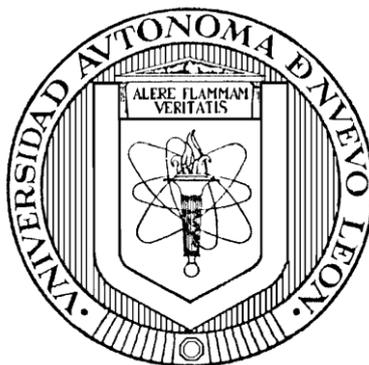


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA
DE LOS CONSTITUYENTES ANTITUBERCULOSOS DE LA CÁSCARA DE

Citrus aurantifolia

POR

Q.F.B. NALLELY ELIZABETH SANDOVAL MONTEMAYOR

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
FARMACIA

Agosto 2011

Aprobación de la tesis

**“AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA
DE LOS CONSTITUYENTES ANTITUBERCULOSOS DE LA CÁSCARA DE
Citrus aurantifolia”**

Dra. María del Rayo Camacho Corona
Presidente

Dr. Edgar Abraham García Zepeda
Secretario

Dra. Elvira Garza Gonzalez
Vocal

Dra. María Teresa Garza González
Sub-directora de Estudios de Posgrado

Agosto 2011

Revisión de la Tesis

**“AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA
DE LOS CONSTITUYENTES ANTITUBERCULOSOS DE LA CÁSCARA DE
Citrus aurantifolia”**

Dra, María del Rayo Camacho Corona

Dr. Edgar Abraham García Zepeda

Dra. Elvira Garza Gonzalez

Dra. Ivonne A. Camacho Mora

MC. Rosario González González

Agosto 2011

RESUMEN

Nallely Elizabeth Sandoval Montemayor

Fecha de Graduación: Agosto, 2011

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS CONSTITUYENTES ANTITUBERCULOSOS DE LA CÁSCARA DE *Citrus aurantifolia*

Número de páginas: Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia

Área de estudio: Química y Farmacología de Productos Naturales

Propósito y Método de estudio: La tuberculosis es una enfermedad causada por el *Mycobacterium tuberculosis*. De acuerdo a datos estadísticos reportados en el 2009 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se registraron 9.4 millones de nuevos casos de tuberculosis y 1.3 millones de muertes. En México, la Secretaría de Salud reportó 15,384 casos de tuberculosis pulmonar en el 2011 y en 2009 reportó 1,872 defunciones. La resistencia de *M. tuberculosis* a los fármacos antituberculosos, los efectos adversos y el tiempo de tratamiento, así como la combinación letal de la tuberculosis con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), han creado la necesidad de buscar nuevas alternativas para el tratamiento de esta enfermedad. Las plantas medicinales nos proporcionan una fuente invaluable de nuevos fármacos con actividad antituberculosa. Es por ello que en este proyecto se estudió el extracto hexánico de la cáscara de *Citrus aurantifolia* ya que en estudios anteriores dicho extracto presentó actividad antituberculosa en contra de una cepa sensible y tres cepas monoresistentes; por lo que se decidió llevar a cabo el fraccionamiento del extracto, así como también la separación e identificación de los constituyentes antituberculosos, empleando técnicas cromatográficas y espectroscópicas, así como la utilización del método de Alamar azul para la determinación de la actividad antituberculosa.

Conclusiones y contribuciones: Se lograron aislar, purificar y caracterizar estructuralmente cinco compuestos: 5-geranoxi-psoraleno, 5-geranoxi-7-metoxi-cumarina, 5,7-dimetoxi-cumarina, 5,8-dimetoxi-psoraleno y 5-metoxi-psoraleno. Asimismo se identificaron por CG/EM 40 compuestos: nueve monoterpenos, cinco sesquiterpenos, cinco cetonas, cuatro alcanos, cuatro cumarinas, tres ácidos grasos, tres alcoholes, dos ésteres, dos éteres, un fenol, un aldehído y una hidroxiacetona. Los ácidos grasos palmítico, linoléico y oléico; y las furanocumarinas 5-geranoxi-psoraleno y 5,8-dimetoxi-psoraleno son buenos prototipos moleculares para la síntesis de nuevos fármacos antituberculosos.

Dra. María del Rayo Camacho Corona

(Firma del asesor)

Dra. Elvira Garza González

(Firma del Co-asesor)

AGRADECIMIENTOS

Dra. María del Rayo Camacho Corona
Por la paciencia y dedicación durante mi estancia en la maestría.

Dra. Elvira Garza González
(Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UANL)
Por la atención y facilidades brindadas para la realización de los ensayos con
Mycobacterium tuberculosis.

Dra. Laura Álvarez Berber
(Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma de Morelos)
Por el apoyo en la adquisición de los espectros de RMN de Ca4, Ca6, Ca7 y Ca8; así
como también de analizar el extracto hexánico de *C. aurantifolia* en el CG-EM.

Dra. Verónica M. Rivas Galindo
(Facultad de Medicina, UANL)
Por el apoyo en analizar la muestra Ca9 en el aparato de RMN.

CONACYT

Por el apoyo de la beca económica, durante la realización de esta tesis.
Asimismo, por la aprobación del proyecto número 10607 de Ciencia Básica en el 2009,
ya que con este apoyo, se ha podido pagar los consumibles requeridos para este
proyecto.

Facultad de Ciencias Químicas
(UANL)
Por las facilidades brindadas durante mi carrera profesional y la maestría.

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida y permitirme realizar mis estudios, a Él le debo lo que soy, Él me da la fortaleza de seguir adelante y la Fe que necesito cada día para afrontar mis decisiones.

A mi familia, quienes por sobre todas las cosas me apoyaron y soportaron en mis crisis de estrés, gracias a ellos que siempre están conmigo en cualquier momento para ayudarme y alentarme a nunca dejar el camino que tomé. Gracias a mi papá que es mi ejemplo a seguir, quien logró salir adelante con sacrificios para que nuestra familia tuviera lo mejor posible, yo por eso te admiro papi, porque se lo que te costó estar en donde estás. Gracias mamá por ser siempre la mejor mamá, por que tus sacrificios son un ejemplo para mí y un ejemplo a seguir, gracias por cada lonche que me preparaste. A mi tía Pera que me apoyo en todo momento y quien fue la que más soportó mi estrés, gracias por tantas veces que me diste un aventón a la escuela y por los consejos que me brindas, eres como una segunda hermanita porque contigo convivo en todo aspecto como tal. A mi hermana Yadira que es una gorrosita, pero a la cual quiero mucho, hermanita recuerda que tú siempre puedes lograr lo que te propongas, nunca tengas miedo de nada.

A mi novio Cutberto, por todo su amor y apoyo, gracias por nunca truncar mis sueños y apoyarme en cada decisión, tu bien sabes que lo que haga hoy en adelante será para un bien común... Te amo!

Y que sería de mí sin mis compañeros de generación? Erika eres una excelente persona la cual admiro por su paciencia, Darío compartimos el mismo gusto por los perritos y hasta nos hizo llorar la misma película, Panchito eres digno de admiración, tu manera de salir adelante a pesar de las adversidades porque a pesar de todo tienes esas ganas de estudiar, Laurita aprendí a conocerte mejor, lo que nunca fue en licenciatura, eres una persona maravillosa con nobles sentimientos y Olivia gracias por permitirme conocerte más y más cada día eres una gran amiga para mí y a pesar de ser tan distintas sabemos

apoyarnos y respetar nuestras formas de ser, te quiero amiga.... A todos ustedes los quiero y me siento muy dichosa por haber compartido las horas de clase y relaxo con ustedes.

¿Qué difícil hubiera sido para mí montar mi primera columna y cargar litros y litros de solvente? Gracias Juan Manuel alias “el socarrón” por ser mi maestro pues tú me enseñaste a trabajar en el laboratorio desde que entré al servicio, gracias por enseñarme a trabajar con la micobacteria y pasarme todos tus tips. Eres un socarrón muy bueno porque aguantaste mis achaques de desesperación, pero sobre todo aprendí a sacarte las palabras aunque fuera a tirabuzón y a pesar de eso al final de todo terminabas hablando tu solito. Gracias maestra Paty por todo su apoyo, por escucharme y entenderme, con su presencia hizo los días más llevaderos, y usted para mí es una amiga y ánimo ya falta menos para que termine su doctorado. A todos mis compañeros del laboratorio como Paty Tecate, tan ñoña y dedicada que es ella, admiro la pasión con la que haces lo que te gusta niña! A la nueva integrante del laboratorio de química de productos naturales que es Adrianita y también a la chica loca de licenciatura llamada Iris (alias Isis) y que nunca deja de reír.

Gracias a los vecinos, por esas comidas llenas de risa y amontonamiento porque en esa mesita hacíamos milagros y no entiendo como cabía tanta gente. A Raúl, Ivette, Eder, Hulk, Jorge, mi amiguis Oli y al doc Isaías que me permitió comer en su laboratorio y que siempre me supo escuchar.

Gracias a todos y cada una de las personas que hicieron mi estancia en la maestría una experiencia inolvidable, que Dios los bendiga hoy y siempre!

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Tuberculosis	1
1.1.2 Diagnóstico	2
1.1.3 Profilaxis	3
1.1.4 Tratamiento	4
1.1.5 Epidemiología	8
1.1.6 Problemática Actual	9
1.2 Medicina Tradicional	10
1.3 <i>Citrus aurantifolia</i>	12
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
2.1 Hipótesis	27
2.2 Objetivo General	27
2.2.1 Objetivos Específicos	27
3. METODOLOGÍA	
3.1 Estudio Fitoquímico	28
3.1.1 Recolección del material vegetal	28
3.1.2 Obtención del extracto hexánico	28
3.1.3 Fraccionamiento del extracto	28
3.1.3.1 Aislamiento y purificación de los principios antituberculosos	30
3.1.3.2 Compuesto Ca4 (5-Geranoxi-psoraleno)	30
3.1.3.3 Compuesto Ca6 (5-Geranoxi-7-metoxi-cumarina)	31
3.1.3.4 Compuesto Ca7 (5,7-Dimetoxi-cumarina o limetina)	31
3.1.3.5 Compuesto Ca8 (Bergapteno o 5-Metoxi-psoraleno)	31
3.1.3.6 Compuesto Ca9 (Isopimpinellina o 5,8-Dimetoxi-psoraleno)	32
3.1.4 Separación e identificación de los componentes volátiles del extracto hexánico por CG/EM	32
3.1.5 Identificación de los compuestos aislados y purificados	33
3.2 Ensayo Biológico	33

3.2.1	Preparación de las muestras a evaluar	33
3.2.2	Preparación del inóculo bacteriano	33
3.2.3	Desarrollo del ensayo biológico	34
3.3	Disposición de residuos: parte fitoquímica y ensayos biológicos	35
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
4.1	Caracterización estructural de los compuestos aislados y purificados del extracto hexánico de la cáscara de <i>C. aurantifolia</i>	37
4.1.1	Elucidación estructural del compuesto 5-geranoxi-psoraleno (Ca4)	37
4.1.2	Elucidación estructural del compuesto 5-geranoxi-7-metoxi-cumarina (Ca6)	44
4.1.3	Elucidación estructural del compuesto 5,7-dimetoxi-cumarina o limetina (Ca 7)	52
4.1.4	Elucidación estructural del compuesto 5-metoxi-psoraleno o Bergapteno (Ca8)	54
4.1.5	Elucidación estructural del compuesto 5,8-dimetoxi-psoraleno o Isopimpinellina (Ca9)	60
4.2	Compuestos identificados por CG/EM	69
4.3	Actividad antituberculosa de los compuestos identificados y caracterizados del extracto hexánico de la cáscara de <i>C. aurantifolia</i>	76
5.	CONCLUSIONES	81
6.	FUTURAS INVESTIGACIONES	83
	BIBLIOGRAFÍA	84
	APÉNDICE- Espectros de masas de los compuestos identificados del extracto hexánico de <i>Citrus aurantifolia</i>	94
	RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	115

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i>	1
2. Estructura química de los fármacos antituberculosos de primera línea	7
3. Estructura química de los fármacos antituberculosos de segunda línea	7
4. Reducción de resazurina a resofurina	34
5. Diagrama del desarrollo del ensayo biológico	36
6. Espectro de RMN ^1H (700 MHz, CDCl_3) de 5-geranoxi-psoraleno	40
7. Espectro de RMN ^{13}C (176 MHz, CDCl_3) de 5-geranoxi-psoraleno	41
8. Estructura del compuesto 5-geranoxi-psoraleno	39
9. Espectro de COSY de 5-geranoxi-psoraleno	42
10. Espectro de HMBC de 5-geranoxi-psoraleno	43
11. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del compuesto 5-geranoxi-7-metoxi-cumarina	47
12. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del compuesto 5-geranoxi-7-metoxi-cumarina	48
13. Estructura del compuesto 5-geranoxi-7-metoxi-cumarina	45
14. Espectro COSY del compuesto 5-geranoxi-7-metoxi-cumarina	49
15. Espectro HSQC del compuesto 5-geranoxi-7-metoxi-cumarina	50
16. Espectro HMBC del compuesto 5-geranoxi-7-metoxi-cumarina	51
17. Estructura del compuesto 5,7-dimetoxi-cumarina	52
18. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del compuesto 5,7-dimetoxi-cumarina	53
19. Espectro de RMN ^1H (700 MHz, CDCl_3) del compuesto 5-metoxi-psoraleno	56
20. Espectro de RMN ^{13}C (176 MHz, CDCl_3) del compuesto 5-metoxi-psoraleno	57
21. Estructura química del compuesto 5-metoxi-psoraleno	55
22. Espectro COSY del compuesto 5-metoxi-psoraleno	58
23. Espectro HMBC del compuesto 5-metoxi-psoraleno	59
24. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 5,8-dimetoxi-psoraleno.	63
25. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 5,8-dimetoxi-psoraleno	64
26. Estructura del compuesto 5,8-dimetoxi-psoraleno	61

27. Espectro de DEPT 45 del compuesto 5,8-dimetoxi-psoraleno	65
28. Espectro de DEPT 90 del compuesto 5,8-dimetoxi-psoraleno	65
29. Espectro de COSY del compuesto 5,8-dimetoxi-psoraleno	66
30. Espectro de NOESY del compuesto 5,8-dimetoxi-psoraleno	67
31. Espectro HETCOR del compuesto 5,8-dimetoxi-psoraleno	68
32. Estructura química de los compuestos identificados del extracto hexánico de <i>C. aurantifolia</i>	72
33. Estructura química de los compuestos identificados del extracto hexánico de <i>C. aurantifolia</i>	73
34. Espectro de masas del compuesto tetrahidro-2-metil-2H-pirano	95
35. Espectro de masas del compuesto 4-Hexen-3-ona	95
36. Espectro de masas del compuesto 3-Metil-3-penten-2-ona	96
37. Espectro de masas del compuesto 3-Hexen-2-ona	96
38. Espectro de masas del compuesto Pinacol	97
39. Espectro de masas del compuesto Resorcinol	97
40. Espectro de masas del compuesto <i>p</i> -Cimeno	98
41. Espectro de masas del compuesto 1-Metoxiciclohexeno	98
42. Espectro de masas del compuesto Óxido de linalol	99
43. Espectro de masas del compuesto Acetato de crisantenilo	99
44. Espectro de masas del compuesto Corilon	100
45. Espectro de masas del compuesto Terpinen-4-ol	100
46. Espectro de masas del compuesto α -Terpineol	101
47. Espectro de masas del compuesto 3-Metil-1,2-ciclopentanediona	101
48. Espectro de masas del compuesto Carvona	102
49. Espectro de masas del compuesto Geraniol	102
50. Espectro de masas del compuesto Citral	103
51. Espectro de masas del compuesto 1,8-Dimetil-4-(1-metiletil)-spiro[4,5]dec-6-en-8-ona	103
52. Espectro de masas del compuesto Formato de geranilo	104
53. Espectro de masas del compuesto Ácido oléico	104
54. Espectro de masas del compuesto Acetato de (2)-7-metil -8-tetradecenilo	105
55. Espectro de masas del compuesto α -bergamoteno	105
56. Espectro de masas del compuesto <i>Trans</i> - α -bisaboleno	106
57. Espectro de masas del compuesto Óxido de cariofileno	106
58. Espectro de masas del compuesto Espatulenol	107
59. Espectro de masas del compuesto 7-metoxi-cumarina	107
60. Espectro de masas del compuesto 1-heptatriacotanol	108
61. Espectro de masas del compuesto <i>Trans</i> -fitol	108
62. Espectro de masas del compuesto Versávido	109
63. Espectro de masas del compuesto Palmitato de metilo	109
64. Espectro de masas del compuesto Ácido palmítico	110
65. Espectro de masas del compuesto 5,7-dimetoxi-cumarina	110
66. Espectro de masas del compuesto 5-metoxi-psoraleno	111
67. Espectro de masas del compuesto Ácido linoléico	111
68. Espectro de masas del compuesto Tricosano	112

69. Espectro de masas del compuesto 5,8-dimetoxi-psoraleno	112
70. Espectro de masas del compuesto Pentacosano	113
71. Espectro de masas del compuesto Tetracosanal	113
72. Espectro de masas del compuesto Octacosano	114
73. Espectro de masas del compuesto Nonacosano	114

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Fármacos antituberculosos de primera y segunda Línea	5
2. Ejemplos de fármacos obtenidos a partir de plantas medicinales	11
3. Fraccionamiento del extracto hexánico y compuestos mayoritarios observados por cromatografía en capa fina	29
4. Constantes espectroscópicas de RMN de ^1H y ^{13}C y HMBC de 5-geranoxi-psoraleno	39
5. Constantes espectroscópicas de RMN de ^1H y ^{13}C y HMBC de 5-geranoxi-7-metoxi-cumarina	46
6. Constantes espectroscópicas de RNM ^1H del compuesto 5,7-dimetoxi-cumarina	52
7. Constantes espectroscópicas de RMN de ^1H y ^{13}C y HMBC de 5-metoxi-psoraleno	55
8. Constantes espectroscópicas de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto 5,8-dimetoxi-psoraleno	62
9. Compuestos separados e identificados por CG/EM del extracto hexánico de la cáscara de <i>C. aurantifolia</i> .	69
10. Compuestos identificados por primera vez en la cáscara de <i>C. aurantifolia</i>	75
11. Actividad en contra de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv de los compuestos identificados en el extracto hexánico de la cáscara de <i>C. aurantifolia</i>	76
12. Actividad en contra de cepas resistente de <i>M. tuberculosis</i> de los compuestos identificados en el extracto hexánico de la cáscara de <i>C. aurantifolia</i>	77

NOMENCLATURA

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEDA	Aroma-extraction dilution analysis
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
Ca	<i>Citrus aurantifolia</i>
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CG/EM	Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas
CG-O	Cromatografía de Gases acoplado a Olfatometría
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria 50
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
COSY	Correlation Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DFPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DH	Deshidrogenasa

DMSO	Dimetilsulfóxido
DPP	Derivado Proteico Purificado
g	Gramos
h	Horas
HETCOR	Heteronuclear Correlation
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	High-performance liquid chromatography
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
kg	Kilogramos
mg	Miligramos
µg	Microgramos
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitros
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

nm	Nanómetros
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
OADC	Ácido oléico, Abúmina, Dextrosa y Catalasa
pf	Punto de Fusión
ppm	Partes por millón
Rf	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SNC	Sistema Nervioso Central
TB	Tuberculosis
TB-MFR	Tuberculosis multi-fármaco resistente
TB-XDR	Tuberculosis Extremadamente Resistente
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad contagiosa causada por el *Mycobacterium tuberculosis*, también conocido como bacilo de Koch. Entre las características más sobresalientes del género *Mycobacterium* se encuentran que son: bacilos gram positivos, ácido-alcohol resistentes, no esporulados y no móviles. Poseen una pared celular compleja constituida por ácidos micólicos, los cuales se encuentran unidos a D-arabinosa y D-galactosa que a su vez están unidos al esqueleto de péptidoglicano (1). Una imagen de la estructura de la pared celular de *M. tuberculosis* es mostrada en la Figura 1.

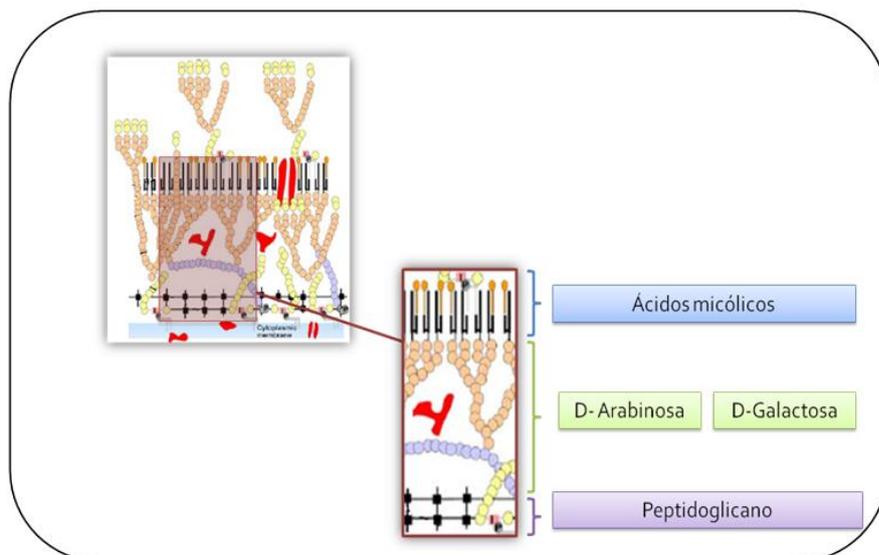


Figura 1. Estructura de la pared celular de *M. tuberculosis* (2)

La infección por *M. tuberculosis* se da por transmisión directa de persona a persona por medio de pequeñas gotitas de saliva que contienen a los microorganismos, estos son transportados por el aire desde un caso activo hasta un huésped susceptible (3). Estas gotitas pueden llegar a los alvéolos pulmonares desencadenando una respuesta inmunológica celular llevada a cabo por los antígenos de la membrana y del citoplasma de las micobacterias, posteriormente los macrófagos reconocen y procesan dichos antígenos y los muestran a los linfocitos T para estimular la transformación de los macrófagos en células especializadas, las cuales se sitúan alrededor de los bacilos dando lugar al granuloma tuberculoso. En muchos casos, este sistema de defensa controla la infección; sin embargo, pueden quedar microorganismos latentes pudiendo activarse en algún momento de la vida del huésped (4) dando lugar a la enfermedad con signos y síntomas característicos como: malestar general, pérdida de peso, tos y sudoración nocturna; escasamente se presentan esputos de carácter purulento y en ocasiones con sangre (1).

1.1.1 Diagnóstico

El diagnóstico de la tuberculosis se basa en una suma de elementos que indican la presencia o ausencia de *M. tuberculosis*. Entre las pruebas útiles para el diagnóstico se encuentran las siguientes (5):

- Prueba de la tuberculina. Se basa en el hecho de que los individuos infectados con bacilos tuberculosos desarrollan hipersensibilidad al Derivado Proteico Purificado de Seibert (DPP) (6). El DPP es aplicado de manera intradérmica

en el antebrazo, siendo positiva cuando se presenta induración palpable de 10 mm en 48 horas en el sitio de aplicación (4).

