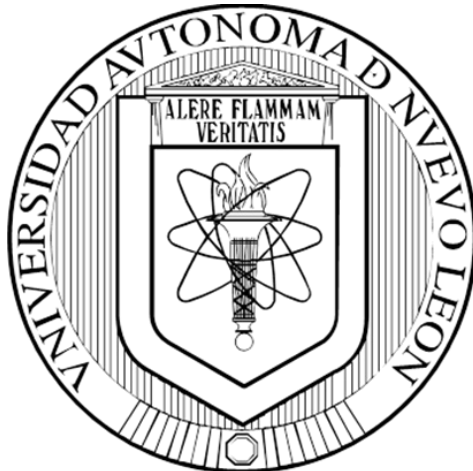


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**PROSPECCIÓN QUÍMICA Y ANTIMICOBACTERIANA DE LOS
PRODUCTOS NATURALES PRESENTES EN LAS PARTES
AÉREAS DE *Bocconia latisejala* S. Wats**

POR

Q.F.B. LIZETTE CAROLINA ARELLANO ORTIZ

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

FEBRERO, 2019

PROSPECCIÓN QUÍMICA Y ANTIMICOBACTERIANA DE LOS PRODUCTOS
NATURALES PRESENTES EN LAS PARTES AÉREAS DE *Bocconia latisejala*
S. Wats

Aprobación de la tesis:

Dr. Edgar Abraham García Zepeda
Presidente

Dra. María del Rosario González González
Secretario

Dr. Francisco Guadalupe Ávalos Alanís
Vocal

Dra. María Araceli Hernández Ramírez
Sub-dirección de Estudios de Posgrado

PROSPECCIÓN QUÍMICA Y ANTIMICOBACTERIANA DE LOS PRODUCTOS
NATURALES PRESENTES EN LAS PARTES AÉREAS DE *Bocconia latisejala*
S. Wats

Revisión de la tesis:

Comité Tutorial

Dra. Patricia Cristina Esquivel Ferriño

Dra. María del Rosario González González

Dr. Francisco Guadalupe Ávalos Alanís

RESUMEN

Q.F.B. Lizette Carolina Arellano Ortiz Fecha de Graduación: Enero, 2019

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: PROSPECCIÓN QUÍMICA Y ANTIMICOBACTERIANA DE
LOS PRODUCTOS NATURALES PRESENTES EN LAS
PARTES AÉREAS DE *Bocconia latisejala* S. Wats

Número de páginas: 151

Candidato para el Grado de Maestría en
Ciencias con Orientación en Farmacia

Área de estudio: Farmacia

Propósito y método del estudio: La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa que constituye un problema de salud pública de primera magnitud al ser una de las diez principales causas de mortalidad en el mundo. Se le considera como una enfermedad reemergente debido a la aparición de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a múltiples fármacos (MDR-TB). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, 558 mil personas a nivel mundial desarrollaron tuberculosis resistente a rifampicina (RR-TB) en 2017 y el 82% presentaron MDR-TB. Ante esta problemática, los sectores público y privado han dirigido proyectos de investigación para desarrollar alternativas terapéuticas que disminuyan la incidencia de TB y el periodo de tratamiento. Las investigaciones sobre productos naturales han permitido descubrir algunos alcaloides de tipo benzo[c]fenantridina con potencial para desarrollar nuevos agentes antifímicos. El género *Bocconia* se caracteriza por contener este tipo de alcaloides, por lo cual se realizó la colecta de las partes aéreas (tallos y hojas) de la especie *Bocconia latisejala*, se extrajeron sus constituyentes con una mezcla de cloroformo: metanol (1:1) y el extracto orgánico fue fraccionado por cromatografía en columna (CC) y particiones líquido-líquido. Para la purificación de los compuestos se realizaron CC, cromatografía en placa preparativa y recristalizaciones. Los productos naturales puros fueron analizados por resonancia magnética nuclear de ^1H , ^{13}C y bidimensional, espectrometría de masas y espectroscopia de infrarrojo para elucidar sus correspondientes estructuras moleculares.

Contribuciones y conclusiones: La prospección química de tallos y hojas de *Bocconia latisejala* S. Wats permitió el aislamiento y caracterización estructural de ocho alcaloides (dihidrosanguinarina, oxisanguinarina, 6-metoxidihidroqueleritrina, 6-metoxidihidrosanguinarina, 6-acetonildihidrosanguinarina, norsanguinarina, 6-nitrometildihidrosanguinarina y el compuesto identificado como BLH14) mediante el análisis de sus datos espectroscópicos experimentales y su comparación con los reportados en la literatura. De estos alcaloides, dihidrosanguinarina y oxisanguinarina se encontraron reportados como constituyentes de las semillas de esta especie; mientras que, 6-acetonildihidrosanguinarina representa el primer reporte en esta especie y ha sido reportado como constituyente en especies del género *Bocconia* y *Macleaya*. El alcaloide Norsanguinarina se describe por primera vez como constituyente del género *Bocconia*, pero se ha descrito plantas de las familias *Papaveraceae*, *Fumariaceae* y *Rutaceae*. El compuesto 6-Nitrometildihidrosanguinarina representa un nuevo producto natural, ya que no se ha reportado previamente en especies vegetales, únicamente se tiene un reporte de obtención mediante semisíntesis orgánica por el mismo grupo de investigación. El compuesto BLH14 se describe como un nuevo tipo de alcaloide presente en el género *Bocconia*, una aporfina de novedosa estructura química. Estos productos naturales se evaluaron frente a dos cepas de *M. tuberculosis*, la H37Rv (sensible a fármacos de primera línea) y la G122 (aislado clínico, resistente a isoniazida, rifampicina y etambutol), donde se obtuvieron concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 12.5 µg/mL para el 6-metoxidihidroqueleritrina contra H37Rv y 25 µg/mL contra G122. El resto de los compuestos exhiben valores de CMI entre 25 µg/mL y 50 µg/mL para ambas cepas de *M. tuberculosis*.

Dr. Edgar Abraham García Zepeda
Dirección de tesis

Dra. María del Rayo Camacho Corona
Co-dirección de tesis

AGRADECIMIENTOS

Dr. Edgar Abraham García Zepeda

Facultad de Ciencias Químicas UANL

Por la asesoría durante el desarrollo del presente proyecto de investigación

Dra. Ma. Del Rayo Camacho Corona

Facultad de Ciencias Químicas UANL

Por la asesoría para la realización de las pruebas biológicas

Comité tutorial

Dra. Patricia Cristina Esquivel Ferríño

Dra. Ma. Del Rosario González González

Dr. Francisco Guadalupe Ávalos Alanís

Facultad de Ciencias Químicas UANL

Por sus observaciones y sugerencias

Dra. Elvira Garza González

Servicio de Gastroenterología

Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González.

Por brindar insumos e infraestructura para la realización de los ensayos biológicos

Téc. María de la Luz Acevedo

Servicio de Gastroenterología

Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González.

Por el asesoramiento técnico en la realización de los ensayos biológicos

Dr. Luis Demetrio Miranda

Instituto de Química

Universidad Nacional Autónoma de México

Por el apoyo para la realización de los espectros de resonancia magnética nuclear



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

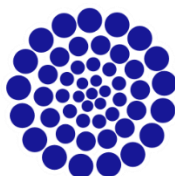


**Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Nuevo León**

y

**Laboratorio 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



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Por otorgar las becas de manutención 596295 y 27092 a través del proyecto de
investigación CB-2013/222152 para el desarrollo del presente proyecto 04-
099351-FAR-02/229.

DEDICATORIA

A mis padres

Hermanos

Sobrinas

A ti...

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Tuberculosis, enfermedad reemergente a nivel mundial.....	1
1.2 Generalidades de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
1.3 Patogénesis de la tuberculosis	7
1.4 Manifestaciones clínicas de la tuberculosis y diagnóstico.....	90
1.5 Datos epidemiológicos	101
1.6 Tratamiento y fármaco-resistencia.....	122
2. ANTECEDENTES.....	17
2.1 Etnomedicina.....	177
2.2 Información taxonómica y botánica de <i>B. latisejala S. Wats</i>	188
2.3 Alcaloides benzo[c]fenantridínicos.....	200
2.4. Biosíntesis de alcaloides de tipo benzo[c]fenantridina.....	21
2.5 Investigación científica.....	24
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	29
3.1 Hipótesis.....	29
3.2 Objetivo general.....	29
3.2.1 Objetivos específicos.....	30
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
4.1 Material y equipo.....	31
4.1.1 Estudio fitoquímico.....	31
4.1.2 Ensayos biológicos.....	32
4.2 Estudio fitoquímico.....	33
4.2.1 Recolección del material vegetal.....	33
4.2.2 Obtención del extracto de hojas y tallos.....	34

4.2.3 Pruebas preliminares cualitativas.....	34
4.2.3.1 Reactivo de Dragendorff para la detección de alcaloides...	35
4.2.3.2 Reactivo de Caín para la detección de triterpenos y esteroides.....	36
4.2.4 Fraccionamiento del extracto orgánico total de tallos.....	37
4.2.5 Fraccionamiento del extracto orgánico total de las hojas.....	39
4.2.5.1 Fraccionamiento ácido-base de la fase metanólica-acuosa.....	39
4.2.5.1.1 Fraccionamiento por cromatografía en columna de la fase orgánica obtenida de la partición ácido-base.....	41
4.2.5.2 Fraccionamiento de fase metanólica-acuosa por cromatografía en columna (FM _{ac}).....	43
4.2.6 Aislamiento y purificación de alcaloides.....	47
4.2.7 Elucidación estructural.....	47
4.3 Ensayos biológicos.....	47
4.3.1 Actividad antimicobacteriana.....	48
4.3.1.1 Preparación de medio de cultivo Middlebrook 7H9.....	48
4.3.1.2 Preparación de inóculos bacterianos.....	49
4.3.1.3 Preparación de soluciones de trabajo.....	49
4.3.1.4 Ensayo en microplaca de Alamar Azul.....	50
4.4 Evaluación de la actividad citotóxica.....	51
4.5 Disposición de residuos.....	53
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
5.1 Estudio fitoquímico.....	54
5.1.1 Aislamiento y caracterización de los alcaloides.....	55
5.1.1.1 Aislamiento de oxisanguinarina.....	55
5.1.1.2 Caracterización estructural de oxisanguinarina.....	57
5.1.1.3 Aislamiento de dihidrosanguinarina.....	59
5.1.1.4 Caracterización estructural de dihidrosanguinarina.....	60
5.1.1.5 Aislamiento de 6-acetonildihidrosanguinarina.....	62
5.1.1.6 Caracterización estructural de 6-acetonildihidrosanguinarina.....	64
5.1.1.7 Aislamiento de 6-metoxidihidroqueleritrina.....	69
5.1.1.8 Caracterización estructural de 6-metoxidihidroqueleritrina.....	70
5.1.1.9 Aislamiento de 6-metoxidihidrosanguinarina.....	73
5.1.1.10 Caracterización estructural de 6-metoxidihidrosanguinarina.....	75
5.1.1.11 Aislamiento de norsanguinsanguinarina.....	77
5.1.1.12 Caracterización estructural de norsanguinarina.....	79
5.1.1.13 Aislamiento de BLH14.....	84
5.1.1.13.1 Propuesta de biosíntesis de BLH14.....	87
5.1.1.14 Caracterización estructural de BLH14.....	88
5.1.1.15 Aislamiento de 6-nitrometildihidrosanguinarina.....	103
5.1.1.15 Propuesta de biosíntesis de 6-nitrometildihidrosanguinarina.....	106

5.1.1.16 Caracterización estructural de 6-nitrometildihidrosanguinarina.....	108
5.1.1.17 Aislamiento de β -sitosterol.....	130
5.1.1.18 Caracterización estructural de β -sitosterol.....	131
5.2 Actividad antimicobacteriana.....	134
5.3 Actividad citotóxica.....	141
6. CONCLUSIONES.....	143
7. BIBLIOGRAFÍA.....	146

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Clasificación de fármacos antituberculosos.....	15
Tabla 2. Características de los fármacos antituberculosos	16
Tabla 3. Fraccionamiento del extracto orgánico de los tallos	37
Tabla 4. Fraccionamiento de la fase metanólica-acuosa de las hojas	44
Tabla 5. Comparación de datos espectroscópicos de RMN ¹ H de norsanguinarina	80
Tabla 6. Comparación de datos espectroscópicos de RMN ¹³ C de norsanguinarina	81
Tabla 7. Comparación de datos espectroscópicos de RMN ¹ H entre 6- nitrometildihidrosanguira y 6-hidroximetildihidrosanguinarina.....	113
Tabla 8. Comparación de datos espectroscópicos de RMN ¹ H y ¹³ C de 6- nitrometildihidrosanguinarina	117
Tabla 9. Correlación de datos espectroscópicos bidimensionales (HMBC y NOESY) del compuesto 6-nitrometildihidrosanguinarina	119
Tabla 10. Comparación de datos espectroscópicos del β-sitosterol.....	132
Tabla 11. Actividad antimicobacteriana de los extractos y productos naturales de <i>B. latisejala</i>	134
Tabla 12. Porcentaje de viabilidad celular de los compuestos puros frente a líneas celulares.....	141

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. <i>B. latisepala</i> S. Wats. Ejemplar de Nuevo León, México	20
Figura 2. Estructura base de alcaloides de tipo benzo[c]fenantridina	21
Figura 3. Etapa 1. Formación de (S)-Norcoclaurina a partir de dos moléculas de tirosina	22
Figura 4. Etapa 2. Formación de (S)- Reticulina a partir de (S)-Norcoclaurina.	23
Figura 5. Etapa 3. Formación de Sanguinarina (alcaloide benzo[c]fenatridínico) a partir de (S)-Reticulina.....	24
Figura 6. Compuestos aislados de <i>B. latisepala</i> S. Wats.....	25
Figura 7. Novedosos productos naturales obtenidos de <i>B. arborea</i>	26
Figura 8. Actividad inhibitoria de cepas sensible (H37Rv) y resistentes (M-12, M-20, 345) de <i>M. tuberculosis</i> para los alcaloides obtenidos de <i>B. arborea</i>	27
Figura 9. Actividad antimicobacteriana de queleritrina y 12-metoxiqueleritrina contra a <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	28
Figura 10. Reacción de Dragendorff para determinación de alcaloides.....	35
Figura 11. Reacción de Caín o Liebermann-Burchard para determinación de terpenos y esteroides.....	36
Figura 12. Diagrama de fraccionamiento del extracto orgánico de tallos.....	38
Figura 13. Diagrama de fraccionamiento del extracto orgánico de hojas.....	40
Figura 14. Diagrama de fraccionamiento preliminar de la fase orgánica de la fracción metanólica-acuosa del extracto orgánico de hojas.....	42
Figura 15. Compuestos presentes en la fase metanólica-acuosa de hojas de <i>B.latisepala</i>	46
Figura 16. Reacción de oxidación de resazurina a resorufina	48
Figura 17. Ensayo antimicobacteriano en microplaca de 96 pocillos.....	51
Figura 18. Caracterización de Oxisanguinarina	56
Figura 19. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de Oxisanguinarina.	58
Figura 20. Caracterización de Dihidosanguinarina	59
Figura 21. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de Dihidosanguinarina ..	61
Figura 22. Caracterización de 6-Acetonildihidosanguinarina	63
Figura 23. Proyección de Newman del fragmento acetónido de la posición bencílica en 6-Acetonildihidosanguinarina en su conformación más estable .	65
Figura 24. Confórmero más estable para 6-Acetonildihidosanguinarina con orientación cis diaxial de los grupos N-metilo y acetónido.....	66
Figura 25. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de 6-Acetonildihidosanguinarina.....	67
Figura 26. Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de 6-Acetonildihidosanguinarina.....	68
Figura 27. Caracterización de 6-Metoxidihidroqueleritrina.....	69

Figura 28. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de 6-Metoxidihidroqueleritrina.....	72
Figura 29. Caracterización de 6-Metoxidihidrosanguinarina	73
Figura 30. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de 6-Metoxidihidrosanguinarina	76
Figura 31. Caracterización de Norsanguinarina.....	78
Figura 32. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, TFA-d) de Norsanguinarina	82
Figura 33. Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, TFA-d) de Norsanguinarina.....	83
Figura 34. Caracterización de BLH14	85
Figura 35. Formación de (S)-Reticulina a partir de dos moléculas de tirosina.....	87
Figura 36. Formación del esqueleto de alcaloides de tipo aporfina	88
Figura 37. Espectro de masas por ESI (DART+) de BLH14	89
Figura 38. Espectro de masas por impacto electrónico EI+ (75 eV) de BLH14.....	90
Figura 39. Estructura, fórmula y masa moleculares de BLH14	91
Figura 40. Espectro de infrarrojo de BLH14.....	92
Figura 41. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, TFA-d) de BLH14	94
Figura 42. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, TFA-d) de BLH14.....	95
Figura 43. Espectro DEPT 135 de BLH14	96
Figura 44. Correlaciones HMBC para BLH14	97
Figura 45. Espectro HMBC (400 MHz, TFA-d) de BLH14.....	98
Figura 46. Principales correlaciones NOESY para BLH14.....	99
Figura 47. Espectro NOESY (400 MHz, TFA-d) de BLH14.....	100
Figura 48. Espectro COSY (400 MHz, TFA-d) de BLH14	101
Figura 49. Espectro HSQC (400 MHz, TFA-d) de BLH14.....	102
Figura 50. Caracterización de 6-nitrometildihidrosanguinarina	104
Figura 51. Alcaloides nitro benzo[c]fenantridínicos	106
Figura 52. Formación de intermediario Nitroglicinato a partir de L-glicina	107
Figura 53. Propuesta de biosíntesis de 6-Nitrometildihidrosanguinarina	108
Figura 54. Espectro de masas de alta resolución (DART+) de 6-Nitrometildihidrosanguinarina	109
Figura 55. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 6-Nitrometildihidrosanguinarina	111
Figura 56. Proyección de Newman de la conformación más estable para el enlace σ entre los carbonos C-6 y C-16 en 6-nitrometildihidrosanguinarina...	112
Figura 57. Confórmero más estable para 6-nitrodihidrosanguinarina con conformación sinclinal y orientación cis diaxial respecto al grupo nitro y N-metilo.	112
Figura 58. Espectro de RMN ¹³ C (500 MHz, CDCl ₃) de 6-Nitrometildihidrosanguinarina	114
Figura 59. Espectro de infrarrojo (FTIR) de 6-Nitrometildihidrosanguinarina	116
Figura 60. Correlaciones HMBC para 6-nitrometildihidrosanguinarina	118
Figura 61. Espectro de RMN HMBC (500 MHz, CDCl ₃) de 6-Nitrometildihidrosanguinarina	120
Figura 62. Correlaciones NOESY para 6-nitrometildihidrosanguinarina	121

Figura 63. Espectro de RMN NOESY (500 MHz, CDCl ₃) de 6-Nitrometildihidrosanguinarina	122
Figura 64. Espectro COSY (500 MHz, CDCl ₃) de 6-Nitrometildihidrosanguinarina	124
Figura 65. Ampliación del espectro COSY para las correlaciones entre los protones orto aromáticos	125
Figura 66. Ampliación del espectro COSY para la correlación entre los protones H6, HA y HB en 6-Nitrometildihidrosanguinarina	126
Figura 67. Espectro de RMN HSQC (500 MHz, CDCl ₃) de 6-Nitrometildihidrosanguinarina	128
Figura 68. Correlaciones HSQC de los grupos dioximetileno y protones orto aromáticos con sus respectivos carbonos en 6-Nitrometildihidrosanguinarina	129
Figura 69. Caracterización de β-sitosterol	130
Figura 70. Espectro de RMN 1H (400 MHz, CDCl ₃) de β-sitosterol	133
Figura 71. Valores de CMI contra cepas de <i>M. tuberculosis</i> y lipofilicidad de alcaloides benzo[c]fenantridínicos y etambutol.....	136
Figura 72. Actividad antimicobacteriana del trabajo presente y reportado para 6-metoxidihidrosanguinarina y 6-metoxidihidroquelitrina	137
Figura 73. Actividad antimicobacteriana de 6-acetonildihidrobencoc]fenantridinas.....	138
Figura 74. Alcaloides de <i>B. latisejala</i> S. Wats con mayor actividad antimicobacteriana.....	139

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
4'OMT	(S)-3'-hidroxi-N-metilcoclaurina-4'-O-metiltransferasa
6OMT	(S)-Norcoclaurina-6-O-metiltransferasa
AcOEt	Acetato de etilo
AO	Aminooxidasa
ATCC	American Type Culture Collection
BBE	Berberina sintasa
BCG	Bacillus de Calmette-Guérin
CC	Cromatografía en columna
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CFS	Queilantifolina sintasa
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₃ OH o MeOH	Metanol
CHCl ₃	Cloroformo
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CNMT	(S)-Coclaurina-N-metiltransferasa
COSY	Correlation Spectroscopy
Cyp719A2	Estilopina sintasa
d	Doblete
DBOX	Dihidrobenzofenantridina oxidasa
dd	Doblete de dobletes
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization
DMSO- <i>d</i> ₆	dimetilsulfóxido/deuterado
EMA	Agencia Europea del Medicamento, por sus siglas en inglés
EtOH	Etanol
FDA	Administración de Alimentos y Fármacos, por sus siglas en inglés
FE	Fase estacionaria
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy
FM	Fase móvil
FMac	Fase metanólica acuosa
FO	Fase orgánica
FtsZ	Proteína mediadora de la citocinesis en bacterias
g	Gramo
G122	Aislado clínico de <i>M. tuberculosis</i> , resistente a isoniazida, rifampicina y etambutol

h	Horas
HACAT	Células inmortalizadas de queratinocitos
H37Rv	<i>M. tuberculosis</i> sensible a isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
Hz	Hertz
J	Distancias entre enlaces C-H en espectros HMBC
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Kg	Kilogramo
L	Litro
L-L	Líquido-líquido
m	Metros
MABA	Método de Alamar Azul
MCF7	Células de adenocarcinoma de mama
MDR-TB	Tuberculosis multifármaco-resistente
MFO	Monofenol oxidasa
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MSH	N-metilstilopina 14-hidroxilasa
NAD ⁺	Dinucleotido de nicotina y adenina (oxidada)
NADH	Dinucleotido de nicotina y adenina (reducida)
ND	No determinado
nm	Nanómetros
NMCH	(S)-N-metilcoclorina-3'-hidroxilas
NOESY	Nuclear overhauser enhancement spectroscopy
NSC	Norcoclaurina sintasa
OADC	Ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
P.f	Punto de fusión
P6H	Protopina 6-hidroxilasa
pb	Pares de bases
PC3	Células de cáncer de próstata
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso molecular
ppm	Partes por millón
Rf	Factor de retención
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
RR-TB	Tuberculosis resistente a rifampicina
s	Singlete
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Humana

SW480	Células de cáncer colorrectal
TB	Tuberculosis
TFA- <i>d</i>	Ácido trifluoroacético deuterado
TLC	Thin layer chromatography (cromatografía en capa fina)
TMS	Tetrametilsilano
TNMT	Tetrahidroprotoberberina sintasa
TYDC	Tirosina dopa descarboxilasa
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
XDR-TB	Tuberculosis extremadamente resistente a fármacos
δ	Desplazamiento químico

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Tuberculosis, enfermedad reemergente a nivel mundial

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades infecciosas más letales y antiguas en el mundo y continúa siendo un reto en los escalafones internacionales de salud [1]. A pesar del desarrollo de nuevos agentes antifímicos, la tuberculosis sigue causando una notable morbilidad a nivel mundial [2] y es una de las diez principales causas de mortalidad en el mundo [3]. Debido a la aparición de cepas resistentes a fármacos se le considera una enfermedad reemergente [4] que hace necesario el planteamiento de proyectos de investigación tendientes al descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos antituberculosos [5].

La TB es una enfermedad infecciosa que afecta principalmente a los pulmones, es causada especialmente por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* que puede persistir en el huésped por largos periodos de latencia sin presentar indicio alguno de infección [6]. Los síntomas comunes en tuberculosis activa son: tos, fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso, entre otros. Dado que la sintomatología puede ser leve durante muchos meses, una persona infectada no busca atención médica e incrementa el riesgo de transmisión a otros individuos [7].

A pesar de que el tratamiento de la tuberculosis es conocido desde hace casi 50 años, éste ha sido menos eficaz debido a la resistencia que ha generado *M. tuberculosis* a los antifímicos prescritos hoy en día [8] constituyendo un problema de salud pública de primera magnitud [4] que aparece como resultado de un uso incorrecto de los antibióticos al tratar con ellos a pacientes infectados de tuberculosis sensible al tratamiento [9]. Tan solo para el año 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que 558 mil personas en el mundo desarrollaron tuberculosis multifármaco-resistente a rifampicina (RR-TB, por sus siglas en inglés) y el 82% presentaron multifármaco-resistencia (MDR-TB) de los cuales el 8.5% de los casos presentaron tuberculosis extremadamente resistente a fármacos (XDR-TB, por sus siglas en inglés) [3].

Por otra parte, la reemergencia notable de la tuberculosis fue impulsada por las deficiencias inmunitarias de personas infectadas con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), las cuales incrementaron considerablemente el riesgo de que la infección latente de *M. tuberculosis* progrese a enfermedad activa y sea transmitida a otros individuos [10, 11] .

La TB y el VIH/SIDA constituyen la principal carga de las enfermedades infecciosas a nivel mundial [2]. El VIH es el principal factor de riesgo que predispone al contagio de *M. tuberculosis* como enfermedad activa, actuando a manera de co-infección, acelerando la disminución de las funciones inmunológicas, influyendo en la aparición de granulomas y aumentando de esta manera el riesgo de reactivación y generación de tuberculosis extrapulmonar,

sumado al riesgo de muerte si no se efectúa un tratamiento eficiente y oportuno [1, 11].

Además del VIH; la desnutrición, la diabetes y el tabaquismo se han señalado como factores de riesgo que inducen al padecimiento de la tuberculosis. Una persona con tuberculosis activa puede infectar a lo largo de un año entre 10 y 15 personas por contacto directo. Se calcula que morirán alrededor del 45% de las personas VIH-negativas con tuberculosis y la totalidad de las personas que presenten co-infección tuberculosis/VIH [12].

La TB representa una amenaza internacional si se considera la dificultad en el diagnóstico y tratamiento de MDR-TB y XDR-TB [13]. Aunque se han hecho avances en el diagnóstico, actualmente solo se dispone de una prueba rápida (Xpert MTB/RIF) que detecta de forma simultánea la tuberculosis y la resistencia a la rifampicina; sin embargo, existen centros de salud en los que aún no se encuentra disponible [3].

La TB es una enfermedad tratable y tiene cura; no obstante, su éxito depende del cumplimiento de la terapia y que ésta sea adecuada para el paciente [12]. El tratamiento actual para la TB está enfocado en una multiterapia que consta de cuatro fármacos de primera línea (isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida) y fármacos de segunda línea (capreomicina, kanamicina, amikacina y fluoroquinolonas); estos últimos tienen la desventaja de ser poco

específicos, de provocar severos efectos secundarios e inducir fácilmente resistencia [14].

La versión actual de la base de datos de fármacos antituberculosos (TBDRUGS) contiene 40 fármacos para el tratamiento contra la TB incluyendo 28 fármacos aprobados y 12 candidatos que se encuentran en diferentes fases de descubrimiento y desarrollo de medicamentos [15].

Los nuevos fármacos que se encuentran en ensayos clínicos fase II para el tratamiento de la TB son: Sutezolid y SQ109 [15]. Recientemente fue aprobada por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA, por sus siglas en inglés) la bedaquilina, un nuevo fármaco utilizado para el tratamiento de MDR-TB [16, 17] y el último fármaco aprobado por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) la delamanida, medicamento para el tratamiento de XDR-TB el cual se encuentra en ensayos clínicos de fase III para demostrar su seguridad y eficacia [18, 19, 20].

En perspectivas para el desarrollo de nuevos fármacos debe tomarse en cuenta que el medicamento anti-TB ideal debe mostrar alta potencia, particularmente contra cepas resistentes a los fármacos y poseer un perfil de seguridad adecuado. Igualmente, mostrar eficacia contra las formas latentes y replicantes de *M. tuberculosis* y no presentar interacciones fármaco/fármaco, particularmente con los medicamentos antirretrovirales [21].

Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar alternativas en la terapia que puedan ser utilizadas tanto para acortar la duración del tratamiento como para combatir el creciente problema de la resistencia a los medicamentos, estas alternativas se pueden encontrar en la síntesis de nuevas moléculas, la investigación biotecnológica y en la investigación de productos naturales [22].

En los últimos años ha existido un interés renovado en el uso de productos naturales ya que presentan gran diversidad, complejidad estructural y estereoquímica, aumentando las probabilidades de encontrar compuestos antituberculosos que posean mecanismos de acción novedosos o que puedan ser modificados para mejorar sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas [21].

La importancia de los productos naturales en el tratamiento de enfermedades data de tiempos ancestrales. Muchos de los fármacos que hoy conocemos fueron desarrollados a partir de derivados naturales [23].

Históricamente, los productos naturales han demostrado ser una vasta fuente de antibióticos incluyendo algunos de los utilizados para el tratamiento de la tuberculosis [24, 25].

En los últimos 20 años, casi el 50% de los medicamentos aprobados por la FDA en los Estados Unidos de América han sido derivados de productos naturales y

casi el 75% de todos los fármacos antiinfecciosos aprobados provienen de plantas medicinales [25, 26].

En la medicina tradicional mexicana se ha reportado el uso de más de 180 especies de plantas para el tratamiento de afecciones respiratorias que pueden estar asociados con la tuberculosis [22, 27]. Alrededor de 75 especies de la flora medicinal de México han sido evaluadas *in vitro* contra *M. tuberculosis* sensible H37Rv [28] y cientos de productos naturales obtenidos de plantas y otros organismos han sido evaluados como moléculas activas contra la TB [23, 29].

En particular, un grupo de metabolitos secundarios son los alcaloides que se caracterizan por su amplia diversidad estructural y distribución en la naturaleza, sumado a su extensa aplicación para tratar diversas enfermedades y para desarrollar nuevos fármacos antifímicos [6]. Los alcaloides se encuentran presentes en bacterias, hongos, animales y principalmente en plantas, reportándose en alrededor de 300 familias vegetales. Hasta la fecha se han descubierto más de 18 mil alcaloides distribuidos en todos los reinos y en todas las clasificaciones estructurales [30].

Especialmente, las plantas del género *Bocconia* son conocidas por su biosíntesis de alcaloides del tipo protoberberina, protopina y benzo[c]fenantridina [23]. Algunos compuestos aislados de plantas superiores de este género se han evaluado frente a cepas sensible y resistentes de *M. tuberculosis*, de los cuales,

los alcaloides de tipo benzo[c]fenantridina han mostrado actividad antimicobacteriana comparable con algunos fármacos antifímicos [31, 32, 33].

Por todo lo anterior, en el presente proyecto de investigación se propone la búsqueda de productos naturales, con propiedades antimicobacterianas frente a cepas sensible y resistentes de *M. tuberculosis*, a partir de las partes aéreas de *Bocconia latisejala* S. Wats.

1.2 Generalidades de *Mycobacterium tuberculosis*

La TB es una enfermedad infecciosa crónica, causada por un grupo de bacterias del orden *Actinomycetales* de la familia *Mycobacteriaceae*, principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*. Se adquiere por la vía aérea comúnmente y afecta mayoritariamente al sistema respiratorio [18].

M. tuberculosis fue descubierto por Robert Koch en 1882. Es un bacilo grampositivo, delgado, de extremidades redondeadas, con longitud de 2-5 μm y diámetro de 0.2 a 0.3 μm , aerobio estricto con preferencia por tejidos bien oxigenados. Es inmóvil, carece de cápsula o espora, no tiene ramificaciones [34].

Posee una pared celular gruesa y con un elevado contenido lipídico que consta de cuatro capas: la más interna es el peptidoglicano constituido de *N*-

acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico que a su vez están unidos por una cadena peptídica corta. La segunda capa posee arabinogalactanos que se encuentran unidos a los ácidos micólicos de la tercera capa. La capa más externa se encuentra constituida por lípidos y por mucósidos. En conjunto, esta composición le confiere a la micobacteria una escasa permeabilidad celular que en parte es responsable de la ineficacia de múltiples agentes antimicobacterianos, así como de la característica ácido-alcohol resistencia con determinadas tinciones para su visualización microscópica [34].

Algunos componentes de la pared, como el lipoarabinomano, intervienen en la patogenia y favorecen la supervivencia del microorganismo en el interior de los macrófagos [34, 35, 36].

Esta micobacteria crece lentamente, cada 18-20 horas, en comparación a los 20 minutos de la mayoría de bacterias, forma colonias no pigmentadas, produce niacina y catalasa, reduce nitratos, es sensible al calor, es inactivada por calentamiento a 68°C a pH 7 y presenta fluorescencia amarilla cuando se tiñe con la mezcla de auramina-rodamina [34, 36, 37] .

Tiene un genoma circular de 4,411,529 pares de bases (pb) y presenta un elevado contenido de guanina-citosina (G+C:61-71%) en su DNA. El genoma de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, codifica alrededor de 4,000 genes, posee características únicas, tales como el alto número de genes que codifican para las enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos y proteínas

que se localizan en la pared y membrana celular, asociadas a la variación antigénica durante la infección [38].

Sumado a lo anterior, este microorganismo tiene la capacidad de entrar en metabolismo latente [37], todas estas características mencionadas le proporcionan una especificidad que implican área de oportunidad en el ámbito clínico para generar respuesta a las pruebas diagnósticas y su tratamiento.

1.3 Patogénesis de la tuberculosis

La infección ocurre cuando un individuo con TB pulmonar expelle aerosoles cargados con *M. tuberculosis*, los que al ser inhalados por otro individuo son fagocitados por los macrófagos alveolares. En personas inmunocompetentes los macrófagos controlan eficazmente la proliferación del bacilo. Si la infección persiste, los bacilos comienzan a replicarse dentro de los macrófagos de hospederos inmunocomprometidos progresando hacia una tuberculosis primaria activa. En algunos casos ocurre diseminación hematógena, dispersándose en células endoteliales y epiteliales. Debido al crecimiento exponencial de la micobacteria, ésta puede propagarse a otros órganos a través de la linfa y la sangre con la ocurrencia de TB extrapulmonar [6, 34, 35, 38].

El periodo de incubación dura desde el momento de la infección hasta que aparecen las lesiones primarias (4-12 semanas); sin embargo, el riesgo de

transmisión puede persistir toda la vida cuando la TB permanece como infección latente. El grado de transmisión de la enfermedad depende del número de bacilos eliminados, de su virulencia y de las oportunidades de formación de aerosoles por expectoración. El periodo de transmisión se mantiene mientras se expulsan bacilos infecciosos. La TB extrapulmonar no se transmite en ausencia de secreciones [2, 35].

1.4 Manifestaciones clínicas de la tuberculosis y diagnóstico

La TB pulmonar se caracteriza por la producción de esputo, sudoración, tos crónica, anorexia y hemoptisis [6, 7]. Las lesiones pulmonares tempranas por lo general se curan sin dejar alteraciones residuales, salvo calcificaciones ocasionales en los pulmones o en los ganglios linfáticos traqueobronquiales [39].

Alrededor del 45% de los pacientes sufren de TB extrapulmonar y puede variar según el origen étnico, la edad y la inmunidad. En regiones endémicas, el 10% de casos de tuberculosis son subclínicos con síntomas negativos de esputo y asociado con el VIH. Sin embargo, alrededor de 25-30% de los pacientes con tratamiento de VIH nunca son diagnosticados de TB [6].

El diagnóstico de la tuberculosis se establece a partir de signos y síntomas clínicos de sospecha, pruebas de imagen y confirmación microbiológica. En

los últimos años se han incorporado técnicas de amplificación genética. A pesar de ello, ningún método consigue el 100% de diagnósticos, por lo que el 10-15% de casos de TB pulmonar y hasta el 50% en algunas formas de TB extrapulmonar no tendrán confirmación microbiológica y se apoyarán en la clínica y en la respuesta al tratamiento [40].

1.5 Datos epidemiológicos

De acuerdo con las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2017, se reportaron 10 millones de casos nuevos de TB y 1.3 millones de defunciones por esta enfermedad en pacientes VIH-negativos y 300 mil muertes en pacientes con VIH/SIDA. Considerándose que 1.3 millones de nuevos casos de tuberculosis presentaban co-infección con el VIH [3].

EL 87% de las incidencias se registraron en países de ingresos bajos y medianos, particularmente en la India, seguida de China, Indonesia Nigeria, Pakistán y Sudáfrica [3].

La relación de incidencia de MDR/RR-TB con resistencia a alguna fluoroquinolona (ofloxacina, levofloxacina y moxifloxacina) fue del 22% [3].

Del año 2000 al 2015 se han reportado 49 millones de muertes, aunque la incidencia de la tuberculosis ha disminuido un 1.5% anual desde 2000. La

OMS establece en 2018 el objetivo de la reducción del 90% de las muertes y el 80% de las incidencias para el 2030 [3].

En América Latina, México se encuentra entre los países con mayor incidencia de casos de TB pulmonar [41]. A inicios de noviembre de 2018 se reportaron 13,937 nuevos casos de TB respiratoria en México. Los estados de la República Mexicana que tienen mayor incidencia de casos de TB pulmonar son Veracruz, Baja California y Nuevo León [42].

1.6 Tratamiento y fármaco-resistencia

Las directrices y recomendaciones para el tratamiento de la TB se actualizan regularmente, todo esquema de terapia de la TB debe cumplir dos bases bacteriológicas: la primera, asociar fármacos para evitar la selección de resistencias y la segunda, prolongar el tratamiento el tiempo suficiente que asegure la curación y evite las recaídas.

La terapia actual recomendada por la OMS para el tratamiento de TB sensible comprende un régimen de corta duración (2 meses) el cual incluye cuatro fármacos de primera línea (isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida; seguido de un tratamiento de 4 meses con rifampicina e isoniazida, mientras que, las cepas MDR requieren un tratamiento con fármacos de segunda línea como kanamicina, amikacina, capreomicina, *p*-aminosalicilato,

fluoroquinolonas, etionamida y cicloserina, donde los tratamientos a menudo se extienden a lo largo de 2 años (Tabla 1) [43].

La única vacuna disponible para su control es el *Bacillus* de Calmette-Guérin (BCG) utilizada como profilaxis en neonatos y lactantes; sin embargo, falla en la protección contra la TB pulmonar, siendo ésta la forma más frecuente y la responsable de la diseminación [44]. Actualmente, algunas vacunas candidatas, como la vacuna recombinante VPM 1002 que se encuentra en ensayos clínicos de fase IIb para la prevención de TB infantil, se encuentran en etapas de desarrollo y evaluación [43].

Para asegurar al máximo la posibilidad de curación y sin recaídas se plantean clasificaciones racionales de fármacos en los que todo tratamiento asocie al menos 4 fármacos no utilizados previamente, o en los que exista la certeza de que *M. tuberculosis* es sensible a los mismos. De ellos, al menos 2 deben ser fármacos esenciales, que son los que eliminan la mayor parte de la población bacilar y pueden curar al enfermo [42].

En términos de resistencia, la TB se clasifica en 5 categorías que van de acuerdo con la dificultad del tratamiento:

1. Tuberculosis inicial con sensibilidad a todos los fármacos antifímicos.
2. Tuberculosis con resistencia a isoniazida, pero con sensibilidad a rifampicina.

3. Tuberculosis con resistencia a rifampicina, pero con sensibilidad a isoniazida.
4. Tuberculosis MDR con sensibilidad a fluoroquinolonas e inyectables de segunda línea.
5. Tuberculosis MDR con resistencia añadida a fluoroquinolonas e inyectables de segunda línea, o incluso patrones más altos de resistencia [42].

La incidencia de cepas MDR se planteó en los 90s para aquellas bacterias resistentes a rifampicina e isoniazida. El 10% de estas cepas desarrollaron resistencia adicional a los principales fármacos antituberculosos de segunda línea: fluoroquinolonas y aminoglucósidos, definida como extrema resistencia a fármacos (XDR). Al igual que cualquier otra bacteria, *M. tuberculosis* adquiere mutaciones durante la replicación del genoma. Algunas de estas mutaciones conducen al desarrollo de resistencia a fármacos antituberculosos [13].

Tabla 1. Clasificación de fármacos antituberculosos [14, 15]

	Grupo	Fármacos
1	Antituberculosos de primera línea, orales	Isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida
2	Antituberculosos de segunda línea, inyectables	Estreptomicina, kanamicina, amikacina, capreomicina y viomicina
3	Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino, ofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino y gatifloxacino
4	Bacteriostáticos orales de segunda línea	Etionamida, protionamida, cicloserina, ácido <i>p</i> -aminosalicílico y tioacetazona
5	Fármacos de eficacia no demostrada (no recomendados por la OMS para su uso habitual en el tratamiento de la tuberculosis MDR)	Amoxicilina/ácido clavulánico, claritromicina
6	Fármacos para el tratamiento de tuberculosis MDR	Bedaquilina, linezolid, delamanida y clofazimina,
7	Fármacos en desarrollo	Pretomanid, AZD-5847, sutezolid, SQ109, TBA-354, Q203

No obstante; además de la resistencia, debe considerarse que estos medicamentos ocasionan diversos efectos adversos, los más comunes son: leves aumentos en el nivel de las enzimas hepáticas, erupción cutánea, intolerancia gastrointestinal, neuropatía y artralgias. También pueden presentarse efectos adversos graves como hepatitis, trombocitopenia inmune, agranulocitosis, hemólisis, insuficiencia renal, neuritis óptica y ototoxicidad (Tabla 2) [43].

