). En cuanto a los compuestos ya reportados del extracto clorofórmico de *L. tridentata*, no se observó actividad antimicobacteriana contra ninguna de las dos cepas de *M. tuberculosis*, sin embargo, mostraron buena actividad antibacteriana como en el caso del Lt20: ácido nordihidroguaiarético con una CMI contra *K. pneumonia* productora de BLEE de 12.5 µg/mL, el compuesto Lt8:3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina con CMI de 6.25 µg/mL contra *S. epidermidis* resistente a linezolid. El derivado de Lt16, el compuesto GN30, mostró la mejor actividad contra *S. aureus* resistente a meticilina (CMI: 6.25 µg/mL) siendo su actividad comparable al estándar positivo levofloxacino; además de que fue el mejor compuesto antimicobacteriano con una CMI contra *M. tuberculosis* H37Rv de 25 µg/mL, y contra *M. tuberculosis* G122 de 12.5 µg/mL, siendo un buen prototipo para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos y antimicobacterianos.



Dra. María del Rayo Camacho Corona
Directora de tesis



Dr. Edgar Abraham García Zepeda
Co-Director de tesis

AGRADECIMIENTOS

Dra. Ma. Del Rayo Camacho Corona

Facultad de Ciencias Químicas, UANL

Por la planeación, asesoría, gestión de recursos y apoyo académico y moral para la realización del proyecto de tesis de maestría.

Dr. Edgar Abraham García Zepeda

Facultad de Ciencias Químicas, UANL

Por sus aportes respecto a la síntesis de derivados metilados y en la elucidación estructural de uno de los lignanos.

Comité tutorial

Dra. Yolanda Gracia Vásquez

Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza

Dra. Susana Thelma López Cortina

Facultad de Ciencias Químicas, UANL

Por sus aportes en la logística, organización y corrección del proyecto de tesis por medio de las reuniones tutoriales y seminarios departamentales.

Dra. Elvira Garza González Servicio de Gastroenterología,

Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González.

Por proporcionar los insumos y las instalaciones para la realización de pruebas de determinación de actividad antimicobacteriana y antibacteriana de los compuestos obtenidos.

María de la Luz Acevedo Duarte

Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González.

Por el asesoramiento técnico en la realización de los ensayos de determinación de actividad antimicobacteriana y antibacteriana de los compuestos.

Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo

Departamento de Analítica, Facultad de Medicina, UANL.

Por la obtención de FIDS de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear.

Biólogo, M.C. Mauricio González Ferrara

Pacalli, la casa de las hierbas

Por proporcionar la planta *Larrea tridentata*.

Dra. Laura P. Álvarez Berber
Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Por su aporte en la realización de Cromatografía de gases acoplado a masas.

Dr. Luis D. Miranda
Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

Por su aporte en la realización de la Difracción de rayos X.
y en la realización de los estudios de Polarimetría.



Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

y

Laboratorio de Química de Productos Naturales y Sintéticos
División de Estudios de Posgrado

Por aportar los insumos, servicios e infraestructura para el desarrollo del
proyecto de tesis de maestría



Por proveer la beca de manutención 597973 al candidato a maestro en ciencias
QFB Guillermo Núñez Mojica

Agradezco a mis padres el apoyo moral y la motivación que siempre me han brindado; nunca dejaron de creer en mi incluso en los momentos más bajos de mi vida; gracias por siempre estar para mi, deseo algún día poder devolverles con creces todo lo bueno que me han aportado, gracias.

Dra. Rayito, antes de comenzar el proyecto de investigación en el laboratorio de QPN, con facilidad podía decir a cualquiera exactamente que quería y hasta donde podría llegar profesional y académicamente; sin embargo, bajo su dirección es que pude explotar realmente mi potencial, me sacó de mí zona de confort tantas veces que ya era difícil trazarme un límite, así que simplemente decidí ya no ponerme límites, porque si lo hacía jamás podría llegar al nivel de exigencia suficiente para lograr algún día estar a su altura como futuro investigador, y sabe algo?, si yo consigo ser por lo menos la mitad de bueno de lo que es usted en lo que hace, me sentiré realizado como persona, por que soy honesto en mis palabras, yo creo que usted es la mejor en su campo de estudio, una profesional de talla internacional, y una persona que con sus defectos y virtudes ha demostrado ser una verdadera amiga y consejera; y con todo lo que he dicho hasta ahora quiero que se quede con una idea en mente, si por algo he de agradecerle, es por darme el privilegio de encontrar mi vocación, aprendiendo de la mejor para algún día serlo yo también. Gracias por apoyarme, motivarme y creer en mi; gracias por sacar a la luz mi mejor versión como individuo y profesional.

Carolina, cuando recién te conocí, me costo tanto trabajo creer que existía una mujer tan pequeña con un cabello tan largo, ojos tan grandes y tanta furia ciega...(en serio no la hagan enojar), pero más allá de lo evidente, eres un as de la farmacognosia y la fitoquímica, y por eso es que te admiro, fueron tantas las veces que me mostrabas como todo puede ser posible si te mantienes recto y persistente, eres un ejemplo de fortaleza y determinación que contra todo pronóstico siempre sale adelante, ni las dos horas de viaje de tu casa al laboratorio te detenían de llegar a trabajar LOS 7 DÍAS DE LA SEMANA, ni tus enfermedades pulmonares, ni toda la gente que quería verte caer, ni siquiera todas las injusticias y contratiempos que te tocó vivir; y por eso, te agradezco, por que eres una fuente de inspiración para mi, el ver que nunca desistes me hizo querer dar más de mi mismo, tanto fue así que juntos formamos el mejor equipo, tu y yo juntos fuimos imparables y no hubo obstáculo que pudiera detenernos mientras colaboráramos, fueron tantas horas de estudio, exámenes, problemas, penas, alegrías y logros los que conseguimos trabajando en equipo, y quiero que quede constancia de lo siguiente; tu no solo eres mi mejor amiga aquí, ni la mejor compañera, eres parte mi familia ahora. Gracias Caroteno...por ayudarme a llegar hasta aquí.

Eddy, al igual que Caro, me ayudaste a mantener mi moral alta en los tiempos de adversidad durante este posgrado; y no soy supersticioso, pero creo que las personas se conocen por una razón, y creo que llegaste a ser mi amigo y compañero por que debía aprender una lección importante de ti, y creo que lo hice, de ti aprendí que a pesar de las adversidades, si tu voluntad es fuerte y tu

razón te muestra la verdad, debes mantenerte firme y creer en tus ideas, creo en ti y se que lograrás llegar a tu meta. Gracias por ser mi amigo Eddy, en las buenas y en las malas.

Laura lo primero que se me viene a la mente al pensar en ti es mucha ternura, eres una de las chicas mas lindas e inteligentes que he conocido, en mis peores días el simple hecho de hablar contigo me alegraba, y tu potencial es inversamente proporcional a tu gusto por el chocolate... de ti debo agradecer tu felicidad y buena actitud, tu compañía siempre sincera y desinteresada, tu consejo y atención fueron muy importantes para mi, y para ser totalmente honesto, desde el día que llegaste al laboratorio las cosas cambiaron para bien, así que gracias Laura, por ser parte de mis días y hacerlos mejores.

Mi conclusión final respecto al desarrollo de mi proyecto en QPN no es nada nuevo para los entusiastas de la ciencia, y es una obviedad tan grande que podría mandarte al hospital si te caé encima.... La naturaleza es el escritor de esta obra, la ciencia es el libreto y los seres humanos solo somos los intérpretes, damas y caballeros... el show debe continuar, den su mejor actuación

DEDICATORIA

A mis padres

ÍNDICE DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
1.2. Tuberculosis y sintomatología	2
1.3. Farmacorresistencia de <i>M. tuberculosis</i>	3
1.4. Epidemiología de la tuberculosis	7
1.5. Tratamiento contra tuberculosis	9
1.6. Infecciones bacterianas y farmacorresistencia	14
1.7. Epidemiología de las infecciones bacterianas nosocomiales	16
1.8. Tratamiento de las infecciones bacterianas	19
1.9. Productos naturales como fuente de nuevos fármacos	20
1.9.1. Lignanos y flavonoides en el desarrollo de fármacos	21
2. ANTECEDENTES	23
2.1. <i>Larrea tridentata</i> (SESSÉ & MOC. EX DC.) COVILLE	23
2.1.1. Usos en la medicina tradicional	24
2.1.2. Fitoquímica de <i>L. tridentata</i>	25
3. Hipótesis y Objetivos	33
3.1. Hipótesis	33
3.2. Objetivos	33
3.2.1. Objetivo general	33
3.2.2. Objetivos específicos	33
4. MATERIALES Y MÉTODOS	35
4.1. Materiales	35
4.2. Metodología	37
4.2.1. Fitoquímica	37
4.2.1.1. Obtención del extracto hexánico clorofórmico	38
4.2.1.2. Fraccionamiento del extracto clorofórmico	38
4.2.1.3. Aislamiento y purificación de fitocompuestos de las fracciones del extracto clorofórmico	39
4.2.2. Síntesis de derivados metilados de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano	45
4.2.3. Caracterización de fitocompuestos y derivados	47
4.2.4. Ensayos biológicos	47
4.2.4.1. Determinación de actividad antibacteriana	47
4.2.4.2. Determinación de actividad antimicobacteriana	49
4.3. Disposición de residuos	52
4.3.1. Aislamiento y purificación de fitocompuestos y semisíntesis de derivados metilados	52
4.3.2. Ensayos Biológicos	53
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
5.1. Elucidación estructural de los constituyentes del extracto clorofórmico de <i>Larrea tridentata</i>	54

5.1.1. Propiedades físicas y espectroscópicas de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano	55
5.1.1.1. Elucidación estructural de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano	56
5.1.2. Rendimiento, propiedades físicas y espectroscópicas de GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	68
5.1.2.1. Elucidación estructural de GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	69
5.1.3. Rendimiento, propiedades físicas y espectroscópicas de GN31: 4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	74
5.1.3.1. Elucidación estructural de GN31: 4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	75
5.1.4. Propiedades físicas y espectroscópicas de Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano	80
5.1.4.1. Elucidación estructural de Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano	81
5.1.5. Propiedades físicas y espectroscópicas de Lt21: 3'-demetoxi-isoguaiacina	91
5.1.5.1. Elucidación estructural de Lt21: 3'-demetoxi-Isoguaiacina	92
5.1.6. Propiedades físicas y espectroscópicas de Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	101
5.1.6.1. Elucidación estructural de Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	102
5.1.7. Propiedades físicas y espectroscópicas de Lt8: 3'-demetoxi- 6-O-demetilisoguaiacina	111
5.1.7.1. Elucidación estructural de Lt8: 3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina	112
5.1.8. Propiedades físicas y espectroscópicas del Lt4: ácido <i>meso</i> -dihidroguaiarético	116
5.1.8.1. Elucidación estructural del Lt4: ácido <i>meso</i> -Dihidroguaiarético	117
5.1.9. Propiedades físicas y espectroscópicas del Lt20: ácido nordihidroguaiarético	121
5.1.9.1. Elucidación estructural del Lt20: ácido Nordihidroguaiarético	122
5.1.10. Propiedades físicas y espectroscópicas de Lt5: 5,4'-dihidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona	126
5.1.10.1. Elucidación estructural de Lt5: 5,4'-dihidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona	126
5.1.11. Propiedades físicas y espectroscópicas de Lt3: 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona	130
5.1.11.1 Elucidación estructural de Lt3: 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona	130
5.2. Análisis del extracto hexánico de <i>L. tridentata</i> por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)	134

5.3. Actividad antibacteriana de los compuestos aislados del extracto clorofórmico de <i>L. tridentata</i> y de los derivados semi-sintéticos	135
5.4. Actividad antimicobacteriana de los compuestos aislados del extracto clorofórmico de <i>L. tridentata</i> y de derivados semi-sintéticos	149
6. CONCLUSIONES	156
7. PERSPECTIVAS	159
8. REFERENCIAS	160
APÉNDICE A	174
APÉNDICE B	183

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Lignanos con actividad antitumoral	22
2. <i>Larrea tridentata</i>	23
3. Flavonoides y lignanos aislados y caracterizados de <i>L. tridentata</i>	30
4. Interacción entre el AmDG y el sitio de acción de la CoA-transferasa mediante el protocolo de docking ciego	31
5. Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano	55
6. Estructuras químicas de 3'-demetoxi-isoguaiacina y 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano	58
7. Espectro RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano	61
8. Espectro RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano	62
9. Espectro COSY (400 MHz, CDCl ₃) de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano	63
10. Espectro HSQC (400 MHz, CDCl ₃) de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano	64
11. Espectro NOESY (400 MHz, CDCl ₃) de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano	65
12. Espectro HMBC (400 MHz, CDCl ₃) de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano	66
13. Estructura de la forma cristalina de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano obtenida mediante difracción de rayos X	67
14. GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	68
15. Espectro RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	70
16. Espectro RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) de GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	71
17. Espectro NOESY (400 MHz, CDCl ₃) de GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	72
18. Espectro RMN HMBC (400 MHz, CDCl ₃) de GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	73
19. GN31: 4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	74
20. Espectro RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de GN31: 4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	76
21. Espectro RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) de GN31: 4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	77
22. Espectro NOESY (400 MHz, CDCl ₃) de GN31: 4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	78
23. Espectro HMBC (400 MHz, CDCl ₃) de GN31: 4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	79

24. Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano	80
25. Espectro RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano	85
26. Espectro RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) de Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano	86
27. Espectro COSY (400 MHz, CDCl ₃) de Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano	87
28. Espectro HSQC (400 MHz, CDCl ₃) de Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-Ciclolignano	88
29. Espectro NOESY (400 MHz, CDCl ₃) de Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano	89
30. Espectro HMBC (400 MHz, CDCl ₃) de Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano	90
31. Lt21: 3'-demetoxi-isoguaiacina	91
32. Espectro RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de Lt21: 3'-demetoxi-Isoguaiacina	95
33. Espectro RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) de Lt21: 3'-demetoxi-Isoguaiacina	96
34. Espectro COSY (400 MHz, CDCl ₃) de Lt21: 3'-demetoxi-Isoguaiacina	97
35. Espectro HSQC (400 MHz, CDCl ₃) de Lt21: 3'-demetoxi-Isoguaiacina	98
36. Espectro NOESY (400 MHz, CDCl ₃) de Lt21: 3'-demetoxi-Isoguaiacina	99
37. Espectro HMBC (400 MHz, CDCl ₃) de Lt21: 3'-demetoxi-Isoguaiacina	100
38. Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	101
39. Espectro RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	105
40. Espectro RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) de Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	106
41. Espectro COSY (400 MHz, CDCl ₃) de Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	107
42. Espectro HSQC (400 MHz, CDCl ₃) de Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	108
43. Espectro NOESY (400 MHz, CDCl ₃) de Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	109
44. Espectro HMBC (400 MHz, CDCl ₃) de Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	110
45. Lt8: 3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina	111
46. Espectro RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de Lt8: 3'-demetoxi-6-O-Demetilisoguaiacina	114
47. Espectro RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) del Lt8: 3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina	115
48. Lt4: ácido meso-dihidroguaiarético	116
49. Espectro RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de Lt4: ácido meso-dihidroguaiarético	119

50. Espectro RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) de Lt4: ácido meso-dihidroguaiarético	120
51. Lt20: ácido nordihidroguaiarético	121
52. Espectro RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de Lt20: ácido nordihidroguaiarético	124
53. Espectro RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) de Lt20: ácido nordihidroguaiarético	125
54. Lt5: 5,4'-dihidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona	126
55. Espectro RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de Lt5: 5,4'-dihidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona	128
56. Espectro RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) de Lt5: 5,4'-dihidroxi-3,7,8-Trimetoxiflavona	129
57. Lt3: 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona	130
58. Espectro RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de Lt3: 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona	132
59. Espectro RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) de Lt3: 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona	133
60. Sitios activos del lignano 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano que mostró la mejor actividad contra <i>S. aureus</i> resistente a meticilina	141
61. Compuestos activos contra <i>S. aureus</i> resistente a meticilina y control positivo levofloxacino	142
62. Compuestos activos contra <i>S. epidermidis</i> resistente a linezolid y control positivo levofloxacino	143
63. Compuestos dimetoxilados activos contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv; G122 y control positivo etambutol	151
64. Lignanos extraídos de <i>Zanthoxylum capense</i> que fueron activos e inactivos contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	153
65. mejor lignano antimicobacteriano sintetizado a partir del ácido meso-dihidroguaiarético	154

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Genes mutados que confieren resistencia a <i>M. tuberculosis</i>	5
2. Fármacos antituberculosos	11
3. Lista de bacterias fármacorresistentes de mayor relevancia clínica	15
4. Clases de antibióticos	19
5. Actividades biológicas de metabolitos secundarios de <i>L. tridentata</i>	26
6. Valores de CMI ($\mu\text{g/mL}$) de los extractos de <i>L. tridentata</i> contra diferentes bacterias	28
7. Actividad antibacteriana y antimicobacteriana de flavonoides y lignanos de <i>L. tridentata</i>	30
8. Fraccionamiento del extracto clorofórmico	39
9. Bacterias farmacorresistentes	48
10. Constantes espectroscópicas clave de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano	59
11. Constantes espectroscópicas de RMN ^1H de 3'-demetoxi-isoguaiacina y Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano	82
12. Constantes espectroscópicas de Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-Ciclolignano	84
13. Constantes espectroscópicas clave de Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	104
14. Actividad de compuestos aislados de <i>L. tridentata</i> contra bacterias fármacorresistentes	138
15. Actividad antimicobacteriana de los compuestos obtenidos de <i>L. Tridentata</i>	149

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema	Página
1. Reacción de metilación de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano	46

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: grados centígrados

μL: microlitros

μg: microgramos

¹³C: carbono trece

¹H: protón

a.c.: aislado clínico

AmDG: ácido *meso*-dihidroguaiarético

ANDG: ácido nordihidroguaiarético

H₂O: acuoso; agua

AcOEt: acetato de etilo

BLEE: Beta lactamasas de espectro extendido

CC: cromatografía en columna

CCF: cromatografía en capa fina

CDCl₃: clorofórmio deuterado

CMI: concentración mínima inhibitoria

CMT: complejo *Mycobacterium tuberculosis*

CODECIN: Comité para la Detección y Control de las Infecciones

Nosocomiales

CPP: cromatografía en placa preparativa

DMSO: dimetil sulfóxido

EMAR: espectrometría de masas de alta resolución

EtOH: etanol; etanólico

ExFR: Extremadamente farmacorresistente

FE: fase estacionaria

FM: fase móvil

FR: fármacorresistente

g: gramos

h: horas

NIRT: National Institute for Research in Tuberculosis

IES +: ionización por electro spray positivo

LVF: levofloxacino

MeOD: metanol deuterado

MeOH: metanol; metanólico

MFR: multifármaco resistente

mg: miligramos

mL: mililitros

nd: no determinado

OADC: ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa

OMS: Organización Mundial de la Salud

P.A.: partes aéreas

P.F.: punto de fusión

RC: resistente a carbapenémicos

RCC: resistente a carbapenémicos y cefalosporinas de amplio espectro

RCP-TR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RHOVE: Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica

RL: resistente a linezolid

RMN: resonancia magnética nuclear

RO: resistente a oxacilinas

RV: resistente a vancomicina

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

TB: tuberculosis

TB-ExFR: tuberculosis extremadamente farmacorresistente

TB-MFR: tuberculosis multifármaco resistente

TB-RR: tuberculosis resistente a rifampicina

TMS: tetrametilsilano

UANL: universidad autónoma de Nuevo León

UFC: unidades formadoras de colonias

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VPH: Virus del Papiloma Humano

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de *Mycobacterium tuberculosis*

Las bacterias del género *Mycobacterium* se caracterizan principalmente por el alto contenido de guanina (G) y citosina (C) en su genoma, y por poseer una envoltura celular rica en lípidos. Existen 130 especies de *Mycobacterium* descritas hasta la fecha; sin embargo, solo un número muy reducido son patógenas¹.

Las cepas patogénicas de *Mycobacterium* se caracterizan por infectar a humanos y animales causando tuberculosis (TB), además de mostrar un lento crecimiento en medios de cultivo y son catalogadas dentro del llamado complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), que está formado por algunas especies como: *Mycobacterium tuberculosis* (causante de tuberculosis en humanos), *Mycobacterium leprae* (causante de lepra en humanos), *Mycobacterium ulcerans* (causante de úlcera de Buruli en humanos), *Mycobacterium bovis* (infecta ganado bovino), *Mycobacterium avium paratuberculosis* y *Mycobacterium marinum* (oportunistas que pueden infectar humanos)¹.

La infección por micobacterias mejor documentada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), es la ocasionada por *M. tuberculosis*, que al infectar los pulmones ocasiona TB pulmonar, pero en condiciones de inmunodepresión, el

bacilo puede infectar otros órganos del cuerpo como cerebro, ojos, ganglios linfáticos, garganta, columna, piel, huesos y riñones; por lo tanto, pacientes con Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) o diabetes son propensos a desarrollar la infección. El contagio se da por vía aérea cuando un infectado de TB pulmonar expelle la bacteria al toser, y una proporción relativamente pequeña (5-15%) de los infectados con TB, desarrollará la enfermedad en algún momento de su vida, normalmente en situaciones de inmunodepresión².

1.2. Tuberculosis y sintomatología

Los pacientes que desarrollan TB pulmonar pueden desarrollar tres tipos de síntomas: sistémicos, del tracto respiratorio y algunos referentes a observaciones en radiografías de pulmones. Los síntomas sistémicos pueden ser: pérdida de peso, anorexia, fatiga, fiebre y sudores nocturnos. Los síntomas que se padecen por afección de los pulmones suelen ser tos, producción de esputo, hemoptisis y dolor de pecho. Comúnmente suceden casos donde el paciente padece síntomas sistémicos, sin manifestación clínica de los síntomas pulmonares, por lo que el diagnóstico recae en las observaciones de radiografías de pecho. En los casos de TB donde se encuentran infectados otros órganos del cuerpo, frecuentemente también se padece a la vez TB pulmonar³.

1.3. Fármacorresistencia de *M. tuberculosis*

A diferencia de muchas especies de bacterias, *M. tuberculosis* muestra en su forma nativa (sin mutaciones que alteren considerablemente su genoma), y que nunca ha tenido contacto con ningún fármaco anti-TB, relativamente pocas variaciones respecto a la susceptibilidad a fármacos anti-TB de primera línea. Por lo tanto, si consideramos las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) que son la concentración mínima de un fármaco en la cual la bacteria no puede desarrollarse, como una medida de la fármacorresistencia, se puede deducir una “CMI promedio” en la cual las cepas sensibles son afectadas por los fármacos anti-TB de primera línea, y entonces de ese modo, se puede saber cuándo una cepa de *M. tuberculosis* es resistente, si la misma es capaz de proliferar a una CMI mayor que la de las cepas sensibles⁴.

Ahora bien, si las cepas nativas inhiben su crecimiento a una CMI constante y poco variable, el origen de las cepas fármacorresistentes puede darse a partir de cepas sensibles que han estado en contacto con fármacos anti-TB, y que han modificado su genoma mediante mutaciones para alterar las dianas farmacológicas de los antibióticos, para de este modo sobrevivir a los tratamientos⁴. Con base en lo anterior, se deduce que la CMI, es un parámetro útil para la determinación de fármacorresistencia; sin embargo, el factor más confiable para la clasificación de cepas sensibles y resistentes es el análisis genómico. La elucidación de las bases genéticas de la fármacorresistencia es el método más preciso para la detección de cepas resistentes, qué a pesar de ser

un proceso lento, la información que proporciona es vital para el diseño de nuevos agentes antituberculosos y para la selección de un régimen de tratamiento más efectivo para los pacientes con TB⁵.

La probabilidad de adquisición de resistencia a los fármacos más potentes como la rifampicina (probabilidad de 10^{-8}) es menor que para los fármacos menos efectivos como tiacetazona, etionamida, capreomicina, cicloserina y viomicina (probabilidad de 10^{-3}). Además, se ha observado que la probabilidad de mutación de *M. tuberculosis* es directamente proporcional a la carga bacteriana infectante. Se debe considerar que si las mutaciones que confieren resistencia son a nivel cromosomal, la probabilidad de adquisición de resistencia simultánea a dos o más fármacos es el producto de probabilidades individuales de cada antibiótico, es decir la probabilidad de fármacorresistencia es multiplicativa⁶.

Cuando la micobacteria infecta y el paciente se somete a tratamiento con fármacos anti-TB, solo sobreviven a la terapia las bacterias resistentes, entonces cuando el paciente se somete a un segundo tratamiento con otros fármacos distintos, sobreviven solamente las bacterias resistentes a estos nuevos fármacos, y en consecuencia el paciente ahora está infectado con una cepa multifármaco resistente (MFR). El mecanismo de adquisición de resistencia anteriormente mencionado se denomina como “*Selección serial de fármacorresistencia*”, y es el principal mecanismo de desarrollo de cepas MFR. En adición a lo anteriormente mencionado, la limitada permeabilidad de la pared celular de *M. tuberculosis* contribuye a una fármacorresistencia de bajo nivel⁶.

Dando por entendido el mecanismo de desarrollo de resistencia, se presentan en la tabla 1 algunos ejemplos de genes involucrados en las mutaciones que otorgan resistencia a *M. tuberculosis*^{6,7}.

TABLA 1
Genes mutados que confieren resistencia a *M. tuberculosis*

Fármaco	Gen mutado	Productos Modificados	Porcentaje reportado en cepas MFR (%)
Rifampicina	<i>RpoB</i>	Subunidad B de la RNA polimerasa	>95
Isoniacida	<i>katG</i>	Catalasa-peroxidasa	60-70
	<i>oxyR-ahpC</i>	Alquil-hidroreductasa	20
INH-Etioniamida	<i>InhA</i>	Enoil-ACP reductasa	<10
Estreptomina	<i>rpsL</i>	Proteína ribosomal S12	60
	<i>rrs</i>	ARNr S16	<10
Fluoroquinolonas	<i>gyrA</i>	ADN girasa	>90
Pirazinamida	<i>PncA</i>	Amidasa	70-100
Etambutol	<i>embCAB</i>	EmbCAB	69

Finalmente, las categorías de resistencias pueden ser clasificadas en las siguientes⁸:

- **Monorresistencia:** tipo de resistencia en TB de aquellos infectados en los que se confirma que las cepas infectantes de *M. tuberculosis* son resistentes *in vitro* a un medicamento anti TB de primera línea⁸.
- **Polirresistencia:** tipo de resistencia en TB de aquellos infectados en los que se confirma que las cepas infectantes de *M. tuberculosis* son resistentes *in vitro* a más de un medicamento anti TB de primera línea, distinto de isoniacida y rifampicina, puede incluir solo a uno de los dos antes mencionados, pero nunca los dos simultáneamente⁸.
- **Multifármaco resistencia (MFR):** tipo de resistencia en TB de aquellos infectados en los que se confirma que las cepas infectantes de *M. tuberculosis* son resistentes *in vitro* como mínimo, a la isoniacida y rifampicina simultáneamente⁸.
- **Extrema fármacorresistencia (ExFR):** tipo de resistencia en TB de aquellos infectados en los que se confirma que las cepas infectantes de *M. tuberculosis* son resistentes *in vitro* como mínimo, a la isoniacida, rifampicina, una fluoroquinolona (ciprofloxacino, ofloxacino, levofloxacino o moxifloxacino), más un aminoglucósido (kanamicina, amikacina)⁸.

1.4. Epidemiología de la tuberculosis

La tuberculosis causada por *M. tuberculosis* representa un grave problema de salud a nivel mundial. En el año 2015 fue una de las primeras 10 causas de muerte, y en conjunto con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) es una de las enfermedades líder en muertes por enfermedades infecciosas².

En el año 2015 se reportaron 1.8 millones de muertes por TB, de las cuales 0.4 millones fueron resultado de coinfección con VIH. En términos de casos, se estima que en el mismo periodo surgieron 10.4 millones de nuevos infectados, que incluyen 1.2 millones de pacientes con VIH de los cuales 5.9 millones fueron hombres, 3.5 millones mujeres y 1 millón niños. Para los pacientes que padecieron tuberculosis multifármaco resistente (TB-MFR), se contabilizaron 480 000 nuevos casos, y de los mismos el 9.5 % fueron tuberculosis extremadamente farmacorresistente (TB-ExFR), además, se reportaron 100 000 casos de tuberculosis resistente a rifampicina (TB-RR); China, India y la Federación Rusa fueron los países donde se reportaron el 45 % de las incidencias de TB-MFR².

En México durante el año 2015 fue reportado un éxito del 85.3% en la cura de pacientes con TB; sin embargo, en los años subsecuentes se ha observado que en el país los decesos por TB van en aumento. Cada año se reportan en promedio 15 mil nuevos casos de TB pulmonar y aproximadamente 2,000 defunciones por la enfermedad⁹. En el 2017, según el último boletín epidemiológico de la Secretaría de Salud, se reportaron 5,413 casos de TB

pulmonar en hombres y 3,035 en mujeres, una cifra preocupante si se toma en cuenta que solo han transcurrido 7 meses del año en curso, por lo tanto, la tendencia respecto a incidencia de casos no parece ir a la baja¹⁰.

En México se notifican casos de TB cada año en más de la mitad de los municipios del país, podría considerarse que hay infectados de TB en todo el territorio mexicano, y los estados que reportan más casos son: Baja California, Veracruz, Guerrero, Sonora, Tamaulipas, Chiapas, Nuevo León y Tabasco. La mayoría de las incidencias se reportan en las grandes ciudades y municipios de mayor número de habitantes como Tijuana, Mexicali, Cd. Juárez, Veracruz, Acapulco, Reynosa, Matamoros, Hermosillo, Tuxtla Gutiérrez, Tapachula, Monterrey y Tabasco como los principales¹¹.

Las cifras globales anteriormente mencionadas son indicativas de que el control de la tuberculosis aún representa un desafío para el sector salud, y se calculó que, en el año 2016 para los países de ingresos bajos y medios fueron necesarios 8.3 billones de dólares al año para subsidiar el control de la enfermedad, esto sin contar los costos para desarrollo e investigación de nuevos tratamientos. En el 2016 solo se tuvieron disponibles 6.6 billones de dólares para el diagnóstico, tratamiento y prevención, por lo que se tuvo un déficit en el financiamiento de 1.7 billones de dólares².

La situación se agrava considerando que se requiere aproximadamente 1 billón de dólares anuales para financiar la investigación referente a tuberculosis, que

se debe considerar como un gasto prioritario, ya que sin el descubrimiento de nuevos tratamientos con fármacos novedosos y métodos de diagnóstico más sensibles y costeables, se corre el riesgo de un retroceso en los avances logrados hasta ahora².

1.5. Tratamiento contra tuberculosis

El tratamiento para combatir TB es variado, y los fármacos a prescribir se administran dependiendo de la susceptibilidad de la cepa infectante de *M. tuberculosis* a los fármacos de primera línea. Los fármacos de primera línea para tratar tuberculosis son rifampicina, isoniacida, etambutol, y pirazinamida, que se administran por vía oral durante 6 meses. Este régimen se recomienda para tratar a pacientes infectados con alguna cepa sensible de *M. tuberculosis*, dichas cepas son susceptibles a los fármacos de primera línea, más en específico a rifampicina e isoniacida².

La tuberculosis multifármaco resistente (TB-MFR) se ocasiona al infectarse con alguna cepa multifármaco resistente de *M. tuberculosis*, que es resistente a por lo menos los fármacos de primera línea isoniazida y rifampicina; además, se puede desarrollar TB-MFR en pacientes con TB sensible cuando no completan de forma adecuada el tratamiento con antifímicos (fármacos anti TB), ya sea por terminarlo antes de tiempo, o por no tomar los fármacos en el orden y la frecuencia recomendada. Para la mayoría de los pacientes con TB-MFR, el tratamiento recomendado por la OMS es la administración de isoniacida,

rifampicina, etambutol, pirazinamida y alguna fluoroquinolona como el ofloxacino diariamente, durante un tiempo de 9 a 12 meses, y desde el 2015 se recomienda también el uso del fármaco bedaquilina como parte de la terapia. Globalmente se reportaron en 2015 un total de 132,120 casos nuevos de TB-MFR, de los cuales se sometieron a tratamiento 124, 990².

La tuberculosis extremadamente fármaco resistente (TB-ExFR), se define como la infección con cualquier cepa de *M. tuberculosis* MFR que es resistente a por lo menos una fluoroquinolona, y además a por lo menos un fármaco inyectable de segunda línea contra TB, el tratamiento para tratar la TB-ExFR es personalizado y la medicación se prescribe dependiendo del cuadro clínico del paciente y de la resistencia de la cepa de *M. tuberculosis* infectante².

Con base a las cifras anteriormente mencionadas, es evidente que el fenómeno de fármacorresistencia mostrado por las cepas de TB-MFR y TB-ExFR complica el tratamiento contra tuberculosis, y según datos de la OMS el margen de éxito del tratamiento contra TB-MFR es del 48%, una cifra muy baja si se compara contra el 90% de éxito en el caso del tratamiento contra TB sensible a fármacos de primera línea. Los nuevos fármacos contra TB aprobados en el 2015, bedaquilina y delamanid, se presentan como una nueva opción para mejorar el régimen de tratamiento, además, si se toma en cuenta que existen diversos fármacos en desarrollo actualmente, el panorama mejora de forma esperanzadora; sin embargo, el fenómeno de fármacorresistencia siempre se debe tener en cuenta durante el desarrollo de nuevos fármacos, por lo que la

exploración de nuevas alternativas debe ser constante y progresivo para asegurar futuros éxitos contra la TB¹². Actualmente se puede acceder a 28 diferentes fármacos contra TB, además de que 12 nuevos compuestos se encuentran en desarrollo y fases finales de aprobación. El National Institute for Research in Tuberculosis (NIRT) en India, en conjunto con el Loyolla College y el Indian Council of Clinical Research, reportan en su base de datos TBDRUGS, información relevante de interés clínico respecto a nuevos fármacos anti-TB; y presentan un compendio de medicamentos usados actualmente, se ilustran en la tabla 2¹².

TABLA 2

Fármacos antituberculosos

Fármaco	Descripción	Gen que afecta (ID)	Producto/proceso afectado
Isoniacida	Derivado del ácido isonicotínico, fármaco de primera línea contra TB	<i>inhA</i> (Rv1484)	Pared celular
Rifampicina	Aislado de <i>Streptomyces mediterraneae</i> , fármaco de primera línea contra TB	<i>RpoB</i> (Rv0667)	Síntesis de RNA
Etambutol	Fármaco de primera línea contra tuberculosis	<i>embC</i> (Rv3793); <i>embA</i> (Rv3794); <i>embB</i> (Rv3795)	Síntesis de pared celular
Pirazinamida	Derivado sintético de niacinamida, fármaco de primera línea contra TB	No se conoce su gen diana	Probablemente síntesis de ácidos micólicos y transporte en membrana. Síntesis de RNA

TABLA 2

Fármacos antituberculosos (Continuación)

Rifabutin	Fármaco del tipo rifamicina usada como una de las primeras drogas antituberculosas de primera línea en pacientes con VIH	<i>rpoB</i> (Rv0667)	Síntesis de ARN
Rifapentina	Es una ciclopentil rifampicina administrada en conjunto con izoniasida durante 3 meses como prevención de infección de TB en pacientes de alto riesgo	<i>rpoB</i> (Rv0667)	Síntesis de ARN
Estreptomina	Aminoglucósido usado en casos de pacientes que son positivos al ensayo de frotis de esputo, y que padecieron TB. Fármaco que solía ser usado como de primera línea	<i>rpsL</i> (Rv0682)	Síntesis de proteínas
Kanamicina	Aminoglucósido usado para tratar TB-MFR	Rrs (MTB00019)	Síntesis de proteínas
Amikacina	Aminoglucósido semisintético usado como fármaco antituberculosos de segunda línea	Rrs (MTB00019)	Síntesis de proteínas
Capreomicina	Péptido cíclico usado para tratar TB-MFR resistente a kanamicina, estreptomina y amikacina	Rrs (MTB00019)	Síntesis de proteínas
Levofloxacin	Fluoroquinolona usada para tratar TB-MFR	<i>gyrB</i> (Rv0005); <i>gyrA</i> (Rv0006)	Replicación y transcripción de ADN
Moxifloxacin	Fluoroquinolona usada para tratar TB-MFR	<i>gyrB</i> (Rv0005); <i>gyrA</i> (Rv0006)	Replicación y transcripción de ADN
Gatifloxacin	Fluoroquinolona usada para tratar TB-MFR. Se usa únicamente como alternativa por sus efectos adversos	<i>gyrB</i> (Rv0005); <i>gyrA</i> (Rv0006)	Replicación y transcripción de ADN
Ofloxacin	Fluoroquinolona usada para tratar TB-MFR	<i>gyrB</i> (Rv0005); <i>gyrA</i> (Rv0006)	Replicación y transcripción de ADN
Etionamida	Derivado semisintético del ácido isonicotínico usado para tratar TB-MFR	<i>inhA</i> (Rv1484)	Pared celular

TABLA 2

Fármacos antituberculosos (Continuación)

Protionamida	Derivado de tioamida usado para tratar TB-MFR	<i>inhA</i> (Rv1484)	Pared celular
Cicloserina	Análogo estructural del aminoácido D-alanina y se usa para tratar TB-MFR	<i>alr</i> (Rv3423c); <i>ddlA</i> (Rv2981c)	Metabolismo de D-alanina. Biosíntesis de péptidoglicano
Terizidona	Análogo estructural de cicloserina usado para tratar TB-MFR y TB-ExFR	<i>alr</i> (Rv3423c); <i>ddlA</i> (Rv2981c)	Síntesis de péptidoglicano
Ácido para-aminosalicílico	Fármaco sintético usado para tratar TB-ExFR	<i>folA</i> (Rv2763c)	Síntesis de ácido fólico y asimilación de hierro
Bedaquilina	Diarilquinolina usada para tratar TB-MFR	<i>atpE</i> (Rv1305)	Fosforilación oxidativa
Delamanid	Nuevo fármaco del tipo dihidro-nitroimidazooxazol usado para tratar TB-MFR	No se conoce su gen diana	Probablemente inhibe síntesis de pared celular
Linezolid	Derivado de oxazolidinona usado para tratar TB-MFR y TB- ExFR	<i>rplC</i> (Rv0701)	Síntesis de proteínas
Clofazimina	Riminofenazina lipofílica usada para tratar TB-MFR y TB-ExFR (antes usada para tratar lepra)	No se conoce su gen diana	Probablemente afecta el transporte en membrana
Amoxicilina y Clavulanato	Fármacos usados en combinación para tratar TB-MFR	<i>ponA1</i> (Rv0050); <i>BlaC</i> (Rv2068c)	Síntesis de péptidoglicano
Imipenem y Cilastatina	Fármacos usados en combinación para tratar TB-MFR	<i>pbpB</i> (<i>ftsI</i>) (Rv2163c)	Síntesis de péptidoglicano
Meropenem y Clavulanato	Fármacos usados en combinación para tratar TB-MFR y TB-ExFR	<i>pbpB</i> (Rv2163c); <i>BlaC</i> (Rv2068c)	Síntesis de péptidoglicano
Tioacetazona	Tiosemicarbazona usada para tratar TB-MFR	<i>cmaA2</i> (Rv0503c)	Pared celular
Claritromicina	Macrólido semisintético usado para tratar TB-MFR	<i>rplV</i> (Rv0706)	Síntesis de proteínas

1.6. Infecciones bacterianas y fármacorresistencia

La resistencia a antibióticos o fármacorresistencia, se desarrolla en microorganismos que crecen y se adaptan en presencia de antibióticos; y debido a que muchos fármacos tienen una relación estructural estrecha con los de su misma clase, la resistencia a un agente antibiótico en particular puede provocar la resistencia a toda una familia de fármacos¹³. La fármacorresistencia ha sido durante décadas un problema para el tratamiento contra enfermedades infecciosas, y tiene como consecuencia una baja en la eficiencia de antimicrobianos provocando que la terapia sea costosa, difícil de seguir, y en algunos casos hasta imposible¹⁴.

Por más de 60 años los antibióticos han sido la mejor opción contra enfermedades infecciosas; sin embargo, la tendencia observada es que por cada fármaco nuevo que se administra a los pacientes, los microorganismos que los infectan adquieren resistencia al mismo. Las malas prácticas en el uso de antibióticos como su prescripción desmedida, automedicación por parte de los pacientes y uso en ganado como coadyuvantes en el desarrollo, son de las principales razones del surgimiento de la fármacorresistencia¹⁵.

En contexto del mercado farmacéutico, los antibióticos que ya no son eficaces para las terapias, pierden valor comercial, por lo que reemplazar los agentes inefectivos con nuevos fármacos debe ser una prioridad para la industria, ya que desde 1987 no se ha descubierto ninguna clase nueva importante de agentes

antibacterianos, además de que los antibióticos en fase de aprobación no serán suficientes para controlar la crisis creciente de resistencia a antibióticos¹³. La OMS consiente de la importancia del problema, publicó en el año en curso (2017) la lista de bacterias fármacorresistentes prioritarias a controlar, mediante el desarrollo e investigación de nuevos agentes antimicrobianos. La lista de bacterias en orden de prioridad se ilustra en la tabla 3¹⁶.

TABLA 3

Lista de bacterias fármacorresistentes de mayor relevancia clínica

PRIORIDAD 1: CRÍTICA

- *Acinetobacter baumannii*, resistente a carbapenem
- *Pseudomonas aureoginosa*, resistente a carbapenem
- Enterobacterias (*Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp*, *Serratia spp*, *Proteus spp*, *Providencia spp*, *Morganella spp*) resistentes a carbapenem y cefalosporinas de tercera generación

PRIORIDAD 2: ALTA

- *Enterococcus faesium*, resistente a vancomicina
- *Staphylococcus aureus*, resistente a meticilina y vancomicina
- *Helicobacter pylori*, resistente a claritromicina
- *Campylobacterias*, resistentes a fluoroquinolonas
- *Salmonela spp*, resistente a fluoroquinolonas
- *Neisseria gonorrhoea*, resistentes a cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolonas

PRIORIDAD 3: MEDIA

- *Streptococcus pneumoniae*, no susceptible a penicilina
- *Haemophilus influenzae*, resistente a ampicilina
- *Shigella spp*, resistente a fluoroquinolonas

1.7. Epidemiología de las infecciones bacterianas nosocomiales

Las infecciones nosocomiales o intrahospitalarias son enfermedades proliferantes en hospitales y centros de salud, y los agentes causales pueden ser bacterias, hongos y virus. Las variantes más frecuentes de este tipo de infecciones suelen ser las asociadas a las vías de canalización al torrente sanguíneo, las asociadas a catéter en vías urinarias, infecciones en heridas quirúrgicas y el principal tipo, las pulmonías asociadas a los dispositivos de ventilación. Las infecciones nosocomiales son adquiridas por los pacientes en tratamiento por alguna enfermedad, e incluso pueden manifestarse después de que el paciente ha sido dado de alta; y por lo regular, el contagio sucede por la interacción entre el paciente con el personal hospitalario y por el contacto con instrumentos invasivos como catéteres y ventiladores. La frecuencia observada con la que se adquieren las infecciones nosocomiales es relativa respecto al nivel de desarrollo de un país, por ejemplo, en países desarrollados el 7% de los pacientes hospitalizados se contagian; en contraste con los países en vías de desarrollo donde se observa un 10% de infectados del total de pacientes hospitalizados¹⁷.

Uno de los principales problemas que impide el control de las infecciones intrahospitalarias es la poca información referente a su epidemiología, debido a que los sistemas de vigilancia epidemiológica son deficientes, además de que no se han desarrollado aún métodos de control lo suficientemente efectivos para este tipo de infecciones¹⁷.

Las bacterias son el principal patógeno causal de infecciones intrahospitalarias. Las bacterias del género *Acinetobacter* son las principales causantes de infecciones en las unidades de cuidados intensivos y corresponden al 80 % de las infecciones nosocomiales reportadas. Entre las infecciones más severas, destaca la provocada por *Clostridium difficile*, que se propaga del personal de hospital hacia los pacientes debido a malos hábitos de higiene en el lavado de manos. Para el caso de enterobacterias carbapenem resistentes, las pertenecientes al género *Klebsiella* y otras como *Escherichia coli* afectan a pacientes cuando pasan de vías intestinales a otras zonas del cuerpo¹⁷.

Como agravante del problema, cuando un paciente es tratado en el hospital, es probable que contraiga alguna enfermedad respiratoria intrahospitalaria, y solo se identifica el agente causal hasta que la infección alcanza una escala epidémica, por lo tanto, las infecciones de vías respiratorias merecen una especial atención entre las infecciones nosocomiales, y más si se toma en cuenta que los agentes causales más comunes son bacterias que proliferan en los pulmones¹⁷. Las infecciones bacterianas en pulmones y vías respiratorias tienen una incidencia elevada en la población, tal es el caso, que la neumonía es la principal causa de muerte en niños menores de 5 años, y es la principal enfermedad causal de hospitalizaciones de adultos. En países desarrollados como Estados Unidos se hospitaliza aproximadamente 1 millón de pacientes por neumonía cada año y un aproximado de 50,000 mueren. La neumonía es la principal causa de sepsis y shock séptico en la mitad de los casos reportados,

además de que la infección intrahospitalaria de la enfermedad muestra la tasa de mortalidad más elevada de entre todas las infecciones nosocomiales¹⁷.

Para el caso de México, el último estudio sobre infecciones nosocomiales fue realizado en el 2011 por la Secretaría de Salud, y se evaluó la prevalencia de infecciones nosocomiales en 54 hospitales; y se observó que 48 de 53 hospitales realizaban algún tipo de vigilancia activa, y todas las instituciones reportaban incidencias al Comité para la Detección y Control de las Infecciones Nosocomiales (CODECIN), Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) además a las delegaciones correspondientes¹⁸. El estudio previamente mencionado arrojó un 21% de prevalencia de infecciones nosocomiales (el doble del estándar internacional), siendo las principales, las infecciones causantes de neumonía. En el 2017, el boletín epidemiológico de la Secretaría de Salud reporta hasta la semana 37 del año en curso un total de 17 937 934 casos de infecciones respiratorias agudas, 1 324 707 casos más que el año pasado, y si se considera la mortalidad de este tipo de infecciones, el panorama en el país no parece prometedor respecto al control epidemiológico de infecciones importantes¹⁹. Ahora bien, denotada la importancia de las infecciones nosocomiales de vías respiratorias, se deben tener en cuenta las principales bacterias causales de enfermedades pulmonares, que son: *Pneumococo pneumonia*, Streptococos del grupo A, *Staphylococcus aureus* (incluyendo *S. aureus* resistente a meticilina), *Klebsiella pneumonia*, bacterias del género *Pseudomona*, *Acinetobacter* y *Burkholderia spp*²⁰.

1.8. Tratamiento de las infecciones bacterianas

Existen actualmente una gran variedad de antibióticos para el tratamiento de infecciones bacterianas (Tabla 4), y la selección del agente adecuado en la terapia dependerá del cuadro clínico del paciente²¹.

TABLA 4
Clases de antibióticos

Antibiótico	Ejemplo	Mecanismo de acción
Sulfonamidas	Sulfametoxazol	Inhibición de la síntesis de ácido fólico por inhibición competitiva contra el ácido <i>para</i> -aminobezoico
Fluoroquinolonas	Levofloxacino	Inhibición de síntesis del ADN
β -Lactámicos	Benzilpenicilina	Inhibición de síntesis de pared celular
Inhibidores de β -Lactamasas	Amoxicilina	Inhibición de síntesis de pared celular
Carbapenémicos	Imipenem	Inhibición de síntesis de pared celular
Cefalosporinas	Cefalexina	Inhibición de síntesis de pared celular
Glucopéptidos	Vancomicina	Inhibición de síntesis de pared celular
Aminoglucósidos	Amikacina	Inhibición de la síntesis de proteínas por unión a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano
Tetraciclinas	Metacilina	Inhibición de la síntesis de proteínas por unión a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano
Macrólidos	Eritromicina	Inhibición de la síntesis de proteínas por unión a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano
Estreptogaminas	Dalfopristina	Inhibición de la síntesis de proteínas por unión a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano
Oxazolidionas	Linezolid	Inhibición de la síntesis de proteínas por unión a sitio P de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano

1.9. Productos naturales como fuente de nuevos fármacos

Los productos naturales son metabolitos secundarios producidos por bacterias, hongos, plantas y algunas especies del reino animal, y que, a lo largo de millones de años de evolución y selección natural, son biosintetizados con el propósito de interactuar con los diferentes componentes celulares de la forma más específica y selectiva posible. En base a lo anterior, la mayor parte de productos naturales atraviesan membranas biológicas, algo destacable en el contexto de farmacia al considerar que muchas moléculas sintéticas no permean eficientemente²².

De los usos más antiguos que se les da a los productos naturales destaca su empleo como antibióticos. Hasta 1996 el 80% de las medicinas usadas eran productos naturales o derivados de los mismos, y durante el periodo comprendido de 1981 a 2002, el 52% de las 868 entidades químicas aprobadas fueron productos naturales o sus derivados²³.

Antes del desarrollo de fármacos como entidades químicas puras con actividad definida, la medicina tradicional o etnomedicina era la única forma de terapia para tratar enfermedades. Primeramente, mediante prueba y error, las diferentes culturas fueron desarrollando un acervo de recursos naturales terapéuticos, inicialmente de forma local en las comunidades, y progresivamente dichos recursos fueron expandiéndose al punto en que actualmente los sistemas de medicina tradicional sustentan la demanda de fármacos de aproximadamente 4.6 billones de personas alrededor del mundo²⁴.

Las plantas son el principal recurso de la medicina tradicional y según cifras de la OMS el 80% de los habitantes del mundo recurren a las mismas como primer tratamiento contra enfermedades. Actualmente 119 entidades químicas derivadas de 90 especies de plantas se encuentran en uso como fármacos en más de un país. De las 119 sustancias mencionadas anteriormente, el 74% fueron descubiertas como resultado del aislamiento de principios activos de plantas usadas en medicina tradicional, lo que indica que el criterio etnomédico en la búsqueda de nuevas sustancias activas, es de suma importancia para el descubrimiento de nuevos fármacos²⁵.