- Radiografía de tórax.
- Baciloscopía. Se basa en la presencia de bacilos ácido-alcohol resistente en un frotis por medio de la tinción Ziehl-Neelsen en muestras de esputo, aunque también se puede utilizar pus, líquido cefalorraquídeo y líquidos de cavidades serosas inflamadas (6).

1.1.2 Profilaxis

La vacuna derivada del Bacilo de Calmette y Guérin (vacuna BCG) es una de las vacunas más utilizada en los países en los que forman parte del programa nacional de inmunización infantil. Esta vacuna fue obtenida por Calmette y Guérin, quienes sometieron una cepa de *Mycobacterium bovis* a numerosos ciclos de atenuación durante 13 años, siendo en el año de 1921 cuando se utilizó por primera vez en seres humanos. Actualmente todas las cepas vacunales derivan del aislado original de *M. bovis* y para evitar desviaciones respecto a la BCG original, la OMS ha conservado desde 1956 muestras liofilizadas de las cepas vacunales (7).

Sin embargo, la vacunación con BCG presenta algunas desventajas; una de ellas es la hipersensibilidad que provoca en la prueba de la tuberculina ya que no se puede distinguir entre la hipersensibilidad causada por una infección o la causada con la vacuna BCG (8). Cabe mencionar que la vacunación con BCG no evita la infección primaria y, lo que es más importante, no evita la reactivación de la infección pulmonar latente (7).

1.1.3 Tratamiento

El tratamiento de la tuberculosis se basa en conceptos distintos a las demás enfermedades infecciosas, ya que *M. tuberculosis* tiene un tiempo de generación prolongado y la capacidad para entrar en periodos de latencia con una actividad metabólica limitada, lo que condiciona la acción de algunos fármacos antituberculosos como la isoniazida. Aunado a este factor, existe el hecho de que la pared celular de *M. tuberculosis* es compleja, hidrófoba y con una permeabilidad reducida para un gran número de compuestos, en consecuencia, el tratamiento de la tuberculosis se realiza con agentes antimicrobianos específicos (9).

Además de considerar la relación que hay entre el fármaco y la micobacteria para un tratamiento efectivo, es importante tomar en cuenta la aceptación por parte del paciente, los efectos adversos de los fármacos y las interacciones farmacológicas, ante todo en los pacientes que reciben tratamiento para el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (9).

M. tuberculosis y otras micobacterias suelen desarrollar resistencia con rapidez cuando se encuentran frente a un solo fármaco, de manera que para desarrollar un tratamiento eficaz es necesario administrar un esquema prolongado de varios medicamentos, que va de 6 meses en una tuberculosis no resistente y de dos años en una tuberculosis resistente (9).

En la Tabla 1 se enlistan los diferentes fármacos utilizados en el tratamiento de la tuberculosis, incluyendo sus mecanismos de acción, sus principales efectos adversos (10) y concentración mínima inhibitoria (CMI). Cabe mencionar que los

medicamentos utilizados para el tratamiento de la tuberculosis se dividen en dos categorías: Primera línea (Figura 2) y segunda línea (Figura 3); estos últimos se administran cuando el paciente presenta resistencia a los de primera línea.

El esquema de tratamiento antituberculoso más utilizado en pacientes no resistentes se lleva a cabo en seis meses y consiste en la administración de isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida los primeros dos meses, seguido de isoniazida y rifampicina los siguientes cuatro meses (9).

TABLA 1

Fármacos Antituberculosos de Primera y Segunda Línea

Fármaco	Mecanismo de Acción	CMI (µg/mL)	Efectos adversos
Primera Línea ^a			
Isoniazida	Inhibidor de la síntesis de ácidos micólicos (profármaco).	0.025 ^b -0.2 ^c	Erupciones, fiebre, ictericia y neuritis periférica
Rifampicina	Inhibidor de la polimerasa de ARN dependiente de ADN de la micobacteria.	0.005 ^b -0.5 ^c	Erupciones, fiebre, náusea y vómito.
Etambutol	Bloqueador de transferasas de arabinosilo involucradas en la biosíntesis de la pared celular.	1-5 ^c	Neuritis óptica
Estreptomina	Inhibe la síntesis de proteínas al alterar la función de los ribosomas. Actúa como un bactericida.	8 ^c -10 ^b	Ototoxicidad, nefrotoxicidad
Pirazinamida	El mecanismo de acción se desconoce. Muestra actividad bactericida a un pH ácido.	12.5 ^b -20 ^c	Daño hepático.

CONTINÚA

Fármaco	Mecanismo de Acción	CMI (µg/mL)	Efectos adversos
Segunda Línea ^a			
Etionamida	El mecanismo de acción no está bien definido, pero se cree que ocurre una deficiencia en la síntesis de la pared celular.	0.5-2.5 ^b	Anorexia, náusea, vómito, irritación gástrica y diversos síntomas neurológicos.
Ácido Aminosalicílico	Es un bacteriostático cuyo mecanismo de acción es similar al de las sulfonamidas, las cuales impiden que el ácido <i>para</i> -aminobenzóico (PABA) sea utilizado de manera normal en la síntesis de ácido fólico.	1 ^b	Trastornos digestivos (anorexia, náusea, dolor epigástrico, dolor abdominal y diarrea)
Cicloserina	Inhibe las reacciones en que interviene la D-alanina en la síntesis de la pared bacteriana.	5-20 ^b	Reacciones adversas en el Sistema Nervioso Central (SNC) como; somnolencia, cefalalgia, temblor, disartria, vértigo etc.
Amikacina	Inhibe la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad 30S de los ribosomas	1 ^c -4 ^b	Nefrotoxicidad y ototoxicidad
Kanamicina		1 ^c	

^aMecanismos de acción como agente antimicrobiano. ^bBrunton et al., 2007. ^cColl, 2009.

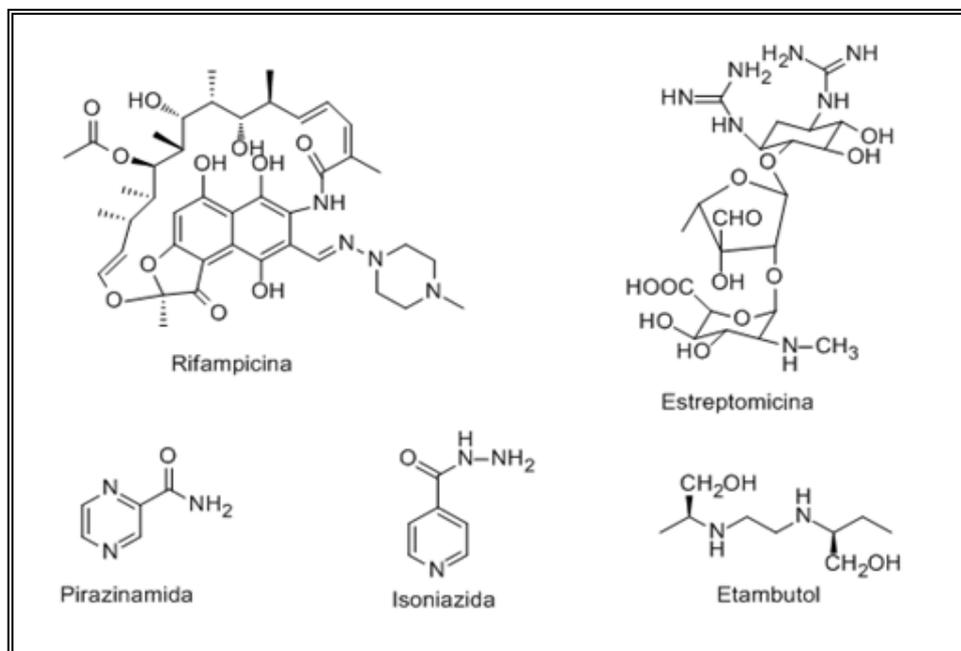


Figura 2. Estructura química de los fármacos antituberculosos de primera línea.

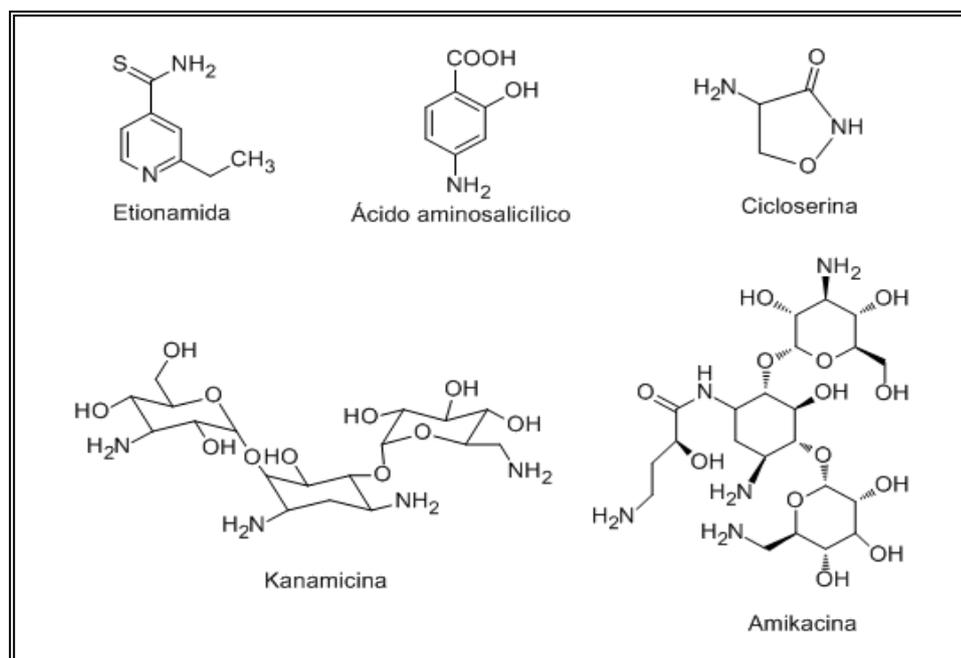


Figura 3. Estructura química de los fármacos antituberculosos de segunda línea.

1.1.4 Epidemiología

La tuberculosis es una enfermedad ligada a la pobreza por ende la mejora de las condiciones socioeconómicas frena la transmisión de la enfermedad; sin embargo, la incidencia de la tuberculosis se ha visto incrementada debido al aumento de la pobreza y a la inmunodeficiencia presentada en los pacientes con VIH (7).

En el 2009 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó 9.4 millones de nuevos casos, equivalentes a 139 casos por cada 100, 000 habitantes en todo el mundo; y la vez representa 1.4 millones de VIH positivos lo que representa el 15% de la población mundial (11).

El número de muertes en ese mismo año fue de 1.3 millones y se estima que se presentaron 28 muertes por cada 100, 000 habitantes, en dicha estimación fue tomada en cuenta la población de VIH negativos como positivos (11).

En México, la Secretaría de Salud publicó en el 2011 la presencia de 15,384 casos de tuberculosis pulmonar en el 2010, donde las entidades federativas que presentaron mayores tasas de incidencia fueron los estados de Baja California Norte, Tamaulipas, Guerrero, Sonora, Nayarit, Veracruz, Chiapas, Nuevo León y Tabasco. Asimismo, la Secretaria de Salud publicó en el 2011 un número de 1,872 defunciones en el 2009 por tuberculosis pulmonar (12).

1.1.5 Problemática Actual

La resistencia a los antibióticos es un problema generalizado en la mayoría de las enfermedades infecciosas y es consecuencia de un tratamiento parcial u anómalo por parte del paciente, o debido a que las pautas dictadas por el médico son erróneas (13). La tuberculosis presenta dos tipos de resistencia a los antibióticos utilizados; la primera se denomina tuberculosis multi-fármaco resistente (TB-MFR), la cual se caracteriza por ser resistente a dos de los fármacos antituberculosos más potentes: rifampicina e isoniazida. La tuberculosis multi-fármaco resistente, en general, da lugar a una terapia prolongada de hasta dos años con fármacos antituberculosos de segunda línea, que son a su vez más caros y con efectos secundarios más graves que los de primera línea. Además, existe un segundo tipo de resistencia, la llamada tuberculosis ultrarresistente o extremadamente resistente (TB-XDR), que es definida como la tuberculosis multi-fármaco resistente que no es sensible a las fluoroquinolonas y al menos a uno de los tres antibióticos de segunda línea (amikacina, capreomicina o kanamicina) (14). En este sentido, la OMS estima que en el 2009 aparecieron 250, 000 casos de TB-MFR que causaron 150, 000 muertes; sin embargo, no han sido realizadas estimaciones oficiales del número de casos de TB-XDR (15).

La tuberculosis puede afectar gravemente a las personas infectadas con VIH, ya que al tener deprimido el sistema inmune provoca que el *M. tuberculosis* pase de un estado latente a uno reactivo, presentando un gran índice de mortalidad en las personas que padecen estas dos enfermedades. Según la OMS, una persona infectada con VIH tiene un riesgo de padecer tuberculosis entre el 5% y 15% en el lapso de un

año, frente al 10% que presenta una persona con el sistema inmunitario intacto a lo largo de su vida (16).

Aunado a los problemas mencionados anteriormente, el tiempo de tratamiento para la tuberculosis resulta ser muy largo, siendo aproximadamente de seis meses en una tuberculosis no resistente. Sin embargo, en una tuberculosis multi-fármaco resistente (MDR-TB) y en personas VIH positivas el tiempo de tratamiento es cerca de dos años, por tal motivo se debe tener especial cuidado en el tratamiento de estos pacientes (13). A pesar de la problemática presentada por la tuberculosis, existe una solución que consiste en la utilización de las plantas medicinales, ya que cuentan con virtudes curativas lo que ha permitido controlar distintas enfermedades desde el comienzo de la historia de la humanidad.

1.2 Medicina Tradicional

De acuerdo a la OMS, la medicina tradicional es la suma completa de conocimientos, técnicas y prácticas fundamentadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas y que se utilizan para mantener la salud, prevenir, diagnosticar y mejorar o tratar trastornos físicos o mentales (17).

En México, la medicina tradicional es un mosaico de piezas procedentes de culturas indígenas diferentes que han determinado históricamente el desarrollo de la cultura nacional (18). En este sentido la medicina tradicional indígena mexicana se define como el conjunto de conocimientos acumulados a través de la historia por los pueblos indígenas y rurales, que están basados en rituales, mística y magia, con

profundos conocimientos sobre la salud y la enfermedad de origen prehispánico (19,20).

Cabe mencionar que la mayoría de los conocimientos prehispánicos acerca de las plantas medicinales de México quedaron grabados en un histórico documento de la herbolaria medicinal Azteca llamado Códice de la Cruz-Badiano (21). Dichos conocimientos han perdurado gracias al interés de las generaciones futuras y al aprovechamiento de la comunidad científica para estudiar la composición y actividades biológicas de las plantas utilizadas en la medicina tradicional.

A partir de las plantas medicinales, los científicos han logrado aislar, caracterizar y evaluar compuestos con actividad farmacológica, de los cuales algunos se han desarrollado como fármacos para el tratamiento de diferentes enfermedades ver Tabla 2 (21).

TABLA 2

Ejemplos de fármacos obtenidos a partir de plantas medicinales

Compuesto	Planta	Acción Farmacológica
Cafeína	<i>Camellia sinensis</i>	Estimulante del Sistema Nervioso Central
Codeína	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico
Colchicina	<i>Colchicum autumnale</i>	Antiinflamatorio
Digoxina	<i>Digitalis lanata</i>	Cardiotónico
Morfina	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico
Pseudoefedrina	<i>Ephedra sinica</i>	Simpaticomimético
Vinblastina	<i>Catharanthus roseus</i>	Antitumoral
Vincristina	<i>Catharanthus roseus</i>	Antitumoral
Taxol	<i>Taxus brevifolia</i>	Antitumoral

Un ejemplo de la aplicación de la medicina tradicional es un estudio realizado por Camacho-Corona y colaboradores en el 2008 en la Facultad de Ciencias Químicas, quienes reportaron la actividad antituberculosa de 9 plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la tuberculosis y enfermedades respiratorias. Una de las plantas utilizadas en este estudio fue *Citrus aurantifolia*, específicamente la cáscara del fruto, donde el extracto hexánico presentó actividad en contra de *M. tuberculosis* (22).

1.3 *Citrus aurantifolia*

La lima, también conocida como limón criollo, limón agrio o limón mexicano (23), es originaria del sureste de Asia, especialmente en el oriente de la India, y fue introducida por los españoles en las islas del Caribe y México (24). El limón es el fruto del árbol que pertenece a la familia de las Rutáceas y su nombre científico es *Citrus aurantifolia*, el cual es un árbol pequeño muy ramificado de entre 4 y 5 m de altura, con un tronco torcido y ramas provistas de espinas (25,26).

Los principales países productores de *C. aurantifolia* son; Brasil, México, Jamaica, Haití, Martinica, Kenia, India, Estados Unidos y Egipto (26). En México, los cítricos ocupan el 40% de la superficie de producción frutícola desde Colima hasta Oaxaca; asimismo, se han identificado varias especies de limón: ácidas y dulces. Dentro de las ácidas se encuentra el limón mexicano y el limón persa (*Citrus latifolia*), ocupando el 80 y 20%, respectivamente, de la superficie nacional plantada de limones (24).

El limón es ampliamente utilizado en la industria alimenticia, de hecho uno de los principales subproductos es el aceite esencial que es utilizado como potenciador de

sabor en alimentos y bebidas, además de ser ingrediente indispensable en los perfumes y en la industria farmacéutica para enmascarar sabores desagradables de algunos medicamentos (25). Cabe mencionar que en México, el aceite esencial es el principal subproducto de exportación (24). En cuanto a los usos tradicionales, las hojas han sido utilizadas para el tratamiento de enfermedades de la piel y como agente antiinflamatorio (27). Por otro lado, el té preparado del jugo, cáscaras u hojas es recomendado como expectorante y logra aliviar la gripe y el resfriado, además el limón previene el escorbuto debido a que es una excelente fuente de vitamina C (28).

Las plantas son ampliamente utilizadas para curar enfermedades y son estos conocimientos empíricos los que han impulsado a la comunidad científica a investigar los compuestos responsables de la actividad biológica. En este sentido, *C. aurantifolia* ha sido objeto de estudios químicos para identificar los compuestos presentes en la planta, así como para evaluar la actividad farmacológica de algunos de sus extractos o compuestos, como se muestra a continuación.

En 1945, Caldwell y colaboradores obtuvieron el aceite por presión del fruto de *C. aurantifolia*, el cual fue cromatografiado sobre Al_2O_3 y eluido con C_6H_6 dando limetina C, isopimpenillina y 7-metoxi-5-geranoxicumarina (29). De igual manera en 1967, Stanley y colaboradores lograron aislar diez compuestos del aceite obtenido por presión del fruto de *C. aurantifolia*. Los autores usaron cromatografía en gel de sílice y lograron identificar compuestos como: 5-geraniloxy-7-metoxicumarina, 5,7-dimetoxicumarina, 5,8-dimetoxipsoraleno (isopimpenillina), 5-geraniloxy-psoraleno (bergamotina), 5- γ,γ -dimetilaliloxy-psoraleno (isoimperatorin), 8-geraniloxy-psoraleno, 8- γ,γ -dimetilaliloxy-psoraleno (imperatorina), 5-metoxi-8- γ,γ -

dimetilaliloxi-psoraleno (felofterina), 5-geraniloxi-8-metoxi-psoraleno e hidrato de oxipeucedanina (30).

Tapanes y colaboradores realizaron dos trabajos relacionados con la preparación de aceite esencial por destilación del fruto de *C. aurantifolia*. En el primer trabajo publicado en 1971 analizaron la fracción terpénica de dicho aceite usando Cromatografía de Gases (CG) logrando identificar y cuantificar γ -terpineol, terpinoleno, limoneno y *p*-cimeno (31). En el segundo trabajo publicado en 1974, los investigadores lograron identificar en el aceite, citral A, citral B, heptanal, octanal, decanal, nonanal, undecanal, metilheptanona y metil nonil cetona usando cromatografía de gases y espectrometría de masas. Además fueron identificados compuestos que anteriormente no habían sido reportados en la planta como: formaldehído, acetaldehído, propanal, butanal, pentanal, hexanal, piperitona, *p*-metilacetofenona y carvona (32).

En 1971, Balbaa y colaboradores sometieron a destilación por vapor y prensado en frío la cáscara de *C. aurantifolia* para la obtención del aceite. Los compuestos identificados por CG fueron: limoneno, α - y β -pineno, sabineno, mirceno, camfeno, β -felandreno, ocimeno, terpineno, *p*-cimeno, terpineol, linalol, geraniol, nerol y/o farnesol, α - y β -citral, citronelal, acetato de linalilo, acetato de geranilo y antranilato de metilo (33).

En 1974, Pérez y colaboradores obtuvieron el aceite esencial de *C. aurantifolia* por el método de centrifugación del cual lograron identificar los siguientes compuestos: α -pineno, camfeno, β -pineno, sabineno, mirceno, limoneno, γ -terpineno

y terpinoleno. En el aceite obtenido por destilación fueron identificados los siguientes compuestos: α -felandreno, α -terpineno, *p*-cimeno y α -*p*-dimetilestireno. En ambos aceites se identificaron como compuestos mayoritarios: α -bergamoteno, β -cariofileno y β -bisaboleno. De acuerdo a este análisis, las fracciones terpénicas y sesquiterpénicas del aceite esencial centrifugado y del obtenido por destilación constituyen un 86 y 14% respectivamente. Cabe mencionar que, los compuestos fueron analizados usando cromatografía en columna, cromatografía de gases preparativa, infrarrojo (IR) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (34).

En 1980, Alexander y colaboradores obtuvieron 15-17% de pectina de la cáscara de *C. aurantifolia* por medio de extracción ácida (35).

En 1987, Clark y colaboradores lograron aislar por HPLC un sesquiterpeno lábil de una fracción hidrocarbonada del aceite de la cáscara de *C. aurantifolia*, el cual fue identificado por técnicas espectroscópicas y confirmado por síntesis como el germacreno B. El análisis del aceite por CG indicó que el germacreno B representa un 0.35% del aceite (36).

En 1989, Park y colaboradores determinaron por Cromatografía en Capa Fina (CCF) la presencia de limonina en el fruto maduro de *C. aurantifolia*, la cual se encontró en una concentración de 5-24 ppm y cabe mencionar que este compuesto es el responsable de la amargura del fruto en los cítricos (37).

En 1993, Nigg y colaboradores hicieron una cuantificación de las cumarinas presentes en cáscara y pulpa de *C. aurantifolia*. En la cáscara y en la pulpa se

encontraron limetina, bergapteno e isopimpinellina. Los investigadores encontraron que las cumarinas presentes en la pulpa son menos concentradas que en la cáscara, además demostraron que el bergapteno es el principal componente responsable de la fitofotodermatitis, sin embargo recomiendan que debe de llevarse a cabo ensayos de interacción dermatológica con psoraleno, bergapteno y limetina (38).