Tabla 2. Características de los fármacos antituberculosos [6,14]

Fármaco	Mecanismo de acción	Gen involucrado en la resistencia	Frecuencia de mutación	*CMI y Toxicidad
Fármacos de primera línea				
Isoniazida (1952)	Inhibición de la síntesis de ácidos micólicos	<i>katG</i> (42–58%). Promotor <i>mabA-inhA</i> (21–34%)	10 ⁻⁵ -10 ⁻⁶	0.025 Hepatitis clínica Polineuritis periférica
Rifampicina (1965)	Inhibición de la transcripción	<i>rpoB</i> (96–98%)	10 ⁻⁵	0.1-0.4 Molestias gastrointestinales. Afectación hepática
Estreptomina (1944)	Inhibición de la síntesis proteica	<i>rpsL</i> (52–89%) <i>rrs</i> (8–21%)	10 ⁻⁶ -10 ⁻⁸	1 Ototoxicidad
Pirazinamida (1970)	-	<i>pncA</i> (72–97%)	10 ⁻³ -10 ⁻⁴	6-50 Hiperuricemia. Hepatotoxicidad
Fármacos de segunda línea				
Etionamida (1966)	Inhibición de la síntesis de ácidos micólicos	Promotor <i>mabA, inhA, ethA</i>	10 ⁻³	0.25 Intolerancia digestiva. Hepatotoxicidad. Neurotoxicidad
Kanamicina/amicacina (1957)	Inhibición de la síntesis proteica	<i>rrs; rpsL</i>	10 ⁻⁶	0.5-1 Ototoxicidad (vestibular y coclear) Nefrotoxicidad
Cicloserina (1955)	Inhibición de la síntesis de pared celular	<i>alr; ddlA</i>	10 ⁻⁴	25 Neuropatía periférica. Alteraciones del SNC. Reacciones psicóticas
Capreomicina (1967)	Inhibición de la síntesis proteica	<i>RpsR, RplI, RplY, RplJ</i>	10 ⁻³	2 Nefrotoxicidad, ototoxicidad
Ácido <i>p</i> -aminosalicílico (1946)	Antifólico	<i>thyA</i>	10 ⁻⁴	0.3-1 Intolerancia gastrointestinal
Fluoroquinolonas	Inhibición de la subunidad A de la ADN-girasa	<i>gyrA, gyrB, lfra</i>	-	0.5 Bien toleradas

*CMI: concentración mínima inhibitoria contra *M. tuberculosis* H37Rv (µg/mL)

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Etnomedicina

México se ubica en el cuarto lugar a nivel mundial por su diversidad vegetal (aproximadamente 25,000 especies), sumado a la enorme riqueza etnobotánica con que cuenta, ya que alrededor del 15% de estas especies son utilizadas en la medicina tradicional para aliviar diversos padecimientos. Sin embargo, solo el 33% de las especies de plantas de la medicina tradicional mexicana se ha utilizado para tratamiento de afecciones respiratorias asociadas a la tuberculosis [45] y alrededor de 75 especies de la flora medicinal de México han sido evaluadas *in vitro* contra *M. tuberculosis* H37Rv [28].

Algunas especies han sido seleccionadas con base en sus usos en la medicina tradicional. Destacan por su actividad *Phoradendron robinsonii*, *Larrea divaricata*, *Amphipterygium adstringens*, *Buddleja cordata*, *Piper sanctum*, *Arracacia toluensis*, *Carya illinoensis*, *Diospyros anisandra*, *Thymus vulgaris* [28] y *Bocconia latisepala* [31].

El género *Bocconia*, perteneciente a la familia *Papaveraceae*, consta de diez especies endémicas de las áreas tropicales y subtropicales, desde México hasta Sudamérica [46]. Se han reconocido las siguientes especies: *B. arborea*, *B. cordata*, *B. frutescens*, *B. hintoniorum*, *B. integrifolia*, *B. latisepala*, *B. laurine*, *B. microcarpa*, *B. pearcei* y *B. vulcanica*. La importancia fitoquímica de este género se debe a la biosíntesis de protoberberina, protopina y alcaloides de tipo benzo[c]fenantridina, a la fecha se han descrito alrededor de 75 alcaloides en el género *Bocconia* [31, 47, 48, 49, 50].

Las especies *B. arborea* y *B. frutescens* destacan por sus usos etnomédicos con actividad antibacteriana, antiparasitaria, antitumoral, antitusiva, analgésica, antiulcerosa, antituberculosa, entre otras [51].

2.2 Información taxonómica y botánica de *B. latisepala* S. Wats

La especie *Bocconia latiselapa* S. Wats, conocida como “llora sangre”, forma parte del matorral submontano de la Sierra Madre Oriental, se localiza en lomeríos de suaves pendientes y en los taludes inferiores sobre los plegamientos de las faldas de dicha sierra, entre los 400 y 800 m de altura sobre el nivel del mar [52].

Bocconia latisepala S. Wats (Figura 1) es un arbusto anual, con tallos que se encuentran en racimos, tiene una altura de 1.5 a 2 metros, sus hojas son ampliamente oblongadas, glaucosas y poco glabras, blanquecinas por la parte

de abajo, pinadas lobuladas al medio, senos redondeados en la base, amplios lóbulos obtusos y dentados, sépalos ampliamente elípticos o casi orbiculares con 3 o 4 líneas largas, más largos que los pedicelos robustos y 15 estambres, fruto semejante a *B. frutescens* el cual es una cápsula elipsoide, lisa, de hasta 7 mm de largo, carnosa y puntiaguda en ambos extremos, de color rojo amaranto, las semillas son pequeñas, negras, con una zona roja en un extremo. Crece en laderas sombreadas, se encuentra en la base y estribaciones de la Sierra Madre, al sur de Monterrey [53, 54].

División taxonómica:

Reino: *Plantae*

Género: *Bocconia*

Phylum: *Magnoliophyta*

Epíteto específico: *latisepala*

Clase: *Magnoliopsida*

Nombre Científico: *Bocconia*

Orden: *Papaverales*

latisepala S. Wats

Familia: *Papaveraceae*

Nombre común: lora sangre [55].



Figura 1. *B. latisejala* S. Wats. Ejemplar de Nuevo León, México

2.3 Alcaloides benzo[c]fenantridínicos

Los alcaloides de tipo benzo[c]fenantridina son un grupo pequeño de productos naturales. La presencia de alcaloides de tipo benzo[c]fenantridina es restringida a plantas de las familias *Fumariaceae*, *Rutacea* y principalmente *Papaveraceae* [56]. Estos alcaloides derivados de isoquinolina son caracterizados por presentar colores brillantes y fluorescentes.

Los alcaloides cuaternarios benzo[c]fenantridínicos presentan susceptibilidad hacia reactivos nucleofílicos. Este ataque nucleofílico se asocia con una serie de alteraciones significativas en el aspecto físico, solubilidad, constitución, propiedades espectrales, etc. [56].

La estructura general de estos alcaloides tiene como base la unión de cuatro anillos aromáticos (A, B, C y D) y el átomo de nitrógeno en la posición 5 (Figura 2). El enlace doble entre los átomos N5 y C6 es generalmente llamado grupo iminio y es el sitio más reactivo en la molécula. Se pueden tener diversas combinaciones de sustituyentes en las posiciones 2, 3, 7, 8, 9, 10 y 12 con grupos metoxilo, metilendioxiolo e hidroxilo.

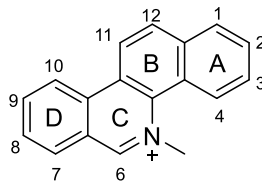


Figura 2. Estructura base de alcaloides de tipo benzo[c]fenantridina [56]

2.3.1 Biosíntesis de alcaloides de tipo benzo[c]fenantridina

Se han realizado estudios de marcaje isotópico que han permitido conocer la biosíntesis de estos metabolitos secundarios derivados de la ruta del ácido shikímico a partir de tirosina. Se describe que en su formación participan diversas enzimas agrupadas en oxido-reductasas, transferasas y liasas. Asimismo, hay avances genéticos en los que se han podido caracterizar 30 enzimas, permitiendo conocer los procesos de regulación [57].

La biosíntesis de estos alcaloides se puede agrupar teóricamente en tres etapas:
 Etapa 1. La producción del precursor (*S*)-Norcoclaurina, a partir de dos moléculas de *L*-Tirosina (Figura 3). Etapa 2. La transformación de (*S*)-Norcoclaurina a (*S*)-Reticulina (Figura 3) y Etapa 3. Las rutas de diversificación que dan origen a las diferentes estructuras (Figura 4) [58, 59].

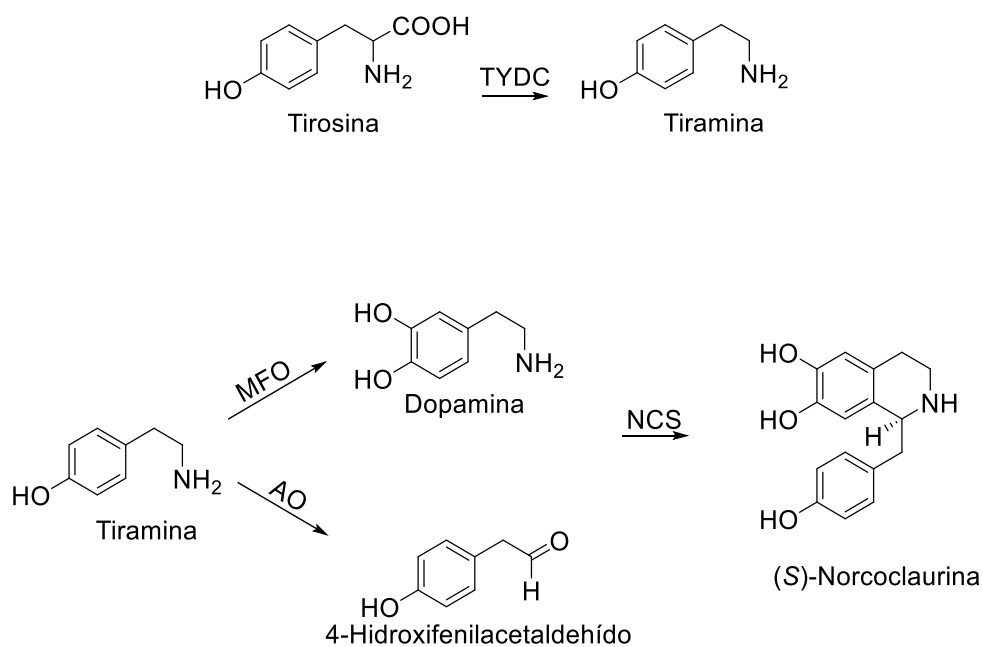


Figura 3. Etapa 1. Formación de (*S*)-Norcoclaurina a partir de dos moléculas de tirosina. TYDC: Tirosina dopa descarboxilasa, MFO: Monofenol oxidasa, AO: Aminooxidasa y NSC: Norcoclaurina sintasa.

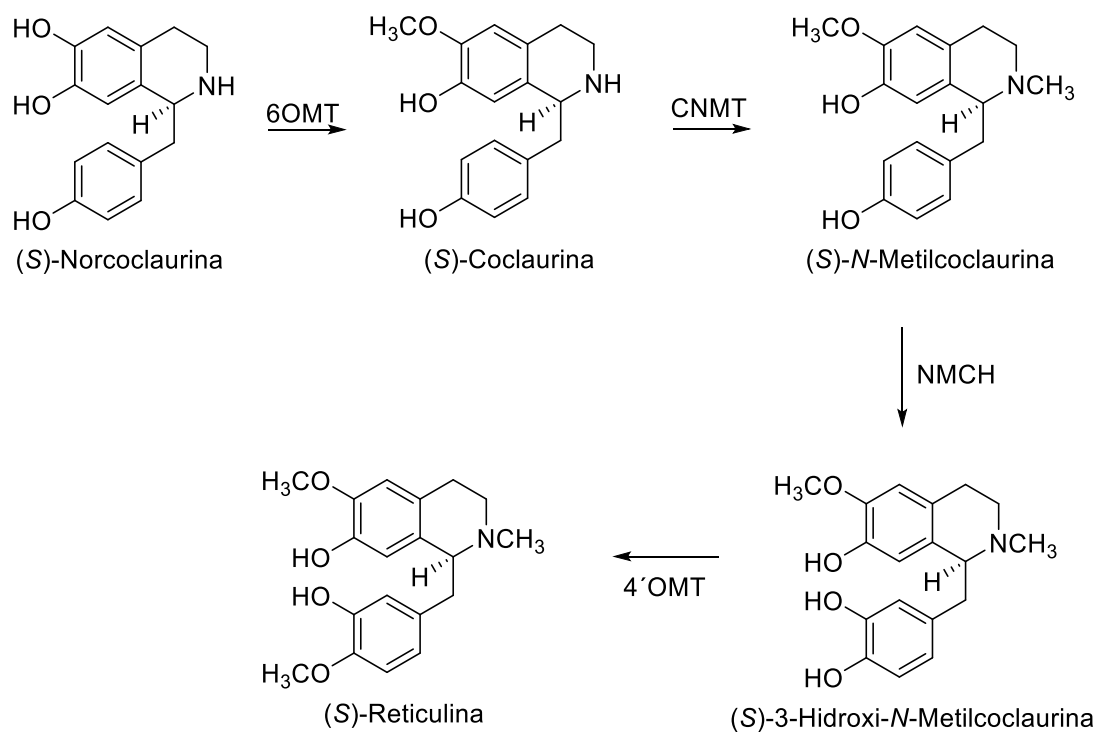


Figura 4. Etapa 2. Formación de (S)- Reticulina a partir de (S)-Norcoclaurina. 6OMT: (S)-Norcoclaurina-6-O-metiltransferasa, CNMT: (S)-Coclaurina-N-metiltransferasa, NMCH: (S)-N-metilcoclaurina-3'-hidroxilasa y 4'OMT: (S)-3'-hidroxi-N-metilcoclaurina-4'-O-metiltransferasa.

Las primeras dos fases de la biosíntesis de estos metabolitos secundarios tienen ocurrencia en el citosol de las células vegetales. Para la formación de alcaloides tipo benzo[c]fenantridina desde (S)-Reticulina se requieren 7 enzimas localizadas en el retículo endoplasmático (Figura 5) [57].

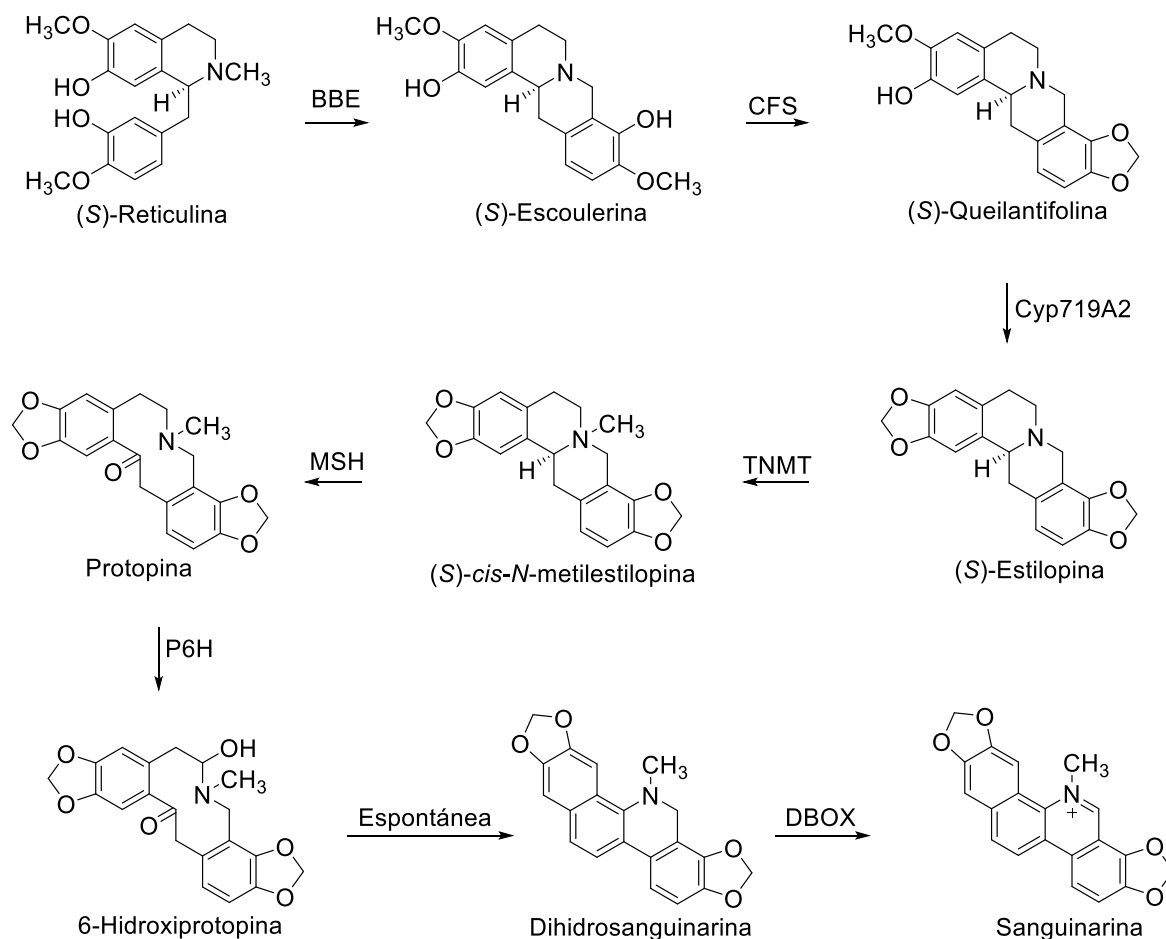


Figura 5. Etapa 3. Formación de Sanguinarina (alcaloide benzo[c]fenatridínico) a partir de (S)-Reticulina. BBE: Berberina sintasa, CFS: Queilantifolina sintasa, Cyp719A2: Estilopina sintasa, TNMT: Tetrahidroprotoberberina sintasa, MSH: N-metilstilopina 14-hidroxilasa, P6H: Protopina 6-hidroxilasa, DBOX: dihidrobenzofenantridina oxidasa [60].

2.4 Investigación científica

Se han realizado estudios científicos en plantas del género *Bocconia*, la mayoría de ellos orientados al aislamiento y purificación de alcaloides, como es el caso de Domínguez, *et al.* que en 1965 reportaron el aislamiento de sanguinarina, oxisanguinarina, queleritrina, protopina y α -alocriptopina (Figura 6) a partir de los extractos con éter de petróleo, de las partes aéreas (hojas, ramas, corteza, tallos

y semillas) y raíces de *B. latifolia* S. Wats [61]. Estos compuestos fueron caracterizados por punto de fusión, análisis elemental y espectroscopia de infrarrojo.

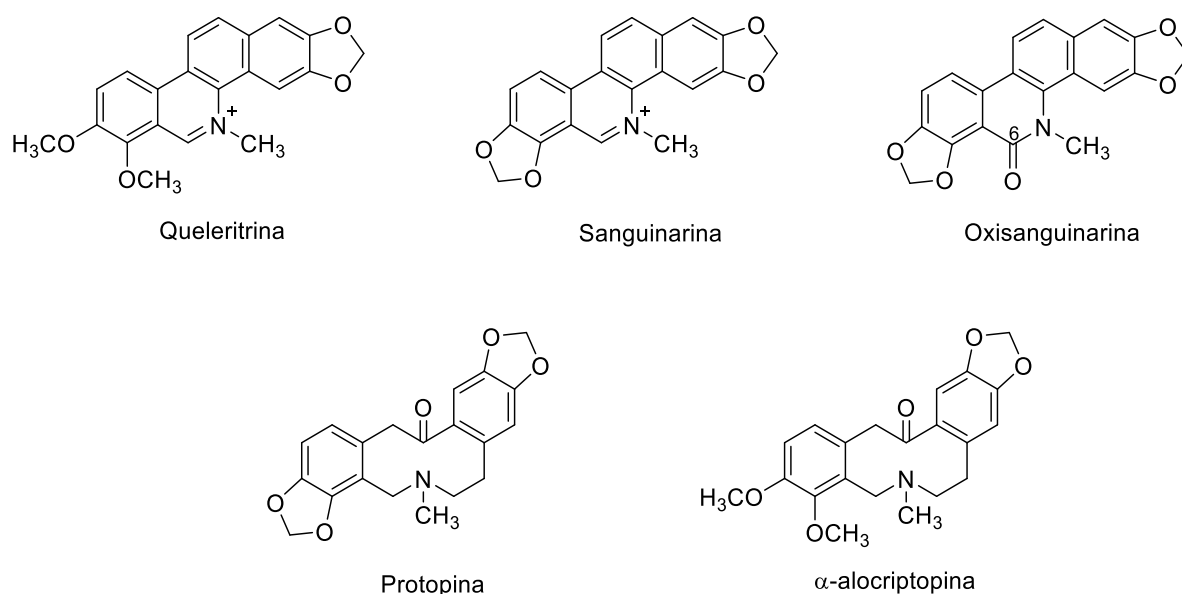


Figura 6. Compuestos aislados de *B. latifolia* S. Wats.

Posteriormente, en 1984, Krane y col. reportaron un compendio de los alcaloides benzo[c]fenantridínicos aislados de plantas de la familia *Papaveraceae*, entre los que se incluyen: sanguinarina, quelirubina, queleritrina, quelilutina, sanguirubina, avicina, dihidrosanguinarina, oxisanguinarina, oxiquelirubina, dihidroqueleritrina, oxiqueleritrina, etcétera [62].

En 2002, Julián y col. aislaron y caracterizaron los alcaloides presentes en la planta *B. arborea*: 6-acetonildihidrosanguinarina, 6-acetonildihidroqueleritrina,

6-metoxidihidroqueleritrina, sanguidimerina, bocconarborina A y bocconarborina B. Además, se encontraron dos estructuras novedosas, un alcaloide benzo[c]fenantridínico denominado (-)-6,12-dimetoxidihidroqueleritrina y un triterpenoide pentacíclico, el ácido (+)-20-*epi*-katónico (Figura 7) [47, 63].

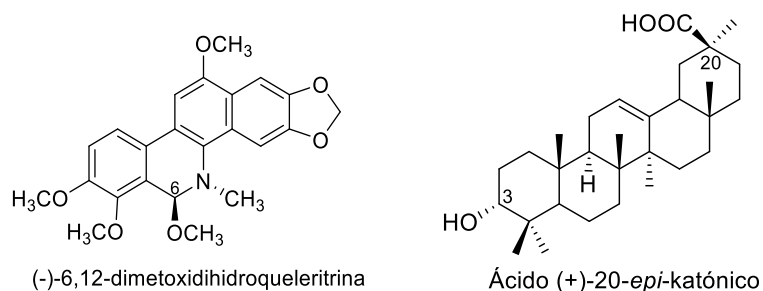


Figura 7. Novedosos productos naturales obtenidos de *B. arborea*

En 2014, Yu y colaboradores presentaron una revisión química y biológica de los alcaloides presentes en especies de los géneros *Bocconia* y *Macleaya*, reportando un total de 75 alcaloides, predominando alcaloides de tipo benzofenantridina, protoberberina y protopina. Además, se reportó la actividad biológica de los extractos orgánicos de algunas especies de estos géneros, como la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto metanólico y hexánico de las hojas de *B. frutescens* con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 125 µg/mL. También se reporta la evaluación biológica de los alcaloides con efectos antitumorales, insecticidas, antiinflamatorios, antimicrobianos y efecto en el sistema cardiovascular [50].

Referente al estudio antimicobacteriano de los alcaloides de plantas del género *Bocconia*, en 2009, Camacho, *et al.* reportaron la actividad antituberculosa de seis alcaloides benzo[*c*]fenantridínicos aislados de *B. arborea*, de los cuales 6-metoxidihidroquelirubina mostró mayor actividad (CMI = 12.5 µg/mL) contra cepas sensible (H37Rv) y resistentes (aislados clínicos 345, M-12 y M-20) de *M. tuberculosis*. Asimismo, se observó que 6-metoxidihidroquelirubina y 6-metoxidihidrosanguinarina también poseen potente actividad antimicobacteriana (Figura 8) [33].

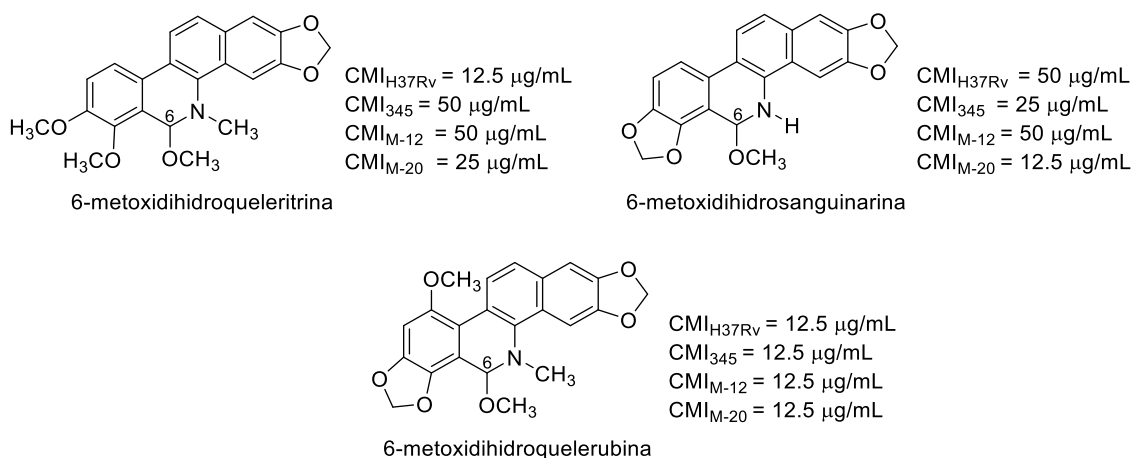


Figura 8. Actividad inhibitoria de cepas sensible (H37Rv) y resistentes (M-12, M-20, 345) de *M. tuberculosis* para los alcaloides obtenidos de *B. arborea*.

El estudio más reciente es por Hernández-Almanza (2016) quien obtuvo diez alcaloides benzo[*c*]fenantridínicos del extracto metanólico de las semillas de *B. latisejala*, los cuales fueron caracterizados como dihidrosanguinarina, oxisanguinarina, dihidroquelirubina (–)-6-acetonildihidroquelirubina, (–)-quelirubidimerina, quelirubina, arnottianamida, (–)-6-acetonil-12-metoxidihidroquelirubina, (–)-6,12-dimetoxidihidroquelirubina y 12-

metoxiqueleritrina [14]. Los compuestos 12-metoxiqueleritrina y (-)-6-acetonil-12-metoxidihidroqueleritrina representan dos nuevos productos naturales pertenecientes a la familia de alcaloides benzo[c]fenantridínicos. De acuerdo con la actividad biológica reportada, queleritrina y 12-metoxiqueleritrina resultaron moléculas promisorias para futuras investigaciones contra *M. tuberculosis* H37Rv (Figura 9) [31].

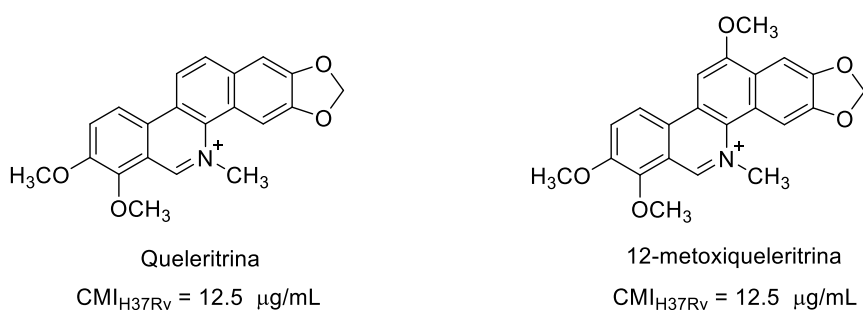


Figura 9. Actividad antimicobacteriana de queleritrina y 12-metoxiqueleritrina contra a *M. tuberculosis* H37Rv.

Aunado a los reportes de actividad antimicobacteriana, investigaciones recientes han reportado que los alcaloides sanguinarina y berberina inducen la filamentación de bacterias tanto grampositivas como gramnegativas y previenen la división celular bacteriana mediante la inhibición de la citocinesis. Esto se debe a que dichos compuestos inhiben la función de FtsZ (proteína mediadora de la citocinesis en bacterias) [64, 65].

CAPITULO 3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Los tallos y hojas de *Bocconia latisejala* S. Wats contienen diferentes productos naturales a los ya reportados en la especie, algunos de ellos son capaces de inhibir el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* sensible y multifármaco resistente en menor concentración mínima inhibitoria que etambutol.

3.2 Objetivo General

Aislamiento, caracterización estructural y determinación de la actividad antimicobacteriana de los compuestos presentes en las partes aéreas de *Bocconia latisejala* S. Wats.

3.2.1 Objetivos específicos

1. Recolección de las partes aéreas (hojas y tallos) de *Bocconia latisejala* S. Wats.
2. Extracción orgánica en cloroformo-metanol (CHCl₃:CH₃OH, 1:1) de hojas y tallos.
3. Fraccionamiento del extracto orgánico de tallos.
4. Fraccionamiento del extracto orgánico de hojas.
5. Aislamiento y purificación de los constituyentes presentes en las fracciones.
6. Elucidación estructural de los compuestos puros.
7. Evaluación de la actividad antimicobacteriana de los compuestos puros frente a una cepa sensible (H37Rv) y una resistente (G122) de *Mycobacterium tuberculosis* por el método Alamar Azul (MABA).
8. Evaluación de la actividad citotóxica por el método de sulforrodamina B.

CAPITULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material y equipo

4.1.1 Estudio fitoquímico

En la etapa fitoquímica, se empleó como fase estacionaria para la cromatografía en columna (CC) gel de sílice (63-200 μm ; 70-230 mesh, Sigma Aldrich). Para la cromatografía en placa fina se emplearon: cromatofolios de gel de sílice 60 F-254 (Fluka analytical). La cromatografía preparativa plana se realizó en cromatoplasmas de gel de sílice 60 F-254 20 x 20 cm (Merck). Como revelador se utilizó una lámpara de UV marca Spectroline (λ 254 y 365nm), reactivo Caín, reactivo de Dragendorff y vainillina. Los eluentes empleados en las cromatografías fueron: cloroformo (CHCl_3), metanol (CH_3OH o MeOH), hexano (Hex), éter etílico, éter de petróleo, etanol (EtOH), acetato de etilo (AcOEt) y diclorometano (CH_2Cl_2).

Los puntos de fusión fueron determinados en un instrumento Fisher-Johns. Durante todo el proyecto se utilizó el evaporador rotativo marca Buchi modelo R-300. Además, se hizo uso de balanza analítica Sartorius B1205.

Los espectros de masas se realizaron con un equipo JMST100LC AccuTOF LC controlada por una fuente de ionización ionSense DART SVP100. Para la caracterización estructural, los espectros de Resonancia Magnética Nuclear se realizaron en un equipo de RMN Varian Unity Inova 300; como estándar interno se utilizó el tetrametilsilano (TMS) y los disolventes utilizados fueron cloroformo deuterado (CDCl_3), metanol deuterado (CD_3), agua deuterada (D_2O) y dimetilsulfóxido deuterado (CD_3SOCD_3), los desplazamientos químicos se reportan en ppm (δ).

4.1.2 Ensayos biológicos

En los ensayos de actividad antimicobacteriana se emplearon microplacas estériles de 96 pocillos con tapa (Corning Costar, New York), como medios de cultivo se utilizó el medio sólido Lowenstein Jensen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y medio Middlebrook 7H9 (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 y glicerol (Sigma-aldrish, St Louis, MO). Además, se utilizó Tween 80 (Sigma-aldrish, St Louis, MO) y Azul de Alamar (Rezarsurina. Biotum, Hayward, CA). Se emplearon los siguientes controles: estreptomina, levofloxacino, rifampicina, isoniazida y etambutol. Las cepas de *M. tuberculosis* empleadas para los ensayos de actividad antimicobacteriana fueron la H37Rv ATCC® 27294™ (sensible a los fármacos de primera línea: isoniazida, rifampicina, etambutol y

pirazinamida) y un aislado clínico G122 (resistente a isoniazida, rifampicina y etambutol). Los disolventes usados fueron: dimetilsulfóxido (DMSO. J.T.Baker, USA), agua desionizada estéril y se aplicó una solución desinfectante de glutaraldehído al 2% activado (GAFIDEX®). Se emplearon micropipetas Biopette A BP1000 y BP200, micropipeta electrónica multicanal a pistón VWR para las microdiluciones y preparación de inóculos. Los ensayos de actividad antimicobacteriana se realizaron en una campana de bioseguridad clase II BSC110011B2-X Biobase y campana de flujo laminar Edgegard y los insumos se esterilizaron en la autoclave semiautomática Tuttnaver.

4.2 Estudio fitoquímico

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

4.2.1 Recolección del material vegetal

La recolección de las partes aéreas (hojas y tallos) de *Bocconia latisejala* S. Wats se realizó en el municipio de San Pedro Garza García del estado de Nuevo León.

La colecta se realizó los días 10 y 31 de Julio de 2016, cuando la especie se encontraba en su etapa de fructificación con abundante cantidad de semillas. Un

ejemplar de la planta se localiza en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL con los números de folio 26666 y 26667 [31].

4.2.2 Obtención del extracto de hojas y tallos

Las hojas y tallos de *B. latisepala* S. Wats se secaron por separado en condiciones de sombra y temperatura ambiente por 15 días. Una vez seco el material vegetal se trituró por separado con ayuda de mortero, licuadora y molino de cuchillas, para la operación se utilizó indumentaria de protección como cubrebocas y lentes de seguridad.

Se obtuvieron 2.509 Kg de hojas (polvo color verde opaco) y 460 g de tallos (apariencia fibrosa). Se dividió el material vegetal en porciones equivalentes en matraces Erlenmeyer de 2 L de capacidad. La obtención del extracto se realizó por maceración en 1.6 L de cloroformo/metanol en proporción 1:1 (CHCl₃/CH₃OH) por 48 h. Posteriormente, se filtró el macerado por gravedad y se concentró a presión reducida en rotaevaporador. El procedimiento se repitió por 6 ocasiones, obteniendo de esta manera 398.5 g del extracto de hojas y 44.2 g de extracto de tallos.

4.2.3 Pruebas preliminares cualitativas

Con la finalidad de realizar un rastreo de los constituyentes principales en las hojas y los tallos de la especie en estudio se realizaron dos pruebas preliminares

específicas para determinación de metabolitos secundarios, teniendo como base lo descrito en los antecedentes donde se reporta la presencia alcaloides y triterpenos en especies del género *Bocconia*. Por ello se realizó la prueba de Dragendorff y la del reactivo de Caín.

4.2.3.1 Reactivo de Dragendorff para la detección de alcaloides

Este reactivo está compuesto de dos soluciones: a) se disuelven 0.17 g de nitrato de bismuto $[\text{Bi}(\text{NO}_3)_3]$ en 10 mL de agua destilada más ácido acético glacial (CH_3COOH) (4:1) y b) se disuelven 4 g de yoduro de potasio (KI) en 10 mL de agua destilada. Se mezclan las soluciones a) y b) y se adicionan 8 mL de ácido acético glacial y 70 mL de agua desionizada [66].

Esta prueba preliminar es positiva para alcaloides al presentarse una coloración rojo, naranja o marrón, lo cual es debido a la formación de un complejo entre el ión metálico y la amina del alcaloide (Figura 10).

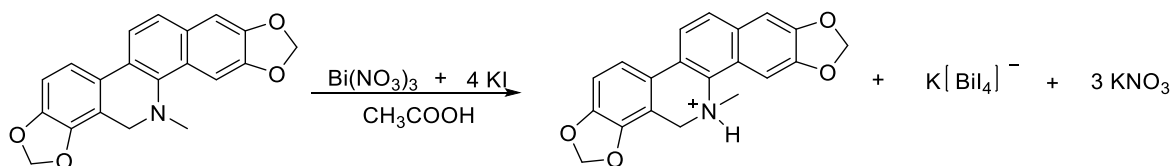


Figura 10. Reacción de Dragendorff para determinación de alcaloides.

4.2.3.2 Reactivo de Caín para la detección de triterpenos y esteroides

Se preparó una solución con anhídrido acético $[(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}]$, ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y cloroformo (CHCl_3) en proporción 10:1:25, respectivamente [66].

Esta reacción es equivalente al método de Liebermann-Burchard [67] y se considera positiva al presentarse coloraciones azul, rojo, rosa, violeta o marrón para triterpenos o esteroides. La coloración aparece como consecuencia de la reacción entre un grupo hidroxilo en medio ácido con la pérdida de una molécula de agua, aumentando la conjugación del anillo insaturado adyacente (Figura 11).

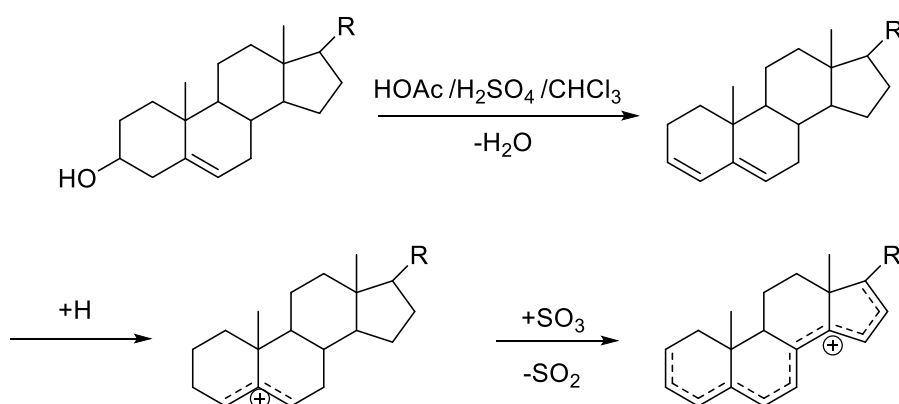


Figura 11. Reacción de Caín o Liebermann-Burchard para determinación de terpenos y esteroides.

Los reactivos descritos anteriormente se utilizaron como reveladores en cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés), además de los reveladores inespecíficos como el sulfato cérico amoniacal y la vainillina.

4.2.4 Fraccionamiento del extracto orgánico total de tallos

El fraccionamiento del extracto orgánico de los tallos (44.2 g), obtenido de la maceración en CHCl₃/CH₃OH (Ver sección 4.2.2), se realizó mediante una cromatografía en columna (CC), utilizando como fase estacionaria (FE) gel de sílice en relación 1:16, y como fase móvil (FM) un gradiente Hex/CHCl₃ y CHCl₃/CH₃OH con proporciones en orden creciente de polaridad. Se tuvo un volumen muerto de 1L, dividido en 5 eluatos de 200 mL. Se obtuvo un total de 320 fracciones las cuales fueron reunidas por sus características cromatográficas en capa fina (TLC) en 26 fracciones principales (Tabla 3).

Tabla 3. Fraccionamiento del extracto orgánico de los tallos

FRACCIÓN	POLARIDAD	MASA (g)	
A	1	Hex (100)	0.0607
B	2-15	Hex:CHCl ₃ (90:10)	
C	16-25	Hex:CHCl ₃ (80:20)	0.0613
D	26-40	Hex:CHCl ₃ (70:30)	
E	41-45	Hex:CHCl ₃ (60:40)	0.1240
F	46-55	Hex:CHCl ₃ (55:45)	
G	56-60	Hex:CHCl ₃ (55:45)	0.0902
H	61-70	Hex:CHCl ₃ (50:50)	
I	71-91	Hex:CHCl ₃ (45:55)	0.4583
J	92-95	Hex:CHCl ₃ (35:65)	0.0161
K	96-98	Hex:CHCl ₃ (25:75)	0.0490
L	99-100	Hex:CHCl ₃ (25:75)	0.2332
M	101-105	Hex:CHCl ₃ (15:85)	
N	106-110	Hex:CHCl ₃ (15:85)	0.1410
Ñ	111-115	Hex:CHCl ₃ (15:85)	0.0362
O	116-136	Hex:CHCl ₃ (10:90)	0.2421
P	137-170	CHCl ₃ (100)	1.2877
Q	171-175	CHCl ₃ :CH ₃ OH (90:10)	0.6100
R	176-180	CHCl ₃ :CH ₃ OH (80:20)	2.5669
S	181-210	CHCl ₃ :CH ₃ OH (75:25)	6.2917
T	211-215	CHCl ₃ :CH ₃ OH (75:25)	0.9626
U	216-220	CHCl ₃ :CH ₃ OH (70:30)	0.3369
V	221-240	CHCl ₃ :CH ₃ OH (50:50)	13.0240
W	241-275	CHCl ₃ :CH ₃ OH (40:60)	9.7204
X	276-315	CHCl ₃ :CH ₃ OH (20:80)	2.1112
Y	315-320	CH ₃ OH (100)	0.2925

A partir de las fracciones A–H se obtuvieron mezclas de ácidos grasos y ceras que no fueron separadas en sus componentes; mientras que, de la fracción I se purificaron cristales blancos, cuyo espectro de RMN ^1H permitió deducir que se trataba de un hidrocarburo alifático. El estudio de las fracciones principales P–R permitió el aislamiento y la purificación de dihidrosanguinarina, oxisanguinarina y 6-metoxidihidroqueleritina, respectivamente. Así como el compuesto identificado como BLH14 en la fracción T. (Figura 12).

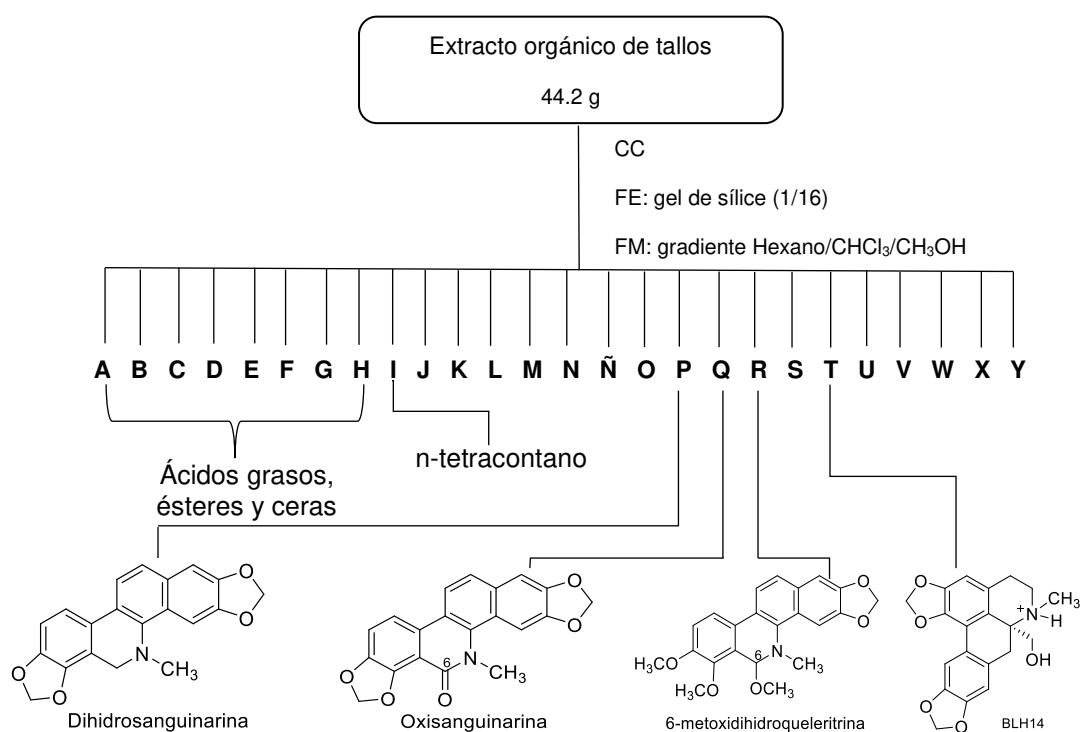


Figura 12. Diagrama de fraccionamiento del extracto orgánico de tallos

4.2.5 Fraccionamiento del extracto orgánico total de las hojas

Partiendo del extracto orgánico de las hojas (398.5 g), obtenido de la maceración con $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$; 1:1 (Ver sección **4.2.2**), se realizó un fraccionamiento líquido-líquido con hexano y metanol con 10% de agua desionizada, con la finalidad de eliminar interferentes como clorofila y grasa, así como otros metabolitos diferentes de alcaloides. De esta extracción se obtuvieron 105.1 g de la fase orgánica soluble en hexano y 290 g de la fase acuosa soluble en metanol (CH_3OH ac 90%). Esta última se dividió en dos porciones para proceder con dos metodologías de fraccionamiento, una por partición ácido-base (FO) y otra por cromatografía en columna (FM_{ac}) (Figura **13**).