1.9.1. Lignanos y flavonoides en el desarrollo de fármacos

Los lignanos son metabolitos secundarios íntimamente relacionados a la industria farmacéutica debido a su amplia variedad de actividades biológicas, teniendo como antecedente el uso de plantas ricas en lignanos como drogas crudas. El ejemplo más representativo de un lignano como fármaco es la podofilotoxina extraída de especies vegetales del género *Berberidaceae*. Los derivados de la podofilotoxina (figura 1), el etopósido y el tenipósido son usados actualmente como fármacos antitumorales en terapias contra cáncer; además de que dichos compuestos también poseen actividad anti-VIH. Los frutos de Schisandra (*Schisandraceae*) contienen lignanos hepatoprotectores, por lo que se usan en el tratamiento de hepatitis viral crónica²⁶.

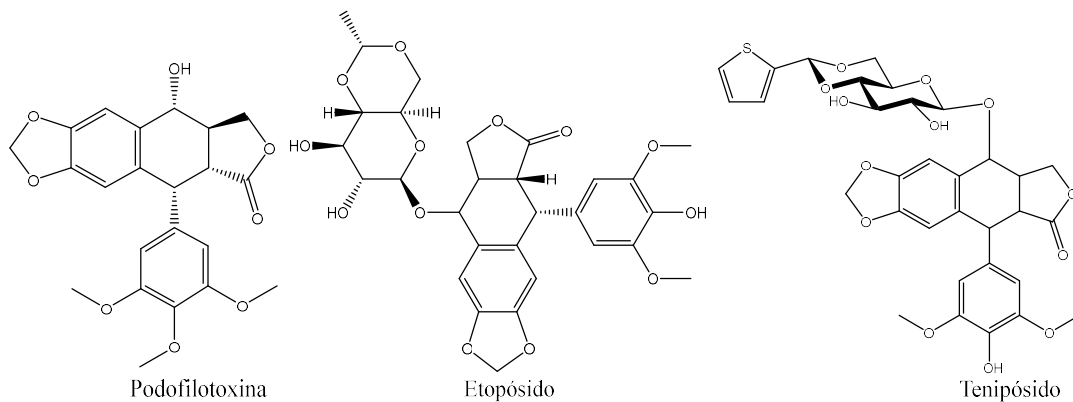


Figura 1. Lignanos con actividad antitumoral

En el caso de los flavonoides, se destacan sus actividades biológicas como antioxidantes, antivirales, antibacterianos y anticancerígenos; sin embargo, son usados más comúnmente en suplementos alimenticios y en dietas. En el contexto farmacéutico, los flavonoides son prospectos prometedores ya que poseen actividad contra virus como el de la influenza y virus de la hepatitis C; además de ser activos también contra bacterias como *Escherichia coli*²⁷.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Larrea tridentata* (SESSÉ & MOC. EX DC.) COVILLE

Larrea tridentata pertenece a la familia Zygophyllaceae (figura 2), esta planta es endémica de México y crece en los estados de Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas, además también se puede encontrar en el sur de Norteamérica²⁸. Se le conoce como “gobernadora”, debido a su habilidad de inhibir el crecimiento de otras plantas a su alrededor con el fin de acaparar agua. El nombre taxonómico de la planta se debe al científico español J. A. Hernández Pérez de Larrea, quién fue el primero en describir la especie²⁹.



Figura 2. *Larrea tridentata*

La planta muestra una altura promedio de 1-3 m, es ramificada y perennifolia, con hojas formadas por 2 folíolos unidos entre sí en la base; oblicuamente ovados y lanceolados. Presenta divaricados de 4 a 15 mm de largo por 3 a 8 mm de ancho, enteros, coriáceos, resinosos, de olor penetrante, y de color verde³⁰. Las hojas son cerosas con una capa de resina muy gruesa secretada por la epidermis glandular de sus estípulas. Sus tallos son nudosos y con textura amaderada. Las flores son completas, con cinco pétalos de color amarillo y brotan independientes (no en racimos) en las axilas de los tallos. Sus frutos son cápsulas redondeadas y cubiertas con pelillos color blanco. La planta desprende un olor penetrante y tiene un sabor amargo, y hasta donde se sabe, es altamente tóxica, por lo que la vida salvaje de su entorno tiende a no comerla²⁸.

2.1.1. Usos en la medicina tradicional

La planta tiene varias aplicaciones medicinales, y es usada con frecuencia en para tratar cálculos renales y afecciones de vías urinarias, bebiendo decocciones de las hojas y ramas. Puede ayudar para aliviar malestares en los riñones e inflamación de vejiga, bebiendo en ayunas la infusión de raíces, rama y corteza. Para problemas ginecológicos como esterilidad femenina se recomienda lavados vaginales con la infusión acuosa de las hojas; también se ha usado la raíz y corteza de *L. tridentata* para aliviar las molestias postparto y para regularizar el periodo menstrual. La infusión de la planta es administrada en baños de asiento para tratar hemorroides, granos, golpes, como cicatrizante y para aliviar el reumatismo³⁰.

2.1.2. Fitoquímica de *L. tridentata*

El metaboloma de *L. tridentata* está conformado por diversos metabolitos secundarios, tan solo en la resina de la planta se han encontrado 19 flavonoides agliconas, algunos flavonoides glicosilados y una gran cantidad de aceites esenciales que contiene más de 300 compuestos volátiles y 67 no volátiles. Además de los compuestos anteriores se ha reportado también presencia de lignanos, saponinas, sapogeninas, esteroides, taninos, monoterpenos y sesquiterpenos. De entre todos los compuestos encontrados en este espécimen vegetal, los lignanos son los que muestran la actividad biológica más prometedora²⁹. Las diferentes actividades biológicas de la planta han sido estudiadas intensivamente con base a los antecedentes anteriores, teniéndose como resultado la documentación y reporte de un amplio compendio de extractos y compuestos de *L. tridentata* con diferentes actividades terapéuticas (tabla 5).

TABLA 5

Actividades biológicas de metabolitos secundarios de *L. tridentata*

Extracto/parte de la planta	Metabolito secundario	Actividad Biológica	Referencia
-	ANDG; 28 compuestos fenólicos	Antidiabético	31
EtOH/P.A.	-	Antidiabético	32
-	ANDG	Antidiabético	33
-	ANDG	Antidiabético	34
-	ANDG	Neuroprotector	35
-	ANDG	Neuroprotector	36
-	ANDG	Neuroprotector	37
-	ANDG	Citoprotector	38
-	ANDG	Citoprotector	39
-	ANDG	Citoprotector	40
-	ANDG	Citoprotector	41
-	ANDG	Activador hTRPA1	42
-	ANDG	Cardioprotector	43
-	ANDG	Cardioprotector	44
-	ANDG	Nefroprotector	45
-	ANDG	Antiinflamatorio	46
MeOH/P.A.	-	Antiinflamatorio	47
-	ANDG	Hipolipemiente	48
H ₂ O/P.A.	-	Antilitiasico	49
H ₂ O; EtOH/P.A.	ANDG	Antilitiasico	50
H ₂ O; EtOH/P.A..	-	Antilitiasico	51
H ₂ O; EtOH/P.A.	-	Antibacterial	52
CHCl ₃ ; MeOH/P.A.	3 lignanos; 4 flavonoides	Antibacterial	53
CHCl ₃ ; MeOH/P.A.	-	Antibacterial	54
EtOH/P.A.	-	Antibacterial	55
CHCl ₃ /P.A.	<i>Am</i> DG	Antituberculoso	56
CHCl ₃ ; MeOH/P.A.	3 lignanos; 4 flavonoides	Antituberculoso	53
CHCl ₃ ; MeOH/P.A.	-	Antituberculoso	57
-	ANDG; metil-ANDG	Antifúngico	58
EtOH/P.A.	-	Antifúngico	55
AcOEt/P.A.	ANDG; 3'-demetoxiisoguaiacina	Antiprotozoario	59
CH ₂ Cl ₂ /P.A.	ANDG; 8 lignanos; 6 flavonoides	Antiprotozoario	60
EtOH/P.A.	ANDG	Antiprotozoario	61
-	3'-O-metil-ANDG	Antiviral (VPH)	62
-	2 lignanos	Antiviral (VIH)	63
-	3'-O-metil-ANDG	Antiviral (VIH)	64
-	ANDG	Anticancerígeno	65
-	6 lignanos; 1 flavonoide	Anticancerígeno	66
-	ANDG	Anticancerígeno	67

H₂O: acuoso; EtOH: etanólico; MeOH: metanólico; AcOEt: acetato de etilo; P.A.: partes aéreas; VIH: virus de inmunodeficia humana; VHP: virus del papiloma humano; ANDG: ácido nordihidroguaiarético; *Am*DG: ácido meso-dihidroguaiarético

Una de las plantas mejor estudiadas dentro del grupo de investigación de la Dra. María del Rayo Camacho Corona, es *L. tridentata*, por sus notorias propiedades antimicrobianas; más en específico por la actividad antimicobacteriana del extracto clorofórmico de la planta. Dentro del grupo de investigación se realizaron estudios que evaluaron la actividad antimicobacteriana de los extractos hexánico, clorofórmico, metanólico y acuoso, encontrándose que el extracto clorofórmico de las partes aéreas de *L. tridentata* mostraba actividad contra *M. tuberculosis* H37Rv (200 µg/mL) y diferentes cepas monoresistentes (100-200 µg/mL) a los fármacos de primera línea contra TB⁶⁹.

El estudio de la planta continuó al evaluar los extractos hexánico, clorofórmico, metanólico y acuoso de *L. tridentata* (tabla 6)⁷⁰ contra diferentes bacterias (ATTC), donde se observó la actividad prometedora del extracto clorofórmico contra *B. subtilis* (CMI:62.25 µg/mL), *L. monocytogenes* (CMI:125 µg/mL), y *A. baumannii* (CMI:125 µg/mL). El extracto metanólico contra *B. subtilis* (CMI: 125 µg/mL), *L. monocytogenes* (CMI: 125 µg/mL), *E. fecalis* (CMI: 125 µg/mL), *H. influenzae* (CMI: 125 µg/mL) y *H. influenzae* (CMI: 125 µg/mL). Los resultados anteriores fueron indicativo de que la actividad antimicrobiana de *L. tridentata* es debida a los componentes en sus extractos clorofórmico y metanólico, ya que los extractos hexánico y acuoso solo mostraron CMI mayores a 250 µg/mL, por lo tanto, para los estudios posteriores se decidió trabajar solo con los extractos más activos, con el objetivo de aislar y caracterizar los compuestos responsables de la actividad antibacterial de los extractos⁷⁰.

TABLA 6

Valores de CMI ($\mu\text{g/mL}$) de los extractos de *L. tridentata* contra diferentes bacterias

Planta/Familia/ Extracto Ubicación/Parte vegetal	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. aureus</i> ATCC BAA- 44	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>S.</i> <i>pneumoniae</i> ATCC 49619	<i>L.</i> <i>monocytogenes</i> ATCC 19111	<i>E.</i> <i>faecalis</i> ATCC 29212	<i>A. baumannii</i> ATCC 15308	<i>S. maltophilia</i> ATCC 12714	<i>H.</i> <i>influenzae</i> ATCC 49766	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247
<i>Larrea tridentata</i> (Zygophyllaceae) / Nuevo León / partes aéreas										
Hexánico	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Clorofórmico	>250	250	62.25	>250	125	>250	125	>250	>250	>250
Metanólico	250	250	125	250	125	125	>250	250	125	125
Acuoso	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Fármacos de referencia										
Levofloxacino	-	-	2	4	2	2	4	4	1	1
Vancomicina	2	4	-	16	16	-	-	-	-	-

Con base en los estudios anteriores, en el año 2012 Favela-Hernández y colaboradores reportaron el aislamiento y caracterización de cuatro flavonoides y tres lignanos del extracto clorofórmico de las hojas de *L. tridentata*, (figura 3) con el fin de probar su actividad como antibacterianos y antimicobacterianos (tabla 7); y como resultado se observó que el compuesto más activo fue el lignano 3-demetoxi-6-O-demetilisoguiacina que mostró buena actividad contra los siguientes aislados clínicos: dos cepas de *S. aureus* (CMI: 25-12.5 µg/mL) y dos cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (CMI: 25-12.5 µg/mL), dos cepas de *E. fecalis* (CMI: 25-12.5 µg/mL) y una de *E. cloacae* (CMI: 12.5 µg/mL) y como antimicobacteriano contra dos aislados clínicos MFR de *M. tuberculosis* (CMI: 12.5 µg/mL)^{71,72}. Los resultados observados indicaron que las moléculas responsables de la actividad antimicrobiana de *L. tridentata* son los lignanos, ya que los cuatro flavonoides ensayados mostraron la menor actividad contra casi todos los aislados clínicos probados (CMI: >50 µg/mL). El compuesto más activo 3-demetoxi-6-O-demetilisoguiacina destacó notoriamente en su actividad biológica sobre el ácido-*meso*-dihidroguaiarético (mejor actividad contra *S. aureus* RM con CMI: 50 µg/mL) y 4-*epi*-larreatricina (mejor actividad contra *E. cloacae* con CMI: 12.5 µg/mL); sin embargo, mostraron cierto grado de actividad a tomarse en cuenta. Se dedujo que el principal responsable de la actividad de los extractos activos de *L. tridentata* es el lignano 3-demetoxi-6-O-demetilisoguiacina, y en base a ello se trazó la directriz de los futuros trabajos en el grupo de investigación, que se enfocaría más en concreto en la obtención de lignanos activos y la elucidación de su mecanismo de acción como antibacterianos y antimicobacterianos.

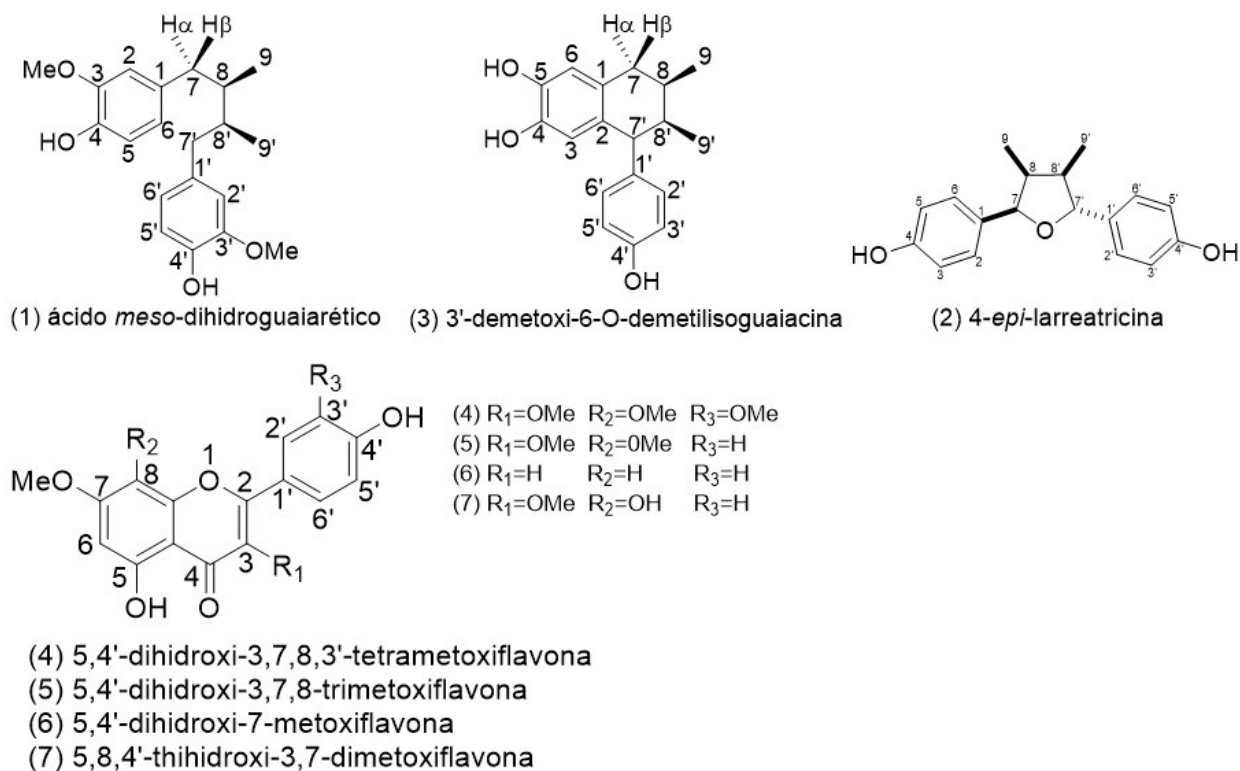


Figura 3. Flavonoides y lignanos aislados y caracterizados de *L. tridentata*

TABLA 7

Actividad antibacteriana y antimicobacteriana de flavonoides y lignanos de *L. tridentata*

Bacteria	ATCC/a.c.	Compuestos							Estandar LVF
		1	2	3	4	5	6	7	
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213	>50	>50	25	>50	>50	50	>50	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> RM	BAA-44	50	>50	25	>50	>50	>50	>50	6.25
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	>50	>50	12.5	>50	>50	50	>50	0.78
<i>Escherichia coli</i>	25922	>50	>50	50	>50	>50	>50	>50	0.78
<i>Enterobacter cloacae</i>	35030	>50	12.5	12.5	>50	>50	>50	>50	0.78
<i>Enterococcus faecalis</i>	a.c. n=5	nd	nd	12.5-25	nd	nd	nd	nd	50
<i>Staphylococcus aureus</i>	a.c. n=3	nd	nd	12.5-25	nd	nd	nd	nd	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> RM	a.c. n=7	nd	nd	12.5	nd	nd	nd	nd	12.5
									isoniacida
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	27294	50	50	>50	>50	>50	>50	>50	0.02
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> MFR	a.c. n=3	12.5-50 ^c	25 ^a	12.5 ^b	25 ^a	25-50 ^c	>50	>50	4.0-6.0

a.c., aislado clínico; nd, no determinado; LVF, levofloxacino; ^aActivo contra una cepa; ^bActivo contra dos cepas; ^cActivo contra tres cepas de *M. tuberculosis* MFR, (1): ácido *meso*-dihidroguaiarético, (2): 4-*epi*-larreatricina, (3): 3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina, (4) 5,4'-dihidroxi-3,7,8,3'-tetrametoxiflavona, (5) 5,4'-dihidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona, (6) 5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavona, (7) 5,8,4'-thihidroxi-3,7-dimetoxiflavona

En vista de los resultados obtenidos por Favela-Hernández *et al.* 2012, Clemente-Soto y colaboradores reportaron el posible mecanismo de acción del lignano ácido *meso*-dihidroguaiáretico (*AmDG*) contra *M. tuberculosis* H37Rv mediante el empleo de microarreglos validados con la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR). En este estudio se determinó la sobreexpresión del gen Rv3551 que codifica para la CoA-transferasa de *M. tuberculosis* H37Rv que fue expuesta a *AmDG*. Mediante docking molecular se determinó que el lignano se une al sitio activo de la enzima CoA-transferasa que participa en la ruta de degradación del geraniol y el 2-metil-naftaleno, ya que se observó la interacción del *AmDG* con dicha subunidad deduciéndose que el lignano inhibe a la enzima, ocasionando la acumulación tóxica de geraniol y 2-metilnaftaleno en la micobacteria hasta concentraciones tóxicas; en la figura 4 se ilustran la probable interacción entre el *AmDG* con la CoA-transferasa^{73,74}.

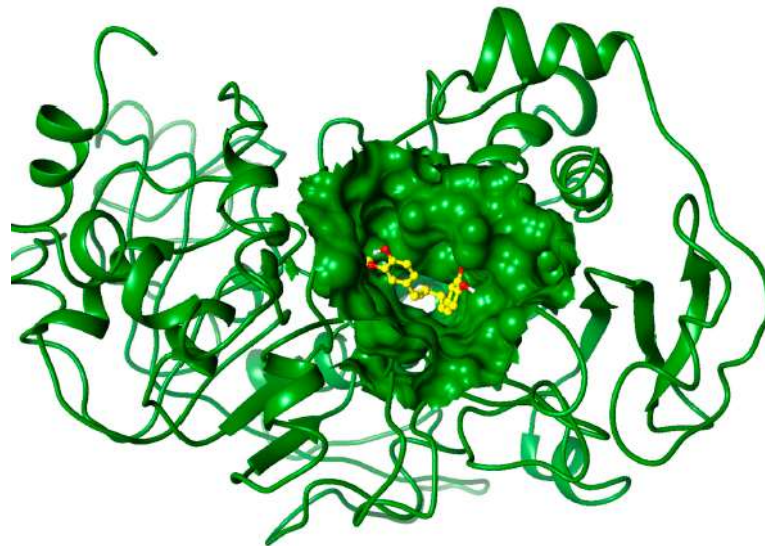


Figura 4. Interacción entre el *AmDG* y el sitio de acción de la CoA-transferasa mediante el protocolo de docking ciego⁵⁶.

Como complemento a la información recabada, Favela-Hernández *et al.*, 2015 reportó la elucidación del mecanismo de acción del compuesto 3-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina contra *S. aureus* resistente a meticilina (SARM). Mediante microarreglos validados por RT-qPCR se obtuvo el perfil de expresión génica de la bacteria expuesta al lignano, y se determinó que probablemente el compuesto 3-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina actúa en la membrana celular reprimiendo algunas proteínas del sistema de transporte en membrana ABC de SARM, provocando que la bacteria no pueda liberar el compuesto 3-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina, por lo que se atribuye a esto la actividad antibacteriana del compuesto⁷⁵.

Con los resultados encontrados por nuestro grupo de investigación, es evidente que los lignanos son los fitocompuestos responsables de la actividad antibacteriana y antimicobacteriana de los extractos de *L. tridentata*, por lo tanto, la exploración de la planta para la búsqueda de nuevas moléculas activas resulta viable, prometedora y altamente productiva para el descubrimiento de nuevos fármacos.

3. Hipótesis y Objetivos

3.1. Hipótesis

L. tridentata es fuente de nuevos metabolitos secundarios con actividad antibacteriana y antimicobacteriana.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo general

Aislar y caracterizar estructuralmente nuevos metabolitos secundarios de las hojas de *L. tridentata*, y determinar su actividad antibacteriana y antimicobacteriana.

3.2.2. Objetivos específicos

1. Preparar los extractos hexánico y clorofórmico de las hojas de *L. tridentata*
2. Aislar y caracterizar estructuralmente los constituyentes del extracto clorofórmico de las hojas de *L. tridentata*
3. Analizar mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) el extracto hexánico

4. Determinar la actividad antibacteriana y antimicobacteriana de los metabolitos secundarios obtenidos de *L. tridentata*

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales y equipos

Se usó como fase estacionaria (FE) en las cromatografías en columna (CC), gel de sílice (0.040-0.063 mm; EMD chemical inc). Para la cromatografía en placa preparativa de aluminio (20 X 20 cm) y cromatografía en capa fina se usaron cromatofolios de gel de sílice 60 F-254 (Fluka analytical y Merk). Se emplearon también placas cromatográficas (20 X 20cm) de base de vidrio 60 F-254 (Merk). Los solventes usados como fases móviles en las cromatografías, y para las recristalizaciones fueron: metanol (MeOH; 99.99%), acetona (C₃H₆O; 99.99%), acetato de etilo (AcOEt; 99.99%), cloroformo (CHCl₃; 98.85%), diclorometano (CH₂Cl₂; 98.85%), hexano (98.99%). Todos los solventes fueron obtenidos de la empresa MERCK, USA. Para la eliminación de colorantes en las muestras se usó carbón activado (Desarrollo de Especialidades Químicas S.A. de C.V.). Para la síntesis de éteres se empleó yodometano (CH₃I; Sigma Aldrich) y carbonato de potasio (K₂CO₃; Sigma Aldrich).

Para los ensayos de actividad antibacteriana y antimicobacteriana se usaron microplacas estériles de 96 pocillos con tapa (Corning Costar, New York), medios de cultivo Mueller Hinton (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), medio Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y medio Lowenstein Jensen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Se empleó ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)

como nutrientes de enriquecimiento para medio Middlebrook 7H9. Se usó además Tween 80 (Sigma-aldrish, St Louis, MO), glicerol (Sigma-aldrish, St Louis, MO), y Azul de Alamar (Biotum, Hayward, CA). Se usaron los siguientes antibióticos: estreptomina, levofloxacina, rifampicina, isoniacida y etambutol (Sigma-aldrish, St Louis, MO). Los disolventes usados fueron: dimetilsulfóxido (DMSO) (J.T.Baker, USA) y agua desionizada estéril.

Equipos

Para la parte fitoquímica; los extractos fueron concentrados en el rotaevaporador Buchi R300, el peso de muestras se determinó con la balanza analítica Sartorius B1205 y se determinaron los puntos de fusión (P.F.) usando el instrumento Fisher Johns. Para la caracterización de compuestos; la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) en una dimensión (RMN-¹H, RMN-¹³C) y en dos dimensiones (HSQC, HMBC, NOESY, COSY) se realizó en el equipo: Bruker NMR400. El estándar interno usado en RMN fue tetrametilsilano (TMS), y los solventes usados fueron cloroformo deuterado (CDCl₃), metanol deuterado (MeOD) y dimetilsulfóxido (DMSO). La espectrometría de masas de alta resolución (EMAR) con la técnica de ionización por electro spray positivo (IES +) se realizó en el equipo JEOL JMS-AX505HA. Para la determinación de la rotación óptica (polarimetría) se usó el Polarímetro Perkin Elmer 343. El estudio de difracción de rayos x se realizó con el Difractómetro Bruker Smart Apex ubicado en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para los ensayos biológicos se emplearon micropipetas Biopette A BP1000 y BP200, micropipeta electrónica multicanal de pistón VWR. Los ensayos de actividad antimicobacteriana se realizaron en una campana de bioseguridad clase II BSC110011B2-X Biobase. El ensayo de actividad antibacteriana se realizó en campana de flujo laminar Edgegard. Los insumos se esterilizaron en la autoclave semiautomática para laboratorio marca Tuttnauer que se encuentra en el hospital universitario, UANL.

4.2. Metodología

La parte fitoquímica y de síntesis de derivados, se realizó en el Laboratorio de Química de Productos Naturales y Sintéticos de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL. Los ensayos biológicos se realizaron en el Laboratorio de Gastroenterología del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, UANL.

4.2.1. Fitoquímica

Material vegetal: Se trabajó con las partes aéreas de *L. tridentata*, obtenidas del estado de San Luis Potosí en el mes de septiembre del año 2015. La planta fue identificada por el Biólogo Mauricio González Ferrara. Una muestra de referencia se conservará en el Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

4.2.1.1. Obtención del extracto hexánico y clorofórmico

Las partes aéreas secas y molidas de *L. tridentata* (1000 g) se maceraron con hexano (1850 mL) durante 24 horas, posteriormente se filtró por gravedad el material vegetal y el extracto hexánico se destiló al vacío usando un rota-evaporador, se obtuvieron 17.65 g de extracto hexánico seco. El material vegetal posteriormente fue macerado con cloroformo (1850 mL X 4) cuatro veces, cada vez por un periodo de 48 horas, en cada macerado el extracto se filtró por gravedad y los extractos clorofórmicos fueron reunidos y destilados al vacío, obteniéndose al final 152.6 g de extracto clorofórmico seco.

4.2.1.2. Fraccionamiento del extracto clorofórmico

El extracto clorofórmico (152.6 g) fue fraccionado por cromatografía en columna (CC), se usó como fase estacionaria (FE) gel de sílice (2000 g), y como fase móvil (FM) un gradiente de Hexano/AcoEt obteniendo un total de 248 fracciones de 400 mL cada una. Todas las fracciones fueron analizadas por cromatografía en capa fina (CCF) y fueron observadas bajo luz ultravioleta y reveladas con sulfato cérico amoniacal. Las fracciones fueron reunidas por similitud cromatográfica en 11 fracciones asignadas desde la letra A hasta la letra K (tabla 8).

TABLA 8**Fraccionamiento del extracto clorofórmico**

Clave	Fracciones reunidas	Polaridad CC
A	1-56	Hexano 100%
B	57-72	Hexano/AcoEt 95:5
C	73-88	Hexano/AcoEt 90:10
D	89-128	Hexano/AcoEt 85:15
E	129-136	Hexano/AcoEt 80:20
F	137-144	Hexano/AcoEt 75:25
G	145-180	Hexano/AcoEt 70:30
H	181-184	Hexano/AcoEt 65:35
I	185-192	Hexano/AcoEt 60:40
J	193-224	Hexano/AcoEt 50:50
K	225-248	Hexano/AcoEt 40:60

4.2.1.3. Aislamiento y purificación de fitocompuestos de las fracciones del extracto clorofórmico**Aislamiento y purificación de Lt4: ácido *meso*-dihidroguaiarético**

El compuesto Lt4 se obtuvo de las fracciones G-I. De la fracción G (7 g) se realizó una cromatografía en columna (CC) usando como fase estacionaria (FE) gel de sílice (140 g) y fase móvil (FM) un gradiente de hexano/AcoEt obteniéndose la subfracción 97-144 (4.7g), la cual se sometió a una CC usando FE gel de sílice (94g) y FM un gradiente de hexano/acetona. De esta última columna se obtuvo

la subfracción 196-360 (3.4 g) que fue sometida a una CC sobre gel de sílice (70 g) eluída con un gradiente de hexano/ CHCl_3 donde se obtuvieron las subfracciones 191-310, 311-340 y 341-450.

La subfracción 191-310 (1.1373 g) se fraccionó en una CC usando como FE gel de sílice (30 g) y FM un gradiente de hexano/ CHCl_3 obteniéndose la subfracción 2141-2170 (277.3 mg) de la cual se purificó una porción de 50 mg por cromatografía en placa preparativa (CPP) usando como fase móvil (FM) CHCl_3 /acetona (98:2) para obtener finalmente 8.1 mg de Lt4. Proveniente también de 191-310, la subfracción 2191-2310 (461 mg) fue purificada por recristalización usando hexano/ CHCl_3 (85:15); el sólido obtenido fue Lt4 (310 mg). La subfracción 311-340 (383 mg) se trató con carbón activado usando CHCl_3 como disolvente; después de filtrar la muestra se sometió a recristalización con hexano/ CHCl_3 (85:15) para obtener Lt4 (177 mg).

La fracción 341-450 se trató con carbón activado usando CHCl_3 como disolvente; después de filtrar, una porción de 100 mg se purificó por cromatografía en placa preparativa (CPP) usando como FM: CHCl_3 /acetona (98:2), lográndose obtener Lt4 (20.6 mg).

La fracción H (768.3 mg) se sometió a una CC usando como FE gel de sílice (15.366 mg) y FM un gradiente de hexano/acetona, obteniéndose la subfracción 76-110 (230.6 mg) la cual se sometió a una CC usando como FE gel de sílice (4.612 g) y FM un gradiente de hexano/ CHCl_3 , obteniéndose las subfracciones

73-84 (63.6 mg) y 85-104 (92.6 mg), que fueron tratadas con carbón activado usando CHCl_3 como disolvente, después se sometió cada subfracción por separado a CPP usando como FM: hexano/AcOEt/acetona (70:25:5) para obtenerse de la subfracción 73-84 un total de 63.3 mg de Lt4 puro y de la subfracción 85-104 un total de 63.2 mg de Lt4.

La fracción I (4.6 g) se fraccionó con una CC usando como FE gel de sílice (92 g) y FM un gradiente de hexano/AcOEt, obteniéndose las subfracciones 79-96 y 97-108. La subfracción 79-96 (417.8 mg) se fraccionó con una CC usando como FE gel de sílice (8.356 g) y FM un gradiente de hexano/ CHCl_3 , obteniéndose la subfracción 68-84 (195 mg) que se purificó por CPP usando como FM: hexano/AcOEt (70:30) para obtener 88.2 mg de Lt4. Para el caso de la subfracción 97-108 (370.5 mg) esta se sometió a una CC usando como FE gel de sílice (7.41 g) y como FM un gradiente de hexano/ CHCl_3 para obtenerse la subfracción 94-112 (50.2 mg) que fue purificada por dos CPP sucesivas usando como FM: hexano/AcOEt (70:30) y hexano/acetona (70:30) donde se obtuvo Lt4 (26.4 mg).

Aislamiento y purificación de Lt16:4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano

El compuesto Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano se obtuvo de las fracciones G y H. La fracción G (7 g) se sometió a una CC usando como FE gel de sílice (140 g) y como FM un gradiente de hexano/AcOEt donde se obtuvieron las subfracciones 97-144 (4.7 g) y 145-168 (832.6 mg). La subfracción 97-144 (4.7 g) se sometió a una CC usando como FE gel de sílice (94 g) y como FM un

gradiente de hexano/acetona, originando la subfracción 361-365 (151 mg) y 366-380 (494 mg). La subfracción 361-365 se trató con carbón activado usando CHCl_3 como disolvente, después se realizó una recristalización en hexano/ CHCl_3 (50:50) para obtener 44 mg de Lt16. La subfracción 366-380 se trató con carbón activado usando CHCl_3 como disolvente obteniéndose 441.6 mg de esta fracción la cual se sometió a una CC usando como FE gel de sílice (14g) y como FM un gradiente de hexano/ CHCl_3 , obteniéndose la subfracción 421-760 (250.2 mg) que se purificó por recristalización con hexano/ CHCl_3 (50:50) obteniéndose 226.2 mg de Lt16. La subfracción 145-168 (832.6 mg) se trató con una CC sobre gel de sílice (16.55 g) y como FM un gradiente de hexano/acetona, obteniéndose las subfracciones 361-378 (58 mg), 379-396 (22.9 mg) y 397-426 (253.1 mg). La subfracción 361-378 (58 m) se sometió a una CC usando como FE gel de sílice (1.7 g) y como FM un gradiente de Hexano/ CHCl_3 obteniéndose la subfracción 296-345 (31.2 mg) que se purificó por recristalización con hexano/ CHCl_3 (50:50) para obtenerse 24.5 mg de Lt16. La subfracción 379-396 se trató con una CPP usando como FM un gradiente de hexano/ AcOEt /acetona (75:25:5) obteniéndose 12.6 mg de Lt16. La subfracción 397-426 se recristalizó con hexano/ CHCl_3 (50:50) y se obtuvieron 102.6 mg de Lt16.

Por último, la fracción I (768.3 mg) fue tratada con una CC usando como FE gel de sílice (15.36 g) y como FM un gradiente de hexano/acetona, obteniéndose la subfracción 111-185 (313.1 mg) que se sometió a una CC usando como FE gel de sílice (6.26 g) y FM un gradiente de hexano/ CHCl_3 , originando la subfracción 93-144 (279.3 mg) que se trató con una CC sobre gel de sílice (5.58 g) y como

FM un gradiente de hexano/acetona, para obtener la subfracción 89-220 (201.6 mg) que se purificó por recristalización con hexano/CHCl₃ (50:50) obteniéndose 100.4 mg de Lt16.

Aislamiento y purificación de Lt17:3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano

La fracción G (7 g) fue sometida a cuatro CC sucesivas sobre gel de sílice y eluidas cada una con gradientes de hexano/AcOEt, hexano/acetona, hexano/cloroformo, y hexano/cloroformo. Respectivamente la subfracción 2141-2170 (277.3 mg) de la cuarta columna se trató con CPP eluída con CHCl₃/acetona (98:2), obteniéndose 9 mg de Lt17. La subfracción 341-450 (567 mg) proveniente de la tercera columna se sometió a una CPP usando FM: CHCl₃/acetona (98:2) dando 29.6 mg de Lt17. El compuesto Lt17 también se obtuvo de CPP (FM: CHCl₃/acetona (98:2)) usada para purificar Lt4 proveniente de las fracciones H-I; se logró obtener 42 mg de Lt17.

Aislamiento y purificación de Lt18:3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano

El compuesto Lt18 se obtuvo de la fracción G la cual como ya se mencionó anteriormente fue procesada por cuatro CC sucesivas. De la subfracción 341-450 obtenida de la tercera CC eluída con hexano/CHCl₃ se obtuvieron 20.5 mg de Lt18 mediante una CPP (FM: CHCl₃/acetona (98:2)).

Aislamiento y purificación de Lt21:3'-demetoxi-isoguaiacina

El lignano Lt20:3'-demetoxi-isoguaiacina se obtuvo de la fracción G, que se procesó mediante cuatro CC sucesivas, y consecutivamente con la subfracción 341-450 obtenida de la tercera CC eluída con hexano/CHCl₃, se realizó otra CC eluyendo isocráticamente (FM: CHCl₃/acetona (98:2)) para obtener la fracción 13-22 a la cual se le realizó dos CPP consecutivas (FM: CHCl₃/acetona (98:2); FM: Hexano/CH₂Cl₂/acetona (60:30:10)) obteniéndose 7 mg de Lt21.

Aislamiento y purificación de Lt8:3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina

La fracción J (40 g) se sometió a una CC sobre gel de sílice (800 g) y FM un gradiente de CHCl₃/acetona. La subfracción 58-120 (3.163 g) se sometió a recristalización usando CHCl₃/acetona (90:10) lográndose obtener Lt8 (3.163 g).

Aislamiento y purificación de Lt20: ácido nordihidroguaiarético

La fracción K (4.36 g) se procesó mediante una CC sobre gel de sílice (87.2 g) usando como FM un gradiente de hexano/acetona; de donde resultó la subfracción 73-79 (polaridad:CH₂Cl₂/MeOH (97:3)) donde precipitó en forma espontánea 63.8 mg de Lt20.

Aislamiento y purificación de Lt3:5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona

La fracción K (4.36 g) se procesó mediante una CC usando como FE gel de sílice (87.2 g) y FM un gradiente de hexano/acetona; de donde resultó la subfracción 86-100 (2.2 g) que se sometió a otra CC sobre gel de sílice (44 g) y FM un

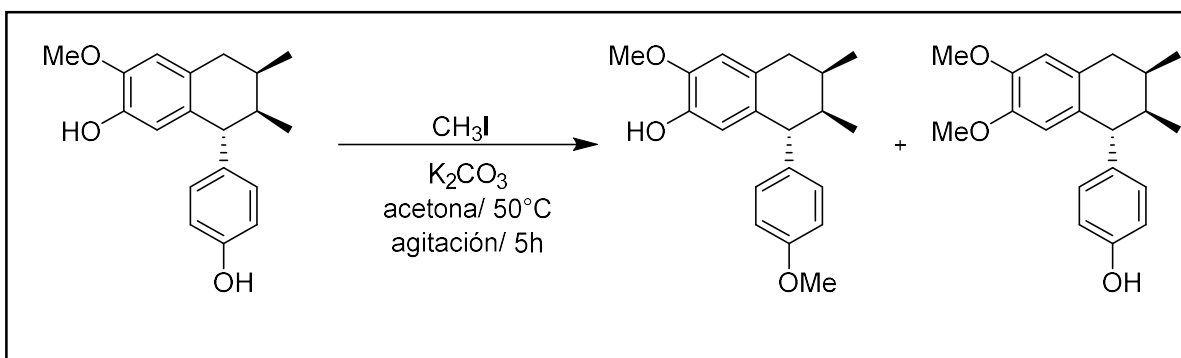
gradiente de CH₂Cl₂/MeOH, de la subfracción 62-64 (CH₂Cl₂/MeOH 97:3) de esta columna precipitó de forma espontánea 88.9 mg de Lt3 puro.

Aislamiento y purificación de Lt5: 5,4'-dihidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona

La fracción J (40 g) se sometió a una CC usando como FE gel de sílice (800 g) y FM un gradiente de CHCl₃/acetona, obteniéndose la subfracción 37-46 (400 mg) la cual se recrystalizó con acetona obteniéndose 377.3 mg de Lt5. La fracción K (4.36 g) se procesó mediante una CC usando como FE gel de sílice (87.2 g) y FM un gradiente de hexano/acetona; de donde resultó la subfracción 71-85 (120.5 mg; hexano/acetona (95:5)) que se purificó por recrystalización con acetona obteniéndose 117.5 mg de Lt5.

4.2.2. Síntesis de derivados metilados de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano

Se disolvieron 50 mg (0.1677 mmol) de Lt16 en 2 mL de acetona, posteriormente se adicionaron 39.4 mg (0.2851 mmol) de K₂CO₃ y consecutivamente se agregaron 17.74 µL (0.2851 mmol) de CH₃I. La reacción procedió en reflujo a una temperatura de 50 °C con agitación durante una hora. Posteriormente se agregaron 17.74 µL (0.2851 mmol) de CH₃I, y se dejó transcurrir la reacción 1 hora más; después se agregaron nuevamente 17.74 µL (0.2851 mmol) de CH₃I y se dejó reaccionar hasta completarse 5 horas. Se monitoreó la reacción a los 30, 60, y 120 minutos por CCF usando como FM Hexano/acetona 70:30 (esquema 1).



Esquema 1. Reacción de metilación de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano

Purificación de derivados: la mezcla de reacción (112 mg) se secó al vacío y se sometió a una CC usando como FE gel de sílice (3.38 mg) y FM un gradiente de hexano/acetona. El derivado GN30 (4.7 mg) se obtuvo en la subfracción 23-28 (hexano/acetona (90:10)), y el derivado GN31 (4.3 mg) se obtuvo en la subfracción 37-50 (hexano/acetona (90:10 a 85:15)).

4.2.3. Caracterización de fitocompuestos y derivados

La elucidación estructural de los compuestos se realizó mediante el análisis de espectros en una dimensión RMN-¹H y RMN-¹³C, en dos dimensiones (COSY, NOESY, HSQC, HMBC) y la determinación de masa molecular de los compuestos por medio de espectrometría de masas de alta resolución (EMAR). Además, se confirmó la estereoquímica predicha mediante estudios de polarimetría (rotación óptica) y difracción de rayos X para la forma cristalina del compuesto Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano.

4.2.4. Ensayos biológicos

4.2.4.1. Determinación de actividad antibacteriana

Se determinó la actividad antibacteriana por el método de microdilución en placa reportado por Zgoda *et al.*, 2001⁷⁶. Las cepas de bacterias (tabla 9) son aislados clínicos farmacorresistentes.

TABLA 9

Bacterias farmacorresistentes

Gram negativas	Gram positivas
<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenémicos (12-666)	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (14-2095)
<i>Escherichia coli</i> (OXA-48) resistente oxacilinas	<i>Staphylococcus epidermidis</i> resistente a linezolid (14-583)
<i>Escherichia coli</i> productora de BLEE (14-2081)	<i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina (10-984)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenémicos (13-1391)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NDM-1+ resistente a carbapenémicos, cefalosporinas de amplio espectro (14-3335)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> productora de BLEE (14-2081)	

Preparación de inóculos bacterianos: Las cepas a ensayar se cultivaron en placas de medio agar-sangre al 5%, incubándose durante 24 h y durante 48 h para *P. aureoginosa* resistente a carbapenémicos. Una vez obtenidas las colonias, se tomaron de 1 a 3 y se transfirieron a tubos conteniendo 5 mL de solución salina estéril, ajustando la turbidez a la escala 0.5 de McFarland (1.5×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml). Finalmente, se transfirieron 10 μ L de la solución anterior a un tubo que contenía 11 mL de medio Muller Hinton, quedando esta última solución (inóculo de trabajo) a una concentración de 5×10^5 UFC/ml.

Ensayo biológico: en una placa de 96 pocillos estéril y con tapa, se agregaron en cada pocillo 100 μ L de medio de cultivo. Posteriormente, se agregó en los pocillos de la fila A las soluciones de trabajo de los compuestos a probar (de concentración 200 μ g/mL y preparadas con DMSO como disolvente). Cada concentración (50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 y 1.56 μ g/mL) se evaluó por duplicado y se usó como control positivo levofloxacino. Una vez agregadas las soluciones de trabajo en la fila A, se realizaron diluciones 1:2 a lo ancho de la placa de la siguiente manera: se mezcló el contenido de los pocillos usando micropipeta multicanal, después se tomaron 100 μ L de la fila A y se transfirieron a la fila B, se mezcló y sucesivamente se tomaron 100 μ L de la fila B y se transfirieron a la fila C; se continúa el proceso de seriado por dilución hasta llegar a la fila G, desechándose los últimos 100 μ L tomados. Realizadas las diluciones, se agregaron 100 μ L de inóculo de trabajo a todos los pocillos, excepto a los de la fila H que son el control negativo. Por último, se incubó la microplaca a 37 °C durante 24-48 h dependiendo de la bacteria ensayada. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se evaluó el crecimiento bacteriano en los pocillos de forma visual; considerando como inhibición la ausencia de turbidez y de conglomerados bacterianos en el fondo del pocillo. Se consideró la CMI como la mínima concentración del compuesto que inhibe el crecimiento de la bacteria.

4.2.4.2. Determinación de actividad antimicobacteriana

Se determinó la actividad antimicobacteriana por el método de Azul de Alamar, descrito por FranzBlau *et al.* 2001⁷⁷ y con las modificaciones descritas por

Favela-Hernández *et al.*, 2012^{71,72}. Las cepas usadas fueron *M. tuberculosis*: H37Rv (cepa ATTC sensible a Rifampicina, Isoniacida, Etambutol y Estreptomina) y G122 (aislado clínico resistente a Rifampicina, Etambutol y Estreptomina).

Preparación de inóculos bacterianos: Las cepas congeladas a -80 °C suspendidas en 1 mL de caldo con glicerol al 10%, fueron atemperadas hasta pasar a fase líquida, enseguida usando una pipeta de plástico desechable, se inoculó todo el conglomerado bacteriano en un tubo de medio sólido Lowenstein Jensen previamente esterilizado; incubando el mismo durante 14 días a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se observó crecimiento discreto de colonias de donde se tomó una colonia y se inoculó en 5 mL de caldo Middlebrook 7H9 enriquecido al 10% con OADC, y se dejó incubando a 37 °C durante 14 días para obtener inóculo líquido, tiempo suficiente para que la bacteria alcance la fase logarítmica de crecimiento. Después de la incubación, se ajustó el inóculo líquido a la escala 1 de McFarland, diluyendo en los casos en que fue necesario, con caldo Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC. Por último, se tomó 1 volumen del inóculo líquido ajustado y se agregó a 19 volúmenes de caldo Middlebrook enriquecido con OADC (dilución 1:20) para de este modo obtener el inóculo de trabajo. El procedimiento se realizó del mismo modo para las dos cepas ensayadas.

Ensayo biológico: Para el ensayo se llenaron todos los pocillos de la fila A y los correspondientes a H1, H2, H3, H10, H11 y H12 con 200 μ L de agua desionizada estéril, posteriormente se llenaron con 100 μ L de caldo Middlebrook 7H9 enriquecido al 10% con OADC los pocillos de las filas B, C, D, E, F, G, H4 y H5 (100 μ L en cada pocillo), y los pocillos H6 y H7 con 180 μ L en cada pocillo así como también los pocillos H8 y H9 con 200 μ L cada pocillo. El siguiente paso consistió en agregar en los pocillos de la fila B las soluciones de trabajo de los compuestos a probar (ajustadas a una concentración de 200 μ g/mL y preparadas con DMSO y caldo Middlebrook enriquecido con OADC como solvente). Cada concentración se evaluó por duplicado.

Una vez agregadas las soluciones de trabajo en la fila B, se mezcló usando una micropipeta multicanal, después se tomaron 100 μ L de la fila B y se transfirieron a la fila C, se mezcló y sucesivamente se tomaron 100 μ L de la fila C y se transfirieron a la fila D; se continuó el proceso de seriado por dilución hasta llegar a la fila G, desechándose los últimos 100 μ L tomados de la misma. Realizadas las diluciones (1:2), se agregaron 100 μ L de inóculo de trabajo a todos los pocillos de las filas B, C, D, E, F, G, H4 y H5 y a los pocillos H6 y H7 se agregaron 20 μ L en cada pocillo. Como paso final, se colocó la tapa a la microplaca y se selló la unión placa/tapa con plástico parafilm. La microplaca cerrada y sellada se incubó a 37 °C durante cinco días, posteriormente se agregaron 12 μ L de solución de Tween 80 y 20 μ L de Azul de Alamar a los pocillos H3, H4, H5, H6, H7 y H8 de la microplaca, y pasadas 24 horas, si se observaba crecimiento notorio (color rosa intenso) en H3 y H4 y crecimiento leve (color violeta) en H5 y H6, se procedió

a agregar Azul de Alamar a todos los pocillos restantes de la microplaca, excepto a aquellos que contenían solo agua desionizada; después la microplaca se tapó y selló con plástico parafilm y se incubó por 24-48 h. Después del tiempo de incubación se determinó de forma visual la CMI de los compuestos, con base en el cambio de color de los pocillos, ya que, si permanecían de un color azul oscuro, se consideraba como ausencia de crecimiento bacteriano, en cambio, si la coloración era rosado intenso, indicaba crecimiento. Se consideró la CMI como la mínima concentración del compuesto que inhibe el crecimiento de la bacteria.

4.3. Disposición de residuos

4.3.1. Aislamiento y purificación de fitocompuestos y semisíntesis de derivados metilados

La disposición de los residuos generados durante el aislamiento y purificación de los compuestos del extracto clorofórmico de *L. tridentata*, así como los desechos producidos durante la síntesis de los derivados metilados de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano se realizó según lo establecido en el reglamento interno de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

4.3.2. Ensayos Biológicos

La disposición de los residuos generados durante los ensayos biológicos se realizó según el reglamento interno del Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico Especializado del Hospital Universitario.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Elucidación estructural de los constituyentes del extracto clorofórmico de *Larrea tridentata*

Del extracto clorofórmico de *L. tridentata* (152.6 g), se aislaron y caracterizaron 3 nuevos productos naturales los ciclolignanos: Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano, Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano y Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano. Adicionalmente, se aislaron y caracterizaron seis metabolitos secundarios que previamente ya se habían reportado en *L. tridentata*: los ciclolignanos Lt8: 3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina y Lt21: 3'-demetoxi-isoguaiacina, los lignanos de tipo butano, el Lt4: ácido *meso*-dihidroguaiarético y el Lt20: ácido nordihidroguaiarético, así como los flavonoides Lt5: 5,4'-dihidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona y Lt3: 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona. A continuación, se indican las propiedades físicas y espectroscópicas, así como la elucidación estructural de cada uno de los productos naturales obtenidos en este estudio.