En 1996, Jantan y colaboradores analizaron la composición química de la cáscara y las hojas de *C. aurantifolia*, las cuales fueron examinadas por co-cromatografía, dos columnas de diferente polaridad y Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM). En la cáscara, el β -pineno y el limoneno fueron los constituyentes mayoritarios; por otro lado, en las hojas el geranial, limoneno y neral fueron los compuestos encontrados en mayor porcentaje de abundancia (39).

En 1998, Haggag y colaboradores prepararon el aceite volátil a partir de las hojas y cáscara de *C. aurantifolia* por medio de destilación a vapor, la cáscara de la fruta fue sometida a prensado en frío. En este estudio se lograron identificar 19 compuestos por medio de CCF y CG (40).

Chisholm y colaboradores llevaron a cabo dos estudios acerca de la composición de *C. aurantifolia* en diferentes años. El primero de ellos fue en 1998 en donde describieron las diferencias entre la composición aromática entre *C. aurantifolia* y *C. latifolia* por los métodos de prensado en frío y el aceite esencial destilado, cada uno de los aceites fue analizado por CG-EM. En el estudio se encontró que el linalol es el compuesto más odorante en todas las muestras; sin embargo, el neral, geranial y sus correspondientes ésteres y aldehídos contribuyen más al olor en los aceites obtenidos por el método de prensado en frío, por otro lado, la concentración de α -terpineol y

otros isómeros de terpineol incrementan significativamente con la destilación (41). En el 2003, este grupo de investigadores caracterizaron los compuestos volátiles de la cáscara de *C. aurantifolia* por medio de cromatografía de gases acoplado a olfatometría (CG-O) y CG-EM. Aproximadamente 50 compuestos aromáticos fueron detectados en el extracto del aceite y aproximadamente 60 en el aceite destilado. En este estudio destacaron que el geranial, neral y linalol dominan en ambos aceites y representan olor característico de los cítricos; además, encontraron que la 7-metoxicumarina es uno de los más intensos odorantes en el extracto del aceite y el óxido de cariofileno y óxido de humuleno en el aceite destilado (42).

En 2000, Venkateshwarlu y colaboradores sometieron a hidro-destilación la cáscara de *C. aurantifolia* en seis estados de maduración, posteriormente realizaron un análisis por CG logrando identificar 19 compuestos, identificaron compuestos responsables del aroma a altas concentraciones como: neral, geranial, geraniol y citronelol, los cuales han sido reportados particularmente en la fruta verde (43).

En 2000, Feger y colaboradores estudiaron el aceite esencial obtenido del prensado en frío de las frutas de dos variedades de lima, la lima Key (*C. aurantifolia*) y lima Persa (*C. latifolia*), encontrando α -santaleno, γ -curcumeno, β -selineno, β -sesquifelandreno y 7-epi- α -salineno. Además encontraron la presencia de compuestos termolábiles como los germacrenos A y B (44).

En 2002, Lota y colaboradores analizaron por CG capilar, CG-EM y RMN ^{13}C los aceites de la cáscara y hojas de limas. Se identificaron limoneno, γ -terpineno y β -pineno en la cáscara. En las hojas se identificaron β -pineno, limoneno, geranial, neral, linalol, citronelal y sabineno (25).

En 2002, Shivashankara y colaboradores estudiaron la composición volátil de la cáscara de *C. aurantifolia*, la cual fue extraída en seis estados de madurez por medio de la técnica de headspace con CG-EM, lográndose indentificar 31 compuestos que representaron el 85% de los compuestos volátiles totales. Algunos de los compuestos mayoritarios identificados fueron: limoneno, β -pineno, γ -terpineno, geraniol y peral. También fueron identificados sesquiterpenos en menor proporción como: β -elemeno, β -farnesano, β -cariofileno, δ -cardineno y α -humuleno. El total de los compuestos organolépticos totales disminuyeron del verde oscuro (19.24%) al estado amarillo (8.91%), en los cuales el peral, geranial y geraniol estaban en alta concentración en el limón verde y disminuyen durante la cosecha (45).

En 2003, Nickavar y colaboradores sometieron a hidro-destilación la fruta seca de *C. aurantifolia* dando como producto un aceite amarillo. Dicho aceite fue analizado por CG-EM y se lograron identificar 32 compuestos, siendo los de mayor proporción: limoneno, α -terpineol y β -pineno (46).

En 2005 Ubando-Rivera y colaboradores encontraron que *C. aurantifolia* mexicana tenía un 66.7% de fibra en la cáscara. Dicha fibra contenía polifenoles y éstos eran responsables de su actividad antioxidante (47).

En 2005, Craske y colaboradores realizaron la comparación del aceite de la cáscara de la lima Australiana (*Microcitrus australe*) y la lima Mexicana (*C. aurantifolia* Swingle) por medio del análisis en CG-EM. En dicho análisis fueron identificados 34 compuestos en la lima Mexicana, entre los más abundantes se

encuentran los siguientes: limoneno, γ -terpineno, β -pineno, geranial, neral, acetato de nerilo y geranil acetato (48).

En 2006, Chowdhury y colaboradores analizaron por CG-EM el aceite esencial de las hojas y la cáscara de *C.aurantifolia*, identificando 33 y 44 compuestos, respectivamente.

Citral y limoneno fueron los compuestos mayoritarios en ambos aceites; otros compuestos mayoritarios encontrados en las hojas fueron el acetato de nerilo y citronelal, y en la cáscara; β -pineno (18.7%) y sabineno (5.1%) (49).

En 2006, Phi y colaboradores obtuvieron el aceite esencial de *C.aurantifolia* Persa por el método de prensado. El aceite se analizó por CG, CG-EM, CG-O y AEDA, donde se lograron identificar 92 compuestos de los cuales el limoneno fué componente mayoritario, seguido de geranial, neral, mirceno y β -bisaboleno (50).

En 2007, Agocs y colaboradores encontraron por HPLC dos carotenoides: β -caroteno y luteína en la cáscara y pulpa de *C.aurantifolia* (51).

En 2007, Johann y colaboradores obtuvieron dos flavonoles del extracto hexánico de las cáscara de *C.aurantifolia*: 8-hidroxi-3,4',5,6,7-pentametoxiflavona y 8-hidroxi-3,3',4',5,6,7-hexametoxiflavona. También evaluaron su actividad antifúngica en contra de hongos patogénicos de plantas y humanos (52).

En 2008, Afolayan y colaboradores realizaron un estudio comparativo de la composición de los compuestos volátiles del aceite esencial del fruto de *C.aurantifolia* maduro y podrido proveniente de Nigeria. Dicho aceite fue aislado por

hidro-destilación y analizado por CG-EM, ambos aceites fueron ricos en limoneno (21.0%, limón maduro; 21.3% limón podrido), α -terpineol (11.7%, maduro; 14.1% podrido), γ -terpineno (8.3%, maduro; 8.9% podrido), α -terpinoleno (2.5%, maduro; 8.5, podrido) y (*E*)- α -farnesano (6.3%, maduro; 4.8% podrido). El α -pineno (11.1%) y linalol (5.5%) fueron encontrados únicamente en el limón maduro. Adicionalmente, citral, decanal también fueron encontrados en el aceite esencial del limón maduro y podrido. *trans*- β -Ocimeno, linalool, myrcenol, dodecanal, *trans*- β -bergamoteno y *trans*- γ -bisaboleno estuvieron ausentes en el aceite esencial del fruto del limón podrido (53).

En 2009, Green y colaboradores caracterizaron polimetoxiflavonas de la cáscara de cítricos jamaquinos y mexicanos por medio de HPLC, con la visión de convertir los desechos de cítricos en productos de valor agregado para uso en la industria farmacéutica y nutracéutica (54).

En 1985, Subbarao y colaboradores encontraron que el aceite esencial de *C. aurantifolia* mostraba actividad inhibitoria en *Bacillus anthracis* y *Vibrio cholerae* (55).

En 1991, Ebana y colaboradores evaluaron la actividad antimicrobiana de *C. aurantifolia* y otras plantas medicinales. Los extractos demostraron inhibir *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococci* β -hemolítico, *Escherichia coli* y *Neisseria gonorrhoeae* (56).

En 1997, Ulate-Rodríguez y colaboradores sometieron la cáscara de lima a prensado en frío y destilación y analizaron la concentración de furanocumarinas lineales: psoraleno, 5-metoxipsoraleno (5-MOP) y 8-metoxipsoraleno (8-MOP) por medio de Cromatografía en Capa Fina (CCF) y CG-EM. El aceite de lima obtenido por prensado en frío obtuvo el más alto contenido de furanocumarinas lineales; psoraleno, 5-MOP, y 8-MOP. Asimismo el extracto de la cáscara de lima, el aceite obtenido de la lima prensada en frío y el estándar de 5-MOP inhibieron el crecimiento de *L. monocytogenes*, pero no en *E. coli* O157:H7; en tanto que, *M. luteus* fue únicamente inhibida por la lima prensada en frío. Además, el aceite prensado en frío inhibió *L. monocytogenes*; sin embargo, el estándar correspondiente a furanocumarinas lineales no lo hizo; por lo que el grupo de investigación sugiere la presencia de otros agentes antimicrobianos en el aceite (57).

En 2006, Aibinu y colaboradores evaluaron la propiedad antimicrobiana del fruto de *C. aurantifolia* en las diferentes formas en las que es usado en la localidad de Nigeria (jugo, cáscara quemada comúnmente llamada “epa-ijebu” así como también el aceite obtenido por el método de destilación a vapor. Cabe mencionar que, la actividad de “epa-ijebu” fue llevada a cabo en diferentes solventes. En cuanto a la actividad antimicrobiana, ésta fue realizada por el método de difusión en agar incluyendo aislados clínicos de bacterias anaerobias facultativas: *S. aureus* ATCC 25213, *S. aureus*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella flexnerii*, *Streptococcus faecalis*, *Citrobacter spp*, *Serratia spp*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli*; hongos: *Aspergillus niger* y *Candida albicans*; y bacterias anaerobias: *Porphyromonas spp* y *Clostridium spp*. En este estudio las bacterias anaerobias y gram-positivas fueron susceptibles a todos los extractos con un rango de CMI de 32

mg/mL-128 mg/mL. En el caso de la actividad en contra de los hongos solo el extracto del aceite fue activo en contra de *A. niger*; por el contrario, *C. albicans* fue susceptible a todos los extractos con un rango de CMI de 256 mg/mL- 512 mg/mL. Asimismo, las bacterias gram-negativas exhibieron un rango de CMI de 64 mg/mL- 512 mg/mL. Un hallazgo importante en esta investigación fue la alta actividad que presentaron el aceite y el extracto con vino de palma de “epa-ijebu” en comparación con los otros extractos (58).

En 2008, Camacho y colaboradores probaron la actividad antituberculosa de plantas usadas en la medicina tradicional Mexicana, donde el extracto hexánico de *C. aurantifolia* presentó una CMI de 200 µg/mL para la cepa H37Rv, este mismo extracto presentó una CMI de 25 µg/mL en una cepa resistente a isoniazida (22).

En 2009, Patil y colaboradores publicaron tres trabajos de investigación relacionados con el fruto de *C. aurantifolia*. En su primer trabajo sometieron el fruto de *C. aurantifolia* a hidro-destilación con un aparato tipo Clevenger para la obtención de aceite esencial, el cual fue analizado por CG-EM. Se encontraron 22 compuestos, de los cuales el limoneno y la dihidrocarvona se presentaron en mayor porcentaje de abundancia. Asimismo, el aceite esencial mostró 78% de inhibición en un cultivo de células SW-480 de cáncer de colon a 100 µg/mL en 48 horas. Adicionalmente, encontraron que el aceite esencial producía apoptosis de las células cancerígenas lo que demostró con esto su mecanismo de acción en contra de las células ensayadas (59). En otro trabajo de este grupo de investigadores, se prepararon el extracto de semillas secas, cáscara y jugo de *C. aurantifolia* con solventes de distinta polaridad (acetato de etilo, cloroformo, acetona, metanol y metanol:agua),

dichos extractos fueron sometidos al ensayo de MTT para medir la inhibición de la proliferación celular en un cultivo de células Panc-28. Las CI₅₀ de los extractos metanol:agua de las semillas, cáscara y jugo fueron los siguientes: 4.1 µg/mL, 1.04 µg/mL, 3.4 µg/mL, respectivamente. Además, este grupo de investigación llevó a cabo el análisis por HPLC de los extractos de distintas polaridades (AcOEt, CHCl₃, acetona, MeOH, MeOH:agua) de la semilla, cáscara y jugo de *C. aurantifolia* en donde encontraron hesperidina y neohesperidina como flavonoides mayoritarios así como rutina en menor proporción. Asimismo, fueron reportados limonoides como: limonina, glucósido de limonina, ácido limonéico, ácido isolimonéico y obacunona (60). En su tercera publicación aislaron e identificaron tres cumarinas del extracto hexánico de *C. aurantifolia*: 5-geraniloxi-7-metoxicumarina, limetin e isopimpinellina. Dichos compuestos inhiben en un 74, 52 y 62% respectivamente, células del cáncer de colon SW-480 (61).

En 2009, Razzaghi-Abyaheh y colaboradores encontraron que el aceite esencial de *C. aurantifolia* inhibe el crecimiento de *Aspergillus parasiticus* e inhibe la producción de aflatoxinas; el valor de CI₅₀ para la inhibición de aflatoxinas fue de 285.6 µg/mL. Los resultados indicaron que el aceite esencial del limón puede ser considerado como un potente candidato para proteger los alimentos de hongos toxigénicos y contaminación con aflatoxinas (62).

En 2010, Guimaraes y colaboradores hicieron un estudio comparativo de las propiedades antioxidantes de la cáscara y el jugo de *C. aurantifolia* y otros cítricos aplicando las técnicas de DFPH, e inhibición de lípido piridoxina usando β-caroteno-linoleato en liposomas y ácido tiobarbitúrico en cerebros homogeneizados. Dichas

técnicas fueron aplicadas a las fracciones volátiles y polares de la cáscara. Se encontró en este estudio que los azúcares reductores y los compuestos fenólicos fueron los responsables de la actividad antioxidante. Las fracciones polares de las cáscaras presentaron un alto contenido de compuestos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico, carotenoides y azúcares reductores que contribuyeron a la alta actividad antioxidante de estas fracciones. En contraste, las fracciones volátiles de las cáscaras tuvieron baja actividad antioxidante (63).

En 2010, Asnaashari y colaboradores analizaron por CG/EM el aceite esencial de *C. aurantifolia* encontrando 22 compuestos mayoritarios, entre ellos el limoneno (28.27%). Asimismo en esta investigación analizaron la actividad de reducción de peso del aceite esencial de *C. aurantifolia* administrado individualmente y en co-administración con cetotifeno (antihistamínico que causa ganancia de peso) utilizando un modelo de ratón. Los hallazgos de esta investigación fueron que los grupos tratados con el aceite esencial tuvieron pérdida de peso y pérdida de consumo de alimento en ratones, posiblemente debido a la promoción de anorexia. Interesantemente, el aceite esencial co-administrado con cetotifeno causó significativamente supresión en la ganancia de peso, así como un decremento en peso de los ratones (64).

En 2010, Lakshmi y colaboradores, evaluaron la eficacia antimicrobiana del aceite esencial de *C. aurantifolia* en contra de fitopatógenos comunes (65).

En 2010, Lee y colaboradores, publicaron que el aceite esencial de *C. aurantifolia* fue activo en contra de *Malassezia furfur*, un hongo causante de la dermatitis

seborrérica, la actividad anti-malassezias fue alta al igual que la de itraconazol a 2 mg/mL. Adicionalmente, el aceite de *C. aurantifolia* fue analizado por CG/EM, siendo los constituyentes mayoritarios el limoneno, γ -terpineno y terpinoleno. En este estudio concluyeron que el aceite esencial de *C. aurantifolia* tiene aplicaciones interesantes en el control de enfermedades derivadas de hongos (66).

En 2011, Ojiezeh y colaboradores evaluaron la actividad antimicrobiana del jugo de *C. aurantifolia* donde los microorganismos *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella* spp y *Proteus mirabilis* fueron susceptibles al extracto crudo del jugo de limón (67).

De acuerdo a la literatura revisada se observa que el fruto de *C. aurantifolia* ha sido sometido a diferentes métodos de extracción para la obtención de compuestos. Los métodos más utilizados para la obtención del aceite esencial son el prensado en frío, destilación por arrastre con vapor o hidro-destilación y centrifugación. Algunos autores han concluido que existe diferencia en la composición química del aceite ya que observaron que el uso de calor descompone algunos metabolitos secundarios. Para la separación e identificación de los componentes de los aceites obtenidos de la cáscara y hojas se han empleado técnicas que van desde cromatografía en columna con Al_2O_3 , CCF en gel de sílice hasta CG-EM, CG-O, HPLC, IR y RMN, siendo la CG-EM la técnica más utilizada para la identificación de los compuestos volátiles. Cabe mencionar que, algunos autores han evaluado la actividad antibacteriana, antioxidante y anticancerígena de los aceites esenciales, donde existe un amplio campo de investigación en la búsqueda de moléculas bio-activas. Sin embargo, el trabajo que marca la realización de esta investigación es el llevado a cabo por

Camacho-Corona y colaboradores en el 2008, quienes evaluaron la actividad antituberculosa de los extractos clorofórmico, hexánico, metanólico y acuoso, siendo el extracto hexánico activo en contra de *M. tuberculosis*.

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Algunos compuestos aislados, purificados y caracterizados de las fracciones activas del extracto hexánico de la cáscara de *C. aurantifolia* pueden ser nuevos agentes con actividad antituberculosa.

2.2 Objetivo General

Aislar, caracterizar y evaluar biológicamente los compuestos antituberculosos del extracto hexánico de la cáscara de *C. aurantifolia*.

2.2.1 Objetivos Específicos

- 1) Realizar la revisión bibliográfica de *C. aurantifolia*.
- 2) Preparar el extracto hexánico.
- 3) Fraccionar el extracto hexánico.
- 4) Aislar y purificar los compuestos de *C. aurantifolia*.
- 5) Determinar la estructura química de los compuestos aislados.
- 6) Evaluar la actividad antituberculosa de los compuestos aislados y caracterizados.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 Estudio fitoquímico

En este estudio la parte fitoquímica fue realizada en la Facultad de Ciencias Químicas en el Laboratorio de Química de Productos Naturales.

3.1.1 Recolección del material vegetal

El fruto de *C. aurantifolia* fue obtenido de un supermercado el 23 de noviembre de 2009 en la Ciudad de Monterrey.

3.1.2 Obtención del extracto hexánico

La cáscara de 7.8 kg de limones fue removida y cortada en trozos pequeños obteniéndose 1.4 kg de cáscara. La cáscara fue macerada con 6 L de hexano por 72 h y el material fue filtrado por gravedad y concentrado en un rota-evaporador. Las cáscaras fueron maceradas por otras 72 h y se siguieron los pasos anteriores, lo que permitió obtener 16.0584 g de extracto hexánico.

3.1.3 Fraccionamiento del extracto

El fraccionamiento del extracto se llevó a cabo por cromatografía en columna utilizando gel de sílice como fase estacionaria y un gradiente de hexano/acetato de

etilo como fase móvil. Se obtuvieron 326 fracciones de 100 mL cada una, las cuales fueron analizadas por cromatografía en capa fina y observadas bajo luz ultravioleta. Las 326 fracciones fueron reunidas en 24 fracciones de acuerdo a su similitud cromatográfica. En la Tabla 3 se resume el fraccionamiento del extracto hexánico y los compuestos mayoritarios aislados en las fracciones obtenidas.

TABLA 3

Fraccionamiento del extracto hexánico y compuestos mayoritarios aislados y purificados

Fracciones Obtenidas	Fracción reunida	Polaridad Hex:AcOEt	Compuesto mayoritario aislado
1-14	1	Hexano	
15-32	2	95:5 y 90:10	
33-37	3	90:10	Ca4
38-39	4	90:10	
40-45	5	90:10	Ca6
46-53	6	90:10	
54-63	7	90:10	
64-72	8	85:15	
73-76	9	85:15	
77-80	10	85:15	Ca7
81-85	11	85:15	
86-92	12	85:15	Ca8
93-98	13	85:15	
99-100	14	80:20	
101-109	15	80:20	Ca9
110-124	16	80:20	
125-156	17	75:25	
157-196	18	75:25 y 70:30	
197-220	19	70:30 y 60:40	
221-230	20	60:40 y 50:50	
231-260	21	50:50 y 40:60	
261-284	22	40:60	
285-325	23	30:70, 20:80 y 10:90	
326	24	AcOEt	

3.1.4 Aislamiento y purificación de los principios antituberculosos

Los compuestos Ca4, Ca6, Ca7, Ca8 y Ca9 se lograron aislar y purificar para su posterior caracterización estructural. Las demás fracciones no se sometieron a cromatografía en columna debido a que se presentan mezclas complejas en su análisis por cromatografía en capa fina. Adicionalmente, en un estudio previo realizado por Elizabeth Elizondo en el 2008 se encontró que todas las fracciones presentaban actividad en contra de *M. tuberculosis* por lo que el extracto hexánico total se analizó por cromatografía de gases acoplado a masas (CG-EM) para identificar los compuestos volátiles presentes en todo el extracto.

3.1.4.1 Compuesto Ca4 (5-Geranoxi-psoraleno)

De la fracción 3 (ver Tabla 3) se obtuvo el compuesto Ca4 impuro, este compuesto fue sometido a varias columnas cromatográficas usando como fase estacionaria sílica gel y fase móvil un gradiente de hexano/acetato de etilo. El compuesto puro se observó en las sub-fracciones de polaridad hexano/acetato de etilo 98:2 como una mancha de color amarillo fluorescente a 365 nm. El compuesto se obtuvo como un aceite con un rendimiento total de 24.8 mg (0.017%).

3.1.4.2 Compuesto Ca6 (5-Genanoxi-7-metoxi-cumarina)

De la fracción 5 (ver Tabla 3) precipitó un sólido blanco brillante, el cual en cromatografía en capa fina y bajo luz ultravioleta muestra una mancha de color azul fluorescente a 365 nm. El sólido fue purificado por una re-cristalización con hexano/acetato de etilo en relación 97:3. Se obtuvo un total de 17.6 mg (0.0012%) de cristales planos de color blanco brillante de punto de fusión (pf) 74-75 °C.

3.1.4.3 Compuesto Ca7 (5,7-Dimetoxi-cumarina o limetina)

En las fracciones 9-10 (Tabla 3) precipitó un sólido que en cromatografía en capa fina reveló como una mancha de color azul fluorescente bajo luz ultravioleta a 254 nm. El sólido fue purificado por re-cristalización con cloroformo, los cristales se obtuvieron en forma de agujas transparentes (10.7 mg) con rendimiento de 0.00076 % y de pf 132-135°C.

3.1.4.4 Compuesto Ca8 (Bergapteno o 5-metoxipsoraleno)

Las fracciones 11-12 (Tabla 3) fueron sometidas a una cromatografía en columna con sílica gel como fase estacionaria y eluída con gradiente de hexano/acetato de etilo. De las sub-fracciones 61-120 (hexano/acetato de etilo 96:4) fue obtenido un sólido de color amarillo con un rendimiento de 0.004 % (56.2 mg) siendo una mezcla del compuesto Ca7 y Ca8 que revela amarillo fluorescente a 365 nm.