4.2.5.1 Fraccionamiento ácido-base de la fase metanólica-acuosa

Se tomaron 126.5 g de la fase metanólica-acuosa (CH_3OH ac 90%) para proseguir con la partición ácido-base. En primer lugar, se realizó un fraccionamiento líquido-líquido con acetato de etilo (Figura **13**).

La fracción acuosa se descartó, se acidificó la fase orgánica con una solución de ácido tartárico a pH 5. La fase acuosa acidificada fue separada de la fase de AcOEt y se neutralizó con una solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) a pH 11. Finalmente se adicionó AcOEt a la fase acuosa neutra para extraer selectivamente los alcaloides neutros (Figura **13**).

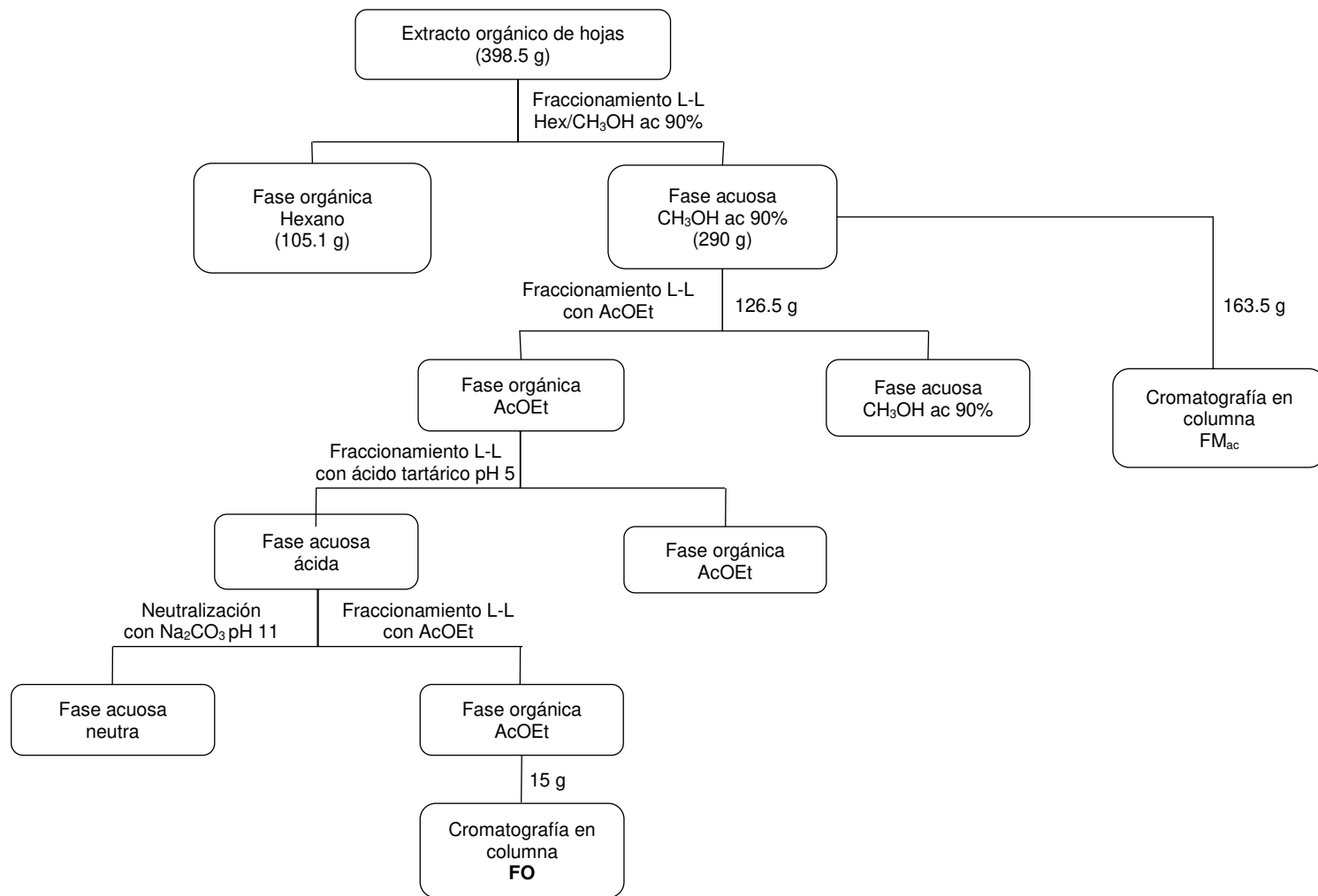


Figura 13. Diagrama de fraccionamiento del extracto orgánico de hojas

4.2.5.1.1 Fraccionamiento por cromatografía en columna de la fase orgánica obtenida de la partición ácido-base

Una vez realizada la partición líquido-líquido para la obtención selectiva de alcaloides del extracto orgánico de hojas (Figura 13), se llevó a sequedad por presión reducida en evaporador rotativo obteniéndose 15 g de la fase orgánica (**FO**) de coloración amarillo-verdoso.

Mediante TLC se observó que la **FO** presentaba menor complejidad que el extracto orgánico total de hojas, eliminando en gran parte el contenido de pigmentos, grasa y otros metabolitos diferentes de alcaloides. Se realizaron pruebas preliminares en cromatografía en columna para la selección de la fase móvil.

Se llevó a cabo una cromatografía en columna de una porción de la **FO** de hojas (2 g) usando una fase móvil en gradiente de Hex/AcOEt/CH₃OH, en orden creciente de polaridad, usando gel de sílice como fase estacionaria en relación 1:20 (Figura 14). De este modo se determinó la composición de la **FO** logrando purificar el alcaloide oxisanguinarina (Hex/AcOEt; 55:45), el cual fue identificado mediante la determinación de punto de fusión (P.f), por sus datos experimentales en resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹H) y su comparación con los datos reportados en la literatura. Por el contrario, la separación de los alcaloides

mayoritarios en la muestra no se logró utilizando esta FM, por lo que se llevaron a cabo otras técnicas de separación cromatográfica.

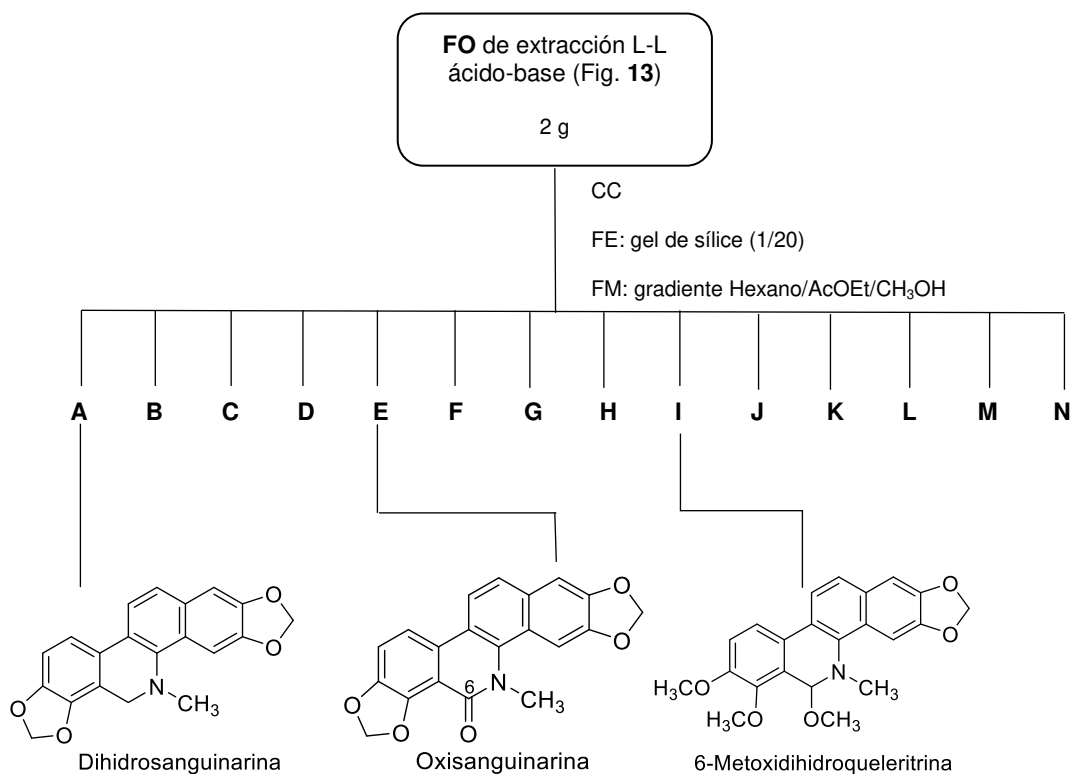


Figura 14. Diagrama de fraccionamiento preliminar de la Fase orgánica (FO) de la fracción metanólica-acuosa del extracto orgánico de hojas

Posteriormente, se realizó la separación de la FO realizando una CC con gradiente CH₂Cl₂/CH₃OH en orden creciente de polaridad con el resto de la muestra (10.5 g) en una columna de gel de sílice (1:20), obteniéndose 176 fracciones. Los eluatos colectados fueron monitoreados mediante TLC y reunidos de acuerdo con sus características cromatográficas, reuniéndose en 13 fracciones principales.

Aunque el procesamiento por extracción ácido-base permitió obtener de manera selectiva los alcaloides presentes en el extracto orgánico de hojas, resultó no ser el mejor método ya que los alcaloides se degradaron; además, las fracciones mostraron gran complejidad en constituyentes y se obtuvieron en cantidades insuficientes para la purificación de los compuestos. No obstante, de este proceso se obtuvieron los alcaloides dihidrosanguinarina y oxisanguinarina presentes en las fracciones A y E, respectivamente.

4.2.5.2 Fraccionamiento de fase metanólica-acuosa por cromatografía en columna (FM_{ac})

Se optó por realizar una cromatografía en columna al resto de la fracción metanólica (163.5 g) ya que los resultados de la partición ácido-base no fueron los esperados. La muestra se disolvió con una mezcla de CHCl₃:CH₃OH para adsorberla en gel de sílice (231.3 g), la columna fue empacada con 2.98 Kg de FE y se utilizó como FM un gradiente Hex/CH₂Cl₂ y CH₂Cl₂/CH₃OH con cambios de polaridad en orden creciente. Se obtuvo un volumen muerto de 3.2 L, el cual fue dividido en 8 eluatos de 400 mL. Las fracciones colectadas fueron monitoreadas por TLC y reunidas en 26 fracciones principales de acuerdo con su similitud cromatográfica (Tabla 4) (Figura 15). De manera simultánea al fraccionamiento, se obtuvieron mezclas de ácidos grasos y ceras que no fueron separadas en sus componentes. Aunado a lo anterior, a partir de la fracción H se purificaron cristales mediante cromatografía en columna (FE: Gel de sílice. FM: (Hex/éter etílico), los cuales fueron identificados como β-sitosterol mediante la

comparación de sus propiedades físicas (P.f. y RMN ^1H) con las reportadas en la literatura y por comparación de una muestra estándar previamente caracterizada en nuestro grupo de investigación [68].

Tabla 4. Fraccionamiento de la fase metanólica-acuosa de las hojas

FRACCIÓN	POLARIDAD	MASA (g)
A	1-48	Hex (100)
	3-16	Hex (100)
	17-48	Hex/ CH_2Cl_2 (98:2)
B	49-56	Hex/ CH_2Cl_2 (98:2)
	57-80	Hex/ CH_2Cl_2 (96:4)
	81-92	Hex/ CH_2Cl_2 (94:6)
	109-116	Hex/ CH_2Cl_2 (92:8)
	117-124	Hex/ CH_2Cl_2 (90:10)
	125-132	Hex/ CH_2Cl_2 (88:12)
	133-140	Hex/ CH_2Cl_2 (83:16)
C	141-184	Hex/ CH_2Cl_2 (80:20)
	185-200	Hex/ CH_2Cl_2 (78:22)
	201-208	Hex/ CH_2Cl_2 (76:24)
	209-216	Hex/ CH_2Cl_2 (74:26)
	217-224	Hex/ CH_2Cl_2 (72:28)
	225-232	Hex/ CH_2Cl_2 (70:30)
	233-240	Hex/ CH_2Cl_2 (68:32)
	241-256	Hex/ CH_2Cl_2 (65:35)
257-280	Hex/ CH_2Cl_2 (60:40)	
D	281-312	Hex/ CH_2Cl_2 (60:40)
	313-334	Hex/ CH_2Cl_2 (55:45)
	335-370	Hex/ CH_2Cl_2 (50:50)
E	371-394	Hex/ CH_2Cl_2 (50:50)
F	395-414	Hex/ CH_2Cl_2 (50:50)
G	415-458	Hex/ CH_2Cl_2 (45:55)
	459-466	Hex/ CH_2Cl_2 (40:60)
	467-482	Hex/ CH_2Cl_2 (35:65)
	482-510	Hex/ CH_2Cl_2 (30:70)
	511-518	Hex/ CH_2Cl_2 (20:80)
H	519-530	Hex/ CH_2Cl_2 (20:80)
I	531-546	Hex/ CH_2Cl_2 (15:85)
J	547-570	Hex/ CH_2Cl_2 (10:90)
	571-592	Hex/ CH_2Cl_2 (5:95)
	593-622	CH_2Cl_2 (100)
	623-642	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (95:5)
K	643-666	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (92:8)

Tabla 5. Fraccionamiento de la fase metanólica-acuosa de las hojas
(Continuación)

FRACCIÓN		POLARIDAD	MASA (g)
L	667-680	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (92:8)	4.3470
	681-694	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (90:10)	
M	695-700	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (90:10)	1.0872
N	701-704	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (90:10)	0.4211
Ñ	705-708	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (90:10)	2.7151
O	709-711	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (85:15)	0.5805
P	712-726	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (85:15)	4.2248
	727-728	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (80:20)	
	729-738	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (80:20)	
Q	739-744	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (80:20)	1.1227
R	745-750	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (75:25)	5.9102
	751-758	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (70:30)	
S	759-768	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (65:35)	19.5568
	769-772	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (55:45)	
	773-776	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (50:50)	
T	777-780	CH ₃ OH (100)	16.7530
	781-796	CH ₃ OH (100)	1.3461
U	797-804	CH ₃ OH (100)	1.0009
V	805-816	CH ₃ OH/H ₂ O (90:10)	345.2

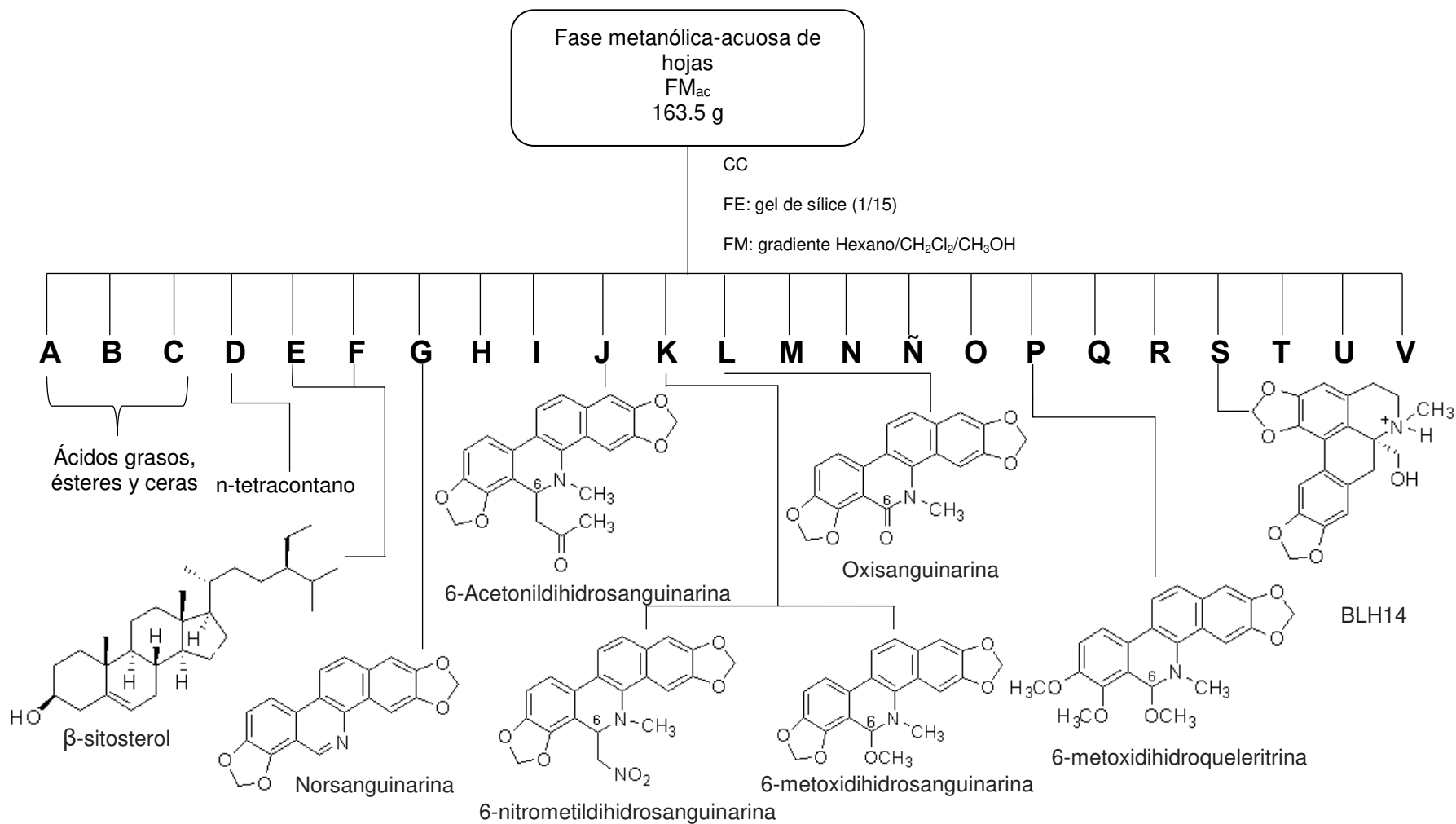


Figura 15. Compuestos presentes en la fase metanólica-acuosa de hojas de *B. latifolia*

4.2.6 Aislamiento y purificación de alcaloides

Para el aislamiento y purificación de los compuestos se emplearon diversas técnicas cromatográficas: cromatografía en columna, cromatografía en capa fina y cromatografía de placa preparativa. También se realizaron cristalizaciones simples y fraccionadas con diferentes solventes, lavados por filtración a vacío y con carbón activado.

4.2.7 Elucidación estructural

La caracterización de los compuestos puros se llevó a cabo por Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno y Carbono trece (RMN ^1H y ^{13}C), Resonancia Magnética Nuclear bidimensional (COSY, NOESY, HSQC, HMBC), Espectrometría de masas, rotación óptica y FTIR, además de la comparación de constantes espectroscópicas con lo reportado en la literatura.

4.3 Ensayos biológicos

La actividad antimicrobacteriana de los compuestos aislados se realizó en el Laboratorio de Gastroenterología del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los ensayos para determinar la actividad citotóxica se realizaron en el Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

4.3.1 Actividad antimicobacteriana

Se determinó la actividad antimicobacteriana por el método de Microplaca de Alamar Azul (MABA) [69] y las cepas de *M. tuberculosis* evaluadas fueron: H37Rv (cepa ATTC 27294™ sensible a rifampicina, isoniazida, etambutol y estreptomycin) y G122 (aislado clínico resistente a isoniazida, rifampicina y etambutol) [70].

El ensayo se fundamenta en un cambio colorimétrico por reducción enzimática, donde la bacteria libera deshidrogenasas al medio que reducen a la resazurina (azul) a resorufina (rosa), por lo tanto, al no tener cambio de coloración los compuestos se consideran activos (Figura 16).

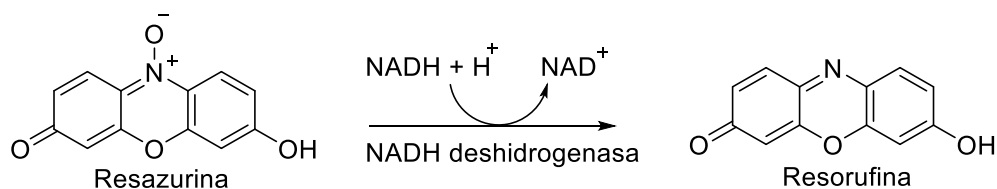


Figura 16. Reacción de oxidación de resazurina a resorufina

4.3.1.1 Preparación de medio de cultivo Middlebrook 7H9

Se pesaron 4.7 g de base caldo Middlebrook 7H9 y se agregaron 20 mL de glicerol al 10% para 880 mL de agua. El medio se esterilizó en autoclave por 15 min a 121°C/15 psi, posteriormente se dejó a temperatura ambiente para añadir 100 mL de OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa).

4.3.1.2 Preparación de inóculos bacterianos

Las cepas utilizadas fueron conservadas en 1 mL de glicerol al 10% y congeladas a -80 °C. Para realizar el inóculo de crecimiento se dejaron a temperatura ambiente hasta pasar a fase líquida, posteriormente usando una pipeta de plástico desechable, se realizó el inóculo en un tubo de ensayo con medio sólido Lowenstein Jensen previamente esterilizado. El periodo de incubación fue durante 14 días a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se transfirió una colonia en un tubo de ensayo con 5 mL de caldo Middlebrook 7H9 enriquecido al 10% con OADC, y se dejó incubar a 37 °C durante 14 días para alcanzar la fase logarítmica de crecimiento. Después de la incubación, se ajustó el inoculo líquido a la escala 1 de McFarland, diluyendo en los casos en que fue necesario, con caldo Middlebrook 7H9 enriquecido al 10 % 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 obtener el inóculo de trabajo.

4.3.1.3 Preparación de soluciones de trabajo

Las soluciones stock para la actividad antituberculosa se prepararon disolviendo 1 mg de los compuestos puros a evaluar con 500 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para los extractos. Las soluciones de trabajo se prepararon tomando una alícuota de las soluciones stock y diluyéndolas con medio Middlebrook 7H9 enriquecido

(4X) hasta alcanzar una concentración de 200 µg/mL en el caso de compuestos puros y 800 µg/mL para los extractos orgánicos de tallos y hojas.

4.3.1.4 Ensayo en Microplaca de Alamar Azul

El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos, cada concentración se realizó por duplicado. Se colocaron 200 µL de agua estéril en los pozos de la primera fila (Fila A) y en los pozos 1 a 3 y 10 a 12 de la última fila (Fila H). En el resto de la microplaca se agregaron 100 µL de caldo Middlebrook 7H9 (Fila B a Fila G) (Figura 17)

Posteriormente, se añadieron 100 µL de la solución de trabajo 4X en los pocillos de la fila B para tener la concentración más alta (100 µg/mL para compuestos puros y 200 µg/mL para extractos orgánicos) realizando diluciones consecutivas (1:2) tomando 100 µL de la fila B seriando hasta la fila G y desechando 100 µL de esta última fila. Una vez realizadas las diluciones, se añadieron 100 µL del inóculo bacteriano previamente ajustado a la escala 1 de McFarland. Simultáneamente se prepararon tres controles con medio de cultivo e inóculo bacteriano en las siguientes proporciones: a) 100:100, b) 180:20 y c) 199:1, cada uno por duplicado desde H4 a H9.

Las placas se incubaron a 37 °C por 5 días, después se adicionaron 20 µL del reactivo resazurina (Alamar azul) y 12 µL de Tween 80 al 10% a los pocillos de

los controles (H4 a H9), se incubó nuevamente a 37 °C por 24 h, como control de esterilidad se observó crecimiento notorio (color rosa intenso) en H4 y H5, crecimiento leve (color violeta) en H6 y H7 y sin crecimiento (color azul) en H8 y H9. Se procedió a agregar resazurina al resto de los pocillos de la microplaca (Filas B a G) y se llevaron a re-incubación a 37 °C por 24 horas para determinar la CMI de las sustancias evaluadas de acuerdo con el cambio de coloración en cada pozo, interpretando como crecimiento una coloración rosa y como inhibición color azul. Como controles positivos se utilizaron isoniazida, rifampicina, etambutol y estreptomicina (Figura 17).

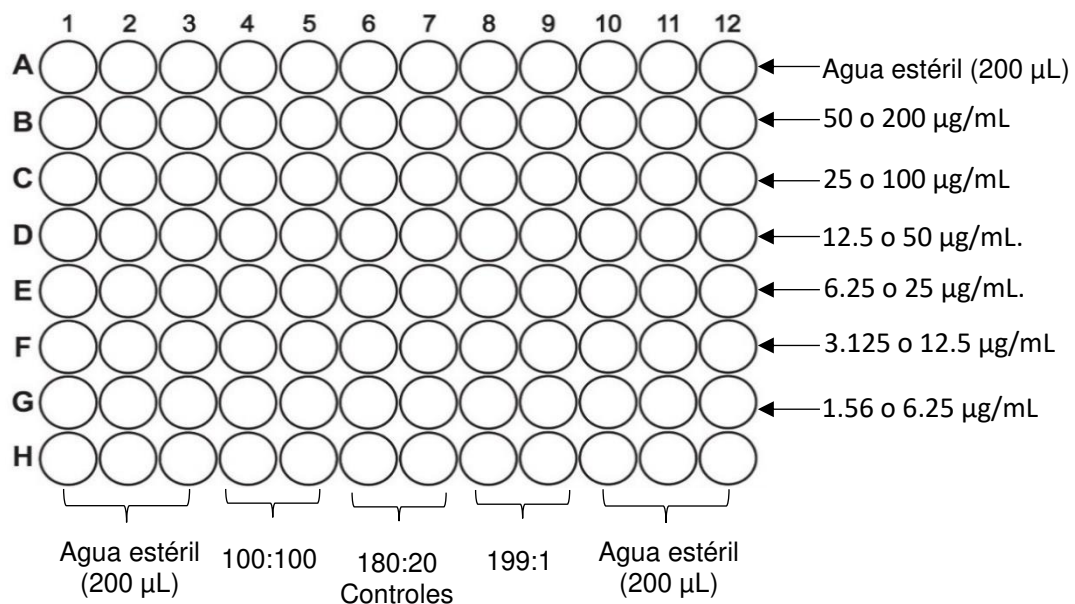


Figura 17. Ensayo antimicobacteriano en microplaca de 96 pocillos.

4.4 Evaluación de la actividad citotóxica

La citotoxicidad de los compuestos puros se determinó utilizando el colorante de unión a proteínas sulforrodamina B (SRB) en un ensayo de microcultivo *in vitro*

con líneas celulares de cáncer (SW480, MCF7 y PC3) y células inmortalizadas de queratinocitos (HACAT).

Las células se cultivaron en Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 adicionado con suero bovino fetal al 10%, 2 mM de *L*-glutamina, 100 unidades/mL de penicilina G, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina, 0.25 µg/mL de anfotericina B y 1% de aminoácidos no esenciales (GIBCO). Se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. La viabilidad de las células fue mayor del 95% determinándose por tinción con azul de tripano. Las células se removieron del matraz de cultivo, se diluyeron con medio fresco y se adicionaron 100 µL de esta suspensión a los pocillos de una microplaca de 96 pocillos (Costar), asegurándose que cada pocillo contuviera de 5000 a 10000 células. La microplaca se incubó a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ por 24 horas.

De forma paralela, se adicionaron 100 µL de medio de cultivo en los pocillos de otra microplaca y se incubaron por 1 hora en las condiciones antes descritas. Posteriormente, se prepararon las soluciones stock de los compuestos puros, disolviendo con DMSO (20 mM) y se adicionaron 100 µL a una concentración 50 µM y se llevó a incubación por 48 horas. Luego, se fijaron las células a los pocillos mediante la adición de 50 µL de ácido trifluoroacético acuoso al 50 % y frío. Las microplacas se incubaron a 4°C por 1 hora, se lavaron con agua y se secaron con aire. Las células fijadas se tiñeron mediante la adición de una solución de sulforrodamina B (SRB) al 0.4% y la SRB que reaccionó se removió mediante

lavados con ácido acético acuoso al 1%. La SRB unida a las células fijadas se solubilizó con 100 μ L de una solución de tris(hidroximetil)aminometano 10 mM.

Las microplacas se colocaron en un agitador de vortex por 5 minutos y se determinó la densidad óptica con un lector de microplacas ((Eix 808, BIO-TEX Instruments, Inc) a una longitud de onda de 515 nm. Los resultados de concentración inhibitoria media (IC_{50}) fueron calculados de acuerdo por el protocolo descrito por Monks [71] con una curva dosis-respuesta para cada compuesto y concentración (IC_{50}), resultando en la inhibición del 50% estimado a través de una regresión no lineal.

4.5 Disposición de residuos

La disposición de residuos generados durante la etapa fitoquímica para el aislamiento y purificación de los productos naturales se realizó conforme a los lineamientos establecidos por el departamento de Seguridad y Medio Ambiente de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Los residuos generados durante la evaluación de la actividad antimicrobiana fueron dispuestos de acuerdo con lo establecido en el reglamento interno del Laboratorio de Gastroenterología del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González. Los residuos generados en los ensayos de citotoxicidad se dispusieron de acuerdo con lo establecido por las normas de seguridad del Instituto de Química de la UNAM.

CAPITULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Estudio fitoquímico

Se realizó una prospección química de las partes aéreas de *Bocconia latisejala* S. Wats, trabajando por separado tallos y hojas. Se emplearon diferentes técnicas analíticas de separación como cromatografía, cristalización, entre otras. Por una parte, la fase metanólica-acuosa de hojas se procesó de dos formas diferentes (partición L-L y CC), obteniéndose un mejor resultado al emplear cromatografía en columna.

Durante el proceso de aislamiento y purificación de alcaloides se presentaron dificultades ya que los compuestos sufrieron degradación y oxidación por diferentes factores como la luz, el oxígeno, desestabilización al eliminar clorofila e interacción con algunos disolventes. Esto se visualizó durante las diferentes etapas de purificación al monitorear por TLC, donde se apreciaron diversos productos de degradación de los productos naturales.

La presencia de ceras, hidrocarburos, ácidos grasos y esteroides fue predominante en el extracto orgánico de tallos y en la fase metanólica-acuosa de

hojas. Algunos de ellos se identificaron por comparación de sus propiedades físicas (P.f, TLC y RMN ^1H) con las reportadas en la literatura, como el n-tetracontano y el β -sitosterol. Estos constituyentes se encuentran en la mayoría de las plantas superiores ya que forman parte importante del mantenimiento estructural de las células vegetales que le confieren protección ante la pérdida de humedad, rigidez mecánica y como barrera ante otros organismos y agentes ambientales.

5.1.1 Aislamiento y caracterización de los alcaloides

5.1.1.1 Aislamiento de oxisanguinarina

La oxisanguinarina se encuentra en tallos y hojas y se obtuvo por CC a partir de la fracción P de tallos (CHCl_3 ; 100%); así como, de las fracciones D (Hex/AcOEt; 55:45) (Fig. **12**) y E (CH_2Cl_2 ; 100%) de la fase orgánica derivada de la partición ácido-base de la fase metanólica-acuosa de hojas.

Las fracciones que lo contenían estaban acompañadas de clorofila y otros compuestos secundarios en menor proporción. Este compuesto se logró purificar mediante lavados con hexano y acetato de etilo, obteniéndose un sólido blanco-gris, el cual fue precipitado, por evaporación lenta, con una mezcla $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$; 1:1. Se identificó como oxisanguinarina (Figura **18**) por comparación de sus características físicas (P.f y RMN ^1H) con la literatura ya que

ha sido reportado anteriormente en las semillas de la especie aunque no se ha evaluado su actividad frente a *M. tuberculosis* [31, 61].

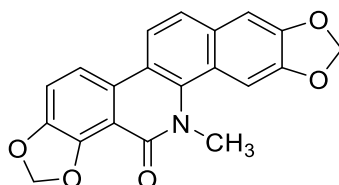


Figura 18. Caracterización de Oxisanguinarina

Sólido color blanco-gris

Soluble en CHCl_3

Rendimiento: Tallos: 227.8 mg (0.51%) Hojas (FO): 52.6 mg (0.5 %)

TLC: Hex/ CHCl_3 / CH_3OH ; 50:45:5 Rf: 0.67

Azul oscuro ($\text{UV}_{254\text{nm}}$)

Azul celeste ($\text{UV}_{365\text{nm}}$)

$\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{NO}_5$

PM: 347g/mol

P.f: > 300°C

cLogP: 3.94

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{ppm} : 7.97 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, H-11), 7.77 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, H-12), 7.57 (s, 1H, H-4), 7.54 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, H-10), 7.23 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, H-9), 7.16 (s, 1H, H-1), 6.27 (s, 2H, OCH_2O), 6.10 (s, 2H, OCH_2O), 3.91 (s, 3H, N- CH_3) (Figura 19).

5.1.1.2 Caracterización estructural de oxisanguinarina

EL espectro de RMN ^1H presenta un patrón de señales típicas para benzo[c]fenantridina donde se observa a campos bajos, en la región de protones aromáticos, cuatro sistemas dobles de los protones *orto*-aromáticos en δ_{H} 7.97, 7.77, 7.54 y 7.23 ppm, correspondientes a los protones H-11, H-12, H-10 y H-9, respectivamente. Asimismo, en la región de protones aromáticos se observan dos señales simples en δ_{H} 7.57 y 7.16 ppm que corresponden a los protones *para*-aromáticos de las posiciones H-4 y H-1, respectivamente. En δ_{H} 6.27 y 6.10 ppm se observan dos señales simples que integran para dos protones cada uno características de los grupos dioximetileno. A campo alto se encuentra la señal singulete típica de los protones de metilo unido a nitrógeno en δ_{H} 3.91 ppm (Figura 19).

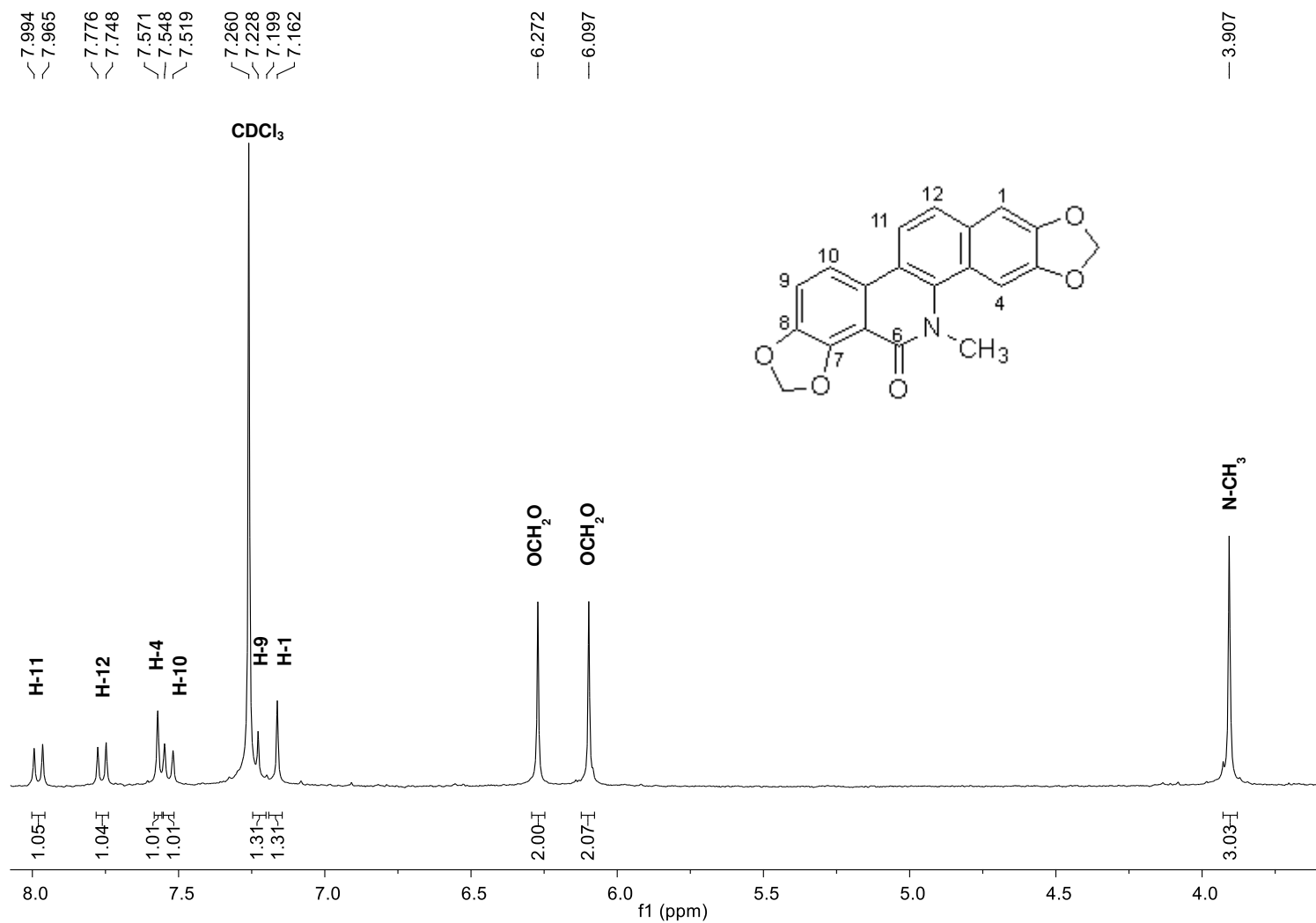


Figura 19. Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de Oxisanguinarina.

5.1.1.3 Aislamiento de dihidrosanguinarina

A partir de la fracción Q ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$; 90:10) del extracto orgánico de tallos, se realizó una CC en gel de sílice con elución en gradiente de Hex/AcOEt y AcOEt/ CH_3OH . A partir de la subfracción C (Hex/AcOEt; 85:15) se recuperó un sólido blanco que se lavó por decantación con hexano y se identificó como dihidrosanguinarina por sus características físicas (P.f, TLC y RMN ^1H) en comparación con las reportadas en la literatura [31].

Dihidrosanguinarina (Figura 20) también fue encontrada en la fracción A (CH_2Cl_2) de la fase orgánica de hojas derivada del fraccionamiento ácido-base. Se comparó por cromatografía en capa fina con la referencia, coincidiendo con el revelado visual al UV (254 y 365 nm) y Rf. Este compuesto es preferentemente soluble en AcOEt y al disolver con CHCl_3 se observó por TLC degradación del compuesto.

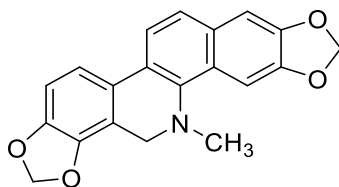


Figura 20. Caracterización de Dihidrosanguinarina

Sólido color blanco

Soluble en AcOEt

Rendimiento: Tallos: 60.1 mg (0.13%) Hojas (FO): 26.2 mg (0.24%)

TLC: Hex/AcOEt; 7:3 Rf: 0.72

Azul rey (UV_{254nm}) Azul rey brillante (UV_{365nm})

C₂₀H₁₅NO₄ PM: 333 g/mol P.f: 265 °C cLogP: 5.23

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ_{ppm}: 7.68 (d,1H, *J* = 9.0 Hz, H-11), 7.67 (s,1H, *J* = 9.0 Hz, H-4), 7.48 (d,1H, *J* = 8.7 Hz, H-12), 7.30 (d,1H, *J* = 8.1 Hz, H-10), 7.11 (s,1H, H-1), 6.85 (d,1H, *J* = 8.1 Hz, H-9), 6.05 (s, 2H, OCH₂O), 6.04 (s,2H, OCH₂O), 4.19 (s, 2H, H-6), 2.61 (s, 3H, N-CH₃) (Figura 21).

5.1.1.4 Caracterización estructural de dihidrosanguinarina

El espectro de RMN ¹H (Figura 21) muestra las señales típicas de benzo[c]fenantridina, al igual que el alcaloide oxisanguinarina pero con desplazamientos químicos a campos más altos, debido a que no se tiene el grupo carbonilo en la posición C-6 ya que se observa un singulete que integra para dos hidrógenos bencílicos y contiguos al átomo de nitrógeno (δ_H 4.19 ppm). Se conservan las señales dobles correspondientes a los protones aromáticos (δ_H 7.68, 7.48, 7.30 y 6.48 ppm) con constantes de acoplamiento típicas para protones en posición *orto* (8.1-9 Hz), además de dos señales sencillas (δ_H 7.67 y 7.11 ppm) que integran para un protón cada una y que corresponden a los protones en posición *para*. Adicionalmente, se observan dos singuletes (δ_H 6.05 y 6.04 ppm) que integran para dos protones cada una, las cuales corresponden a los grupos dioximetileno. Finalmente, a δ_H 2.61 ppm se observa la señal típica de los protones de metilo unido a nitrógeno.