5.1.1. Propiedades físicas y espectroscópicas de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano

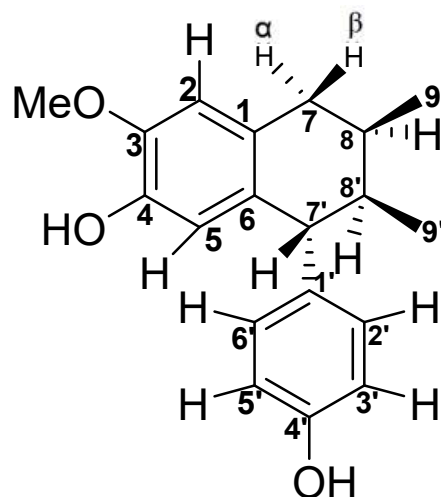


Figura 5. Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano

El compuesto se obtuvo como agujas cristalinas blancas (510.3 mg; 0.05103 %), soluble en CHCl_3 y acetona, pf: 101-103 °C, $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3$, PM: 298.38 g/mol, $[\alpha]_D^{25}$: -77.8. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.88 (d, $J = 5.88$ Hz, 3H, H-9'), 0.89 (d, $J = 6.88$ Hz, 3H, H-9), 1.90 (m, 1H, H-8'), 2.01 (m, 1H, H-8), 2.45 (dd, $J=16.36$, 7.6 Hz, 1H, H-7 β), 2.87 (dd, $J=16.36$, 5.34 Hz, 1H, H-7 α), 3.61 (d, $J=6.24$ Hz, 1H, H-7'), 3.86 (s, 3H, OMe-3), 4.78 (s, 1H, OH-4'), 5.34 (s, 1H, OH-4), 6.39 (s, 1H, H-5), 6.55 (s, 1H, H-2), 6.70 (d, $J=8.52$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.87 (d, $J = 8.48$ Hz, 2H, H-2', H-6'). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 16.05 (C9, C9'), 28.98 (C8), 35.17 (C7), 40.69 (C8'), 50 (C7'), 55.80 (OMe-3), 110.57 (C2), 114.82 (C3', C5'), 116.06 (C5), 127.76 (C1), 130.15 (C2', C6'), 130.83 (C6), 139.42 (C1'), 143.46 (C4), 144.95 (C3), 153.53 (C4').

5.1.1.1. Elucidación estructural de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano

El espectro de RMN ^1H (figura 7) mostró dos dobletes que convergen, uno a 0.88 ppm (d, $J = 5.88$ Hz, 3H, H-9') y otro a 0.89 ppm (d, $J = 6.88$ Hz, 3H, H-9), y corresponde cada doblete a un metilo unido a un grupo metino, después se observan dos multipletes a 1.90 ppm (m, 1H, H-8') y 2.01 ppm (m, 1H, H-8) que corresponden a los protones de los grupos metino en C-8, luego se observan dos dobletes de dobletes a 2.45 ppm (dd, $J=16.36, 7.6$ Hz, 1H, H-7 β) y 2.87 ppm (dd, $J=16.36, 5.34$ Hz, 1H, H-7 α), cuya multiplicidad es debida al acoplamiento geminal entre los protones bencílicos en C-7, y el acoplamiento vecinal con el metino en C-8, en 3.61 ppm (d, $J=6.24$ Hz, 1H, H-7') se observa un doblete cuya señal corresponde al protón del metino en C-7' unido a la posición 6 del anillo aromático característico de un ciclolignano, en 3.86 ppm (s, 3H, OMe-3) está un singulete del único metoxilo de la molécula, después se observan dos singuletes a 4.78 ppm (s, 1H, OH-4') y 5.34 ppm (s, 1H, OH-4) que corresponden a los hidrógenos de dos hidroxilos fenólicos, continuando hacia campo bajo, se observan dos singuletes a 6.39 ppm (s, 1H, H-5) y 6.55 ppm (s, 1H, H-2) que corresponden a dos hidrógenos en posición para de un anillo aromático tetrasustituido, y finalmente, se observan dos dobletes que conforman un sistema A_2B_2 , a 6.70 ppm (d, $J=8.52$ Hz, 2H, H-3', H-5') y 6.87 ppm (d, $J = 8.48$ Hz, 2H, H-2', H-6') de un anillo para-disustituido.

En el espectro de RMN ^{13}C (figura 8) se observan 6 carbonos alifáticos en: 16.05 ppm (C9, C9'), 28.98 ppm (C8), 35.17 ppm (C7), 40.69 ppm (C8') y 50 ppm (C7'); después se tiene una señal para el carbono del único metoxilo de la molécula a 55.80 ppm (OMe-3), y finalmente hay 12 carbonos aromáticos en: 110.57 ppm (C2), 114.82 ppm (C3', C5'), 116.06 ppm (C5), 127.76 ppm (C1), 130.15 ppm (C2', C6'), 130.83 ppm (C6), 139.42 ppm (C1'), 143.46 ppm (C4), 144.95 ppm (C3), 153.53 ppm (C4').

En el espectro COSY (figura 9) se observó que los protones de los carbonos alifáticos correlacionaron intensamente entre ellos, así del mismo modo los hidrógenos aromáticos del anillo *para*-disustituido. Las correlaciones COSY clave para la caracterización de Lt16 fueron: H-7 α ; H-7 β /H-8, H-8/H-8'; H-9, H-8'/H-7'; H-9', H-2'/H-3' y H-5'/H-6', lo que es coherente con la estructura propuesta en la figura 5. El espectro HSQC (figura 10) muestra la correlación entre cada hidrógeno con el carbono al cual está unido, además confirma que los carbonos cuaternarios propuestos en el espectro de RMN ^{13}C de la figura 10, han sido asignados de forma correcta, debido a que no correlacionan con ningún protón. La información clave para determinar la estructura precisa respecto a estereoquímica y patrón de sustitución en la molécula fue obtenida de las observaciones del espectro NOESY (figura 11) que denota la correlación espacial entre el metoxilo en el C-3 con H-2 que correlaciona con H-7 α y H-7 β , dicha correlación es una evidencia sólida de la posición del metoxilo en C-3; además se observó la correlación entre el protón del hidroxilo del C-4 con H-5 y el protón del hidroxilo en C-4' con H-3' y H-5', reafirmando el patrón de sustitución

observado para Lt16. Por último el espectro de HMBC (figura 12) aportó las bases para indicar las posiciones de los carbonos cuaternarios en la molécula, al observarse su conectividad a 3 enlaces de distancia con los C-H: C-1/H-7', C-3/H-5, C-4/H-2, C-6/H-2, C-1'/H-3';H-5', C-4'/H-2';H-6'.

Al comparar los desplazamientos químicos y las multiplicidades de las señales del espectro de RMN ^1H de Lt16 (figura 6) con lo reportado por Gnabre *et al.*, 1995⁶³, aparentemente este compuesto podría ser el lignano 3'-demetoxi-isoguaiacina, que es un compuesto previamente reportado en *L. tridentata*, y autores como Lambert *et al.* 2005⁶⁶ corroboran el dato. Sin embargo, en la elucidación estructural del ciclolignano por RMN en dos dimensiones se encontró que es un compuesto distinto a 3'-demetoxi-isoguaiacina, debido a que la posición del único metoxilo que posee la molécula es distinta a la posición que se muestra en 3'-demetoxi-isoguaiacina (figura 6), por lo tanto, el ciclolignano obtenido puede ser considerado un nuevo metabolito secundario no reportado en *L. tridentata* y en ninguna otra especie.

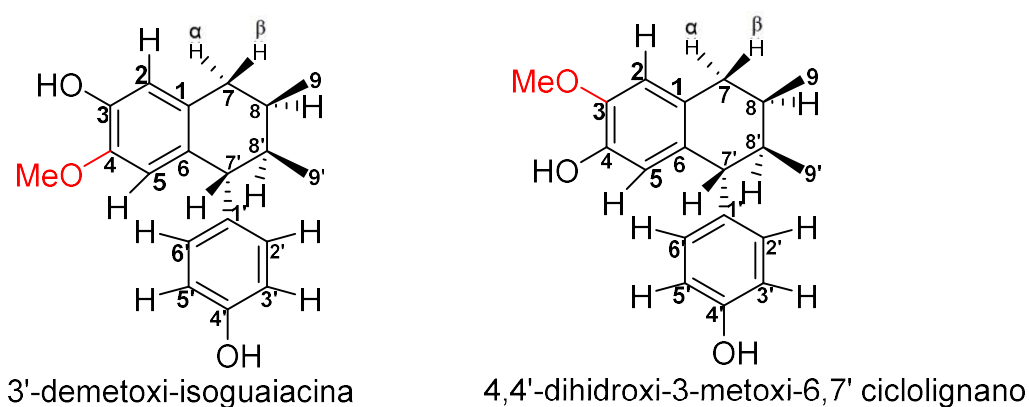


Figura 6. Estructuras químicas de 3'-demetoxi-isoguaiacina y Lt16: 4,4'-dihidroxi 3-metoxi-6,7'-ciclolignano

Finalmente, la confirmación de la estructura de Lt16 fue aportada por la prueba difracción de rayos X de monocristal del compuesto (figura 13), observándose que la estereoquímica y patrón de sustitución de la estructura van acorde a lo elucidado mediante RMN en una y dos dimensiones. En la tabla 10 se ilustran las constantes espectroscópicas clave para la elucidación estructural de Lt16.

TABLA 10

Constantes espectroscópicas clave de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi -6,7'-ciclolignano

Posición	δ_H	δ_C	HMBC	NOESY
1	-	127.76	H-5	
2	6.57 (s, 1H)	110.57		OMe, H7 α , H7 β
3	-	144.95	H-5	
4	-	143.46	H-2	
5	6.39 (s, 1H)	116.06		
6	-	130.83	H-2	
7 α	2.87 (dd, $J=16.36, 5.34$ Hz, 1H)	35.17		
7 β	2.45 (dd, $J=16.36, 7.6$ Hz, 1H)	35.17		Me-9
8	2.01 (m, 1H)	28.98		
9	0.89 (d, $J=6.88$ Hz, 3H)	16.05		H-7 β
1'	-	139.42	H-3', H-5'	
2'	6.87 (d, $J= 8.48$ Hz, 1H)	130.15		
3'	6.70 (d, $J=8.52$ Hz, 1H)	114.82		
4'	-	153.53	H-2', H-6'	
5'	6.70 (d, $J=8.52$ Hz, 1H)	114.82		
6'	6.87 (d, $J= 8.48$ Hz, 1H)	130.15		
7'	3.61 (d, $J=6.24$ Hz, 1H)	50		H-2', H-6', Me-9'
8'	1.90 (m, 1H)	40.69		
9'	0.88 (d, $J=5.88$ Hz, 3H)	16.05		
OH	4.78 (s, 1H)	-		
OH	5.35 (s, 1H)	-		
OMe	3.86 (s, 3H)	55.80		H-2, H-7 α , H-7 β

En vista que el compuesto Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi -6,7'-ciclolignano es un compuesto nuevo no reportado en *L. tridentata*, se derivatizó en dos compuestos

dimetoxilados, con el fin de ser ensayados en pruebas biológicas, y de este modo obtener información clave respecto a la relación estructura-actividad biológica del nuevo compuesto.

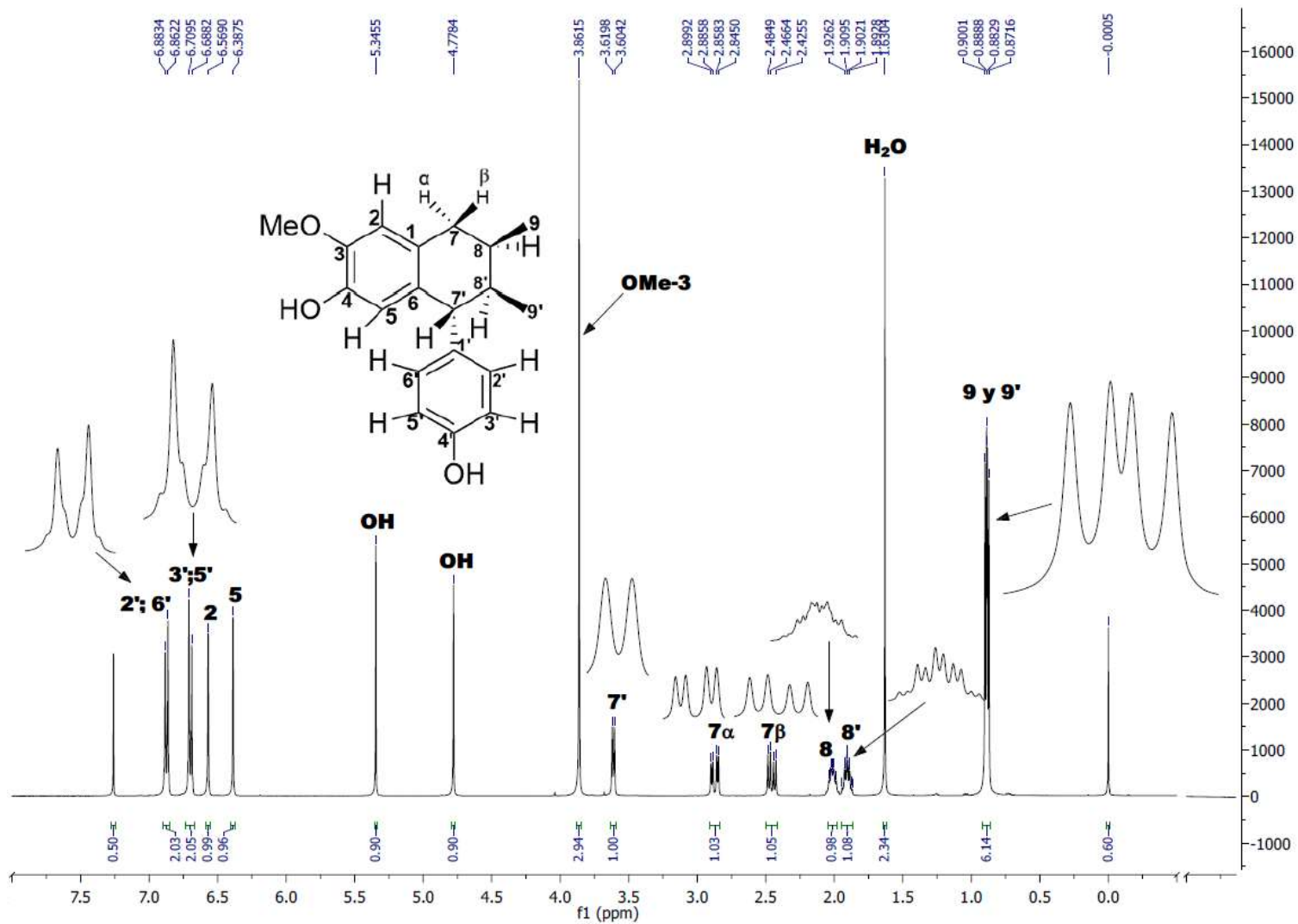


Figura 7. Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano

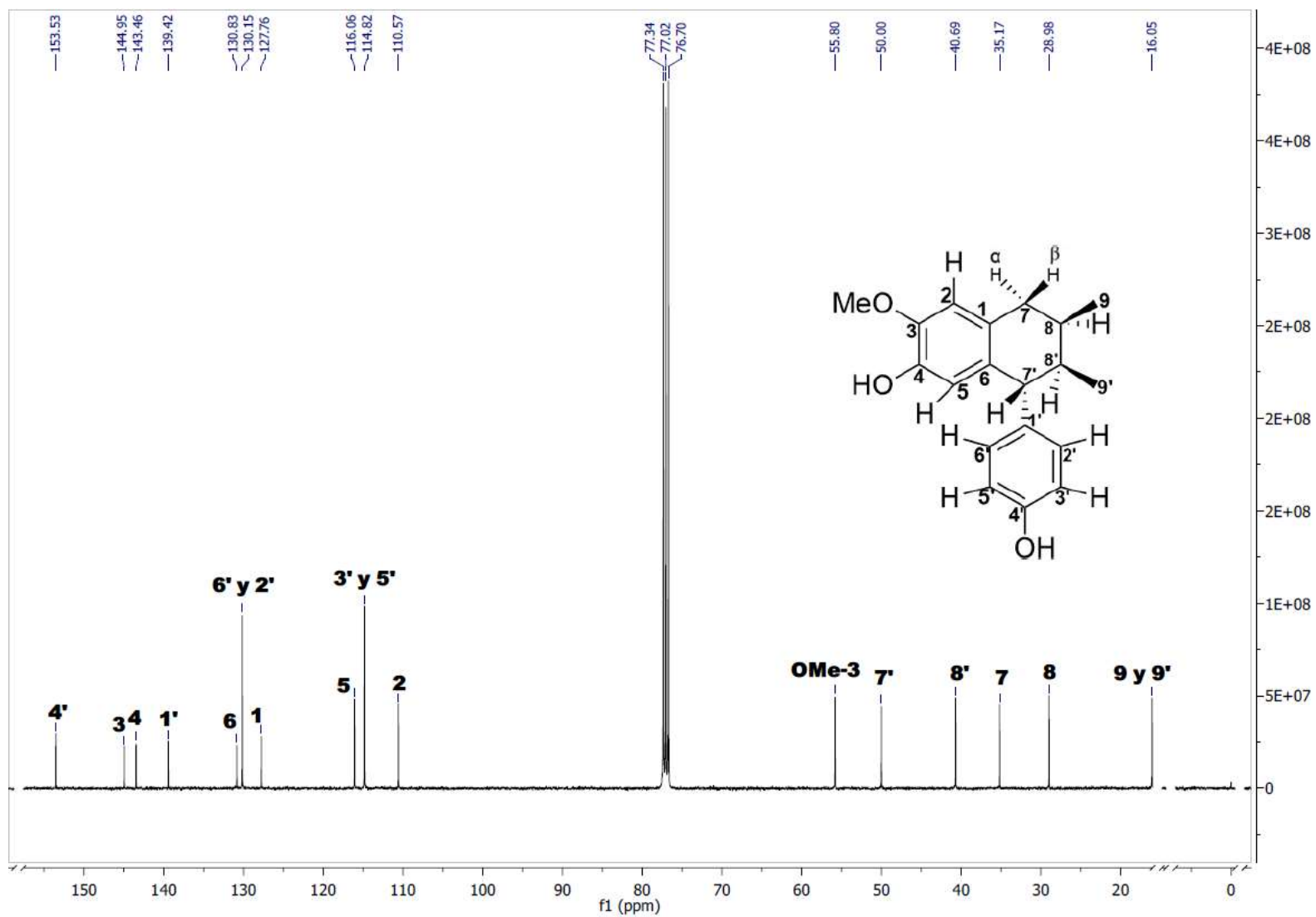


Figura 8. Espectro RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl₃) de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano

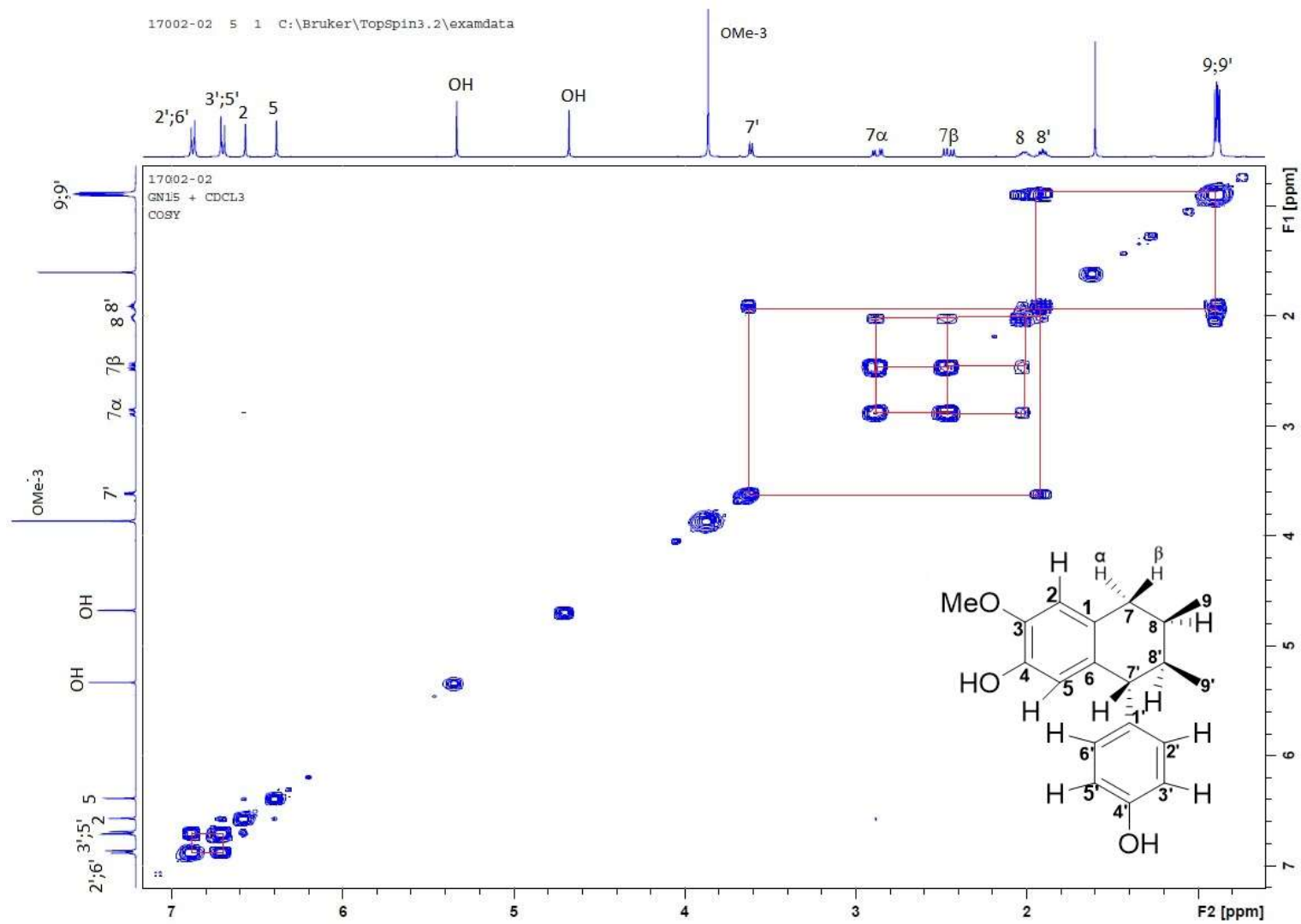


Figura 9. Espectro COSY (400 MHz, CDCl₃) de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclollignano

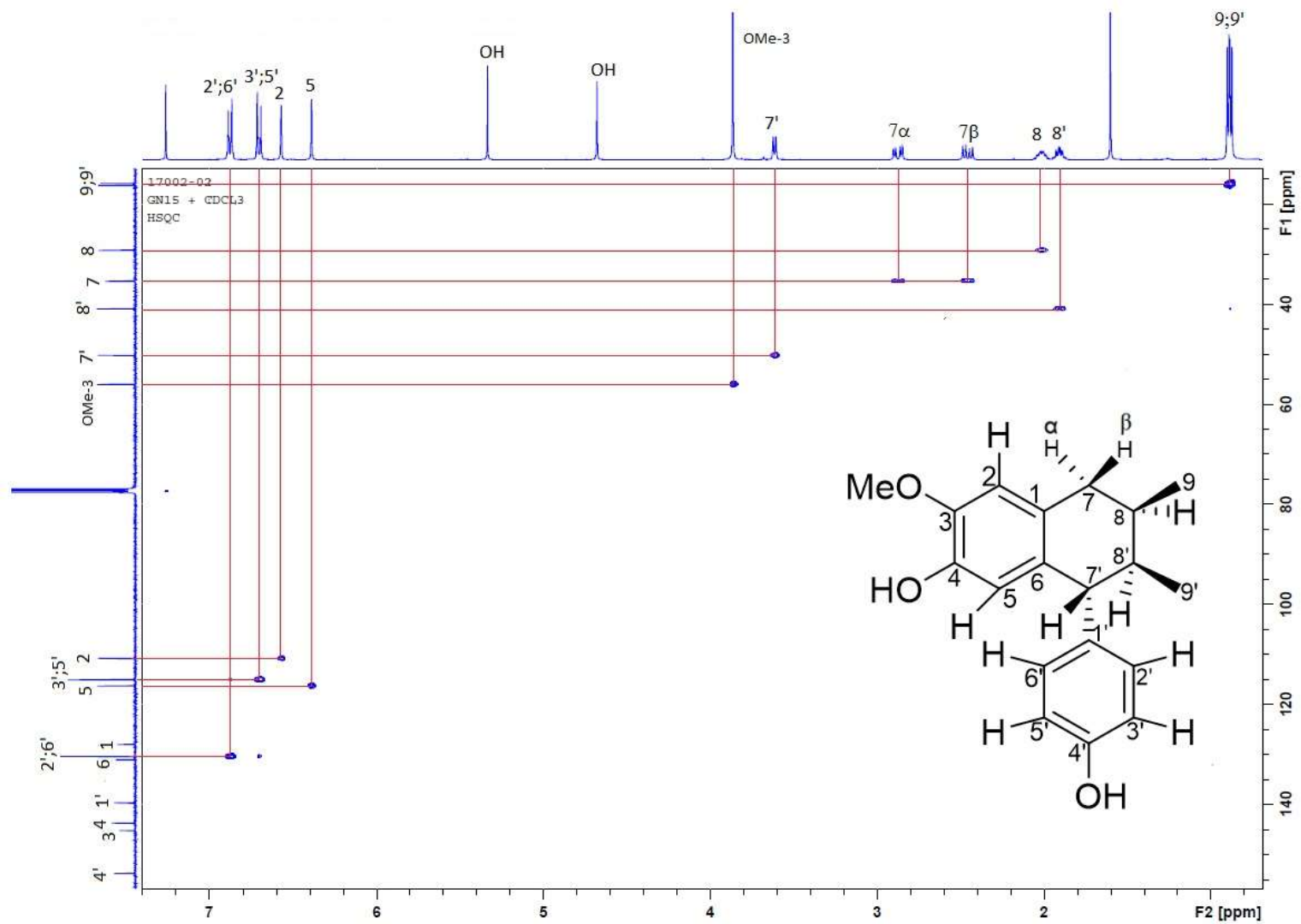


Figura 10. Espectro HSQC (400 MHz, CDCl_3) de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano

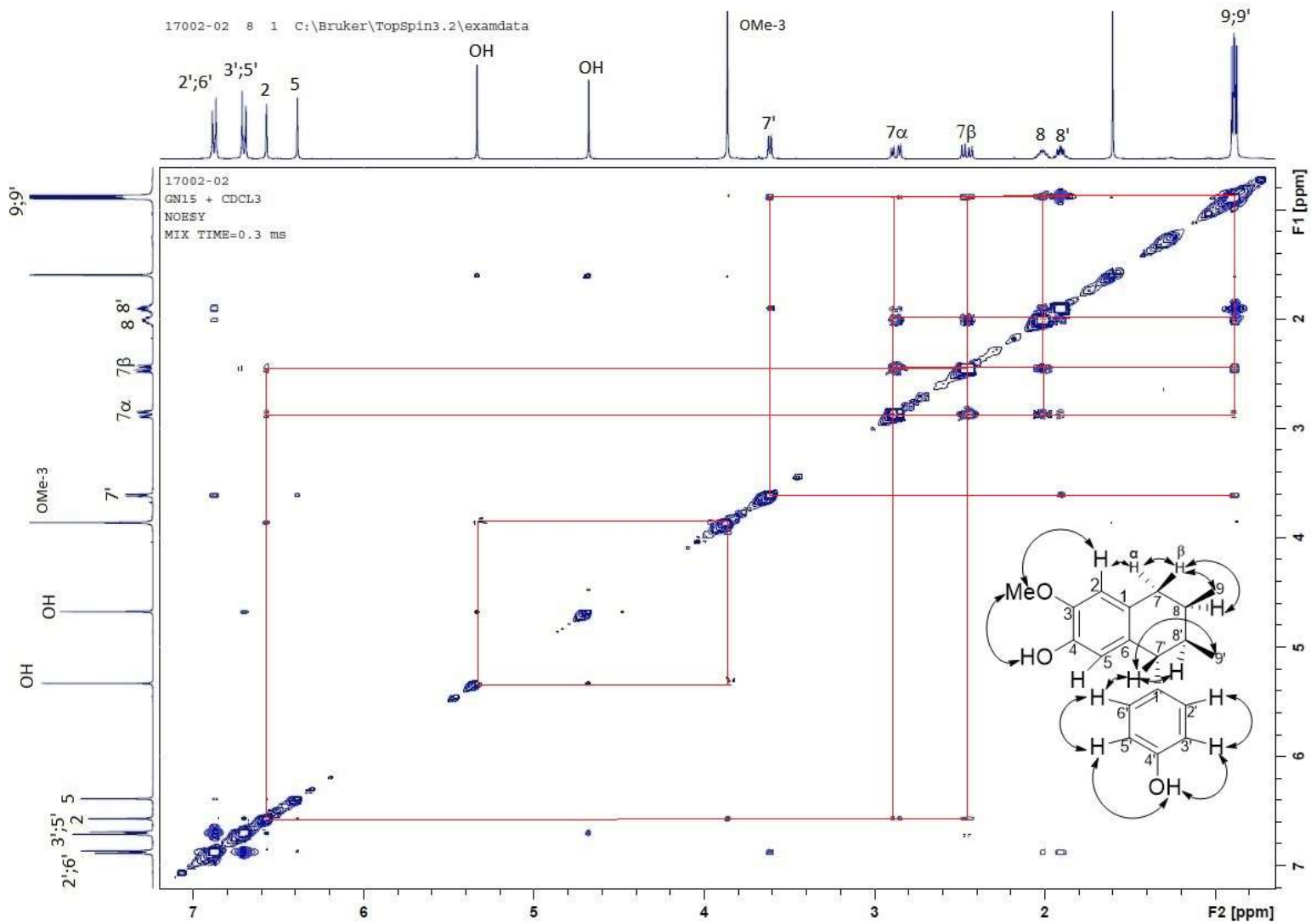


Figura 11. Espectro NOESY (400 MHz, CDCl₃) de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano

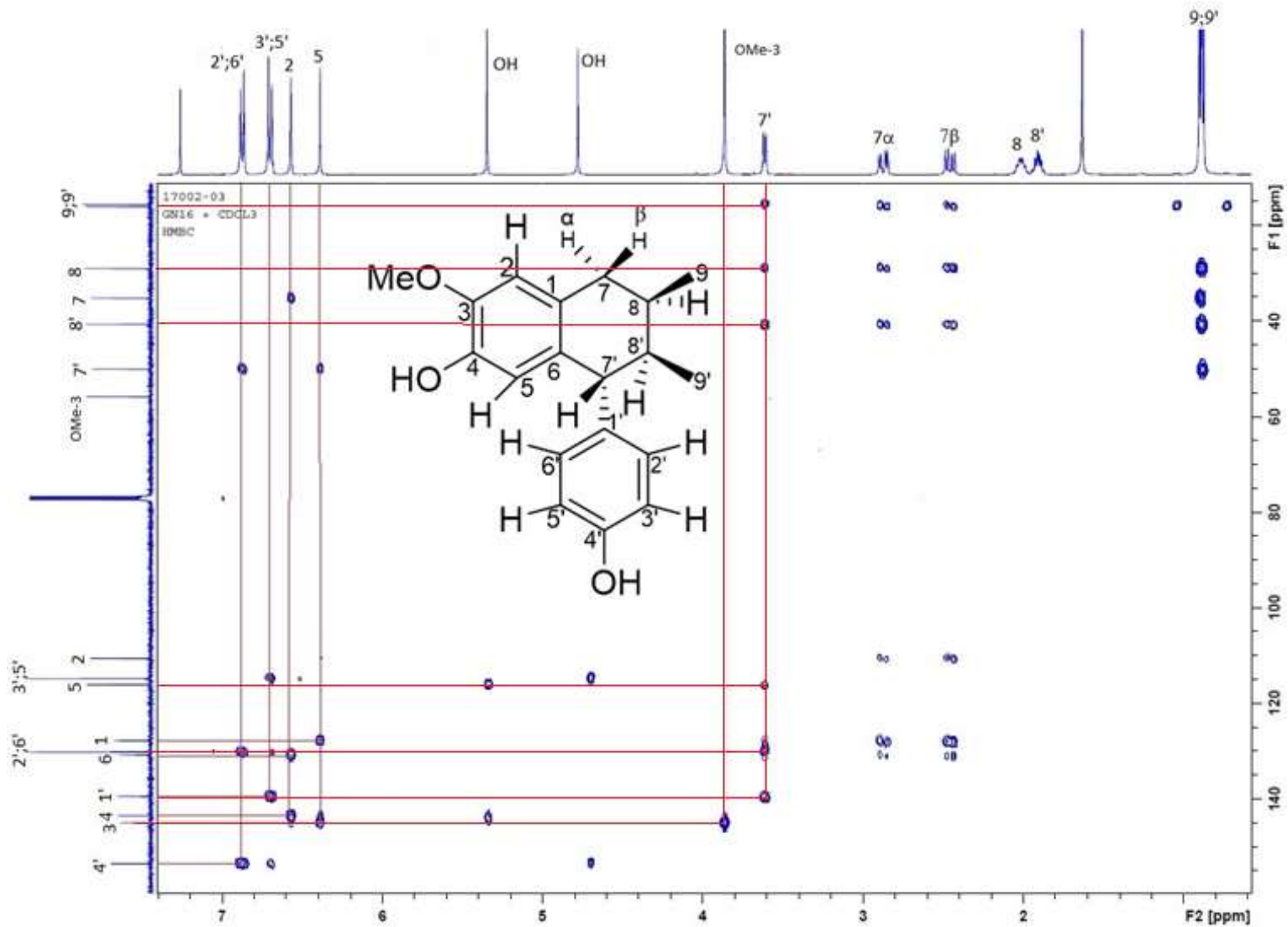


Figura 12. Espectro HMBC (400 MHz, CDCl₃) de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano

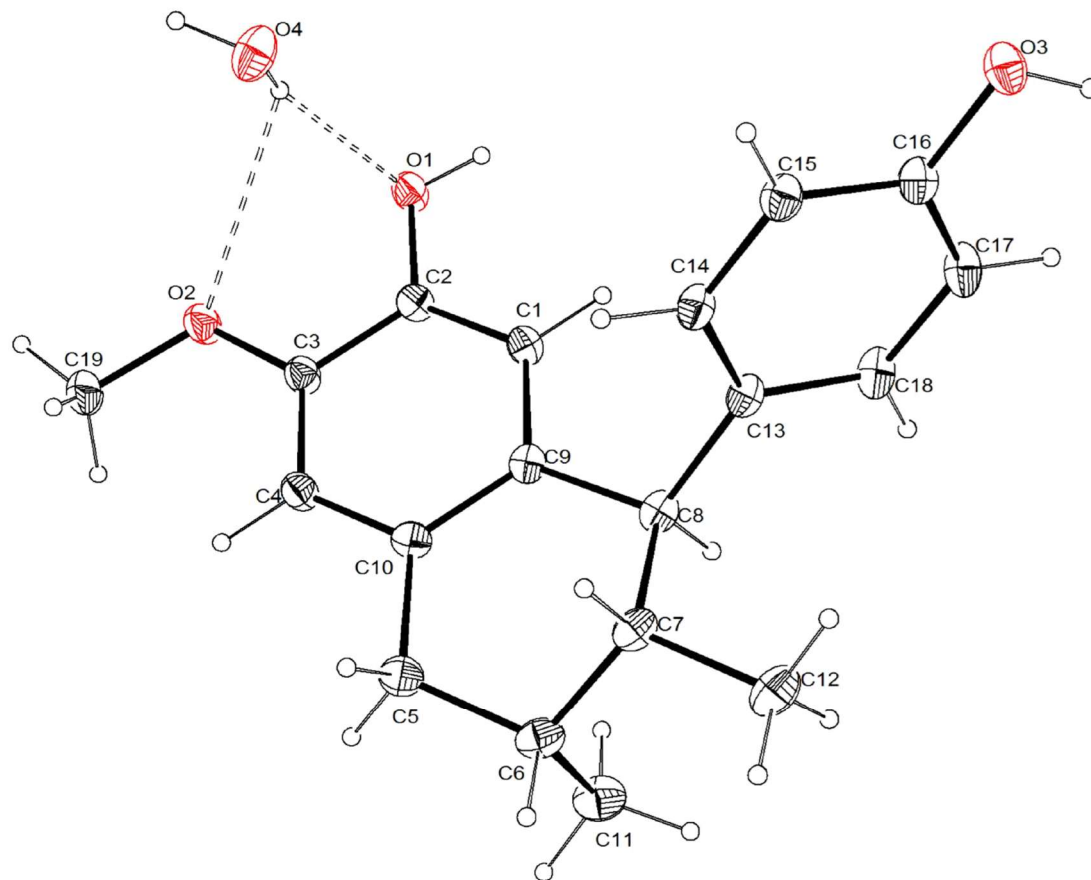


Figura 13. Estructura de la forma cristalina de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano obtenida mediante difracción de rayos X

5.1.2. Rendimiento, propiedades físicas y espectroscópicas de GN30 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano

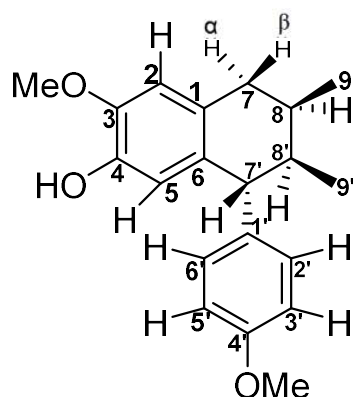


Figura 14. GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano

Resina transparente (4.7 mg; 8.96 %), soluble en CHCl_3 y acetona, $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_3$, PM: 312.40 g/mol. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.91 (d, $J = 6.92$ Hz, 3H, H-9'), 0.92 (d, $J = 6.88$ Hz, 3H, H-9), 1.95 (m, 1H, H-8'), 2.08 (m, 1H, H-8), 2.48 (dd, $J=16, 7.4$ Hz, 1H, H-7 β), 2.9 (dd, $J=16.32, 5.36$ Hz, 1H, H-7 α), 3.65 (d, $J=6.24$ Hz, 1H, H-7'), 3.80 (s, 3H, OMe-4'), 3.88 (s, 1H, OMe-3), 5.34 (s, 1H, OH-4), 6.4 (s, 1H, H-5), 6.59 (s, 1H, H-2), 6.8 (d, $J=8.72$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.95 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-2', H-6'). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 15.63 (C9), 16.05 (C9'), 29. (C8), 35.19 (C7), 40.68 (C8'), 50 (C7'), 55.22 (OMe-3), 55.80 (OMe-4'), 110.58 (C2), 113.41 (C3', C5'), 116.08 (C5), 127.7 (C1), 129.94 (C2', C6'), 130.9 (C6), 139.26 (C1'), 143.52 (C4), 144.96 (C3), 157.69 (C4').

5.1.2.1. Elucidación estructural de GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano

La caracterización estructural del derivado GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano se realizó con base a los espectros de RMN de una y dos dimensiones. Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (figuras 6 y 7) de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano son muy parecidos al derivado obtenido (figuras 15 y 16).

Para el derivado GN30, la señal clave en el espectro de RMN ^1H (figura 15) que confirmó la metilación, fue el singulete a 3.8 ppm (s, 3H, OMe-4'), en cuanto al espectro de RMN ^{13}C (figura 16) se observó una señal a 55.8 ppm (OMe-4'). El espectro NOESY (figura 17) mostró la correlación espacial entre los protones del metoxilo en 3.8 ppm con los protones H-3' y H-5', y siendo esta la única correlación que se observa en el espectro para dicho metoxilo, se dedujo que este sustituyente se encuentra en la posición 4' tal y como se muestra en la figura 13. Como complemento a la información obtenida en el espectro NOESY, el segundo metilo generado en la reacción mostró correlaciones en el espectro de HMBC (figura 18), donde claramente se observa que el carbono C-4' correlaciona con los hidrógenos en H-2', H-6'; H-3', H-5' y con los hidrógenos del metoxilo en la posición 4', confirmando así que el derivado es GN30

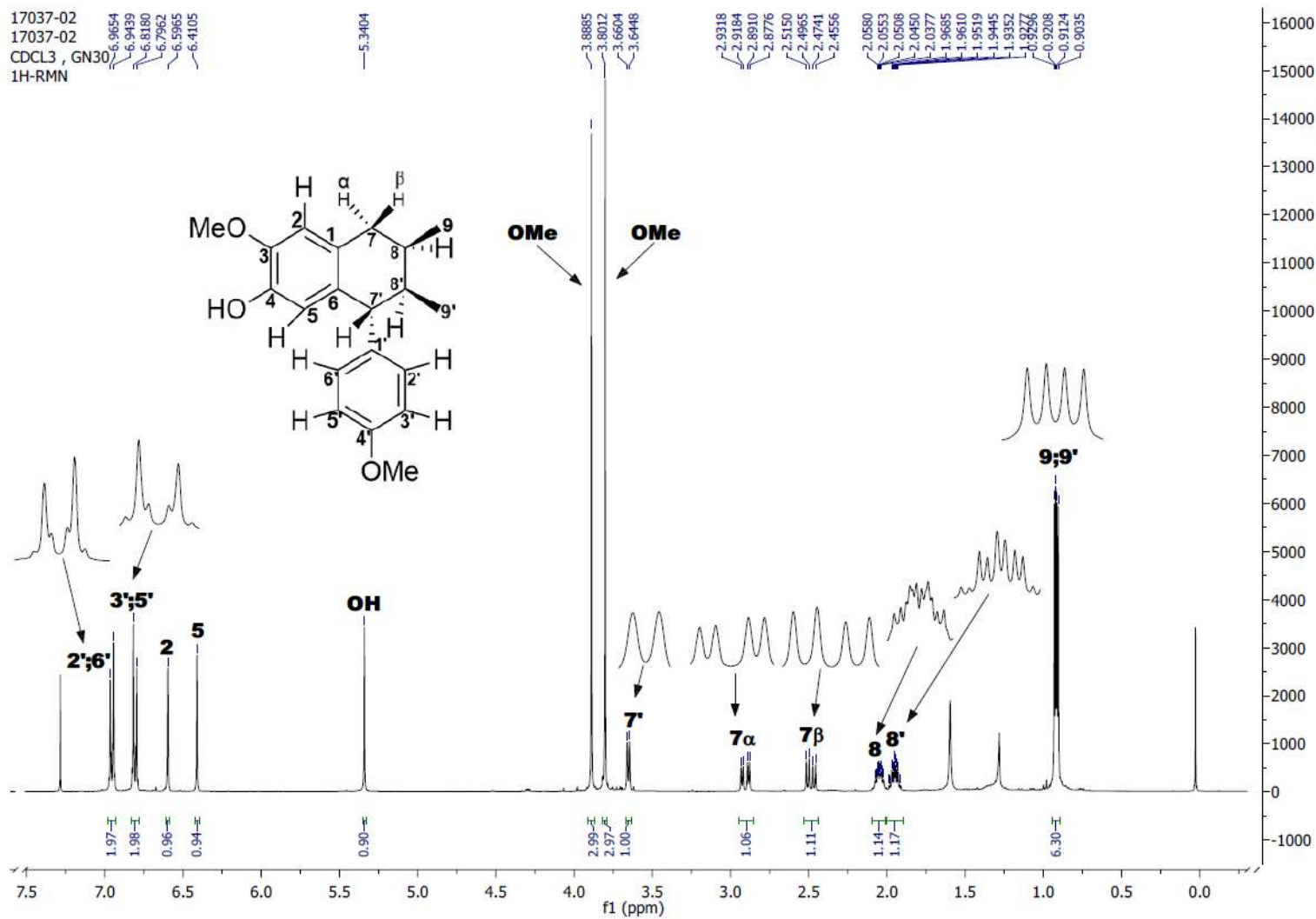


Figura 15. Espectro RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano

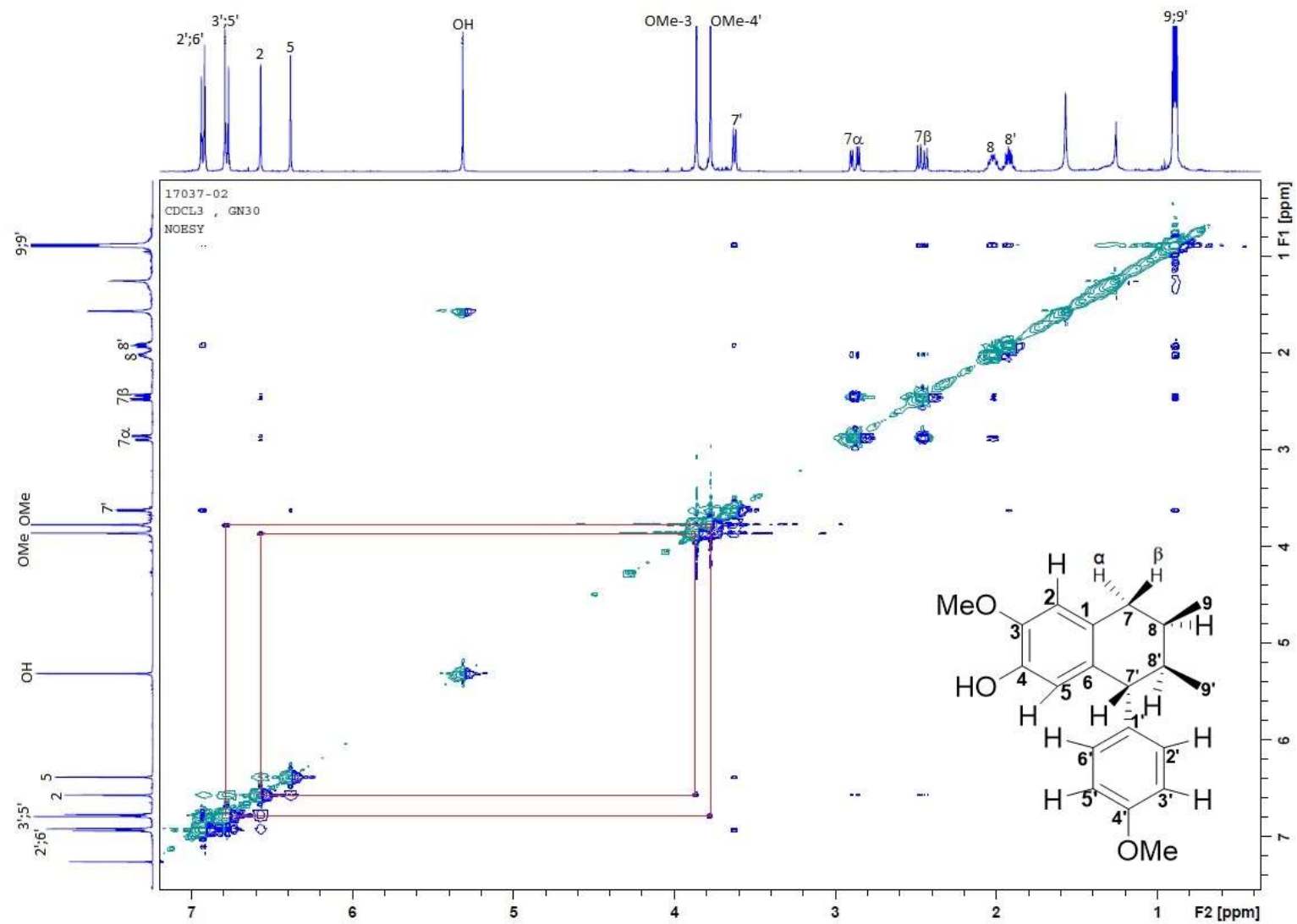


Figura 17. Espectro NOESY (400 MHz, CDCl_3) de GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclogignano

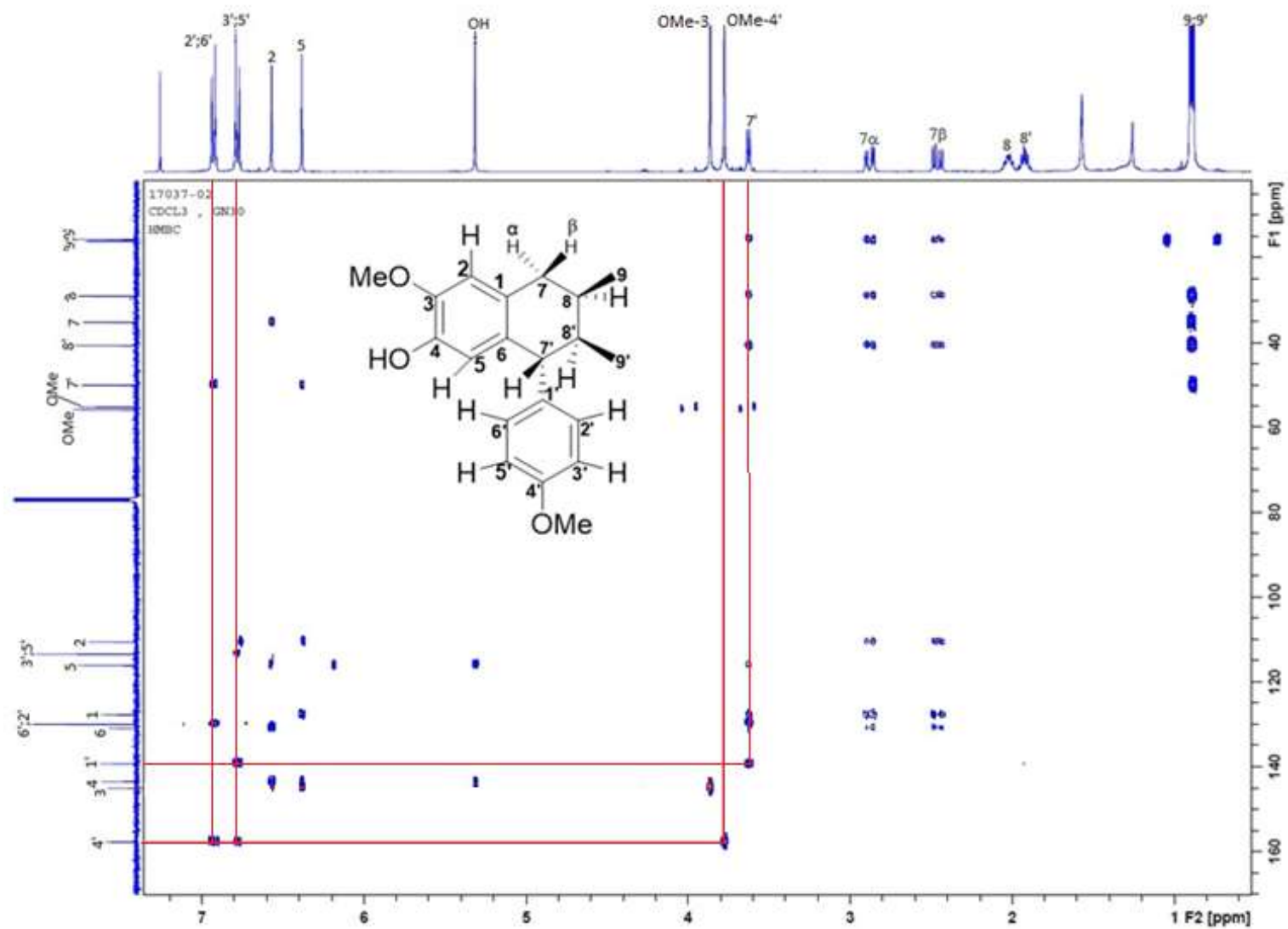


Figura 18. Espectro RMN HMBC (400 MHz, CDCl₃) de GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclogignano

5.1.3. Rendimiento, propiedades físicas y espectroscópicas de GN31: 4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-6,7'-ciclolignano

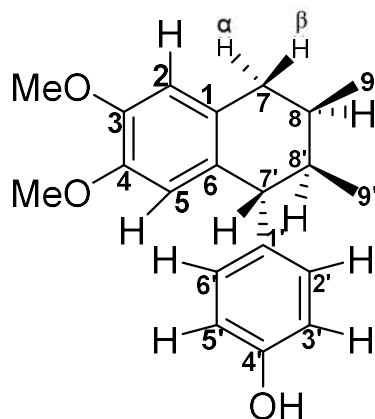


Figura 19. GN31: 4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-6,7'-ciclolignano

El compuesto se obtuvo como agujas cristalinas blancas (4.2 mg; 8.2 %), soluble en CHCl_3 y acetona, pf: 140-143 °C, $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_3$, PM: 312.40 g/mol. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.92 (d, $J = 6.68$ Hz, 3H, H-9'), 0.93 (d, $J = 6.76$ Hz, 3H, H-9), 1.92 (m, 1H, H-8'), 2.04 (m, 1H, H-8), 2.47 (dd, $J = 16.52, 8.26$ Hz, 1H, H-7 β), 2.86 (dd, $J = 16.52, 5.4$ Hz, 1H, H-7 α), 3.68 (s, 3H, OMe-4), 3.7 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, H-7'), 3.88 (s, 1H, OMe-3), 4.74 (s, 1H, OH-4'), 6.34 (s, 1H, H-5), 6.61 (s, 1H, H-2), 6.73 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.89 (d, $J = 8.36$ Hz, 2H, H-2', H-6'). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 15.22 (C9), 16.67 (C9'), 28.3 (C8), 34.64 (C7), 40.93 (C8'), 50.53 (C7'), 55.74 (OMe-3), 55.77 (OMe-4), 111.20 (C2), 113.30 (C5), 114.79 (C3', C5'), 128.52 (C1), 129.59 (C6), 130.14 (C2', C6'), 139.59 (C1'), 147.17 (C4), 147.24 (C3), 153.55 (C4').