3.1.4.5 Compuesto Ca9 (Isopimpinellina o 5,8-dimetoxipsoraleno)

Las fracciones 13-15 (Tabla 3) fueron sometidas a una cromatografía en columna con sílica gel como fase estacionaria y un gradiente de hexano/acetato de etilo como fase móvil, de las sub-fracciones de polaridad 95:5 hexano/acetato de etilo precipitó un sólido. Este sólido fue purificado por una re-cristalización (hexano/acetato de etilo 95:5) rindiendo un sólido de color amarillo claro, el cual revela en cromatografía en capa fina y bajo luz ultravioleta como una mancha de color amarillo fluorescente a 365 nm. Del compuesto puro con pf 126-127°C se obtuvo un total de 0.004 mg (4.07 %).

3.1.5 Separación e identificación de los componentes volátiles del extracto hexánico por CG/EM

El extracto hexánico de la cáscara de *C. aurantifolia* fue analizado por cromatografía de gases acoplado a masas (CG/EM) para la identificación de los compuestos volátiles. Las condiciones empleadas fueron las siguientes: Técnica de ionización: Impacto Electrónico (IE) 70eV; columna: HP 5MS de 25 m, 0.2 mm de diámetro interno y 0.33 µm de tamaño de partícula, gas acarreador: helio a un velocidad de flujo de 39 cm/seg, rampa de temperatura: 40°C durante 2min, 10°C/min hasta 260°C durante 20 minutos; inyector: 250°C, splitless; cantidad inyectada: 1µL, detector: MSD 280°C línea de transferencia. La identificación de los analitos volátiles del extracto hexánico fue realizada por medio de la biblioteca NIST versión 1.7a.

3.1.6 Identificación de los compuestos aislados y purificados

La identificación y caracterización de los compuestos Ca4, Ca6, Ca7, Ca8 y Ca9 se llevó a cabo por Resonancia Magnética Nuclear de una y dos dimensiones.

3.2 Ensayo Biológico

Los ensayos biológicos fueron realizados en el departamento de Microbiología, de la Facultad de Medicina

3.2.1 Preparación de las muestras a evaluar

Las soluciones stock fueron preparadas disolviendo 1 mg de cada una de las muestras en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta alcanzar una concentración de 20 mg/ml. Las soluciones stock se mantuvieron a -20°C hasta antes de su uso. Posteriormente las soluciones de trabajo fueron preparadas a partir de una alícuota tomada de cada una de las soluciones stock y diluyéndolas con medio Middelbrook 7H9-OADC (ácido oléico, albúmina, dextrosa y catalasa) a una concentración cuatro veces mayor de concentración más alta ensayada.

3.2.2 Preparación del inóculo bacteriano

Las cepas fueron cultivadas en medio Middelbrook 7H9-OADC a 37°C durante 2 semanas, tiempo durante el cual la bacteria alcanza la fase logarítmica de crecimiento. El inóculo bacteriano fue preparado diluyendo el cultivo en fase

logarítmica hasta ajustar la turbidez al estándar No.1 de McFarland, posteriormente se diluyó a 1:20 con medio Middelbrook 7H9-OADC.

3.2.3 Desarrollo del ensayo biológico

La actividad antituberculosa fue determinada de acuerdo al método descrito en la literatura (68,69); dicho método se basa en la propiedad que tienen las bacterias en crecimiento de liberar deshidrogenasas (DH) al medio, las cuales reducen la resazurina (azul y sin fluorescencia) a resofurina (rosa y fluorescente), en la figura 4 se muestra la reacción de reducción de la resazurina.

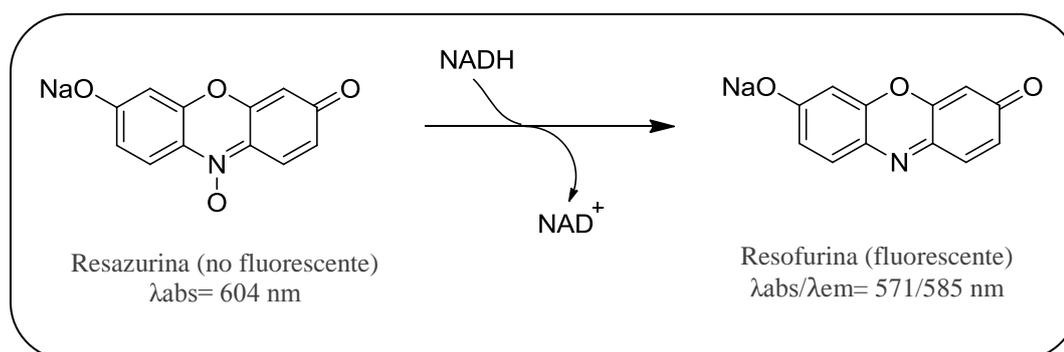


Figura 4. Reducción de resazurina a resofurina

El ensayo se llevó a cabo en micro placas de 96 pocillos en los cuales se ensayaron seis muestras y cada concentración fue ensayada por duplicado. En la placa de 96 pocillos se colocaron 200 µl de agua estéril en los pozos de la periferia, en los demás pocillos se añadieron 100 µl de medio Middelbrook 7H9. Posteriormente se añadieron 100 µl de la solución de trabajo en los pocillos de mayor concentración (50 µg/ml), con lo que se obtuvo una concentración de DMSO < 1%

v/v en los pozos. Enseguida se realizó una serie de diluciones 1:2 a lo ancho de la placa y posteriormente se añadieron 100 µl del inóculo bacteriano previamente preparado. Asimismo se prepararon tres controles a) 100:100, b) 10:100 y c) 1:100; los cuales representan el 100%, 10% y 1% de la población bacteriana a ensayar. Las placas fueron incubadas por 5 días, posteriormente se adicionó 20 µl del reactivo Alamar azul y 12 µl de Tween 80 al 10% a todos los pozos. Las placas se re-incubaron a 37°C por 24 h. Si después de esta incubación se observó cambio de color del reactivo de azul a rosa, se interpretó como presencia de crecimiento bacteriano. Posteriormente, se adicionó el reactivo de Alamar azul (20 µl) y tween 80 al 10% (12 µl) a los demás pocillos, interpretando el cambio de color del reactivo de la misma forma que los controles, después de 24 h de incubación a 37°C (Figura 5).

3.3 Disposición de residuos: parte fitoquímica y ensayos biológicos

La disposición de los residuos de la parte experimental se realizó en base a las normas establecidas por el departamento de manejo y control de residuos de la Facultad de Ciencias Químicas y de la Facultad de Medicina de la UANL.

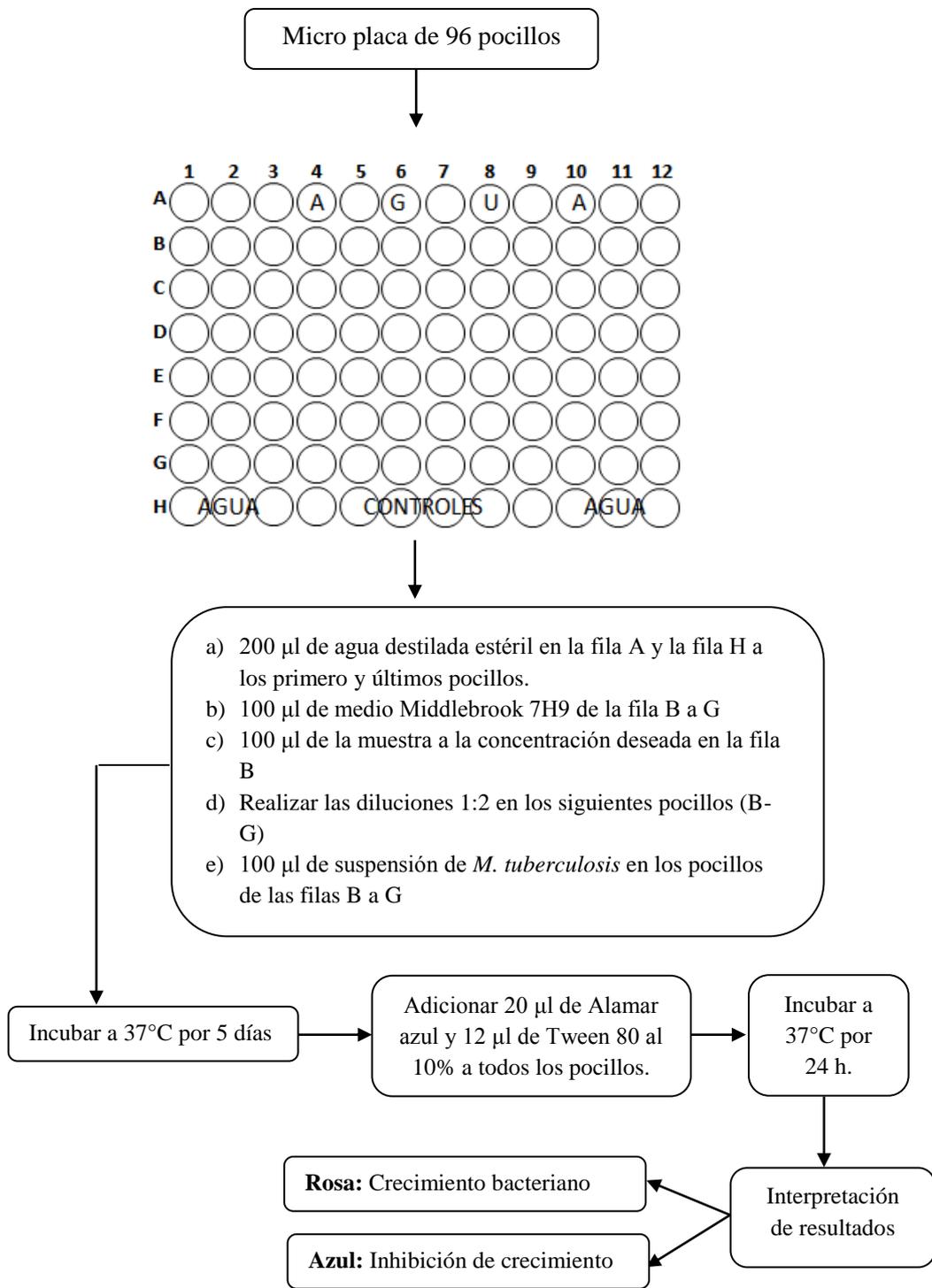


Figura 5. Diagrama del desarrollo del ensayo biológico

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización estructural de los compuestos aislados y purificados del extracto hexánico de la cáscara de *C. aurantifolia*

Del extracto hexánico de la cáscara de *C. aurantifolia* se lograron aislar y caracterizar estructuralmente cinco compuestos por medio del análisis de sus espectros de RMN de una dimensión (RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT) y de dos dimensiones (COSY, NOESY, HMBC y HMQC, HSQC).

4.1.1 Elucidación estructural del compuesto 5-geranoxi-psoraleno (Ca4)

El análisis del espectro de RMN ^1H (Figura 6) del compuesto Ca4 muestra señales para 22 protones, de los cuales cinco protones eran característicos de una furanocumarina monosustituída, de acuerdo a las siguientes señales: un doblete a un desplazamiento químico (δ) de 8.17 ppm con una constante de acoplamiento (J) de 9.8 Hz correspondiente a H-4, este protón se acopla con H-3 que se observa a δ 6.27 ppm como un doblete con una $J = 9.8$ Hz. Asimismo el protón H-2' que aparece en δ 7.59 ppm como un doblete ($J = 2.8$ Hz) se acopla con el protón H-3' que se encuentra en δ 6.96 ppm como un doblete con una $J = 2.8$ Hz. Adicionalmente se observa un singulete en δ 7.16 ppm que corresponde a un protón aromático sin acoplar. En el espectro de RMN ^1H (Figura 6) se observaron las señales características de un grupo geranoxi de acuerdo a lo siguiente: en δ 5.53 un triplete hexaplete y en 5.06 ppm un triplete heptaplete con $J = 1.4, 6.3$ Hz, cada uno

correspondientes a H-2'' y H-6'', respectivamente. Los dos protones de H-1'' se observan a δ 4.95 ppm como un doblete con una $J= 6.3$ Hz, también presenta a δ 2.09 ppm un multiplete que integra para 4 protones correspondientes a dos protones de H-4'' y dos de H-5''. Finalmente, se observan tres singuletes en δ 1.69, 1.68 y 1.60 ppm correspondientes a los metilos en posición H-9'', H-10'' y H-8''.

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 7), se observan 21 señales correspondientes a cada uno de los carbonos de una geranoxi-furanocumarina. En este sentido, se muestra una señal característica del grupo carbonilo de la lactona cumarínica en δ 161.57 ppm correspondiente a C-2. En la Tabla 4 se resumen las constantes espectroscópicas del compuesto Ca4 y es importante mencionar que cada una de las señales de protón y de carbono trece coincidieron con las señales de 5-geranoxi-psoraleno (Figura 8) reportadas por Kawaii y colaboradores (70).

Para confirmar la estructura se realizaron experimentos de doble dimensión. El espectro de COSY (Figura 9) muestra las siguientes correlaciones: H-4 y H-3; H-2' y H-3'; H-2'' y H-1'' y, H-6'' y H-5''. En el espectro de HMBC (Figura 10) se observaron las correlaciones que existen a larga distancia entre los carbonos y protones, como se indica en la Tabla 4. En este sentido se concluye que el grupo geraniloxi se encuentra sustituido en posición 5, debido a la correlación de larga distancia entre el C-5 y los protones H-1''.

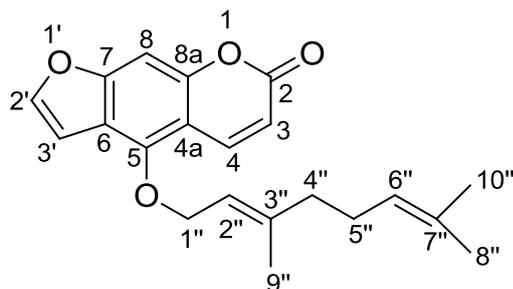


Figura 8. Estructura del compuesto 5-geranoxi psoraleno

TABLA 4

Constantes espectroscópicas de RMN de ^1H y ^{13}C y HMBC de 5-geranoxi-psoraleno

Posición	δH (J en Hz) ^a 700 MHz, CDCl_3	δH (J en Hz) ^b 400 MHz, CDCl_3	δC^a 176 MHz, CDCl_3	δC^b 100 MHz, CDCl_3	HMBC
2			161.57	161.3	
3	6.27, dd (9.8, 0.7)	6.25, d (9.8)	112.77	112.6	H-3/161.57, 107.73
4	8.17, dd (9.8, 0.7)	8.14, d (9.8)	139.86	139.6	H-4/C-2, C-8a
4a			107.73	107.6	
5			149.5	149.0	
6			114.27	114.3	
7			158.34	158.2	
8	7.16, t (0.7)	7.13, s	94.45	94.3	H-8/C-6, C-7, C8a, C-4a
8a			152.86	152.7	
2'	7.59, d (2.8)	7.57, d (2.5)	145.18	144.9	H-2'/C-6, C-3', C-7
3'	6.96, dd (0.7, 2.8)	6.94, dd (0.9, 2.5)	105.28	105.0	H-3'/C-6, C-7, C-2'
1''	4.95, d (6.3)	4.93, d (6.8)	69.95	69.8	H-1''/C-5, C-2'', C-3''
2''	5.53, tsext (6.3, 1.4)	5.51, m	119.05	118.9	
3''			143.27	143.0	
4''			39.71	39.5	
5''	2.09, m	2.08, m	26.40	26.2	
6''	5.06, tsept (6.3, 1.4)	5.05, m	123.69	123.5	
7''			132.27	132.0	
8''	1.68, d (0.7)	1.66 s	25.90	25.7	
9''	1.69, d (0.7)	1.67 s	17.94	17.7	
10''	1.60, d (0.7)	1.58 s	16.90	16.7	

^aDatos obtenidos experimentalmente. ^bKawaii y col.