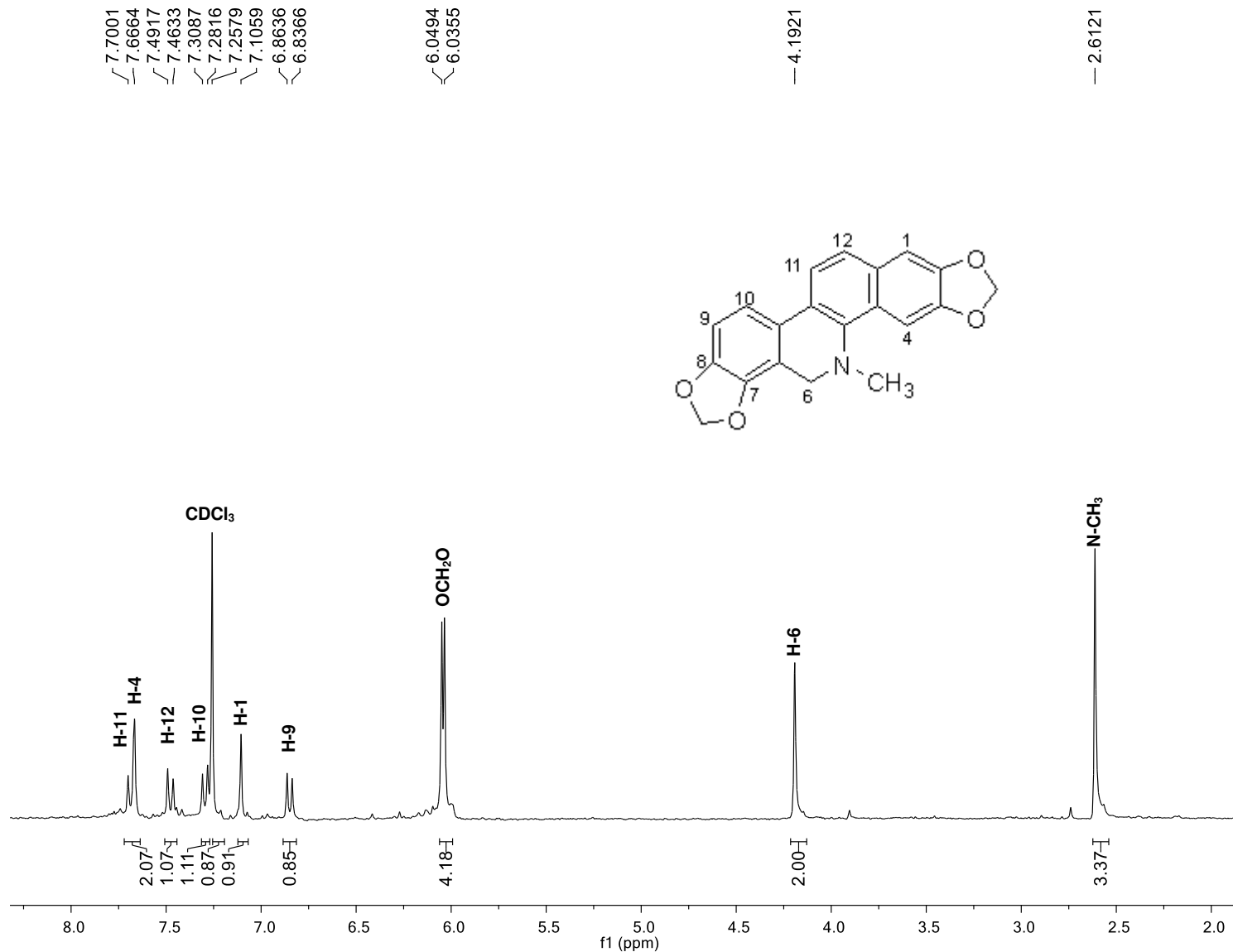


Figura 21. Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de Dihydroanguinarina

5.1.1.5 Aislamiento de 6-acetonildihidrosanguinarina

Se encuentra mayoritariamente en hojas, aunque también se identificó en los tallos. Este compuesto fue aislado a partir de la fracción J de la fase metanólica-acuosa de hojas. La fracción se lavó con Hex/AcOEt (80:20) originando un precipitado amarillo el cual fue sometido a una CC, utilizando gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil, mezcla de Hex/AcOEt, iniciando con una polaridad de 95:5 y aumentos graduales de polaridad del 5% hasta 100% AcOEt.

De la reunión de las subfracciones 111 a 138 se obtuvieron cristales en forma de aguja color amarillo, los cuales fueron purificados mediante lavados repetidos con hexano por decantación. De acuerdo con sus características cromatográficas y espectroscópicas experimentales (RMN ^1H y ^{13}C) (Figura **24** y **25**) y su comparación con las reportadas en la literatura se identificó como 6-acetonildihidrosanguinarina (Figura **22**). Esta es la primera ocasión que se reporta el alcaloide en *B. latisejala*, aunque ya ha sido reportado como constituyente de especies de la familia Papaveraceae como *B. arborea*, *B. frutescens*, *M. cordata* y *M. microcarpa* [63, 50]. Algunos autores consideran que los alcaloides 6-acetonildihidroderivados son artefactos derivados de alcaloides cuaternarios de benzo[c]fenantridina con acetona (presente como impureza en algunos disolventes) o con ácido 3-oxopentanodioico (presente en algunas plantas) después de la alcalinización [56].

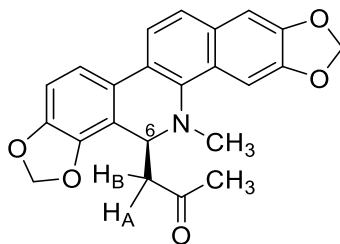


Figura 22. Caracterización de 6-Acetonildihydrosanguinarina

Cristales amarillos en forma de agujas

Soluble en AcOEt y CHCl₃

Rendimiento: Tallos: 5 mg (0.011%) Hojas (F_{Mac}): 12 mg (0.073%)

TLC: Hex/CHCl₃/CH₃OH; 50:45:5 R_f: 0.85 [α]^{25°C}/_{589nm} = + 2.5°

Azul rey (UV_{254nm}) Azul rey brillante (UV_{365nm})

C₂₃H₁₉NO₅ PM: 389.13 g/mol P.f: 185°C cLogP: 4.95

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ_{ppm}: 7.69 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H-11), 7.52 (s, 1H, H-4)
7.48 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H-12), 7.33 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H-10), 7.10 (s, 1H, H-1). 6.86
(d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H-9), 6.06 (s, 4H, OCH₂O), 4.86 (dd, 1H, *J* = 10.5, 4.2 Hz, H-
6), 2.68 (dd, 1H, *J* = 15.9, 9.3 Hz, H-1'B), 2.64 (s, 3H, s, N-CH₃), 2.30 (dd, 1H, *J*
= 15.0, 3.3 Hz, H-1'A), 2.06 (s, 3H, COCH₃) (Figura 25).

RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ_{ppm}: 207.34 (CO), 148.32 (C-3), 147.7 (C-2), 147.25
(C-8), 144.36 (C-7), 131.11 (C-12A), 124.11 (C-4A), 123.53 (C-10A), 120.11 (C-
12), 116.56 (C-6A), 107.87 (C-11), 104.44 (C-10), 101.64 (C-9), 101.16 (C-1),
100.69 (OCH₂O), 54.54 (C-4), 49.69 (C-6), 43.14 (CH₂CO), 31.39 (N-CH₃), 29.79
(CH₃CO) (Figura 26).

5.1.1.6 Caracterización estructural de 6-acetonildihidrosanguinarina

Mediante el espectro de RMN ^1H (Figura **25**) se determinó la estructura del alcaloide 6-acetonildihidrosanguinarina debido a la presencia de un patrón de señales similar a dihidrosanguinarina; es decir, a campo bajo resuenan las señales características de los hidrógenos *orto* (δ_{H} 7.69, 7.48, 7.33, 6.86 ppm) y *para* aromáticos (δ_{H} 7.52 y 7.10 ppm), aunado a las señales típicas del grupo *N*-metilo (δ_{H} 2.64 ppm) y los grupos dioximetilenos (δ_{H} 6.06 ppm). Las diferencias espectroscópicas radican en la presencia del fragmento acetono en C-6, deducido por la presencia de tres señales dobles de dobles debidas a un sistema ABX de protones que corresponden al acoplamiento vecinal entre el hidrogeno H-6 (δ_{H} 4.86, $J = 10.5, 4.2$ Hz) y los protones del grupo metileno *alfa* al carbonilo H-1'B (δ_{H} 2.68, $J = 15.9, 9.3$ Hz) y H-1'A (δ_{H} 3.30, $J = 15, 3.3$ Hz). Aunado a lo anterior, se observó una señal simple en δ_{H} 2.06 ppm que integra para tres hidrógenos y que corresponde al grupo metilo del fragmento de acetona.

Las constantes de acoplamiento de las señales dobles de dobles son congruentes con lo descrito en la literatura para el análogo estructural 6-acetonildihidroqueleritina [31] y ambidamina [72], donde se describe que la conformación espacial del hidrógeno H-6 se encuentra *anti* al protón H-1'B y *gauche* al hidrógeno H-1'A (Figura **23**). Lo anterior fue confirmado mediante modelado molecular, estableciéndose que el conformero más estable presenta

una configuración alternada con el grupo *N*-metilo y el grupo metilcetona orientados hacia la misma dirección, lo que probablemente permita la formación de un enlace de hidrógeno intermolecular débil entre un hidrógeno del metilo y el oxígeno del carbonilo (C-H---O) [31, 73].

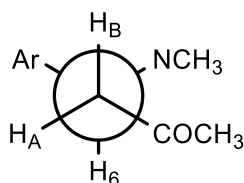


Figura 23. Proyección de Newman del fragmento acetónido de la posición bencílica en 6-acetonildihydrosanguinarina en su conformación más estable

El análisis conformacional mediante el programa PCMODEL v6 permitió determinar al conformero más estable para 6-acetonildihydrosanguinarina resultando ser aquel en el que el fragmento de acetónido se encuentra en una conformación sinclinal con respecto al grupo *N*-metilo con orientación *cis* diaxial, con una energía potencial relativa de 72.368 kcal/mol (Figura 24).

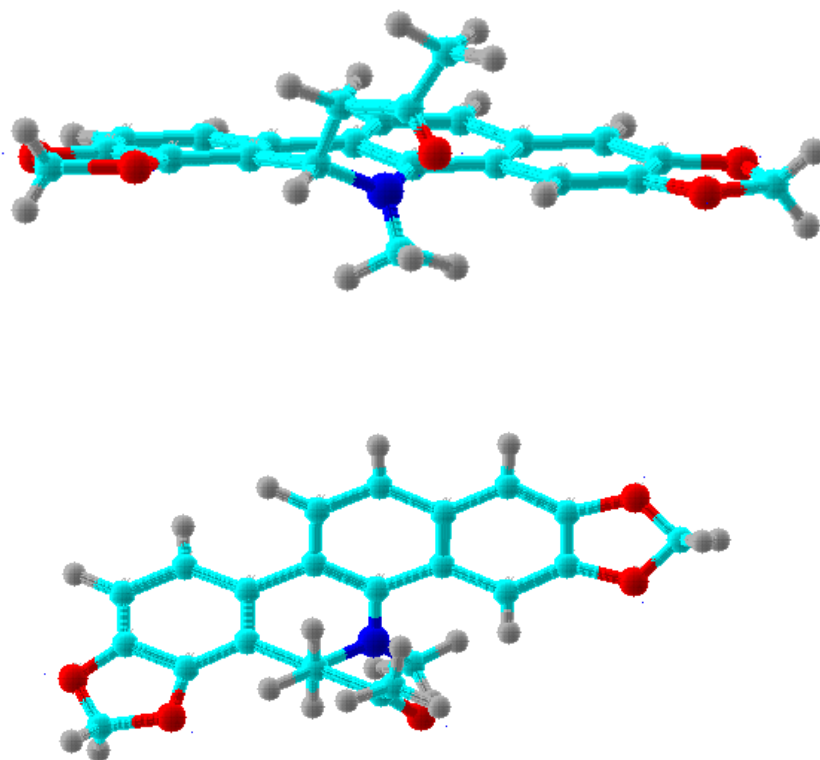


Figura 24. Confórmero más estable para 6-acetonildihidrosanguinarina con orientación *cis* diaxial de los grupos N-metilo y acetónido.

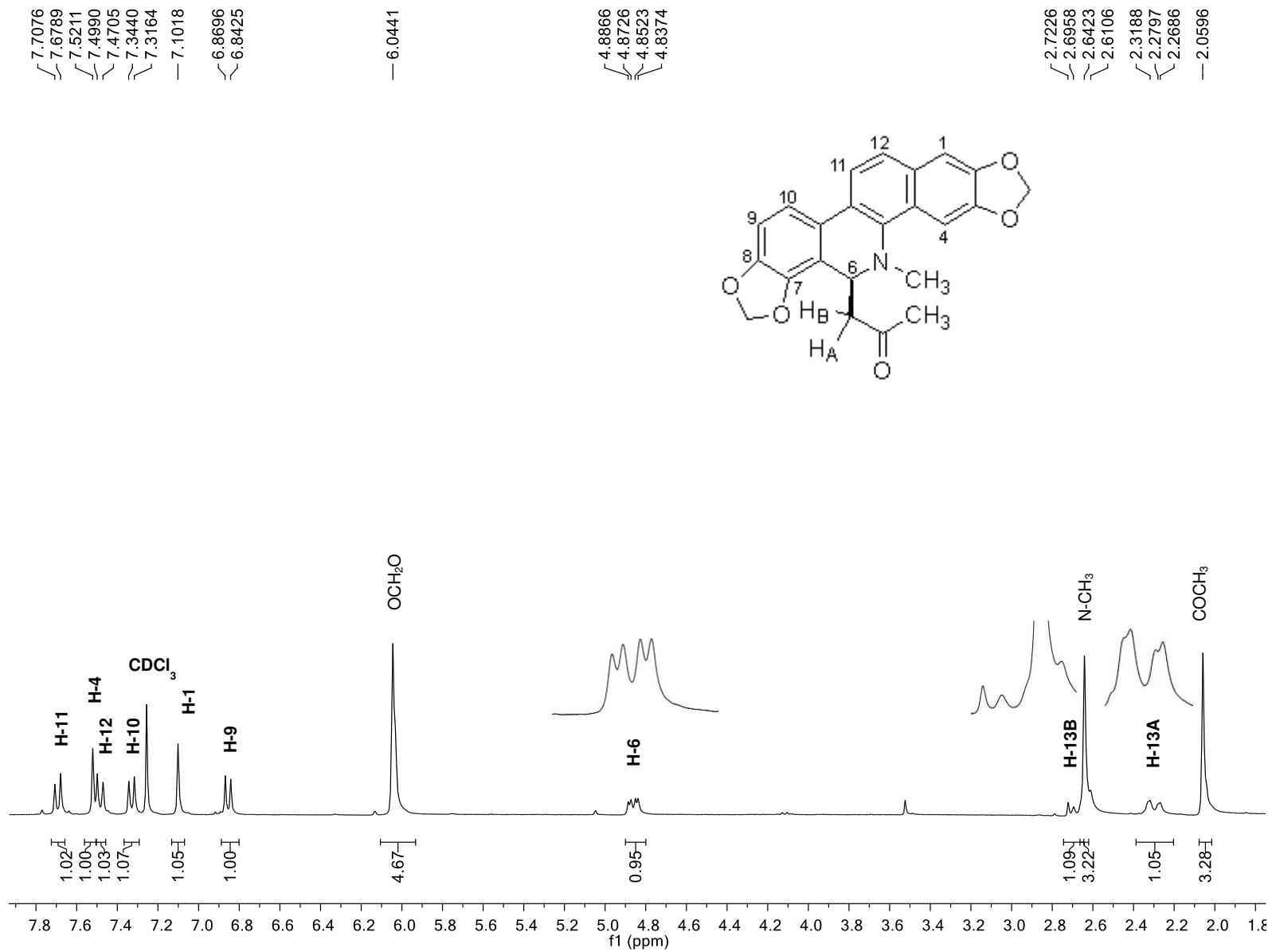


Figura 25. Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de 6-Acetonildihidrosanguinarina

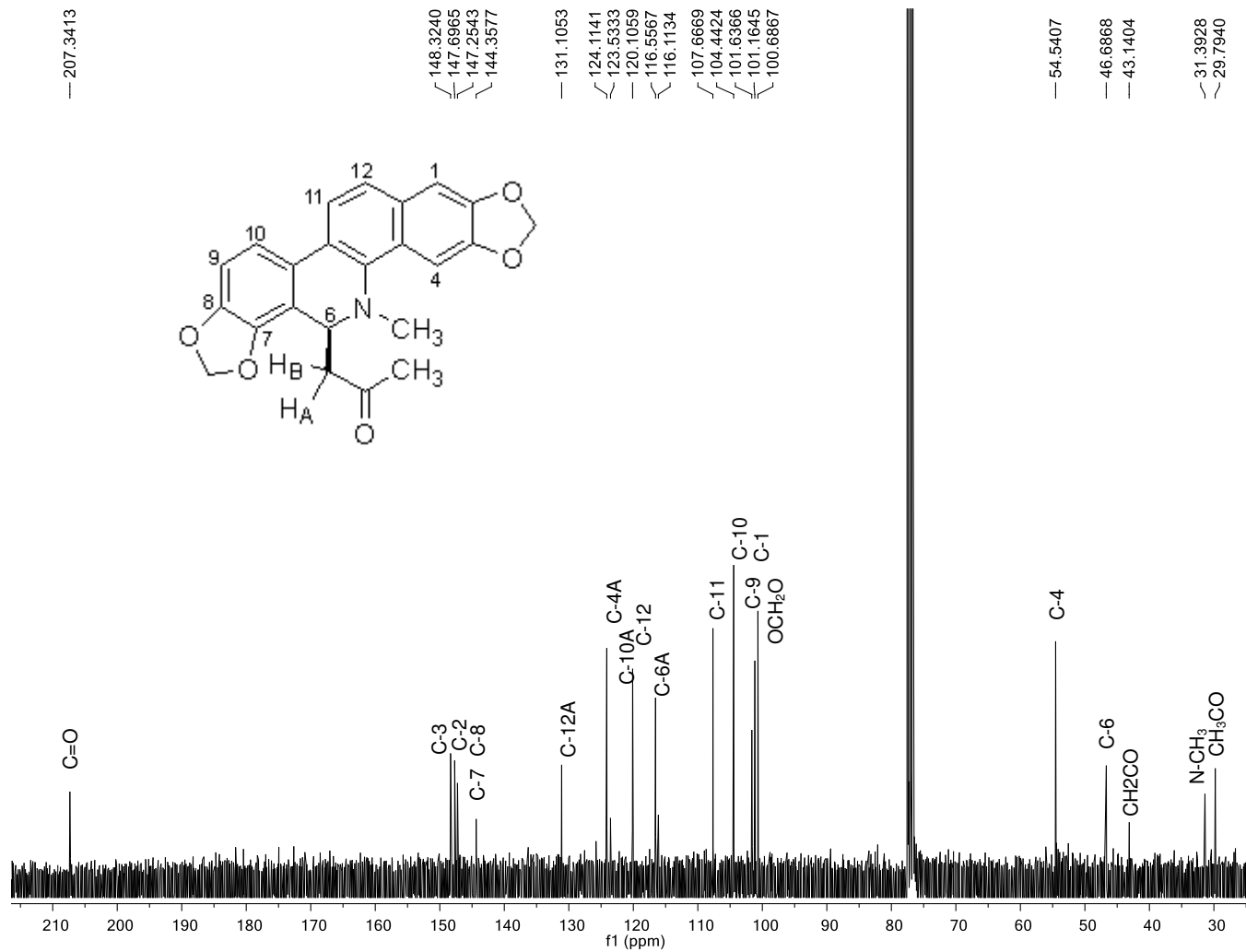


Figura 26. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de 6-Acetonildihidrosanguinarina

5.1.1.7 Aislamiento de 6-metoxidihidroqueleritrina

Se realizó una cromatografía en columna a la fracción R de tallos, utilizando como FE gel de sílice y se eluyó con un sistema en gradiente de polaridad, iniciando con mezcla de Hex/CHCl₃ hasta 100% de CHCl₃ y continuando con una mezcla CHCl₃/CH₃OH. De esta manera, en la subfracción J (CHCl₃/CH₃OH, 50:50) se obtuvo un precipitado grisáceo el cual mostraba dos compuestos principales por TLC bajo la luz UV a 254 y 365 nm (naranja y amarillo). Se realizó una cromatografía preparativa en una placa de gel de sílice (20 x 20 cm), utilizando como fase móvil una mezcla CH₂Cl₂/CH₃OH (98:2), las bandas obtenidas fueron maceradas en baño de agua fría para evitar degradación de los compuestos. De esta manera se logró aislar un sólido blanco que al ser solubilizado con metanol presentó coloración amarilla al visible y al analizarse por RMN se identificó como 6-metoxidihidroqueleritrina (Figura 27). Este compuesto se encuentra también en las hojas de *B. latisejala* y es la primera vez que se reporta en la especie, pero no en el género.

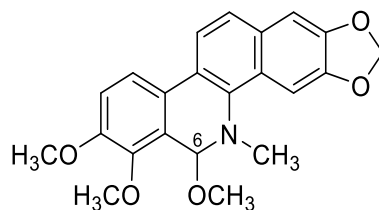


Figura 27. Caracterización de 6-Metoxidihidroqueleritrina

Cristales blancos

Soluble en CH₃OH

Rendimiento: Tallos: 5.2 mg (0.12%) Hojas (F_{Mac}): 14 mg (0.0085%)

TLC: Hex/CHCl₃/CH₃OH; 50:45:5 Rf: 0.5 $[\alpha]^{25^\circ\text{C}}_{589\text{nm}} = -0.33$

Amarillo (UV_{254nm}) Amarillo intenso (UV_{365nm})

C₂₂H₂₁NO₅ PM: 379.14c g/mol P.F: 230-235°C cLogP: 4.71

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ_{ppm} : 7.78 (d, 1H, *J*: 8.6 Hz, H-11), 7.70 (s, 1H, H-4), 7.63 (d, 1H, *J*: 8.6 Hz, H-10), 7.48 (d, 1H, *J*: 8.5 Hz, H-12), 7.26 (s, 1H, *J*: 8.4, H-1), 7.09 (d, 1H, *J*: 8.7 Hz, H-9), 6.06 (s, 2H, OCH₂O), 5.55 (s, 1H, H-6), 3.96 (s, 3H, OCH₃), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 3.46 (s, 3H, OCH₃) 2.76 (s, 3H, N-CH₃) (Figura 28).

5.1.1.8 Caracterización estructural de 6-metoxidihidroqueleritrina

En el espectro de RMN ¹H (Figura 28) se observan los cuatro dobletes típicos que corresponden a los metinos *orto* aromáticos en δ_{H} 7.72, 7.60, 7.41 y 7.08 ppm y las señales simples en δ_{H} 7.56 y 7.06 ppm que corresponden a los metinos *para* aromáticos. Se conserva el singulete que integra para los tres hidrógenos del grupo *N*-metilo en δ_{H} 2.64 ppm. Las diferencias espectroscópicas con respecto a derivados de dihidrosanguinarina radican en que se tiene una sola señal simple en δ_{H} 5.96 ppm, correspondiente al grupo dioximetileno del anillo A del alcaloide benzo[c]fenantridínico; se observan dos señales simples a δ_{H} 3.83 y 3.82 ppm que corresponden a los grupos metoxilo asignados para las

posiciones 7 y 8 del anillo D. Además, se presentan dos señales simples a δ_H 5.46 y 3.24 ppm asignados al protón H-6 y al metoxilo unido en la misma posición.

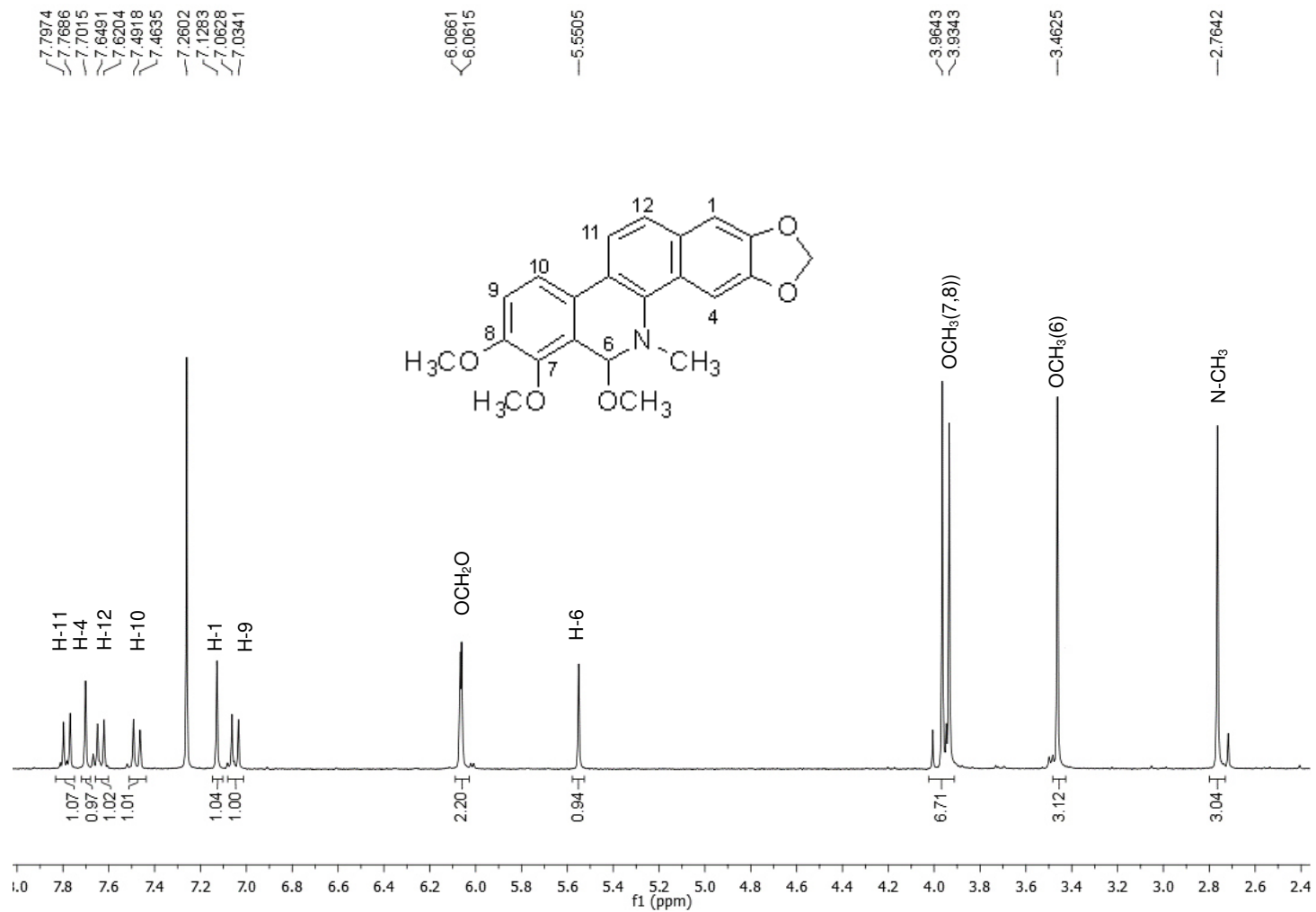


Figura 28. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) de 6-Metoxidihidroqueleritina

5.1.1.9 Aislamiento de 6-metoxidihidrosanguinarina

A partir de la fracción K de la FM_{ac} de hojas y mediante lavados con Hex/AcOEt (85:15) se obtuvo un precipitado gris. Al realizar TLC de este sólido se observó bajo la luz UV de 254 y 365 nm la presencia de dos compuestos, uno negro y el otro color naranja de mayor polaridad. Después de eluir la placa cromatográfica y observar bajo la luz UV_{365nm} se observó una transformación del compuesto negro a color naranja. Se realizaron pruebas en TLC observando que el compuesto oscuro sufría mayor degradación con acetona, acetato y metanol; por lo tanto, se realizó una CC usando como sistema de elución en gradiente con una mezcla Hex/éter etílico (iniciando con una proporción 80:20); sin embargo, no se logró la separación de los compuestos. La muestra se recuperó de la sílice y al tratar de solubilizar la muestra con cloroformo se observó una segunda fase en la solución en color naranja con una densidad mayor. Se decantó la fase soluble en cloroformo y de esta manera se separó al compuesto color naranja, el cual se analizó por RMN ¹H e identificó como 6-metoxidihidrosanguinarina (Figura 29).

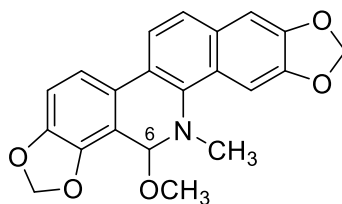


Figura 29. Caracterización de 6-Metoxidihidrosanguinarina

Sólido color blanco

Soluble en CH₃OH

Rendimiento: Tallos: Identificado Hojas (F_{Mac}): 3.4mg (0.0020%)

TLC: CH₂Cl₂/CH₃OH; 95:5 Rf: 0.82

Naranja (UV_{254nm}) Naranja intenso (UV_{365nm})

C₂₁H₁₇NO₅ PM: 363.11 g/mol P.F: 256°C cLogP: 5.01

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ_{ppm}: 7.79 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H-), 7.66 (s, 1H, H-), 7.49 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H-12), 7.48 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H-10), 7.16 (s, 1H, H-), 6.97 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H-9), 6.09 (s, 1H, OCH₂O), 6.05 (s, 1H, OCH₂O), 6.04 (s, 1H, OCH₂O), 6.01 (s, 1H, OCH₂O), 5.41 (s, 1H, H-6), 3.63 (s, 3H, OCH₃), 2.74 (s, 3H, NCH₃) (Figura 30).

5.1.1.10 Caracterización estructural de 6-metoxidihidrosanguinarina

En el espectro de RMN ^1H (Figura 30) se observan las señales dobles características de los protones aromáticos con dos sistemas AB de los hidrógenos en posiciones 11,12 y 9,10 (δ_{H} 7.79, 7.49, 7.48 y 6.97 ppm), así como dos señales simples de los protones aromáticos en posición 4 y 1 (δ_{H} 7.66 y 7.16). A campo alto se observa la señal correspondiente al grupo *N*-metilo (δ_{H} 2.74 ppm). La diferencia con respecto del análogo 6-metoxidihidroquelitrina se observa la presencia de dos señales simples que corresponden a los grupos dioximetileno en los anillos A y D (δ_{H} 6.09 y 6.05 ppm). Adicionalmente se observan dos señales simples, una que corresponde al protón en posición 6 (δ_{H} 5.41 ppm) y la otra que corresponde al grupo metoxilo en posición 6 (δ_{H} 3.63 ppm).

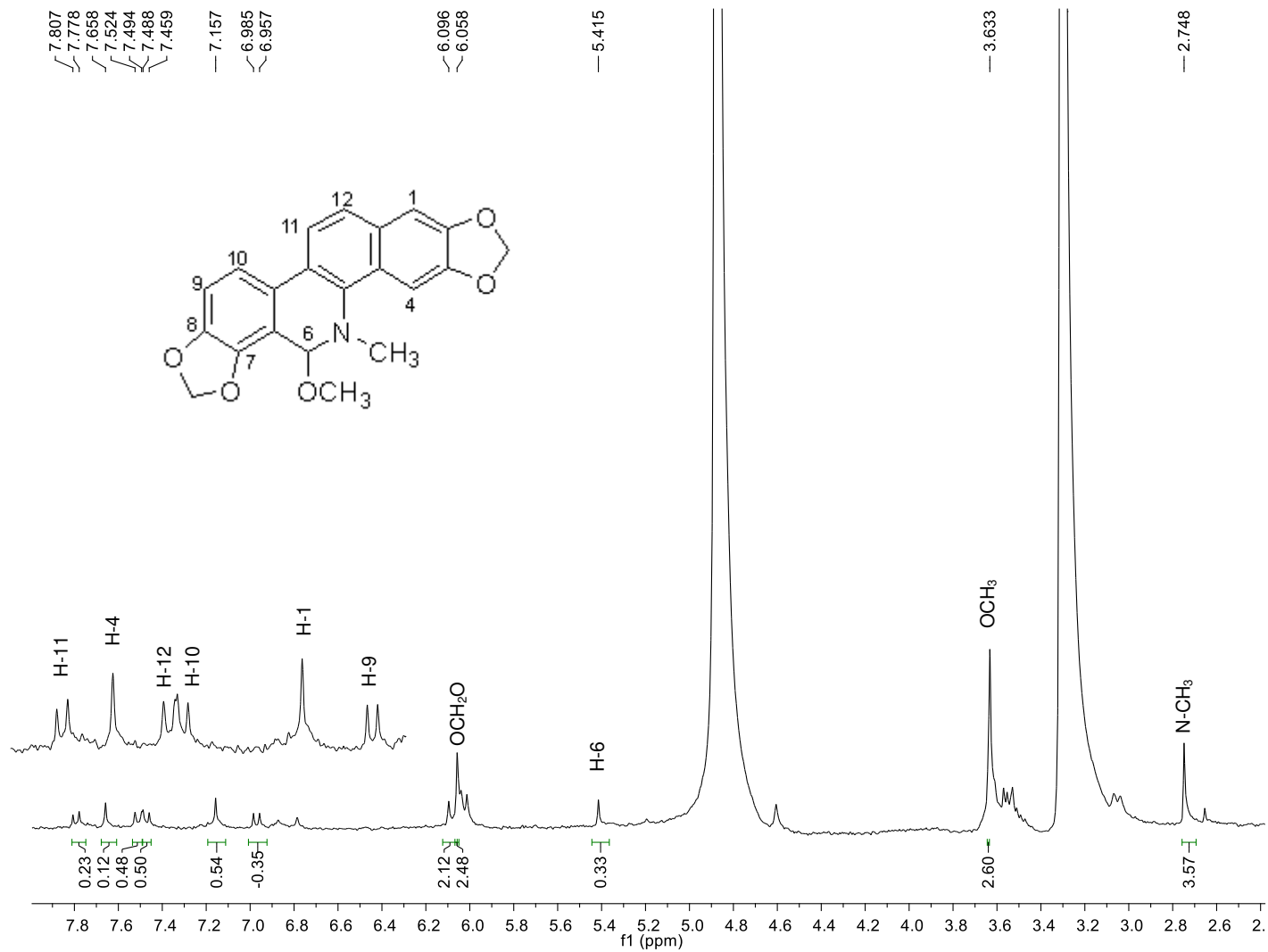


Figura 30. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de 6-Metoxidihydroanguinarina

5.1.1.11 Aislamiento de norsanguinarina

A partir de la fracción G de la FMac de hojas, se obtuvo un sólido con apariencia grasa soluble en cloroformo. Al disolver la fracción se observó un precipitado amarillo insoluble en cloroformo el cual se lavó por decantación con mezcla Hex/CHCl₃ (50:50) y sucesivamente con CHCl₃. Posteriormente se recrystalizó con mezcla CHCl₃/CH₃OH (50:50). Se obtuvo un polvo color amarillo parcialmente soluble en metanol e insoluble en agua, pero soluble en ácido acético. Al realizar TLC de este sólido se observó fluorescencia bajo la luz UV color amarillo (254nm) y amarillo intenso (365 nm). Se analizó por RMN ¹H y ¹³C y se identificó como norsanguinarina (Figura 31) por sus características espectroscópicas. Destacando que este alcaloide se reporta por primera vez en el género *Bocconia*; sin embargo, se ha encontrado en otras especies de las familias *Papaveraceae*, *Fumariaceae* y *Rutaceae* [74]; por ejemplo: *Dactylicapnos torulosa*, *Chelidonium majus* (golondrina), *Chelidonium japonicum*, *Eschscholtzia californica* (amapola de California), *Macleaya cordata*, *Corydalis tashiroi*, *Argemone mexicana* L (adormidera espinosa), *Papaver somniferum* L. (*Opium poppy*/ amapola real) y *Papaver rhoeas* (amapola silvestre) [75, 76, 77, 50, 78, 79, 80, 81].

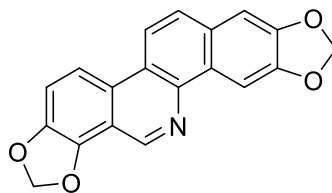


Figura 31. Caracterización de Norsanguinarina

Sólido color amarillo

Soluble en ácido acético

Rendimiento: Tallos: ND Hojas (F_{Mac}): 17 mg (0.010%)

TLC: Hex/AcOEt; 70:30 Rf: 0.65

Amarillo (UV_{254nm}) Amarillo intenso (UV_{365nm})

C₁₉H₁₁NO₄ PM: 317.07 g/mol P.F: 275-280°C cLogP: 5.00

RMN ¹H (300 MHz, TFA-*d*) δ_{ppm}: 9.55 (s, 1H, H-6), 8.51 (d, 1H, *J* = 9.21 Hz, H-12), 8.48 (d, 1H, *J* = 8.94 Hz, H-10), 8.19 (d, 1H, *J* = 8.88 Hz, H-11), 7.98 (s, 1H, H-4), 7.95 (d, 1H, *J* = 8.79 Hz, H-9), 7.45 (s, 1H, H-1) ,6.51 (s, 2H, OCH₂O), 6.27 (s, 2H, OCH₂O) (Figura **32**).

RMN ¹³C (300 MHz, TFA-*d*) δ_{ppm}: 151.00 (C-3), 150.53 (C-2), 148.14 (C-8), 147.53 (C-6), 140.54 (C-7), 131.75 (C-4b), 131.30 (C-12a), 128.94 (C-4a), 127.29 (C-10a), 124.08 (C-12), 120.74 (C-10b), 120.09 (C-11), 117.41 (C-10), 116.83 (C-6a), 109.74 (C-9), 105.99 (C-1), 104.98 (C-4), 102.66 (OCH₂O), 96.83 (OCH₂O) (Figura **33**).

5.1.1.12 Caracterización estructural de norsanguinarina

Mediante la interpretación del espectro de RMN ^1H (Figura **32**) se determinó la estructura de norsanguinarina debido a algunas diferencias espectroscópicas con respecto de los alcaloides dihidrobenzo[*c*]fenantridínicos; es decir, se observó una señal simple que integra para un protón en la región de campo bajo (δ_{H} 9.55 ppm, H-6) y no se observaron los singuletes característicos de los grupos metileno y metilo unidos a nitrógeno. Por ello se dedujo la presencia de un grupo imina, que se confirmó con el espectro de RMN ^{13}C (Figura **33**) por la presencia de una señal en δ_{C} 147.5 ppm y la ausencia de las señales en campo alto de los grupos metileno y metilo unidos a nitrógeno. También se observaron las señales dobles características de los protones *orto* aromáticos de las posiciones 12, 11, 10 y 9 (δ_{H} 8.51, 8.48, 8.19 y 7.95 ppm) y las señales simples para los protones *para* aromáticos de las posiciones 4 y 1 (δ_{H} 7.98 y 7.45 ppm); además de dos señales singuletes que corresponden a los grupos dioximetileno. Por lo anterior, se establece que se trata de la estructura de norsanguinarina, un alcaloide de tipo benzo[*c*]fenantridina. Al ser la primera vez que se reporta en especies del género *Bocconia* se realizó una comparación de los datos espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C con lo reportado en otras especies.

Los datos espectroscópicos del presente compuesto resultaron casi idénticos a los reportados por Furaya y colaboradores en 1972 (Tabla **5**), quienes obtuvieron norsanguinarina a partir de *Papaver somniferum* L [81].

Tabla 6. Comparación de datos espectroscópicos de RMN ¹H de norsanguinarina

Asignación	RMN ¹H experimental (300 MHz, TFA-<i>d</i>) δ ppm (m, J_{Hz})	RMN ¹H literatura (TFA-<i>d</i>) δ ppm (m, J_{Hz}) [81]
1	7.45 (s)	7.45 (s)
4	7.98 (s, 1H)	7.98 (s)
6	9.55 (s, 1H)	9.55 (s)
9	7.95 (d, 1H, <i>J</i> = 8.79)	7.95 (d, 1H, <i>J</i> = 10)
10	8.19 (d, 1H, <i>J</i> = 8.88)	8.18 (d, 1H, <i>J</i> = 10)
11	8.48 (d, 1H, <i>J</i> = 8.94)	8.49 (d, 1H, <i>J</i> = 10)
12	8.51 (d, 1H, <i>J</i> = 9.21)	8.52 (d, 1H, <i>J</i> = 10)
OCH ₂ O	6.27 (s)	6.25 (s)
OCH ₂ O	6.51 (s)	6.50 (s)

El espectro de RMN ¹³C se comparó con lo reportado por Tousek y colaboradores (2004) (Tabla 6) quienes obtuvieron norsanguinarina de manera sintética a partir de sanguinarina y se utilizó cloroformo deuterado como disolvente para la realización del espectro; por lo tanto, los desplazamientos químicos difieren con lo obtenido experimentalmente donde se utilizó TFA-*d* como disolvente [82].