5.1.3.1. Elucidación estructural de GN31: 4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-6,7'-ciclolignano

La caracterización estructural del derivado GN31: 4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-6,7'-ciclolignano se realizó con base a los espectros de RMN de una y dos dimensiones. Los espectros del derivado fueron muy parecidos a la del producto natural 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano.

Para el derivado GN31, la señal del espectro de RMN ^1H (figura 20) que confirmó la metilación fue el singulete a 3.88 ppm (s, 3H, OMe-4), en cuanto al espectro de RMN ^{13}C (figura 21) se observó una señal a 55.77 ppm (C-OMe-3;4). El espectro NOESY (figura 22) mostró la correlación espacial entre los protones de uno de los metoxilos con H-5, y la correlación del otro metoxilo con H-2, lo que indica que las posiciones 3 y 4 se encuentran sustituidas por metoxilos. Para complementar la información obtenida en el espectro NOESY, se observó en el espectro de HMBC (figura 23) la correlación de los carbonos 3 y 4 con sus respectivos metoxilos y con los hidrógenos H-2 y H-5, por lo que la estructura propuesta corresponde con lo ilustrado en la figura 19.

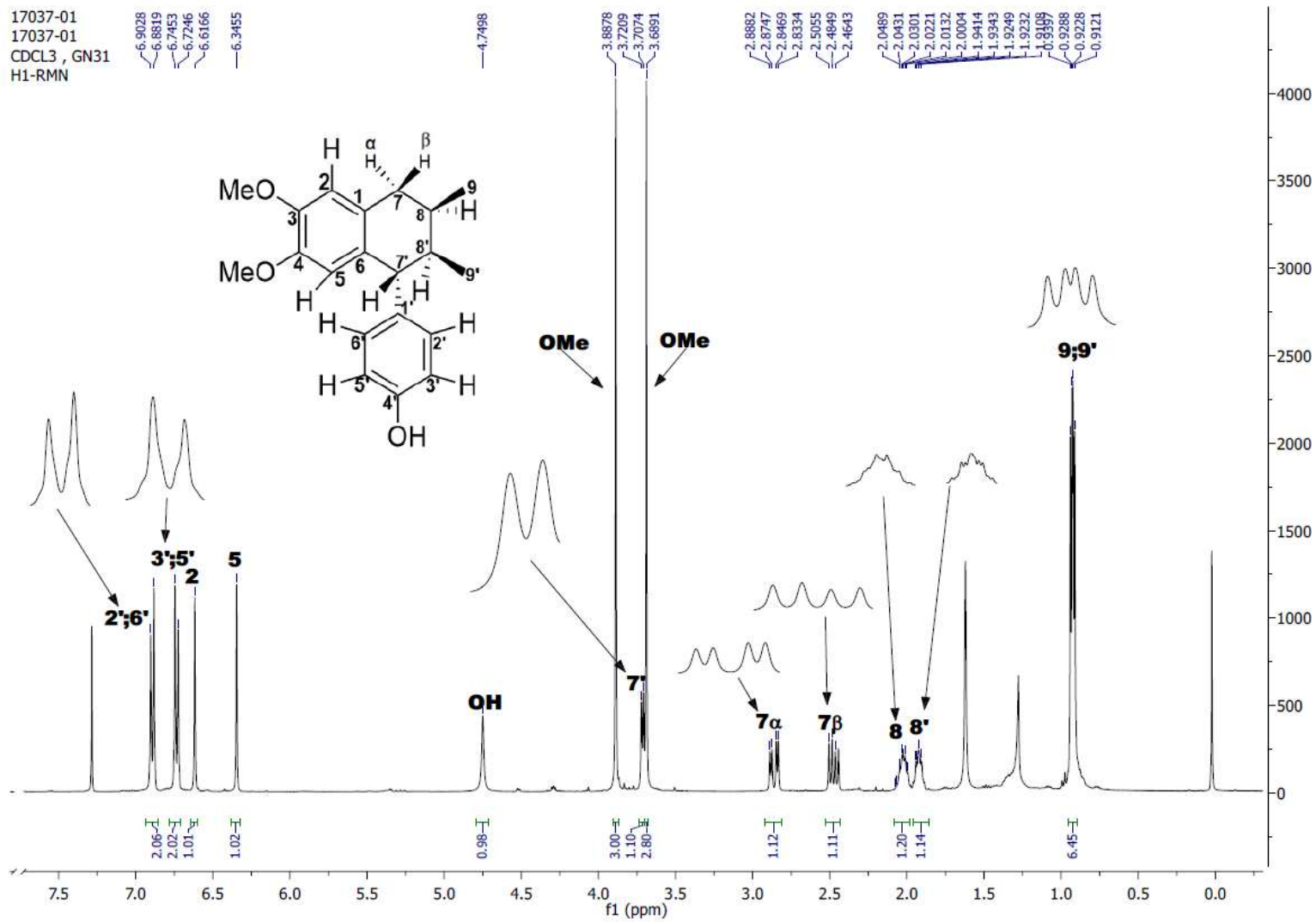


Figura 20. Espectro RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de GN31: 4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-6,7'-ciclolognano

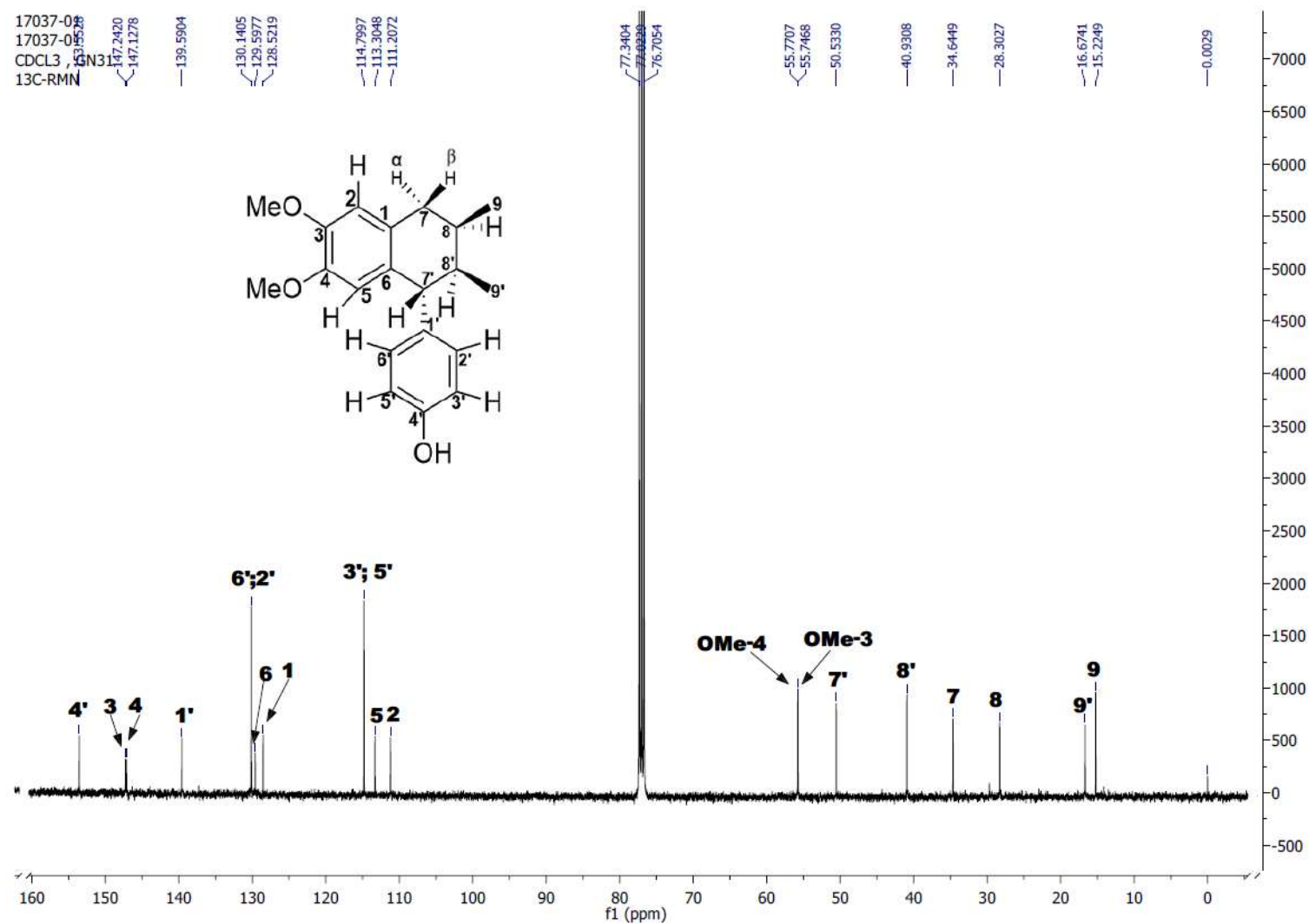


Figura 21. Espectro RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) de GN31: 4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-6,7'-cicolignano

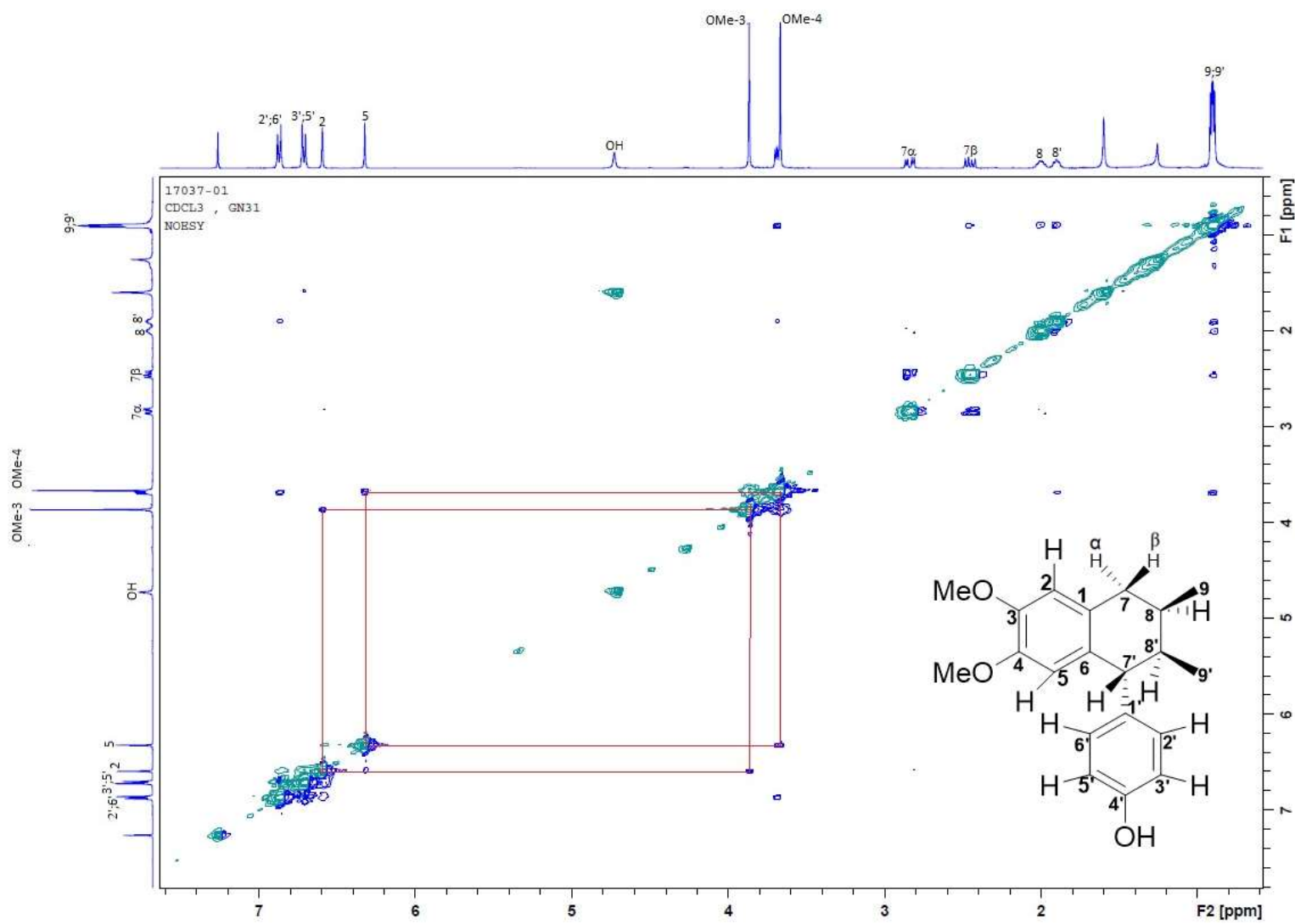


Figura 22. Espectro NOESY (400 MHz, CDCl₃) de GN31: 4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-6,7'-ciclolignano

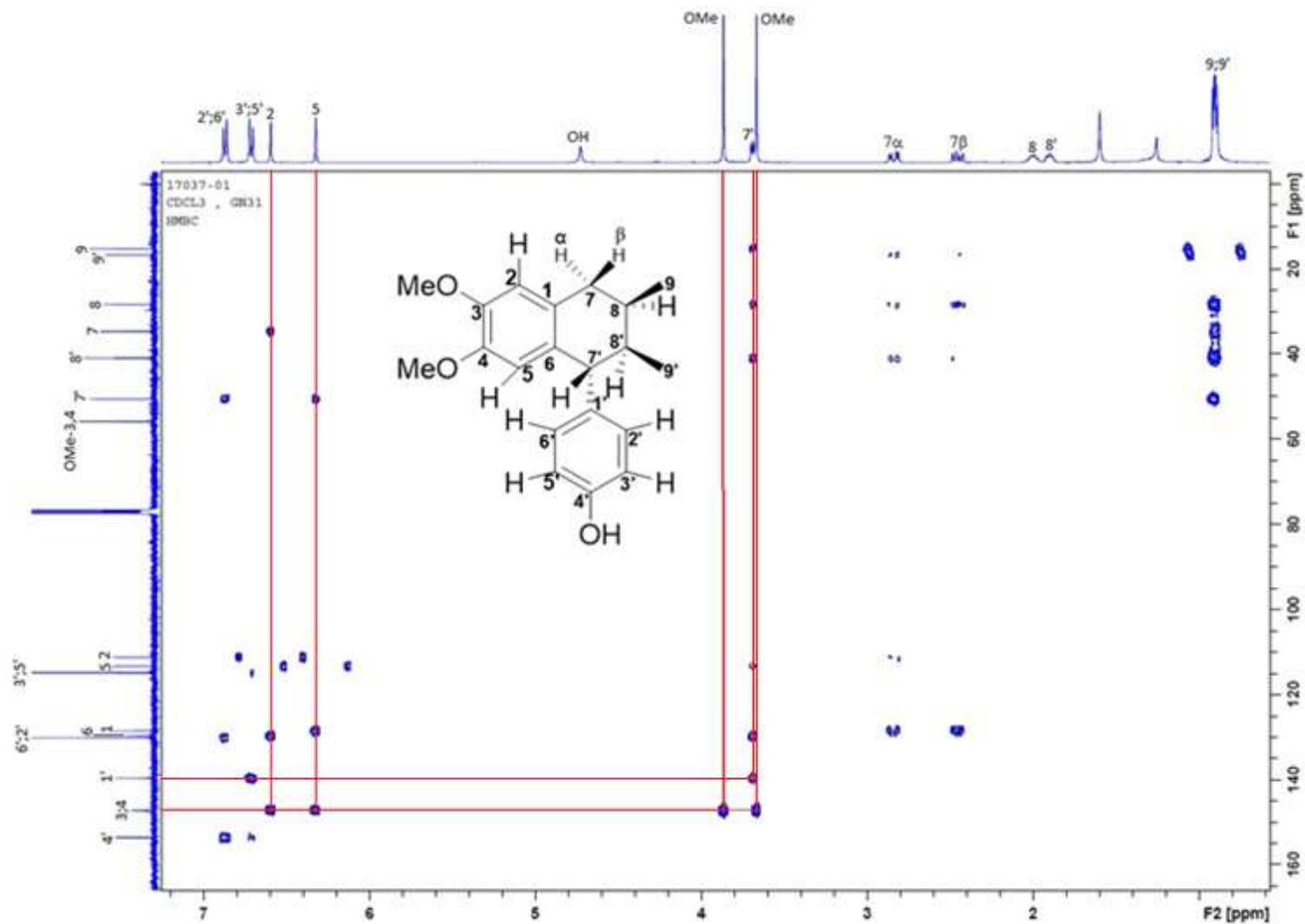


Figura 23. Espectro HMBC (400 MHz, CDCl₃) de GN31: 4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-6,7'-ciclolignano

5.1.4. Propiedades físicas y espectroscópicas de Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano

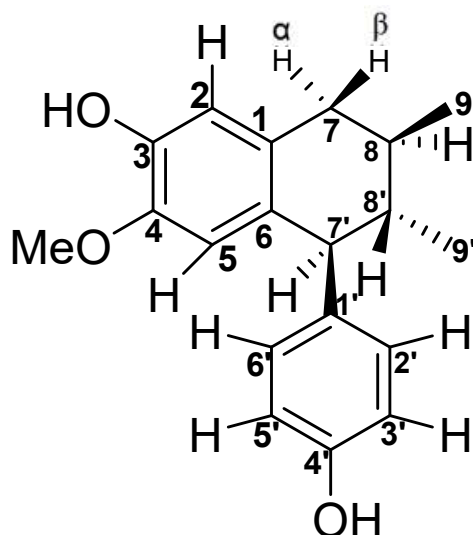


Figura 24. Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano

El compuesto se obtuvo como resina amarilla oscura (20.5 mg; 0.00205 %), soluble en CHCl_3 y acetona, $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3$, PM: 298.38 g/mol. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.9 ppm (d, $J=6.56$ Hz, 3H, H-9'), 0.92 ppm (d, $J=6.68$ Hz, 3H, H-9), 1.90 ppm (m, 1H, H-8'), 2.0 ppm (m, 1H, H-8), 2.44 ppm (dd, $J=16.6$; 8.28 Hz, 1H, H-7 β), 2.82 ppm (dd, $J=16.44$, 5.34 Hz, 1H, H-7 α), 3.68 ppm (d, $J=12.56$ Hz, 1H, H-7'), 3.7 ppm (s, 3H, OMe-4), 4.73 ppm (s, 1H, OH), 5.47 ppm (s, 1H, OH), 6.32 ppm (s, 1H, H-5), 6.68 ppm (s, 1H, H-2), 6.74 ppm (d, $J=8.56$ Hz, 1H, H-3', H-5'), 6.9 ppm (d, $J=8.48$ Hz, 1H, H-2', H-6'). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 15.23 (C9), 16.61 (C9'), 28.21 (C8), 34.4 (C7), 40.92 (C8'), 50.63 (C7'), 55.85 (OMe-4), 112.58 (C5), 114.06 (C2), 114.79 (C3', C5'), 129.13 (C1), 129.41 (C6), 130.13 (C2', C6'), 139.78 (C1'), 143.74 (C4), 144.95 (C3), 153.52 (C4').

5.1.4.1. Elucidación estructural de Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano

El espectro de RMN ^1H (figura 25) de Lt18 se observaron dos dobletes que convergen, uno a 0.9 ppm (d, $J=6.56$ Hz, 3H, H-9') y el otro a 0.92 ppm (d, $J=6.68$ Hz, 3H, H-9) y corresponden a dos metilos unidos a un grupo metino, después se observan dos multipletes a 1.90 ppm (m, 1H, H-8') y 2.0 ppm (m, 1H, H-8) que corresponden a dos protones de metinos, consecutivamente se observan dos doblete de dobletes a 2.44 ppm (dd, $J=16.6$; 8.28 Hz, 1H, H-7 β) y 2.82 ppm (dd, $J=16.44$, 5.34 Hz, 1H, H-7 α) que corresponden a dos protones de metileno, y que muestran su multiplicidad debido a acoplamiento geminal mutuo y vecinal con su protón vecino, después a 3.68 ppm (d, $J=12.56$ Hz, 1H, H-7') se observa un doblete que corresponde al metino que cicliza con la posición 6 del anillo aromático, también se observa un singulete de metoxilo 3.7 ppm (s, 3H, OMe-4), dos singuletes de hidroxilos fenólicos a 4.73 ppm (s, 1H, OH) y 5.47 ppm (s, 1H, OH), enseguida se observan dos singuletes de protones aromáticos en disposición para de un anillo tetrasustituido a 6.32 ppm (s, 1H, H-5) y 6.68 ppm (s, 1H, H-2), y finalmente se tienen dos dobletes que conforman un sistema A_2B_2 a 6.74 ppm (d, $J=8.56$ Hz, 1H, H-3', H-5') y 6.9 ppm (d, $J=8.48$ Hz, 1H, H-2', H-6') que corresponden a los protones aromáticos de un anillo aromático paradisustituido. Hasta este punto, el compuesto Lt18 parece ser el lignano 3'-demetoxi-isoguaiacina reportado por Gnabre *et al.*, 1995⁶³ y Lambert *et al.*, 2005⁶⁶; sin embargo, el doblete a 3.68 ppm (d, $J=12.56$ Hz, 1H, H-7') es distinto al del compuesto reportado por los autores anteriores, tanto en su

desplazamiento químico como en su constante de acoplamiento (tabla 11). Lo que sugiere una disposición hacia adelante del anillo aromático.

Tabla 11

Constantes espectroscópicas de RMN ¹H de 3'-demetoxi-isoguaiacina y

Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano

	3-demetoxi-isoguaiacina (RMN 500 MHz, CDCl ₃)	3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano (RMN 400 MHz, CDCl ₃)
Posición	$\delta^1\text{H}$ (J=Hz)	$\delta^1\text{H}$ (J=Hz)
2	6.57, s	6.68, s
5	6.36, s	6.32, s
7 α	2.87, dd, (16.2; 4.7)	2.82, dd, (16.44; 5.34)
7 β	2.45, dd, (16.2; 7.2)	2.44, dd, (16.6; 8.28)
8	2.02, m	2.0, m
Me-9	0.89, d, (6.9)	0.92, d, (6.68)
2'	6.87, d, (8.5)	6.9, d, (8.48)
3'	6.70, d, (8.5)	6.74, d, (8.56)
5'	6.70, d, (8.5)	6.74, d, (8.56)
6'	6.87, d, (8.5)	6.9, d, (8.48)
7'	3.61, d, (6.2)	3.68, d, (12.56)
8'	1.9, m	1.9, m
Me-9'	0.88, d, (6.9)	0.9, d, (6.56)
OMe-4	3.7, s	3.7, s
OH-3	4.78, s	4.73, s
OH-4'	5.35, s	5.47, s

En el espectro de RMN ¹³C (figura 26) se observaron 6 carbonos alifáticos a 15.23 ppm (C9), 16.61 ppm (C9'), 28.21 ppm (C8), 34.4 ppm (C7), 40.92 ppm (C8') y 50.63 ppm (C7'); una señal de un carbono de metoxilo a 55.85 ppm (OMe-4); además de 12 carbonos aromáticos: 112.58 ppm (C5), 114.06 ppm (C2), 114.79 ppm (C3', C5'), 129.13 ppm (C1), 129.41 ppm (C6), 130.13 ppm (C2', C6'), 139.78 ppm (C1'), 143.74 ppm (C4), 144.95 ppm (C3), 153.52 ppm (C4').

Un análisis más exhaustivo de este cicloligano se realizó mediante RMN en dos dimensiones. En el espectro COSY (figura 27) se observó que los protones de los carbonos alifáticos correlacionan intensamente entre ellos, así del mismo modo los carbonos aromáticos del anillo *para*-disustituido. Las correlaciones COSY clave para la caracterización de Lt18 fueron: H-7 α ; H-7 β /H-8, H-8/H-8'; H-9, H-8'/H-7'; H-9', H-2'/H-3' y H-5'/H-6', lo que es coherente con la estructura propuesta en la figura 24. El espectro HSQC (figura 28) muestra que cada hidrógeno correlaciona con su respectivo carbono al cual está unido. También se pudo confirmar que los carbonos cuaternarios asignados en el espectro de RMN ^{13}C (figura 26), fueron asignados de forma correcta, debido a que no correlacionan con ningún protón. El espectro NOESY (figura 29) mostró una correlación del metoxilo con H-5, lo que sugiere que este sustituyente se encuentra en la posición 4, además de una notoria correlación entre el H-5 con H-6', lo que podría ser indicativo de que dichos protones se encuentran cercanos espacialmente; y esto sucede debido a que el anillo aromático *para*-disustituido en la molécula se encuentra orientado hacia el frente del plano, lo que se confirma al observarse la correlación espacial entre H-7' y H-9', teniendo a dichos protones orientados hacia atrás del plano, lo que se corrobora al analizar la constante de acoplamiento de 12.6 Hz del doblete que corresponde a H-7', este valor sugiere que el protón se encuentra muy alejado de H-8' que está en disposición trans axial (ángulo diedro: 169.5°) hacia el frente del plano, y dicha condición solo es posible si H-7' se encuentra en disposición axial pero hacia el atrás del plano, y en consecuencia el anillo aromático *para*-disustituido de Lt18 se orienta hacia el frente del plano. Tomando en cuenta que la estructura

reportada por Gnabre *et al.*, 1995⁶³ y Lambert *et al.*, 2005⁶⁶ de 3'-demetoxi-isoguaiacina tiene una estereoquímica distinta a Lt18. Por último, el espectro de HMBC (figura 30) aportó las bases para indicar las posiciones de los carbonos cuaternarios en la molécula, al observarse su conectividad a 3 o 2 enlaces de distancia con los C-H: C-1/H-5, C-3/H-5, C-4/H-2, C-6/H-2, C-1'/H-3'; H-5', H-4'/H-2'; H-6'. En la tabla 12 se resumen las constantes espectroscópicas clave para la caracterización precisa del compuesto Lt18 como 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano que resultó ser un nuevo producto natural.

TABLA 12

Constantes espectroscópicas de Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano

Posición	δ_H	δ_C	HMBC	NOESY
1	-	129.13	H-5	
2	6.68 (s, 1H)	114.06		
3	-	144.95	H-5	
4	-	143.74	H-2	
5	6.32 (s, 1H)	112.58		H-2', H-6'
6	-	129.41	H-2	
7 α	2.82 (dd, $J=16.44, 5.34$ Hz, 1H)	34.4		
7 β	2.44 (dd, $J=16.6; 8.28$ Hz, 1H)	34.4		Me-9
8	2.0 (m, 1H)	28.21		
9	0.92 (d, $J=6.68$ Hz, 3H)	15.23		H-7 β
1'	-	139.78	H-3', H-5'	
2'	6.9 (d, $J= 8.48$ Hz, 1H)	130.13		
3'	6.74 (d, $J=8.56$ Hz, 1H)	114.79		
4'	-	153.52	H-2', H-6'	
5'	6.74 (d, $J=8.56$ Hz, 1H)	114.79		
6'	6.9 (d, $J= 8.48$ Hz, 1H)	130.13		
7'	3.68 (d, $J=12.56$ Hz, 1H)	50.63		Me-9'
8'	1.90 (m, 1H)	40.92		
9'	0.9 (d, $J=6.56$ Hz, 3H)	16.61		
OH	4.73 (s, 1H)	-		
OH	5.47 (s, 1H)	-		
OMe-4	3.7 (s, 3H)	55.85		H-5

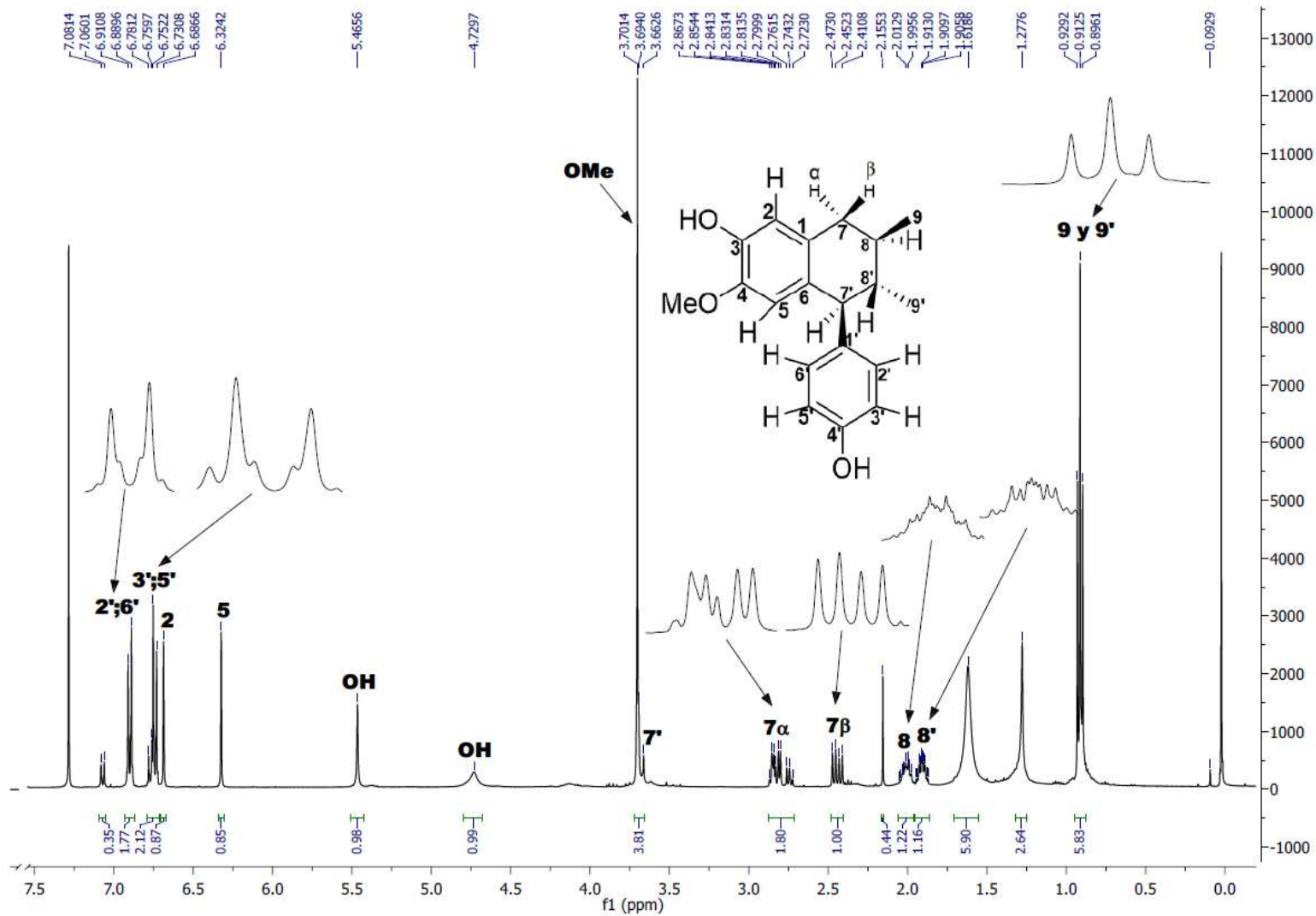


Figura 25. Espectro RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano

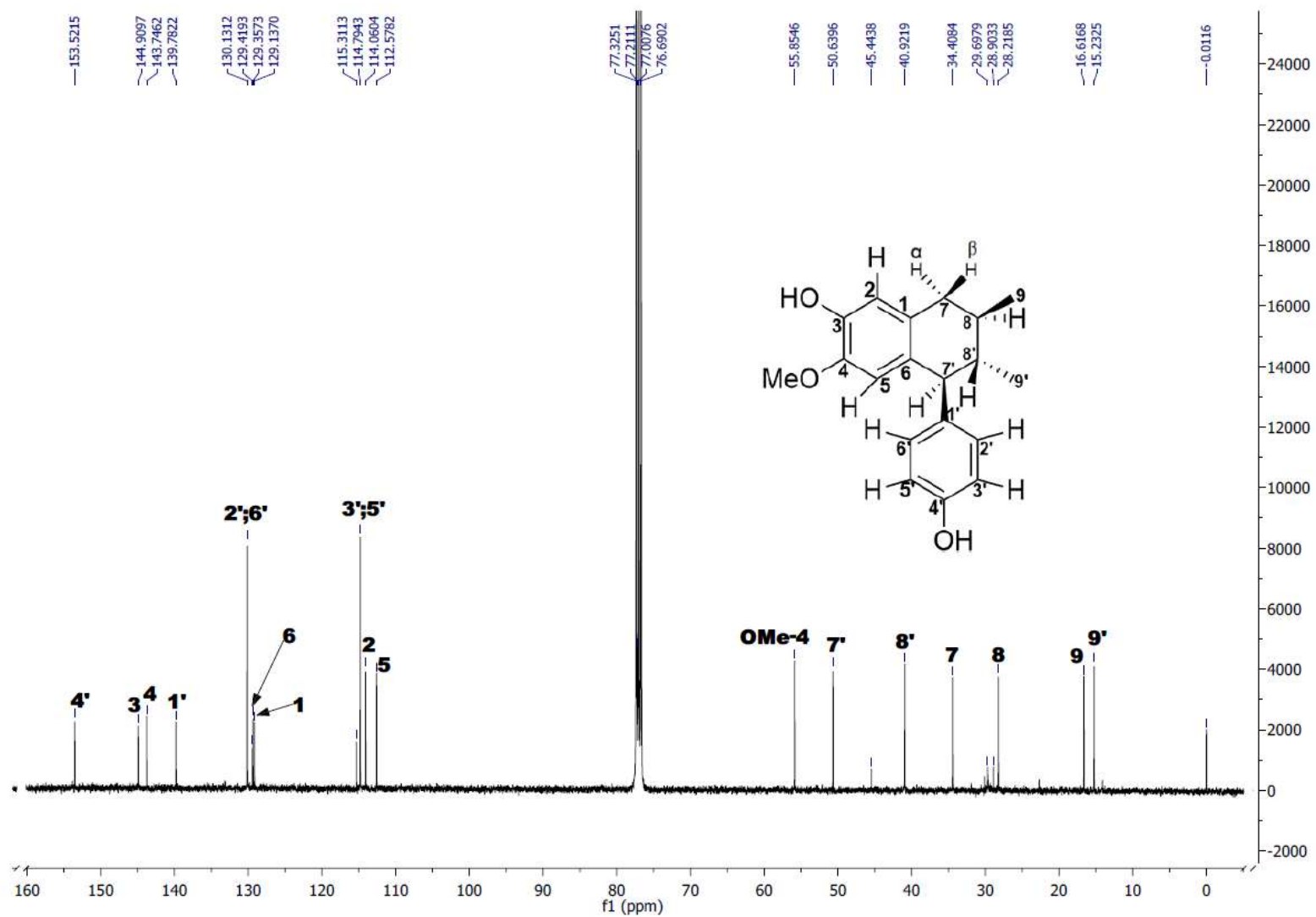


Figura 26. Espectro RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclogignano

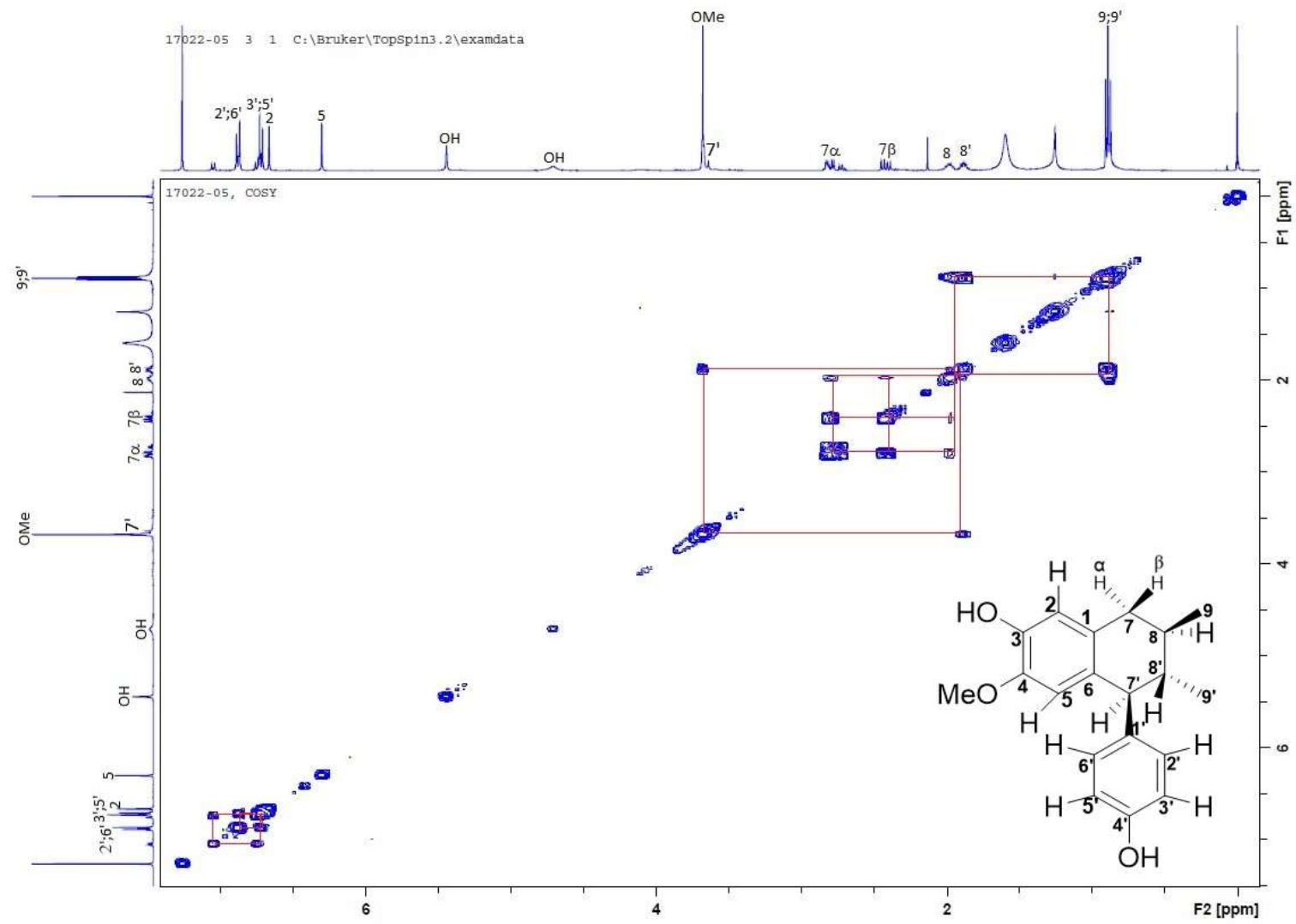


Figura 27. Espectro COSY (400 MHz, CDCl₃) de Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano

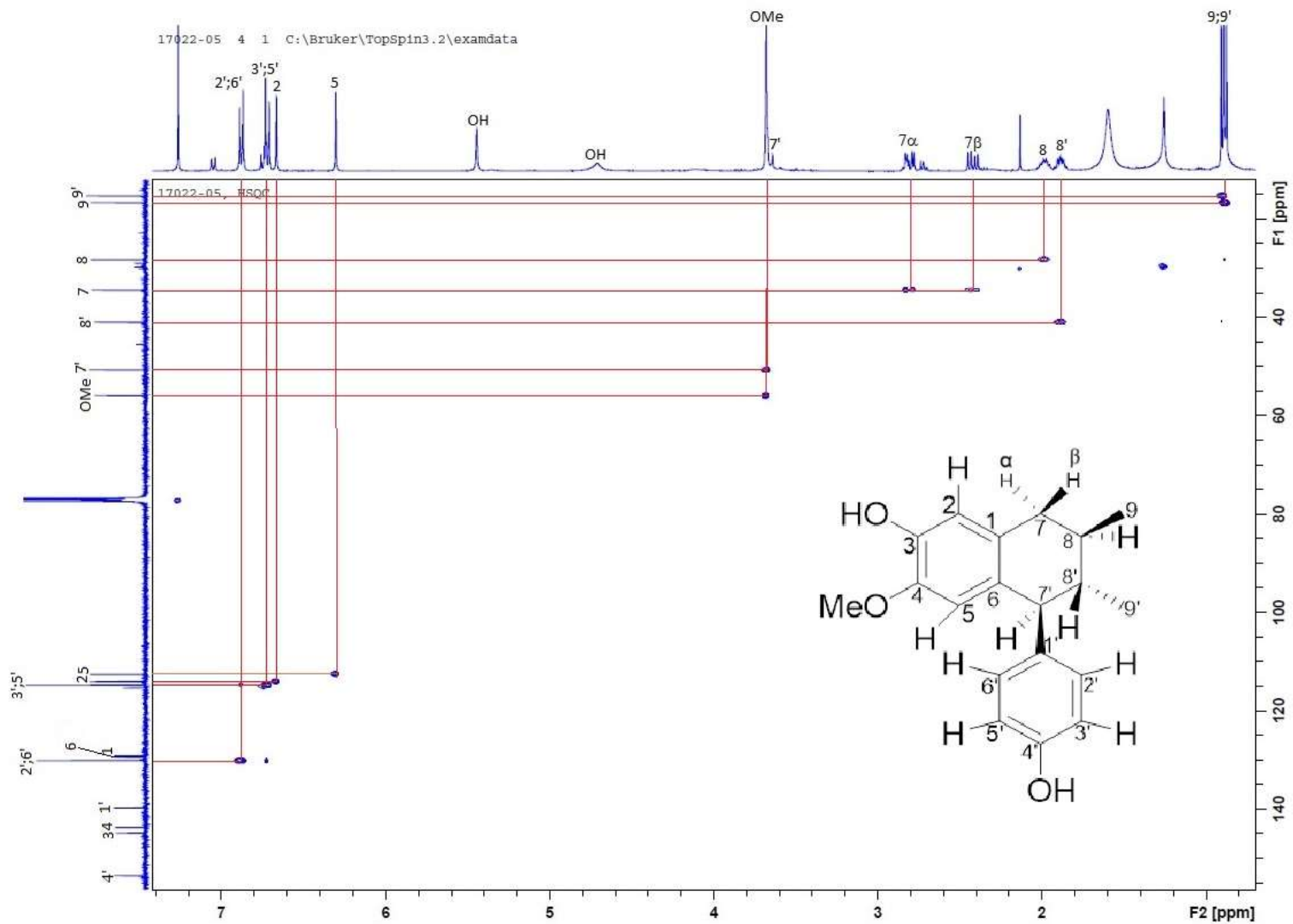


Figura 28. Espectro HSQC (400 MHz, CDCl₃) de Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolognano

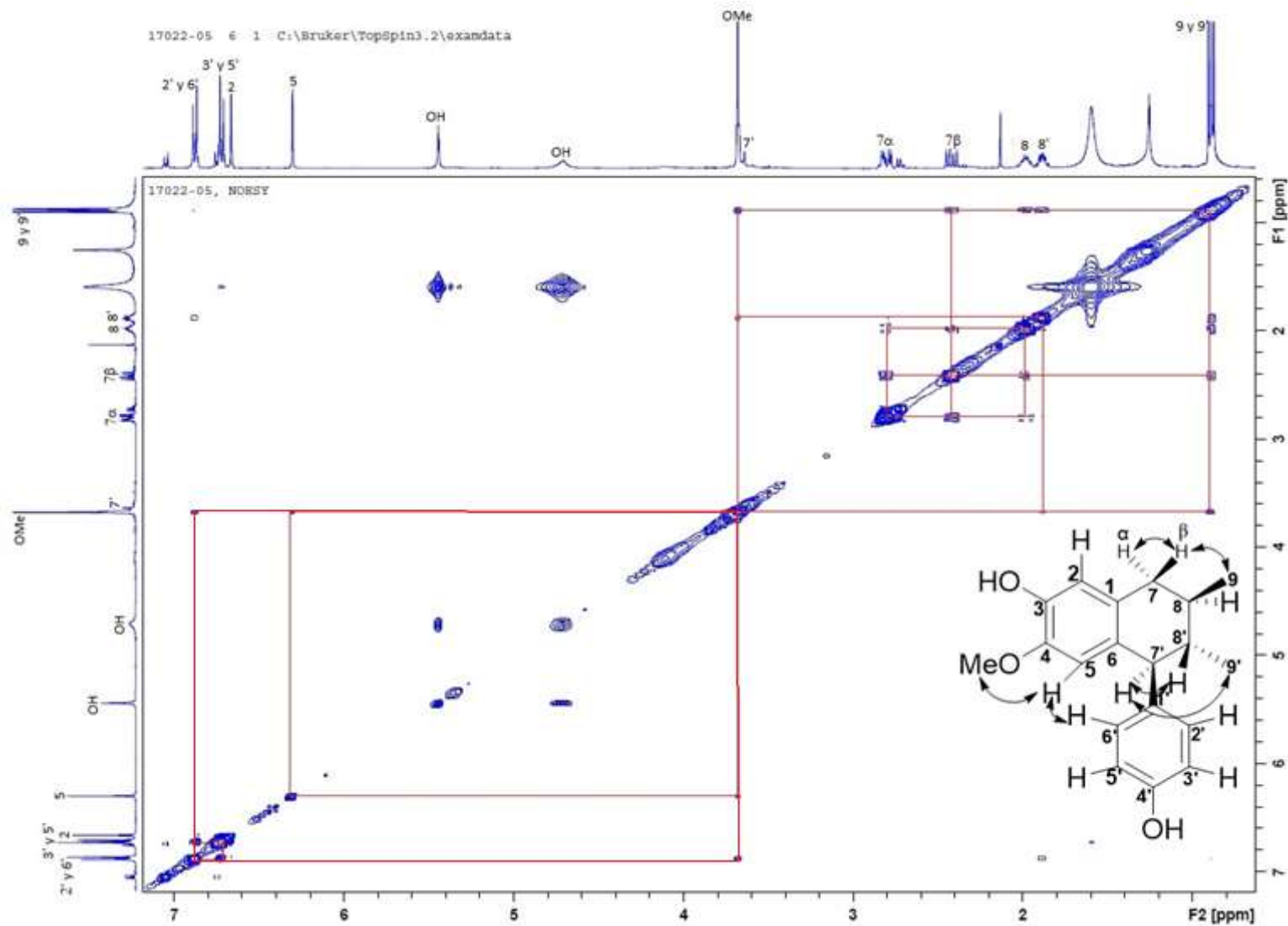


Figura 29. Espectro NOESY (400 MHz, CDCl_3) de Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano

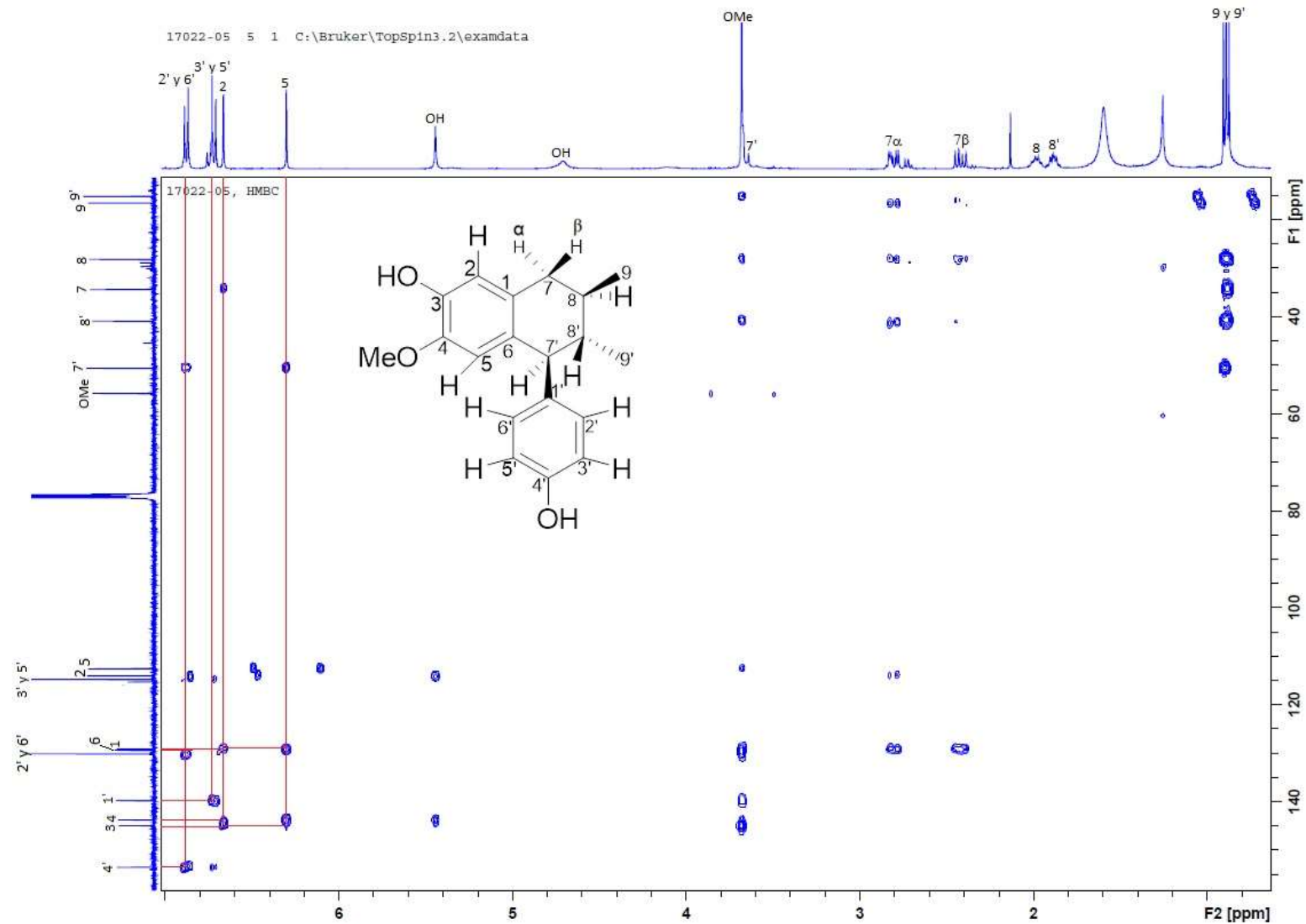


Figura 30. Espectro HMBC (400 MHz, CDCl_3) de Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano

5.1.5. Propiedades físicas y espectroscópicas de Lt21: 3'-demetoxi-isoguaiacina

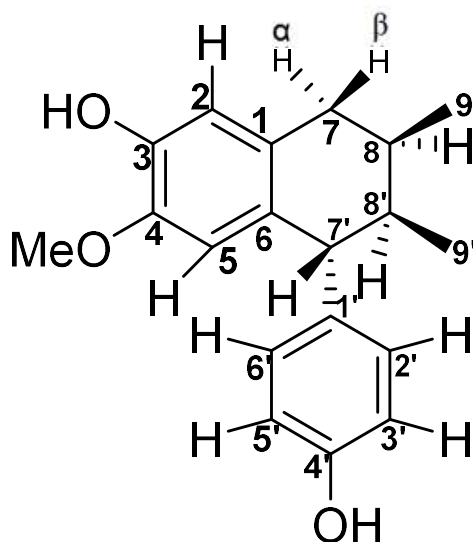


Figura 31. Lt21: 3'-demetoxi-isoguaiacina

El compuesto se obtuvo como cristales blancos con forma de aguja (7 mg; 0.0007 %), soluble en CHCl_3 , pf: 141-143 °C, $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3$, PM: 298.38 g/mol. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.9 ppm (d, $J=6.64$ Hz, 3H, H-9'), 0.92 ppm (d, $J=6.68$ Hz, 3H, H-9), 1.90 ppm (m, 1H, H-8'), 2.01 ppm (m, 1H, H-8), 2.44 ppm (dd, $J=16.66$; 8.34 Hz, 1H, H-7 β), 2.82 ppm (dd, $J=16.52$, 5.36 Hz, 1H, H-7 α), 3.69 ppm (d, $J=2.68$ Hz, 1H, H-7'), 3.7 ppm (s, 3H, OMe-4), 4.73 ppm (s, 1H, OH), 5.47 ppm (s, 1H, OH), 6.32 ppm (s, 1H, H-5), 6.68 ppm (s, 1H, H-2), 6.74 ppm (d, $J=8.6$ Hz, 1H, H-3', H-5'), 6.9 ppm (d, $J=8.44$ Hz, 1H, H-2', H-6'). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 15.23 (C9), 16.61 (C9'), 28.21 (C8), 34.4 (C7), 40.92 (C8'), 50.64 (C7'), 55.85 (OMe-4), 112.58 (C5), 114.06 (C2), 114.79 (C3', C5'), 129.13 (C1), 129.36 (C6), 130.13 (C2', C6'), 139.79 (C1'), 143.75 (C4), 144.91 (C3), 153.51 (C4').