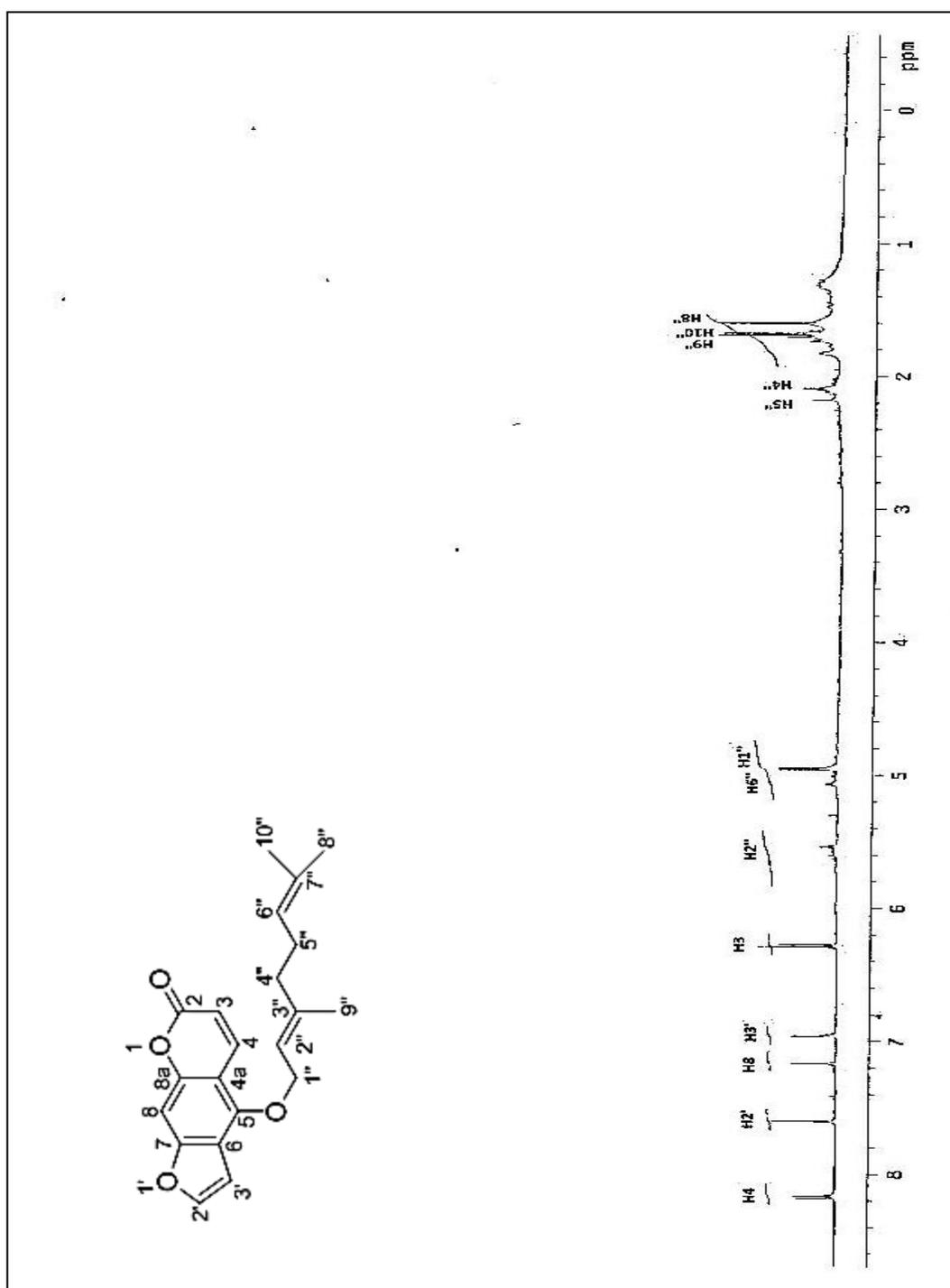


Figura 6. Espectro de RMN ^1H (700 MHz, CDCl_3) de 5-geranoxi-psoraleno

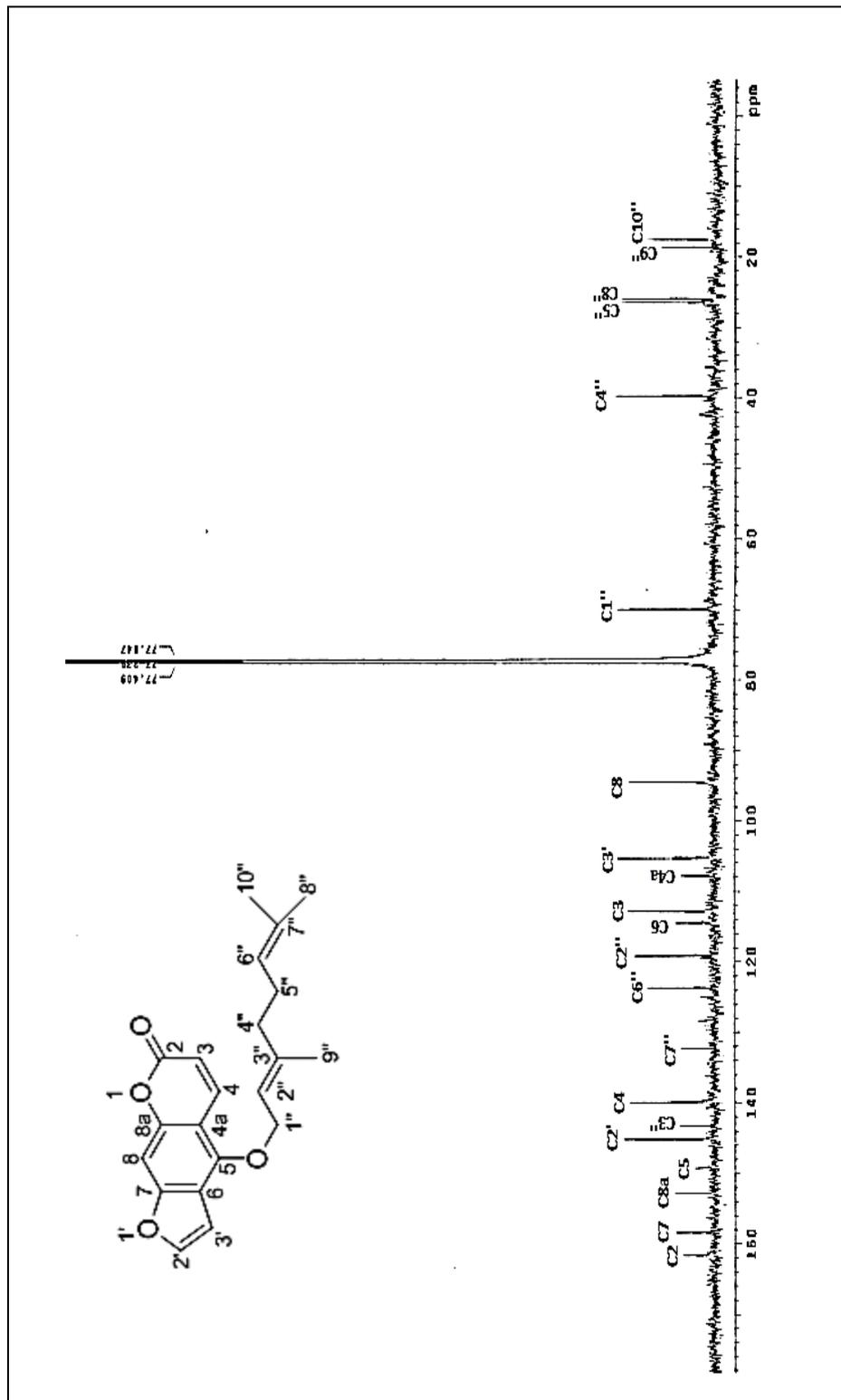


Figura 7. Espectro de RMN ^{13}C (176 MHz, CDCl_3) de 5-geranoxi-psoraleno

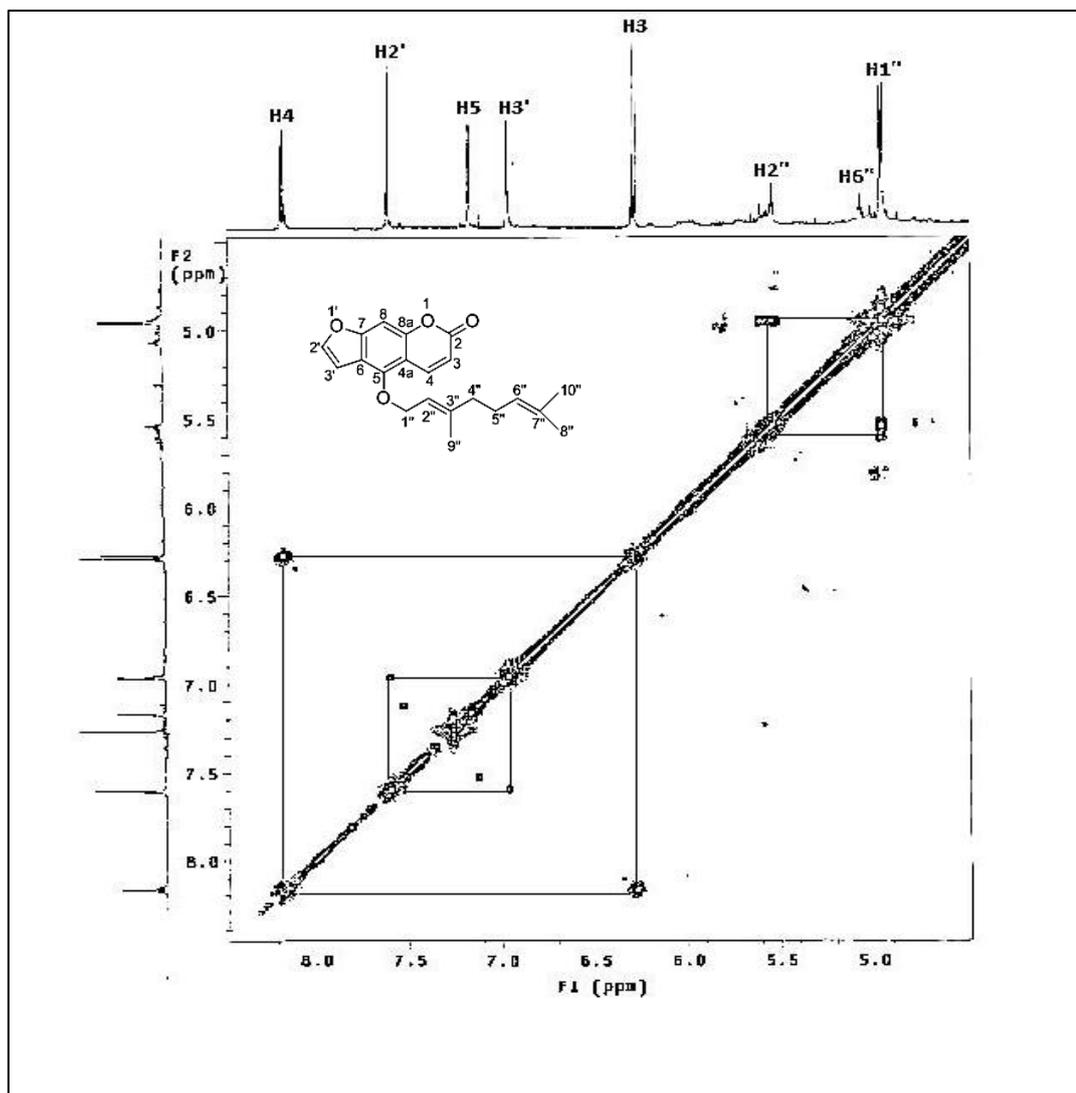


Figura 9. Espectro de COSY de 5-geranoxi-psoraleno

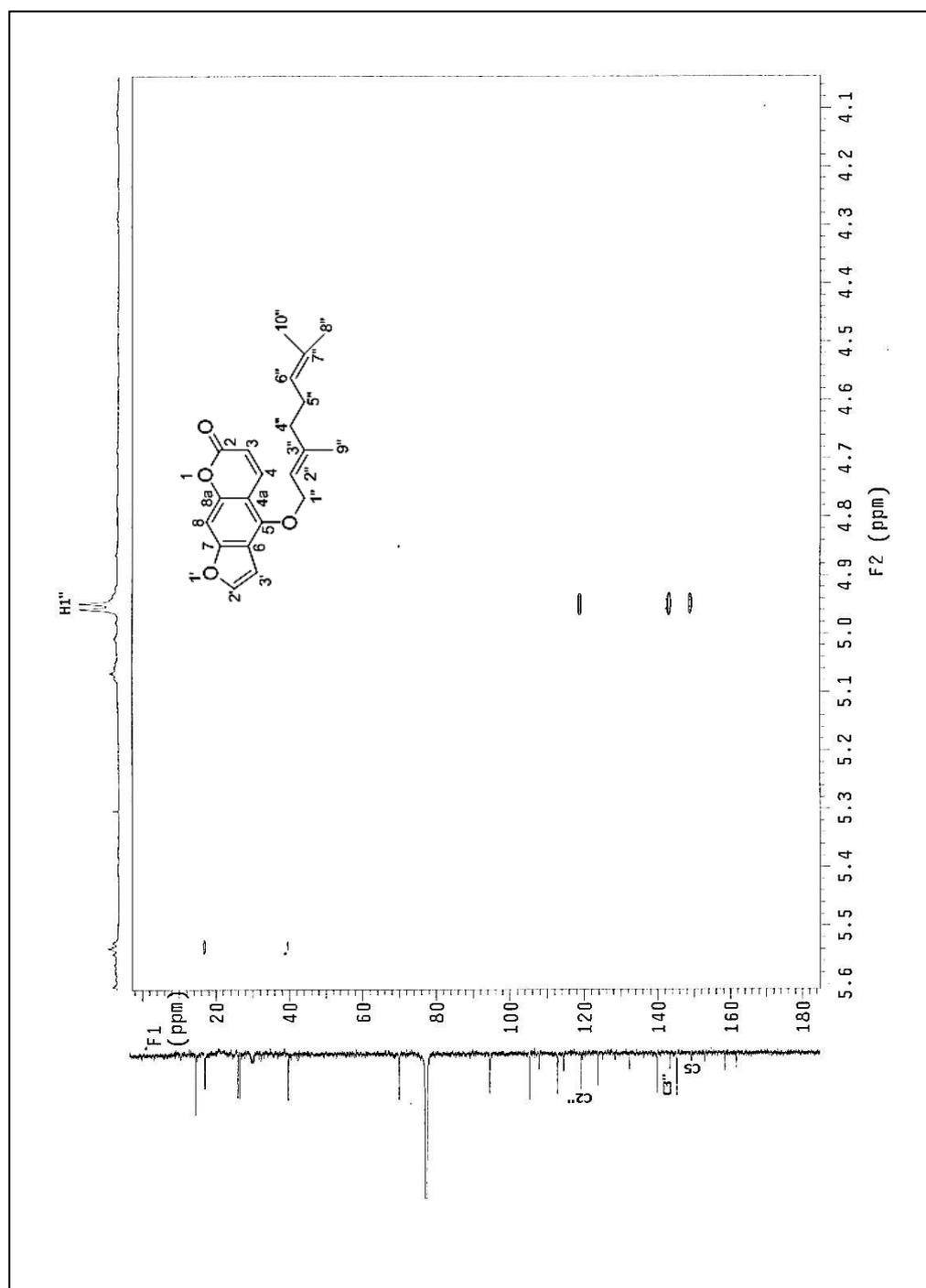


Figura 10. Espectro de HMBC de 5-geranoxi-psoraleno

4.1.2 Elucidación estructural del compuesto 5-geranoxi-7-metoxi-cumarina

(Ca6)

En el espectro de RMN ^1H (Figura 11) del compuesto Ca6 se observan señales para 24 protones característicos de una cumarina sustituida con un grupo geranoxi y un grupo metoxilo por las señales siguientes: en δ 8.00 ppm se observa un doblete con una $J= 9.8$ Hz correspondiente al protón H-4, el cual se acopla con el protón H-3 ubicado en δ 6.15 ppm como un doblete con una $J= 9.6$ Hz. También, se observan dos protones metarrelacionados uno a δ 6.41 ppm (d, $J= 2.2$ Hz) y otro en δ 6.28 ppm (d, $J= 2$ Hz). Adicionalmente, se observan las señales características del grupo geraniloxi de acuerdo a lo siguiente: en δ 5.47 ppm ($J= 6.4, 1.2$ Hz) y 5.09 ppm ($J= 6.4, 1.6$ Hz) resuenan un triplete sextaplete y un triplete septaplete, correspondientes a H-2' y H-6', respectivamente. En δ 4.60 ppm se observa un doblete ($J= 6.4$ Hz) que corresponde al protón de H-1' y en δ 2.11 ppm un multiplete correspondiente a dos protones de H-4' y dos protones de H-5'. Por otro lado se observan tres dobletes ($J= 0.8$ Hz) en δ 1.74, 1.67 y 1.61 ppm que corresponden a los protones H-9', H-10' y H-8', respectivamente. Finalmente, se observa un singulete en δ 3.85 ppm con una integral para tres protones y que puede ser atribuido a un grupo metoxilo.

El espectro de RMN ^{13}C (Figura 12) muestra 20 señales de carbonos de los cuales es importante mencionar al grupo carbonilo de una lactona cumarínica en δ 161.8 ppm; así como, la señal del metoxilo en 55.9 ppm. En la Tabla 5 se resumen las constantes espectroscópicas del compuesto Ca6. La comparación de las constantes físicas y espectroscópicas de Ca6 con las cumarinas previamente reportadas por Miyake y colaboradores (71) permitieron identificar al compuesto como la 5-geranoxi-7-metoxi-cumarina (Figura 13).

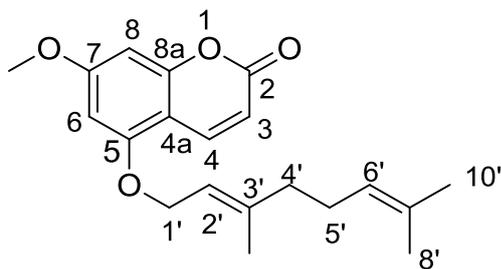


Figura 13. Estructura del compuesto 5-geranoxi-7-metoxi-cumarina

Para confirmar la elucidación estructural de 5-geranoxi-7-metoxi-cumarina se corrió el espectro COSY (Figura 14) el cual mostró la correlación que hay entre H-4 y H-3, H-6 y H-8, H-2' y H-1', H-6' y H-5'. Cabe mencionar que se observan correlaciones a larga distancia entre H6' y H-8', H6' y H-10'; y por último H-2' y H-9'. Así mismo en el espectro HSQC (Figura 15) se pueden observar las correlaciones que existen entre el protón con su correspondiente carbono. Adicionalmente se llevó a cabo un experimento HMBC (Figura 16) para observar la correlación existente a larga distancia entre protones y carbonos (Tabla 5).

TABLA 5

Constantes espectroscópicas de RMN de ^1H y ^{13}C y HMBC de 5-geranoxi-7-metoxi-cumarina

Posición	δH (J en Hz) ^a 400 MHz, CDCl_3	δH (J en Hz) ^b 400 MHz, <i>d</i> - DMSO	δC^a 100 MHz, CDCl_3	δC^b 100 MHz, <i>d</i> - DMSO	HMBC
2			161.88		
3	6.15, d (9.6)	6.15, d (9.5)	111.01	112.52	
4	8.00, d (9.8, 0.4)	8.01, dd (9.5, 0.5)	139.28	139.59	
4a			104.48	107.48	
5			156.48	148.95	
6	6.28, d (2)	6.29, d (2.0)	96.0	114.17	H-6/C-5, C-7, C-8, C-4a
7			163.81	158.10	
8	6.41, dd (2, 0.4)	6.41, dd (2.9, 0.5)	92.88	94.19	H-8/C-6, C-7, C-4a, C-8a
8a			157.06	152.63	
1'	4.6, d (6.4)	4.6, d (6.5)	65.89	69.73	H-1'/C-5, C-2'', C-3'
2'	5.47, tsext (6.4, 1.2)	5.48, tq (6.5, 1.0)	118.68	118.84	
3'			142.36	143.02	
4'			39.7	39.47	
5'	2.11, m	2.12, m	26.42	26.19	
6'	5.09, tsept (6.4, 1.6)	5.09, m	123.78	123.47	
7'			132.20	130.00	
8'	1.61, d (0.8)	1.61, s	17.93	17.68	
9'	1.74, d (0.8)	1.75, s	16.94	16.65	
10'	1.67, d (0.8)	1.68, s	25.88	25.65	
7-OMe	3.85, s	3.85, s	55.99	55.74	

^aDatos obtenidos experimentalmente. ^bMiyake y col.

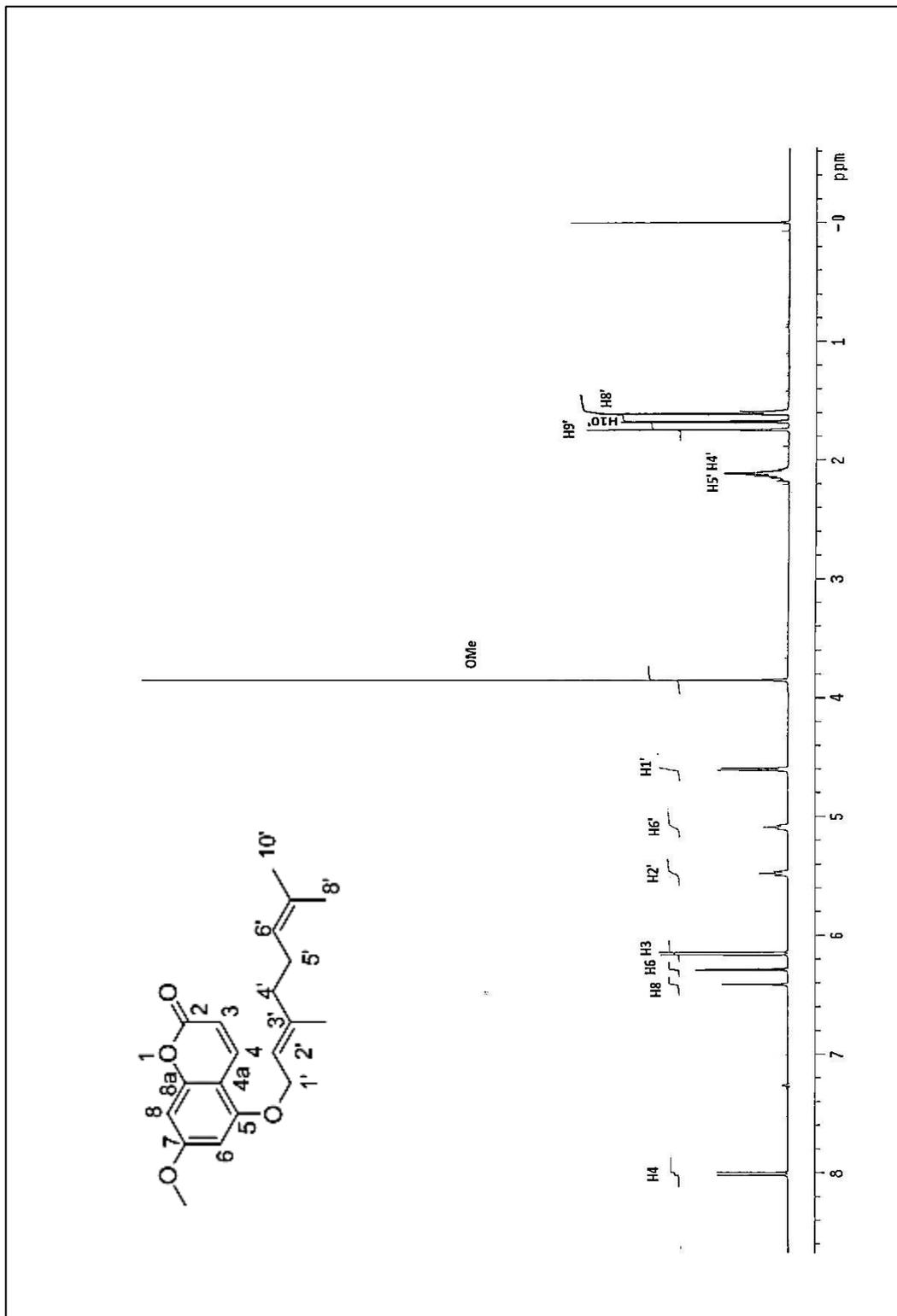


Figura 11. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del compuesto 5-geranoxi-7-metoxi-cumarina

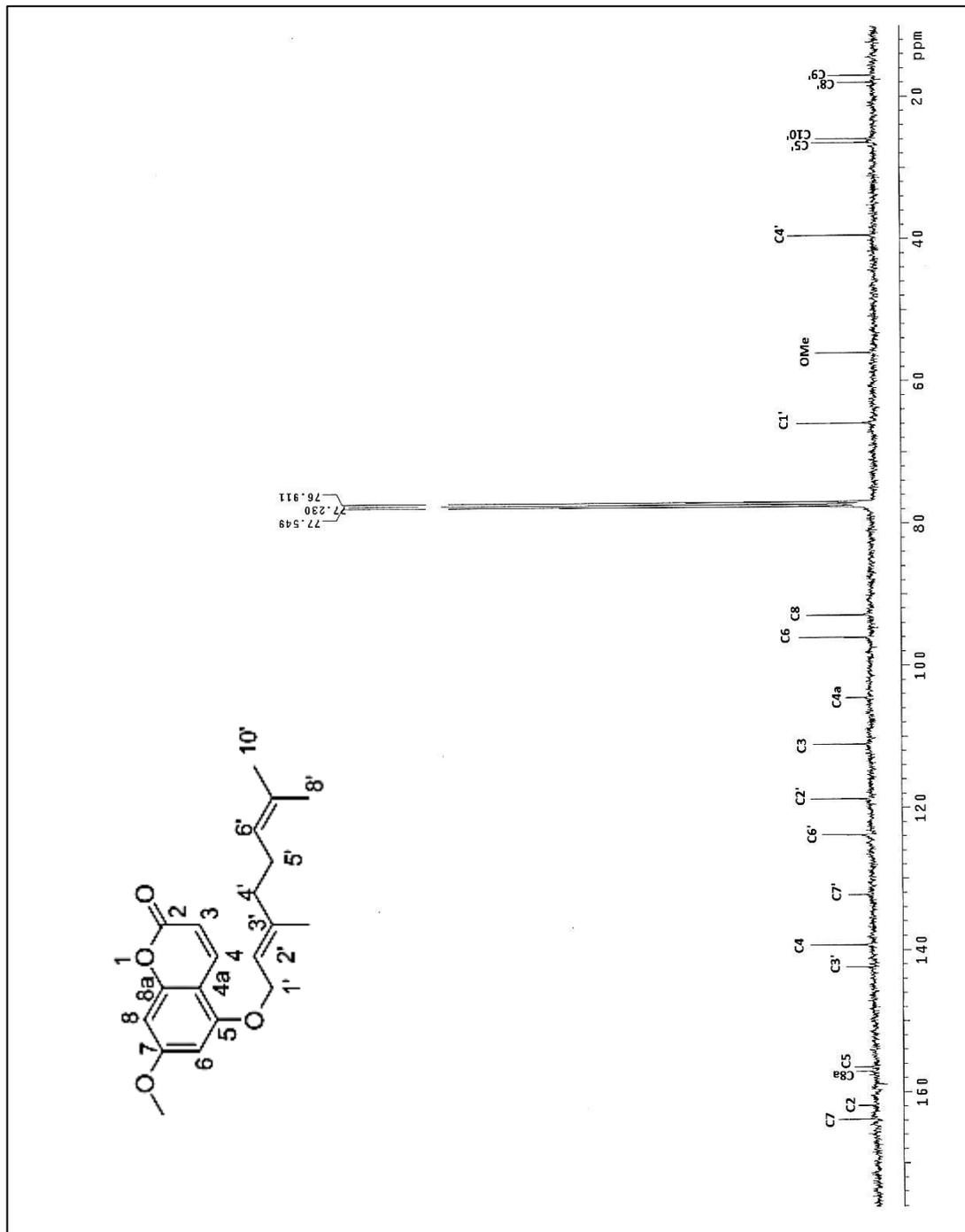


Figura 12. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del compuesto 5-geranoxi-7-metoxi-cumarina