Tabla 7. Comparación de datos espectroscópicos de RMN ^{13}C de norsanguinarina

Asignación	RMN ^{13}C experimental (75 MHz, TFA-d) δ ppm	RMN ^{13}C literatura (125.76 MHz, CDCl_3) δ ppm [74]
1	105.99	104.4
2	150.53	148.4
3	151.01	148.6
4	104.98	102.4
4a	128.95	129.4
4b	131.75	139.9
6	147.53	144.8
6a	116.83	112.8
7	140.54	143.6
8	148.14	145.2
9	109.74	113.6
10	117.41	115.6
10a	127.29	128.2
10b	120.74	120.4
11	120.09	118.4
12	124.08	127.4
12a	131.30	129.8
OCH ₂ O	102.66	102.4
OCH ₂ O	96.83	101.4

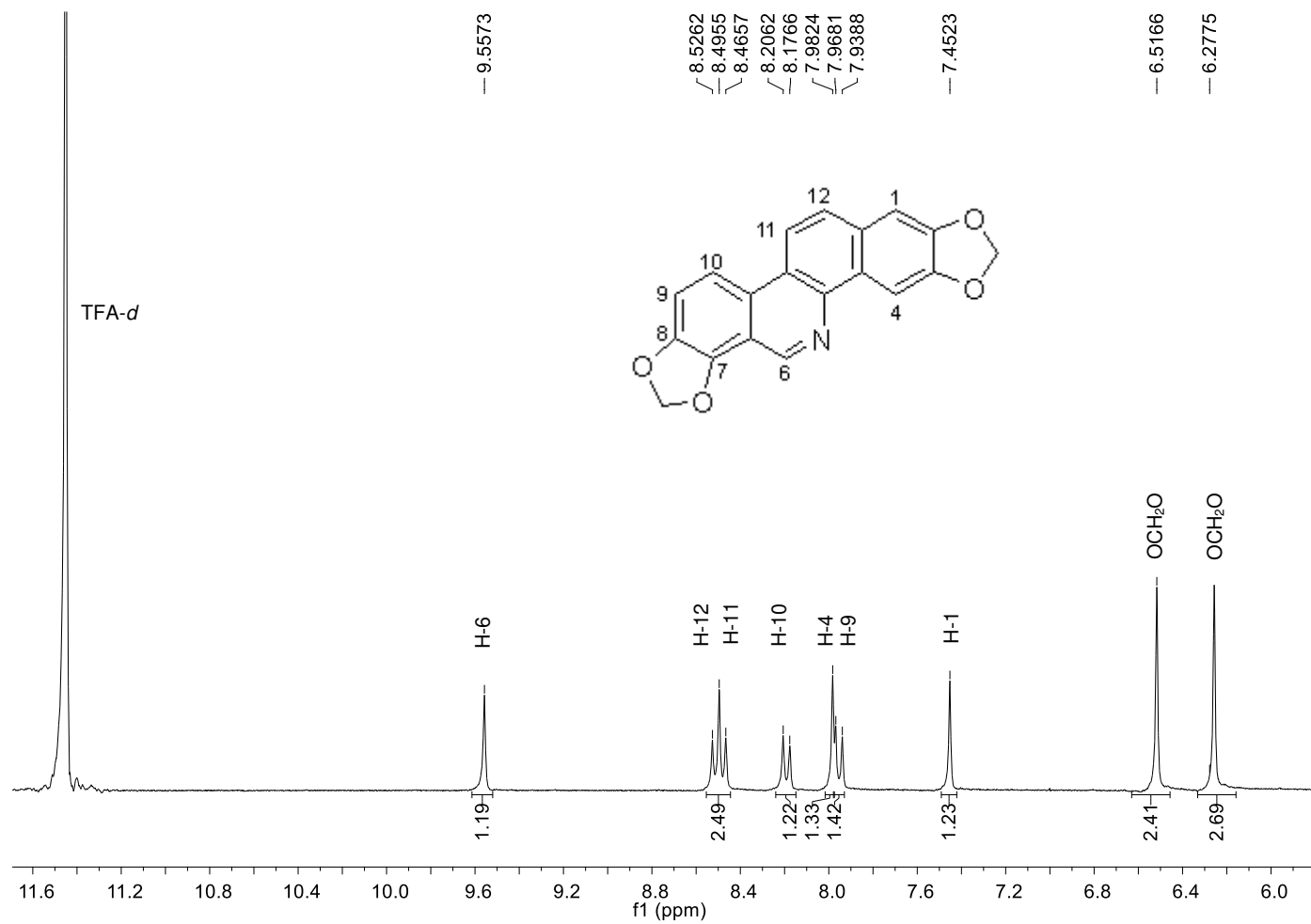


Figura 32. Espectro de RMN ¹H (300 MHz, TFA-*d*) de Norsanguinarina

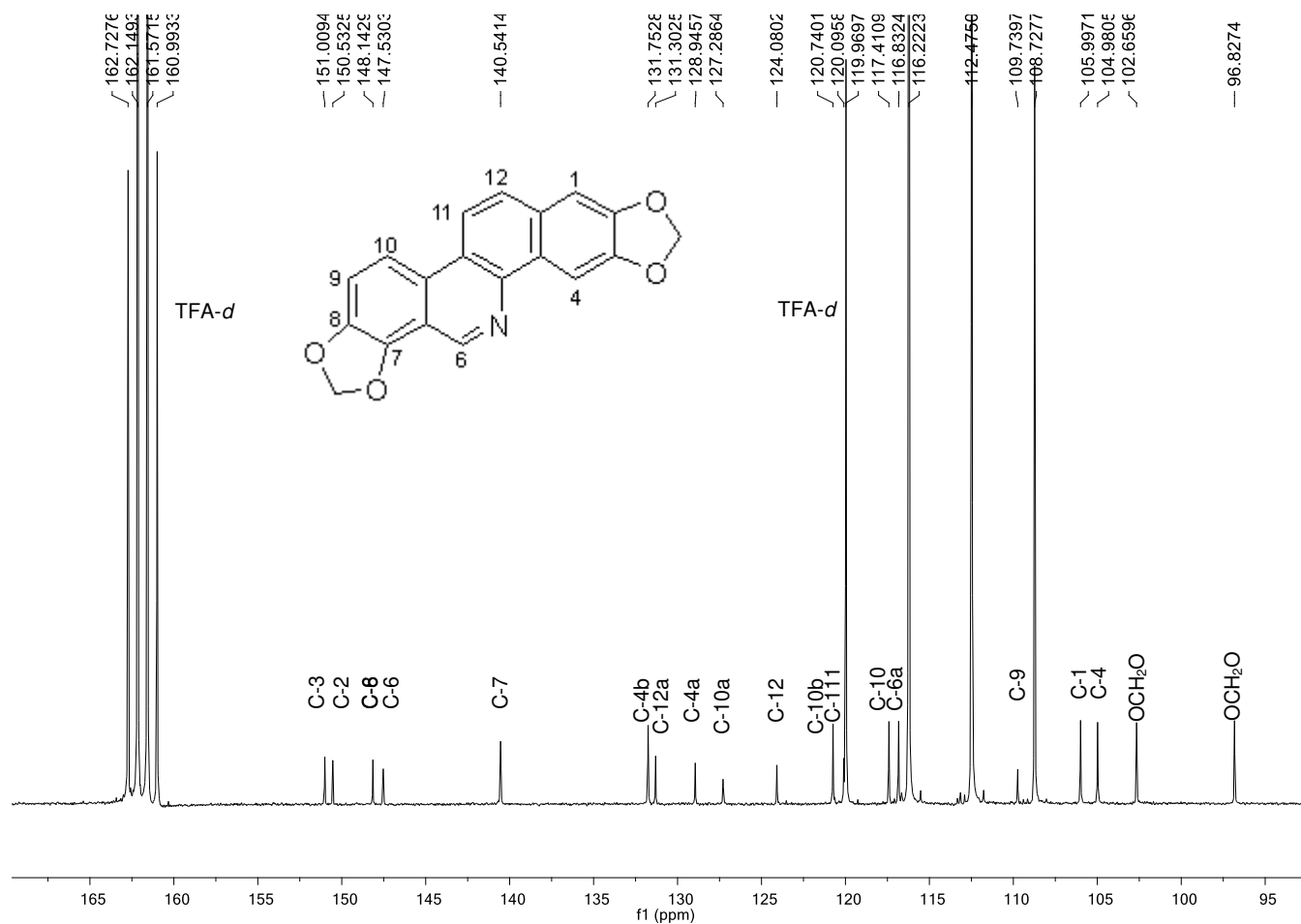


Figura 33. Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, TFA-*d*) de Norsanguinarina

5.1.1.13 Aislamiento de BLH14

En la fracción S de la FM_{ac} de hojas se observó un precipitado café que cristalizó en forma de esferas (CH₂Cl₂/MeOH 50:50). El precipitado se lavó y decantó sucesivamente con metanol y cloroformo hasta la obtención de un sólido blanco. Se disolvió en metanol y diclorometano (1:1) a 75° C para su recrystalización, obteniéndose un sólido blanco con apariencia aperlada. Este compuesto revela color negro al UV_{254nm} y se comparó por TLC contra las muestras de referencia obtenidas por Hernández-Almanza sin coincidir con R_f ni color bajo el UV con alguno de estos estándares, por lo que se presume que este compuesto no fue obtenido con anterioridad a partir de las semillas de *B. latisejala*. Este compuesto fue obtenido también a partir de la fracción T de tallos con el mismo procedimiento de purificación. Se analizó por RMN de H¹ y C¹³, RMN de dos dimensiones, espectrometría de masas y rotación óptica, llegando a la siguiente propuesta estructural de un nuevo producto natural (Figura 34). Este nuevo compuesto es un alcaloide de tipo aporfina, con lo que además de la aportación de un nuevo producto natural también se define un nuevo tipo de alcaloide en el género *Bocconia*.

Los alcaloides de tipo aporfina se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, se han encontrado en más de 20 familias y 100 géneros de plantas; con más de 500 alcaloides reportados [83, 84]. Las familias de plantas que destacan por tener este tipo de alcaloides son: *Annonaceae* (28 géneros), *Menispermaceae* (20 géneros), *Ranunculaceae* (9 géneros), *Lauraceae* (18 géneros), *Papaveraceae* (13 géneros), entre otras [85].

Las aporfinas son un subgrupo de bencilisoquinolinas, con una base estructural tetracíclica formada por la unión directa de los anillos aromáticos A y D del núcleo típico de alcaloides de tipo bencilisoquinolina. El nitrógeno se encuentra en la posición 6 y puede estar como amina secundaria, terciaria o cuaternaria [86].

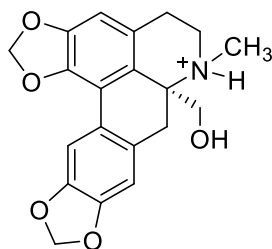


Figura 34. Caracterización de BLH14

Sólido color blanco

Soluble en MeOH/ CH₂Cl₂ (1:1) a 75°C

Rendimiento: Tallos: 80.6 mg (0.18%)

Hojas (F_{Mac}): 181.4 mg (0.11%)

TLC: CH₂Cl₂/CH₃OH; 90:10

R_f: 0.7

[α]^{25°C}_{589nm} = -0.5

Negro (UV_{254nm})

No revela (UV_{365nm})

C₂₀H₂₀NO₅

PM: 354 g/mol; cal 354.13 g/mol

P.f: 255-260°C

cLog P: 3.94

RMN ^1H (400 MHz, TFA-*d*) δ_{ppm} : 7.74 (s, 1H, H-11), 7.04 (s, 1H, H-8), 6.70 (s, 1H, H-3), 6.18 (d, 2H, $J = 9.36$ Hz, OCH₂O), 5.96 (d, 2H, $J = 1.52$ Hz, OCH₂O), 4.80 (d, 1H, $J = 16.3$ Hz, H-12A), 4.60 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz, H-12B), 3.94 (m, 1H, H-5A), 3.77 (m, 1H, H-5B), 3.37 (m, 2H, H-4), 3.28 (m, 2H, H-7), 3.22 (s, 3H, N-CH₃) (Figura 41).

RMN ^{13}C (100 MHz, TFA-*d*) δ_{ppm} : 152.54 (C-9), 152.22 (C-2), 150.26 (C-10), 149.92 (C-1), 143.51 (C-1b), 128.16 (C-3a), 125.18 (C-11a), 123.24 (C-7a), 110.85 (C-3), 110.12 (C-1a), 109.26 (C-11), 107.52 (C-8), 107.06 (OCH₂O), 104.18 (OCH₂O), 94.65 (C-6a), 56.98 (CH₂OH), 56.31 (C-7), 46.51 (N-CH₃), 41.03 (C-5), 29.74 (C-4) (Figura 42).

5.1.1.13.1 Propuesta de biosíntesis de BLH14

La biosíntesis de aporfina sigue la misma secuencia que las benzo[c]fenantridinas al iniciar con dos unidades de tirosina como aminoácido precursor, hasta la formación de *S*-(+)-reticulina (Figura 35) [87, 88].

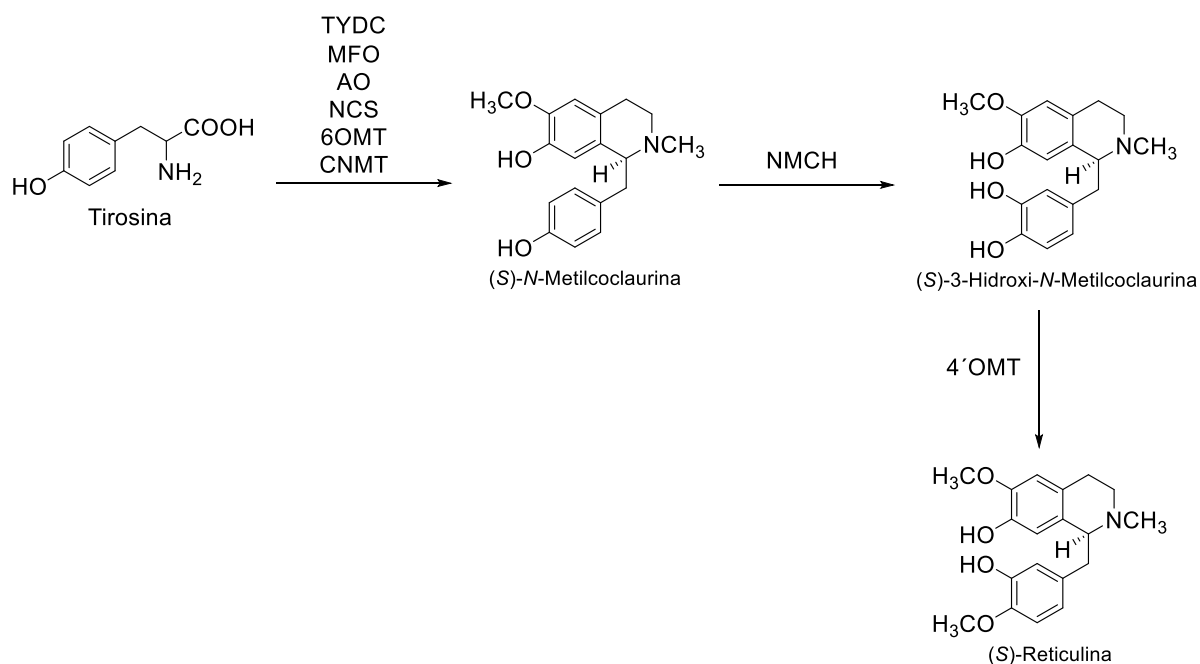


Figura 35. Formación de (*S*)-Reticulina a partir de dos moléculas de tirosina. TYDC: Tirosina dopa descarboxilasa, MFO: Monofenol oxidasa, AO: Aminooxidasa, NSC: Norcoclaurina sintasa, NMCH: (*S*)-N-metilcoclaurina-3'-hidroxilasa y 4'OMT: (*S*)-3'-hidroxi-N-metilcoclaurina-4'-O-metiltransferasa.

La formación del esqueleto de aporfina es catalizada por una enzima citocromo P450, corituberina sintasa (CYP80G2), mediante una reacción de acoplamiento oxidativo fenólico intramolecular C8-C2' [86] [88]. Posteriormente otra enzima del citocromo cataliza la formación del grupo dioximetileno (Figura 36) [87].

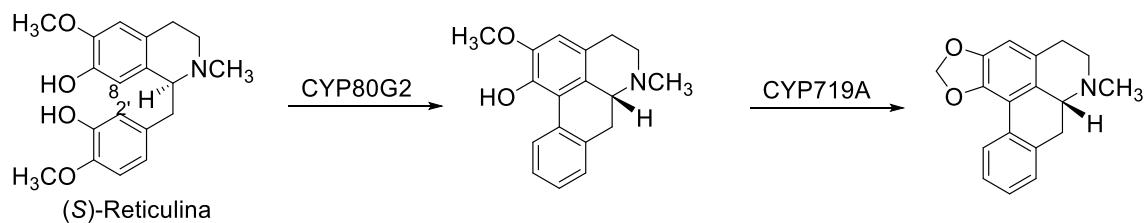


Figura 36. Formación del esqueleto de alcaloides de tipo aporfina, mediado por enzimas del citocromo P450.

5.1.1.14 Caracterización estructural de BLH14

La estructura para BLH14 se propone con base en la determinación de su fórmula molecular mediante espectrometría de masas por análisis directo en tiempo real (DART+) (Figura 37) e impacto electrónico (EI+) (Figura 38). Aunado a los espectros de RMN ¹H (Figura 40), ¹³C (Figura 41) y DEPT (Figura 42) que permitieron establecer la presencia de un grupo metilo unido a nitrógeno de amina cuaternaria, seis grupos metilenos, tres grupos metino aromáticos y diez carbonos aromáticos; con lo cual se determinó la fórmula molecular C₂₀H₂₀NO₅ (m/z 354 [M]⁺; calc. 355 [M+H]⁺).

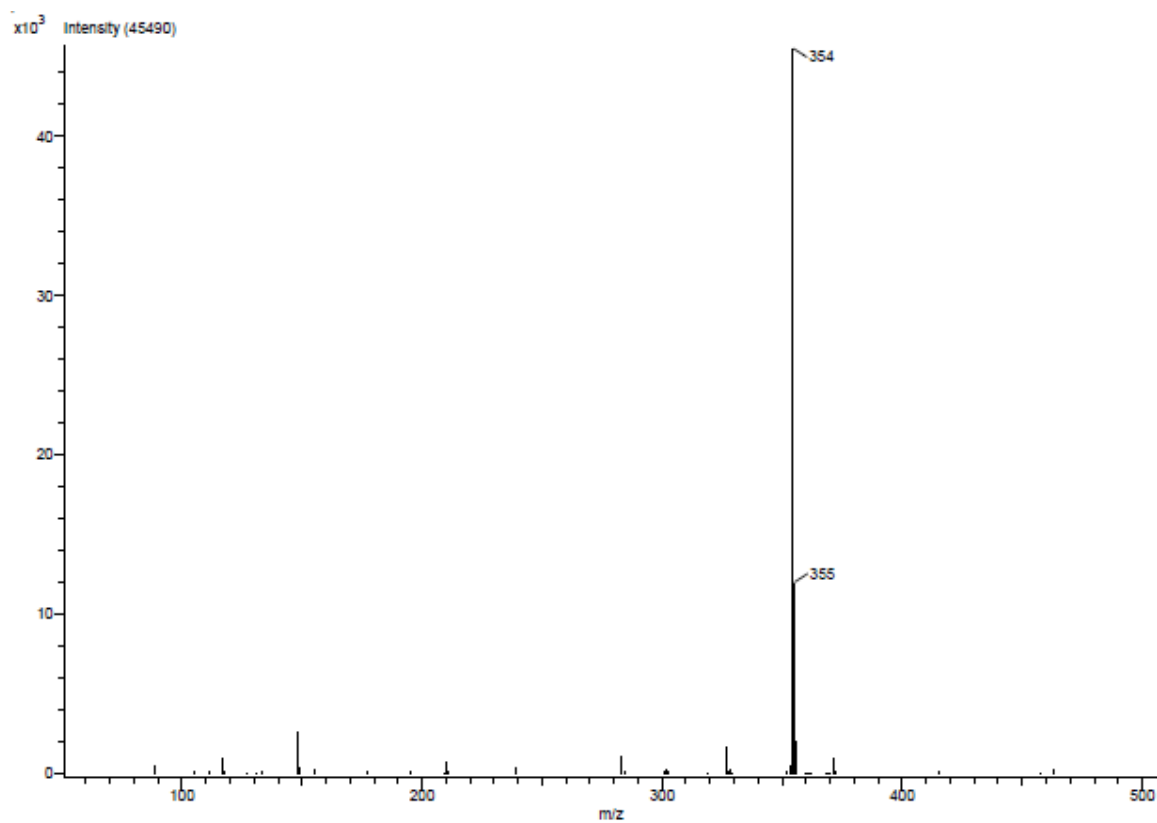


Figura 37. Espectro de masas por ESI (DART+) de BLH14

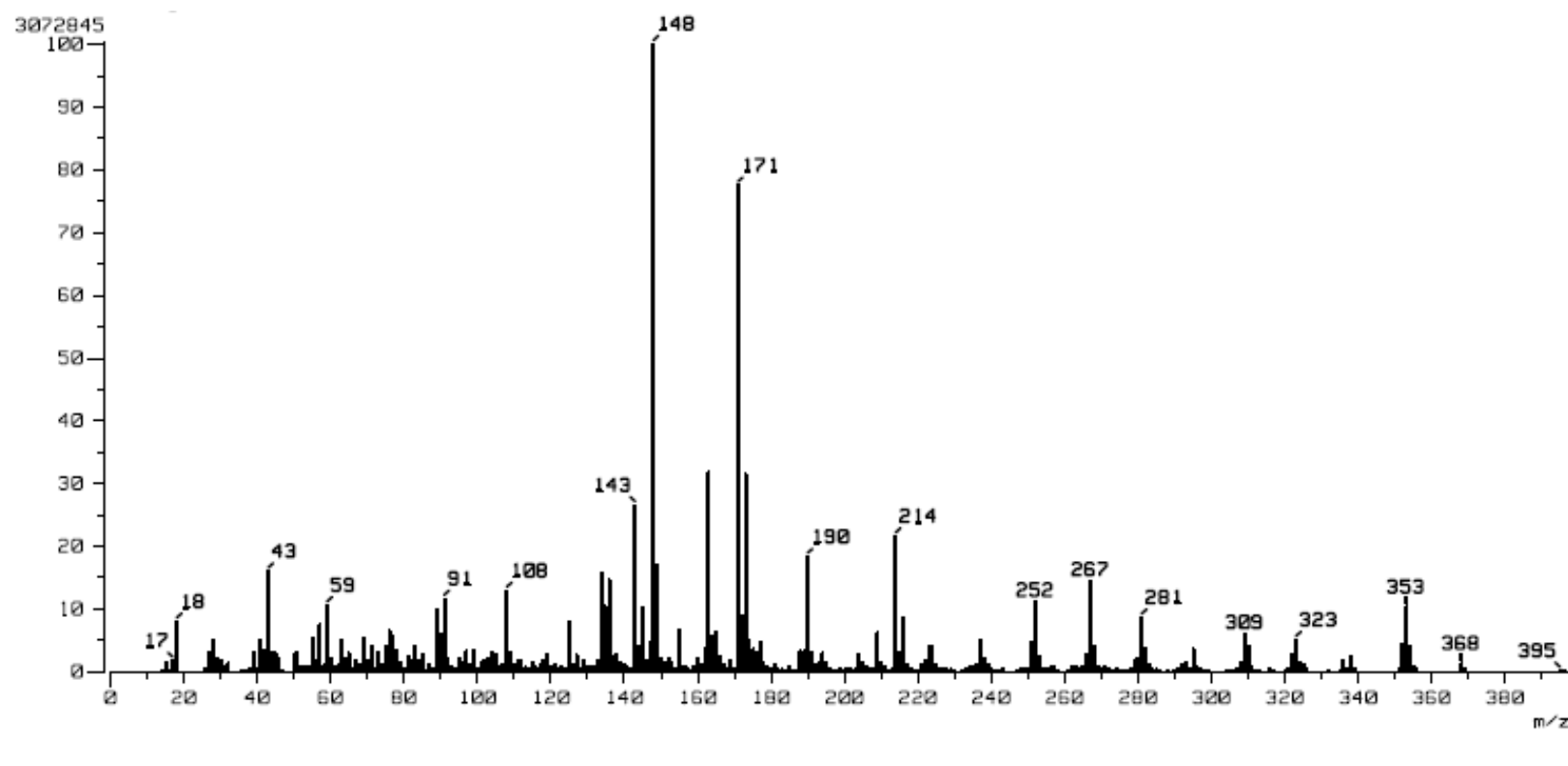
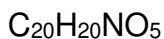
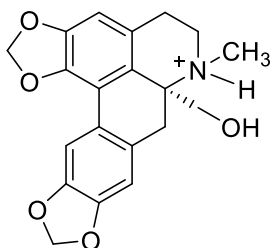


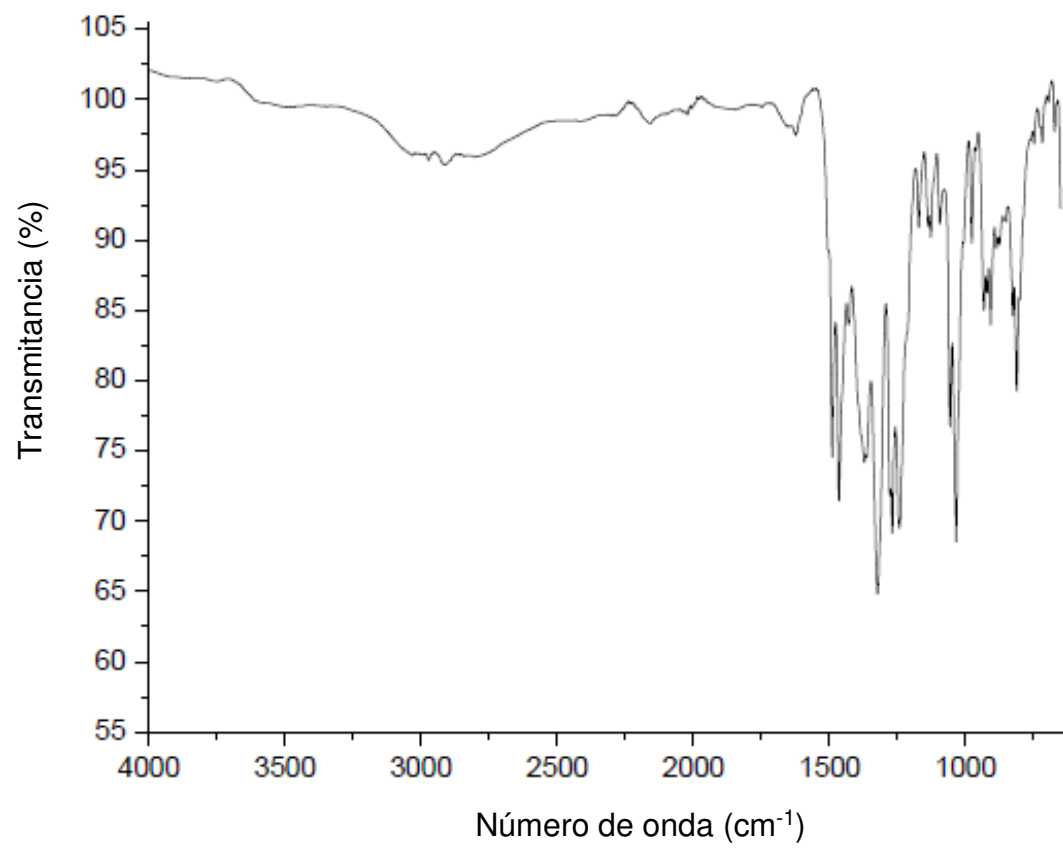
Figura 38. Espectro de masas por impacto electrónico EI+ (75 eV) de BLH14.

En el espectro de FTIR (Figura 40) se observan bandas anchas que indican la presencia de grupos hidroxilo asociadas a vibraciones O-H de estiramiento (3550 y 3250 cm^{-1}), la señal se muestra por encima del rango normal debido a la formación de puentes de hidrógeno. También se observa la señal que indica la presencia de enlaces N-H de amina cuaternaria, dicha señal se ensancha cuando forma puentes de hidrógeno ($3200\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$). Además, se observan las bandas de absorción de los enlaces O-C-O aromático ($1450\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$) así como las bandas de C-O de estiramiento de función alquilo (1000 cm^{-1}) y las bandas características de los enlaces C-C de estiramiento ($1550\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$).



m/z: 354 g/mol

Figura 39. Estructura, fórmula y masa moleculares de BLH14



El espectro de RMN ^1H (Figura 41) permitió deducir una relación estructural con los alcaloides de tipo benzo[c]fenantridina; por ejemplo, la presencia de tres protones aromáticos, al presentarse tres singuletes correspondientes a las posiciones 3 (δ_{H} 6.70 ppm), 8 (δ_{H} 7.04 ppm) y 11 (δ_{H} 7.74 ppm). Posteriormente se presentan dos señales doblete que integran para dos protones cada uno correspondientes a los grupos dioximetileno (δ_{H} 6.18 y 5.96 ppm). A continuación, se observan dos dobletes con acoplamiento geminal que se asignan a los protones del grupo hidroximetileno H-12A (δ_{H} 4.80 ppm, $J = 16.3$ Hz) y H-12B (δ_{H} 4.60 ppm, $J = 16.2$ Hz), esto se puede correlacionar con el espectro de RMN ^{13}C (Figura 42) al observarse la señal del carbono unido a hidroxilo a δ_{C} 56.98 ppm. A diferencia de los alcaloides anteriores, en este espectro se observan señales de tres grupos metilenos alifáticos, los cuales corresponden a las posiciones 4 (δ_{H} 3.37 ppm), 5 (δ_{H} 3.94 H-5A, 3.77 H-5B ppm) y 7 (δ_{H} 3.28 ppm), esto se puede confirmar con las señales de carbono por sus desplazamientos químicos a 29.74 ppm (C-4), 46.51 ppm (C-5) y 56.31 ppm (C-7), esto es relacionado con observado en el espectro DEPT (Figura 43) al encontrarse las señales de grupos metileno. Asimismo, se observa la presencia de un grupo metilo unido a nitrógeno de amina cuaternaria (δ_{H} 3.21 ppm; δ_{C} 46.51 ppm) el cual confirma que se trata de un alcaloide, pero las diferencias espectroscópicas indican que este es un alcaloide de tipo aporfina y no del tipo benzo[c]fenantridina.

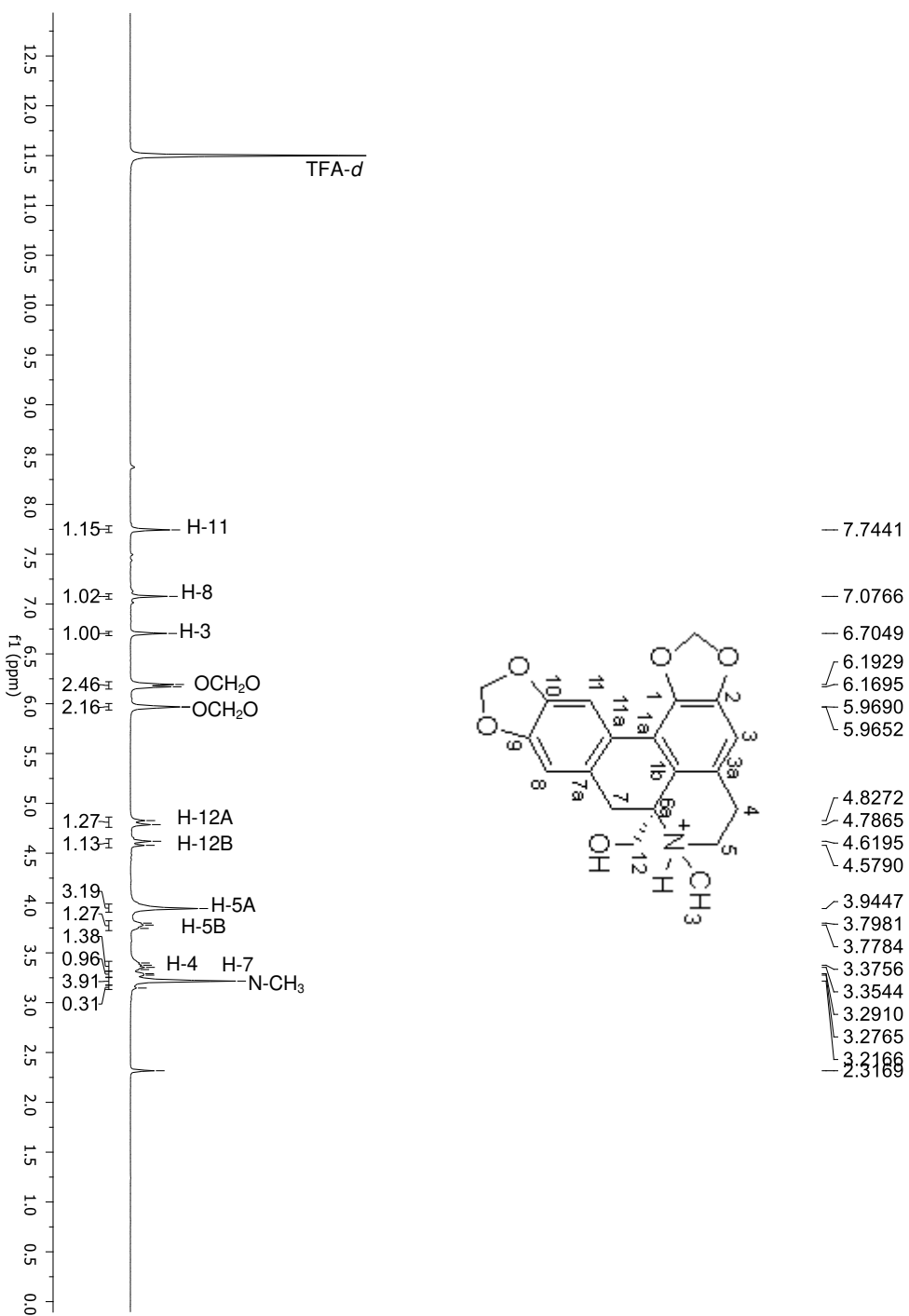


Figura 41. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, TFA-d) de BLH14

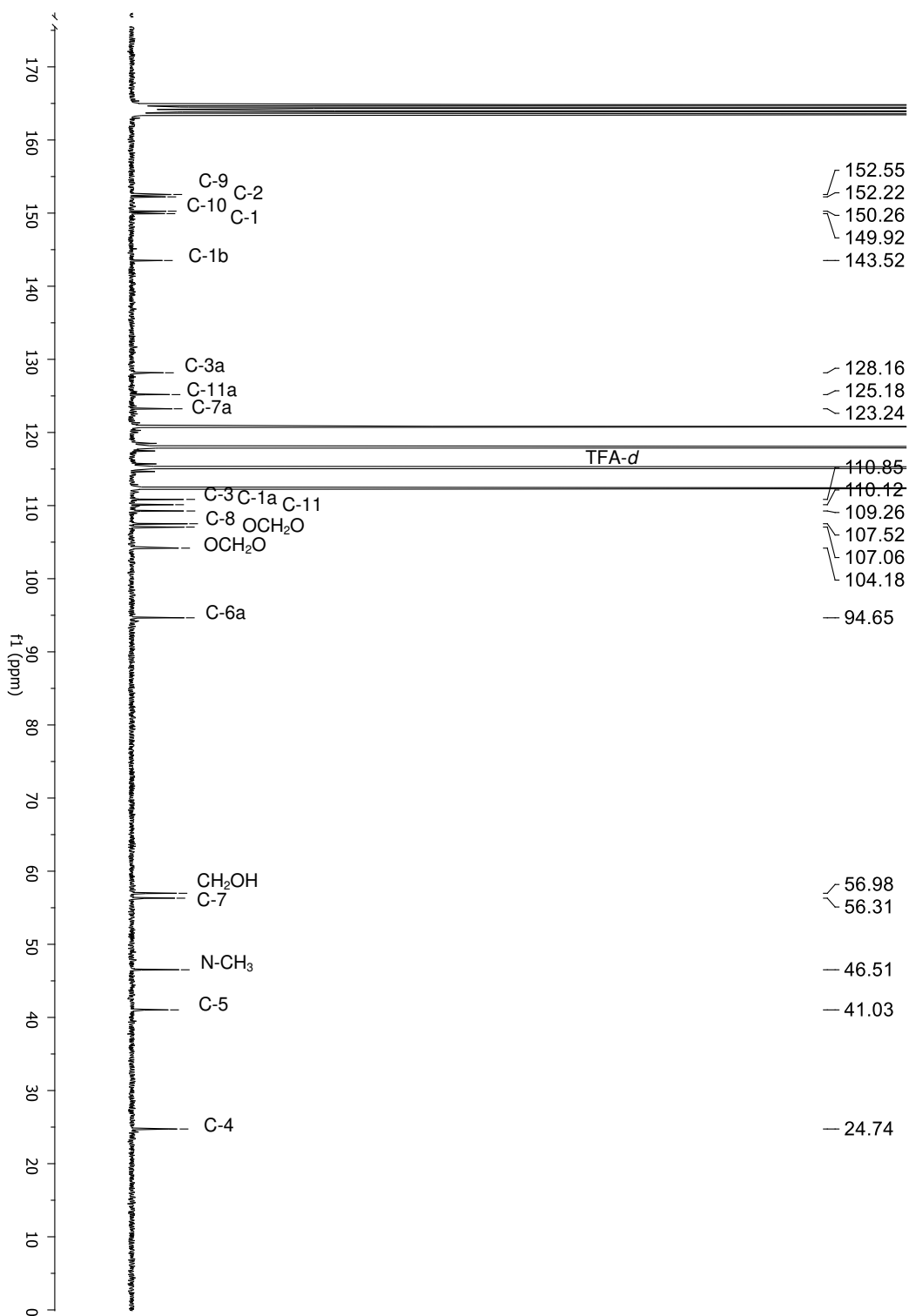


Figura 42. Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, TFA-*d*) de BLH14

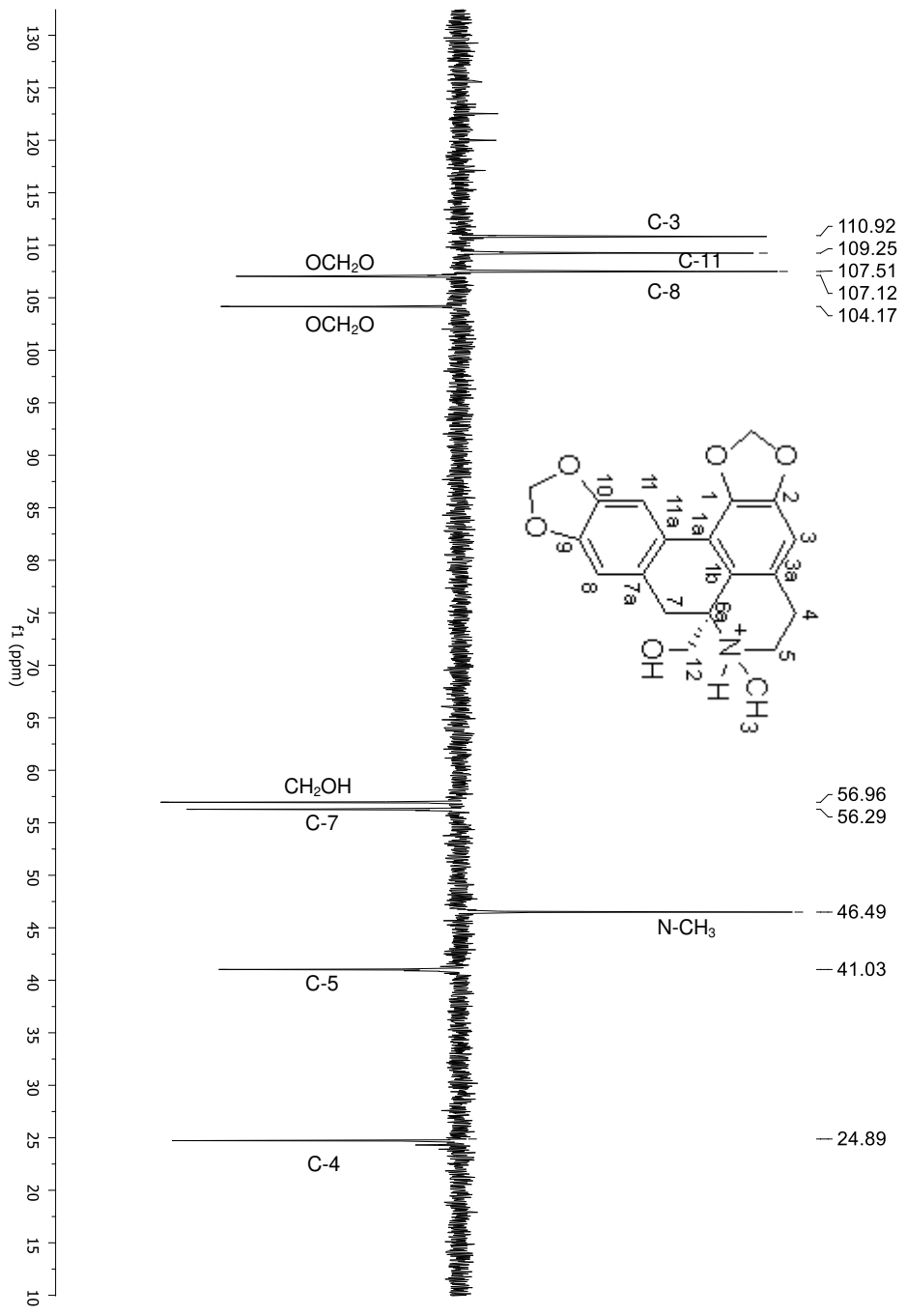


Figura 43. Espectro DEPT 135 de BLH14

El espectro HMBC (Figura 45) muestra las siguientes correlaciones clave a través de 2, 3 y 4 enlaces de distancia. 2J : C-2/H-3 (δ_H 6.7 ppm), 3J : C-3a/H-4 (δ_H 3.37 ppm) y 3J : C-3a/H-5A y H-5B (δ_H 3.94 y 3.77 ppm), lo que indica la presencia de dos metilenos vecinos. Asimismo, se observan las correlaciones 2J : C-6a/H-12A y H-12B (δ_H 4.80 y 4.60 ppm) que corresponden al grupo hidroximetileno. También la correlación 2J : C-7a/H-7 (δ_H 3.28 ppm) y 3J : C-11a/H-7 (δ_H 3.28 ppm), respectivamente. Las siguientes correlaciones 4J : C-1b/H-11 (δ_H 7.74 ppm) y 4J : C-6a/H-8 (δ_H 7.04 ppm), son de las más importantes debido a que permitieron deducir que los dos anillos aromáticos se encuentran directamente unidos formando el esqueleto base de un alcaloide de tipo aporfina (Figura 44).

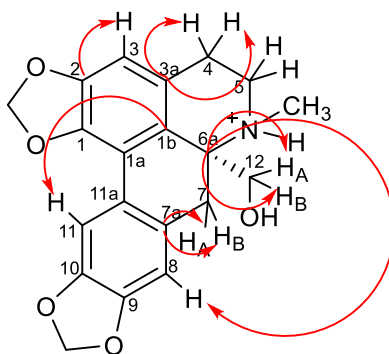


Figura 44. Correlaciones HMBC para BLH14

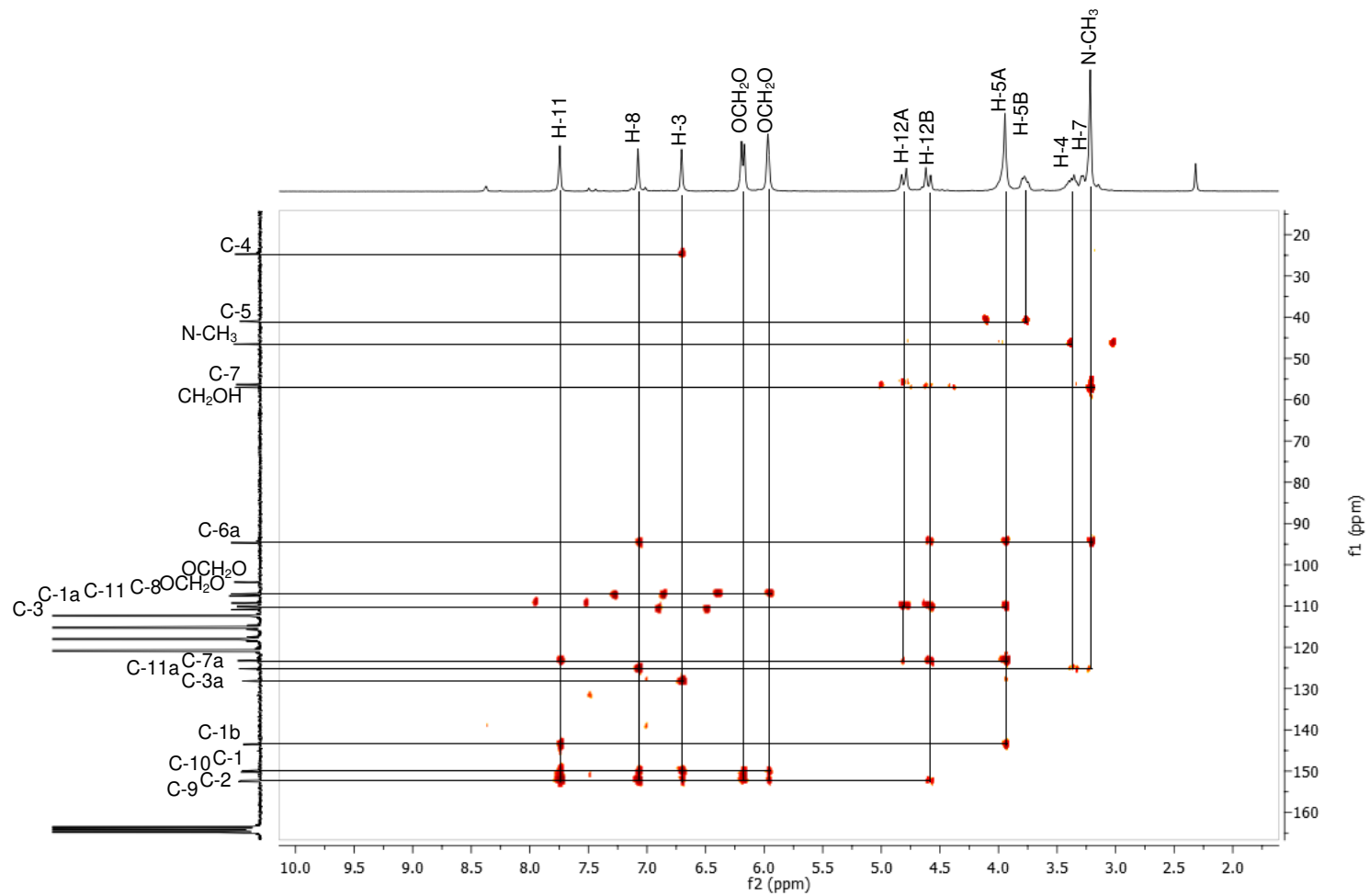


Figura 45. Espectro HMBC (400 MHz, TFA-d) de BLH14

En el espectro NOESY (Figura 47) se observan las correlaciones espaciales más importantes entre los protones H-3 (δ_H 6.70 ppm) y los protones de la posición H-4A (δ_H 3.38 ppm) y H-4B (δ_H 3.29 ppm), las correlaciones entre los protones de la posición H-5 (δ_H 3.94, 3.77 ppm) con los protones del grupo N-metilo (δ_H 3.22 ppm) y los protones del metileno unido al grupo OH (δ_H 4.80, 4.60 ppm); esta correlación indica que tanto el metileno como el grupo N-metilo se encuentran posicionados detrás del plano, así entonces se deduce que el carbono quiral C-6a presenta configuración relativa (*S*). Por último, se observa en el espectro la correlación entre el protón de la posición H-8 (δ_H 7.04 ppm) con los protones en H-7 (δ_H 3.28 ppm) (Figura 46).