5.1.5.1. Elucidación estructural de Lt21: 3'-demetoxi-isoguaiacina

El espectro de RMN ^1H (figura 32) de Lt21 mostró dos dobletes que convergen, uno a 0.9 ppm (d, $J=6.56$ Hz, 3H, H-9') y el otro a 0.92 ppm (d, $J=6.68$ Hz, 3H, H-9) y corresponden a dos metilos unidos a un grupo metino, después se observan dos multipletes a 1.90 ppm (m, 1H, H-8') y 2.0 ppm (m, 1H, H-8) que corresponden a dos protones de metinos, consecutivamente se observan dos doblete de dobletes a 2.44 ppm (dd, $J=16.6; 8.28$ Hz, 1H, H-7 β) y 2.82 ppm (dd, $J=16.44, 5.34$ Hz, 1H, H-7 α) que corresponden a dos protones de metileno, y que muestran su multiplicidad debido a acoplamiento geminal mutuo y vecinal con su protón vecino, después a 3.69 ppm (d, $J=5.24$ Hz, 1H, H-7') se observa un doblete que corresponde al metino que cicliza con la posición 6 del anillo aromático, también se observa un singulete de metoxilo 3.7 ppm (s, 3H, OMe-4), dos singuletes de hidroxilos fenólicos a 4.73 ppm (s, 1H, OH) y 5.47 ppm (s, 1H, OH), enseguida se observan dos singuletes de protones aromáticos en disposición para de un anillo tetrasustituido a 6.32 ppm (s, 1H, H-5) y 6.68 ppm (s, 1H, H-2) y finalmente se tienen dos dobletes que conforman un sistema A_2B_2 a 6.74 ppm (d, $J=8.6$ Hz, 1H, H-3', H-5') y 6.9 ppm (d, $J=8.44$ Hz, 1H, H-2', H-6') que corresponden a los protones aromáticos de un anillo aromático paradisustituido.

En el espectro de RMN ^{13}C (figura 33) se observaron 6 carbonos alifáticos a 15.23 ppm (C9), 16.61 ppm (C9'), 28.21 ppm (C8), 34.4 ppm (C7), 40.92 ppm (C8') y 50.64 ppm (C7'); una señal de un carbono de metoxilo a 55.85 ppm (OMe-

4); además de 12 carbonos aromáticos: 112.58 ppm (C5), 114.06 ppm (C2), 114.79 ppm (C3', C5'), 129.13 ppm (C1), 129.36 ppm (C6), 130.13 ppm (C2', C6'), 139.79 ppm (C1'), 143.75 ppm (C4), 144.91 ppm (C3), 153.51 ppm (C4').

En el espectro COSY (figura 34) se observó que los protones de los carbonos alifáticos correlacionan intensamente entre ellos, así del mismo modo los carbonos aromáticos del anillo *para*-disustituido. Las correlaciones COSY clave para la caracterización de Lt21 fueron: H-7 α ; H-7 β /H-8, H-8/H-8'; H-9, H-8'/H-7'; H-9', H-2'/H-3' y H-5'/H-6', lo que es coherente con la estructura propuesta en la figura 31. El espectro HSQC (figura 35) muestra que cada hidrogeno correlaciona con su respectivo carbono al cual está unido. También se pudo confirmar que los carbonos cuaternarios asignados en el espectro de RMN ¹³C (figura 33) fueron asignados de forma correcta debido a que no correlacionan con ningún protón. El espectro NOESY (figura 36) mostró la correlación intensa entre los protones del metoxilo con H-5, por lo tanto, se deduce que el metoxilo se encuentra en la posición 4, además, se observó una notoria correlación entre H-7' con los protones del metilo en la posición 9' que está orientado hacia el frente del plano, entonces H-9' y H-7' se encuentran orientados en el mismo sentido, lo que conlleva a que el anillo aromático *para*-disustituido unido a la posición 7' esté posicionado hacia atrás del plano, y la aseveración se confirma al analizar la constante de acoplamiento de 5.24 Hz del doblete que corresponde a H-7', este valor sugiere que el protón se encuentra en cercanía con H-8' que está en disposición ecuatorial hacia atrás del plano, y dicha condición solo es posible si H-7' se encuentra en disposición también ecuatorial pero hacia el frente del plano,

y se tienen como consecuencia de ello que el anillo aromático *para*-disustituido de Lt21 se oriente de forma axial hacia atrás del plano. Por último, el espectro de HMBC (figura 37) aportó las bases para indicar las posiciones de los carbonos cuaternarios en la molécula, al observarse su conectividad a 3 y 2 enlaces de distancia con los C-H: C-1/H-7', C-3/H-2; H-5, C-4/H-2; H-5, C-6/H-7', C-1'/H-3'; H-5', H-4'/H-2'; H-6'; H-3'; H-5', C-7'/H-5; H-2'; H-6'. Al comparar Lt21 con lo reportado por Gnabre *et al.*, 1995⁶³ y Lambert *et al.*, 2005⁶⁶ se dedujo que Lt21 es en efecto el ciclolignano 3'-demetoxi-isoguaiacina, que resultó ser el enantiomero del compuesto Lt18 descrito anteriormente. Se puede diferenciar el compuesto Lt18 (figura 24) de Lt21 (figura 31) por su estereoquímica, que para el caso de Lt18 el anillo aromático *para*-disustituido se encuentra orientado hacia el frente del plano, a diferencia de Lt21, que muestra el anillo aromático *para*-disustituido posicionado hacia atrás del plano.

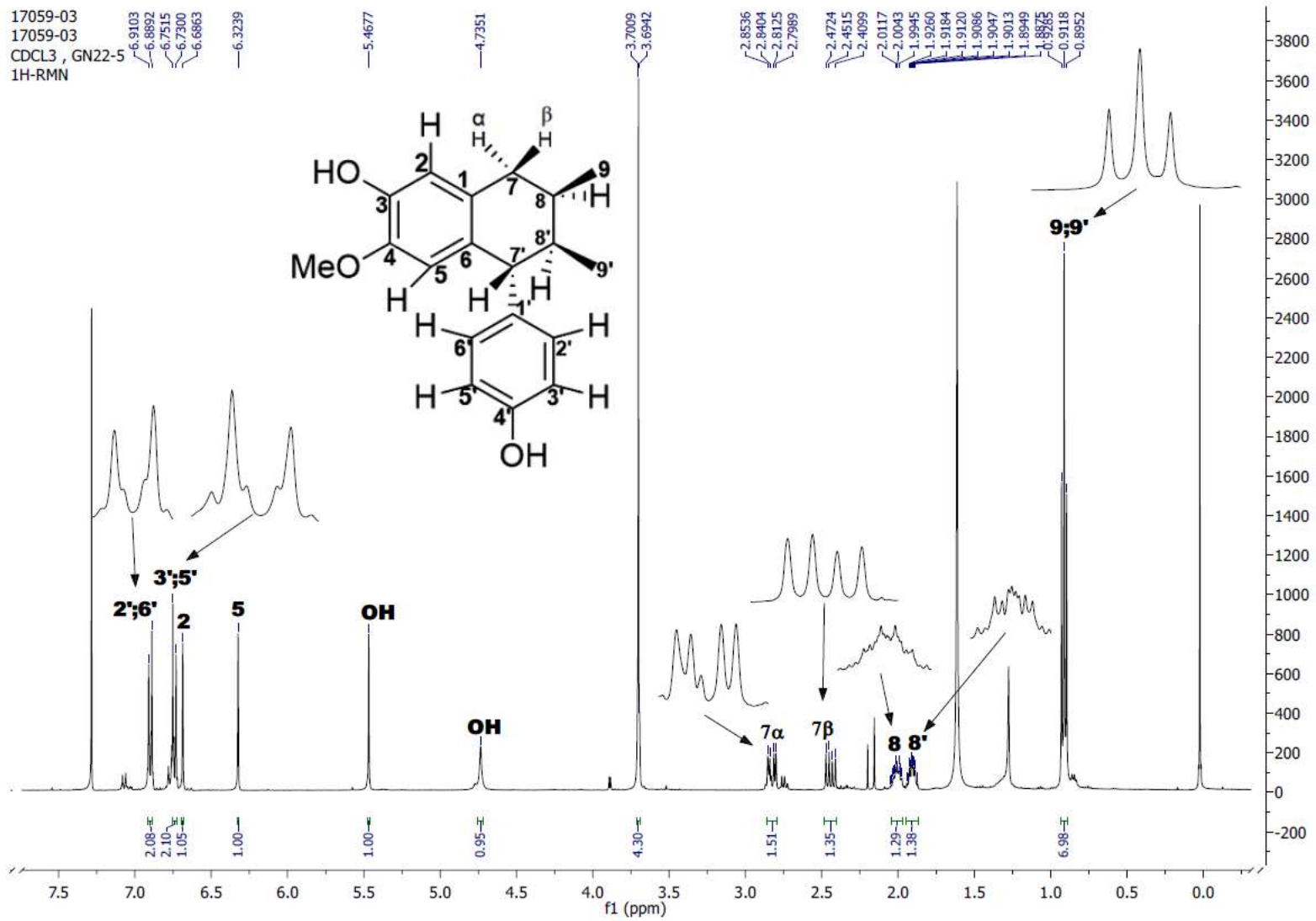


Figura 32. Espectro RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de Lt21: 3'-demetoxi-isoguaiacina

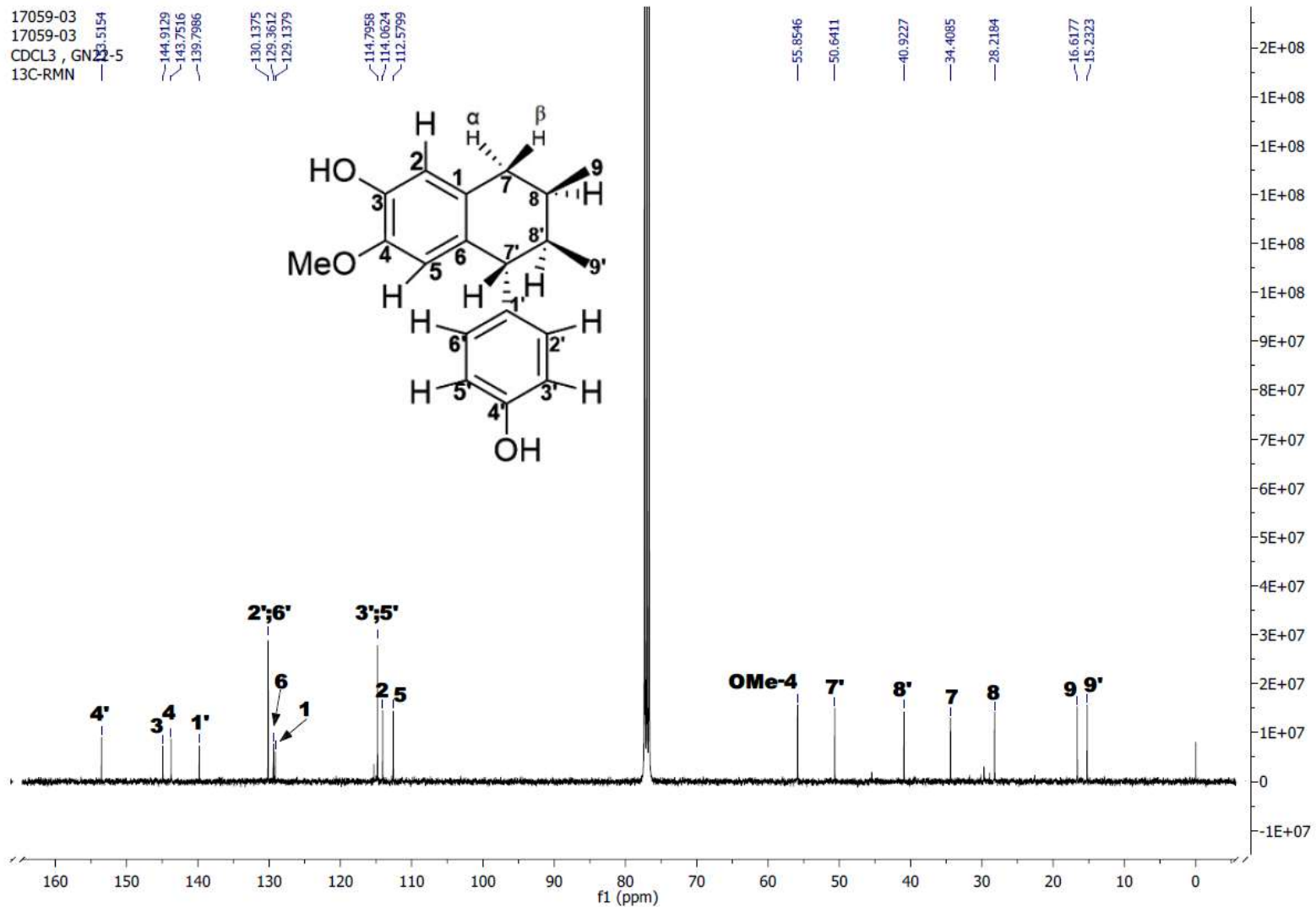


Figura 33. Espectro RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) de Lt21: 3'-demetoxi-isoguaiacina

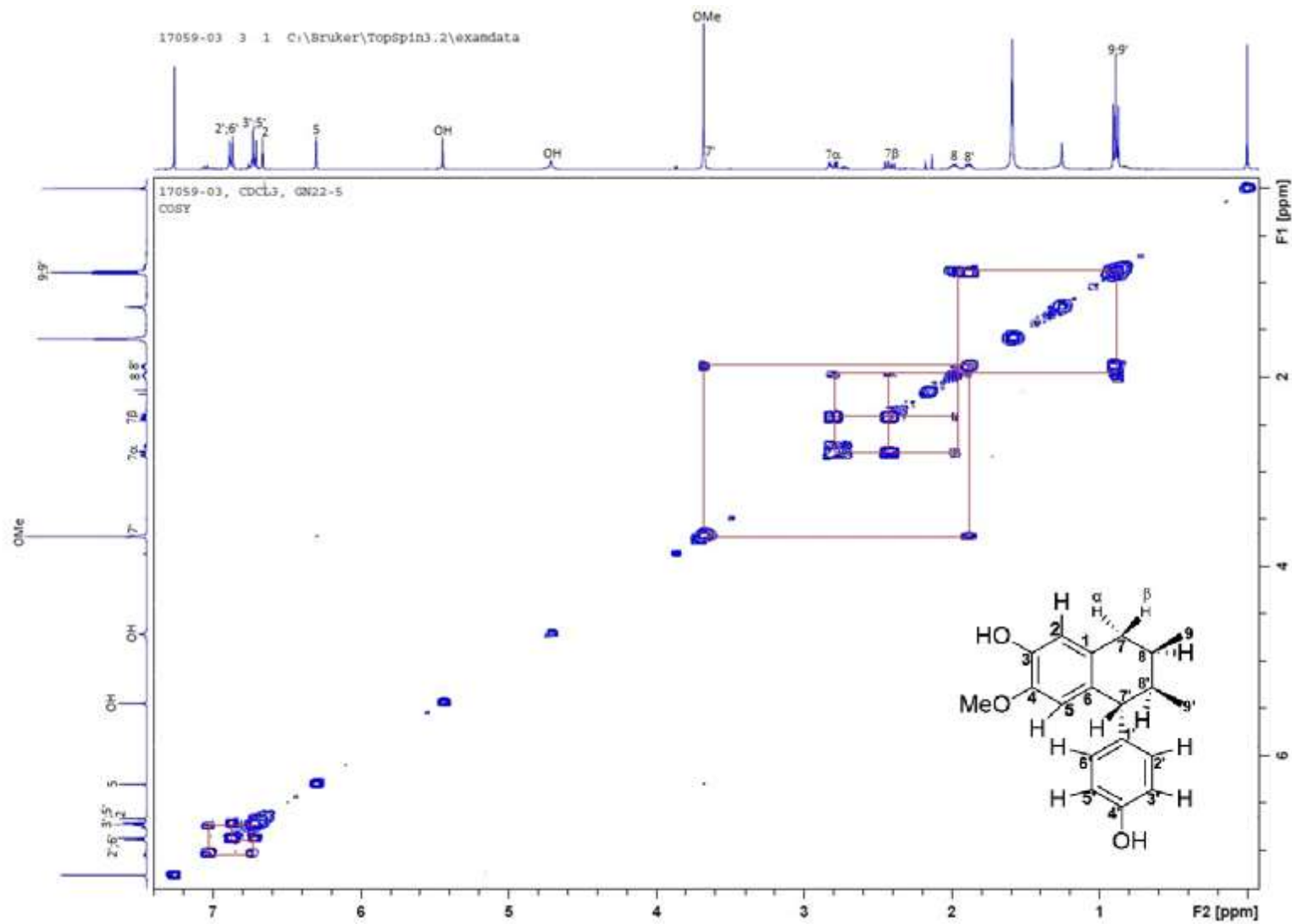


Figura 34. Espectro COSY (400 MHz, CDCl₃) de Lt21: 3'-demetoxi-isoguaiacina

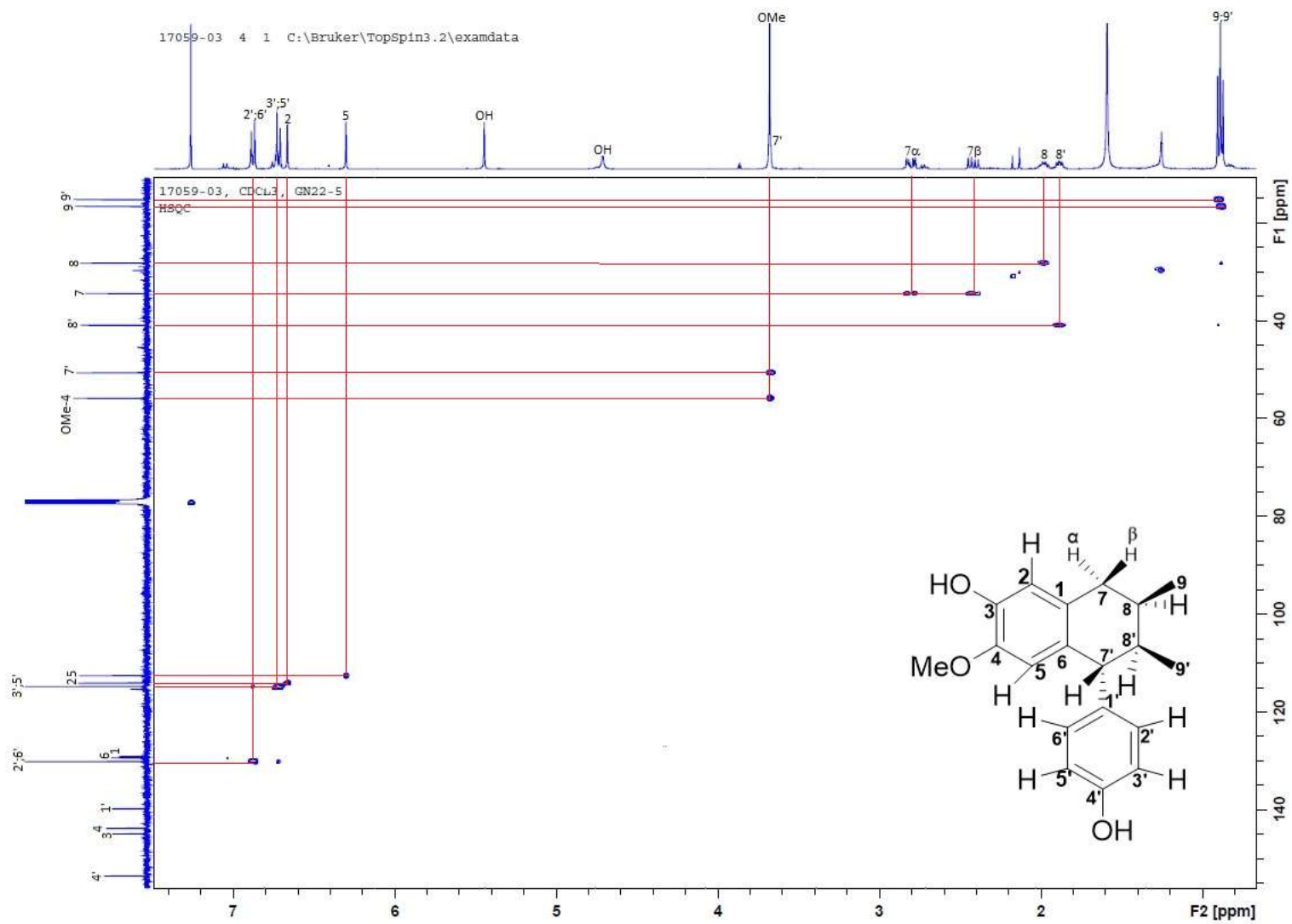


Figura 35. Espectro HSQC (400 MHz, CDCl₃) de Lt21: 3'-demetoxi-isoguaiacina

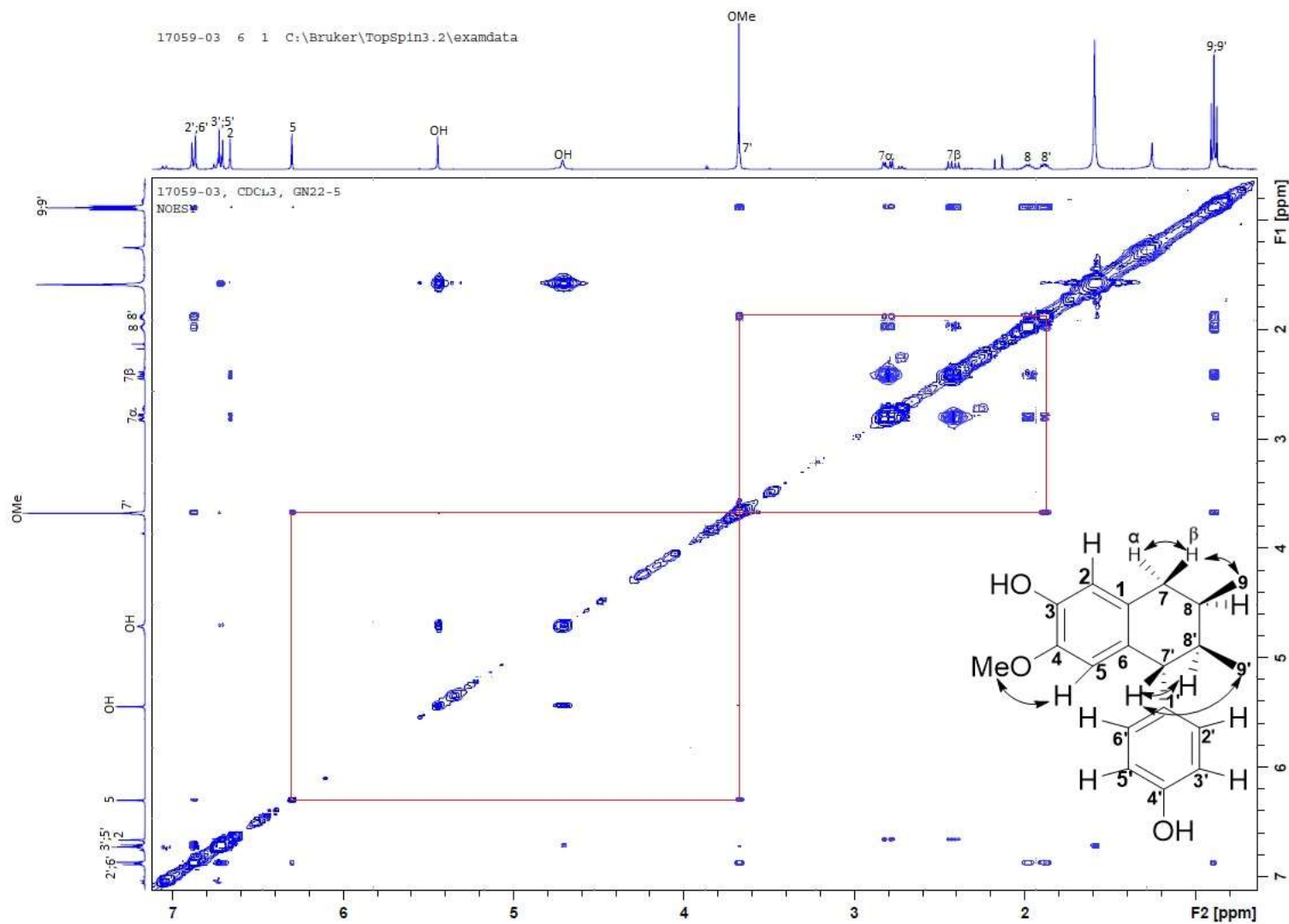


Figura 36. Espectro NOESY (400 MHz, CDCl₃) de Lt21: 3'-demetoxi-isoguaiacina

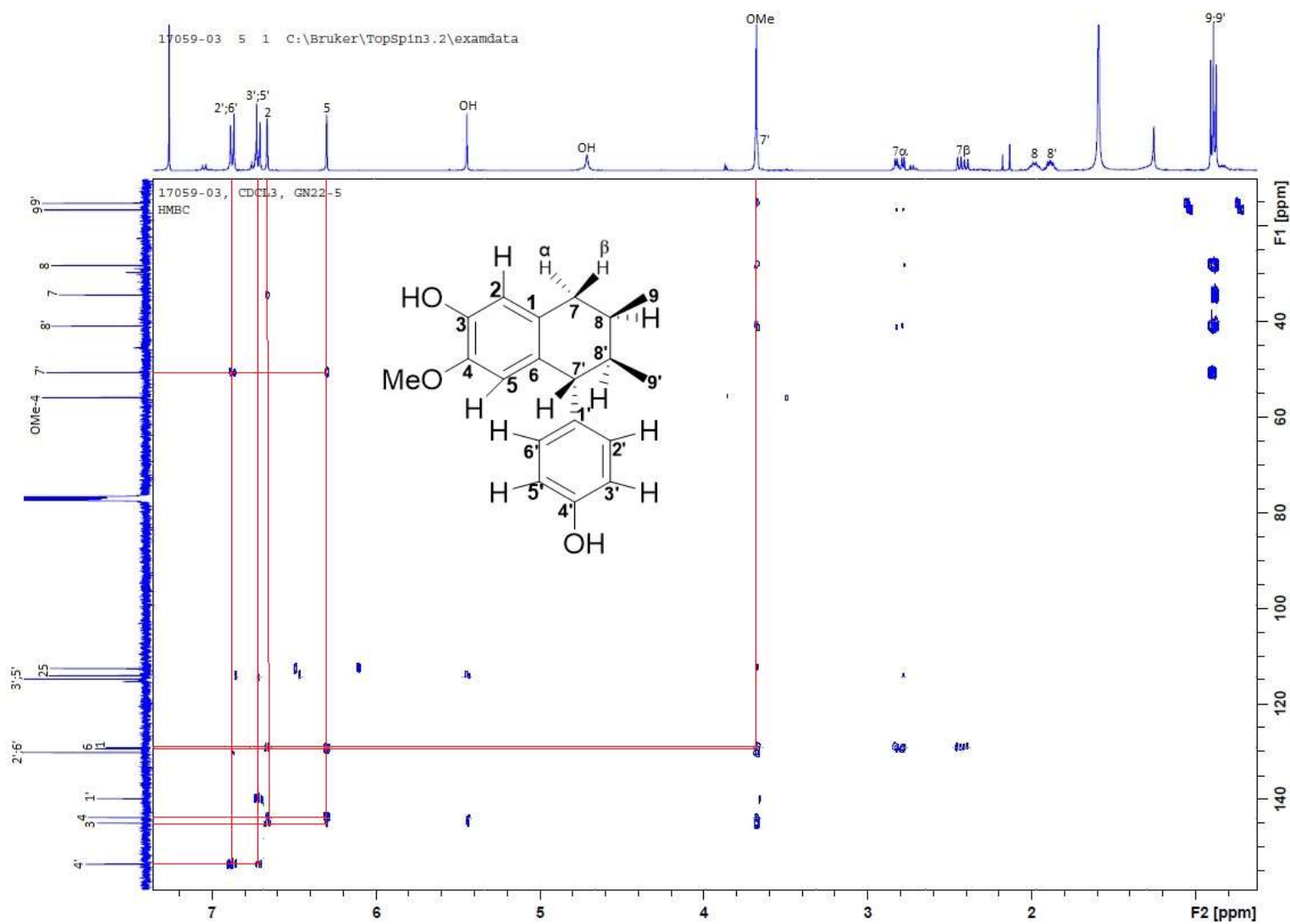


Figura 37. Espectro HMBC (400 MHz, CDCl₃) de Lt21: 3'-demetoxi-isoguaiacina

5.1.6. Propiedades físicas y espectroscópicas de Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano

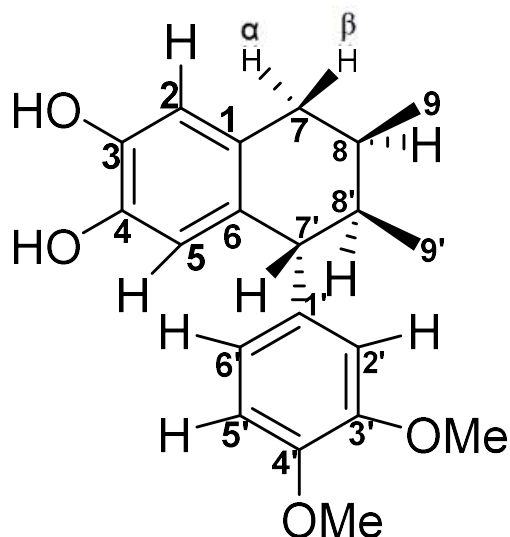


Figura 38. Lt17; 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano

El compuesto se obtuvo como resina amarilla (80.6 mg; 0.00806 %), soluble en CHCl_3 y acetona, $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_4$, PM: 328.17 g/mol. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.90 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, H-9), 0.92 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, H-9'), 1.96 (m, 1H, H-8'), 2.06 (m, 1H, H-8), 2.48 (dd, $J=16.34$, 7.1 Hz, 1H, H-7 β), 2.91 (dd, $J=16.32$, 5.36 Hz, 1H, H-7 α), 3.61 (d, $J=6.56$ Hz, 1H, H-7'), 3.83 (s, 3H, OMe), 3.89 (s, 3H, OMe), 5.35 (s, 1H, OH), 5.48 (s, 1H, OH), 6.42 (s, 1H, H-5), 6.51 (dd, $J=8.1$, 1.86 Hz, 1H, H-6'), 6.56 (d, $J=1.84$ Hz, 1H, H-2'), 6.59 (s, 1H, H-2), 6.80 (d, $J=8.08$ Hz, 1H, H-5'). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 15.82 (C9), 15.86 (C9'), 29.28 (C8), 35.31 (C7), 40.62 (C8'), 50.45 (C7'), 55.79 (OMe), 55.91 (OMe), 110.55 (C2), 111.48 (C2'), 113.74 (C5'), 116.02 (C5), 122.03 (C6'), 127.61 (C1), 130.85 (C6), 139.01 (C1'), 143.48 (C4), 143.65 (C3), 144.95 (C4'), 146.22 (C3').

5.1.6.1. Elucidación estructural de Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano

El espectro de RMN ^1H (figura 39) mostró dos dobletes que convergen, uno a 0.90 ppm (d, $J=6.6$ Hz, 3H, H-9) y el otro a 0.92 ppm (d, $J=6.6$ Hz, 3H, H-9') que corresponden a grupos metilos unidos cada uno a un metino, después se tiene dos multipletes a 1.96 ppm (m, 1H, H-8') y 2.06 ppm (m, 1H, H-8) que corresponden a protones de metinos, consecutivamente a 2.48 ppm (dd, $J=16.34$, 7.1 Hz, 1H, H-7 β) y 2.91 ppm (dd, $J=16.32$, 5.36 Hz, 1H, H-7 α) se tienen dos dobletes de dobletes de un metileno en la posición bencílica, y que muestran su multiplicidad por acoplamiento geminal entre los protones en el metileno y vecinales con los protones del metino vecino, luego en 3.61 ppm (d, $J=6.56$ Hz, 1H, H-7') se observa un doblete del protón del metino en C-7' que se cicla con la posición 6 del anillo aromático, después se observan dos singuletes de metoxilos a 3.83 ppm (s, 3H, OMe) y 3.89 ppm (s, 3H, OMe) y otros dos singuletes de hidroxilos a 5.35 ppm (s, 1H, OH) y 5.48 ppm (s, 1H, OH); a 6.42 ppm (s, 1H, H-5) se observa un singulete del protón aromático, después un doblete de doblete a 6.51 ppm (dd, $J=8.1$, 1.86 Hz, 1H, H-6') que se origina por el acoplamiento en orto de H-6' con H-5' y en meta con H-2', después se tiene un doblete del protón aromático H-2' a 6.56 ppm (d, $J=1.84$ Hz, 1H, H-2') producto de acoplamiento de protones meta-relacionados H-2' y H-6', y finalmente se tiene un singulete de protón aromático a 6.59 ppm (s, 1H, H-2) y un doblete a 6.80 ppm (d, $J=8.08$ Hz, 1H, H-5') producto del acoplamiento de H-5' con H-6' en posición orto.

En el espectro de RMN ^{13}C (figura 40) se observaron 6 señales de carbonos alifáticos: 15.82 ppm (C9), 15.86 ppm (C9'), 29.28 ppm (C8), 35.31 ppm (C7), 40.62 ppm (C8'), 50.45 ppm (C7'); y 2 correspondientes a metoxilos 55.79 ppm (OMe), 55.91 ppm (OMe); y finalmente 12 carbonos aromáticos: 110.55 ppm (C2), 111.48 ppm (C2'), 113.74 ppm (C5'), 116.02 ppm (C5), 122.03 ppm (C6'), 127.61 ppm (C1), 130.85 ppm (C6), 139.01 ppm (C1'), 143.48 ppm (C4), 143.65 ppm (C3), 144.95 ppm (C4'), 146.22 ppm (C3').

El espectro COSY (figura 41) muestra que los protones de los carbonos alifáticos correlacionan intensamente entre ellos teniendo como correlaciones clave H-7 α ; H-7 β /H-8, H-8/H-8'; H-9, H-8'/H-7'; H-9'; respectivamente los dos metoxilos muestran correlación entre ellos (OMe/OMe) y del mismo modo los dos hidroxilos también correlacionan mutuamente (OH/OH); adicionalmente, se observaron las correlaciones entre H-5'/H-6' y H-6'/H-2'. En el espectro HSQC (figura 42) se observa la correlación de los carbonos con los hidrógenos que están unidos a ellos y también se confirma que los carbonos cuaternarios propuestos en el espectro de RMN ^{13}C de la figura 40, han sido asignados de forma correcta, y es de destacar que a diferencia de los compuestos Lt16 y Lt18, el ciclolignano Lt17 posee un carbono cuaternario extra, el C-3', ya que en esa posición se encuentra un sustituyente metoxilo. El espectro NOESY (figura 43) confirma la estructura propuesta, ya que se aprecia la correlación espacial mutua entre los protones de los hidroxilos de las posiciones 3 y 4 (OH/OH), además de la correlación entre los protones de los dos metoxilos (OMe/OMe) y con las posiciones 2' y 6' (OMe/H-2'; OMe/H-6'); indicando que el compuesto Lt17 es un ciclolignano asimétrico

cuyos sustituyentes se encuentran dispuestos como se ilustra en la figura 34. Por último, el espectro de HMBC (figura 44) aportó las bases para indicar las posiciones de los carbonos cuaternarios en la molécula, al observarse su conectividad a 3 enlaces de distancia con los C-H: C-1/H-5, C-3/H-5, C-4/H-2, C-6/H-2, C-1'/H-5', C-3'/H-5', C-4'/H-3'. Con base a lo descrito anteriormente el compuesto Lt17 corresponde a 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano que resulto ser un nuevo producto natural (tabla 13).

TABLA 13

Constantes espectroscópicas clave de Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano

Posición	δ_H	δ_C	HMBC	NOESY
1	-	127.61	H-5	
2	6.59 (s, 1H)	110.55		
3	-	143.65	H-5	
4	-	143.48	H-2	
5	6.42 (s, 1H)	116.02		H-7'
6	-	130.85	H-2	
7 α	2.91 (dd, $J= 16.32, 5.36$ HZ, 1H)	35.31		
7 β	2.48 (dd, $J=16.34, 7.1$ Hz, 1H)	35.31		Me-9
8	2.06 (m, 1H)	29.28		
9	0.90 (d, $J=6.6$ Hz, 3H)	15.82		
1'	-	139	H-5'	
2'	6.56 (d, $J= 1.84$ Hz, 1H)	111.48		OMe, H-7'
3'	-	146.22	H-5'	
4'	-	144.95	H-2'	
5'	6.80 (d, $J= 8.08$ Hz, 1H)	113.74		H-6'
6'	6.51 (dd, $J=8.1, 1.86$ Hz, 1H)	122.03		H-5'
7'	3.61 (d, $J= 6.56$ Hz, 1H)	50.45		H-2',H-6',H-5
8'	1.96 (m, 1H)	40.62		
9'	0.92 (d, $J=6.6$ Hz, 3H)	15.86		H-7'
OH	5.35 (s, 1H)	-		OH
OH	5.48 (s, 1H)	-		OH
OMe	3.83 (s, 3H)	55.79		OMe, H2', H-6'
OMe	3.89 (s, 3H)	55.91		OMe

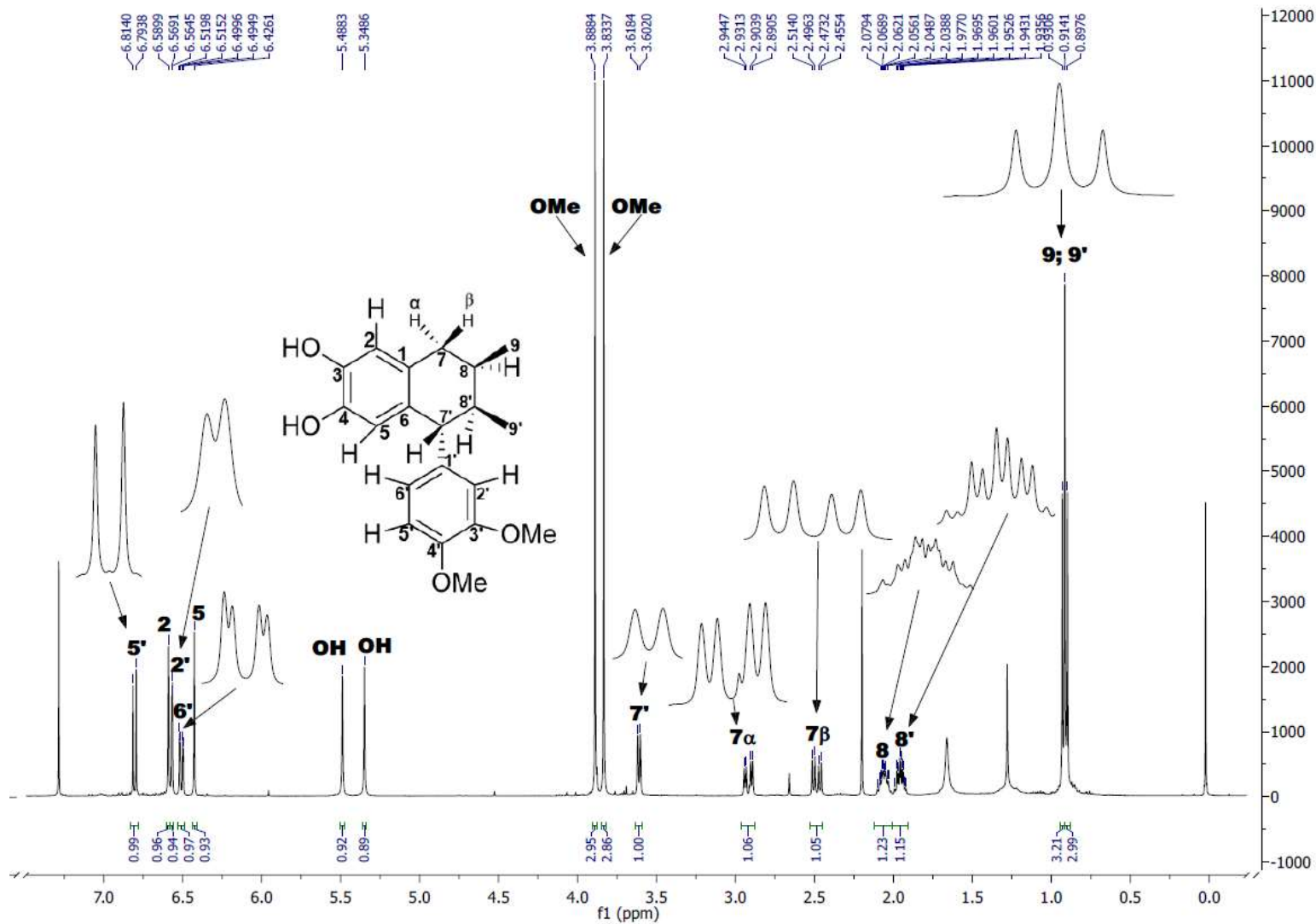


Figura 39. Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-cicloglignano

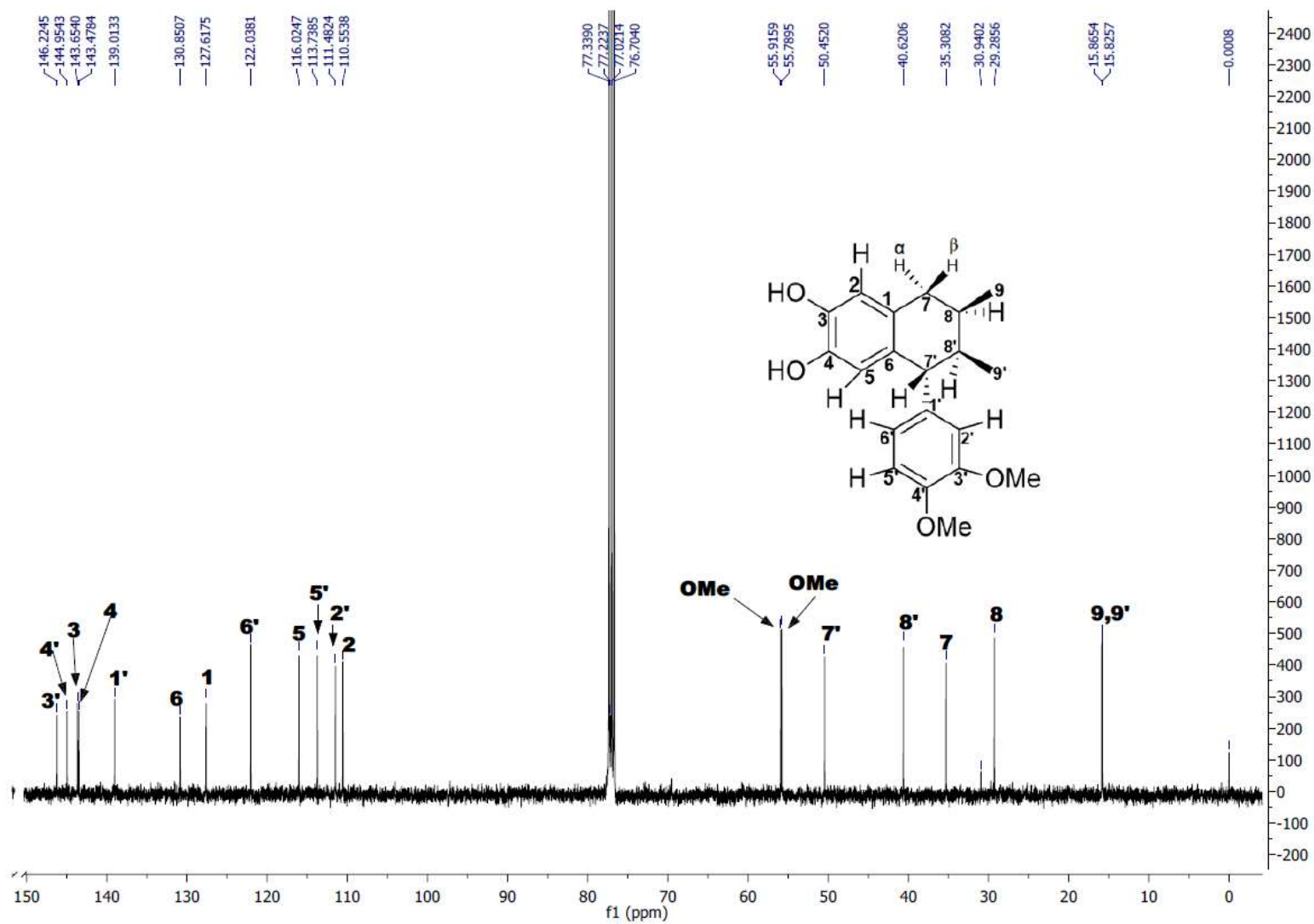


Figura 40. Espectro RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano

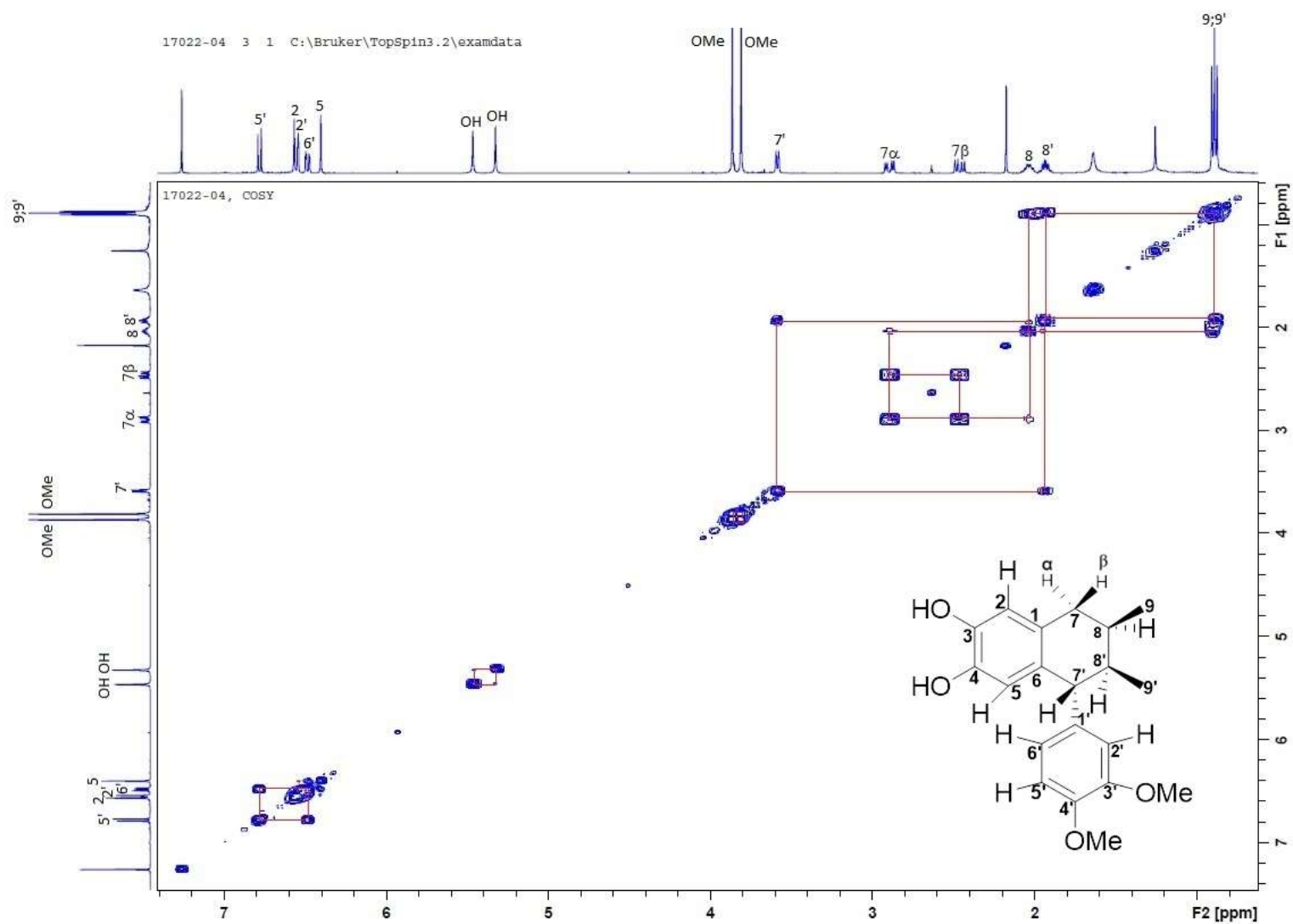


Figura 41. Espectro COSY (400 MHz, CDCl₃) de Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolognano