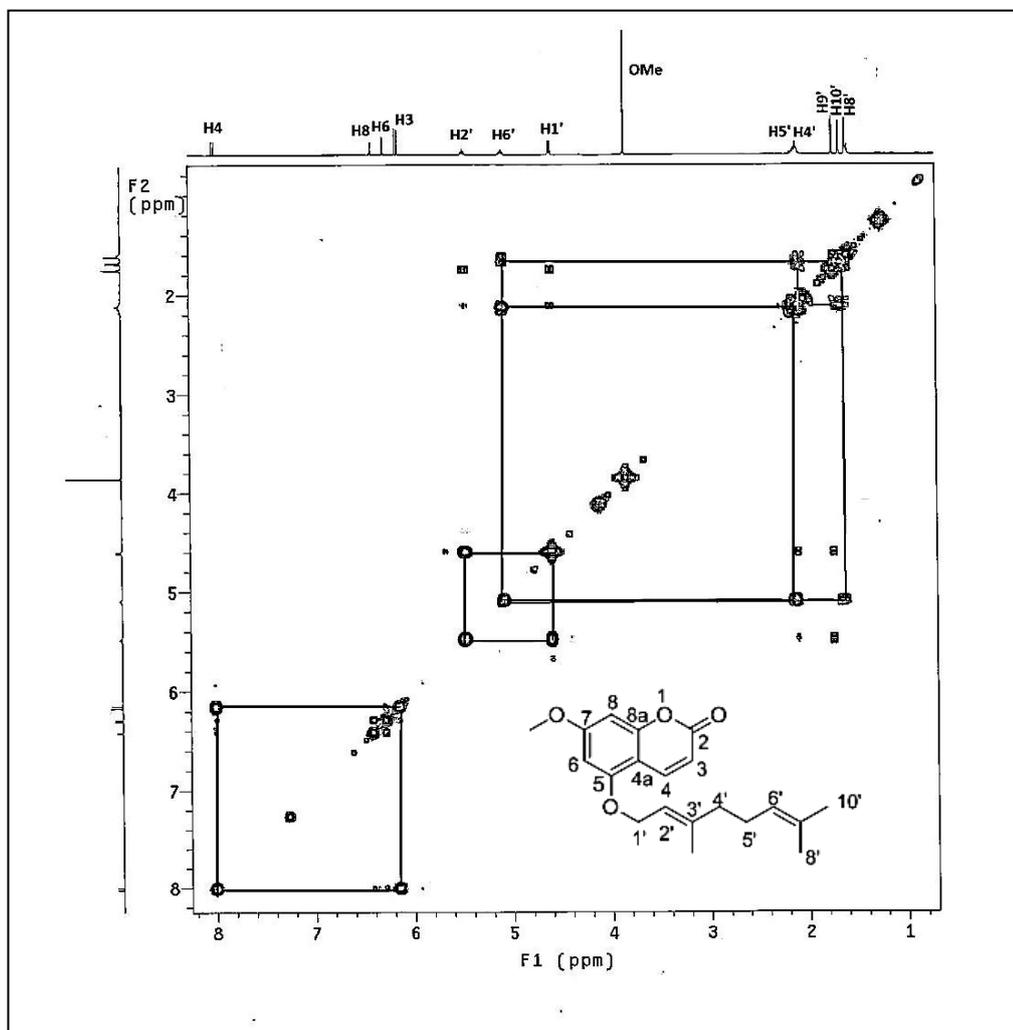


Figura 14. Espectro COSY del compuesto 5-geranoxi-7-metoxi-cumarina

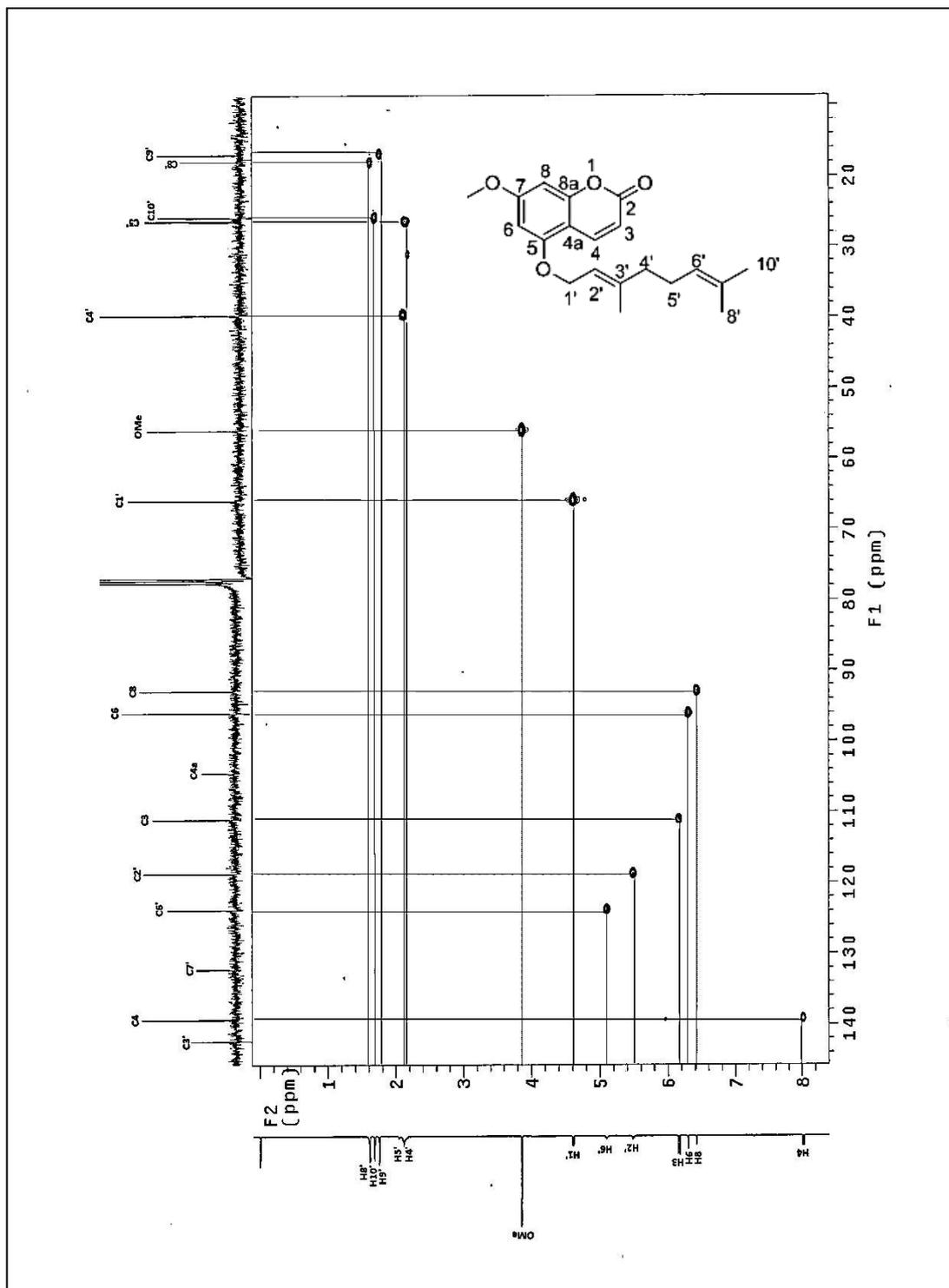


Figura 15. Espectro HSQC del compuesto 5-geranoxi-7-metoxi-cumarina

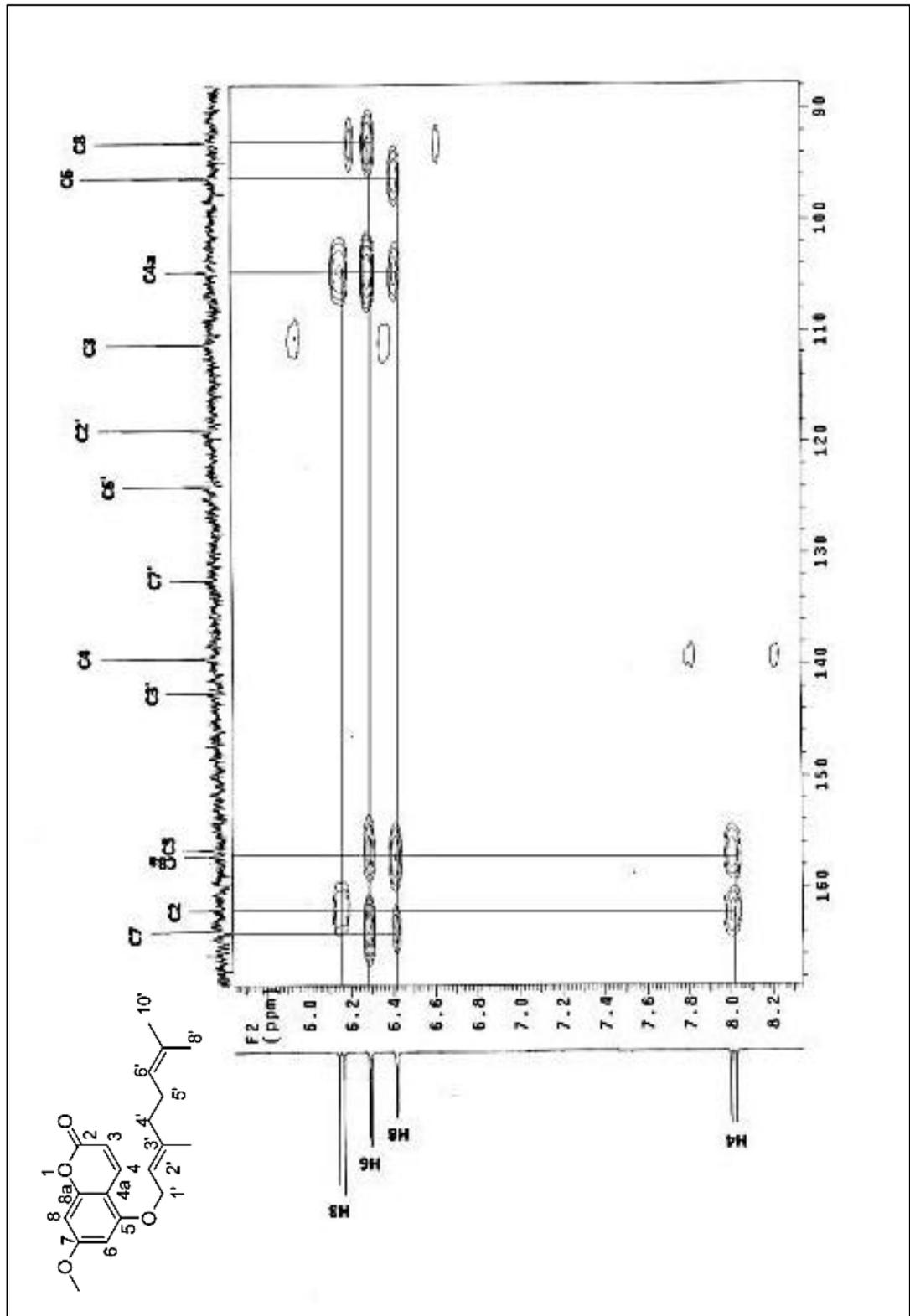


Figura 16. Espectro HMBC del compuesto 5-geranoxi-7-metoxi-cumarina

4.1.3 Elucidación estructural del compuesto 5,7-dimetoxi cumarina o limetina (Ca7)

El punto de fusión, el Rf y el espectro de RMN ^1H de Ca7 nos permitieron concluir se trata de la 5,7-dimetoxi cumarina (Figura 17). Esta cumarina fue la misma que la obtenida previamente del extracto hexánico de la cáscara de *C. aurantifolia* en forma de cristales por Elizondo-Treviño en el 2008. El espectro de RMN ^1H (Figura 18) muestra en δ 7.97 ppm un doblete con una $J= 9.6$ Hz correspondiente a H-4, este protón se acopla con H-3 el cual se observa como un doblete en δ 6.16 ppm ($J= 9.6$ Hz). Asimismo en δ 6.28 y 6.42 ppm se observan dos dobletes ($J= 2\text{Hz}$) metarrelacionados correspondientes a H-6 y H-8, respectivamente. Por último en δ 3.89 y 3.85 ppm se observan dos singuletes que integran para tres protones cada uno y que corresponden a 7-OCH₃ y 5-OCH₃, respectivamente. En la Tabla 6 se muestran las constantes espectroscópicas de la 5,7-dimetoxi-cumarina.

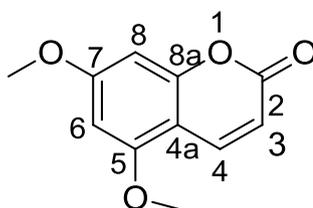


Figura 17. Estructura del compuesto 5,7-dimetoxi cumarina

TABLA 6

Constantes espectroscópicas de RNM ^1H del compuesto 5,7-dimetoxi cumarina

Posición	δH (J en Hz) ^a 400 MHz, CDCl ₃	δH (J en Hz) ^b 400 MHz, CDCl ₃
3	6.16, d (9.6)	6.16, d (9.6)
4	7.97, d (9.6)	7.97, d (9.5)
6	6.28, d (2.4)	6.28, d (2.1)
8	6.42, d (2)	6.41, d (2.3)
5-OMe	3.85, s	3.85, s
7-OMe	3.89, s	3.89, s

^aDatos obtenidos experimentalmente. ^bElizondo- Treviño

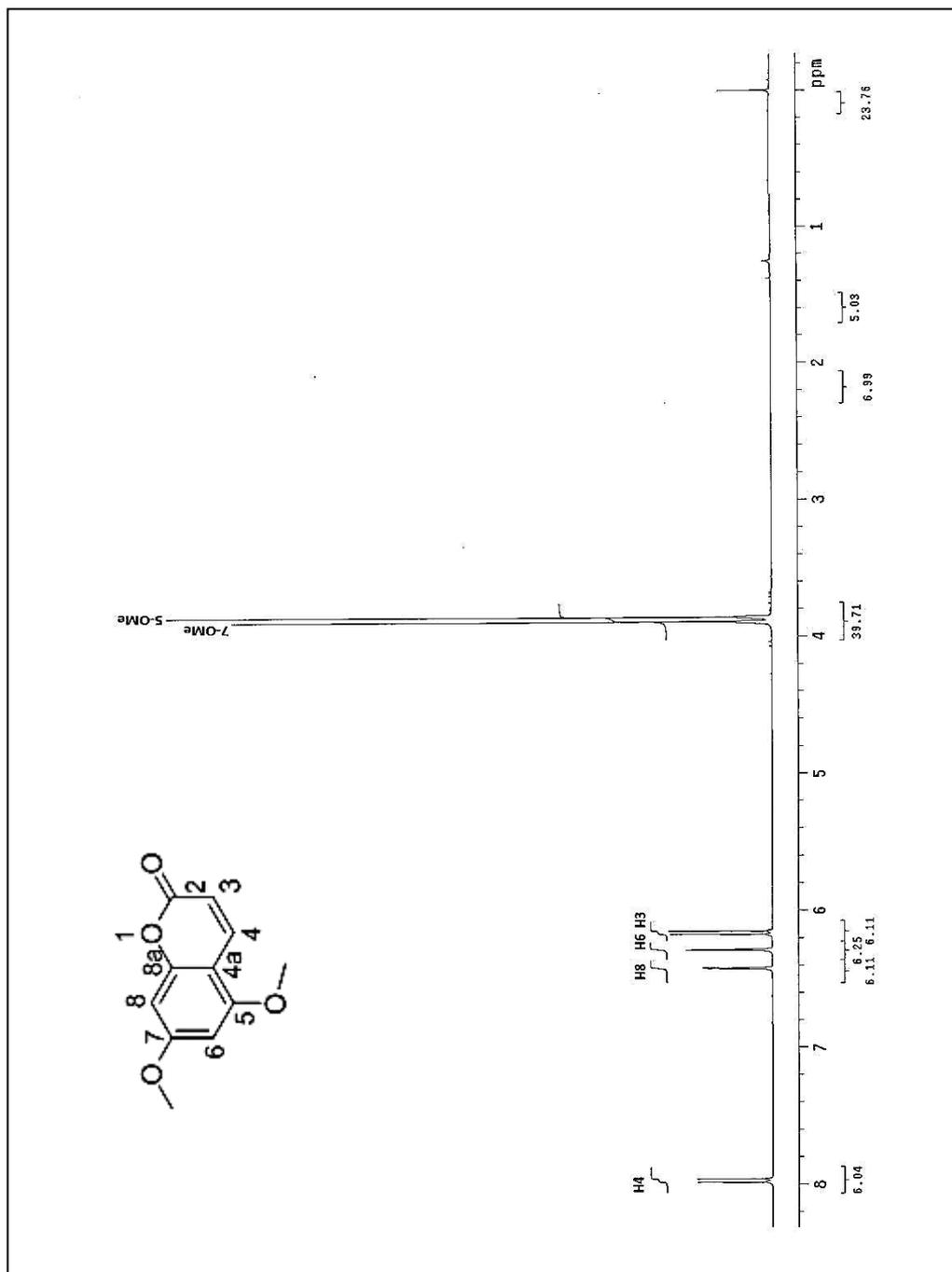


Figura 18. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) del compuesto 5,7-dimetoxi cumarina

4.1.4 Elucidación estructural del compuesto 5-metoxi-psoraleno o Bergapteno (Ca8)

El espectro RMN ^1H (Figura 19) muestra seis señales equivalentes a ocho protones característicos de una furanocumarina metoxilada. A continuación se describen las señales características: en δ 8.16 ppm se observa un doblete con una $J=9.8$ Hz, correspondiente a H-4, el cual se acopla con H-3 localizado en 6.28 ppm como un doblete ($J=9.8$ Hz). En δ 7.14 ppm se observa un singlete que integra para un protón. Adicionalmente en δ 7.6 ppm se observa H-2' como un doblete con una $J=2.8$ Hz, el cual se acopla con H-3' (δ 7.02, $J=2.1$ Hz). Finalmente en δ 4.27 ppm se observa un singlete correspondiente a un grupo metoxilo.

El espectro de RMN ^{13}C (Figura 20) muestra 12 señales, de las cuales la señal a 161.5 ppm corresponde al grupo carbonilo de una lactona cumarínica y en 60.3 ppm un grupo metoxilo, además se observan 10 carbonos aromáticos. En la Tabla 7 se resumen las constantes espectroscópicas de Ca8. De acuerdo al análisis del espectro de RMN ^1H y de ^{13}C el compuesto podría ser el 5-metoxi-psoraleno o el 8-metoxi-psoraleno, por lo que se buscó en la literatura las constantes espectroscópicas de ambos compuestos y se encontró que el compuesto Ca8 corresponde al 5-metoxi-psoraleno (Figura 21) reportado previamente por Yu Hongwei y colaboradores (72).

Lo anterior fue confirmado por el análisis de RMN doble dimensión. En el espectro COSY (Figura 22) se observa la correlación que existe entre el protón H-4 y H-3, así como también entre los protones H-2' y H-3'. Adicionalmente fue realizado el experimento de HMBC (figura 23) en donde se observan las correlaciones que existen entre protones y carbonos a larga distancia, cada una de las correlaciones se muestran en la Tabla 7.

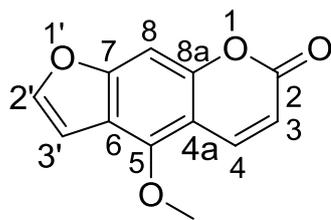


Figura 21. Estructura química del compuesto 5-metoxi-psoraleno

TABLA 7

Constantes espectroscópicas de RMN de ^1H y ^{13}C y HMBC de 5-metoxi-psoraleno

Posición	δH (J en Hz) ^a 700 MHz, CDCl_3	δH (J en Hz) ^b 600 MHz, CDCl_3	δC^a 176 MHz, CDCl_3	δC^b 150 MHz, CDCl_3	HMBC
2			161.53	161.2	
3	6.28, d (9.8)	6.26, d (9.6)	112.76	112.5	H-3/C-2, C-8a
4	8.16, dd (9.8, 0.7)	8.15, d (9.6)	139.53	139.2	H-4/C-2, C-4a
4a			152.90	152.7	
5			149.78	149.5	
6			112.87	112.7	
7			158.59	158.3	
8	7.14, dd (1.4, 0.7)	7.13, s	94.07	93.8	H-8/C-4a, C-6, C-8a, C-8
8a			106.61	106.4	
2'	7.6, d (2.8)	7.59, d (2.5)	145.01	144.7	H-2'/C-7, C-6
3'	7.02, dd (2.1, 1.4)	7.02, d (2.5)	105.26	105.2	H-3'/C-7, C-2', C-6
5-OMe	4.27, s	4.26, s	60.3	60.0	

^aDatos obtenidos experimentalmente. ^bYu Hongwei y col.

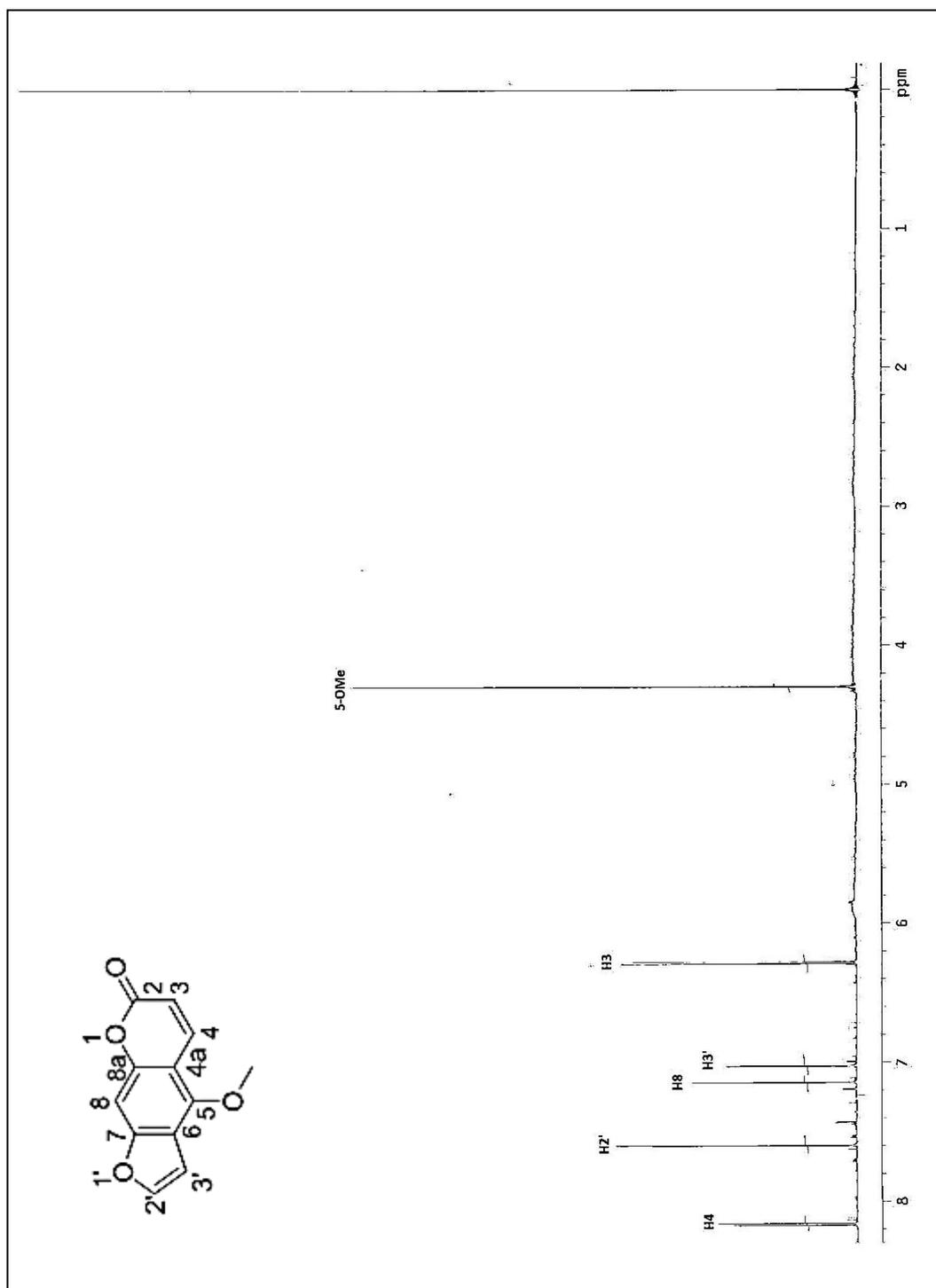


Figura 19. Espectro de RMN ^1H (700 MHz, CDCl_3) del compuesto 5-metoxi-psoraleno