Sumado a lo anterior, en el espectro COSY (Figura 48) se puede observar la correlación a través de tres enlaces de distancia entre los protones de las posiciones 4 y 5, denotando la presencia de dos metilenos vecinos.

En el espectro HSQC (Figura 49) se confirma la conectividad entre protones y carbonos en la molécula en concordancia con lo observado en los espectros anteriormente descritos.

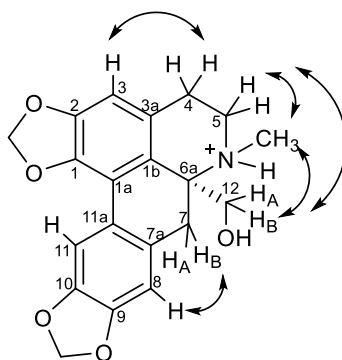


Figura 46. Principales correlaciones NOESY para BLH14

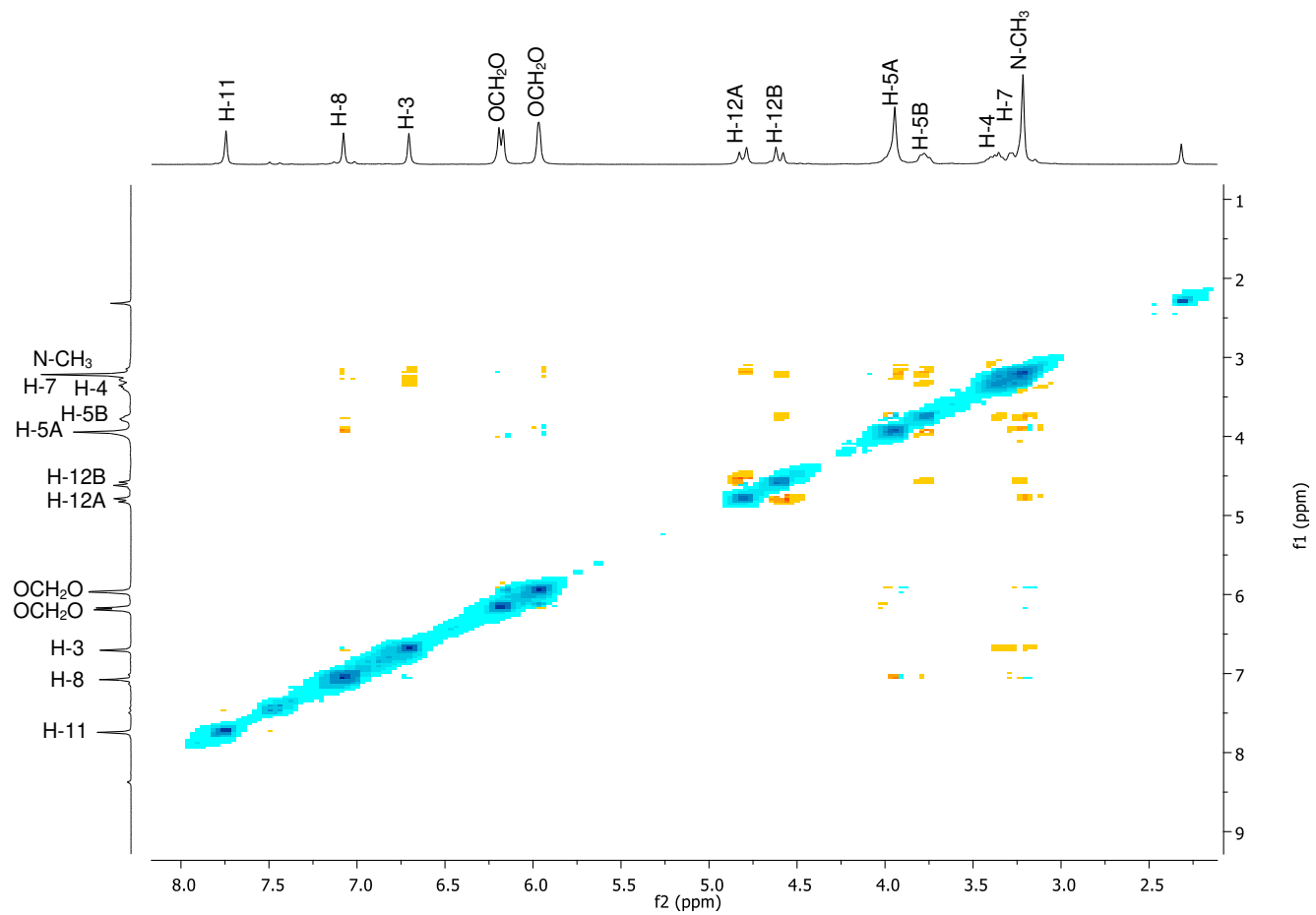


Figura 47. Espectro NOESY (400 MHz, TFA-d) de BLH14

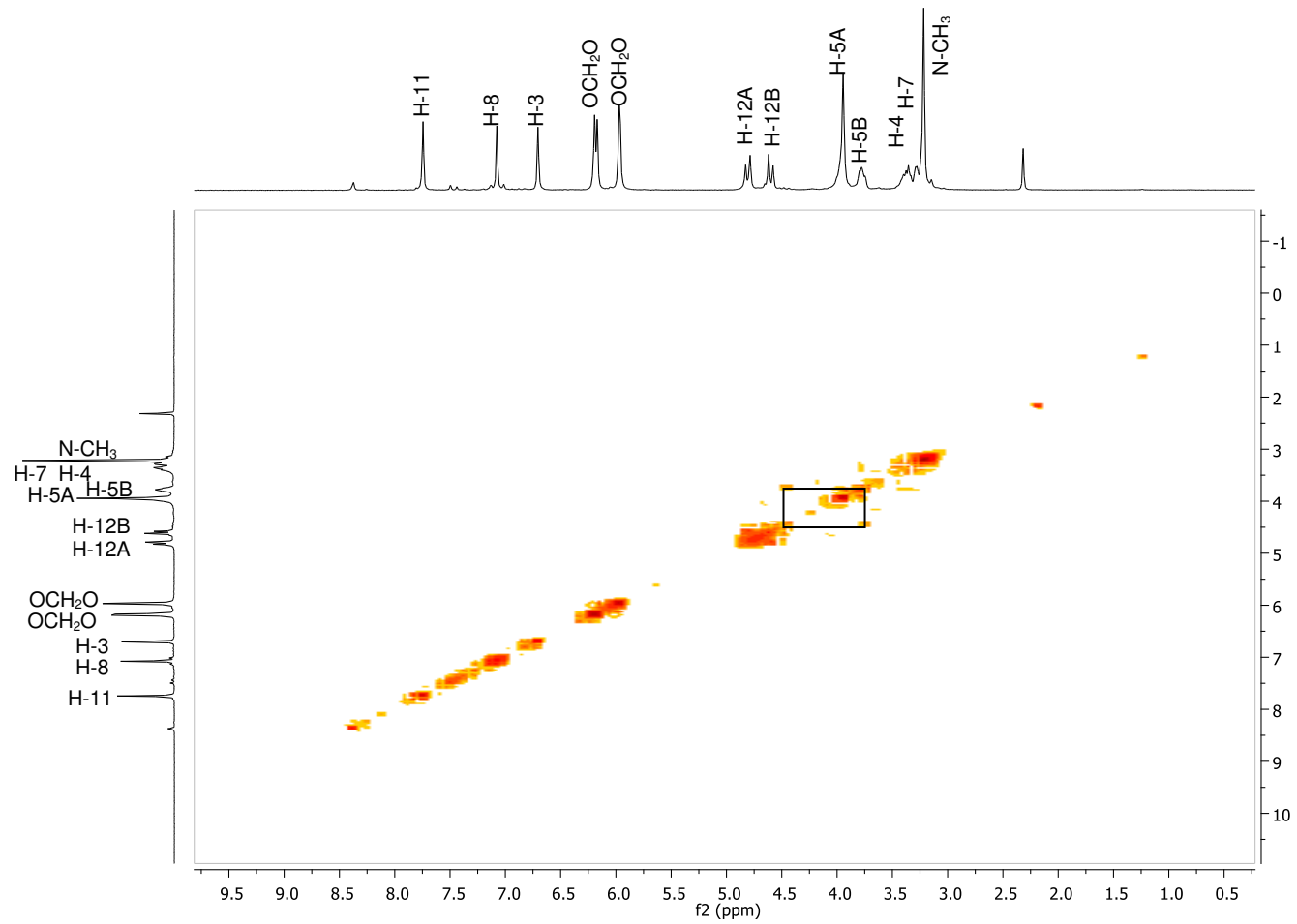


Figura 48. Espectro COSY (400 MHz, TFA-d) de BLH14

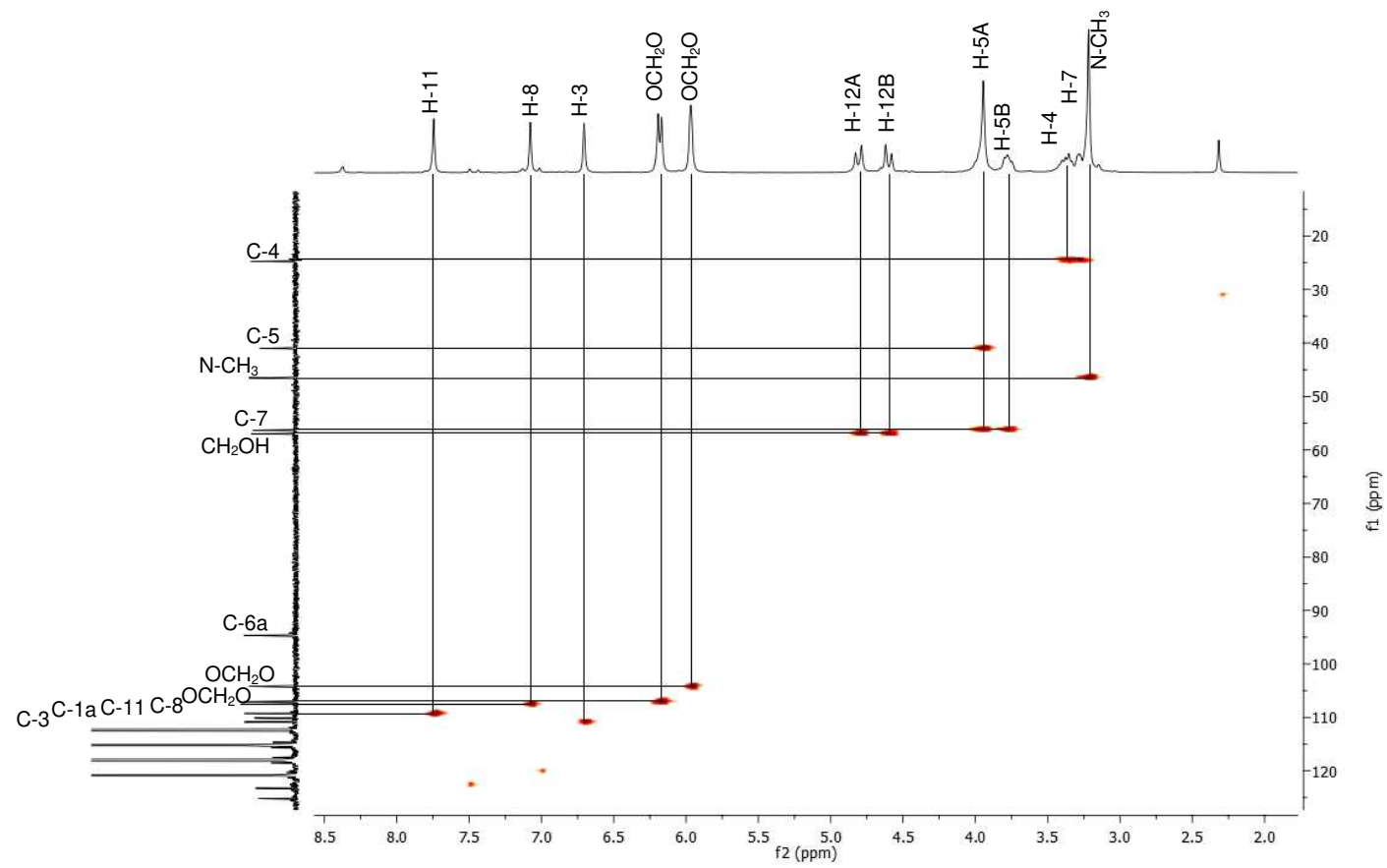


Figura 49. Espectro HSQC (400 MHz, TFA-d) de BLH14

5.1.1.15 Aislamiento de 6-nitrometildihidrosanguinarina

La fracción K de la FMac de hojas se lavó con Hex/AcOEt (90/10), se utilizó carbón activado y tierra de diatomeas (Hyflo Super Cel ®) y posterior filtración al vacío para reducir la presencia de clorofila en la muestra obteniendo un sólido color gris oscuro (10.4 mg). A continuación, se realizó una cromatografía en columna utilizando una fase estacionaria compuesta con gel de sílice y tierra de diatomeas (gel de sílice en relación 1:20 respecto a la cantidad de muestra y el 10% de tierra de diatomeas con respecto a la cantidad de sílice necesaria), utilizando como fase móvil un gradiente de Hex/AcOEt con cambios de 5% de polaridad hasta 100% de AcOEt y posteriormente con una mezcla AcOEt/MeOH. De la subfracción 17-22 se obtuvo un precipitado beige el cual revelaba al UV (254 y 365 nm) un compuesto negro/morado como mayoritario. Este sólido fue procesado por una segunda cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como fase móvil una mezcla isocrática de Hex/CHCl₃ (50:50) obteniendo el compuesto puro en la subfracción 12-32. El sólido obtenido fue lavado sucesivamente con hexano y posteriormente recristalizado con una mezcla CHCl₃/MeOH (50/50) teniéndose un sólido color blanco. Se observó que este compuesto es susceptible a degradación ya que el sólido blanco cambio a coloración naranja y al observarse al UV se presentaban manchas secundarias en color azul y naranja. La estructura del compuesto se determinó mediante RMN de ¹H y ¹³C, así como espectros bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC y NOESY), espectrometría de infrarrojo y espectrometría de masas. Se compararon los espectros de RMN con la literatura, encontrándose coincidencia

con el compuesto 6-(nitrometil)-5,6-dihidrosanguinarina obtenido mediante semisíntesis orgánica por Romo Pérez y colaboradores, dentro del mismo grupo de investigación (Tabla 7) [89]. Este compuesto no se encuentra reportado previamente en *B. latispala* ni en ninguna otra especie vegetal, por lo tanto, se describe como un nuevo producto natural (Figura 50).

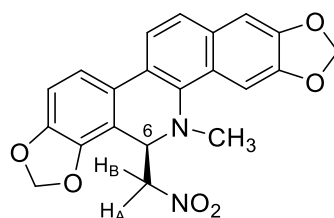


Figura 50. Caracterización de 6-nitrometildihidrosanguinarina

Sólido color blanco

Soluble en CHCl_3

Rendimiento: Tallos: ND Hojas (F_{Mac}): 10.4 mg (0.006%)

TLC: Hex/AcOEt; 70:30 Rf: 0.65

Negro ($\text{UV}_{254\text{nm}}$) Negro/morado ($\text{UV}_{365\text{nm}}$)

$\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_6$ PM: 393.10 g/mol P.f: 216-220°C (238-240°C)[89]

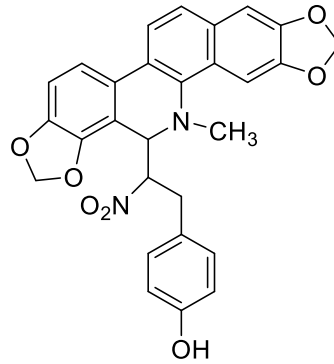
cLogP: 4.34

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ_{ppm} : 7.70 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H-11), 7.53 (d, 1H, $J = 9.45$ Hz, H-12), 7.52 (s, 1H, H-4), 7.40 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-10), 7.12 (s, 1H, H-1), 6.95 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-9), 6.12 (d, 1H, $J = 1.16$ Hz, OCH_2O), 6.11 (d, 1H, $J = 1.16$ Hz, OCH_2O), 6.08 (s, 2H, OCH_2O), 5.21 (dd, 1H, $J = 4.4, 11.0$ Hz, H-6),

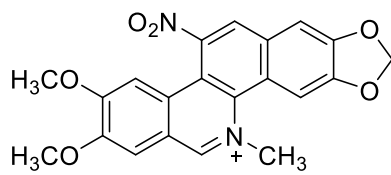
4.33 (dd, 1H, $J = 4.4, 12.0$ Hz, H-A), 4.26 (dd, 1H, $J = 11.2, 11.2$ Hz, H-B), 2.71 (s, 3H, NCH₃) (Figura 55).

RMN ¹³C (500 MHz, CDCl₃) δ_{ppm} : 148.54 (C-3), 147.96 (C-2), 147.35 (C-8), 144.89 (C-7), 138.08 (C-4b), 131.32 (C-12a), 127.51 (C-10b), 126.20 (C-10a), 124.64 (C-12), 122.51(C-4a), 119.69 (C-11), 116.79 (C-10), 110.85 (C-6a), 108.77 (C-9), 104.25 (C-1), 101.92 (14 OCH₂O), 101.18 (15 OCH₂O), 100.78 (C-4), 75.76 (CH₂-NO₂), 56.04 (C-6), 43.25 (NCH₃) (Figura 58).

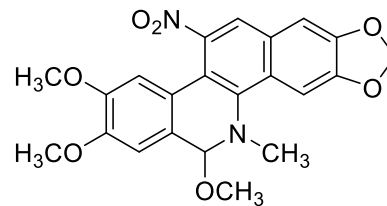
Aunque es inusual encontrar nitrocompuestos en la naturaleza, se han reportado alrededor de 200 productos naturales derivados de plantas, hongos, bacterias y mamíferos que contienen grupos nitro y que presentan actividad biológica antibacterial y antitumoral [83, 84], entre ellos destaca el cloranfenicol, un potente antibiótico obtenido a partir de la bacteria *Streptomyces venezuelae*. A la lista se suman alcaloides de tipo benzo[c]fenantridina que contienen grupos nitro, por ejemplo la nitrotirasanguinarina obtenida a partir de la especie *Hypocoum imbwe* (Papaveraceae) [92], la 6-nitronitidina y 6-nitro-8-metoxi-7,8-dihidronitidina aislados de la planta *Zanthoxylum atchoum* (Rutaceae) [93] (Figura 51).



Nitrotirasanguinarina



6-nitronitidina



6-nitro-8-metoxi-7,8-dihidronitidina

Figura 51. Alcaloides nitro benzo[c]fenantridínicos

5.1.1.15.1 Propuesta de biosíntesis de 6-nitrometildihidrosanguinarina

Winkler y Hertweck (2007) propusieron diferentes mecanismos para la comprensión de la biosíntesis de grupos nitro en productos naturales: 1. Oxidación directa de un grupo amino, 2. Nitración mediada por N-oxidasas y 3. Nitración por reacción electrofílica [83].

Aunque no se ha establecido la ruta biosintética para la formación de nitrobenzo[c]fenantridinas se puede observar que el compuesto nitrotirasanguinarina presenta estrecha relación estructural 6-nitrometilsanguinarina. Se propone un

probable mecanismo de biosíntesis en el que participa como sustrato un residuo del aminoácido L-glicina (Figura 52). Iniciando con la N-oxigenación consecutiva del grupo amino de L-glicina; por medio de una enzima monooxigenasa mediada por FAD⁺ y NADPH, hasta originar N, N-dihidroxiciglicinato como intermediario. El cual posteriormente por una reacción de deshidrogenación genera al Nitroglicinato. En seguida, mediante una reacción de descarboxilación se origina un carboanión intermediario que es incorporado a la posición C-6 de sanguinarina mediante una reacción tipo SN2 (Figura 53) originando finalmente el producto 6-nitrotirasanguinarina.

1. N-oxigenación para generar el intermediario N, N-dihidroxiciglicinato y su posterior deshidrogenación.

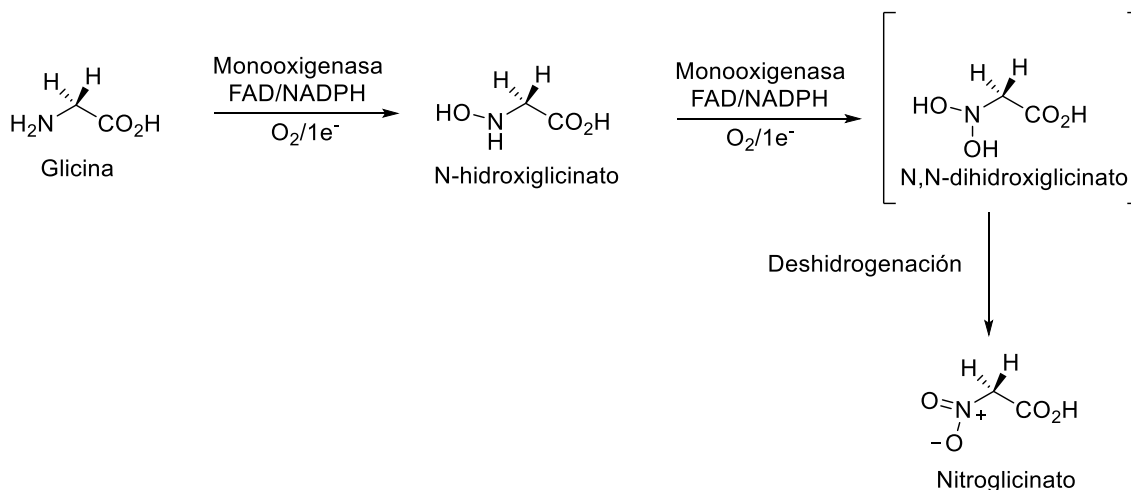


Figura 52. Formación de intermediario Nitroglicinato a partir de L-glicina

2. Convergencia de dos rutas para formar el nitroderivado

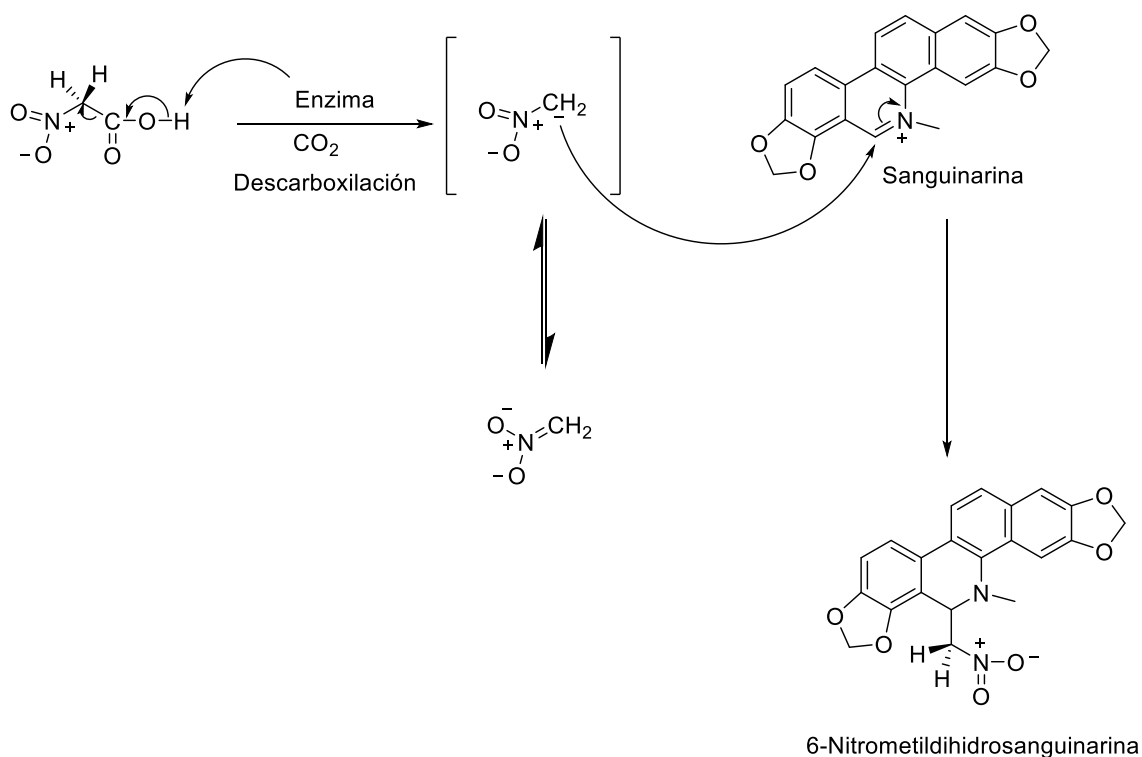
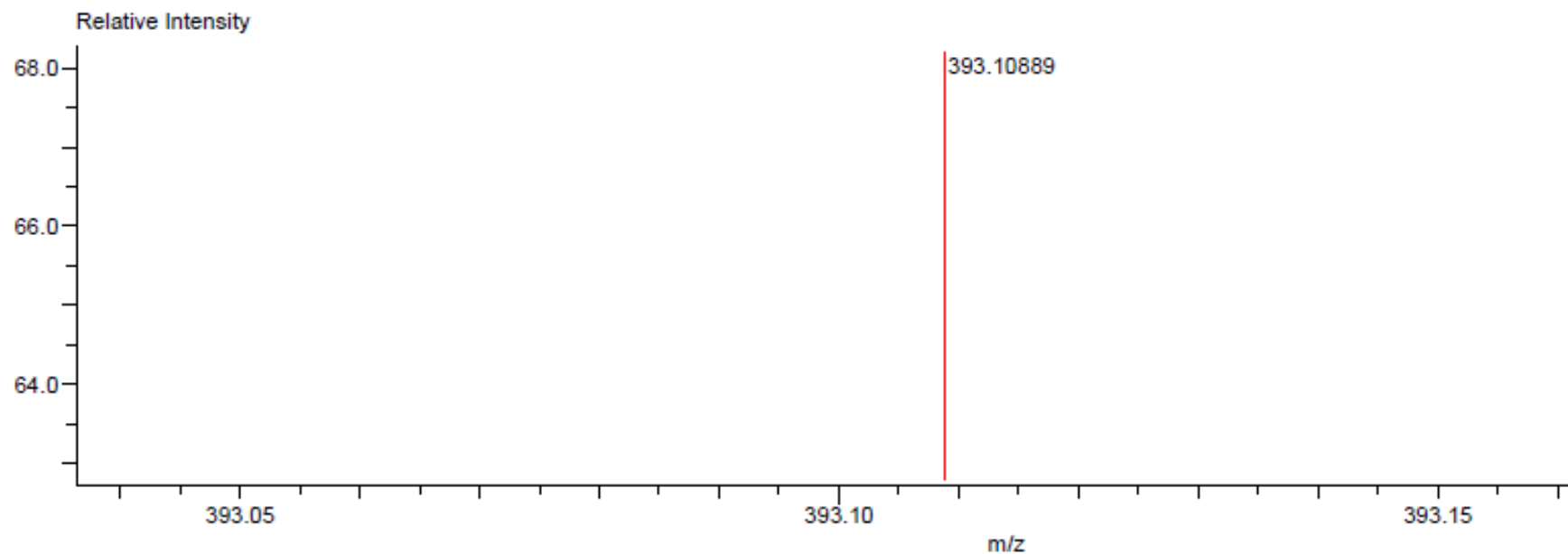


Figura 53. Propuesta de biosíntesis de 6-Nitrometildihidosanguinarina

5.1.1.16 Caracterización estructural de 6-nitrometildihidosanguinarina

La elucidación estructural de este nuevo producto natural se determinó por medio de la información obtenida en los espectros de RMN ¹H, ¹³C y espectros bidimensionales, así como IR y espectrometría de masas de alta resolución (DART+) con lo cual se determinó fórmula molecular C₂₁H₁₇N₂O₆ (m/z) calculada [M+H]: 393.10419 y (m/z) experimental [M+H]: 393.10889 (Figura 54).



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
393.10889	19815.75	393.10866	0.23	0.57	$^{12}\text{C}_{21}^{1}\text{H}_{17}^{14}\text{N}_2^{16}\text{O}_8$	14.5

Figura 54. Espectro de masas de alta resolución (DART+) de 6-Nitrometildihidrosanguinarina

Con el espectro de RMN ^1H (Figura 55) se determinó la identidad de un alcaloide de tipo benzo[c]fenantridina al observarse las señales típicas de los protones *orto* y *para* aromáticos (δ_{H} 7.70, 7.53, 7.52, 7.40, 7.12, 6.95 ppm). Asimismo, se encontraron las señales características para los grupos dioximetilenos encontrados en alcaloides derivados de dihidrosanguinarina (δ_{H} 6.11 y 6.08 ppm) y una señal simple en 2.71 ppm correspondiente a los protones del grupo N-metilo. En un desplazamiento químico de 5.21 ppm se observó un doblete de dobletes que corresponde al protón H-6. La multiplicidad de esta señal se debe a la presencia de un sustituyente metileno en la posición C-6, generando un sistema de protones ABX por su acoplamiento con los protones H-A (δ_{H} 4.33 ppm) y H-B (δ_{H} 4.26 ppm) del fragmento de nitrometano. La constante de acoplamiento de 11 Hz exhibida por H-6 sugiere que dicho hidrógeno adopta una conformación *anti* con relación a uno de los hidrógenos del grupo metileno ($J = 11.2$ Hz, H-B) y que, por consiguiente, el otro hidrógeno ($J = 4.4, 12$ Hz, H-A) adopta una conformación *gauche* con relación a H-6 (Figura 56).

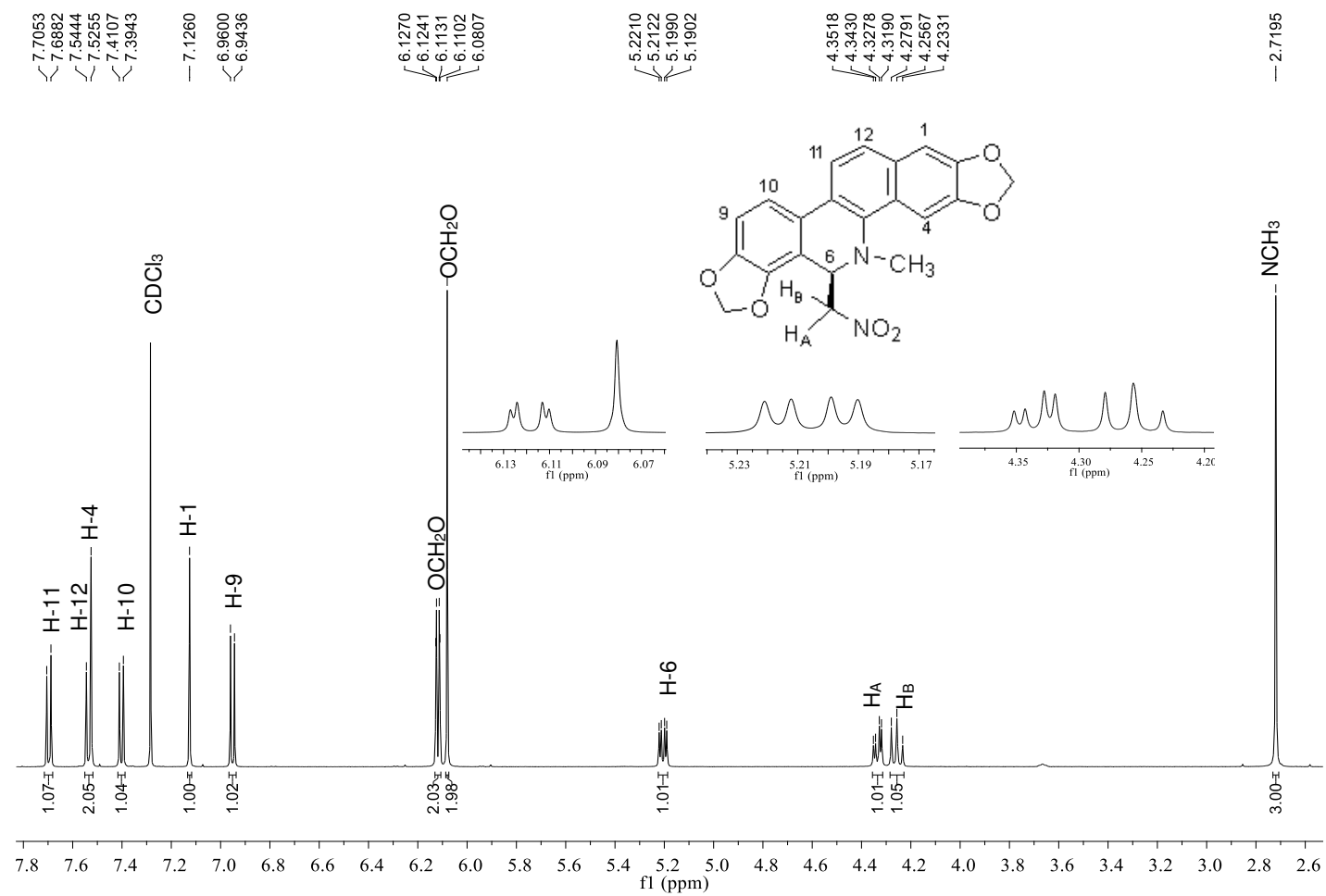


Figura 55. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de 6-Nitrometilidihidosanguinarina

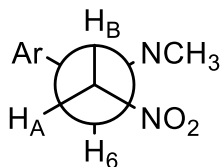


Figura 56. Proyección de Newman de la conformación más estable para el enlace σ entre los carbonos C-6 y C-16 en 6-nitrotetrahidroquinolina

Los resultados del análisis conformacional obtenidos en el programa PCMODEL v6 mostraron que el conformero más estable para 6-nitrotetrahidroquinolina es el que orienta a los sustituyentes nitro y N-metilo en una disposición sinclinal, quedando la orientación de ambos de forma *cis* diaxial, con una energía potencial de 76.66 kcal/mol (Figura 57).

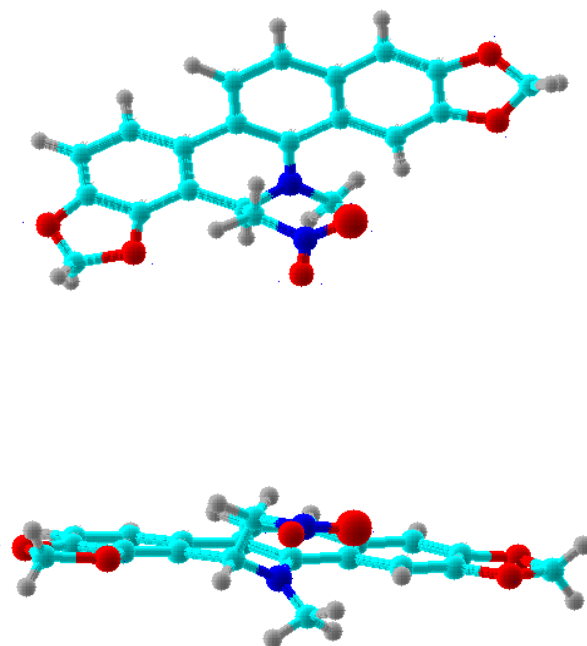


Figura 57. Confórmero más estable para 6-nitrotetrahidroquinolina con conformación sinclinal y orientación *cis* diaxial respecto al grupo nitro y N-metilo.

Adicionalmente, se dedujo la presencia de un grupo desprotector unido al metileno al observarse las señales dobles de dobles con desplazamientos químicos en campos más bajos de lo habitual. Lo anterior se correlacionó con el espectro de RMN ^{13}C (Figura 58), observándose una señal en δ_c 75.7 ppm que inicialmente se atribuyó a un grupo hidroxilo; sin embargo, al comparar con la literatura se observa una diferencia considerable con los desplazamientos químicos en el espectro de RMN ^1H para el compuesto 6-hidroximetildihidrosanguinarina (Tabla 7).

Tabla 8. Comparación de datos espectroscópicos de RMN ^1H entre 6-nitrometildihidrosanguira y 6-hidroximetildihidrosanguinarina

Asignación	RMN ^1H experimental (500 MHz, CDCl_3) δ ppm	RMN ^1H literatura (300 MHz, CDCl_3) δ ppm [94]
H-6	5.21 (dd, 1H, $J = 4.4, 10.75$ Hz)	3.89 (1H, m)
H-A	4.33 (dd, 1H, $J = 4.4, 12$ Hz)	
H-B	4.26 (dd, 1H, $J = 11.5$ Hz)	3.41 (2H, m)

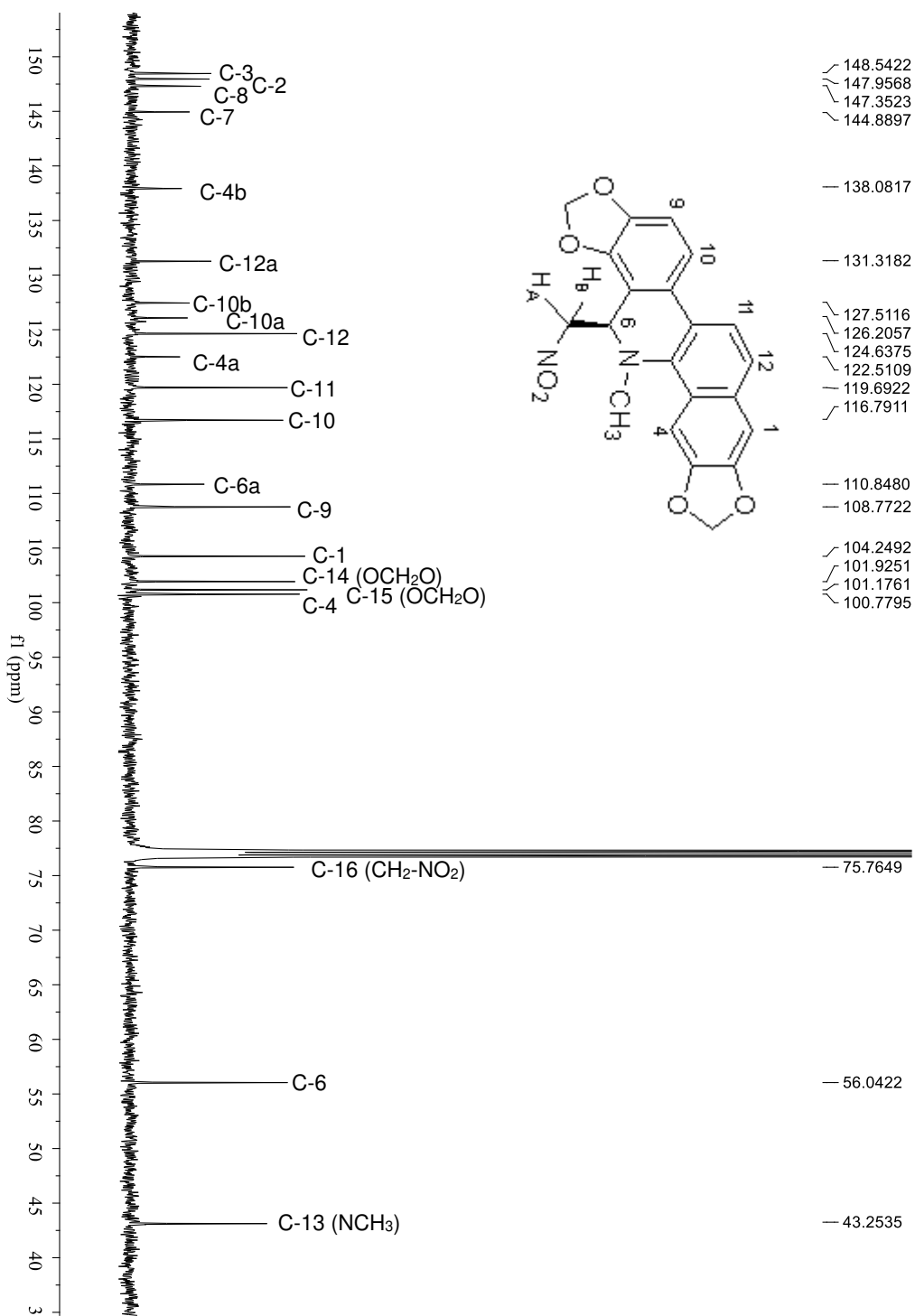


Figura 58. Espectro de RMN ¹³C (500 MHz, CDCl₃) de 6-Nitroimididinosanguinarina

Considerando la información anterior, se optó por realizar un espectro de infrarrojo (FTIR) para identificar grupos funcionales en la molécula. En el espectro no se observó la banda de absorción debida al estiramiento del enlace O–H (aproximadamente 3200 cm^{-1}), pero se observaron las bandas características del grupo nitro en 1549 (estiramiento asimétrico de C–NO₂) y 1451 cm^{-1} (estiramiento simétrico de C–NO₂). (Figura **59**).

Así, lo observado en el espectro de FTIR permitió establecer la presencia de un grupo nitro en lugar de un grupo hidroxilo. La comparación de los datos espectroscópicos experimentales con lo reportado en la literatura por Romo y cols. permitió confirmar la presencia del compuesto denominado 6-nitrometildihidrosanguinarina, previamente obtenido por semisíntesis [89]. (Tabla **8**). Por consiguiente, el presente compuesto se considera un nuevo producto natural al no encontrarse reportado como metabolito secundario obtenido a partir de alguna otra especie vegetal.