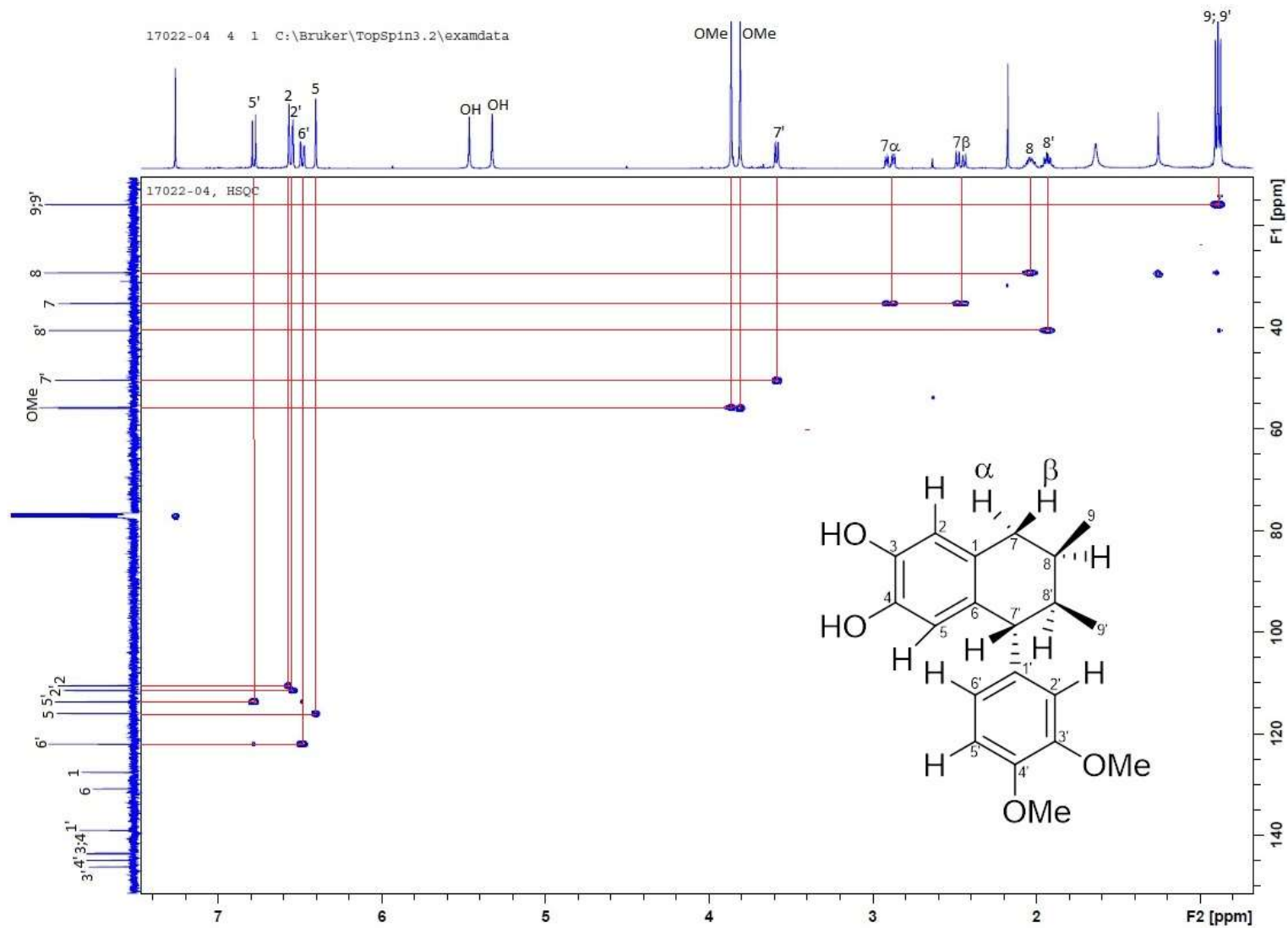


Figura 42. Espectro HSQC (400 MHz, CDCl₃) de Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano

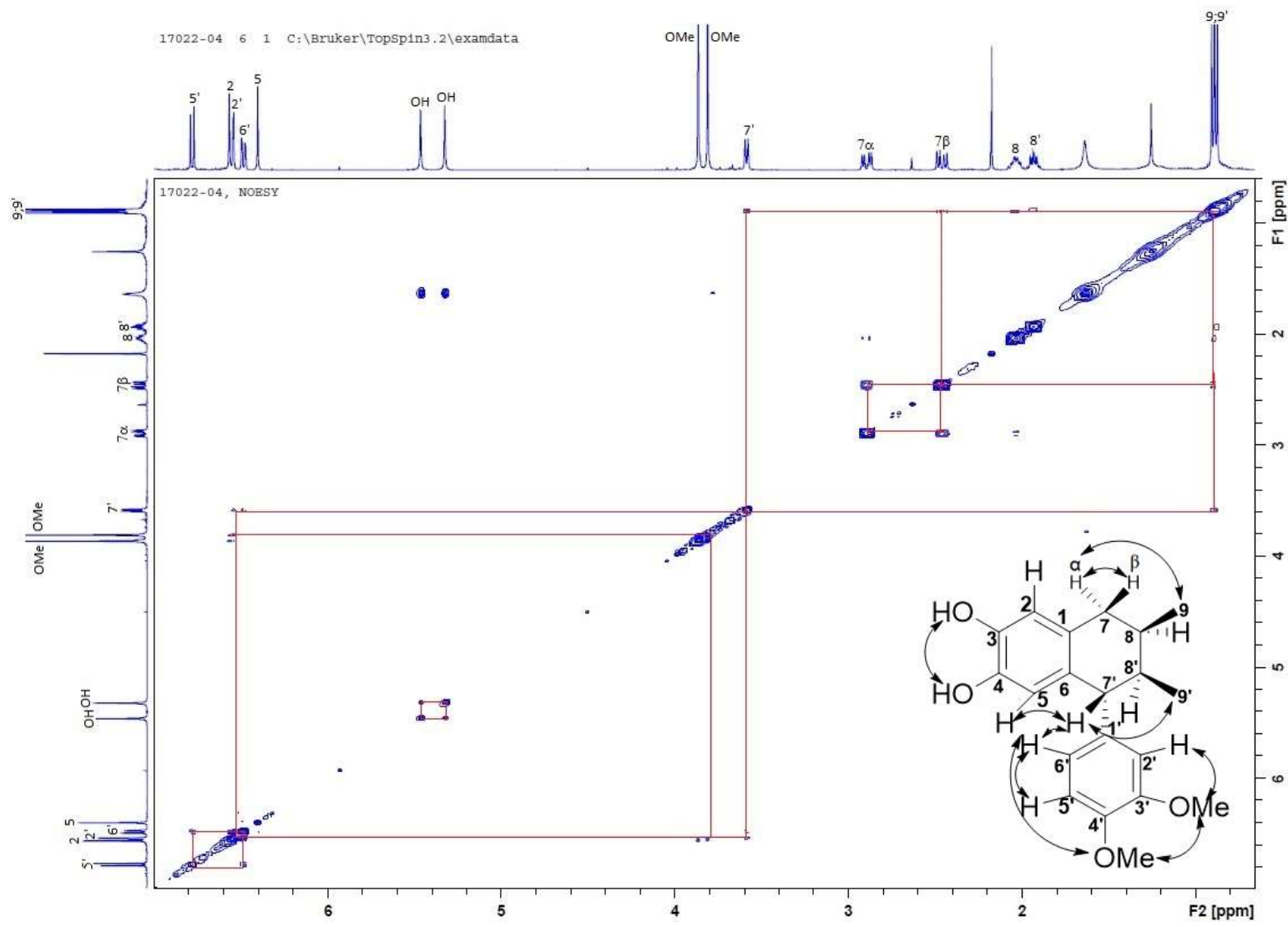


Figura 43. Espectro NOESY (400 MHz, CDCl_3) de Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano

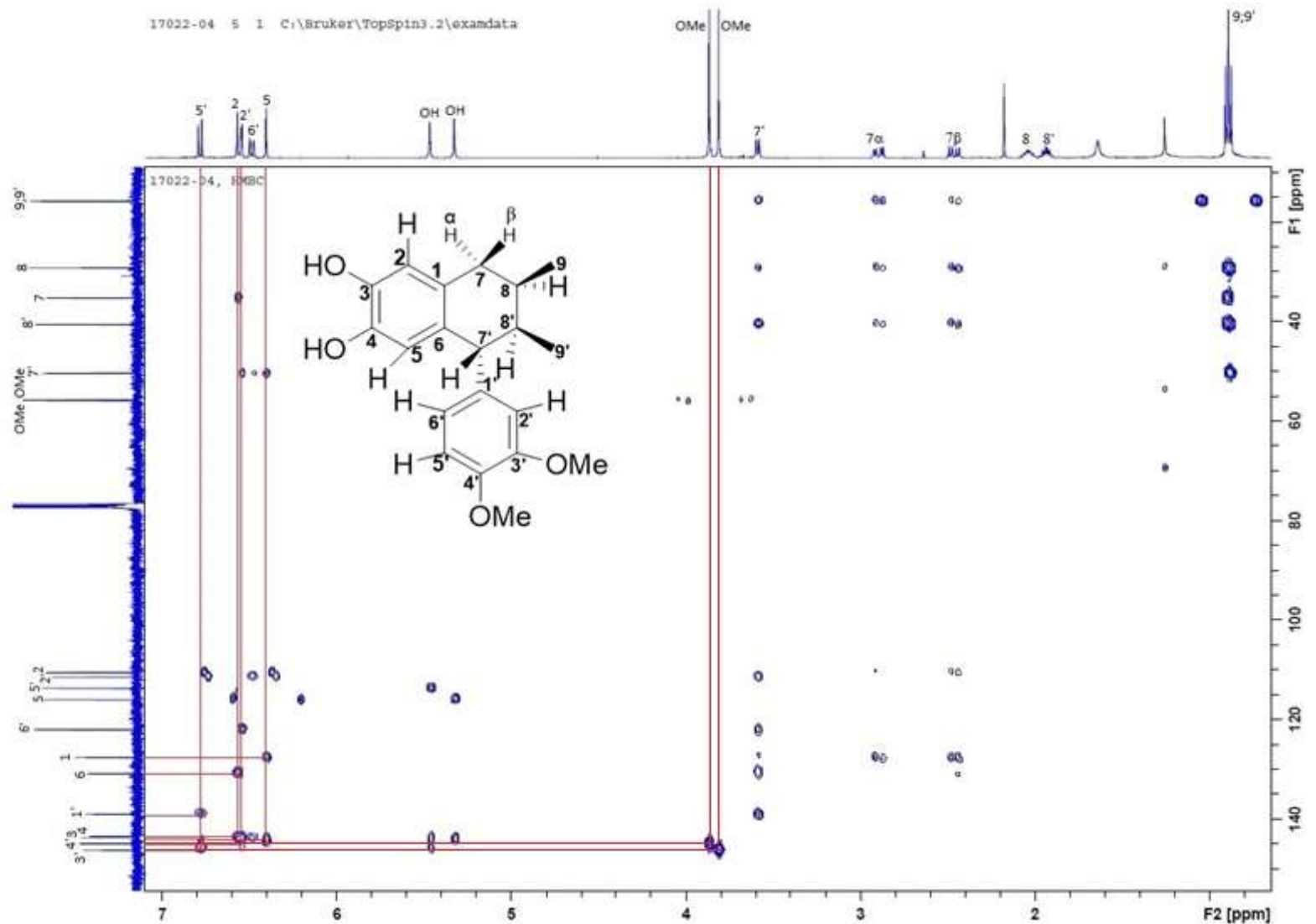


Figura 44. Espectro HMBC (400 MHz, CDCl₃) de Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano

5.1.7. Propiedades físicas y espectroscópicas de Lt8: 3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina

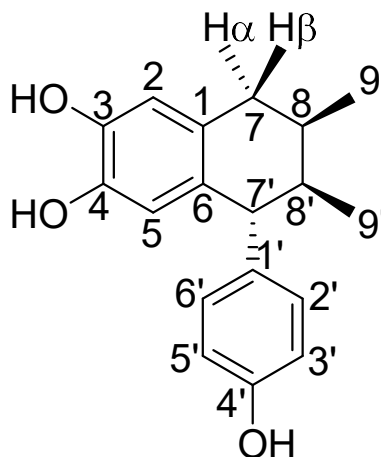


Figura 45. Lt8: 3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina

El compuesto es un sólido color café claro (3163 g; 0.3163 %), soluble en acetona y MeOH, pf: 182-185 °C, C₁₈H₂₀O₃, PM: 284.35 g/mol. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.89 (d, *J* = 6.88 Hz, 3H, H-9'), 0.90 (d, *J* = 6.88 Hz, 3H, H-9), 1.92 (m, 1H, H-8'), 2.02 (m, 1H, H-8), 2.44 (dd, *J*=16.42, 7.34 Hz, 1H, H-7β), 2.86 (dd, *J*=16.42, 5.38 Hz, 1H, H-7α), 3.61 (d, *J*=6.4 Hz, 1H, H-7'), 4.65 (s, 1H, OH), 4.79 (s, 1H, OH), 5.05 (s, 1H, OH), 6.33 (s, 1H, H-2), 6.64 (s, 1H, H-5), 6.74 (d, *J*=8.56 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.9 (d, *J* = 8.48 Hz, 2H, H-2', H-6'). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 15.67 (C9'), 15.91(C9), 28.98 (C8), 34.84 (C7), 40.67 (C8'), 49.93 (C7'), 114.85 (C3', C5'), 115.14 (C2), 116.99 (C5), 129.23 (C1), 130.17 (C2'; C6'), 130.72 (C6), 139.51 (C1'), 141.3 (C4), 141.9 (C3), 153.58 (C4').

5.1.7.1. Elucidación estructural de Lt8: 3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina

El espectro de RMN ^1H (figura 46) mostró dos dobletes que convergen, y corresponde cada señal a un metilo que acopla con el protón de su respectivo metino vecino, uno a 0.89 ppm (d, $J = 6.88$ Hz, 3H, H-9') y el otro a 0.90 ppm (d, $J = 6.88$ Hz, 3H, H-9), después se observan dos multipletes a 1.92 ppm (m, 1H, H-8') y 2.02 (m, 1H, H-8) que corresponden cada uno a un protón alifático de grupo metino, consecutivamente se aprecian dos dobletes de dobletes a 2.44 ppm (dd, $J=16.42, 7.34$ Hz, 1H, H-7 β) y 2.86 ppm (dd, $J=16.42, 5.38$ Hz, 1H, H-7 α) que corresponden cada uno a un protón del único metileno de la cadena alifática, después se observa un doblete a 3.61 ppm (d, $J=6.4$ Hz, 1H, H-7') que corresponde al protón del metino dibencílico que cicliza con la posición 6 de la molécula, después se observan 3 singuletes de hidroxilos fenólicos a 4.65 ppm (s, 1H, OH), 4.79 ppm (s, 1H, OH) y 5.05 ppm (s, 1H, OH); consecutivamente se observan dos singuletes a 6.33 ppm (s, 1H, H-2) y 6.64 ppm (s, 1H, H-5) de dos hidrógenos para relacionados de anillo aromático tetrasustituido; y finalmente se observan dos dobletes que conforman un sistema A_2B_2 de un anillo aromático para-disustituido, a 6.74 ppm (d, $J=8.56$ Hz, 2H, H-3', H-5') y 6.9 ppm (d, $J = 8.48$ Hz, 2H, H-2', H-6'). El compuesto es un ciclolignano, cuya señal característica para definirlo como tal es el doblete a 3.61 ppm (d, $J=6.4$ Hz, 1H, H-7'), que implica que la cadena de butano no es abierta ni simétrica.

El espectro de RMN ^{13}C (figura 47) muestra los carbonos alifáticos con las siguientes 6 señales: 15.67 ppm (C9'), 15.91 ppm (C9), 28.98 ppm (C8), 34.84 ppm (C7), 40.67 ppm (C8'), 49.93 ppm (C7'); 12 carbonos aromáticos: 114.85 ppm (C3', C5'), 115.14 ppm (C2), 116.99 ppm (C5), 129.23 ppm (C1), 130.17 ppm (C2'; C6'), 130.72 ppm (C6), 139.51 ppm (C1'), 141.3 ppm (C4), 141.9 ppm (C3) y 153.58 ppm (C4'). Con base a lo reportado por Favela-Hernández et al., 2012⁷² y Gnabre *et al.*, 2015²⁹, se dedujo que el compuesto es el lignano 3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina.

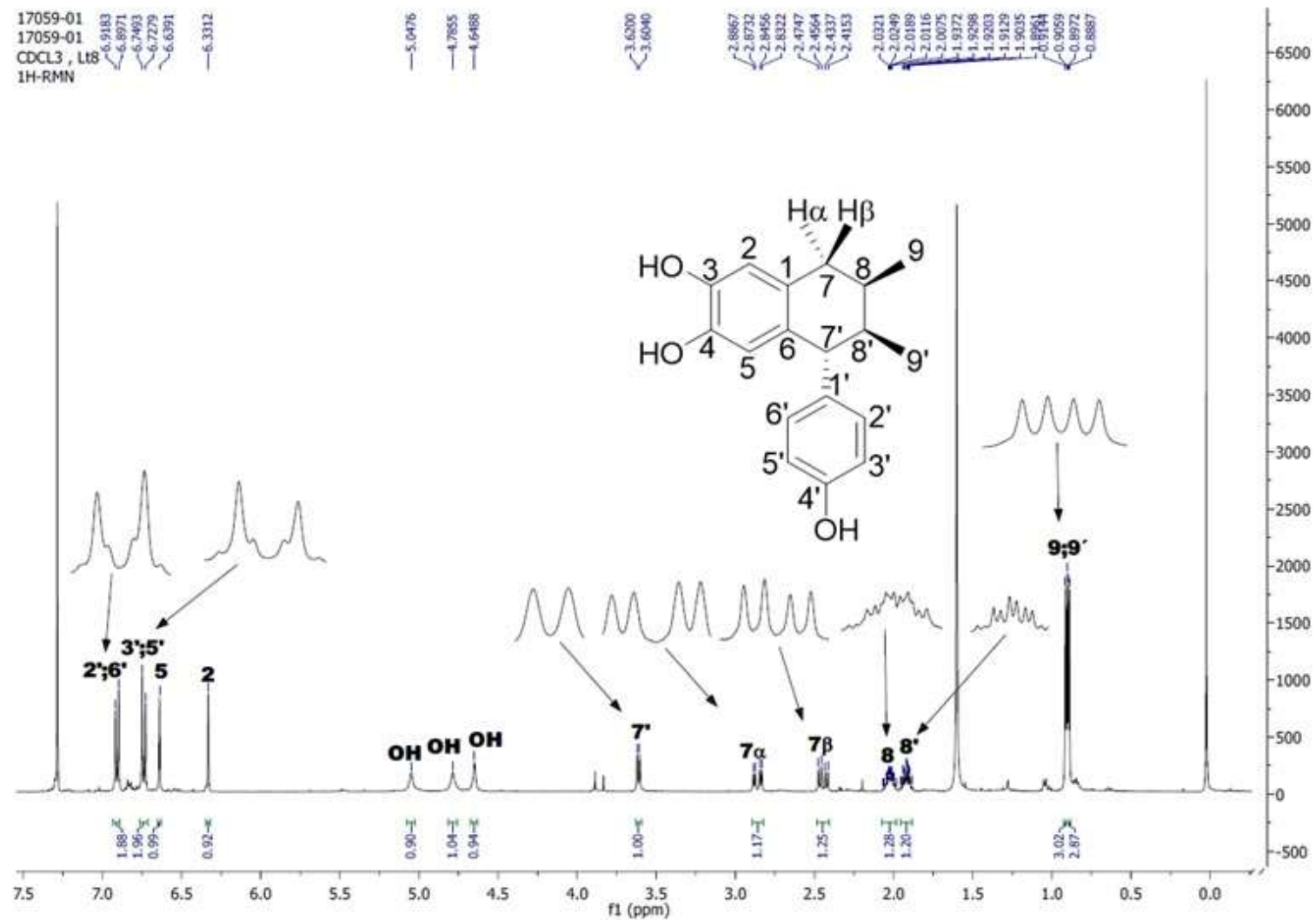


Figura 46. Espectro RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de Lt8: 3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina

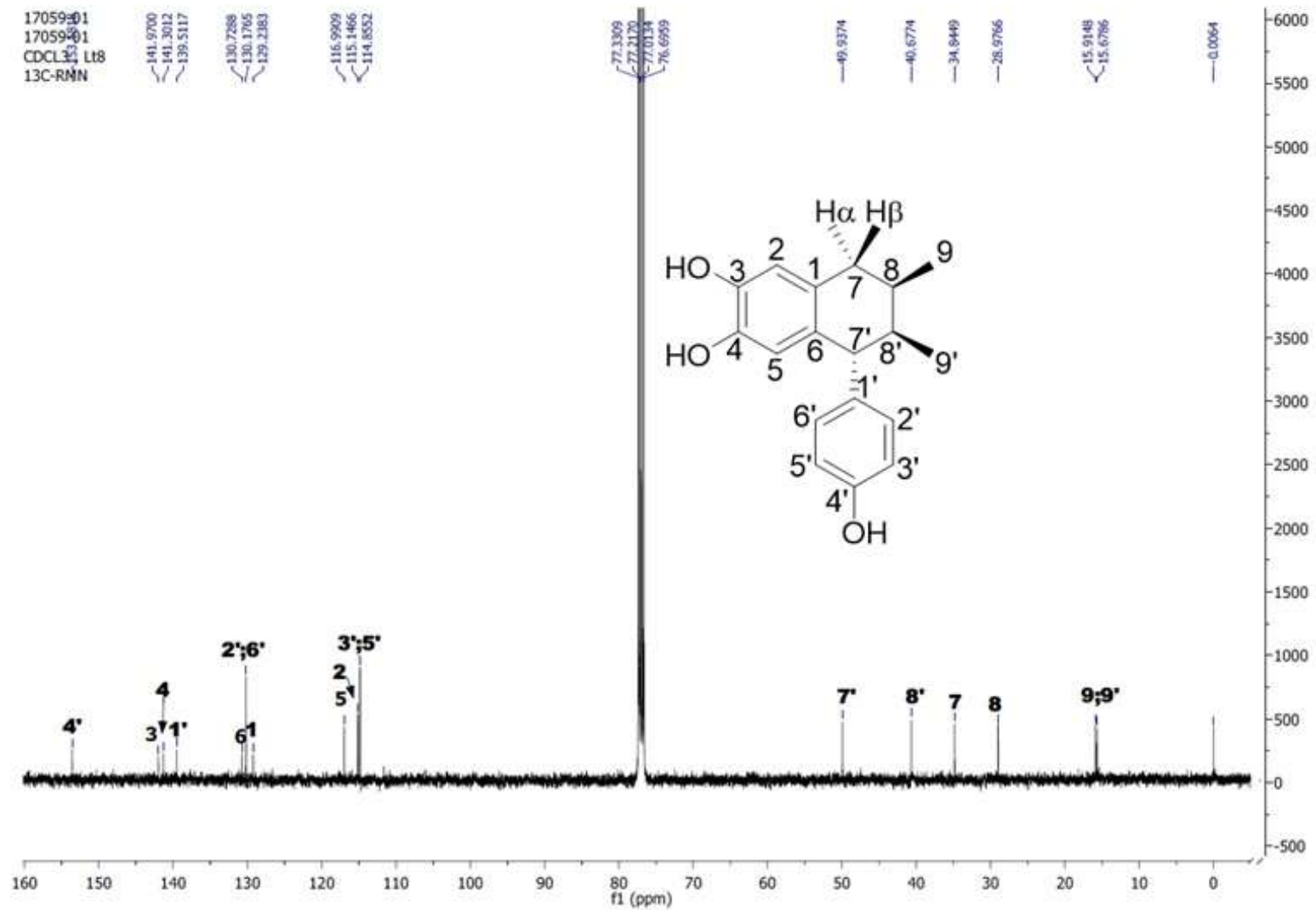


Figura 47. Espectro RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) de Lt8: 3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina

5.1.8. Propiedades físicas y espectroscópicas del Lt4: ácido *meso*-dihidroguaiarético

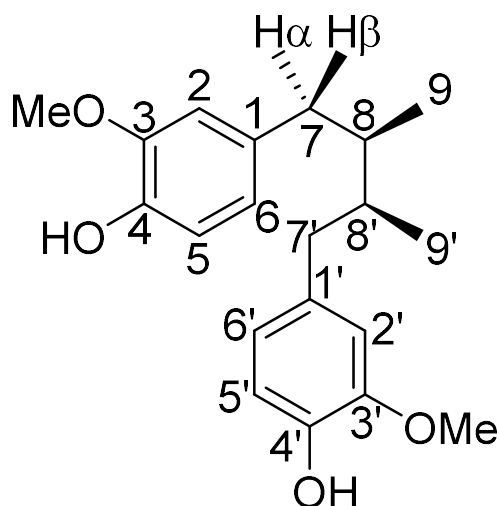


Figura 48. Lt4: ácido *meso*-dihidroguaiarético

El ácido *meso*-dihidroguaiarético es un sólido color blanco (756.8 mg; 0.07568 %), soluble en CHCl_3 y acetona, pf: 80-82 °C, $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_4$, PM: 330.42 g/mol. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.83 (d, $J = 6.72$ Hz, 6H, H-9, H-9'), 1.74 (m, 2H, H-8 y H-8'), 2.28 (dd, $J = 13.46, 9.26$ Hz, 2H, H-7 β , 7 β'), 2.72 (dd, $J = 13.48, 5$ Hz, 2H, H-7 $\alpha, 7\alpha'$), 3.86 (s, 6H, OMe-3, OMe-3'), 5.46 (s, 2H, OH-4, OH-4'), 6.60 (d, $J = 1.72$ Hz, 2H, H-2 y H-2'), 6.65 (dd, $J = 1.72, 8.04$ Hz, 2H, H-6 y H-6'), 6.82 (d, $J = 7.96$ Hz, 2H, H-5, H-5'). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 16.21 (C9, C9'), 38.88 (C7, C7'), 39.18 (C8, C8'), 55.84 (OMe-3, OMe-3'), 111.41 (C2, C2'), 113.93 (C5, C5'), 121.69 (C6, C6'), 133.77 (C1, C1'), 143.54 (C3, C3'), 146.28 (C4, C4').

5.1.8.1. Elucidación estructural del Lt4: ácido meso-dihidroguaiarético

El espectro de RMN ^1H (figura 49) de Lt4 mostró las señales características de un lignano de tipo butano, observándose inicialmente un doblete a 0.84 ppm (d, $J = 6.72$ Hz, 6H, H-9, H-9') que corresponde a los protones de dos metilos unidos cada uno a un metino, después se observa el multiplete a 1.75 ppm (m, 2H, H-8 y H-8') de los protones de los metinos, consecutivamente se observan dos doblete de dobletes a 2.28 ppm (dd, $J = 13.46, 9.26$ Hz, 2H, H-7 β , 7 β') y 2.73 ppm (dd, $J = 13.48, 5$ Hz, 2H, H-7 α , 7 α') que corresponden a los protones de la posición bencílica, siendo su multiplicidad debida al acoplamiento geminal entre ellos (7 α / 7 β y 7 α' / 7 β') y al acoplamiento vecinal con los protones de los metinos (8; 8'); a 3.86 ppm (s, 6H, OMe-3, OMe-3') se aprecia el singulete de dos metoxilos y a 5.46 ppm (s, 2H, OH-4, OH-4') el singulete de dos hidroxilos; en la región aromática se observa un doblete a 6.60 ppm (d, $J = 1.72$ Hz, 2H, H-2 y H-2') que se origina debido al acoplamiento de protones *meta*-relacionados (H-2/H-6 y H-2'/H-6'), luego se observa un doblete de doblete a 6.65 ppm (dd, $J = 8.04, 1.72$ Hz, 2H, H-6 y H-6') debido al acoplamiento con protones vecinos en posición orto y meta (H-6/H-2; H-5; y H-6'/H-2'; H-5'), y finalmente se observa un doblete a 6.82 ppm (d, $J = 7.96$ Hz, 2H, H-5, H-5') producto de los acoplamientos de hidrógenos orto H-5/H-6 y H-5'/H-6'. El número de protones integrados al relacionarse con la cantidad de señales observadas, deja implícito que el lignano muestra equivalencia magnética entre los protones de los dos anillos aromáticos, además de que los mismos muestran un patrón idéntico de sustitución, el mismo caso sucede con los núcleos de la cadena alifática, por lo tanto, se puede deducir

que la molécula elucidada es un compuesto simétrico, lo que se hace evidente al observar en la estructura que existe un plano de simetría entre el enlace que une las posiciones 8 y 8'.

El espectro de RMN ^{13}C (figura 50) muestra 3 señales de los 6 carbonos alifáticos presentes en la cadena de butano del lignano a: 16.21 ppm (C9, C9'), 38.88 ppm (C7, C7') y 39.18 ppm (C8, C8') y una señal de los dos metoxilos aromáticos a 55.84 ppm (OMe-3, OMe-3'). Se observan 12 carbonos aromáticos: 111.41 ppm (C2, C2'), 113.93 ppm (C5, C5'), 121.69 ppm (C6, C6'), 133.77 ppm (C1, C1'), 143.54 ppm (C3, C3') y 146.28 ppm (C4, C4'). Las señales observadas sustentan el hecho de que el ácido meso-dihidroguaiarético es un compuesto simétrico, ya que cada señal integra para dos carbonos, y esto es solo posible si dichos carbonos son magnéticamente equivalentes. Finalmente, con base en lo reportado por Favela-Hernández et al., 2012⁷², Gnabre *et al.*, 1995⁶³ y Lambert *et al.*, 2005⁶⁶, se dedujo que el compuesto el lignano Lt4 es el ácido meso-dihidroguaiarético.

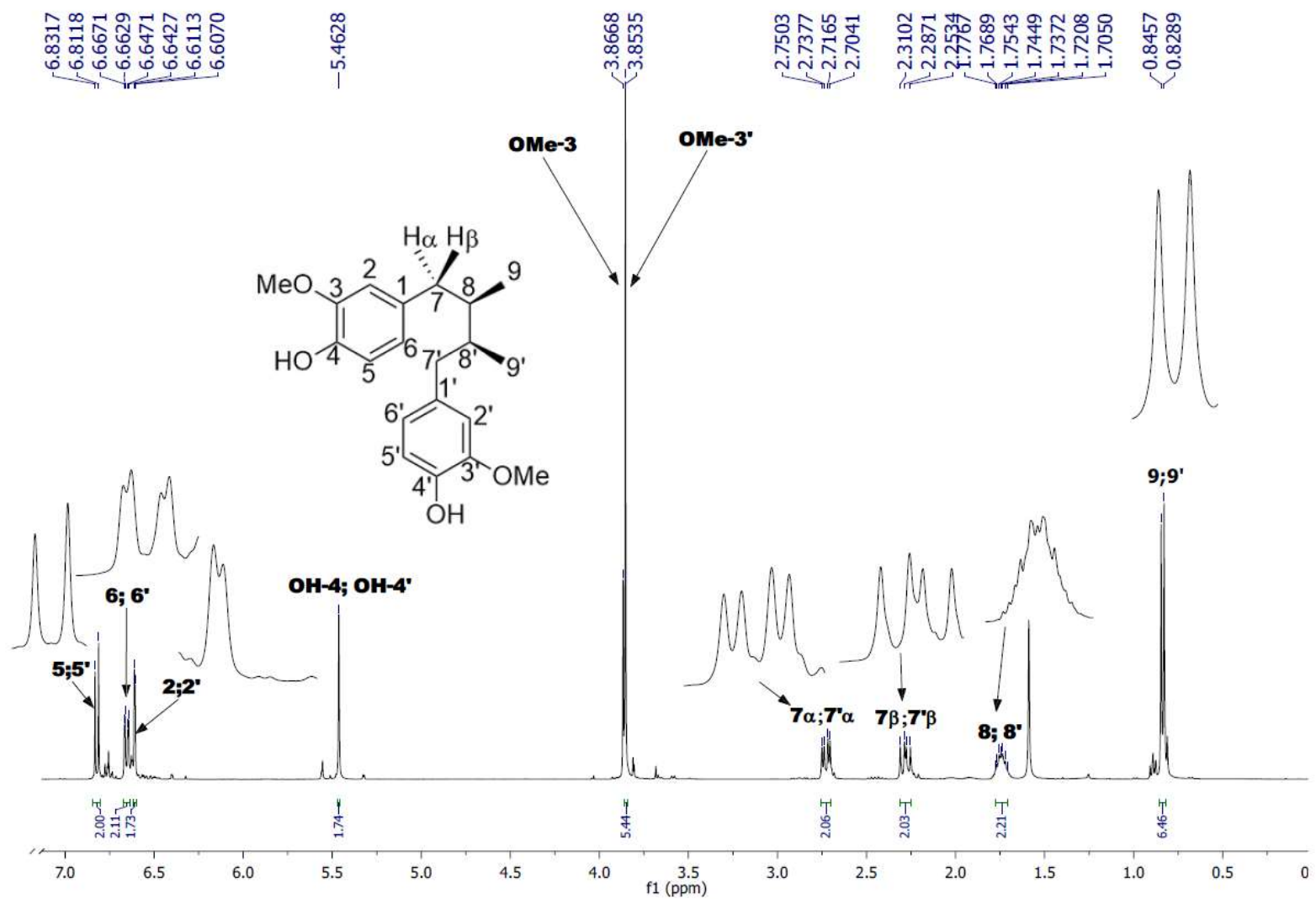


Figura 49. Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Lt4: ácido *meso*-dihidroguaiarético

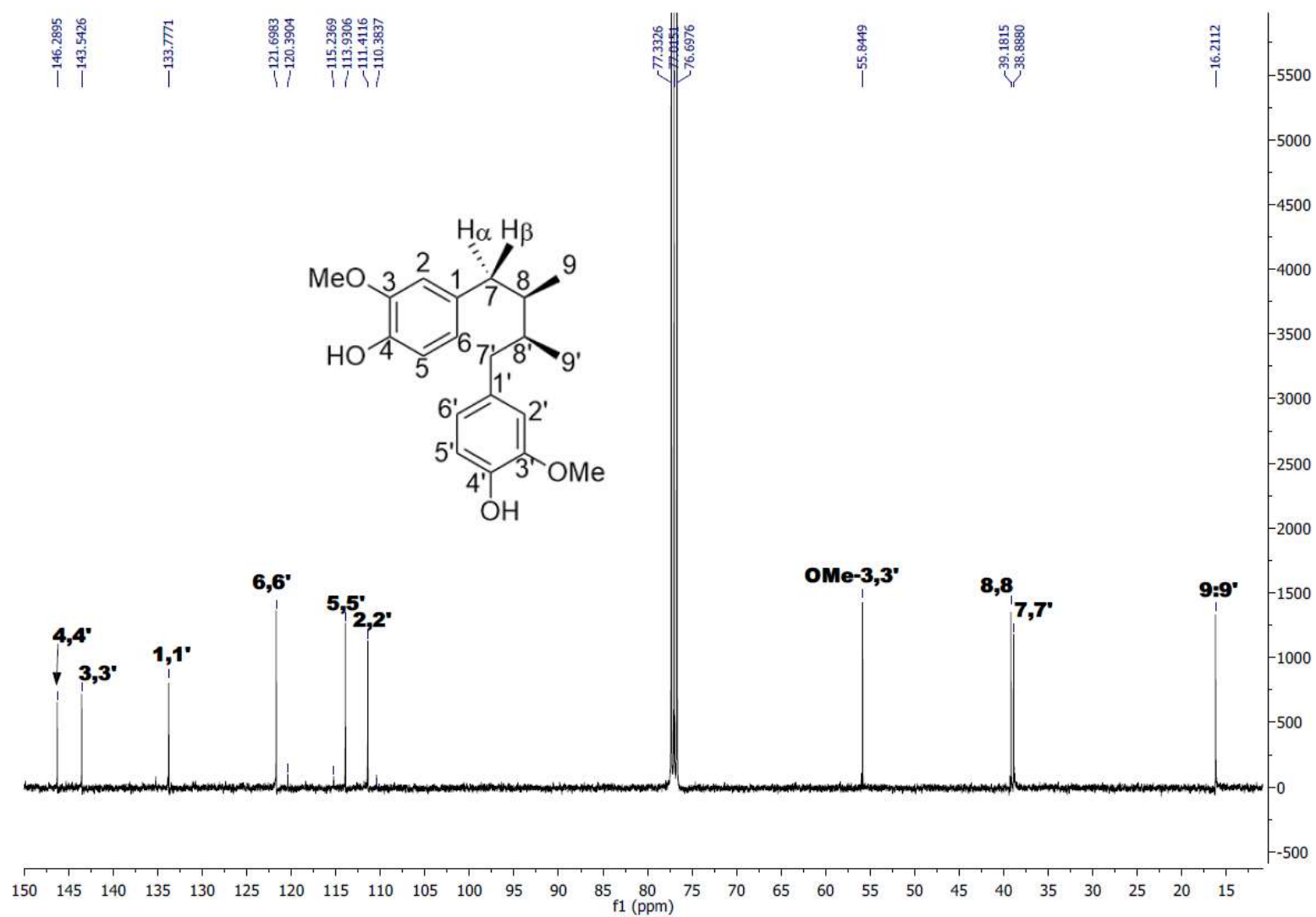


Figura 50. Espectro RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) de Lt4: ácido *meso*-dihidroguaiarético

5.1.9. Propiedades físicas y espectroscópicas del Lt20: ácido nordihidroguaiarético

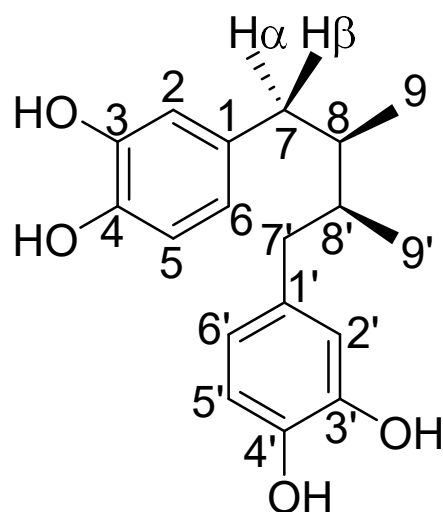


Figura 51. Lt20: ácido nordihidroguaiarético

El compuesto es un sólido color beige (63.8 mg; 0.00638 %), soluble en acetona y MeOH, pf: 185-187 °C, C₁₈H₂₂O₄, PM: 302.15 g/mol. RMN 1H (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 0.83 (d, *J* = 6.64 Hz, 6H, H-9, H-9'), 1.72 (m, 2H, H-8 y H-8'), 2.19 (dd, *J* = 13.34, 9.24 Hz, 2H, H-7β, 7β'), 2.67 (dd, *J* = 13.32, 5 Hz, 2H, H-7α, 7α'), 4.89 (s, 4H, OH-4, OH-4', OH-3, OH-3'), 6.48 (dd, *J* = 8, 2 Hz, 2H, H-6 y H-6'), 6.63 (d, *J* = 2 Hz, 2H, H-2 y H-2'), 6.68 (d, *J* = 7.96 Hz, 2H, H-5, H-5'). RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 15.19 (C-9, 9'), 38.20 (C-7, C-7'), 39.12 (C-8, C-8'), 114.73 (C-2, C-2'), 115.75 (C-5, C-5'), 120.02 (C-6, C-6'), 133.41 (C-1, C-1'), 142.69 (C-3, C-3'), 144.54 (C-4, C-4').

5.1.9.1. Elucidación estructural del Lt20: ácido nordihidroguaiarético

El espectro de RMN ^1H (figura 52) del compuesto Lt20 mostró las siguientes señales: un doblete a 0.83 ppm (6H, d, $J = 6.64$ Hz, H-9, H-9') que corresponde a dos metilos unidos cada uno a un metino, un multiplete 1.72 ppm (2H, m, H-8 y H-8') que corresponde a los protones de los grupos metino de la cadena alifática, dos doblete de dobletes a 2.19 ppm (2H, dd, $J = 13.34, 9.24$ Hz, H-7 β , 7 β ') y 2.67 ppm (2H, dd, $J = 13.32, 5$ Hz, H-7 α , 7 α ') que acoplan de forma geminal entre sí y de forma vecinal con su grupo metino vecino (H-8; H-8'), un singulete a 4.89 ppm (4H, s, OH-4, OH-4', OH-3, OH-3') de cuatro hidroxilos aromáticos, que se encuentran formando un puente de hidrógeno con el MeOH usado como disolvente; un doble de dobletes a 6.48 ppm (2H, dd, $J = 8, 2$ Hz, H-6 y H-6') que corresponde al acoplamiento de H-6 con H-5 en posición orto y con H-2 en posición meta; así del mismo modo H-6' con H-5' y H-2', un doblete a 6.63 ppm (2H, d, $J = 2$ Hz H-2 y H-2') producto del acoplamiento entre dos protones meta-relacionados (H-2/H-6; H-2'/H-6'), y como última señal, un doblete a 6.68 ppm (2H, d, $J = 7.96$ Hz, H-5, H-5') producto del acoplamiento entre protones orto-relacionados (H-5 y H-6; H-5' y H-6').

En el espectro de RMN ^{13}C (figura 53) se observan 6 carbonos alifáticos: 15.19 ppm (C-9, 9'), 38.20 ppm (C-7, C-7'), 39.12 ppm (C-8, C-8'); 12 carbonos aromáticos: que integran en las siguientes 6 señales: 114.73 ppm (C-2, C-2'),

115.75 ppm (C- 5, C-5'), 120.02 ppm (C6, C-6'), 133.41 ppm (C-1, C-1'), 142.69 ppm (C-3, C-3'), 144.54 ppm (C-4, C-4').

El compuesto Lt20 se diferencia del Lt4 únicamente en los sustituyentes de los anillos aromáticos, ya que solo posee hidroxilos. Con base a lo anterior y a lo reportado por Gnabre *et al.*, 1995⁶³, se confirma que la estructura propuesta para Lt20 es el ácido nordihidroguaiarético.

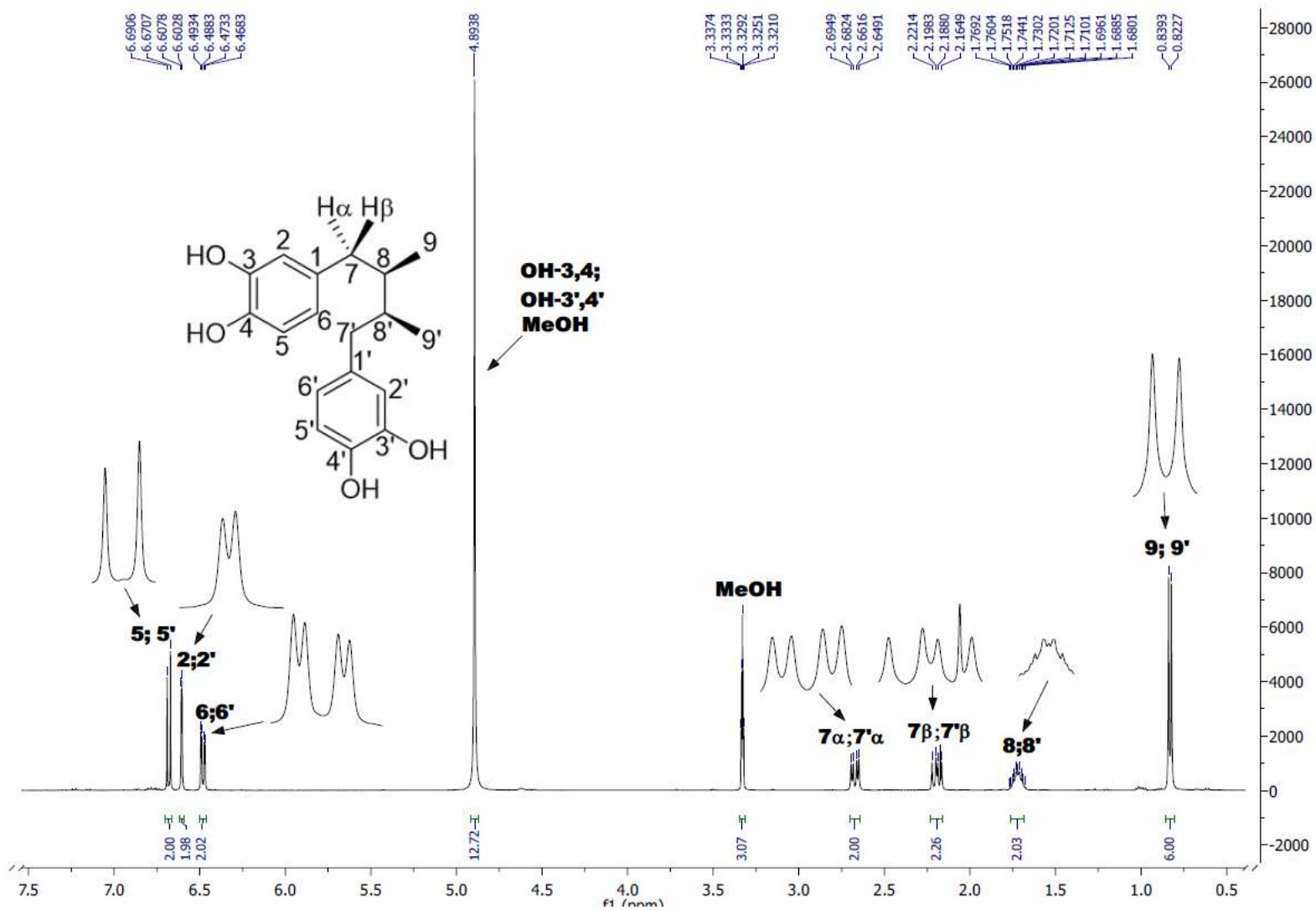


Figura 52. Espectro RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de Lt20: ácido nordihidroguaiarético

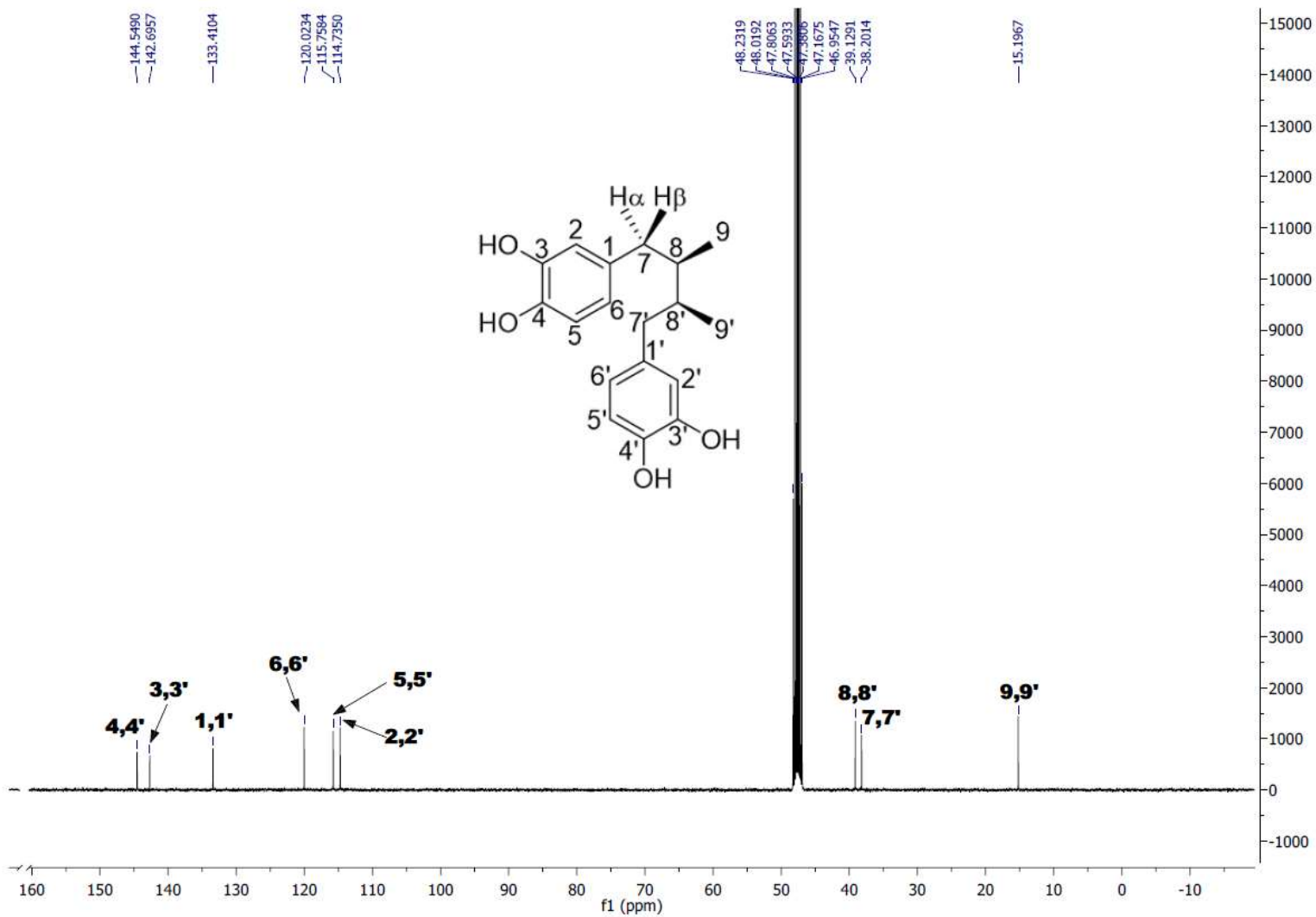


Figura 53. Espectro RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de Lt20: ácido nordihidroguaiarético

5.1.10. Propiedades físicas y espectroscópicas de Lt5: 5,4'-dihidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona

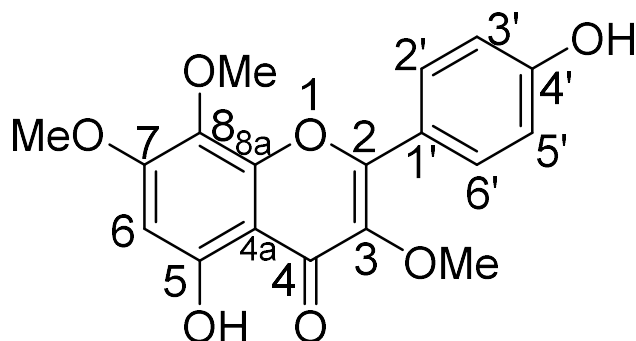


Figura 54. Lt5: 5,4'-dihidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona

El flavonoide es un sólido color amarillo claro (494 mg; 0.04948 %), parcialmente soluble en acetona y metanol, pf: 258-260 °C, C₁₈H₁₆O₇, PM: 344.31 g/mol. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.802 (s, 3H, OMe-7), 3.802 (s, 3H, OMe-8), 3.91 (s, 3H, OMe-3), 6.58 (s, 1H, H-6), 6.98 (d, *J*=8.88 Hz, 2H, H-3'; H-5'), 7.97 (d, *J*=8.88 Hz, H-2'; H-6'), 12.5 (s, 1H, OH-5). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 57 (OMe-3), 60.18 (OMe-8), 61.56 (OMe-7), 96.21 (C6), 104.95 (4a), 116.28 (C3'; C5'), 121.11 (C4'), 128.84 (C7), 130.57 (C2'; C6'), 138.03 (C3), 148.31 (C8a), 156.84 (C8), 156.55 (C5), 160.82 (C2), 178.79 (C4).