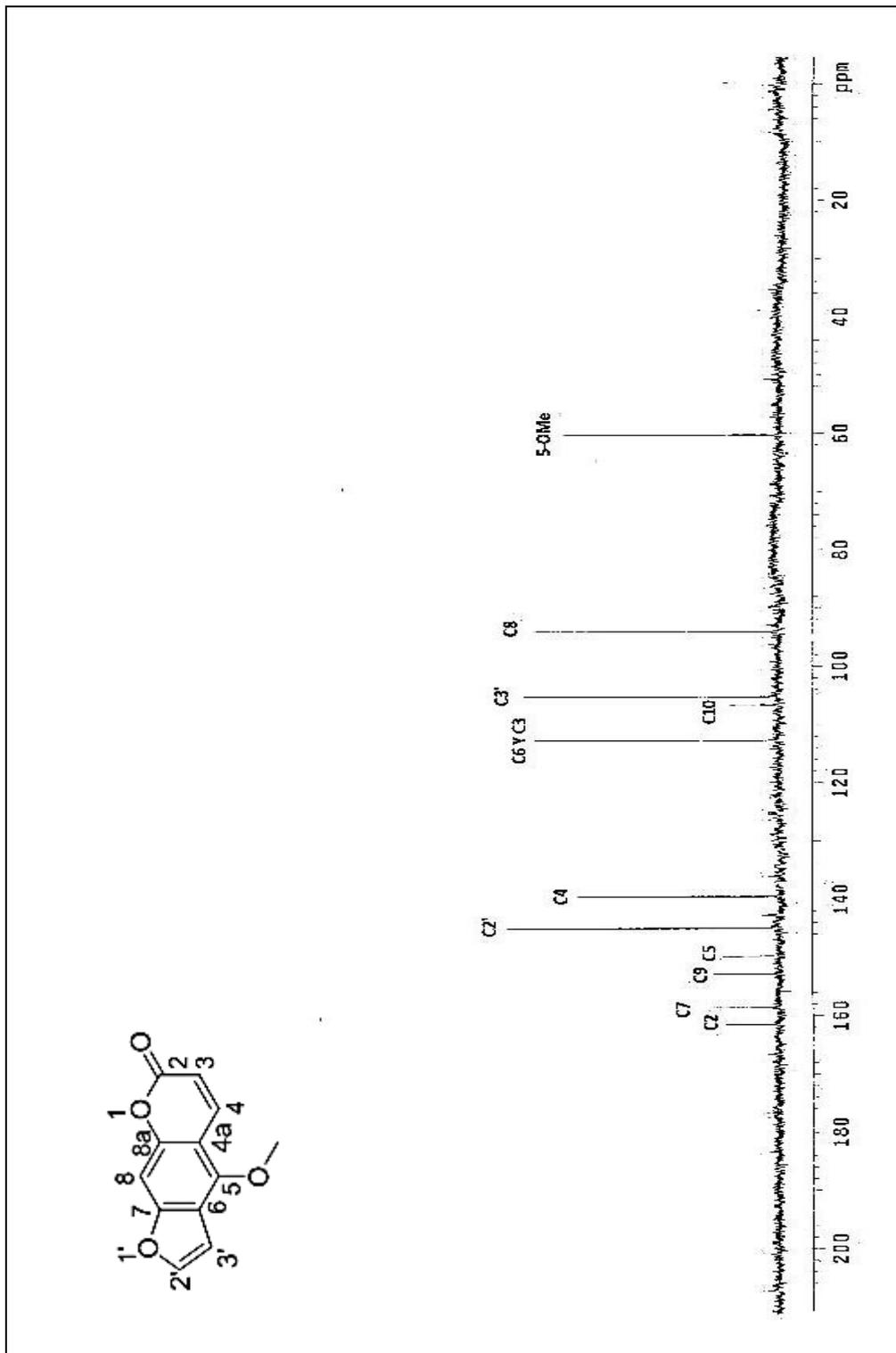


Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C (176 MHz, CDCl_3) del compuesto 5-metoxi-psoraleno

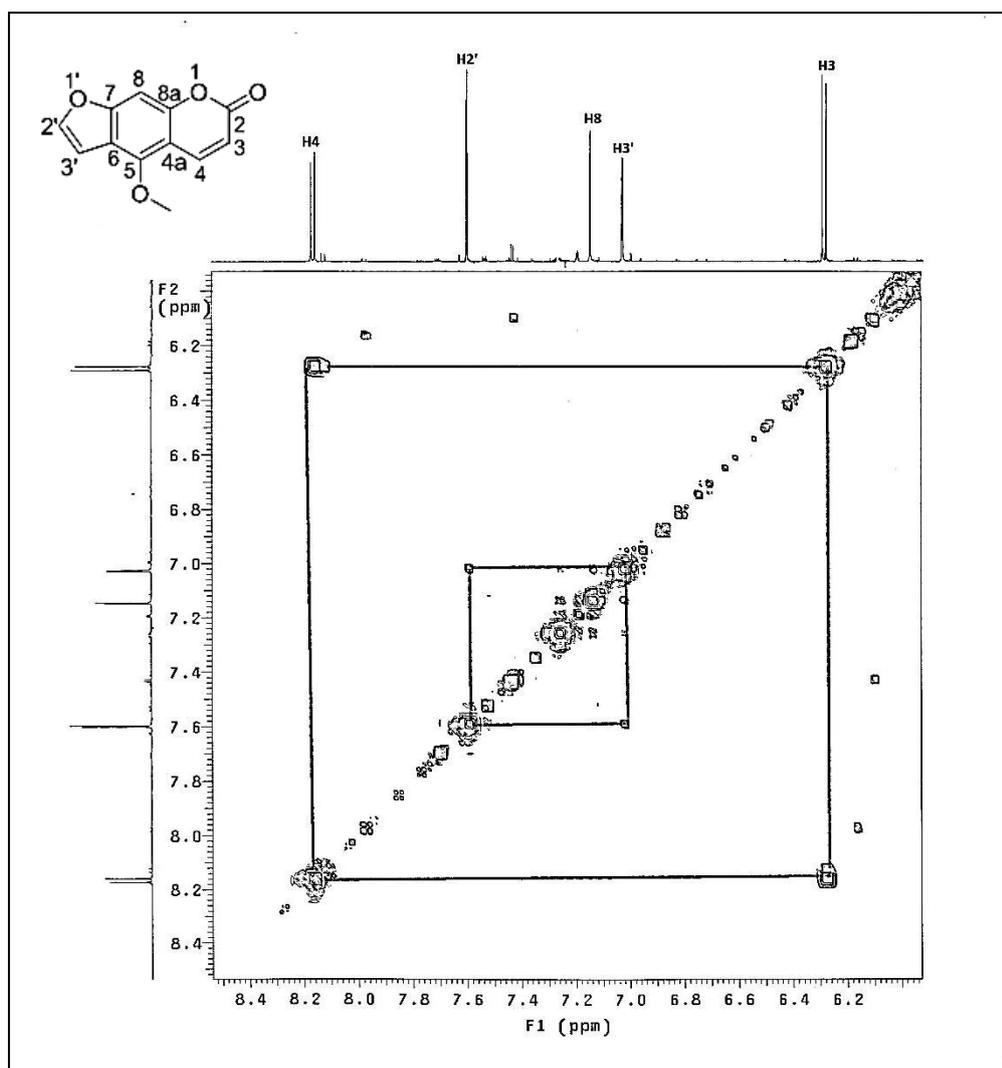


Figura 22. Espectro COSY del compuesto 5-metoxi-psoraleno

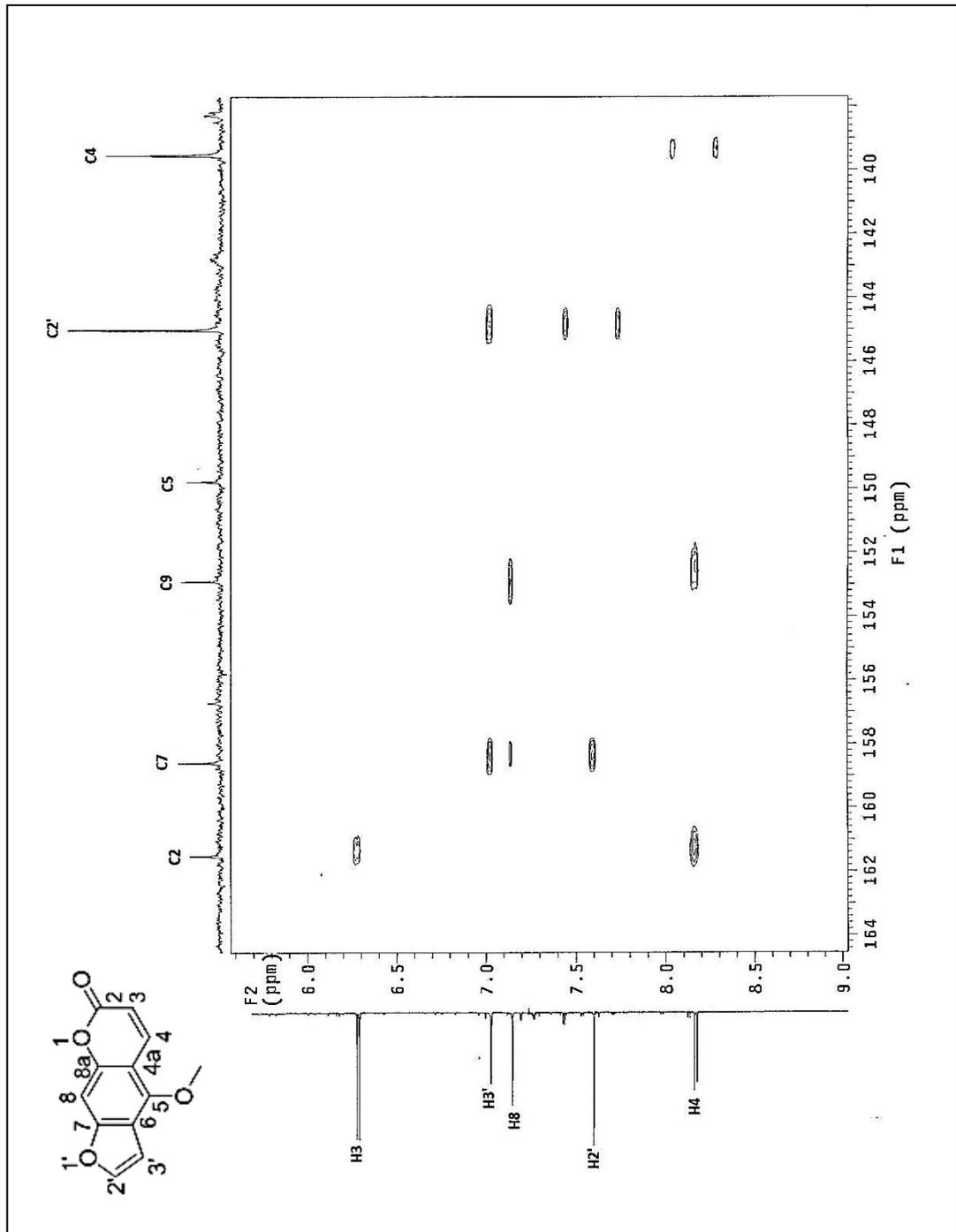


Figura 23. Espectro HMBC del compuesto 5-metoxi-psoraleno

4.1.5 Elucidación estructural del compuesto 5,8-dimetoxi-psoraleno o Isopimpinellina (Ca9)

El espectro de RMN ^1H (Figura 24) del compuesto Ca9 muestra señales para cuatro protones aromáticos característicos de una furanocumarina doblemente metoxilada de acuerdo a la siguiente discusión: para el anillo de la lactona se observa un doblete ($J= 10 \text{ Hz}$) en δ 8.12 ppm correspondiente a H-4, el cual se acopla con H-3 (δ 6.29, d, $J= 10 \text{ Hz}$). Por otra parte, se observan dos dobletes, uno en δ 7.63 ppm (d, $J= 1.6 \text{ Hz}$) y el otro en 7.00 ppm (d, $J= 1.2 \text{ Hz}$) los cuales corresponden a los protones H-2' y H-3' del anillo de furano. Finalmente, se observa un singulete en δ 4.16 ppm que integra para seis protones y que corresponde a los protones de los metoxilos 5 y 8.

El espectro de RMN ^{13}C (Figura 25) se observan 13 señales, de las cuales se puede destacar la señal en δ 160.72 ppm característica del C-2 de una lactona α,β -insaturada. También, se observan las señales para dos metoxilos en δ 61.95 y 61.06 ppm y para los carbonos de benceno y furano (Tabla 8). En la Tabla 8 se resumen los datos espectroscópicos de Ca9, el cual se caracterizó como la 5,8-dimetoxipsoraleno o isopimpinellina (Figura 26) por comparación de sus datos espectroscópicos con los previamente reportados para este compuesto por Miyazawa y colaboradores en el 2004 (73).

Cabe mencionar que para confirmar la elucidación estructural del 5,8-dimetoxi psoraleno fueron realizados estudios de DEPT 45, 90 y 135, aunado a experimentos de doble dimensión. En el caso de DEPT 45 (Figura 27) se observan seis señales correspondientes al C-3' (δ 105.32), C-3 (δ 113.10), C-4 (δ 139.64), C-2' (δ 145.35) y dos $-\text{OCH}_3$ (δ 61.06 y 61.96). Asimismo en el espectro de RMN DEPT 90 (Figura

28) se observan cuatro señales correspondientes a los metinos (C-3, C-4, C-2' y C3'). Cabe mencionar que, el espectro de RMN DEPT 135 es igual al espectro de DEPT 45 ya que la molécula no presenta en su estructura metilenos, apareciendo únicamente los metilos y metinos.

En el experimento de doble dimensión COSY (Figura 29) se puede observar la correlación entre los protones H-3 y H-4 así como entre los protones H-2' y H-3'. Lo anterior pudo ser confirmado por la interacción que existe entre estos protones en el espacio por medio de espectro de NOESY mostrado en la Figura 30. Por otro lado, en la Figura 31 se muestra el espectro de HETCOR, el cual muestra la correlación entre los carbonos C-3, C-4, C-2' y C-3' con sus respectivos protones.

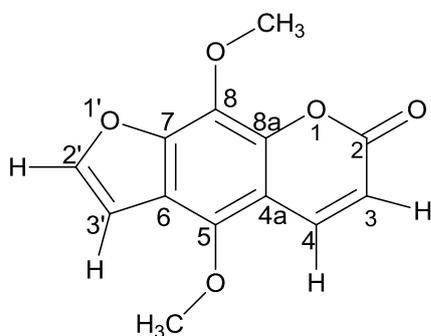


Figura 26. Estructura del compuesto 5,8-dimetoxi-psoraleno

TABLA 8

Constantes espectroscópicas de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto 5,8-dimetoxi psoraleno

Posición	δH (J en Hz) ^a 400 MHz, CDCl_3	δH (J en Hz) ^b 500 MHz, CDCl_3	δC^a 100 MHz, CDCl_3	δC^b 125 MHz, CDCl_3
2			160.72	160.6
3	6.29, d (10)	6.29, d (9.7)	113.10	112.9
4	8.12, d (10)	8.12, d (9.7)	139.64	139.1
4a			107.87	107.7
5			144.52	144.4
6			115.03	114.9
7			150.24	150.1
8			128.45	128.3
8a			143.92	143.8
2'	7.63, d (1.6)	7.63, d (2.3)	145.35	145.2
3'	7.00, d (1.2)	7.00, d (2.3)	105.32	105.2
5-OMe	4.16, s	4.16, s	61.96	61.8
8-OMe		4.17, s	61.06	60.9

^aDatos obtenidos experimentalmente. ^bMiyazawa y col.

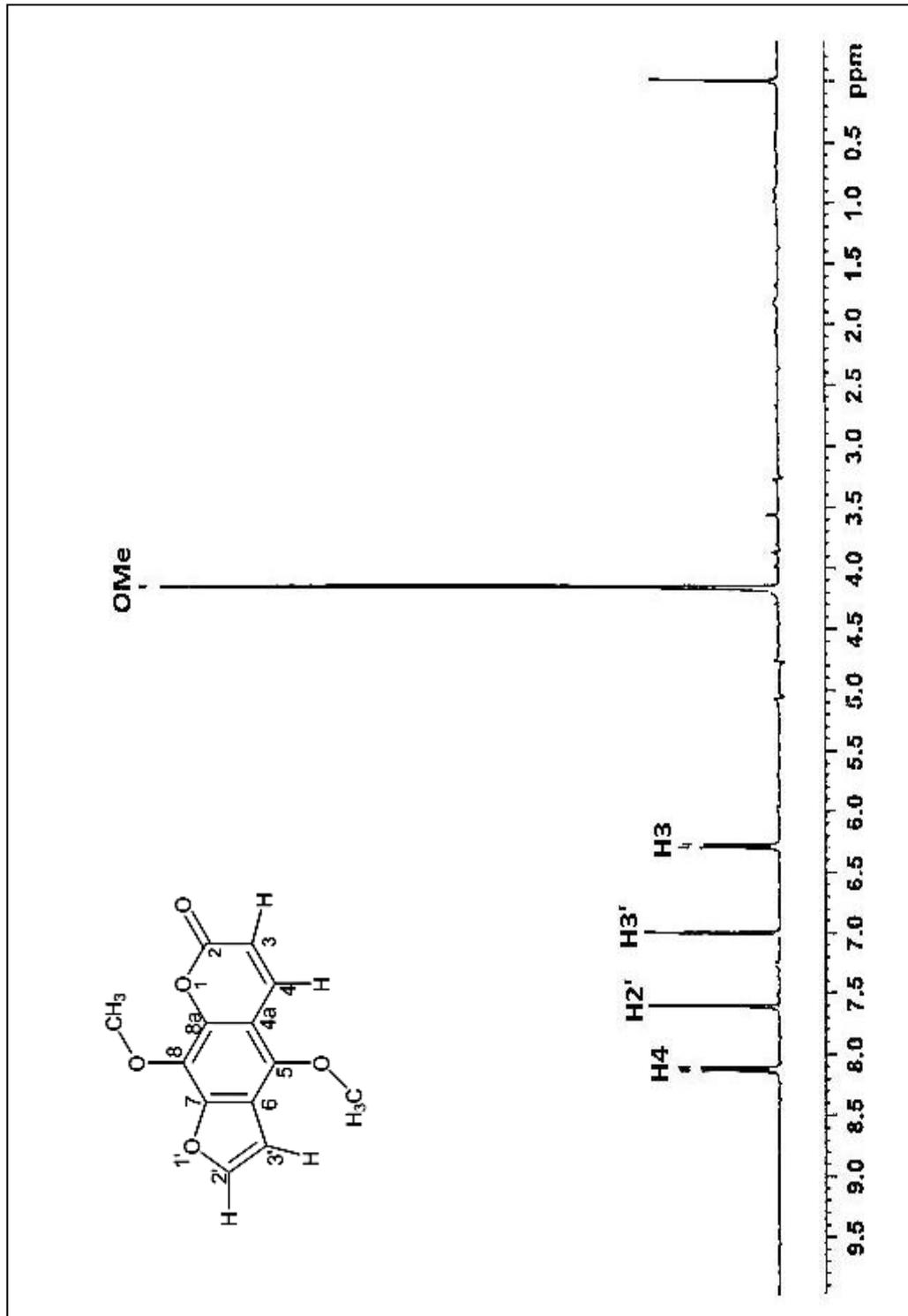


Figura 24. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 5,8-dimetoxi-psoraleno.

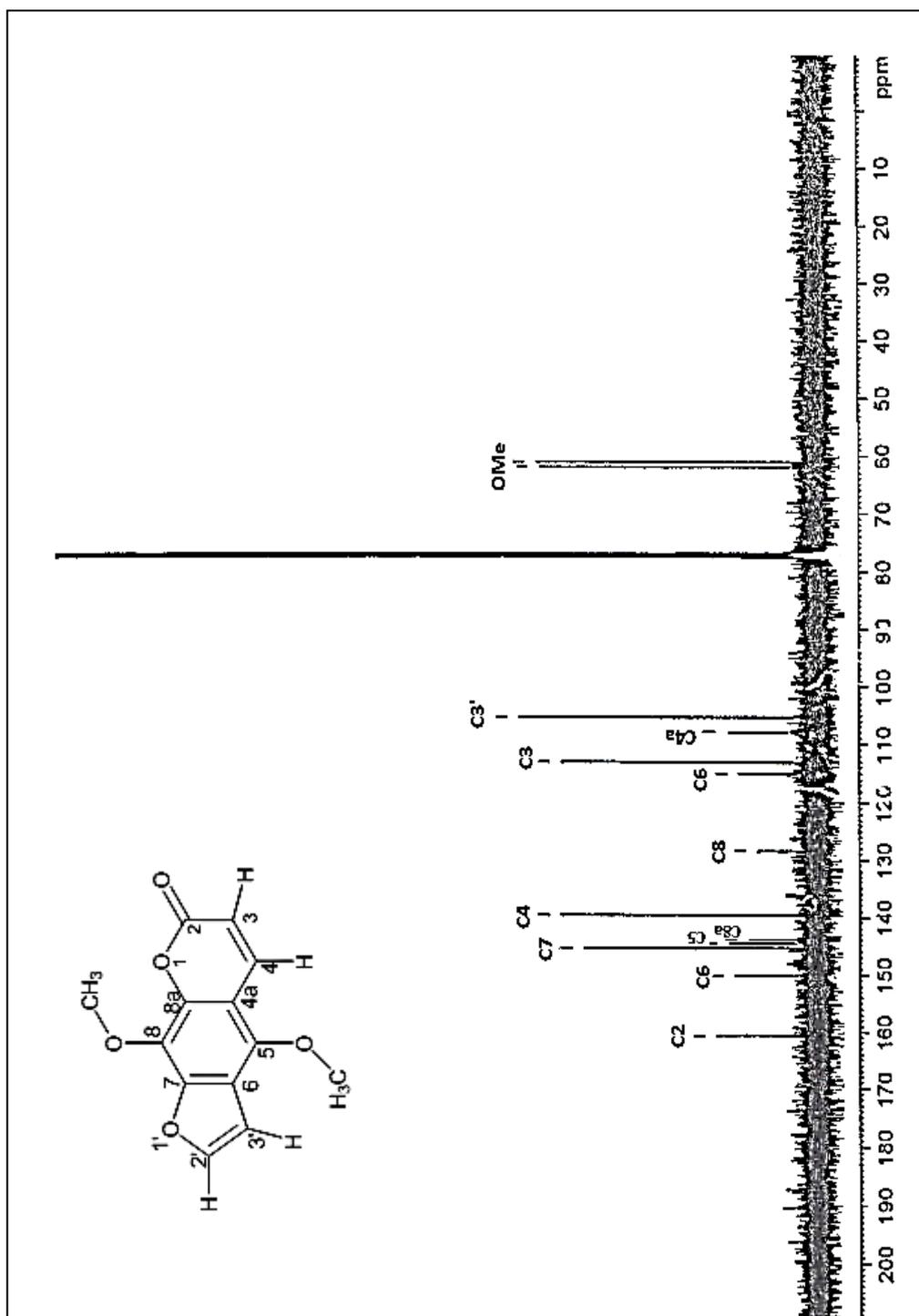


Figura 25. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 5,8-dimetoxi-psoraleno.