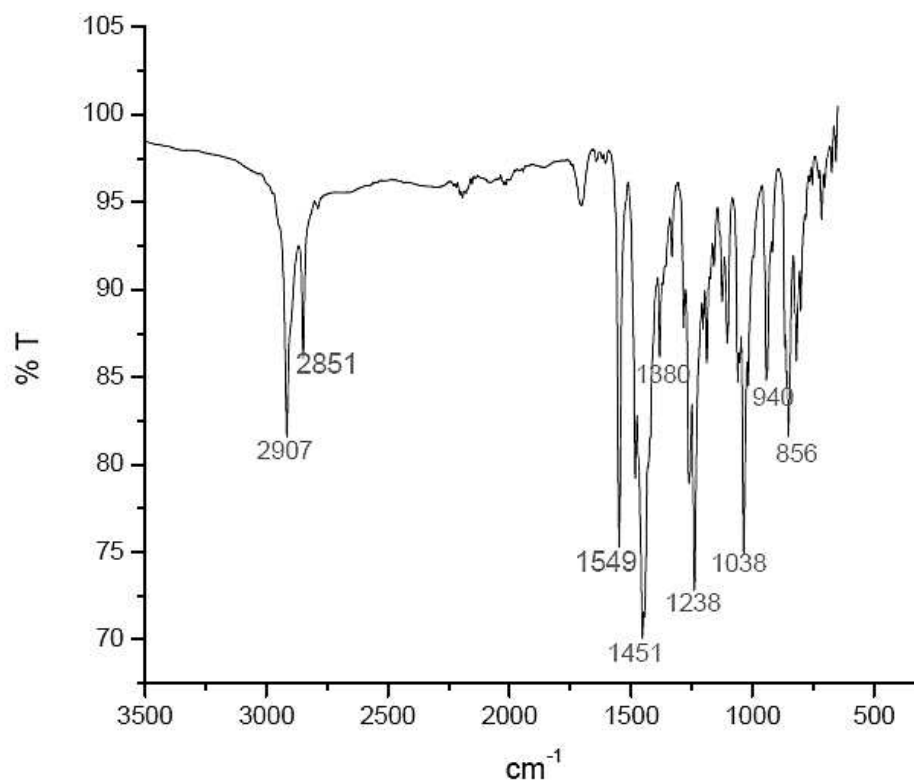


Figura 59. Espectro de infrarrojo (FTIR) de 6-Nitrometildihidrosanguinarina

Tabla 9. Comparación de datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C de 6-nitrometildihidrosanguinarina

Asignación	RMN ^1H experimental (500 MHz, CDCl_3) δ ppm	RMN ^1H literatura (300 MHz, CDCl_3) δ ppm [89]	RMN ^{13}C experimental (300 MHz, CDCl_3) δ ppm	RMN ^{13}C literatura (75 MHz, CDCl_3) δ ppm [89]
1	7.12 (s, 1H)	7.10 (s, 1H)	104.25	104.3
2	-	-	147.95	148.1
3	-	-	148.54	148.5
4	7.52 (s, 1H)	7.50 (s, 1H)	100.78	100.9
4a	-	-	122.51	122.6
4b	-	-	138.08	138.0
5 (N)	-	-	-	-
	5.21	5.17		
6	(dd, 1H, $J = 4.4, 11.0$ Hz)	(dd, $J = 10.8, 4.5$ Hz)	56.06	56.1
6a	-	-	110.85	110.9
7	-	-	144.88	145.3
8	-	-	147.35	147.3
	6.95	6.92		
9	(d, 1H, $J = 8.2$ Hz)	(d, $J = 8.1$ Hz)	108.77	108.9
	7.40	7.38		
10	(d, 1H, $J = 8.2$ Hz)	(d, $J = 8.1$ Hz)	116.79	116.8
10a	-	-	126.20	126.2
10b	-	-	127.51	127.3
	7.70	7.67		
11	(d, 1H, $J = 8.5$ Hz)	(d, $J = 8.7$ Hz, 1H)	119.69	119.8
	7.53	7.52		
12	(d, 1H, $J = 9.45$ Hz)	(d, $J = 7.8$ Hz)	124.64	124.7
12a	-	-	131.32	131.4
	6.11	6.10		
14 OCH_2O	(d, 2H, $J = 1.16$ Hz) (d, 2H, $J = 1.16$ Hz)	(s, 1H) 6.09 (s, 1H)	101.92	102.0
15 OCH_2O	6.08 (s, 2H)	6.06 (br s, 2H)	101.18	101.3
	4.33	4.32		
H-A	(dd, 1H, $J = 4.4, 12.0$ Hz)	(dd, $J = 12.0, 4.5$ Hz)	-	-
	4.26	4.25		
H-B	(dd, 1H, $J = 11.2,$ 11.2 Hz)	(dd, $J = 11.4, 11.1$ Hz)	-	-
13 (NCH_3)	2.71 (s, 3H)	2.69 (s, 3H)	43.25	43.2
16 (CH_2 - NO_2)	-	-	75.76	75.8

El espectro HMBC (Figura 61) proporcionó las siguientes correlaciones clave a dos y tres enlaces de distancia: 3J : C-4b/H-6 (δ_H 5.21 ppm), 3J : C-7/H-6 (δ_H 5.21 ppm) y 3J : C-10a/H-6 (δ_H 5.21 ppm), tratándose de los carbonos aromáticos con hibridación sp. Adicionalmente, las correlaciones 2J : CH₂NO₂/H-6 (δ_H 5.21 ppm) y 3J : N-CH₃/H-6 (δ_H 5.21 ppm) indican que la estructura de benzo[c]fenantridina se encuentra sustituida en la posición 6 con un nitrometileno. Finalmente, las correlaciones 3J : C-7/OCH₂O (δ_H 6.12 y 6.11 ppm) y 3J : C-8/OCH₂O (δ_H 6.12 y 6.11 ppm) demuestran la presencia de grupo dioximetileno del anillo D y las correlaciones para el dioximetileno del anillo A entre 3J : C-2/OCH₂O (δ_H 6.08 ppm) y 3J : C-3/OCH₂O (δ_H 6.08 ppm) (Figura 60) (Tabla 9).

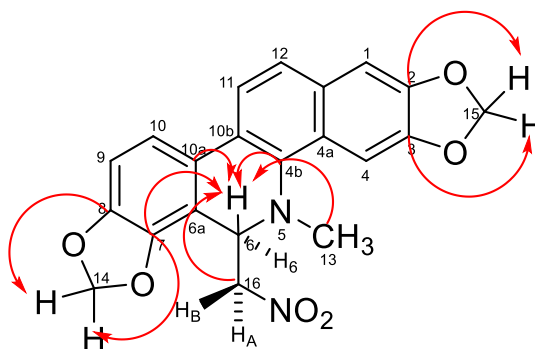


Figura 60. Correlaciones HMBC para 6-nitrometildihydrosanguinarina

Tabla 10. Correlación de datos espectroscópicos bidimensionales (HMBC y NOESY) del compuesto 6-nitrometildihidrosanguinarina

Asignación	δ_H (m, J)	δ_C	HMBC	NOESY
1	7.12 (s)	104.25		H-12
2	-	147.96	15 OCH ₂ O	
3	-	148.54	15 OCH ₂ O	
4	7.52 (s)	100.78	N-CH ₃	NCH ₃
4a	-	122.51		
4b	-	138.08		
6	5.21 (dd, J = 4.4, 11.0 Hz)	56.04	H-A, H-B	H-A, H-B
6a	-	110.85	H-6	
7	-	144.89	H-6, 14 OCH ₂ O	
8	-	147.35	14 OCH ₂ O	
9	6.95 (d, J = 8.2 Hz)	108.77		H-10
10	7.40 (d, J = 8.2 Hz)	116.79		H-9, H-11
10a	-	126.20	H-6	
10b	-	127.51		
11	7.70 (d, J = 8.5 Hz)	119.69		H-10
12	7.53 (d, J = 9.45 Hz)	124.64		H-1
12a	-	131.32		
14 OCH ₂ O	6.12 (d, J = 1.16 Hz)	101.92		
15 OCH ₂ O	6.11 (d, J = 1.16 Hz)	101.18		
H-A	6.08 (s) 4.33 (dd, J = 4.4, 12.0 Hz)	-		H-6
H-B	4.26 (dd, J = 11.2 Hz)	-		H6
13 (NCH ₃)	2.71 (s)	43.25	H-6	H-4
16 (CH ₂ -NO ₂)	-	75.76	H-6	

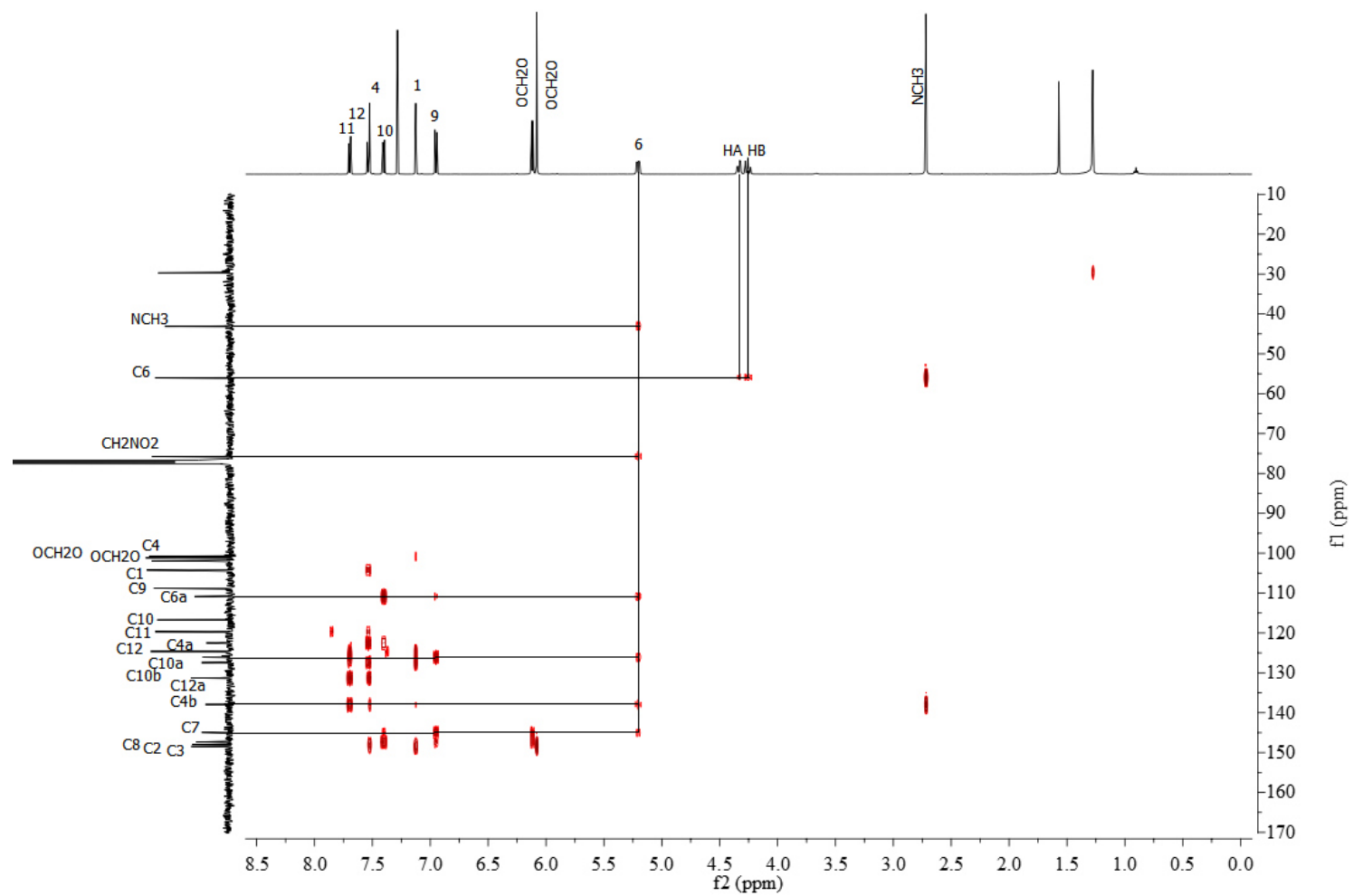


Figura 61. Espectro de RMN HMBC (500 MHz, CDCl₃) de 6-Nitrometildihidrosanguinarina

El espectro NOESY (Figura 63) confirma la estructura propuesta, ya que se aprecia la correlación espacial mutua entre los protones del grupo N-metilo (δ_H 2.71 ppm) con el protón en posición 4 (δ_H 7.52 ppm), lo que indica que están orientados hacia el mismo plano. Igualmente se confirma la interacción espacial entre H-6 (δ_H 5.21 ppm) y los hidrógenos del metileno unido al grupo nitro HA (δ_H 4.33 ppm) y HB (δ_H 4.26 ppm). Además, se observa correlación entre los hidrógenos *orto* aromáticos: H-10 (δ_H 7.40 ppm) con H-9 (δ_H 6.95 ppm) y H-11 (δ_H 7.70 ppm) y la correlación H-12 (δ_H 7.53 ppm) con H-1 (δ_H 7.12 ppm) (Figura 62) (Tabla 9).

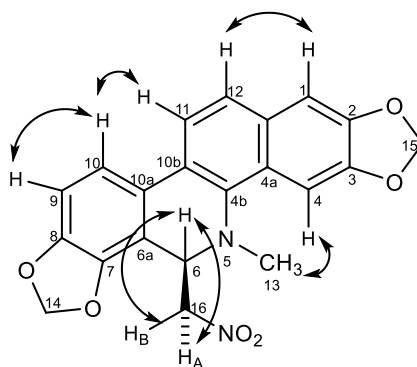


Figura 62. Correlaciones NOESY para 6-nitrometildihidrosanguinarina

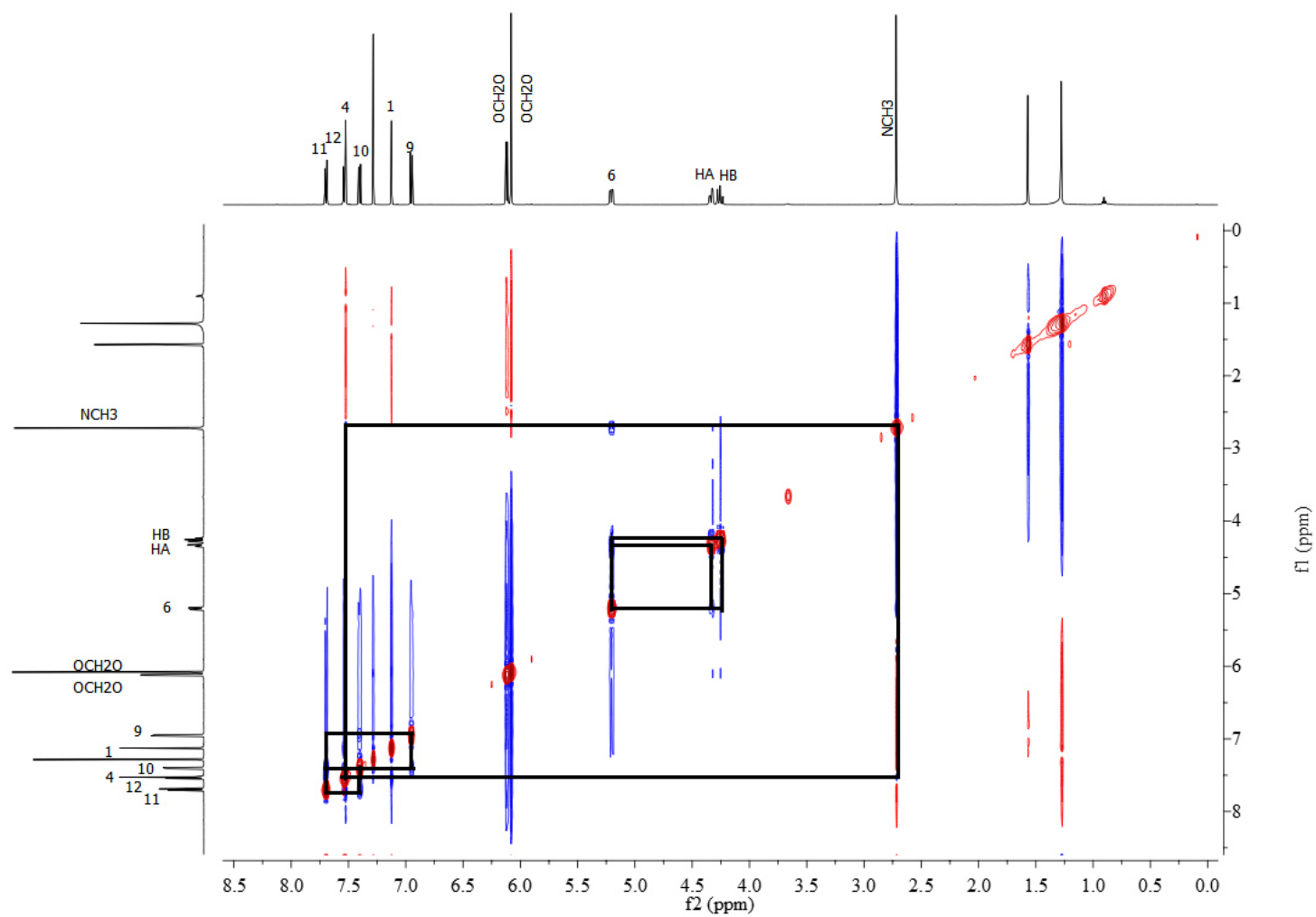


Figura 63. Espectro de RMN NOESY (500 MHz, CDCl_3) de 6-Nitrometildihidrosanguinarina

El espectro COSY (Figura **64**) muestra las correlaciones entre los protones *orto* aromáticos de las posiciones 11 con 12 (δ_{H} 7.70, 7.53 ppm) y 10 con 9 (δ_{H} 7.40, 6.95 ppm) (Figura **65**). Asimismo, se confirma la estructura de un alcaloide de tipo benzo[*c*]fenantridina con un sustituyente metileno en la posición C-6 al correlacionar mutuamente los protones HA (δ_{H} 4.33 ppm) y HB (δ_{H} 4.26 ppm) con el protón H6 (δ_{H} 5.21 ppm) (Figura **66**).

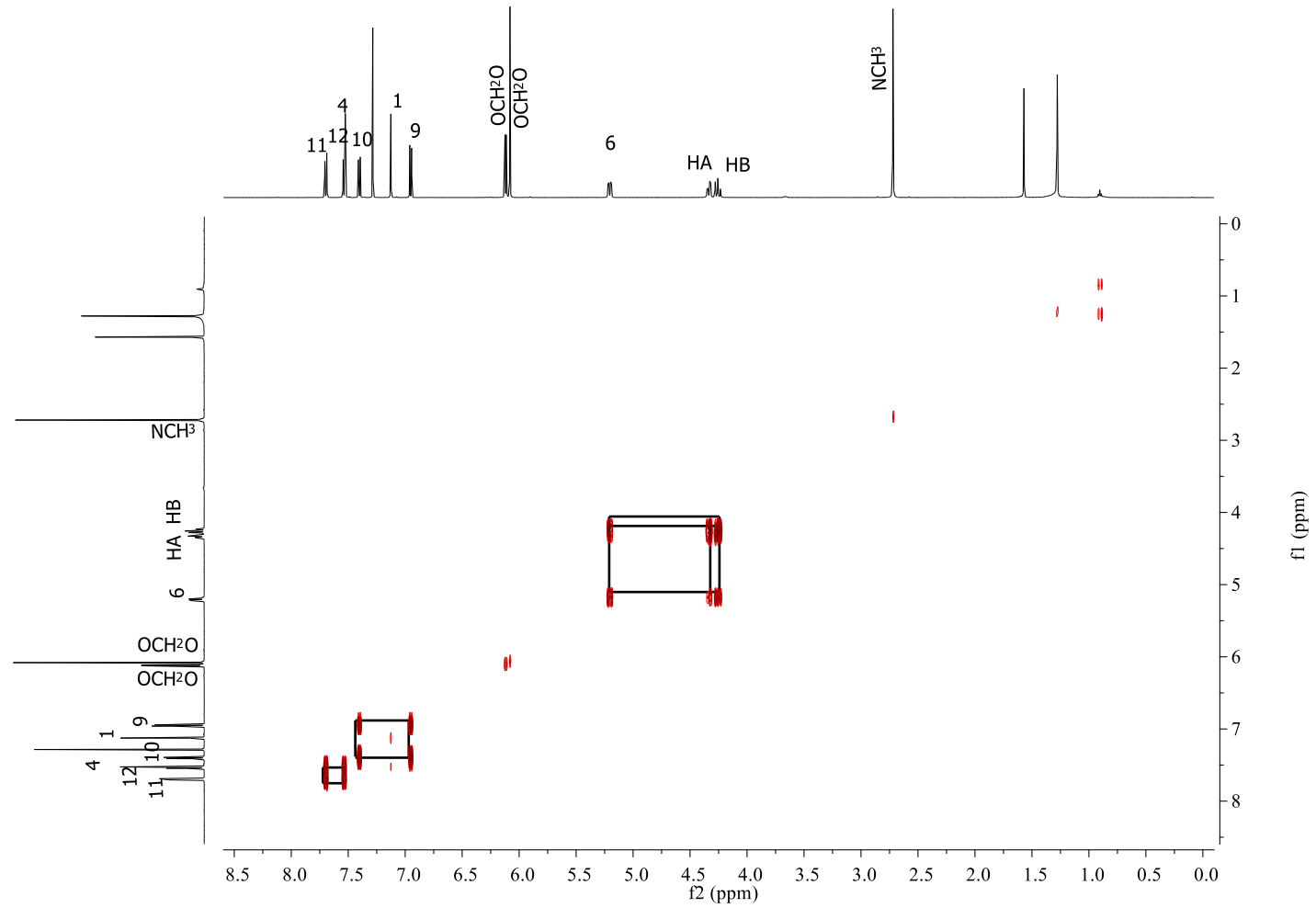


Figura 64. Espectro COSY (500 MHz, CDCl₃) de 6-Nitrometildihidrosanguinarina

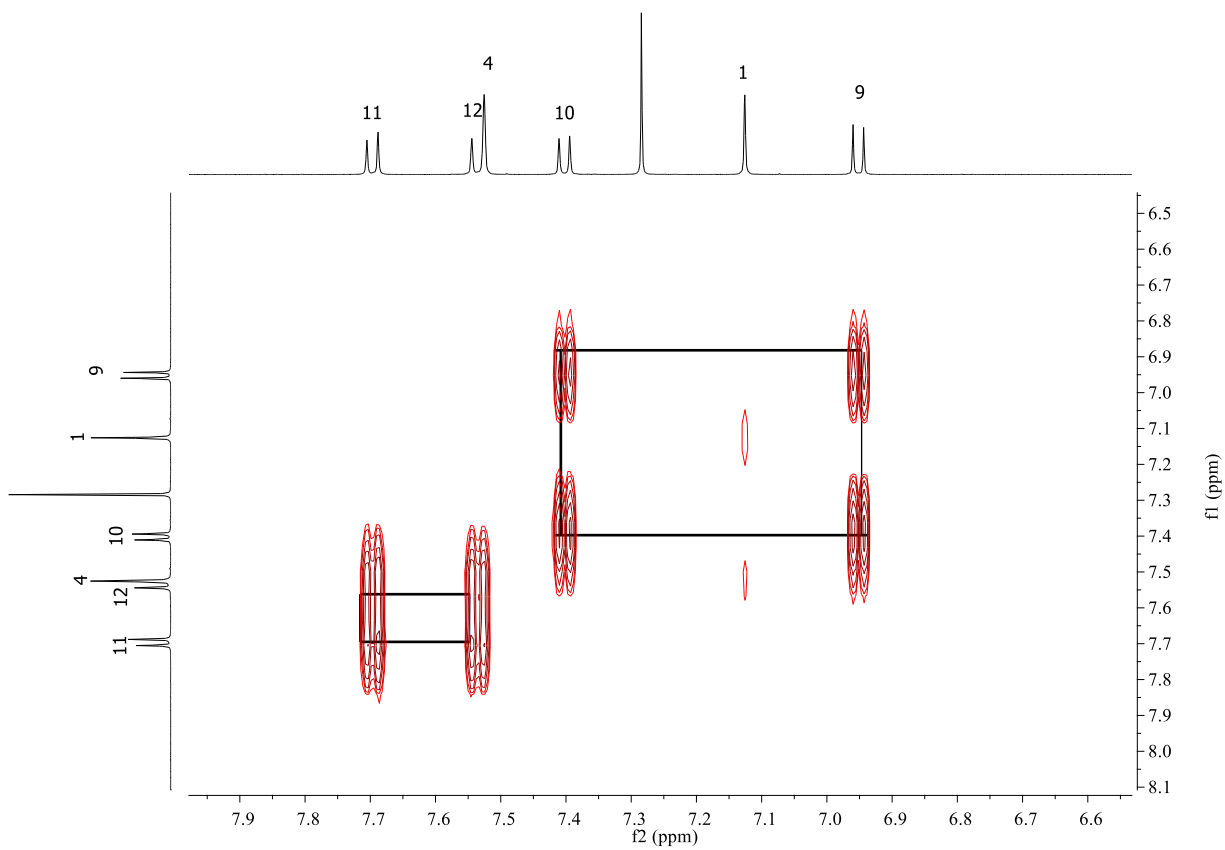


Figura 65. Ampliación del espectro COSY para las correlaciones entre los protones *orto* aromáticos

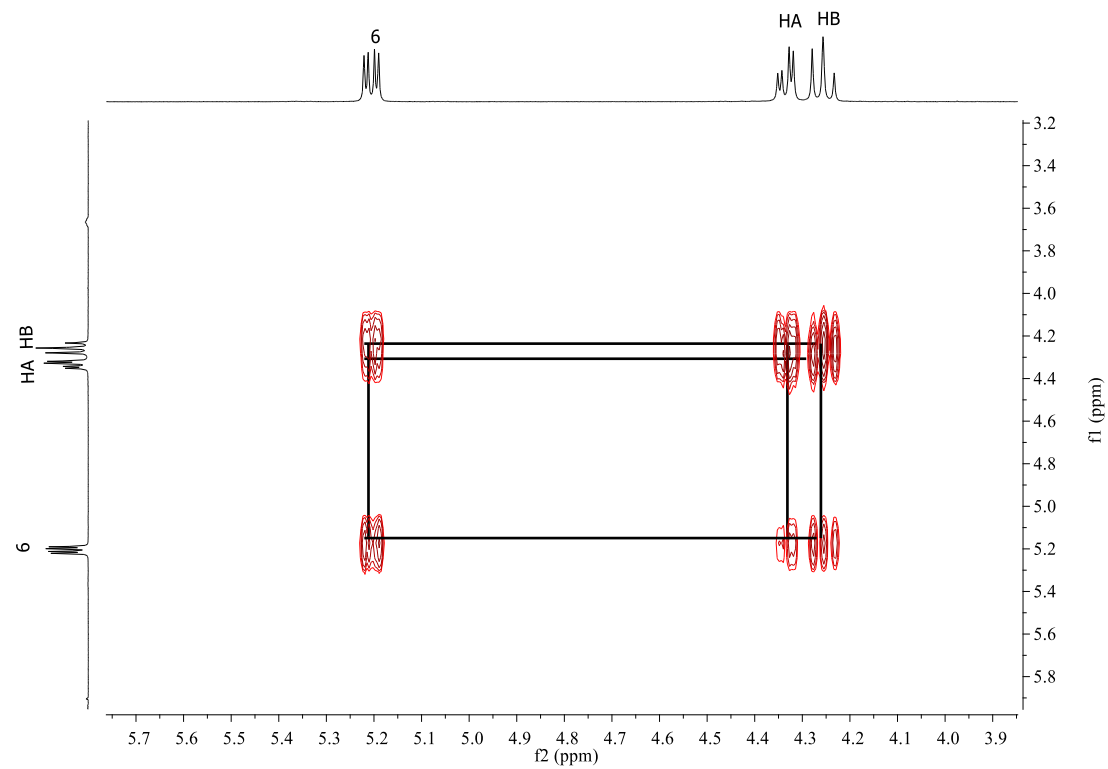


Figura 66. Ampliación del espectro COSY para la correlación entre los protones H6, HA y HB en 6-Nitrometildihidrosanguinarina

En el espectro HSQC (Figura **67**) se observa la correlación de los carbonos con los hidrógenos unidos a ellos, resaltando la correlación de los protones H-A (δ_{H} 4.33 ppm) y H-B (δ_{H} 4.26 ppm) con el metileno unido al grupo nitro (δ_{C} 75.76 ppm) y vecino a la posición H6. Además, se observa la correlación de los protones con su carbono correspondiente de los dos grupos OCH₂O, destacando que las correlaciones de los protones en δ_{H} 6.12 ppm (d, $J = 1.16$ Hz) y 6.11 ppm (d, $J = 1.16$ Hz) con el carbono en δ_{C} 101.92 ppm pertenecen al dioximetileno del anillo D y las correlaciones entre los protones en δ_{H} 6.08 ppm con el carbono en δ_{C} 101.18 ppm corresponden al dioximetileno del anillo A. También se presentan las correlaciones de los carbonos aromáticos sp² con los protones de las posiciones 11 (δ_{H} 7.70 ppm; δ_{C} 119.69 ppm), 12 (δ_{H} 7.53 ppm; δ_{C} 124.64 ppm), 4 (δ_{H} 7.54 ppm; δ_{C} 100.78 ppm), 10 (δ_{H} 7.40 ppm; δ_{C} 116.79 ppm), 1 (δ_{H} 7.12 ppm; δ_{C} 104.25 ppm) y 9 (δ_{H} 6.95 ppm; δ_{C} 108.77 ppm) (Figura **68**).

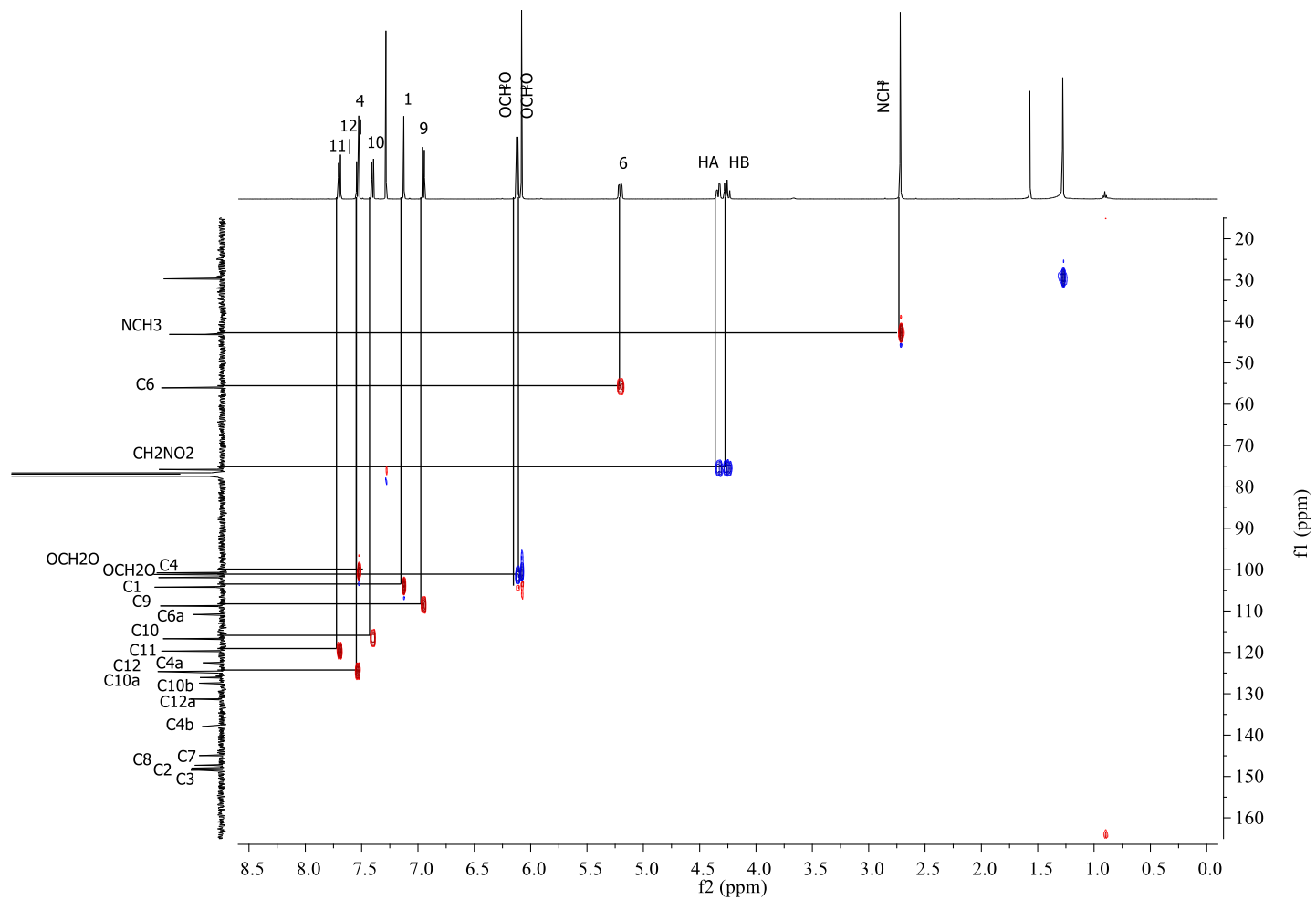


Figura 67. Espectro de RMN HSQC (500 MHz, CDCl₃) de 6-Nitrometildihidrosanguinarina

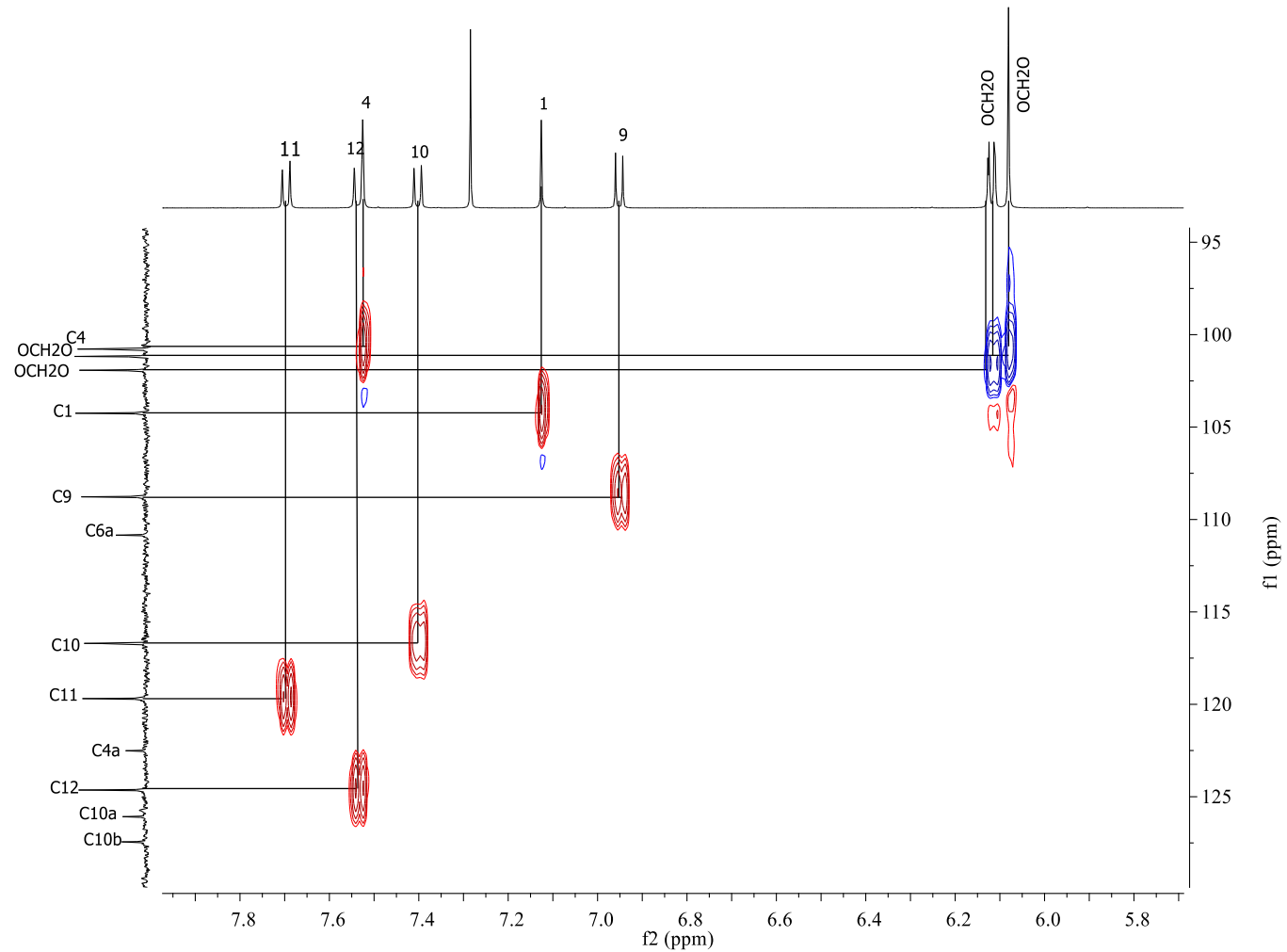


Figura 68. Correlaciones HSQC de los grupos dioximetileno y protones *orto* aromáticos con sus respectivos carbonos en 6-Nitrometildihydroanguinarina

5.1.1.17 Aislamiento de β -sitosterol

A partir de las fracciones E y F de la fase metanólica-acuosa de hojas, se obtuvo un sólido color beige el cual fue lavado con hexano. El sobrenadante del lavado con hexano se dejó secar por evaporación a temperatura ambiente y aparecieron cristales en forma de aguja que al analizar por TLC mostraba diferentes compuestos que al revelarse con reactivo de Caín (manchas color magenta-rojo) lo que sugería la presencia de triterpenos o esteroides. Por lo anterior, la muestra se procesó por CC, usando gel de sílice como fase estacionaria y mezcla de hexano/éter etílico, iniciando con una polaridad de 85:15 y con cambios graduales del 5% hasta 100% éter etílico. En las subfracciones 85-120 (70:30) se obtuvieron cristales incoloros en forma de aguja por evaporación lenta. El espectro de RMN ^1H exhibió señales características del β -sitosterol (Figura 70), por lo que se compararon los datos espectroscopios experimentales con los reportados para β -sitosterol y se confirmó por comparación en TLC con una muestra de referencia previamente caracterizada en el grupo de investigación. Aunque es un fitocompuesto comúnmente encontrado en especies vegetales, es la primera vez que se aísla de *B. latisejala* (Figura 69).

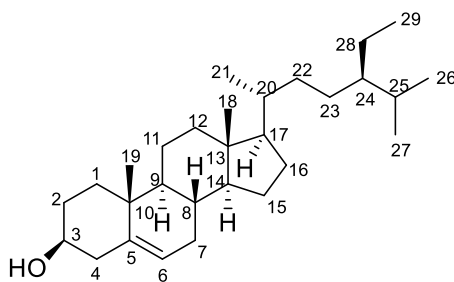


Figura 69. Caracterización de β -sitosterol

Cristales incoloros

Soluble en CHCl_3

Rendimiento: Tallos: ND Hojas: ND

TLC: Hex/éter etílico; 80:20 Rf: 0.65

No revela ($\text{UV}_{254\text{nm}}$) No revela ($\text{UV}_{365\text{nm}}$)

Reactivo de Caín: rojo-magenta

$\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ PM: 414 g/mol P.f: 135°C Log P: 10.44

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{ppm} : 5.35 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz, H-6), 3.52 (m, 1H, H-3), 2.26 (m, 2H, H-28), 2.01 (m, 2H, H-4), 1.85 (m, 2H, H-7), 1.01 (s, 3H, H-19), 0.92 (d, 3H, $J = 8.7$ Hz, H-29), 0.85 (t, 3H, $J = 6.4$ Hz, H-21), 0.83 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz, H-27), 0.81 (d, 3H, $J = 8.6$ Hz, H-26), 0.68 (s, 3H, H-18) (Figura 70).

5.1.1.18 Caracterización estructural de β -sitosterol

En el espectro de RMN ^1H (Figura 70) se observan las señales características de estructuras relacionadas con el colesterol. Iniciando a campo alto, se tiene un patrón de señales complejas (δ_{H} 2.4-0.7 ppm), donde destacan seis señales de mayor intensidad atribuidas a los grupos metilo (δ_{H} 0.68, 0.81, 0.83, 0.85, 0.92, 1.01 ppm). También se observa una señal multiplete (δ_{H} 3.52 ppm) que corresponde protón en la posición 3, geminal al grupo hidroxilo; además de una señal doble que se asigna al protón vinílico en posición 6 (δ_{H} 5.35 ppm). La comparación de estos datos espectroscópicos con la literatura permitió establecer la identidad del compuesto como β -sitosterol (Tabla 10).

Tabla 11. Comparación de datos espectroscópicos del β -sitosterol.

Asignación	RMN ^1H experimental δ ppm (m, I, J_{Hz})	RMN ^1H literatura δ ppm (m, I, J_{Hz}) [68][95]
3	3.52 (m)	3.53 (m)
6	5.35 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz)	5.36 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz)
19	1.01 (s, 3H)	1.01 (s, 3H)
21	0.85 (t, 3H)	0.84 (t, 3H)
27	0.83 (d, 3H, $J = 8.5$ Hz)	0.84 (d, 3H, $J = 7.6$ Hz)
26	0.81 (d, 3H, $J = 8.6$ Hz)	0.82 (d, 3H, $J = 8.4$ Hz)
18	0.68 (s, 3H)	0.68 (s, 3H)
29	1.02 (s, 3H)	1.01 (s, 3H)

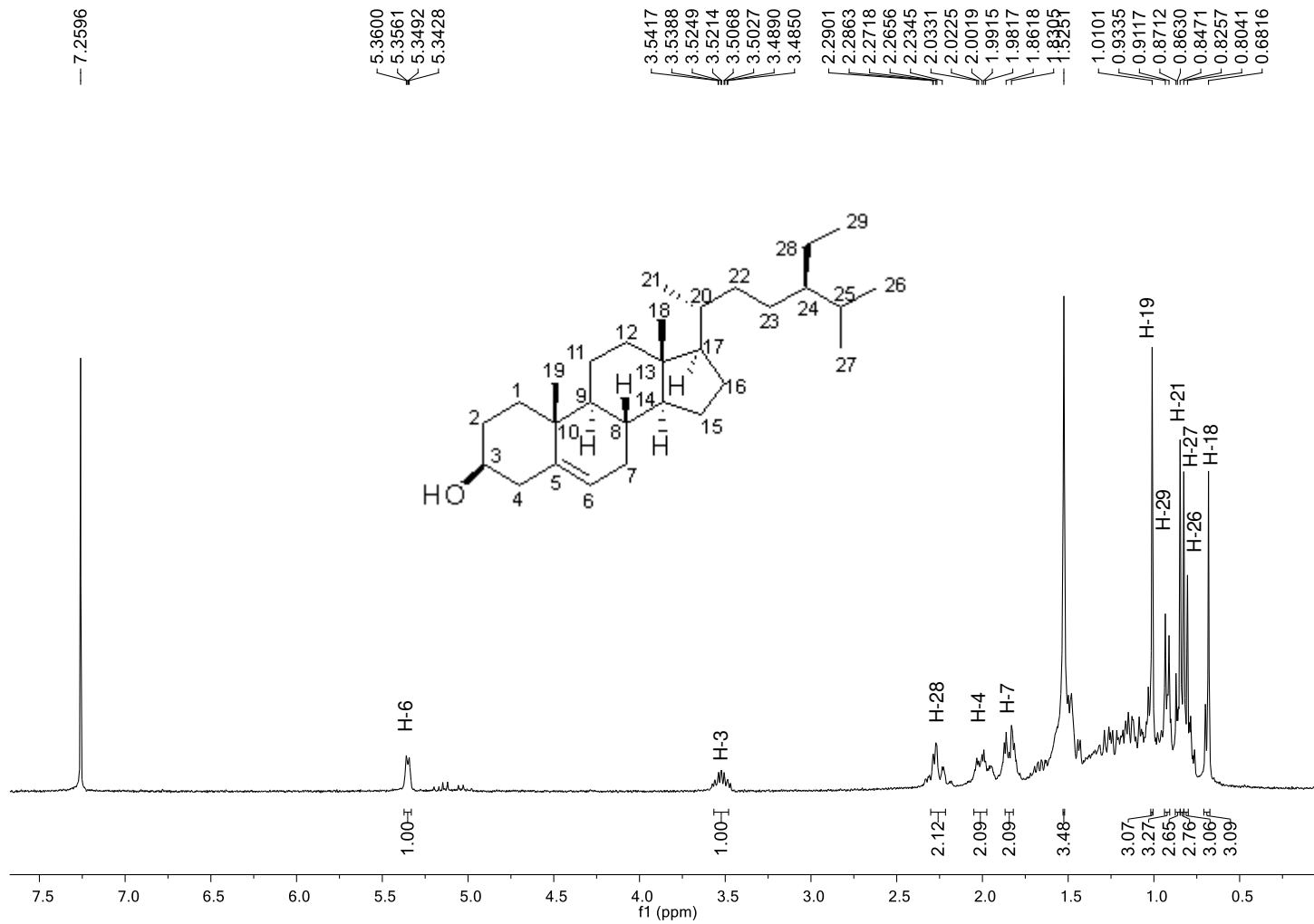


Figura 70. Espectro de RMN 1H (400 MHz, CDCl₃) de β-sitosterol

5.2 Actividad antimicobacteriana

Se evaluaron los extractos orgánicos y los productos naturales obtenidos a partir de los tallos y hojas de *B. latisepala* S. Wats mediante el método Alamar Azul [69]. Se emplearon dos cepas de *M. tuberculosis*, la H37Rv sensible a los fármacos de primera línea y la G122 resistente a isoniazida, rifampicina y etambutol (Tabla 11).