5.1.10.1. Elucidación estructural de Lt5: 5,4'-dihidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona

Tal como se ilustra en la figura 55, el espectro de RMN ¹H de Lt5 muestra los singuletes de tres metoxilos aromáticos a 3.8 ppm (s, 3H, OMe-7), 3.8 ppm (s,

3H, OMe-8) y 3.91 ppm (s, 3H, OMe-3), después resuena un singulete a 6.58 ppm (s, 1H, H-6) que corresponde a la señal de un protón aromático, después se observan dos dobletes, el primero a 6.98 ppm (d, $J= 8.88$ Hz, 2H, H-3'; H-5') y el segundo a 7.97 ppm (d, $J= 8.88$ Hz, H-2'; H-6') que corresponden a un sistema A₂B₂ de un anillo para-disustituido y por último se observa un singulete de un hidroxilo a 12.5 ppm (s, 1H, OH-5) quelatado con el carbonilo en la posición C-4.

En el espectro de RMN ¹³C de la figura 56 se observan 12 señales de carbonos aromáticos y son las siguientes: 96.21 ppm (C6), 104.95 ppm (4a), 116.28 ppm (C3'; C5'), 121.11 ppm (C4'), 128.84 ppm (C7), 130.57 ppm (C2';C6'), 148.31 ppm (C8a), 156.55 ppm (C5), y 156.84 ppm (C8). A 178.79 ppm (C4) se observa el carbono del carbonilo; dos señales de carbonos heterocíclicos 138.03 ppm (C3), 160.82 ppm (C2); y tres señales que corresponden a los carbonos de los metoxilos aromáticos a 57 ppm (OMe-3), 60.18 ppm (OMe-8) y 61.56 ppm (OMe-7). El análisis de los espectros de RMN indican que la estructura propuesta para el compuesto Lt5 es el flavonoide 5,4'-dihidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona, de acuerdo a lo reportado previamente por Favela-Hernández *et al.*, 2012⁷² y Bernhard *et al.*, 1981⁸⁶.

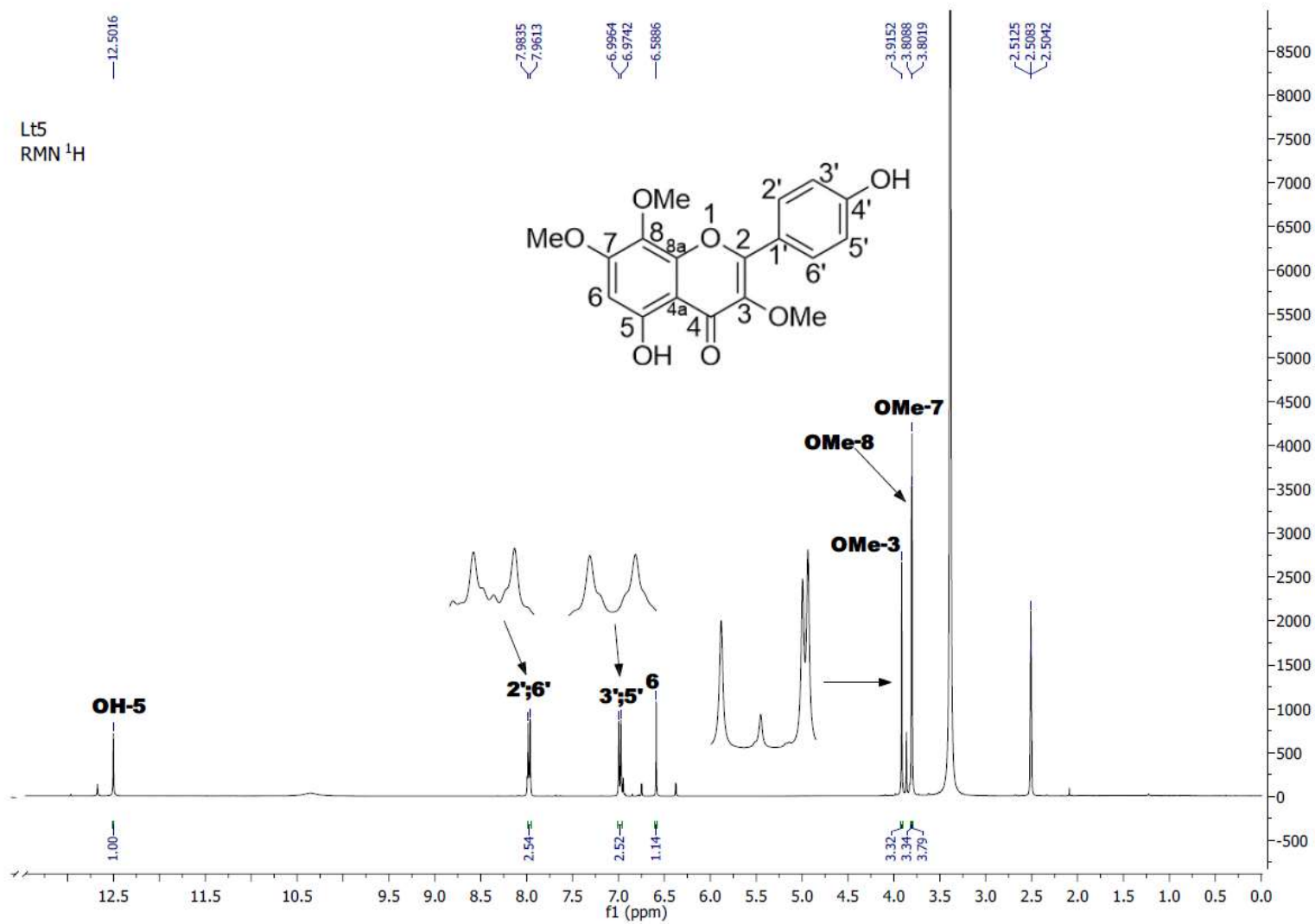


Figura 55. Espectro RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de Lt5: 5,4'-dihidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona

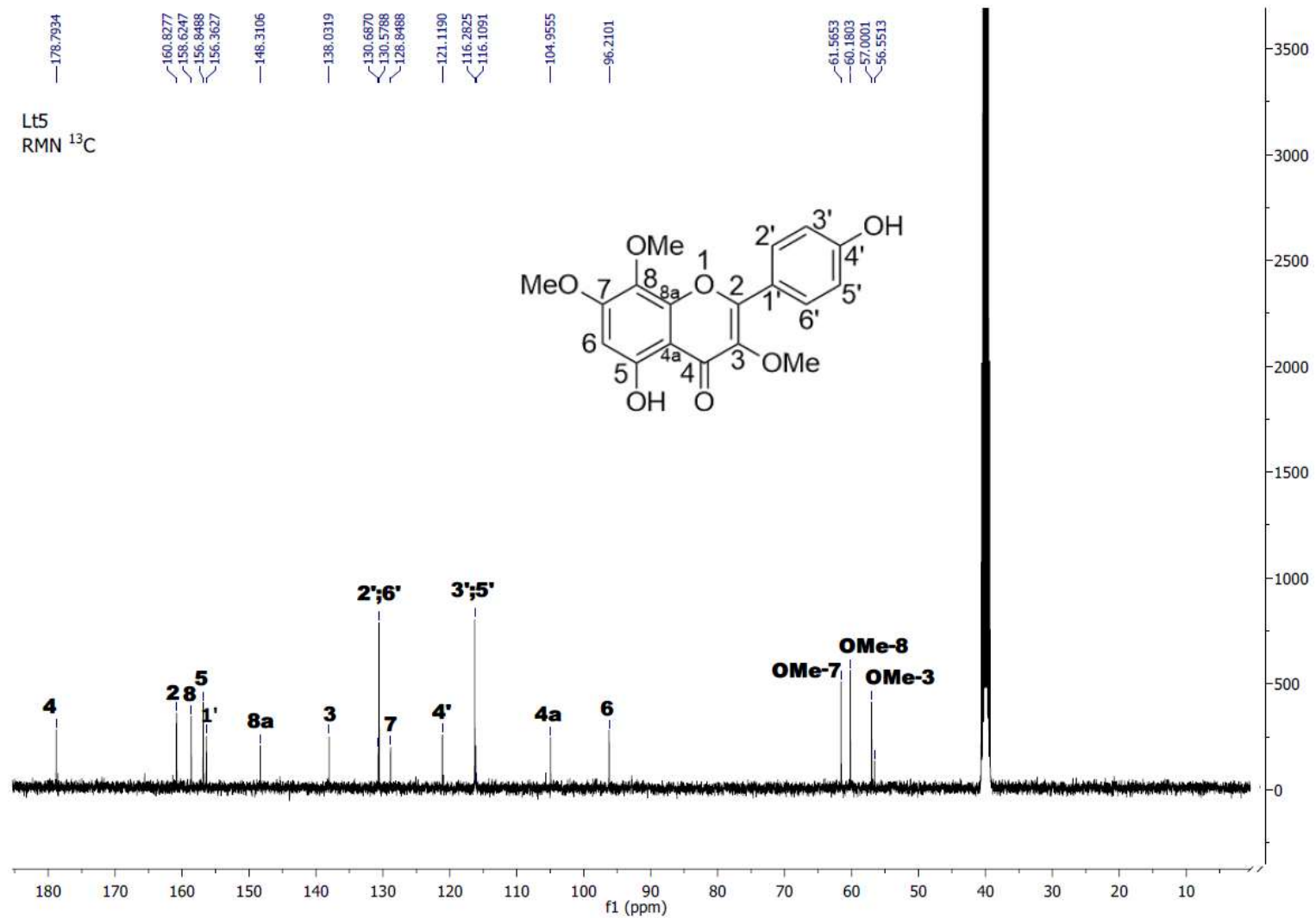


Figura 56. Espectro RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de Lt5: 5,4'-dihidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona

5.1.11. Propiedades físicas y espectroscópicas de Lt3: 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona

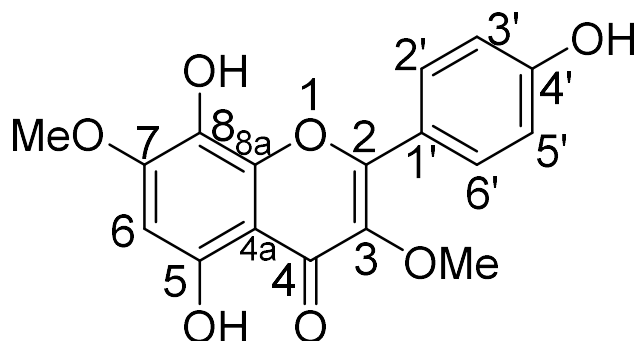


Figura 57. Lt3: 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona

El compuesto es un sólido color amarillo oscuro (88.9 mg; 0.00889 %), parcialmente soluble en acetona y metanol, pf: 245-247 °C, C₁₇H₁₄O₇, PM: 330.29 g/mol. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.77 (s, 3H, OMe-3), 3.78 (s, 3H, OMe-7), 6.21 (s, 1H, H-6), 6.97 (d, 8.88 Hz, 2H, H-3'; H-5'), 7.94 (d, 8.84 Hz, H-2'; H-6'), 12.35 (s, 1H, OH-5). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 60.16 (OMe-3), 61.28 (OMe-7), 99.81 (C6), 103.58 (C8), 116.24 (C3'; C5'), 121.29 (C4'), 128.38 (C2'; C6'), 137.87 (C3), 149.01 (C8a), 155.57 (C1'), 156.55 (C5), 160.63 (C2), 178.15 (C4).

5.1.11.1 Elucidación estructural de Lt3: 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona

Como se aprecia en la figura 58, el espectro de RMN ¹H de Lt3 mostró dos singuletes que corresponden cada uno a un metoxilo, a 3.77 ppm (s, 3H, OMe-3) y 3.78 ppm (s, 3H, OMe-7), continuando hacia campo bajo se observa un

singulete que corresponde a un protón aromático (s, 1H, H-6), después se observan dos dobletes, a 6.97 ppm (d, $J=8.88$ Hz, 2H, H-3'; H-5'), y a 7.94 ppm (d, $J= 8.84$ Hz, H-2'; H-6') de un sistema A_2B_2 de un anillo aromático para-sustituido; y finalmente se observa el singulete de un hidroxilo a 12.35 ppm (s, 1H, OH-5) que se quelata con el carbonilo ubicado en la posición 4 del flavonoide.

Para el caso del espectro de RMN ^{13}C de la figura 59, se detectaron 12 señales de carbonos aromáticos 99.81 ppm (C6), 103.58 ppm (C8), 116.24 ppm (C3'; C5'), 121.29 ppm (C4'), 128.38 ppm (C2'; C6'), 149.01 ppm (C8a), 155.57 ppm (C1'), 156.55 ppm (C5), 178.15 ppm (C4), quedando solapada la señal del carbono en posición 4a, por lo que no se aprecia en el caso particular de este espectro. Las señales a 137.87 ppm (C3) y 160.63 ppm (C2) corresponden a carbonos heterocíclicos; el carbono a 178.15 ppm (C4) corresponde al carbono del carbonilo; y finalmente las señales a 60.16 ppm (OMe-3) y 61.28 ppm (OMe-7) corresponden a metoxilos. El análisis de los espectros de RMN indican que la estructura propuesta para el compuesto Lt3 es el flavonoide 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona, de acuerdo a lo reportado previamente por Favela-Hernández *et al.*, 2012 y Sakibara *et al.*, 1975⁸⁷.

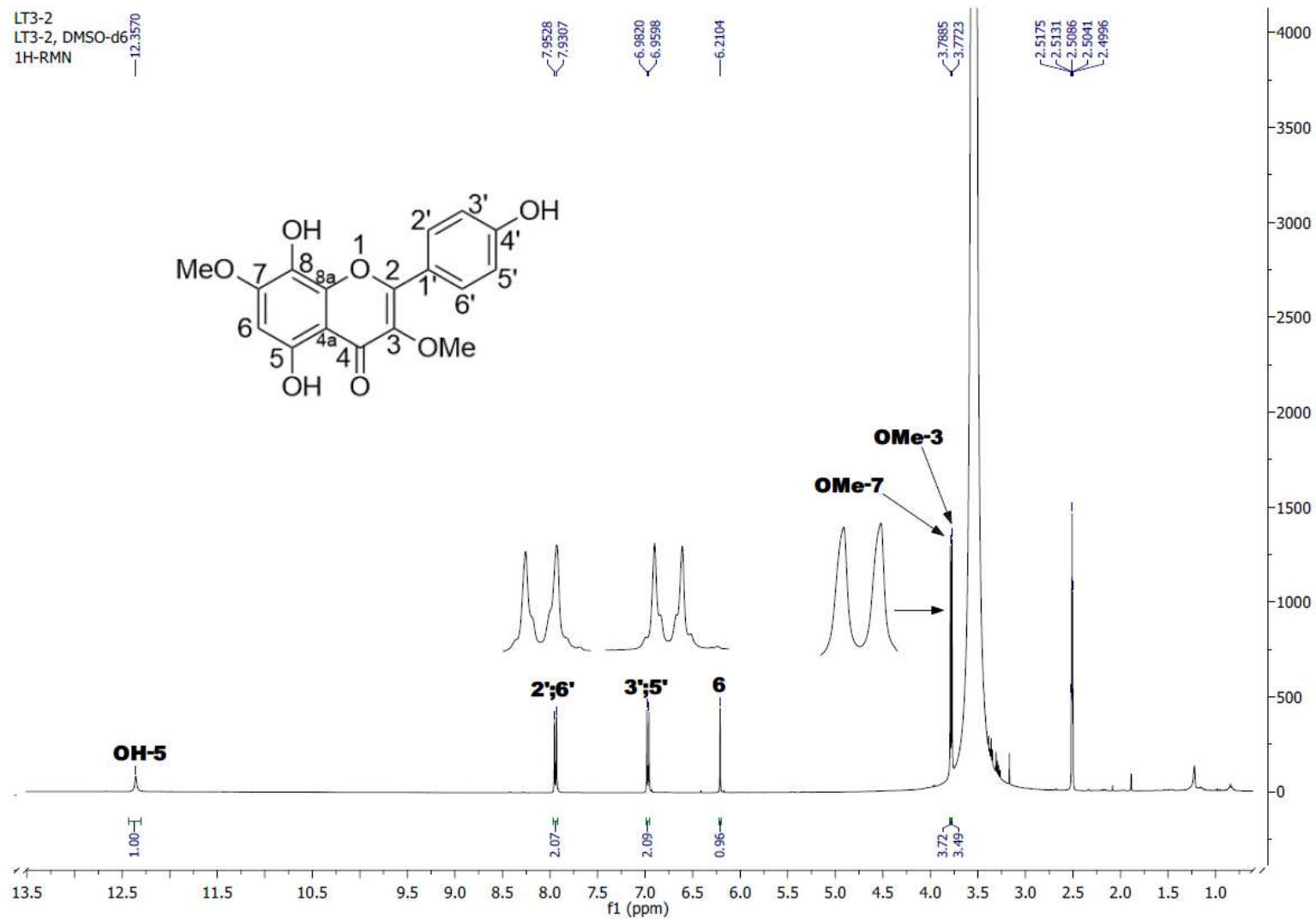


Figura 58. Espectro RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de Lt3: 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona

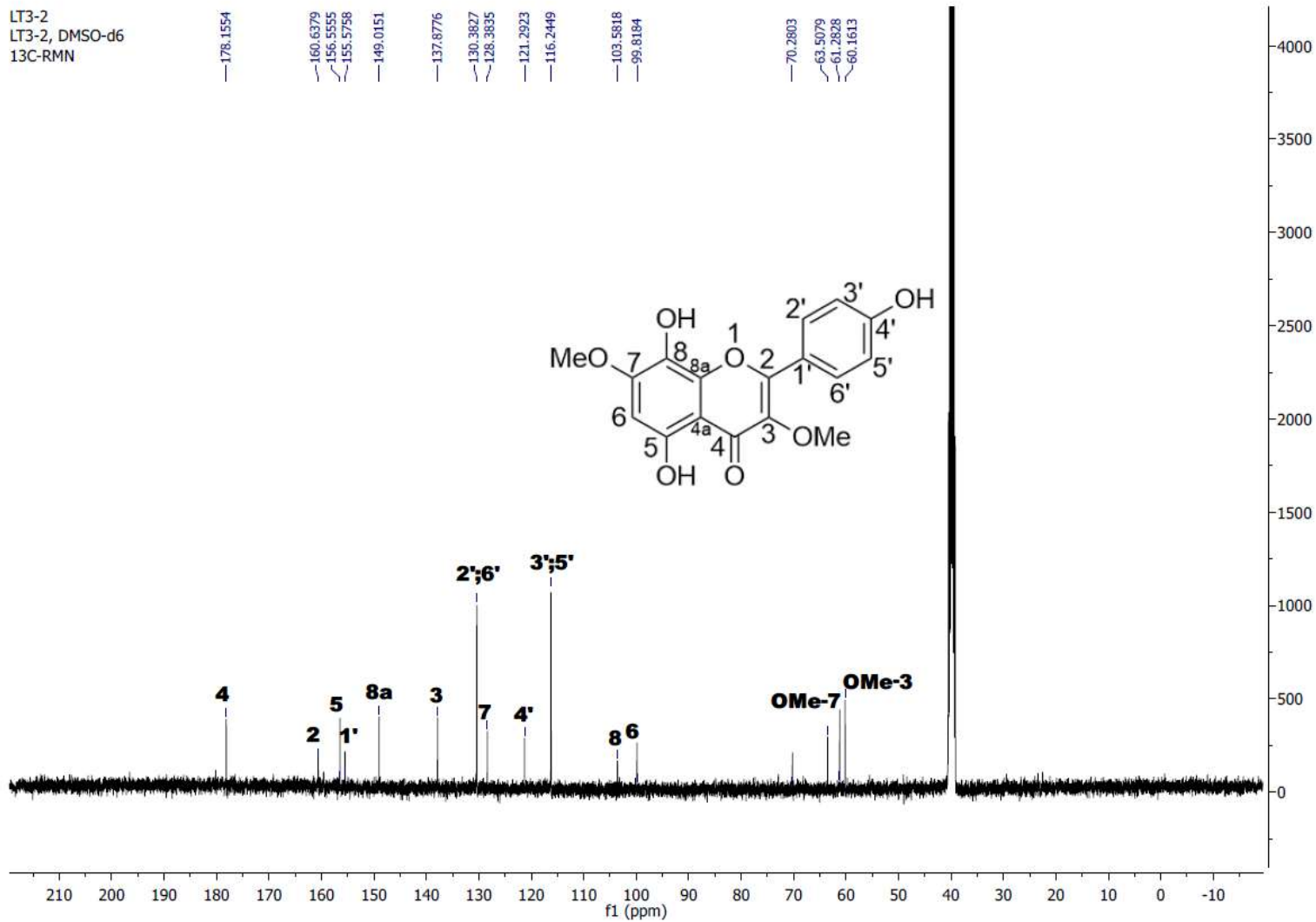


Figura 59. Espectro RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de Lt3: 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona

5.2. Análisis del extracto hexánico de *L. tridentata* por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)

Se logró caracterizar un alcano el nonacosano (11.12%) y un esteroide el β -sitosterol (24.61%), como compuestos mayoritarios del extracto hexánico de *L. tridentata*, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas; la identificación de los compuestos se logró mediante la comparación de los espectros de masas con la base de datos.

El único antecedente reportado sobre análisis por cromatografía de gases acoplado a masas de *L. tridentata* y otros especímenes del género *Zygophyllaceae*, es el de Bohnstedt et al., 1979⁷⁸, donde encontraron varios sustituyentes provenientes de la ruta biosintética del ácido mevalónico, constituyentes de los aceites esenciales y derivados de las vías de biosíntesis de ácidos grasos y de la ruta del shikimato. Comparando con el antecedente anterior se encuentra un punto de concordancia en la composición del extracto hexánico, al observarse la presencia de β -sitosterol (24.61 %) como metabolito secundario provenientes de la ruta del acetato mevalonato.

5.3. Actividad antibacteriana de los compuestos aislados del extracto clorofórmico de *L. tridentata* y de los derivados semi-sintéticos

Se determinó la actividad antibacteriana de los compuestos aislados del extracto clorofórmico, así como de dos derivados semi-sintéticos, contra 9 aislados clínicos fármacorresistentes (tabla 14). Todos los compuestos ensayados fueron inactivos (CMI >50 µg/mL) contra 5 de 6 bacterias gram negativas, y únicamente se observó actividad contra *K. pneumoniae* productora de BLEE por parte de tres compuestos: Lt3: 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona (CMI: 50 µg/mL), Lt8: 3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina (CMI: 25 µg/mL) y Lt20: ácido nordihidroguaiarético (CMI: 12.5 µg/mL), siendo menos activos que el estándar positivo levofloxacino (CMI: 1.15 µg/mL).

Contra las bacterias gram positivas, se observó actividad contra los tres aislados clínicos ensayados; para el caso de *E. faecium* resistente a vancomicina se determinó como activo el compuestos Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano (CMI: 50 µg/mL), así como también los compuestos Lt8: 3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina, Lt20: ácido nordihidroguaiarético, Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano, Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano y GN31: 4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-6,7'-ciclolignano todos con valor de CMI de 25 µg/mL; siendo estos últimos 4 veces menos potentes que el control positivo levofloxacino (CMI: 6.25 µg/mL).

Contra *S. aureus* resistente a meticilina (figura 54) todos los compuestos fueron activos excepto el Lt4: ácido *meso*-dihidroguaiarético (CMI >50 µg/mL), Lt3: 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona (CMI >50 µg/mL) y Lt5: 5,4'-dihidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona (CMI >50 µg/mL). Se observó actividad por parte de los compuestos Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano, Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano, todos con CMI de 25 µg/mL, siendo cuatro veces menos activos que el control positivo levofloxacino. Se observaron como los compuestos más activos el Lt8: 3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina, Lt20: ácido nordihidroguaiarético, Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano y GN31: 4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-6,7'-ciclolignano, todos con CMI de 12.5 µg/mL, siendo dos veces menos activo que el levofloxacino. Solo un compuesto igualó la actividad del control positivo levofloxacino (CMI: 6.25 µg/mL), y fue el derivado metilado GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano, con una CMI de 6.25 µg/mL, perfilándose como el compuesto más activo contra *S. aureus* resistente a meticilina.

Por último, contra *S. epidermidis* resistente a linezolid (figura 55) no se observó actividad por parte de los compuestos Lt4: ácido *meso*-dihidroguaiarético, Lt3: 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona y Lt5: 5,4'-dihidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona que mostraron una CMI mayor a 50 µg/mL. Se observó actividad por parte de los compuestos Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano, Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano y el derivado metilado GN31: 4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-6,7'-ciclolignano que tuvieron CMI de 25 µg/mL, siendo dos veces menos activos que el control positivo levofloxacino. Los compuestos más activos

fueron el Lt20: ácido nordihidroguaiarético, Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano y el derivado GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano, todos con una CMI de 12.5 µg/mL, mostrando una eficacia igual a la del control positivo levofloxacino (CMI: 12.5 µg/mL). El compuesto Lt8: 3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina mostró una CMI de 6.25 µg/mL, por lo que fue el compuesto más activo contra *S. epidermidis* resistente a linezolid, siendo dos veces más activo que el control positivo levofloxacino (CMI: 12.5 µg/mL). La tabla 14 resume la actividad antibacteriana de los compuestos ensayados.

Tabla 14

Actividad de compuestos aislados de *L. tridentata* contra bacterias fármacorresistentes

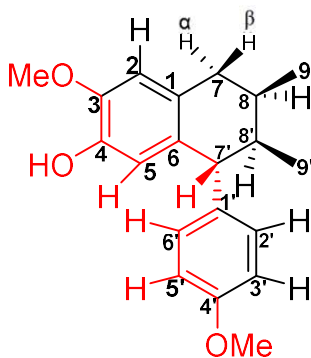
Compuesto	Aislados clínicos FR Gram negativos CMI (µg/mL)						Aislados clínicos FR Gram positivas CMI (µg/mL)		
	<i>A. baumannii</i> RC (12-666)	<i>E. coli</i> RO (OXA-48)	<i>E. coli</i> BLEE (14-2081)	<i>P. aeruginosa</i> RC (13-1391)	<i>K. pneumoniae</i> RCC NDM-1+ (14-3335)	<i>K. pneumoniae</i> BLEE (14-2081)	<i>E. faecium</i> RV (10-984)	<i>S. aureus</i> RM (14-2095)	<i>S. epidermidis</i> RL (14-583)
Lt4	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Lt8	>50	>50	>50	>50	>50	25	25	12.5	6.25
Lt20	>50	>50	>50	>50	>50	12.5	25	12.5	12.5
Lt16	>50	>50	>50	>50	>50	>50	25	12.5	12.5
Lt17	>50	>50	>50	>50	>50	>50	25	25	25
Lt18	>50	>50	>50	>50	>50	>50	50	25	25
GN30	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	6.25	12.5
GN31	>50	>50	>50	>50	>50	>50	25	12.5	25
Lt3	>50	>50	>50	>50	>50	50	>50	>50	>50
Lt5	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
LEV	12.5	>50	25	3.125	50	1.15	6.25	6.25	12.5

Lt4: ácido meso-dihidroguaiarético; **Lt8:** 3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina; **Lt20:** ácido nordihidroguaiarético; **Lt16:** 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano; **Lt17:** 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano; **Lt18:** 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano; **GN30:** 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano; **GN31:** 4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-6,7'-ciclolignano; **Lt3:** 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona; **Lt5:** 5,4'-dihidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona; **LEV:** levofloxacino; **RC:** resistente a carbapenémicos; **RO:** resistente a oxaciclinas; **BLEE:** productora de β-lactamasas de espectro extendido; **RCC:** resistente a carbapenémicos y cefalosporinas de amplio espectro; **RV:** resistente a vancomicina; **RM:** resistente a metilicina; **RL:** resistente a linezolid; **FR:** fármacorresistente

De los resultados observados en la tabla 14, está claro que los lignanos y flavonoides de *L. tridentata*, así como los derivados metilados de Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano muestran una deficiente actividad contra bacterias gram negativas; sin embargo, es de destacar la actividad de los compuestos polihidroxiados Lt8: 3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina (CMI: 25 µg/mL) y Lt20: ácido nordihidroguaiarético (CMI: 12.5 µg/mL) contra *K. pneumoniae* productora de BLEE. La actividad de los compuestos anteriormente mencionada puede ser debida a que solo poseen como sustituyentes grupos hidroxilo, por lo tanto, la diana farmacológica presente en *K. pneumoniae* productora de BLEE debe favorecer la interacción mediante puentes de hidrógeno múltiples. Contra las bacterias gram positivas se observó actividad antibacteriana en un rango de CMI de 50 a 6.25 µg/mL, siendo las cepas más sensibles a los compuestos ensayados *S. aureus* resistente a meticilina y *S. epidermidis* resistente a linezolid.

El derivado GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano mostró la mejor actividad contra *S. aureus* resistente a meticilina (CMI: 6.25 µg/mL), lo anterior puede ser debido al patrón de sustitución que muestra en sus anillos aromáticos, que es distinto a todos los lignanos ensayados, otorgándole una actividad comparable al estándar positivo levofloxacino (CMI: 6.25 µg/mL). En promedio, los lignanos muestran una CMI de 12.5 µg/mL, y tienen en común sustituyentes hidroxilo y metoxilo distribuidos en los anillos aromáticos en las posiciones 3, 4 y 4', y una estereoquímica que posiciona al anillo aromático para disustituido detrás del plano; lo que indica que dichos factores son clave respecto a la actividad

contra *S. aureus* RM, y la hipótesis se refuerza al observar el compuesto Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dihidroxi-6,7'-ciclolignano (CMI: 25 µg/mL) que incumple la condición de poseer un anillo aromático para disustituido, y el compuesto Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano (CMI: 25 µg/mL) que incumple con la condición de estereoquímica hacia atrás del plano de su anillo para disustituido, mostrando una CMI menor que los compuestos que cumplen con las características de estereoquímica y patrón de sustitución antes mencionados. En la figura 60 se indica la propuesta de sitios activos y patrón de sustitución óptimo (en color rojo) que otorga mejor actividad antibacteriana de lignanos contra *S. aureus* resistente a meticilina.



GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano
CMI: 6.25 µg/mL

Figura 60: sitios activos del derivado metilado GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano que mostro la mejor actividad contra *S. aureus* resistente a meticilina

Con base en las CMI mostradas por los compuestos ensayados en el presente trabajo (Figuras 61 y 62) se deduce que los principales metabolitos secundarios que otorgan actividad antibacteriana a *L. tridentata* son los lignanos Lt20: ácido nordihidroguaiarético, Lt8: 3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina y Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano.

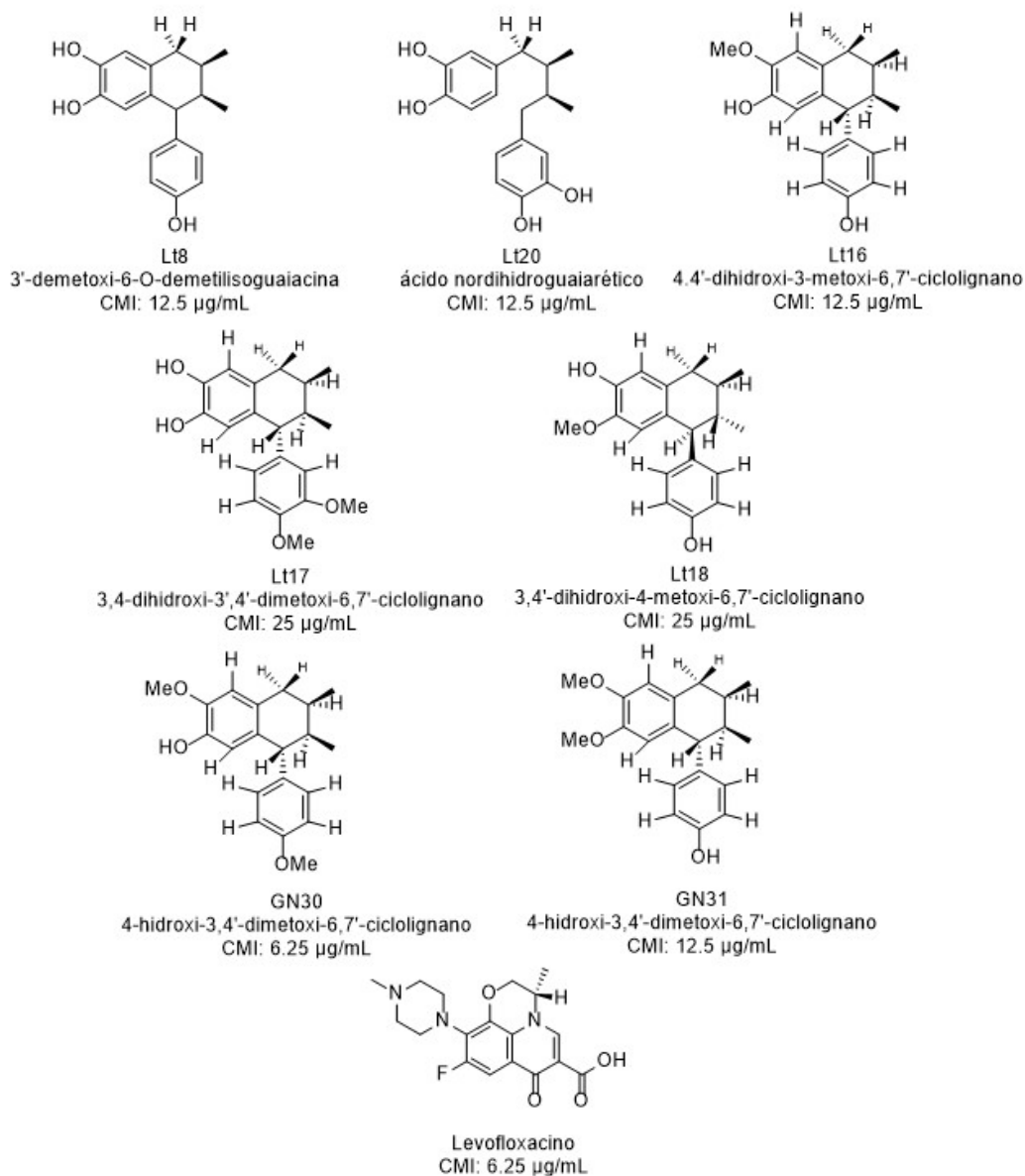


Figura 61. Compuestos activos contra *S. aureus* resistente a linezolid y control positivo levofloxacin

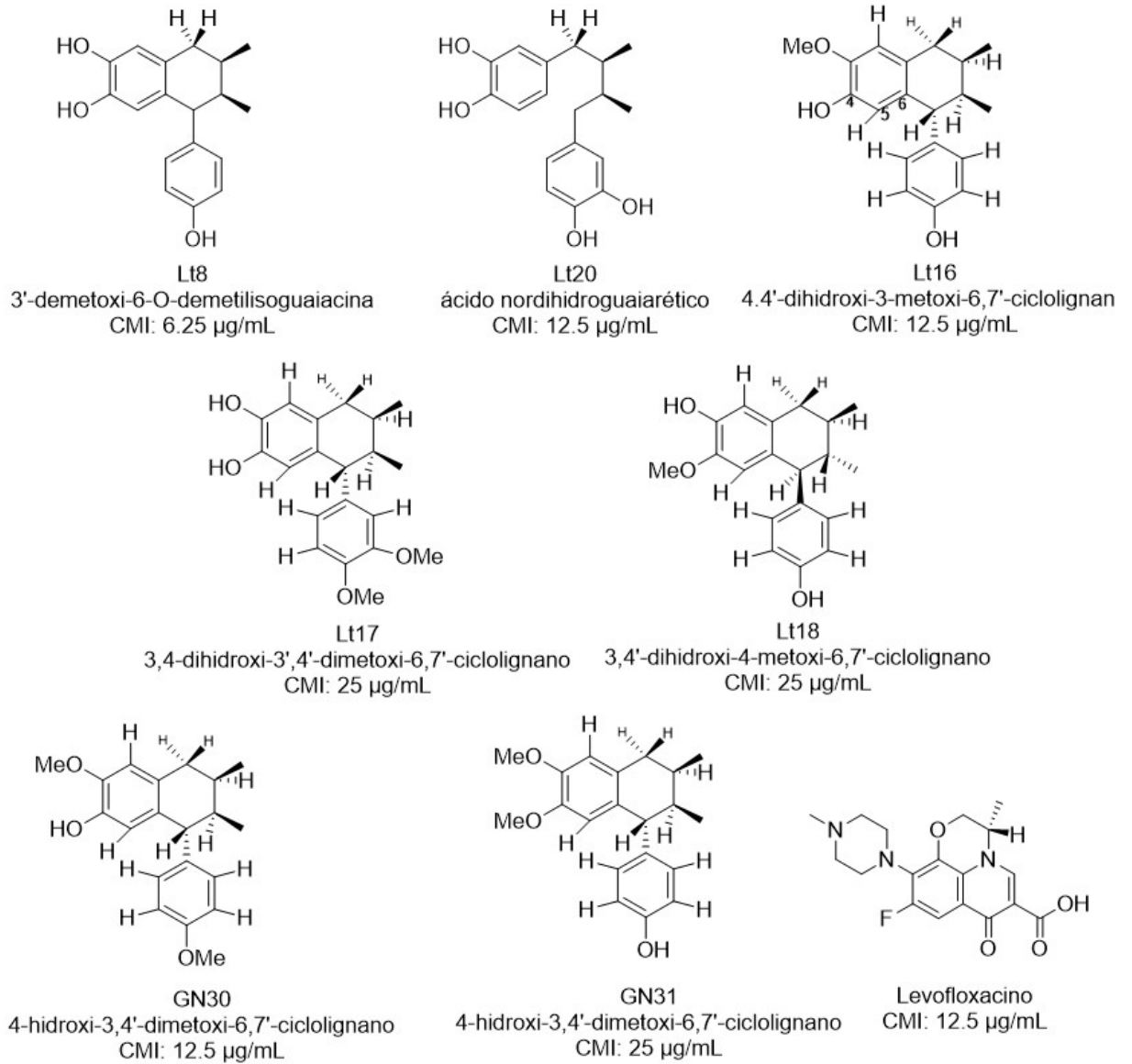


Figura 62. Compuestos activos contra *S. epidermidis* resistente a linezolid y control positivo levofloxacino

La actividad antibacteriana de Lt20: ácido nordihidroguaiarético contra *S. aureus* resistente a meticilina (CMI: 12.5 µg/mL) y *S. epidermidis* resistente a linezolid (CMI: 12.5 µg/mL), se puede explicar y contrastar con base en ensayos realizados por otros autores como Shin y Harris, 1977, que reportaron la actividad antibacteriana de Lt20 al probarlo contra las cepas ATTC *E. coli* y *S. aureus* que fueron cultivadas en medio líquido soya-tripticosa que contenía diversas concentraciones de Lt20, y se observó que una concentración de 400 ppm inhibía el crecimiento de *E. coli* en el medio, además de que una concentración de 50 ppm fué suficiente para inhibir el crecimiento de *S. aureus*⁷⁹; adicionalmente, Cunningham-Oakes *et al.*, 2015, reportó la actividad antibacteriana de Lt20 como sinergista, al ensayarse en conjunto con los aminoglucósidos gentamicina, nemonicina y tobramicina contra 200 aislados clínicos de *S. aureus* sensible y resistente a meticilina, y mediante ensayos *in vitro* “checkerboard” se observó sinergia entre Lt20 y los aminoglucósidos contra el 97% de los aislados clínicos; además, mediante pruebas *in vivo* en modelos murinos de infección cutánea, se observó un incremento en la actividad de los aminoglucósidos al ser administrados en conjunto con Lt20⁸⁰.

La actividad antibacteriana de Lt20 puede explicarse mediante el mecanismo de acción propuesto por Cunningham-Oakes *et al.*, 2015⁸⁰ en concordancia con lo reportado por Ooi *et al.*, 2015⁸¹ al evaluar el daño a la membrana de *S. aureus* y *S. epidermidis* por parte de Lt20 y otros compuestos antioxidantes mediante un análisis “time-kill” para determinar el cese de la fase de crecimiento logarítmica bacteriana. El mecanismo implica que el Lt20, al poseer hidroxilos fenólicos daña

la membrana bacteriana ocasionando fuga de ATP, además de causar también la precipitación de algunos componentes del citoplasma bacteriano. El compuesto Lt20 al vulnerar la membrana bacteriana, facilita la difusión de otras sustancias al interior de la bacteria, explicándose de ese modo su actividad como sinergista⁸⁰.

Al igual que el compuesto Lt20, el ciclolignano Lt8: 3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina mostró su mejor actividad antibacteriana contra las bacterias gram positivas *S. aureus* resistente a meticilina (CMI: 12.5 µg/mL) y *S. epidermidis* resistente a linezolid (CMI: 6.25 µg/mL), dichos resultados son comparables con lo reportado por Favela-Hernández *et al.*, 2012⁷², que determinó que el compuesto Lt8 es el compuesto responsable de la actividad antibacteriana de *L. tridentata*, mostrando contra diversas cepas de *S. aureus* y *S. aureus* resistente a meticilina una CMI en el rango de 25-12.5 µg/mL; por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente trabajo se confirman y validan con base en el antecedente, además, si se toma en cuenta que el compuesto Lt8 es extraído de fracciones de extractos de *L. tridentata* con actividad anti-VIH según lo reportado por Gnabre *et al.* 1995, el compuesto en cuestión podría ser candidato a fármaco antibacterial para tratar infecciones en pacientes VIH positivos^{63,64}. En cuanto al mecanismo de acción antibacterial propuesto para Lt8 contra bacterias gram positivas, en este caso contra *S. aureus*, los resultados reportados por Favela-Hernández *et al.*, 2015 indicaron que al igual que Lt20, el compuesto afecta la membrana bacteriana, en este caso interfiriendo con sistema

de transporte en membrana “ATP-binding Cassette” o sistema ABC, causando la muerte de la bacteria⁷⁵.

El compuesto Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano, fué uno de los productos naturales nuevos aislados de *L. tridentata*, y al no existir precedentes sobre esta molécula en ningun organismo, se acentúa su importancia como nuevo compuesto antibacteriano, mostrando una actividad equiparable a los mejores compuestos antibacterianos de *L. tridentata*, el Lt20 y Lt8, con una CMI de 12.5 µg/mL contra las bacterias gram positivas *S. aureus* resistente a meticilina y *S. epidermidis* resistente a linezolid; por lo tanto, Lt16 tiene el mismo potencial como agente antibacterial que Lt8; un resultado alentador para posteriores estudios con los ciclolignanos nuevos de *L. tridentata*. El posible mecanismo de acción de Lt16 pueda ser distinto al de Lt20 y Lt8, ya que es diferente a dichos compuestos al poseer un metoxilo en su estructura (figura 57 y 58) y por lo tanto su actividad bactericida puede verse influeciada de un modo distinto a la de un lignano polihidroxiado como Lt8 y Lt20. Adicionalmente, mediante la metilación de Lt16, los derivados GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano y GN31: 4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-6,7'-ciclolignano mostraron una actividad equiparable a los mejores compuestos antibacteriales de *L. tridentata* Lt20, Lt8 y Lt16 (figura 57 y 58), en especial el derivado GN30 que fué el compuesto más activo de entre todos los ensayados contra *S. aureus* resistente a meticilina, con una CMI de 6.25 µg/mL. Por todo lo anterior mencionado, la derivatización del compuesto Lt16 por metilación incrementa notoriamente su actividad antibacterial hasta el punto de que el derivado GN30 mostró ser igual

de efectivo que el control positivo levofloxacio (figura 57 y 58), por lo tanto, Lt16 resulta ser el compuesto más prometedor como nuevo agente antibacterial, y una perspectiva importante para el proyecto será la subsecuente derivatización de esté ciclolignano para incrementar su efectividad antibacterial.

Al igual que Lt16, los compuestos Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-cicolignano y Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-cicolignano son lignanos no reportados, y a pesar de que su actividad antibacterial no fue tan buena como la de los compuestos Lt20, Lt8 y Lt16 (figura 57 y 58) con una CMI de 25 µg/mL contra *S. aureus* resistente a meticilina y *S. epidermidis* resistente a linezolid, su descubrimiento es importante como aportación a la química y farmacología de *L. tridentata* al ser este trabajo el primer reporte de actividad biológica de moléculas con la estructura de Lt17 y la estereoquímica de Lt18 (figura 57 y 58), además de que al ser activos contra bacterias gram positivas, plantean la posibilidad de que puedan mostrar actividad contra aislados clínicos distintos a los probados en el presente trabajo.

Por último, el lignano de tipo butano Lt4: ácido meso-dihidroguaiarético, y los flavonoides Lt3: 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona y Lt5: 5,4'-dihidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona no parecen ser buenos candidatos a fármacos antibacteriales, mostrándose inactivos contra los 9 aislados clínicos ensayados, con la excepción del compuesto Lt3 que mostro una CMI de 50 µg/mL contra *K. pneumoniae productora* de BLEE; dichos resultados concuerdan con lo reportado por Favela-Hernández *et al.* 2012⁷². A pesar de lo anterior mencionado, estudios previos

como el de Kawaguchi *et al.*, 2009 reporta actividad antibacterial de los estereoisómeros de Lt4 en su forma (+), (-) y (*meso*) contra *Bacillus subtilis*, *S. aureus* y *Listeria denitrificans*⁸², por lo tanto, Lt4 podría mostrar actividad antibacterial contra aislados clínicos diferentes a los del presente estudio. En el caso de los flavonoides, en estudios previos como el de Martini *et al.*, 2004 se reporta actividad antibacteriana contra diversas bacterias, destacando la actividad por parte de varios análogos estructurales de Lt3 y Lt5 contra *Vibrio cholerae* en un rango de CMI de 50-25 µg/mL⁸³, por lo que el estudio de los flavonoides de *L. tridentata* podría orientarse hacia la determinación de actividad antidisentérica.

5.4. Actividad antimicobacteriana de los compuestos aislados del extracto clorofórmico de *L. tridentata* y de derivados semi-sintéticos

Se determinó la actividad antimicobacteriana de los compuestos aislados del extracto clorofórmico, así como de dos derivados semi-sintéticos (tabla 16). Las cepas contra las que se ensayaron los compuestos fueron la cepa *M. tuberculosis* H37Rv sensible a todos los fármacos de primera línea y el aislado clínico *M. tuberculosis* G122 resistente a rifampicina, etambutol y estreptomicina. El compuesto ácido meso-dihidroguaiarético no fue evaluado en vista que su actividad antimicobacteriana (CMI: 50-12.5 µg/mL) ya fue reportada previamente por Favela-Hernández *et al.*,2012⁷².

El compuesto Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano fue inactivo contra *M. tuberculosis* H37Rv (CMI >50 µg/mL), pero mostró actividad contra la cepa G122 (CMI: 50 µg/mL). Los compuestos Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano y GN31: 4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-6,7'-ciclolignano mostraron actividad (CMI: 50 µg/mL) contra las dos cepas ensayadas. El compuesto Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano fue activo contra la cepa sensible H37Rv (CMI: 25 µg/mL) y resistente G122 (CMI: 25 µg/mL); y su actividad fue superada únicamente por la del compuesto GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano que tuvo actividad contra la cepa sensible H37Rv (CMI: 25 µg/mL) y contra la cepa resistente G122 (CMI: 12.5 µg/mL) siendo dos veces menos activo que el control positivo etambutol (figura 56). En la tabla 15 se resumen la actividad antimicobacteriana de los compuestos ensayados.

Tabla 15

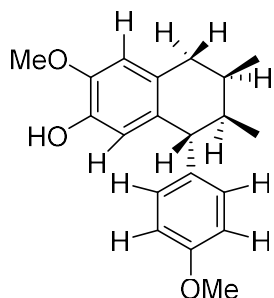
**Actividad antimicobacteriana de los compuestos obtenidos de
*L. tridentata***

Compuesto	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. tuberculosis</i> G122	Log P
Lt8: 3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina	>50	>50	4.35
Lt20: ácido nordihidroguaiarético	>50	>50	4.48
Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano	50	50	4.62
Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	25	25	4.49
Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano	50	>50	4.62
GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	25	12.5	4.88
GN31: 4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-6,7'-ciclolignano	50	50	4.88
Lt3: 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona	>50	>50	0.98
Lt5: 5,4'-dihidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona	>50	>50	1.24
Isoniacida	0.195	0.195	-0.64
Rifampicina	0.195	1.56	N.A.
Etambutol	3.125	6.25	0.06

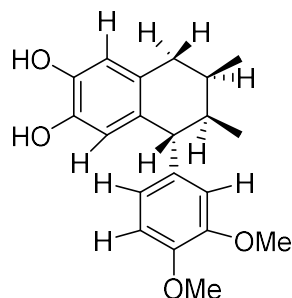
H37Rv: sensible a todos los fármacos de primera línea, **G122:** resistente a rifampicina, etambutol y estreptomina; **N.A.:** no aplica

Con base en los resultados observados, es de destacar que los compuestos que resultaron activos, son todos ciclolignanos que poseen por lo menos un metoxilo en su estructura, lo que parece resultar clave en cuanto a actividad antimicobacteriana para los lignanos ensayados, y dicha hipótesis se sustenta en el hecho de que el lignano Lt8 solo posee grupos hidroxilo en su estructura, y resulto inactivo, a diferencia de por ejemplo el compuesto activo Lt16 que es muy similar a Lt8, excepto por el hecho de que posee un grupo metoxilo en posición 3'. Los compuestos con mejor actividad antimicobacteriana fueron el Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano (CMI 25 µg/mL) y el derivado metilado GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano (CMI 25-12.5 µg/mL) que se sintetizó a partir del ciclolignano Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano. Los resultados observados indican que los grupos metoxilo son clave para la

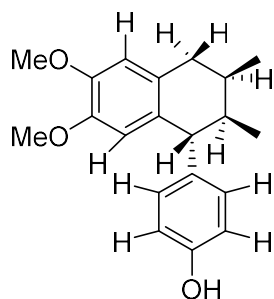
actividad antimicobacteriana en lignanos, debido a que incrementan el LogP de los compuestos, haciéndolos más lipofílicos y facilitando la penetración de los mismos a través de la membrana rica en ácidos micólicos de la micobacteria, y a mayor número de grupos metoxilo en la molécula, se observa un mayor incremento de LogP, y por lo tanto de actividad antimicobacteriana, entonces, es evidente que los compuestos Lt17 (CMI: 25 µg/mL, Log P: 4.49) y GN30 (CMI: 25-12.5 µg/mL, Log P: 4.88) son los ciclolignanos más activos al mostrar el mayor número de metoxilos de las moléculas ensayadas, y por lo tanto, los LogP más lipofílicos. El compuesto GN31: 4'-hidroxi-3,4-dimetoxi-6,7'-ciclolignano (CMI: 50 µg/mL, Log P: 4.88), a pesar de que cumple con las condiciones de metoxilación y LogP antes mencionadas, mostro actividad antimicobacteriana mas baja que GN30 y Lt17 (figura 63), debido probablemente a que los metoxilos se encuentran en el anillo aromático tetrasustituido del lignano, y no en el anillo aromático *para*-disustituido; por lo tanto, se puede considerar que la posición óptima de los metoxilos para otorgar actividad antimicobacteriana, es en el anillo aromático *para*-disustituido.



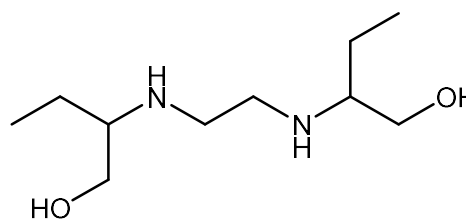
GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano
H37Rv CMI:25 µg/mL
G122 CMI:12.5 µg/mL



Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano
H37Rv CMI:25 µg/mL
G122 CMI:25 µg/mL



GN31: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano
H37Rv CMI:50 µg/mL
G122 CMI:50µg/mL

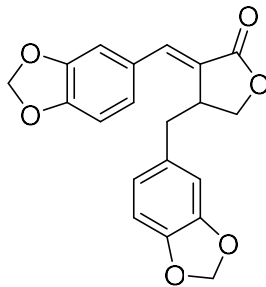


Etambutol
H37Rv CMI:3.125 µg/mL
G122 CMI: 6.25 µg/mL

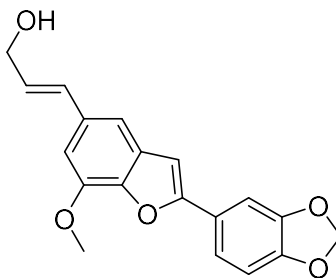
Figura 63: Compuestos dimetoxilados activos contra *M. tuberculosis* H37Rv;
G122 y control positivo etambutol

All comparar los resultados anteriores con lo reportado con Favela-Hernández *et al.*, 2012⁵³, se observa concordancia con lo expuesto en el presente trabajo, ya que se confirmó que los lignanos son los principales responsables de la actividad antimicobacteriana del extracto clorofórmico de *L. tridentata*, además de que se confirmó también que los flavonoides son inactivos contra *M. tuberculosis*. Considerando que el rango de CMI que mostraron los compuestos activos fué de 50 a 12.5 µg/mL, se sugiere establecer las cifras anteriores como un intervalo de actividad para definir a un lignano como prospecto prometedor para ser

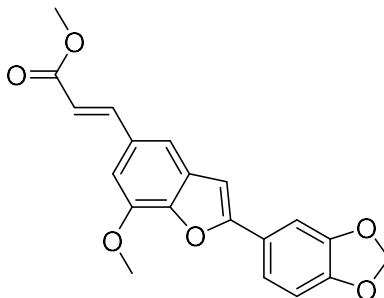
desarrollado como fármaco antimicobacteriano, y la propuesta se sustenta al comparar con lo reportado por Luo *et al.*, 2013⁸⁴, que determinó la actividad antimicobacteriana *in vitro* de lignanos y alcaloides aislados de *Zanthoxylum capense*, encontrando que los lignanos (-)-sesamina y (-)-episesamina mostraron actividad en un rango de CMI de 50 a 25 µg/mL contra cepas de *M. tuberculosis* H37Rv en sus variantes virulenta y avirulenta, además de que también se observó que los lignanos (E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)enediol, (E)-3-(2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-metoxibenzofuran-5-il)prop-2-en-1-ol y metil (E)-3-(2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-metoxibenzofuran-5-il)acrilato (figura 60) no mostraron actividad antimicobacteriana, con CMI mayor a 50 µg/mL; por lo tanto, el rango de actividad anteriormente propuesto puede representar un factor en común entre lignanos prometedores a convertirse en nuevos fármacos antimicobacterianos; así entonces, el rango de actividad antimicobacteriana (CMI: 50-12.5 µg/mL) debería ser considerado como un criterio de selección para el desarrollo de derivados de lignanos con actividad antimicobacteriana. Al observar las estructuras de la figura 64, se observa que al igual que con los lignanos del presente trabajo, al incrementarse el LogP en las moléculas, se incrementa la actividad antimicobacteriana, por lo que se sustenta la hipótesis antes mencionada de que a mayor lipofilicidad se observa mayor actividad, por lo tanto, el LogP de los compuestos debe ser un segundo criterio de selección de lignanos prometedores.



(*E*)-4-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetilen)dihidrofuran-2(3*H*)-ona
 H37Rv CMI: 50-25 µg/mL
 Log P: 3.84



(*E*)-3-(2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-7-metoxibenzofuran-5-il)prop-2-en-1-ol
 H37Rv CMI: >50 µg/mL
 Log P: 2.97

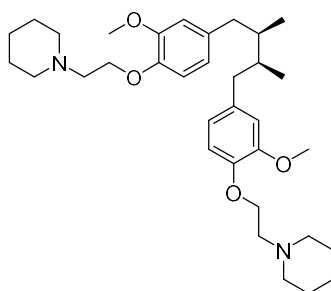


metil (*E*)-3-(2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-7-metoxibenzofuran-5-il)acrilato
 H37Rv CMI: >50 µg/mL
 Log P: 3.19

Figura 64: Lignanos extraídos de *Zanthoxylum capense* que fueron activos e inactivos contra *M. tuberculosis* H37Rv

Lo anteriormente analizado postula las bases para el desarrollo biodirigido de lignanos antimicobacterianos provenientes de fuentes naturales, sin embargo,

para una mejora óptima de compuestos antimicobacterianos, se debe incrementar su actividad tal como se realizó en el presente trabajo, mediante la derivatización por semisíntesis, y se tiene como prueba inapelable de lo anterior el estudio realizado por Reyes-Melo *et al.*, 2017⁸⁵, que reporto la actividad antimicobacteriana de derivados semisintéticos del compuesto Lt4: ácido *meso*-dihidroguaiarético, y reportó como uno de los compuestos más activos al derivado *meso*-31 (figura 65) con CMI en un rango de 6.25-3.125 µg/mL contra la cepa H37Rv sensible a los fármacos de primera línea y dos cepas fármacorresistentes (G122, G133), y se observó que su actividad fue comparable a la del fármaco de primera línea etambutol, y tomando en cuenta que la plataforma de síntesis Lt4 (CMI: 50-12.5 µg/mL) es menos activa que *meso*-31, se reafirma el hecho de que la derivatización de lignanos es una de las mejores vías para optimizar la actividad biológica en este tipo de productos naturales.



meso-31
H37Rv CMI: 3.125 µg/mL
G122 CMI: 6.25 µg/mL
G133 CMI: 6.25 µg/mL

Figura 65: mejor lignano antimicobacteriano sintetizado a partir del ácido *meso*-dihidroguaiarético⁸⁵

Tal como se observa en la figura 63, los compuestos más activos contra *M. tuberculosis* son todos ciclolignanos dimetoxilados, por lo que su mecanismo de acción podría ser fundamentado en la interacción de los grupos metoxilo con la diana farmacológica presente en la micobacteria, lo que concuerda con Clemente-Soto *et al.* 2014⁵⁴ que reportó el mecanismo de acción contra *M. tuberculosis* H37Rv del Lt4 que es un lignano de tipo butano dimetoxilado. El mecanismo se basó en la interacción del compuesto con la enzima CoA-transferasa de *M. tuberculosis* ocasionando la acumulación de geraniol y del 2-metil-naftaleno hasta concentraciones letales para la micobacteria; dicho mecanismo podría no ser la mejor propuesta para los lignanos dimetoxilados más activos del presente trabajo, ya que a diferencia de Lt4, los compuestos Lt17 y GN30 son ciclolignanos, por lo tanto no se puede asumir el mecanismo de acción con base a lo reportado por Clemente-Soto *et al.* 2014⁵⁴ , y así entonces la propuesta de mecanismo de acción debe realizarse como una perspectiva del proyecto.

6. CONCLUSIONES

1. Del extracto hexánico de *L. tridentata* se caracterizaron por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas el alcano nonacosano (11.12%) y un esteroide, el β -sitosterol (24.61 %) como los compuestos mayoritarios de este extracto.
2. Del extracto clorofórmico se aislaron y caracterizaron 3 ciclolignanos nuevos no reportados previamente en *L. tridentata* y representan nuevos productos naturales que mostraron actividad antimicobacteriana: Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano (CMI: 50 μ g/mL, H37Rv y G122), Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano (CMI: 50 μ g/mL, H37Rv) y Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano (CMI: 25 μ g/mL, H37Rv, G122). Los compuestos nuevos poseen actividad antibacteriana contra las bacterias gram positivas: *E. faecium* resistente a vancomicina, *S. aureus* resistente a meticilina y *S. epidermidis* resistente a linezolid, mostrando las siguientes actividades: Lt16 (CMI: 25-12.5 μ g/mL), Lt18 (CMI: 25 μ g/mL) y Lt17 (CMI: 50-25 μ g/mL). Los resultados obtenidos validan la hipótesis propuesta de que *L. tridentata* es fuente de nuevos compuestos con actividad antibacteriana y antimicobacteriana.
3. Se determinó que Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano mejora su actividad antibacteriana contra las cepas *S. aureus* resistente a meticilina

y *S. epidermidis* resistente a linezolid al tener un metoxilo en la posición 4', observándose en el derivado 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano una CMI en el rango de 12.5 a 6.25 µg/mL. Del mismo modo el derivado antes mencionado mostró la mejor actividad antimicobacteriana de entre todos los compuestos ensayados, con un rango de CMI de 25 a 12.5 µg/mL contra la cepa sensible H37Rv y el aislado clínico MFR G122. Se concluye que el ciclolignano nuevo Lt16 es prometedor como plataforma para semisíntesis de nuevos agentes antibacterianos y antimicobacterianos al verse una mejoría notoria en su actividad biológica sin necesidad de ser modificado drásticamente en su estructura base.

4. Se aislo y caracterizo 4 lignanos previamente reportados en *L. tridentata*: Lt4: ácido meso-dihidroguaiarético, Lt20: ácido nordihidroguaiarético, Lt8: 3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina, y el Lt21: 3'-demetoxi-isoguaiacina; así como también dos flavonoides: Lt3: 5,8,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona y Lt5: 5,4'-dihidroxi-3,7,8-trimetoxiflavona.
5. Los compuestos Lt8: 3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina, Lt16: 4,4'-dihidroxi- 3-metoxi-6,7'-ciclolignano y Lt20: ácido nordihidroguaiarético, fueron dos veces menos activo que el levofloxacino contra la cepa de *S. aureus* resistente a meticilina. Adicionalmente, se observo actividad muy buena por parte del derivado semi-sintetico GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano con una CMI de 6.25 µg/mL, comparable a la del control positivo levofloxacino.

6. Para la cepa *S. epidermidis* resistente a linezolid se observó que el Lt20: ácido nordihidroguaiarético tuvo una CMI de 12.5 µg/MI siendo tan activo como el control positivo levofloxacino (CMI: 12.5 µg/mL). El compuesto Lt8: 3'-demetoxi-6-O-demetilisoguaiacina mostro una CMI de 6.25 µg/mL, siendo dos veces más activo que el control positivo levofloxacino (CMI: 12.5 µg/mL).

7. PERSPECTIVAS

1. Determinar el mecanismo de acción contra *S. aureus* resistente a metilina y contra *M. tuberculosis* H37Rv del derivado semi-sintético GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano mediante el uso de microarreglos validados por RT-qPCR.
2. Derivatizar el compuesto GN30: 4-hidroxi-3,4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano con el fin de incrementar su actividad antibacteriana y antimicobacteriana.
3. Determinar la citotoxicidad de los ciclolignanos Lt16: 4,4'-dihidroxi-3-metoxi-6,7'-ciclolignano, Lt18: 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano y Lt17: 3,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7'-ciclolignano para determinar su potencial como nuevos agentes anticancerígenos.

8. REFERENCIAS

1. D. Bottai, T. P. Stinear., P. Supply, R. Brosch. Mycobacterial pathogenomic and evolution. *Microbiology Spectrum*. 2 (1): MGM2-0025. (2013).
2. World Health Organization (WHO). *Global Tuberculosis Report 2016*. (2016).
3. E. Steven, B. A. Weinberger, J. M. Cockrill. *Principles of Pulmonary Medicine*. Mosby Elsevier. 5: 310 (2008).
4. D.A Mitchinson. Drug resistance in tuberculosis. *Eur Respir J*; 25: 376–379 (2005).
5. J. M. Musser. Antimicrobial agent resistance in Mycobacteria: Molecular genetic insights. *Clinical Microbiology Reviews*; 8, 496-514 (1995).
6. R. Ashok, K. Awdhesh, A. Nishat. Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis: Molecular Perspectives. *Emerging Infectious Diseases*; 4: 195-209 (1998).
7. J. C. Palomino, A. Martin. Drug Resistance Mechanisms in Mycobacterium tuberculosis. *Antibiotics* 2014, 3, 317-340 (2014).
8. Secretaría de Salud, CENAVECE/OPS-OMS/CONAVE/INER/InDRE. *MDR-TB. 2017. Tuberculosis*; 1.
9. C. Y. Cacho. *Epidemiología de la tuberculosis en México*. [<http://conacytprensa.mx/index.php/ciencia/salud/1103-epidemiologia-de-la-tuberculosis-en-mexico>] (Accesada el 22 de febrero del 2016).

10. Secretaría de Salud. Boletín epidemiológico sistema nacional de vigilancia epidemiológica sistema único de información. 34: 25 (2017).
11. Secretaría de Salud. Tuberculosis, información general de micobacteriosis. 2016. [[/www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/tuberculosis](http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/tuberculosis)] (Accesada el 05 de julio del 2017).
12. Jagadish Chandrabose Sundaramurthi, Luke Elizabeth Hanna, Sriram Selvaraju, Sridharan Brindha, J. Joel Gnanadoss, Savarian Vincent, Harpreet Singh, Soumya Swaminathan. TBDRUGS-Database of drugs for tuberculosis. Tuberculosis.100: 69-71 (2016).
13. Organización Mundial de la Salud (OMS). Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. ISBN 978 92 4 350976 1 (2016).
14. World Health Organization (WHO). Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance. ISBN 978 92 4 156474 8 (2014).
15. World Health Organization (WHO). 10 Facts on antimicrobial resistance. [http://www.who.int/features/factfiles/antimicrobial_resistance/facts/en/] (Accesada el 05 de julio del 2017).
16. World Health Organization (WHO). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, Discovery, and development of new antibiotics. (2017).
17. Ahmed Khan Hassan, Kanwal Baig Fatima, Mehboob Riffat. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. Asian Pac J Trop Biomed. 7(5): 478–482 (2017).

18. Secretaría de Salud. Medición de la prevalencia de infecciones nosocomiales en hospitales generales de las principales instituciones públicas de salud. (2011).
19. Secretaria de Salud. Boletín epidemiológico sistema nacional de vigilancia epidemiológica sistema único de información. (34): 38 (2017).
20. R. L. Kradin, S. Digumarthy. The pathology of pulmonary bacterial infection. (2017).
21. L. B. Brunton, J. S. Lazo, K. L. Parker. Goodman y Gilman. Las bases de la farmacología de la terapéutica. McGraw-Hill – Interamericana. Edición 11.1095, 1111-1113, 1127-1130, 1155-1158, 1173-1178 (2007).
22. G. D. Wright. Opportunities for natural products in 21st century antibiotic Discovery. Nat. Prod. Rep. (34): 694-701 (2017).
23. E. Martens, A. L. Demain. The antibiotic resistant crisis, with a focus on the United States. The Journal of Antibiotics. (70): 520–526 (2017).
24. G. A. Cordell, M. D. Colvard. Natural products and traditional medicine: turning on a paradigm. Journal of Natural Products. 23; 75(3): 514-25 (2012).
25. D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader. The influence of natural products upon drug Discovery. (17):215-234 (2000).
26. J. L. Ríos, R. M. Giner, J. M. Prieto. New findings on the bioactivity of lignans. Atta-ur-Rahman (Ed.) Studies in Natural Products Chemistry. 26 (2002).

27. Tian-yang Wuang, Qing Li, Kai-shun Bi. Bioactive flavonoids in medicinal plants: structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. (2017).
28. S. Arteaga, C. A. Andrade, R. Cárdenas. *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *Journal of Ethnopharmacology*. (98): 231–239 (2005).
29. J. Gnabre, R. Bates, Huag Ru Chih. Creosote bush lignans for human disease treatment and prevention: Perspectives on combination therapy. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. (5); 119e126 (2015).
30. CONABIO, *Larrea Tridentata*. *Contr. U.S. Natl. Herb*. 4:75 (1983).
31. I. Roskar, B. Strukelj, M. Lunder. Screening of Phenolic Compounds Reveals Inhibitory Activity of Nordihydroguaiaretic Acid Against Three Enzymes Involved in the Regulation of Blood Glucose Level. *Plant Foods Hum Nutr*. (71): 88–89 (2016).
32. G. del Vecchyo-Tenorio; R. Cardenas-Vazquez; M. Rodriguez-Cruz; A. Andrade-Cetto. Creosote Bush (*Larrea tridentata*) Improves Insulin Sensitivity and Reduces Plasma and Hepatic Lipids in Hamsters Fed a High Fat and Cholesterol Diet. *Frontiers in pharmacology*. (7): 194 (2016).
33. M. J. Reed, K. Meszaros, L. J. Entes, M. D. Claypool, J. G. Pinkett, D. Brignetti, J. Luo, A. Khandwala, G. M. Reaven. Effect of masoprocol on carbohydrate and lipid metabolism in a rat model of type II diabetes. *Diabetologia*. 42 (1): 102-106 (1999).

34. J. Luo, T. Chuang, J. Cheung, J. Quan, J. Tsai, C. Sullivan, H. F. Richard, M. J. Reed, K. Meszaros, S. R. King, T. J. Carlson, G. M. Reaven. Masoprocol (nordihydroguaiaretic acid): a new antihyperglycemic agent isolated from the creosote bush (*Larrea tridentata*). *European Journal of Pharmacology*. 346 (1): 77-79 (1998).
35. Li-Jun Zhang, Jing Wu, Dong-Mei Xing, Yu Liu, Fu-Hai Jia, Da-Tong Li. Nordihydroguaiaretic Acid (NDGA) Promotes Functional Recovery after Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Lat. Am. J. Pharm.* 33 (6): 994-1000 (2014).
36. Liu Yu, Wang Di Qu, You-Yang, Xiao Xing-Jun, Zhu Yu-Lan. Protecting Effect of Nordihydroguaiaretic Acid on Brain Edema After Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury and the Role of 12/15-Lipoxygenase. *Lat. Am. J. Pharm.* 33 (4): 601-6 (2014).
37. N. Cardenas-Rodriguez, S. Guzman-Beltran, N. O. Medina-Campos, M. Orozco-Ibarra, L. Massieu, J. Pedraza-Chaverri. The effect of nordihydroguaiaretic acid on iodoacetate-induced toxicity in cultured neurons. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 23 (2): 137-142 (2009).
38. J. Hernández-Damian, A. C. Anderica-Romero, J. Pedraza-Chaverri. Paradoxical Cellular Effects and Biological Role of the Multifaceted Compound Nordihydroguaiaretic Acid. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* (347): 685–697 (2014).
39. S. Guzman-Beltran, J. Pedraza-Chaverri, S. Gonzalez-Reyes, F. Hernandez-Sanchez, U. E. Juarez-Figueroa, Y. Gonzalez, K. Bobadilla, M.

- Torres. Nordihydroguaiaretic acid attenuates the oxidative stress-induced decrease of CD33 expression in human monocytes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 14 (2013).
40. A. Zuniga-Toala, O. N. Medina-Campos, S. Espada, A. Cuadrado, J. Pedraza-Chaverri. Nordihydroguaiaretic acid induces heme oxygenase-1 (HO-1) and cytoprotection in a phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K)-dependent way in renal epithelial (LLC-PK1) cells. 7(5): 186-190 (2013).
41. A. Zuniga-Toala, E. Tapia, C. Zazueta, F. Correa, Z. L. Zatarain-Barron, R. Hernandez-Pando, G. Zarco-Marquez, O. N. Medina-Campos, J. Pedraza-Chaverri. Nordihydroguaiaretic acid pretreatment prevents ischemia and reperfusion induced renal injury, oxidant stress and mitochondrial alterations. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6 (15): 2938-2947 (2012).
42. W. J. Redmond, M. Camo, V. Mitchell, C. W. Vaughan, M. Connor. Nordihydroguaiaretic acid activates hTRPA1 and modulates behavioral responses to noxious cold in mice. *Pharma Res Per*. 2(6) (2014).
43. Lu Jian-Ming, Nurko Jacobo, Jiang Jun, Weakley Sarah M., Lin Peter H., Yao Qizhi, Chen Changyi. Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) inhibits ritonavir-induced endothelial dysfunction in porcine pulmonary arteries. *Medical Science Monitor*. 17 (11): 312-318 (2011).
44. H. Yamamura, N. Nagano, M. Hirano, K. Muraki, M. Watanabe, Y. Imaizumi. Activation of Ca²⁺-dependent K⁺ current by nordihydroguaiaretic acid in porcine coronary arterial smooth muscle cells.

Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 291 (1): 140-146 (1999).

45. P. Yam-Canul, Y. I. Chirino, D. J. Sanchez-Gonzalez, C. M. Martinez-Martinez, C. Cruz, C. Villanueva, J. Pedraza-Chaverri. Nordihydroguaiaretic acid attenuates potassium dichromate-induced oxidative stress and nephrotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*. 46 (3): 1089-1096 (2008).
46. Rahman Shakilur, Ansari Rizwan Ahmed, Rehman Hasibur, Parvez Suhel, Raisuddin Sheikh. Nordihydroguaiaretic Acid from Creosote Bush (*Larrea tridentata*) Mitigates 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate-Induced Inflammatory and Oxidative Stress Responses of Tumor Promotion Cascade in Mouse Skin. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. eCAM. 734-785 (2011).
47. M. Meckes, A. D. David-Rivera, V. Nava-Aguilar, A. Jimenez. Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw edema. *Phytomedicine. International journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 11 (5): 446-51 (2004).
48. K. A. Scribner, T. M. Gadbois, M. Gowri, S. Azhar, G. M. Reaven. Masoprocol decreases serum triglyceride concentrations in rats with fructose-induced hypertriglyceridemia. *Metabolism: clinical and experimental*. 49 (9): 1106-10 (2000).
49. L. A. Pinales, R. R. Chianelli, W. G. Durrer, R. Pal, M. Narayan, F. S. Manciu. Spectroscopic study of inhibition of calcium oxalate calculi growth

- by *Larrea tridentata*. Journal of Raman Spectroscopy. 42 (3): 259-264 (2011).
50. S. Arteaga, A. Carmona, J. Luis, A. Andrade-Cetto, R. Cardenas. Effect of *Larrea tridentata* (creosote bush) on cholesterol gallstones and bile secretion in hamsters. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 57 (9): 1093-1099 (2005).
51. H. Granados, R. Cardenas. Biliary calculi in the golden hamster. XXXVII. The prophylactic action of the creosote bush (*Larrea tridentata*) in pigmented cholelithiasis produced by vitamin A. Revista de Gastroenterologia de Mexico. 59 (1): 31-5 (1994).
52. R. Snowden, H. Harrington, K. Morrill, L. Jeane, J. Garrity, M. Orian, E. Lopez, S. Rezaie, K. Hassberger, D. Familoni, J. Moore, K. Virdee, L. Albornoz-Sanchez, M. Walker, J. Cavins, T. Russell, E. Guse, M. Reker, O. Tschudy, J. Wolf, T. True, O. Ukaegbu, E. Ahaghotu, A. Jones, S. Polanco, Y. Rochon, R. Waters, J. Langland. A comparison of the anti-*Staphylococcus aureus* activity of extracts from commonly used medicinal plants. Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.). 20 (5): 375-82 (2014).
53. J. M. J. Favela-Hernández, E. Garza-Gonzalez, V. M. Rivas-Galindo, M. R. Camacho-Corona. Antibacterial and Antimycobacterial Lignans and Flavonoids from *Larrea tridentata*. Phytotherapy Research. 26 (12): 1957-1960 (2012).
54. V. Bocanegra-García, M. R. Camacho-Corona, M. Ramírez-Cabrera, G. Rivera, E. Garza-Gonzalez. The bioactivity of plant extracts against

- representative bacterial pathogens of the lower respiratory tract. BMC research notes. (2): 95 (2009).
55. M. A. Verastegui, C. A. Sanchez, N. L. Heredia, J. S. Garcia-Alvarado. Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahuan desert. Journal of Ethnopharmacology. 52 (3): 175-7 (1996).
56. A. F. Clemente-Soto, I. Balderas-Renteria, G. Rivera, A. Segura-Cabrera, E. Garza-Gonzalez, M. R. Camacho-Corona. Potential mechanism of action of *meso*-dihydroguaiaretic acid on Mycobacterium tuberculosis H37Rv. Molecules. 19 (12) (2014).
57. M. R. Camacho-Corona, M. A. Ramírez-Cabrera, O. Santiago González, E. Garza-González, I. P. Palacios, J. Luna-Herrera. Activity against drug resistant-tuberculosis strains of plants used in Mexican traditional medicine to treat tuberculosis and other respiratory diseases. Phytotherapy research. 22 (1): 82-5 (2008).
58. I. Vargas-Arispuro, A. Contreras-Valenzuela, M. A. Martinez-Tellez. Lignans from *Larrea tridentata* (creosote bush) as fungal β -1,3-glucanase inhibitors. Pesticide Biochemistry and Physiology. 94 (2-3): 60-63 (2009).
59. Bashyal Bharat, Li Linfeng, LaBarbera Daniel V, Bains Trpta, Debnath Anjan. *Larrea tridentata*: A novel source for anti-parasitic agents active against Entamoeba histolytica, Giardia lamblia and Naegleria fowleri. PLoS neglected tropical diseases. 11 (8): 5832 (2017).
60. T. J. Schmidt, S. Rzeppa, M. Kaiser, R. Brun. *Larrea tridentata*-Absolute configuration of its epoxy lignans and investigations on its antiprotozoal activity. Phytochemistry Letters. 5: 632–638 (2012).

61. J. J. Segura. Effects of nordihydroguaiaretic acid and ethanol on the growth of *Entamoeba invadens*. *Archivos de investigacion medica*. 9 (1): 157-62 (1978).
62. K. L. Allen, D. R. Tschantz, K. S. Awad, W. P. Lynch, A. L. DeLucia. A plant lignan, 3'-O-methyl-nordihydroguaiaretic acid, suppresses papillomavirus E6 protein function, stabilizes p53 protein, and induces apoptosis in cervical tumor cells. *Molecular Carcinogenesis*. 46 (7): 564-575 (2007).
63. J. Gnable, C. Huang Ru Chih, R. B. Bates, J. J. Burns, S. Caldera, M. E. Malcomson, K. J. McClure. Characterization of anti-HIV lignans from *Larrea tridentata*. *Tetrahedron*. 51 (45): 12203-10 (1995).
64. J. N. Gnable, J. N. Brady, D. J. Clanton, Y. Ito, J. Dittmer, R. B. Bates, R. C. Huang. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 transcription and replication by DNA sequence-selective plant lignans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92 (24): 11239-43 (1995).
65. C. J. Ryan, M. Zavodovskaya, J. F. Youngren, M. Campbell, M. Diamond, J. Jones, L. Shiry, G. M. Allan, A. Betty, I. D. Goldfine. Inhibitory effects of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) on the IGF-I receptor and androgen dependent growth of LAPC-4 prostate cancer cells. *Prostate (Hoboken, NJ, United States)*. 68 (11): 1232-1240 (2008).
66. J. D. Lambert, S. Sang, A. Dougherty, C. G. Caldwell, R. O. Meyers, R. T. Dorr, B. N. Timmermann. Cytotoxic lignans from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry (Elsevier)*. 66 (7): 811-815 (2005).

67. M. Gonzales, G. T. Bowden. Nordihydroguaiaretic acid-mediated inhibition of ultraviolet B-induced activator protein-1 activation in human keratinocytes. *Molecular Carcinogenesis*. 34 (2): 102-111 (2002).
68. R. B. Teppone, S. Kusari, M. Spiteller. Recent advances in research on lignans and neolignans. *Nat. Prod. Rep.* 33; 1044 (2016).
69. M. R. Camacho-Corona, M. A. Ramirez-Cabrera, O. González-Santiago, E. Garza-González, I. Paz, J. Luna-Herrera. Activity against Drugs Resistant-Tuberculosis Strains of Plants used in Mexican Traditional Medicine to treat Tuberculosis and Other Respiratory Diseases. *Phytother. Res.* 22:82-85 (2008).
70. V. Bocanegra-García, M. R. Camacho-Corona, M. Ramírez-Cabrera, G. Rivera, E. Garza-González. The bioactivity of plant extracts against representative bacterial pathogens of the lower respiratory tract. *BMC Research Notes*. 2:95 (2009).
71. J.M.J. Favela Hernández. Tesis de doctorado, Aislamiento y Caracterización de los compuestos antibacterianos y antituberculosos de *Larrea tridentata*, determinación de su toxicidad y mecanismo de acción del compuesto más activo. Facultad de Ciencias Químicas. UANL. (2012).
72. 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*. *Phytother. Res.* 26: 1957-1960 (2012).

73. A. F. Clemente Soto. Tesis de maestría, Aportaciones al mecanismo de acción del ácido *meso*-dihidroguaiarético sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Facultad de Ciencias Químicas. UANL. (2013).
74. A. F. Clemente-Soto, I. Balderas-Rentería, G. Rivera, A. Segura-Cabrera, E. Garza-González, M. R. Camacho-Corona. Potential Mechanism of Action of *meso*-Dihydroguaiaretic Acid on *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Molecules*. 19:20170-20182 (2014).
75. J. M. J. Favela Hernández, A. F. Clemente Soto, I. Rentería Balderas, E. Garza González, M. R. Camacho Corona. Potential Mechanism of Action of 3'-Demethoxy-6-O-demethylisoguaiacin on Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 20; 12450-12458 (2015).
76. J. R. Zgoda, J. R. Porter. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharm Biol*. 2939:221-225 (2001).
77. S. G. Franzblau, R.S. Witzig, J. C. McLaughlin, P. Torres, G. Madico, A. Hernandez, M. T. Degnan, M. B. Cook, V. K. Quenzer, R. M. Ferguson, y R. H. Gilman. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using microplate Alamar Blue assay. *J.Clin. Microbiol*. 36 (2): 362-366 (1998).
78. C. F. Bohnstedt, T. J. Mabry. The volatile constituents of the genus *Larrea* (*Zygophyllaceae*). *Revista Latinoamericana de Química*. 10 (3): 128-31 (1979).
79. Shin An Ling, N. D. Harris. Antimicrobial Activity of Selected Antioxidants. *Journal of Food Protection*. 40 (8): 520-522 (1977).

80. E. Cunningham-Oakes, O. Soren, C. Moussa, G. Rathor, Liu Ying jun, A. Coates, Hu Yanmin. Nordihydroguaiaretic acid enhances the activities of aminoglycosides against methicillin-sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. *Frontiers in Microbiology*. 6: 1195 (2015).
81. N. Ooi, E. A. Eady, J. H. Cove, A. J. O'Neill. Redox-active compounds with a history of human use: antistaphylococcal action and potential for repurposing as topical antibiofilm agents. *J Antimicrob Chemother*. 70: 479–488 (2015).
82. Y. Kawaguchi, S. Yamauchi, K. Masuda, H. Nishiwaki, K. Akiyama, M. Maruyama, T. Sugahara, T. Kishida, Y. Koba. Antimicrobial Activity of Stereoisomers of Butane-Type Lignans, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. (73): 8. 1806-1810 (2009).
83. N.D. Martini, D.R.P. Katerere, J.N. Eloff. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. (93): 207–212 (2004).
84. X. Luo, D. Pires, J. A. Aínsa, B. Gracia, N. Duarte, S. Mulhovo, E. Anes, M.J.U. Ferreira. Zanthoxylum capense constituents with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro and ex vivo within human macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. (146): 417–422 (2013).
85. K. Reyes-Melo, A. García, A. Romo-Mancillas, E. Garza-González, V. R. Rivas-Galindo, D. L. Miranda, J. Vargas-Villarreal, J.M.J. Favela-Hernández, M. R. Camacho-Corona. *meso*-Dihydroguaiaretic acid

derivatives with antibacterial and antimycobacterial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. (2017).

86. O. B. Heinz, K. Thiele. Additional Flavonoids from the leaves of *Larrea tridentata*. *Journal of Medicinal Plant Research*. (41): 100-103 (1981).

87. M. Sakibara, N. B. Timmermann, N. Nakatani, H. Waldrum, T. J. Mabry. New 8-Hydroxyflavonols from *Larrea tridentata*. *Phytochemicals Report*.(14):849-851(1975).

APÉNDICE A

**TABLAS COMPLEMENTARIAS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE LA FORMA
CRISTALINA DEL COMPUESTO 4,4'-DIHIDROXI-3-METOXI-6,7'-CICLOLIGNANO**

Table 1. Crystal data and structure refinement for GN-16m.		
Identification code	239MGL17	
Empirical formula	C19 H24 O4	
Formula weight	316.38	
Temperature	200(2) K	
Wavelength	1.54178 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P21	
Unit cell dimensions	a = 11.973(2) Å	$\alpha = 90^\circ$.
	b = 5.5476(10) Å	$\beta = 106.765(6)^\circ$.
	c = 13.475(2) Å	$\gamma = 90^\circ$.
Volume	857.0(3) Å ³	
Z	2	
Density (calculated)	1.226 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.686 mm ⁻¹	
F(000)	340	
Crystal size	0.388 x 0.082 x 0.080 mm ³	
Theta range for data collection	3.425 to 68.276°.	
Index ranges	-13<=h<=14, -6<=k<=6, -16<=l<=16	
Reflections collected	11100	
Independent reflections	3146 [R(int) = 0.1213]	
Completeness to theta = 67.679°	100.0 %	
Absorption correction	None	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	3146 / 5 / 224	
Goodness-of-fit on F ²	1.096	
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0621, wR2 = 0.1574	
R indices (all data)	R1 = 0.0745, wR2 = 0.1828	
Absolute structure parameter	0.2(5)	
Extinction coefficient	0.013(3)	
Largest diff. peak and hole	0.239 and -0.191 e.Å ⁻³	

Table 2. Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for **GN-16m**. $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U^{ij} tensor.

	x	y	z	U(eq)
O(1)	5859(2)	7958(6)	3892(3)	53(1)
O(2)	4132(2)	5088(7)	3041(3)	59(1)
O(3)	12408(3)	6047(7)	5184(3)	59(1)
O(4)	6148(3)	4004(8)	5404(3)	72(1)
C(1)	7028(3)	6279(8)	2861(3)	43(1)
C(2)	6018(3)	6400(8)	3150(3)	44(1)
C(3)	5101(3)	4849(8)	2694(3)	47(1)
C(4)	5214(3)	3246(9)	1958(3)	49(1)
C(5)	6312(4)	1230(9)	861(4)	53(1)
C(6)	7305(4)	1667(9)	393(4)	54(1)
C(7)	8424(4)	2212(8)	1266(4)	50(1)
C(8)	8307(3)	4568(8)	1832(3)	44(1)
C(9)	7166(3)	4633(7)	2126(3)	42(1)
C(10)	6243(3)	3095(8)	1661(3)	45(1)
C(11)	6997(5)	3620(11)	-443(4)	68(1)
C(12)	9514(5)	2224(11)	892(4)	68(2)
C(13)	9376(3)	5035(8)	2743(3)	43(1)
C(14)	9650(4)	3538(9)	3611(4)	49(1)
C(15)	10662(4)	3873(9)	4420(4)	51(1)
C(16)	11409(3)	5749(8)	4371(4)	47(1)
C(17)	11148(4)	7287(8)	3525(4)	56(1)
C(18)	10141(3)	6892(8)	2728(4)	53(1)
C(19)	3190(4)	3449(12)	2618(5)	68(2)

Table 3. Bond lengths [Å] and angles [°] for GN-16m.

O(1)-C(2)	1.375(5)	C(7)-H(7)	1.0000
O(1)-H(1A)	0.852(14)	C(8)-C(13)	1.518(6)
O(2)-C(3)	1.377(5)	C(8)-C(9)	1.528(5)
O(2)-C(19)	1.433(6)	C(8)-H(8)	1.0000
O(3)-C(16)	1.380(5)	C(9)-C(10)	1.393(6)
O(3)-H(3)	0.851(14)	C(11)-H(11A)	0.9800
O(4)-H(4A)	0.853(14)	C(11)-H(11B)	0.9800
O(4)-H(4B)	0.851(14)	C(11)-H(11C)	0.9800
C(1)-C(2)	1.375(6)	C(12)-H(12A)	0.9800
C(1)-C(9)	1.392(6)	C(12)-H(12B)	0.9800
C(1)-H(1)	0.9500	C(12)-H(12C)	0.9800
C(2)-C(3)	1.390(6)	C(13)-C(18)	1.383(6)
C(3)-C(4)	1.368(6)	C(13)-C(14)	1.394(6)
C(4)-C(10)	1.404(6)	C(14)-C(15)	1.389(6)
C(4)-H(4)	0.9500	C(14)-H(14)	0.9500
C(5)-C(10)	1.513(6)	C(15)-C(16)	1.386(6)
C(5)-C(6)	1.518(7)	C(15)-H(15)	0.9500
C(5)-H(5A)	0.9900	C(16)-C(17)	1.385(6)
C(5)-H(5B)	0.9900	C(17)-C(18)	1.381(6)
C(6)-C(11)	1.529(7)	C(17)-H(17)	0.9500
C(6)-C(7)	1.537(7)	C(18)-H(18)	0.9500
C(6)-H(6)	1.0000	C(19)-H(19A)	0.9800
C(7)-C(12)	1.528(6)	C(19)-H(19B)	0.9800
C(7)-C(8)	1.540(6)	C(19)-H(19C)	0.9800
C(2)-O(1)-H(1A)	106(4)	C(4)-C(3)-O(2)	125.3(4)
C(3)-O(2)-C(19)	116.6(4)	C(4)-C(3)-C(2)	119.5(4)
C(16)-O(3)-H(3)	106(4)	O(2)-C(3)-C(2)	115.2(4)
H(4A)-O(4)-H(4B)	109(6)	C(3)-C(4)-C(10)	121.6(4)
C(2)-C(1)-C(9)	121.9(4)	C(3)-C(4)-H(4)	119.2

C(2)-C(1)-H(1)	119.0	C(10)-C(4)-H(4)	119.2
C(9)-C(1)-H(1)	119.0	C(10)-C(5)-C(6)	113.4(4)
C(1)-C(2)-O(1)	123.6(4)	C(10)-C(5)-H(5A)	108.9
C(1)-C(2)-C(3)	119.4(4)	C(6)-C(5)-H(5A)	108.9
O(1)-C(2)-C(3)	116.9(3)	C(10)-C(5)-H(5B)	108.9
C(6)-C(5)-H(5B)	108.9	H(11B)-C(11)-H(11C)	109.5
H(5A)-C(5)-H(5B)	107.7	C(7)-C(12)-H(12A)	109.5
C(5)-C(6)-C(11)	111.6(4)	C(7)-C(12)-H(12B)	109.5
C(5)-C(6)-C(7)	109.1(4)	H(12A)-C(12)-H(12B)	109.5
C(11)-C(6)-C(7)	113.3(4)	C(7)-C(12)-H(12C)	109.5
C(5)-C(6)-H(6)	107.5	H(12A)-C(12)-H(12C)	109.5
C(11)-C(6)-H(6)	107.5	H(12B)-C(12)-H(12C)	109.5
C(7)-C(6)-H(6)	107.5	C(18)-C(13)-C(14)	117.3(4)
C(12)-C(7)-C(6)	112.8(4)	C(18)-C(13)-C(8)	121.6(4)
C(12)-C(7)-C(8)	111.6(4)	C(14)-C(13)-C(8)	121.1(4)
C(6)-C(7)-C(8)	111.2(3)	C(15)-C(14)-C(13)	121.3(4)
C(12)-C(7)-H(7)	106.9	C(15)-C(14)-H(14)	119.3
C(6)-C(7)-H(7)	106.9	C(13)-C(14)-H(14)	119.3
C(8)-C(7)-H(7)	106.9	C(16)-C(15)-C(14)	119.5(4)
C(13)-C(8)-C(9)	113.3(3)	C(16)-C(15)-H(15)	120.3
C(13)-C(8)-C(7)	111.7(3)	C(14)-C(15)-H(15)	120.3
C(9)-C(8)-C(7)	111.4(3)	O(3)-C(16)-C(17)	121.2(4)
C(13)-C(8)-H(8)	106.7	O(3)-C(16)-C(15)	118.4(4)
C(9)-C(8)-H(8)	106.7	C(17)-C(16)-C(15)	120.4(4)
C(7)-C(8)-H(8)	106.7	C(18)-C(17)-C(16)	118.8(4)
C(1)-C(9)-C(10)	118.7(4)	C(18)-C(17)-H(17)	120.6
C(1)-C(9)-C(8)	119.9(4)	C(16)-C(17)-H(17)	120.6
C(10)-C(9)-C(8)	121.4(4)	C(17)-C(18)-C(13)	122.7(4)
C(9)-C(10)-C(4)	118.9(4)	C(17)-C(18)-H(18)	118.6
C(9)-C(10)-C(5)	122.7(4)	C(13)-C(18)-H(18)	118.6
C(4)-C(10)-C(5)	118.4(4)	O(2)-C(19)-H(19A)	109.5
C(6)-C(11)-H(11A)	109.5	O(2)-C(19)-H(19B)	109.5
C(6)-C(11)-H(11B)	109.5	H(19A)-C(19)-H(19B)	109.5

H(11A)-C(11)-H(11B)	109.5	O(2)-C(19)-H(19C)	109.5
C(6)-C(11)-H(11C)	109.5	H(19A)-C(19)-H(19C)	109.5
H(11A)-C(11)-H(11C)	109.5	H(19B)-C(19)-H(19C)	109.5

Table 4. Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for **GN-16m**. The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	u11	u22	u33	u23	u13	u12
O(1)	41(1)	56(2)	65(2)	-19(2)	20(1)	-5(1)
O(2)	42(1)	72(2)	67(2)	-21(2)	20(1)	-10(1)
O(3)	42(2)	59(2)	70(2)	5(2)	9(1)	1(1)
O(4)	61(2)	77(3)	87(3)	23(2)	36(2)	14(2)
C(1)	36(2)	39(2)	51(2)	0(2)	9(2)	2(2)
C(2)	40(2)	42(2)	49(2)	-4(2)	11(2)	5(2)
C(3)	38(2)	49(2)	53(3)	-8(2)	13(2)	-1(2)
C(4)	42(2)	51(2)	51(2)	-6(2)	9(2)	-5(2)
C(5)	59(2)	47(2)	55(3)	-6(2)	17(2)	3(2)
C(6)	71(3)	45(2)	51(3)	1(2)	22(2)	13(2)
C(7)	55(2)	47(2)	53(3)	6(2)	24(2)	14(2)
C(8)	45(2)	40(2)	50(2)	11(2)	17(2)	10(2)
C(9)	40(2)	38(2)	46(2)	7(2)	12(2)	5(2)
C(10)	48(2)	45(2)	42(2)	-1(2)	10(2)	3(2)
C(11)	84(3)	63(3)	55(3)	12(3)	15(2)	14(3)
C(12)	73(3)	68(3)	74(4)	9(3)	41(3)	17(3)
C(13)	40(2)	41(2)	53(2)	8(2)	20(2)	10(2)
C(14)	46(2)	50(2)	55(3)	10(2)	20(2)	0(2)
C(15)	50(2)	50(2)	57(3)	10(2)	18(2)	4(2)
C(16)	39(2)	43(2)	60(3)	5(2)	15(2)	8(2)
C(17)	40(2)	46(2)	81(3)	18(2)	16(2)	2(2)
C(18)	41(2)	46(2)	71(3)	23(2)	17(2)	10(2)
C(19)	48(2)	85(4)	76(3)	-14(3)	24(2)	-19(3)

Table 5. Hydrogen coordinates ($\times 10^4$) and isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for **GN-16m**.

	X	y	z	U(eq)
H(1A)	6510(30)	8670(90)	4140(40)	64
H(3)	12850(40)	6960(100)	4960(40)	70
H(4A)	5850(50)	5180(80)	5000(40)	86
H(4B)	5650(40)	3510(130)	5700(40)	86
H(1)	7649	7351	3171	51
H(4)	4580	2209	1640	59
H(5A)	5566	1227	299	64
H(5B)	6409	-383	1189	64
H(6)	7436	134	52	65
H(7)	8525	879	1784	60
H(8)	8266	5908	1327	53
H(11A)	6770	5096	-152	102
H(11B)	6347	3066	-1024	102
H(11C)	7677	3948	-689	102
H(12A)	10210	2300	1490	101
H(12B)	9494	3631	447	101
H(12C)	9535	749	497	101
H(14)	9134	2264	3650	59
H(15)	10840	2825	5002	62
H(17)	11651	8590	3494	67
H(18)	9968	7938	2145	63
H(19A)	3480	1789	2726	103
H(19B)	2864	3754	1874	103
H(19C)	2583	3684	2965	103

Table 6. Hydrogen bonds for **GN-16m** [Å and °].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(1)-H(1A)...O(3)#1	0.852(14)	1.89(2)	2.702(4)	159(5)
O(4)-H(4A)...O(1)	0.853(14)	2.15(3)	2.945(5)	155(6)
O(4)-H(4A)...O(2)	0.853(14)	2.85(5)	3.448(5)	129(5)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 -x+2,y+1/2,-z+1

APÉNDICE B

DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
OTORGA EL PRESENTE

Reconocimiento

Se le otorga a:

GUILLERMO NÚÑEZ MOJICA

POR SU ASISTENCIA AL:
**IV CONGRESO INTERNACIONAL DE
QUÍMICA E INGENIERÍA VERDE**



Llevado a cabo el:
6, 7 Y 8 de Septiembre 2017

Dr. Eduardo Soto Regalado