Tabla 12. Actividad antimicobacteriana de los extractos y productos naturales de *B. latisepala*

Compuesto	CMI ($\mu\text{g/mL}$) contra a <i>M. tuberculosis</i>	
	H37Rv	G122
Extracto orgánico de hojas	> 200	>200
Extracto orgánico de tallos	200	> 200
Oxisanguinarina	> 50	> 50
6-Acetonildihidosanguinarina	> 50	> 50
6-Metoxidihidosanguinarina	50	50
6-Metoxidihidroqueleritrina	12.5	25
Norsanguinarina	> 50	> 50
BLH14	50	50
6-nitrometildihidosanguinarina	>50	ND
β -sitosterol	> 50	> 50
Isoniazida	0.048	0.19
Rifampicina	0.048	0.097
Etambutol	3.12	6.25

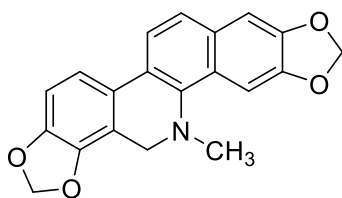
CMI: Concentración mínima inhibitoria. ND: No determinado

Los resultados de la tabla anterior (Tabla 11) muestran que todas las muestras evaluadas presentan actividad contra la cepa de *M. tuberculosis* sensible (H37Rv) a excepción del extracto orgánico de hojas. Los productos naturales que destacaron por ser más activos fueron 6-metoxidihidroqueleritrina y el compuesto

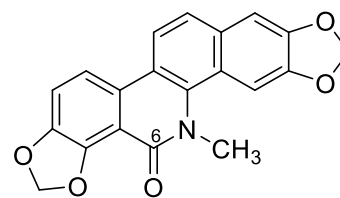
BLH14, los cuales exhibieron concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 12.5 µg/mL y 50 µg/mL, respectivamente frente a H37Rv. Para el aislado clínico G122, 6-metoxidihidroqueleritrina mostró una CMI de 25 µg/mL y el compuesto BLH14 de 50 µg/mL. El compuesto 6-metoxidihidrosanguinarina mostró una CMI de 50 µg/mL en ambas cepas. El resto de las muestras ensayadas mostraron CMIs entre 50 µg/mL y > 100 µg/mL.

Es posible observar una correlación de estructura-actividad de dichos alcaloides naturales, tomando como base la estructura de dihidrosanguinarina (cLogP = 4.25), evaluada anteriormente contra *M. tuberculosis* por Hernández-Almanza (CMI > 50 µg/mL para H37Rv y G122) [31]. Se observó que para el caso de oxisanguinarina, al exhibir un grupo carbonilo en la posición C-6, no se incrementa la actividad; sin embargo, al mostrar un grupo metoxilo en la misma posición (6-metoxidihidrosanguinarina) se observa una disminución en la actividad antimicobacteriana (CMI 50 µg/mL, contra H37Rv y G122). Es importante notar que la actividad biológica se incrementó con el remplazo del grupo dioximetileno de las posiciones 7 y 8 por grupos metoxilo, ya que el alcaloide 6-metoxidihidroqueleritrina exhibió CMIs de 12.5 µg/mL contra H37Rv y 25 µg/mL contra G122. Este incremento en la actividad antimicobacteriana se puede correlacionar con el incremento en lipofilicidad de acuerdo con el siguiente orden: dihidrosanguinarina < 6-metoxidihidrosanguinarina < 6-metoxidihidroqueleritrina (Figura 71). Para el alcaloide 6-acetonildihidrosanguinarina la diferencia estructural respecto a los alcaloides

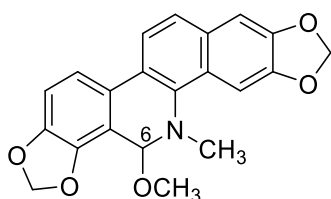
anteriores radica en el sustituyente metilcetona en la posición C-6, conservando la base estructural de dihidrosanguinarina (Figura 71).



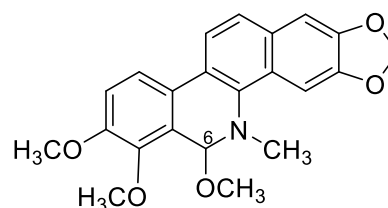
Dihydrosanguinarina
 $c\text{LogP} = 4.25$
 $\text{CMI}_{\text{H37Rv}} > 50 \mu\text{g/mL}$
 $\text{CMI}_{\text{G122}} > 50 \mu\text{g/mL}$



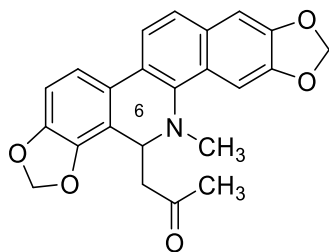
Oxisanguinarina
 $c\text{LogP} = 3.27$
 $\text{CMI}_{\text{H37Rv}} > 50 \mu\text{g/mL}$
 $\text{CMI}_{\text{G122}} > 50 \mu\text{g/mL}$



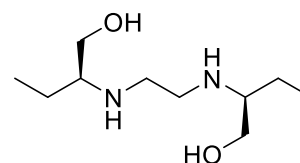
6-Metoxidihydrosanguinarina
 $c\text{LogP} = 4.54$
 $\text{CMI}_{\text{H37Rv}} = 50 \mu\text{g/mL}$
 $\text{CMI}_{\text{G122}} = 50 \mu\text{g/mL}$



6-Metoxidihidroquelertina
 $c\text{LogP} = 5.5$
 $\text{CMI}_{\text{H37Rv}} = 12.5 \mu\text{g/mL}$
 $\text{CMI}_{\text{G122}} = 25 \mu\text{g/mL}$



6-Acetonildihydrosanguinarina
 $c\text{LogP} = 4.3$
 $\text{CMI}_{\text{H37Rv}} > 50 \mu\text{g/mL}$
 $\text{CMI}_{\text{G122}} > 50 \mu\text{g/mL}$



Etambutol
 $c\text{LogP} = 0.06$
 $\text{CMI}_{\text{H37Rv}} = 3.12 \mu\text{g/mL}$
 $\text{CMI}_{\text{G122}} = 6.25 \mu\text{g/mL}$

Figura 71. Valores de CMI contra cepas de *M. tuberculosis* y lipofilicidad de alcaloides benzo[c]fenantridínicos y etambutol

Los alcaloides 6-metoxidihidroqueleritrina y 6-metoxidihidrosanguinarina se reportaron con anterioridad por Camacho-Corona y colaboradores describiendo CMI's contra *M. tuberculosis* H37Rv de 12 µg/mL y 50 µg/mL, respectivamente para cada compuesto [33]. Comparando estos resultados con los obtenidos en el presente proyecto de investigación se observó que los valores de CMI eran reproducibles para la cepa H37Rv (Figura 72).

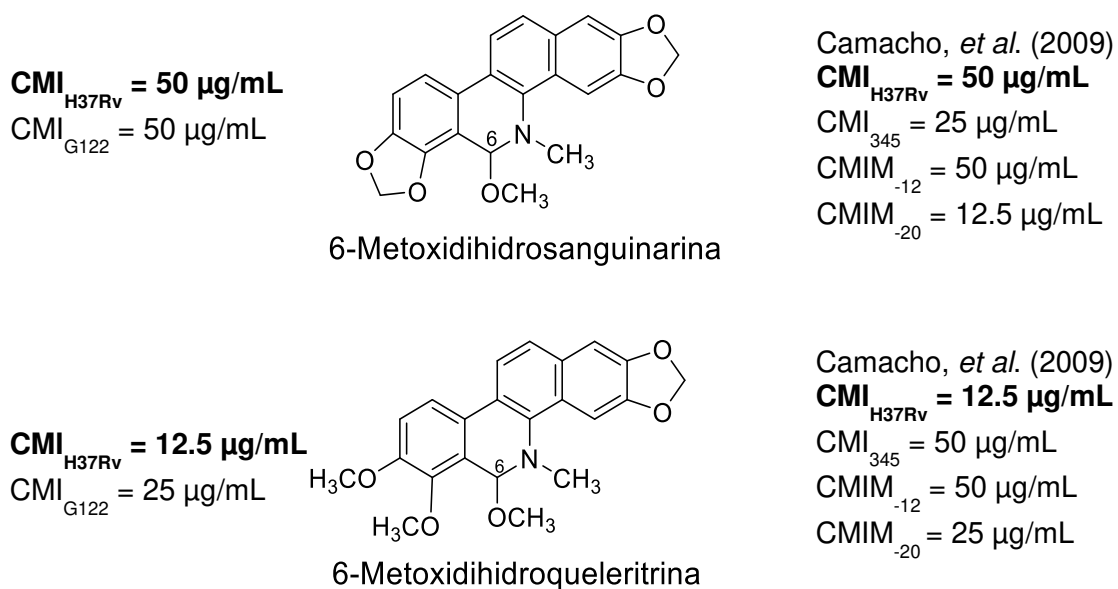


Figura 72. Actividad antimicobacteriana del trabajo presente y reportado para 6-metoxidihidrosanguinarina y 6-metoxidihidroqueleritrina

La comparación de 6-acetonildihidrosanguinarina, obtenido a partir de los tallos y hojas de *B. latisejala* (CMI_{H37Rv} >50 µg/mL y CMI_{G122} > 50 µg/mL), con su análogo 6-acetonildihidroqueleritrina (CMI_{H37Rv} > 50 µg/mL y CMI_{G122} > 50 µg/mL), obtenido a partir de las semillas de la misma especie [31], permitió deducir que la actividad no se ve favorecida al modificar la base estructural de los 6-acetonildihidroderivados de dihidrosanguinarina por dihidroqueleritrina. Lo

anterior puede ser debido a un impedimento estérico dado por los grupos metoxilo de las posiciones C-7 y C-8 de 6-acetonildihidroqueleritrina. En contraste, lo reportado por Luo y colaboradores [96] indica que la presencia de grupos metoxilo en el anillo D de un análogo de 6-acetonildihidroqueleritrina, el alcaloide 6-acetonildihidronitidina aislado de *Zanthoxylum capense*, no afecta la actividad antimicobacteriana, sino que depende de la posición que estos tengan. La presencia de grupos metoxilo en las posiciones C-8 y C-9 de 6-acetonildihidronitidina mejoró sus propiedades antimicobacterianas (CMI_{H37Ra} 6.2 µg/mL y CMI_{H37Rv} 12.5 µg/mL) en comparación con 6-acetonildihidroqueleritrina, cuya diferencia estructural radica en la posición de los grupos metoxilo (C-7 y C-8) (Figura 73).

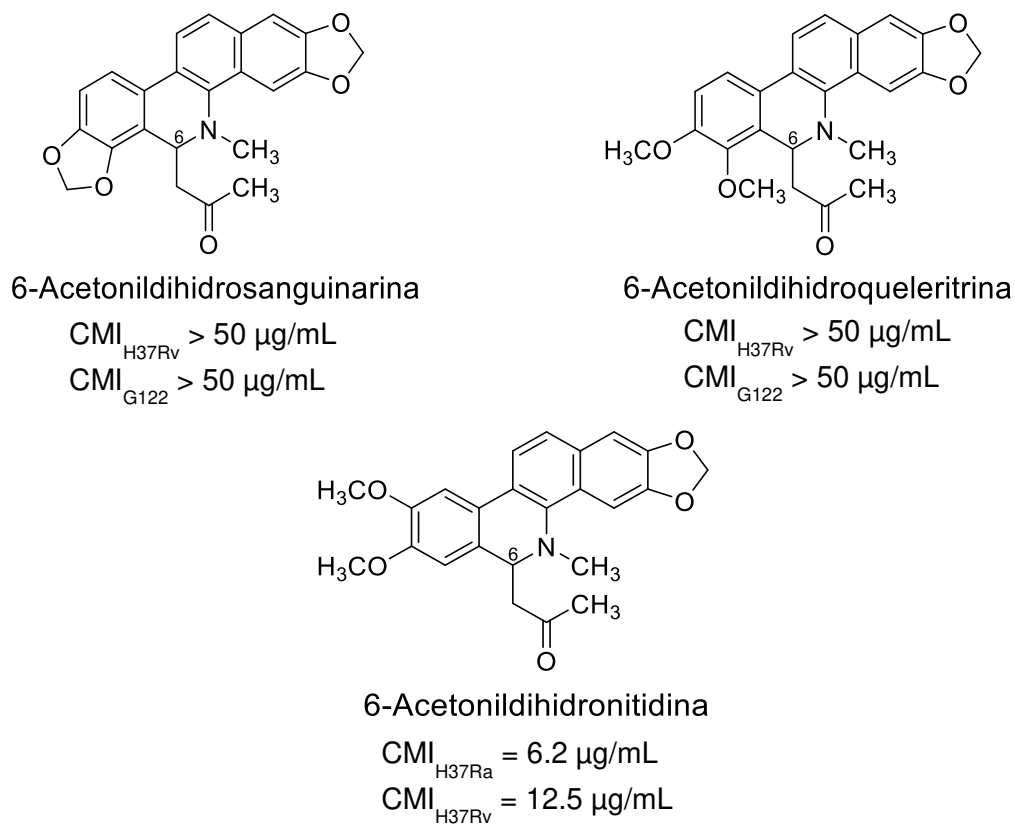


Figura 73. Actividad antimicobacteriana de 6-acetonildihidrobenzo[c]fenantridinas.

Asimismo, se compararon los alcaloides queleritrina ($\text{CMI}_{\text{H37Rv}}$ 12.5 $\mu\text{g/mL}$ y CMI_{G122} 6.2 $\mu\text{g/mL}$) y 12-metoxiqueleritrina ($\text{CMI}_{\text{H37Rv}}$ 12.5 $\mu\text{g/mL}$ y CMI_{G122} 12.5 $\mu\text{g/mL}$), compuestos con mayor actividad antimicobacteriana reportados previamente por Hernández-Almanza [31], lo que permitió deducir que la presencia del grupo iminio en los alcaloides cuaternarios de queleritrina es importante para exhibir buena actividad antimicobacteriana. Sin embargo, se observó que la incorporación de un grupo metoxilo en la posición C-12 tiene efecto decreciente en la actividad antimicobacteriana contra la cepa resistente G122, al reducirse la electrofilicidad del grupo iminio por efecto del grupo metoxilo (Figura 74).

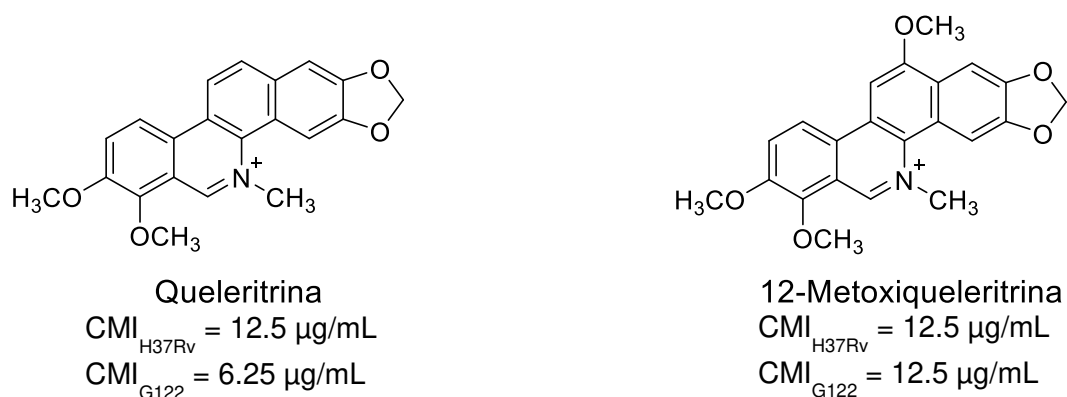


Figura 74. Alcaloides de *B. latisejala* S. Wats con mayor actividad antimicobacteriana

En resumen, la actividad antimicobacteriana contra *M. tuberculosis* sensible se favorece para 6-acetonildihidrobenzo[c]fenantridinas con grupos dioximetilenos en las posiciones C-2 y C-3 del anillo A y grupos metoxilo en las posiciones C-9

y C-10 del anillo D; así como, para las 6-metoxidihidrobenzo[c]fenantridinas con grupos metoxilo en las posiciones C-7 y C-8 del anillo D.

Adicional a lo reportado por Ishikawa y colaboradores [97] en un estudio de actividad antimicobacteriana de alcaloides benzo[c]fenantridínicos completamente aromatzados donde se establece un análisis de relación estructura-actividad destacando que la adición de un grupo metoxilo en las posiciones C-10 y C-12 en derivados cuaternarios de sanguinarina incrementan la actividad y se presenta mayor actividad cuando el anillo A presenta grupos dioximetileno.

Lo anterior concuerda con lo reportado por Tavares, *et al.* [98] donde se evaluó la actividad antimicrobiana de alcaloides benzo[c]fenantridínicos contra bacterias Gram positivas, Gram negativas (Gram + y Gram-) y levaduras, resultando que: 1) los grupos dioximetilenos en C-7 y C-8 favorecen la actividad antimicrobiana, (lo que demuestra que el tipo y posición de los sustituyentes en el anillo D influyen en la actividad), 2) los alcaloides cuaternarios presentan mayor actividad antimicrobiana que sus contrapartes reducidas, sugiriendo que el grupo iminio es determinante para la actividad y 3) sustituyentes dioximetilenos en C-2 y C-3 son importantes para la actividad.

5.3 Actividad citotóxica

Se realizó una evaluación de la actividad citotóxica de los compuestos 6-metoxidihidroqueleritrina, 6-acetonildihidrosanguinarina y BLH14, utilizando células inmortalizadas de queratinocitos (HACAT) y tres líneas celulares de cáncer: colorrectal (SW480), adenocarcinoma de mama (MCF7) y de próstata (PC3) con el método colorimétrico de Sulforrodamina B [71] a una concentración de 50 μ M. Los resultados se expresan en porcentaje de viabilidad celular para cada línea celular y se calculó el índice de selectividad para determinar la especificidad de la actividad citotóxica (Tabla 12).

Tabla 13. Porcentaje de viabilidad celular de los compuestos puros frente a líneas celulares.

Compuesto	Líneas celulares			
	SW480	MCF7	PC3	HACAT
6-Metoxidihidroqueleritrina	Viabilidad celular (%)			
	41.2	38.2	20.4	42.85
6-Acetonildihidrosanguinarina	Índice de selectividad			
	1.04	1.12	2.10	NA
BLH14	Viabilidad celular (%)			
	85.9	62.4	NC	75.87
BLH14	Índice de selectividad			
	0.88	1.22	NA	NA
BLH14	Viabilidad celular (%)			
	ND	ND	ND	43.39
BLH14	Índice de selectividad			
	NA	NA	NA	NA

NA: No aplica. ND: No determinado

Los resultados muestran que el compuesto 6-metoxidihidroqueleritrina presenta buen índice de selectividad contra las tres líneas celulares de cáncer, pero mayor especificidad contra la línea celular de cáncer de próstata (PC3). El compuesto 6-acetonildihidrosanguinarina presenta buena selectividad contra la línea celular de adenocarcinoma de mama (MCF7).

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

Este proyecto de investigación permitió conocer la composición química y la actividad antimicrobiana de las partes aéreas de *B. latisepala* S. Wats, lo que representa el primer estudio en el que se fraccionan los extractos orgánicos de tallos y hojas para el aislamiento de sus constituyentes y su caracterización mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Así, se obtuvieron ocho alcaloides caracterizados estructuralmente como dihidrosanguinarina, oxisanguinarina, 6-acetonildihidrosanguinarina, 6-metoxidihidroqueleritrina, 6-metoxidihidroqueleritrina, norsanguinarina, 6-nitrometildihidrosanguinarina y BLH14. Los compuestos oxisanguinarina y dihidrosanguinarina han sido reportados previamente en las semillas de esta especie. Los alcaloides 6-acetonildihidrosanguinarina, 6-metoxidihidrosanguinarina, 6-metoxidihidroqueleritrina se reportan por primera vez en esta especie, pero se han encontrado anteriormente en las partes aéreas de especies de los géneros *Bocconia* y *Macleaya* [50]. Norsanguinarina se reporta por primera vez en el género *Bocconia*, pero se ha reportado en plantas de las familias Papaveraceae, Fumariaceae y Rutaceae. El compuesto 6-nitrometildihidrosanguinarina representa un novedoso producto natural ya que solo se ha reportado

previamente mediante la obtención por síntesis orgánica. El compuesto BLH14, un alcaloide de tipo aporfina; además de considerarse un nuevo producto natural, es un nuevo tipo de alcaloide presente en el género *Bocconia*.

Se realizó un estudio preliminar con pruebas colorimétricas donde se observa que los constituyentes prioritarios en la especie son alcaloides (Reactivo Dragendorff) y algunos esteroides y triterpenos (Reactivo Caín) con lo que se obtiene información relevante para indicar la presencia de nuevos constituyentes que no han sido reportados anteriormente en la especie.

Se encontraron otros fitocompuestos, en las partes aéreas de esta planta, los cuales son componentes primordiales en especies vegetales tal es el caso del β -sitosterol, algunos hidrocarburos alifáticos de cadena larga, glicéridos, ésteres de ácidos grasos y ceras.

Se emplearon diversas técnicas para el aislamiento y purificación de alcaloides que permitieron detectar que estos productos naturales son susceptibles a degradación bajo ciertas condiciones como el oxígeno ambiental, la temperatura (mayor a 40°C), interacción con disolventes y las fases estacionarias usadas en cromatografía, entre otras. Con ello, se observó la presencia de productos secundarios de constitución no conocida; además, el rendimiento relativo de los compuestos constituye una limitante para la obtención y caracterización estructural. Debido a la gran susceptibilidad al ataque nucleofílico en alcaloides

cuaternarios se pueden presentar diferentes artefactos (metabolitos no naturales) durante los procesos de aislamiento y purificación [56].

Los alcaloides de *B. latisepala* S. Wats se evaluaron frente a dos cepas de *M. tuberculosis*, la H37Rv (sensible a fármacos de primera línea) y la G122 (aislado clínico, resistente a rifampicina y etambutol). Los compuestos más activos contra H37Rv fueron 6-metoxidihidroqueleritrina y BLH14 con concentraciones mínimas inhibitorias de 12.5 µg/mL y 50 µg/mL, respectivamente para la cepa H37Rv. Para el aislado clínico G122 se obtuvieron CMI de 25 µg/mL para 6-metoxidihidroqueleritrina y 50 µg/mL para BLH14.

La hipótesis del presente proyecto se aprueba parcialmente ya que se encontraron constituyentes no reportados previamente (norsanguinarina, 6-nitrometildihidrosanguinarina y BLH14) en la especie *Bocconia*. Sin embargo, la actividad antimicobacteriana de los compuestos no fue equiparable que el control positivo etambutol.

Debido a los resultados de la actividad antimicobacteriana se plantea como perspectiva la derivatización de los compuestos 6-metoxidihidroqueleritrina y BLH14, ya que es posible considerar dichos compuestos como plataformas para la semisíntesis de nuevos derivados antimicobacterianos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] F. Ntie-Kang, J. N. Yong, L. C. Owono-Owono, W. Sippl y E. Megnassan. Perspectives on tuberculosis pathogenesis and discovery of anti-tubercular drugs. *Curr. Med. Chem.* 21:3466-3477, **(2014)**.
- [2] J. A. Philips y J. D. Ernst. Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 7(1):353-384, **(2012)**.
- [3] World Health Organization. Global tuberculosis report 2018, **(2018)**.
- [4] G. Catho *et al.* Management of emerging multidrug-resistant tuberculosis in a low-prevalence setting. *Clinical Microbiology and Infection*, **(2015)**.
- [5] J. Mwanzia-Nguta, R. Appiah-opong, A. K. Nyarko, D. Yeboah-manu y P. G. A. Addo. Current perspectives in drug discovery against tuberculosis from natural products. *Asian African Soc. Mycobacteriology.* 4:165-183, **(2015)**.
- [6] S. K. Mishra, G. Tripathi, N. Kishore, R. K. Singh, A. Singh y V. K. Tiwari. Drug development against tuberculosis: Impact of alkaloids. *Eur. J. Med. Chem.* 137:504-544, **(2017)**.
- [7] A. Leitch. Anomalous symptoms in tuberculosis. *The Tuberculous Process.* 85-96, **(2014)**.
- [8] P. Brouqui, F. Quenard y M. Drancourt. Old antibiotics for emerging multidrug-resistant/extensively drug-resistant tuberculosis (MDR/XDR-TB). *Int. J. Antimicrob. Agents.* 49(5):554-557, **(2017)**.
- [9] World Health Organization. Farmacorresistencia a los antituberculosos. **(2016)**. [Online]. Disponible: <http://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/es/>. [Acceso: 20-agosto-2017].
- [10] K. C. Chinsembu. Tuberculosis and nature's pharmacy of putative anti-tuberculosis agents. *Acta Trop.* 153:46-56, **(2016)**.
- [11] J. Bruchfeld, M. Correia-Neves y G. Källenius. Tuberculosis and HIV coinfection. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5(7):1-15, **(2015)**.
- [12] World Health Organization. Tuberculosis. Nota descriptiva, **(2016)**. [Online]. Disponible: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>. [Acceso: 01-octubre-2017].
- [13] T. Maitre *et al.* Multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis. *Médecine Mal. Infect.* 47(1):3-10, **(2017)**.
- [14] P. Coll. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*, " *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 27(8):474-480, **(2009)**.
- [15] J. C. Sundaramurthi *et al.* TBDRUGS-Database of drugs for tuberculosis. *Tuberculosis.* 100:69-71, **(2016)**.
- [16] A. Skrahina *et al.* Bedaquiline in the multidrug-resistant tuberculosis treatment: Belarus experience. *Int. J. Mycobacteriology.* 5:62-63, **(2016)**.
- [17] E. B. Chahine, L. R. Karaoui y H. Mansour. Bedaquiline: A novel diarylquinoline for multidrug-resistant tuberculosis. *Ann. Pharmacother.* 48(1):107-115, **(2014)**.
- [18] S. Tiberi *et al.* Classifying new anti-tuberculosis drugs: rationale and future

- perspectives. *Int. J. Infect. Dis.* 56:181-184, **(2017)**.
- [19] G. F. dos S. Fernandes, C. M. Chin y J. L. Dos Santos. Advances in drug discovery of new antitubercular multidrug-resistant compounds. *Pharmaceuticals*. 10(2):1-17, **(2017)**.
- [20] G. Mori, L. R. Chiarelli, G. Riccardi y M. R. Pasca. New prodrugs against tuberculosis. *Drug Discov. Today*. 22(3):519-525, **(2017)**.
- [21] D. Quan, G. Nagalingam, R. Payne y J. A. Triccas. New tuberculosis drug leads from naturally occurring compounds. *International Journal of Infectious Diseases*. 56:212-220, **(2017)**.
- [22] D. G. Brown, T. Lister y T. L. May-Dracka. New natural products as new leads for antibacterial drug discovery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24:413-418, **(2014)**.
- [23] D. J. Newman y G. M. Cragg. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79:629-661, **(2015)**.
- [24] J. M. Nguta *et al.* Antimycobacterial y cytotoxic activity of selected medicinal plant extracts. *J. Ethnopharmacol.* 82:10–15, **(2016)**.
- [25] A. L. Harvey, R. Edrada-Ebel y R. J. Quinn. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14(2):111-129, **(2015)**.
- [26] J. Sharifi-Rad *et al.* Medicinal plants used in the treatment of tuberculosis - ethnobotanical and ethnopharmacological approaches. *Biotechnol. Adv.* 1-59, **(2017)**.
- [27] V. Navarro, M. L. Villarreal, G. Rojas y X. Lozoya. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *J. Ethnopharmacol.* 53(3):143-147, **(1996)**.
- [28] J. Arellanes, M. Adelina, C. Garrido y L. Díaz. Las plantas medicinales mexicanas como fuente de compuestos antimicobacterianos. *Rev. Mex. Ciencias Farm.* 41(1):22-29, **(2010)**.
- [29] A. García, V. Bocanegra-García, J. P. Palma-Nicolás y G. Rivera. Recent advances in antitubercular natural products. *Eur. J. Med. Chem.* 49:1-23, **(2012)**.
- [30] T. P. T. Cushnie, B. Cushnie y A. J. Lamb. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 44(5):377-386, **(2014)**.
- [31] T. E. Hernández-Almanza. Aislamiento, caracterización estructural y evaluación antimicobacteriana de los alcaloides de *Bocconia latisejala*. Universidad Autónoma de Nuevo León, **(2016)**.
- [32] V. Navarro y G. Delgado. Two antimicrobial alkaloids from *Bocconia arborea*. *J. Ethnopharmacol.* 66(2):223-226, **(1999)**.
- [33] M. R. Camacho-Corona *et al.* Evaluation of some plant-derived secondary metabolites against sensitive and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mex. Chem. Soc.* 53(2):71-75, **(2009)**.
- [34] J. González-Martin. Microbiología de la tuberculosis. *Semin. la Fund. Esp. Reumatol.* 15(1):25-33, **(2014)**.
- [35] L. Barksdale and K. S. Kim. *Mycobacterium*. *Bacteriol. Rev.* 41(1):217-372, **(1977)**.
- [36] R. P. Tripathi, N. Tewari, N. Dwivedi y V. K. Tiwari. Fighting tuberculosis:

- An old disease with new challenges. *Med. Res. Rev.* 1-8, (2004).
- [37] L. Guenin-Macé, R. Siméone y C. Demangel. Lipids of pathogenic mycobacteria: contributions to virulence and host immune suppression. *Transbound. Emerg. Dis.* 56(6-7):255-268, (2009).
- [38] N. P. Maulén. Factores de virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Med Chile.* 139:1605-1610, (2011).
- [39] D. V. A. N. Soolingen. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections : main methodologies and achievements. *J. Intern. Med.* 249:1–26, (2001).
- [40] J. A. Caminero, J. A. Cayla, F. J. García-pérez, J. J. Palacios y J. Ruiz-manzano. Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis con resistencia a fármacos. *Arch. Bronconeumol.* 20:502-509, (2017).
- [41] Organización Panamericana de la Salud. Control de la tuberculosis en grandes ciudades de Latinoamérica y el caribe, (2016)..
- [42] Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Boletín Epidemiológico, (2017).
- [43] M. Pai *et al.* Tuberculosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2:16076, (2016).
- [44] C. Costa, B. Walker y A. Bonavia. Tuberculosis Vaccines – state of the art and novel approaches to vaccine development,” *Int. J. Infect. Dis.* 32:5-12, (2015).
- [45] R. Gómez-Cansino, S. L. Guzmán-Gutiérrez y M. Guadalupe. Natural compounds from Mexican medicinal plants as potential drug leads for anti-tuberculosis drugs. *Ann. Brazilian Acad. Sci.* 1–13, (2017).
- [46] Discover Life. Localización de *Bocconia* en el mundo. [Online]. Disponible: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Bocconia>. [Acceso: 01-Sep-2017].
- [47] A. Julián y G. Delgado. (±)-Bocconarborines A and B, Novel 1, 3-Bis-Benzo [c] phenanthridinyl acetone alkaloids from *Bocconia arborea*. *J. Mex. Chem. Soc.*, 45(4):189-194, (2001).
- [48] R. H. F. Manske. The alkaloids of papaveraceous plants. *Can. J. Chem.* 83-85, (1953).
- [49] V. Preininger. Chemotaxonomy of Papaveraceae and Fumariaceae. *The alkaloids*. Institute of Chemistry, Medical Faculty, Palackj University, Olomouc, Czechoslovakia. 29:1-98, (1986).
- [50] X. Yu *et al.* Alkaloids from the tribe *Bocconieae* (Papaveraceae): A chemical and biological review. *Molecules.* 19:13042-13060, (2014).
- [51] UNAM. Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana. [Online]. Disponible: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>. [Acceso: 01-Sep-2017].
- [52] C. Rodríguez-Ramírez y G. Alanís-Flores. Chipinque. Tesigo de la naturaleza. *Fondo editorial de Nuevo León*, 2007. [Online]. Disponible: <https://issuu.com/24design/docs/chipinque>. [Acceso: 20-Jul-2016].
- [53] G. Calderón. Flora del bajío y de regiones adyacentes. (1991).
- [54] S. Watson. Contributions to American Botany. *Am. Acad. Arts Sci.* 25:124-163, (1990).
- [55] UNAM. Información taxonómica *Bocconia latisejala* S. Wats. *Herbario Nacional*, 2010. [Online]. Disponible:

- <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PVsn29368>. [Acceso: 01-Sep-2017].
- [56] J. Dostál y J. Slavík. Some aspects of the chemistry of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 27(H):155-184, (2002).
- [57] I. D. L. C. Chacón, A. R. González-Esquinca y C. A. Riley-Saldaña. Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos. *Univ. Sci.* 17(2):189-202, (2012).
- [58] J. M. Hagel y P. J. Facchini. Benzylisoquinoline alkaloid metabolism: A century of discovery and a brave new world. *Plant Cell Physiol.* 54(5):647-672, (2013).
- [59] A. Diamond y I. Desgagné-Penix. Metabolic engineering for the production of plant isoquinoline alkaloids. *Plant Biotechnol. J.* 14(6):1319-1328, (2016).
- [60] E. Fossati *et al.* Reconstitution of a 10-gene pathway for synthesis of the plant alkaloid dihydrosanguinarine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Commun.* 5:1-11, (2014).
- [61] X. A. Dominguez *et al.* A chemical study of *Bocconia latisejala wats.* *Can. J. Chem.* 43(1):679-682, (1964).
- [62] B. Krane, M. Fagbule y S. Maurice. The benzophenanthridine alkaloids. *J. Nat. Prod.* 47(1):1-43, (1984).
- [63] A. Julián. Caracterización estructural y evaluación biológica de los metabolitos secundarios de *Bocconia arborea*. Universidad Nacional Autónoma de México, (2002).
- [64] D. E. Anderson *et al.* Comparison of small molecule inhibitors of the bacterial cell division protein FtsZ and identification of a reliable cross-species inhibitor. *Am. Chem. Soc.* 7(1):1918-1928, (2012).
- [65] T. K. Beuria, M. K. Santra y D. Panda. Sanguinarine blocks cytokinesis in bacteria by inhibiting FtsZ assembly and bundling, *Am. Chem. Soc.* 44(1):16584-16593, (2005).
- [66] X. A. Domínguez. Métodos para la investigación fitoquímica. *Limusa*. México, (1973).
- [67] B. I. Diamondstone y R. A. Velapoldi. Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak color reactions for cholesterol. *Clin. Chemistry.* 20(7):794-801, (1974).
- [68] A. Romo Pérez. Aislamiento y caracterización estructural de nuevos inhibidores de α -glucosidasa a partir de raíces de *Smilax sp.* Universidad Autónoma de Nuevo León, (2013).
- [69] S. G. Franzblau *et al.* Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J. Clin. Microbiol.* 36(2):362-366, (1998).
- [70] S. M. Flores-Treviño. Caracterización genotípica de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*: perfiles de resistencia a antifímicos y mutaciones en genes asociados a resistencia. Universidad Autónoma de Nuevo León, (2013).
- [71] A. Monks *et al.* Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 83, no. 11, pp. 757-766, (1991).

- [72] Z. Yang, Z. Liu, B. Jiang, F. Teng, Y. Wang y N. Han. Ambidalmine A e E and ambidimerine F: Bioactive dihydrobenzophenanthridine alkaloids from *Corydalis ambigua* var. *amurensis*. *Eur. J. Med. Chem.* 84:417-424, **(2014)**.
- [73] F. J. Mart. X-ray diffraction and total ^1H and ^{13}C NMR assignment of (*RS*)-6-acetyldihydrochelerythrine) 32(4):63-64, **(2002)**.
- [74] J. Tousek, J. Dostal y R. Marek. Theoretical and experimental NMR chemical shifts of norsanguinarine and norchelerythrine. *J. Mol. Struct.* 689:115–120, **(2004)**.
- [75] G. Rücker, E. Breitmaier, G. Zhang y R. Mayer. Alkaloids from *Dactylicapnos torulosa*. *Phytochemistry.* 36(2):519–523, **(1994)**.
- [76] A. Deng, Z. Zhang, Q. Li, L. Ma y H. Qin. Two new hopane-type triterpenes from the aerial part of *Chelidonium majus*. *Phytochemistry.* 17:75–78, **(2016)**.
- [77] H. Itokawa, A. Ikuta, N. Tsutsui y I. Ishiguro. Alkaloids and a sterol from *Cheledonium japonicum*. *Phytochemistry.* 17:839–840, **(1973)**.
- [78] J. Chen, C. Duh y I. Chen. New Tetrahydroprotoberberine N-oxide alkaloids and cytotoxic constituents of *Corydalis tashiroi*. *Planta Med.* 65:643–647, **(1999)**.
- [79] A. Brossi. The alkaloids: Chemistry and Pharmacology, 40th ed. San Diego, California, **(1991)**.
- [80] J. Rubio-Piña y F. Vázquez-Flota. Pharmaceutical applications of the benzylisoquinoline alkaloids from *Argemone*. *Curr. Top. Med. Chemistry.* 17(13):1–8, **(2013)**.
- [81] T. Furuya, A. Ikuta y K. Syono. Alkaloids from callus tissue of *Papaver somniferum*. *Phytochemistry.* 11(2):3041–3044, **(1972)**.
- [82] G. L. Nelson, G. C. Levy y J. D. Cargioli. Solvent effects in Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance. Electronic Perturbation of Aromatic Systems. *J Am Chem Soc.* 2619(25):3089–3094, **(1975)**.
- [83] M. L. Angeles, N. Kapadia y W. Harding. Aporphine alkaloids as ligands for serotonin receptors. *Med. Chemistry.* 6(4):241–249, **(2016)**.
- [84] M. Shamma y W. A. Slusarchyk. The aporphine alkaloids. *Chem. Rev.* 64(1): 59–79, **(1964)**.
- [85] J. Chen , K. Gao , T. Liu , H. Zhao, J. Wang, H.Wu, B.Liu y W. Wang. Aporphine alkaloids: A kind of alkaloids extract source. Chemical constitution and pharmacological actions in different botany. *Asian J. Chemistry.* 25(18):10015–10027, **(2013)**.
- [86] J. L. Rios, S. Mhfez, R. M. Giner y M. C. Recio. Biological aspects of aporphinoid alkaloids. *The Alkaloids: Chemistry and Biology.* 53:57–117, **(1999)**.
- [87] X. Deng *et al.* Investigation of benzylisoquinoline alkaloid biosynthetic pathway and its transcriptional regulation in lotus. *Hortic. Res.* 5(29):1–16, **(2018)**.
- [88] J. S. Morris y P. J. Facchini. Isolation and characterization of reticuline N - Methyltransferase Involved in biosynthesis of the aporphine alkaloid Magnoflorine in *Opium Poppy*. *J. Biol. Chemistry.* 291(45):23416–23427, **(2016)**.
- [89] A. Romo-Pérez *et al.* Mild C (sp 3)-H functionalization of

- dihydrosanguinarine and dihydrochelerythrine for development of highly cytotoxic derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 138:1–12, (2017).
- [90] R. Winkler y C. Hertweck. Biosynthesis of Nitro Compounds. *ChemBioChem*, 8:973–977, (2007).
- [91] R. Parry, S. Nishino y J. Spain. Naturally-occurring nitro compounds. *R. Soc. Chem.* 28:152–167, (2011).
- [92] V. Pabuccuoglu, G. Arar, T. Gozler, A. J. Freyer y M. Shamma. Nitrotyrasanguinarine: an unusual nitrated benzophenanthridine alkaloid from *Hypecoum species*. *J. Nat. Prod.* 52(4):716–719, (1989).
- [93] A. Yao-kouassi, C. Caron, D. Harakat y M. Ze. New nitro-benzo[c]phenanthridine and indolopyridoquinazoline alkaloids from *Zanthoxylum atchoum*. *Comptes Rendus Chim.* 18(8):891–897, (2015).
- [94] Z. X. Qing *et al.* Mass spectrometry-guided isolation of two new dihydrobenzophenanthridine alkaloids from *Macleaya cordata*. *Nat. Prod. Res.* 31(14):1633–1639, (2017).
- [95] V. Sai, P. Chaturvedula y I. Prakash. Isolation of Stigmasterol and β - Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *Int. Curr. Pharm. J.* 1(9):239–242, (2012).
- [96] A. Ai, S. Mulhovo, X. Luo, D. Pires, U. Ferreira y E. Anes. *Zanthoxylum capense* constituents with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro and ex vivo within human macrophages. *J. Ethnopharmacol.* 146:417-422, (2013).
- [97] T. Ishikawa. Benzo[c]phenanthridine bases and their antituberculosis activity. *Med. Res. Rev.* 21(1):61-72, (2001).
- [98] D. Weber *et al.*. Structure-activity relationship of benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium* having antimicrobial activity. *PLoS One.* 9(5):1-10, (2014).