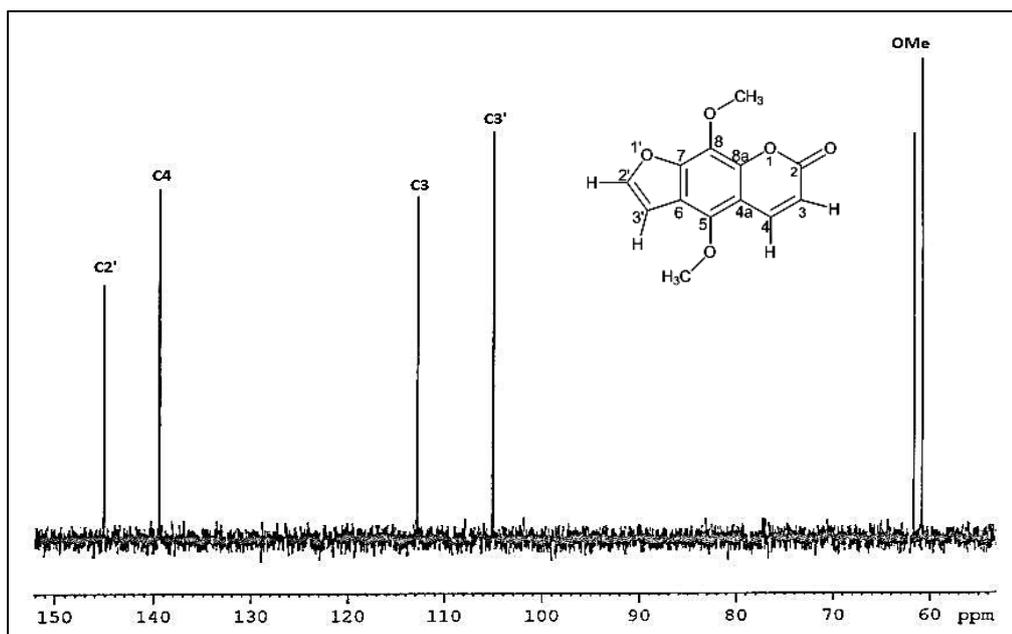


Figura 27. Espectro de DEPT 45 del compuesto 5,8-dimetoxi-psoraleno

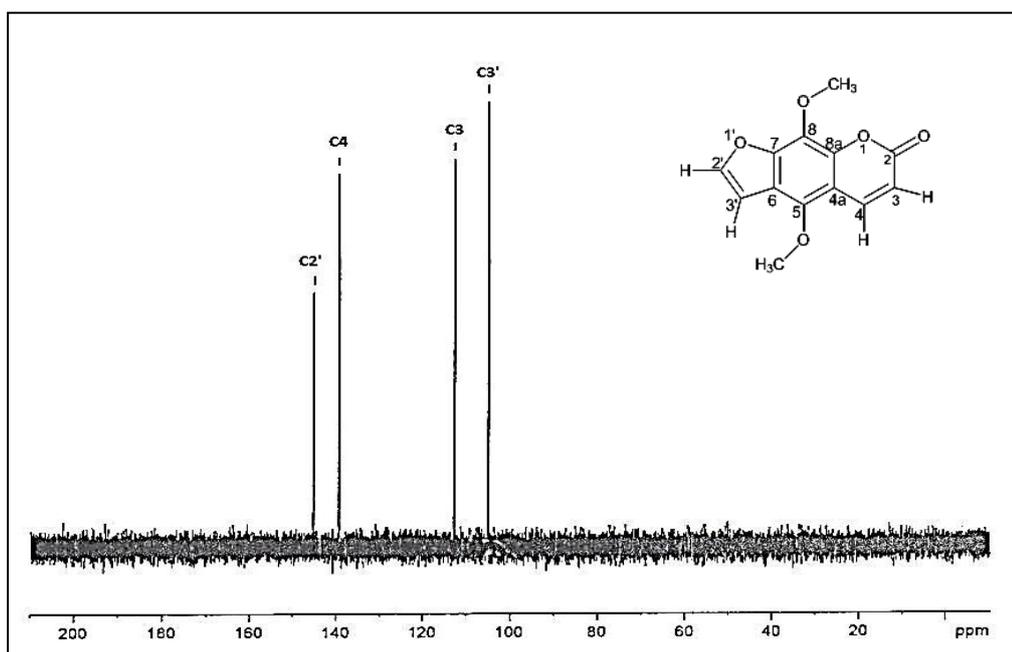


Figura 28. Espectro de DEPT 90 del compuesto 5,8-dimetoxi-psoraleno

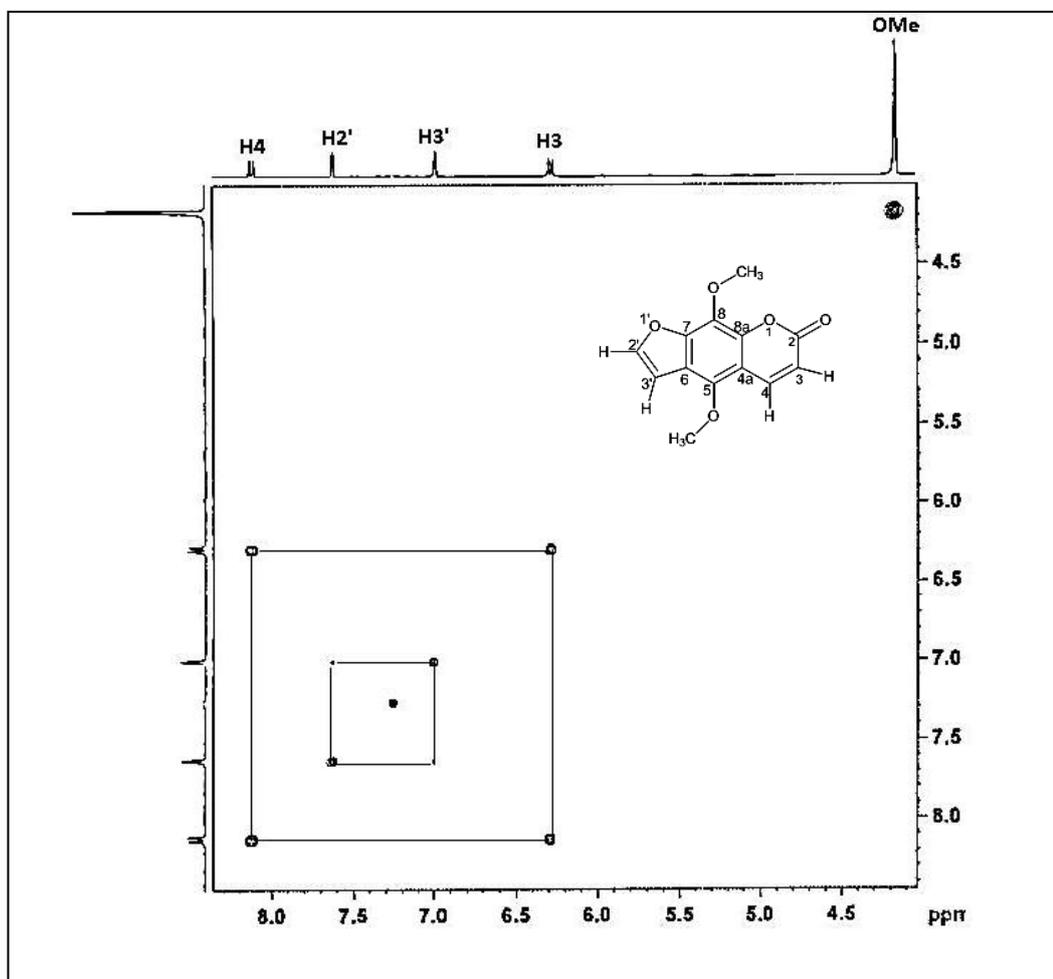


Figura 29. Espectro de COSY del compuesto 5,8-dimetoxi-psoraleno

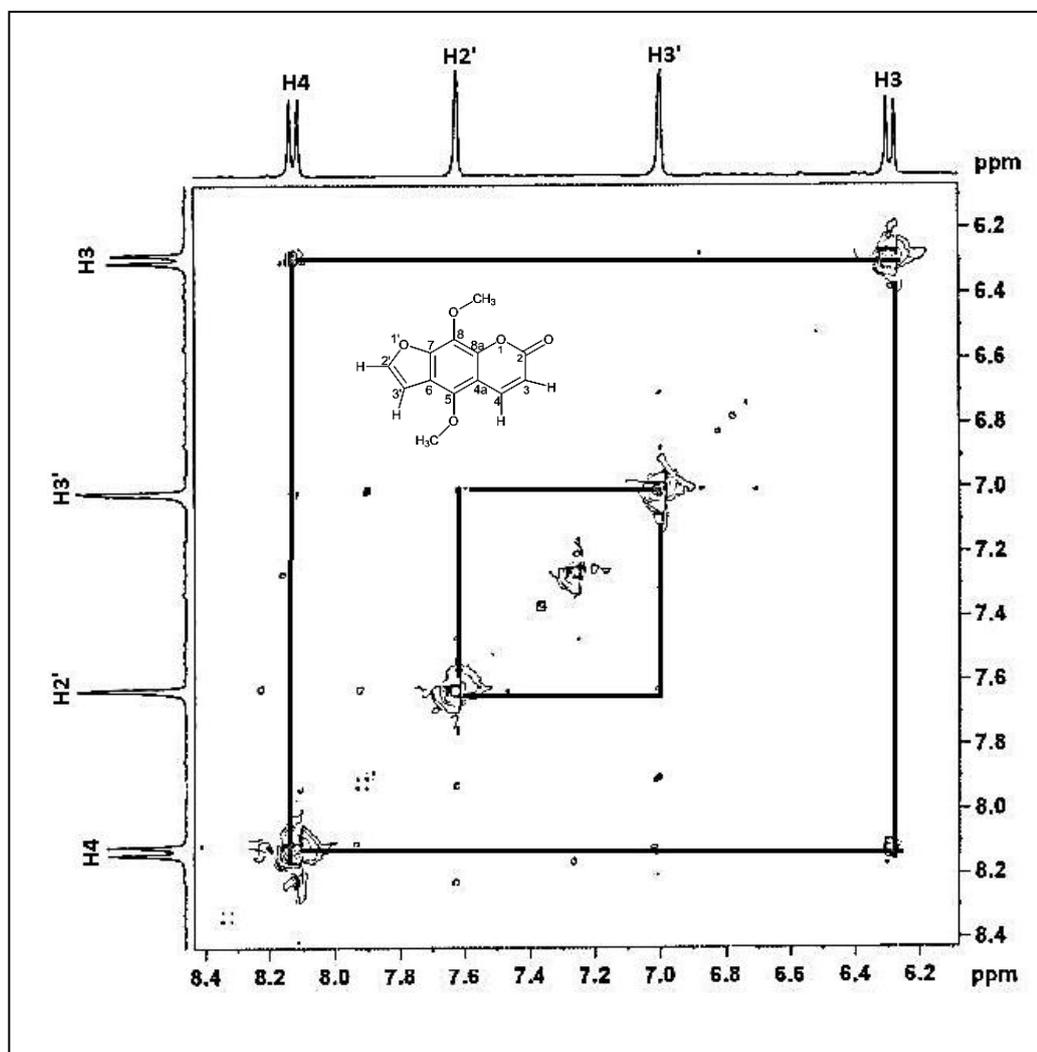


Figura 30. Espectro de NOESY del compuesto 5,8-dimetoxi-psoraleno

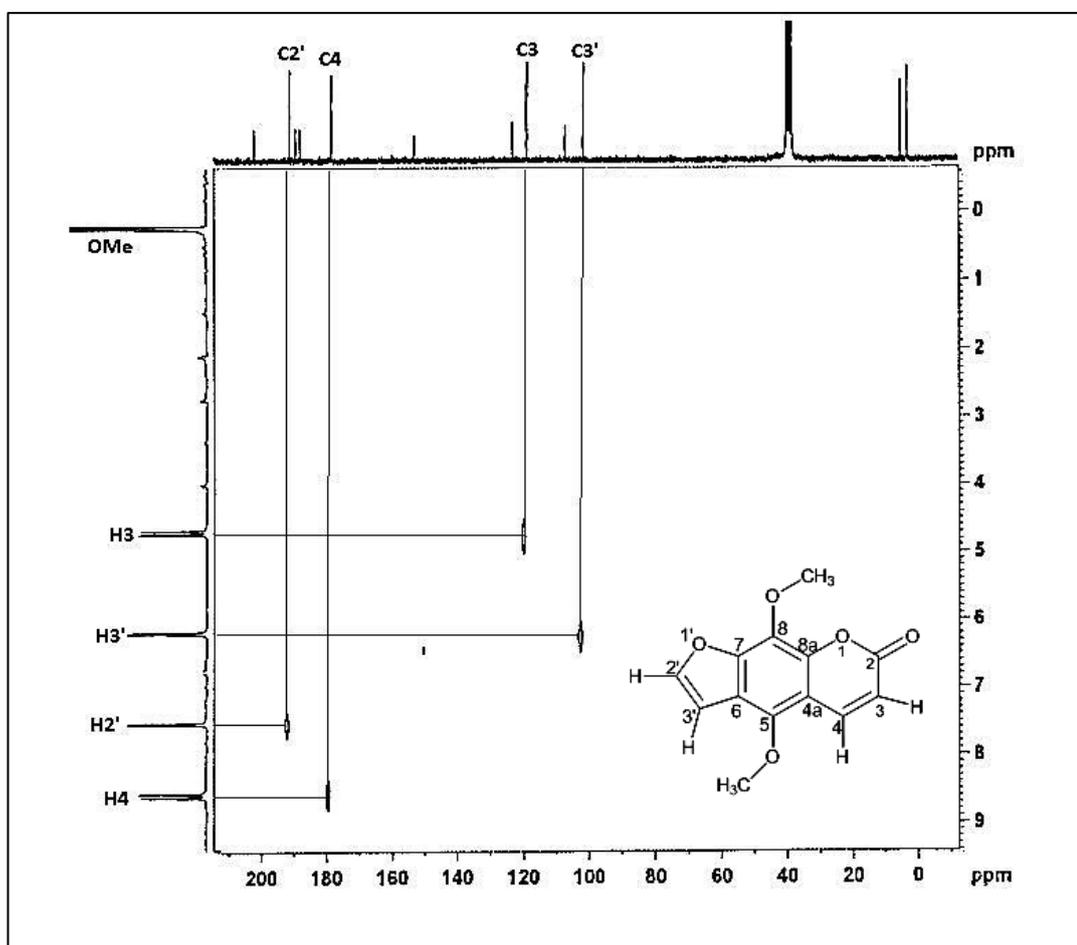


Figura 31. Espectro HETCOR del compuesto 5,8-dimetoxi-psoraleno

4.2 Compuestos identificados por CG/EM

Para identificar los compuestos volátiles del extracto hexánico de *C. aurantifolia* se realizó un análisis por CG/EM del mismo y lográndose identificar 40 compuestos, los cuales se enlistan en la Tabla 9 y se ubican en las siguientes clases de compuestos: nueve monoterpenos, cinco sesquiterpenos, cinco cetonas, cuatro alcanos, cuatro cumarinas, tres ácidos grasos, tres alcoholes, dos ésteres, dos éteres, un fenol, un aldehído y una hidroxiacetona. En la Figuras 32 y 33 se muestran las estructuras químicas de los compuestos identificados.

TABLA 9

Compuestos separados e identificados por CG/EM del extracto hexánico de la cáscara de *C. aurantifolia*.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Porcentaje de abundancia	Fórmula molecular	Peso molecular g/mol
Tetrahidro-2-metil-2H-pirano	5.241	0.556	C ₆ H ₁₂ O	100.06
4-Hexen-3-ona	5.541	0.339	C ₆ H ₁₀ O	98.06
3-Metil-3-penten-2-ona	5.665	0.382	C ₆ H ₁₀ O	98.06
3-Hexen-2-ona	5.665	0.382	C ₆ H ₁₀ O	98.06
Pinacol	6.290	1.313	C ₆ H ₁₆ O ₂	120.06
Resorcinol	8.349	2.848	C ₆ H ₆ O ₂	110.06
<i>p</i> -Cimeno	8.851	0.275	C ₁₀ H ₁₄	148.11
1-Metoxi-ciclohexeno	9.600	6.243	C ₇ H ₁₂ O	112.07
Óxido de linalol	9.965	0.915	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170.10
Acetato de crisantenilo	10.604	0.310	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	194.13

CONTINÚA

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Porcentaje de abundancia	Fórmula molecular	Peso molecular g/mol
Corilon	10.916	5.406	C ₆ H ₈ O ₂	112.06
Terpinen-4-ol	11.464	1.300	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25
α-Terpineol	11.737	4.663	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25
3-Metil-1,2-ciclopentanediona	12.115	6.460	C ₆ H ₈ O ₂	112.06
Carvona	12.487	0.689	C ₁₀ H ₁₄ O	136.09
Geraniol	12.597	0.895	C ₁₀ H ₁₈ O	154.10
Citral	12.773	1.725	C ₁₀ H ₁₆ O	152.1
1,8-Dimetil-4-(1-metiletil)-spiro [4,5]dec-6-en-8-ona	12.956	0.439	C ₁₅ H ₂₄ O	220.16
Formato de geraniol	13.106	0.551	C ₁₁ H ₁₈ O ₂	182.11
Ácido oléico	13.933	0.538	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.19
Acetato de (2)-7-metil-8-tetradecenilo	14.200	2.213	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	268.18
α-Bergamoteno	14.963	0.779	C ₁₅ H ₂₄	204.35
Trans-α-Bisaboleno	15.894	0.800	C ₁₅ H ₂₄	204.35
Óxido de cariofileno	17.048	2.355	C ₁₅ H ₂₄ O	220.36
Espatuleno	17.595	1.519	C ₁₅ H ₂₄ O	220.35
Umbelliferona; 7-metoxicumarina	19.061	3.377	C ₁₀ H ₈ O ₃	176.10
1-Heptatriaconanol	19.367	0.150	C ₃₇ H ₇₆ O	536.40
Trans-Fitol	19.530	0.169	C ₂₀ H ₄₀ O	296.21
Versálico	20.077	0.398	C ₁₈ H ₂₆ O	258.19
Palmitato de metilo	20.449	0.228	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270.18
Ácido palmítico	21.178	5.381	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.17

CONTINÚA

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Porcentaje de abundancia	Fórmula molecular	Peso molecular g/mol
5,7-Dimetoxicumarina	21.823	12.326	$C_{11}H_{10}O_4$	206.19
5-Metoxi-psoraleno	22.768	0.752	$C_{12}H_8O_4$	280.19
Ácido linoléico	22.768	0.752	$C_{18}H_{32}O_2$	280.19
Tricosano	23.876	0.244	$C_{23}H_{46}$	338.2
5,8-Dimetoxi-psoraleno	24.117	4.745	$C_{13}H_{10}O_5$	246.13
Pentacosano	25.857	0.360	$C_{25}H_{50}$	352.27
Tetracosanal	27.798	0.546	$C_{24}H_{48}O$	352.26
Octacosano	28.776	0.307	$C_{28}H_{58}$	394.30
Nonacosano	33.408	0.389	$C_{29}H_{60}$	408.31

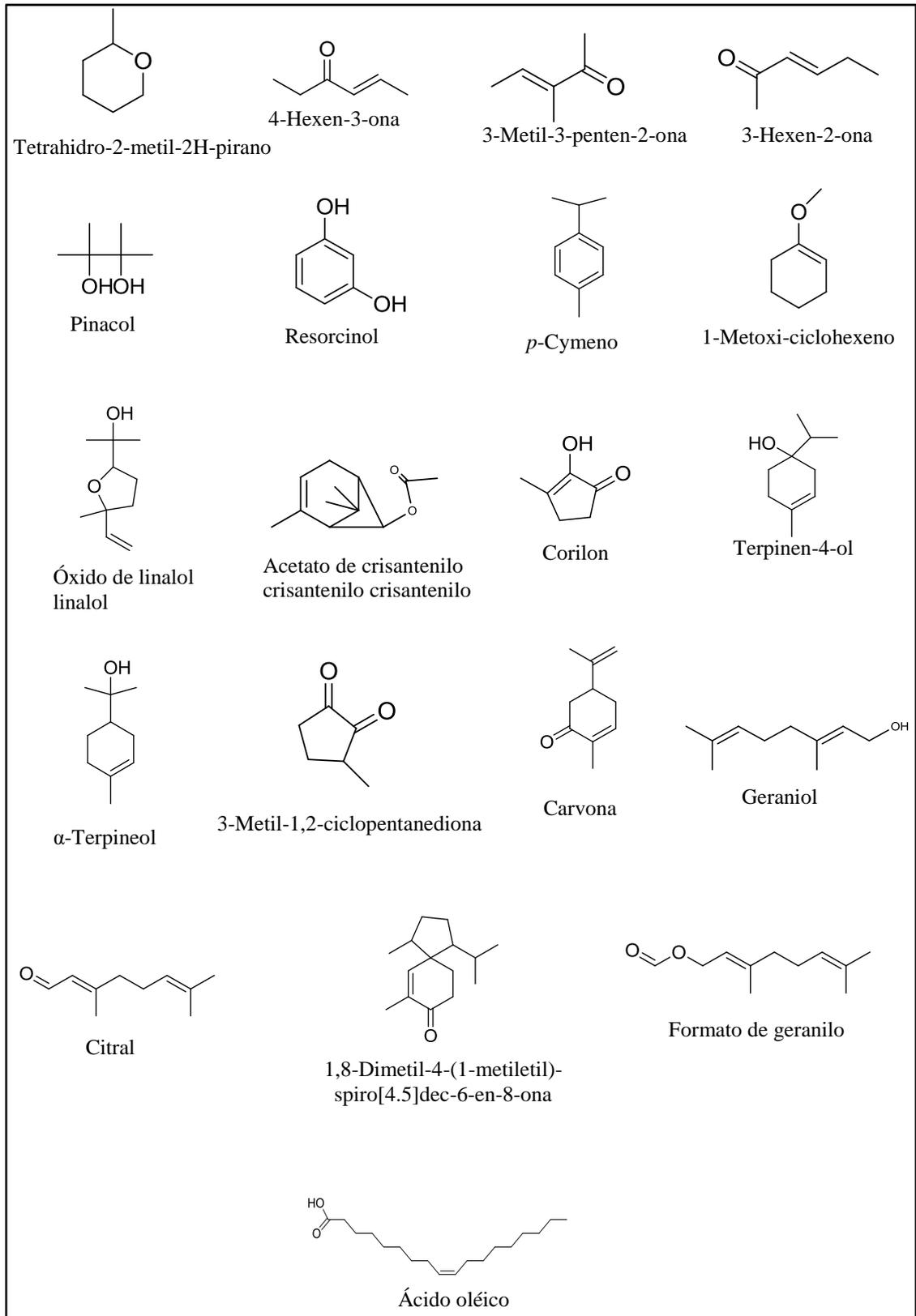


Figura 32. Estructura química de los compuestos identificados del extracto hexánico de

C. aurantifolia

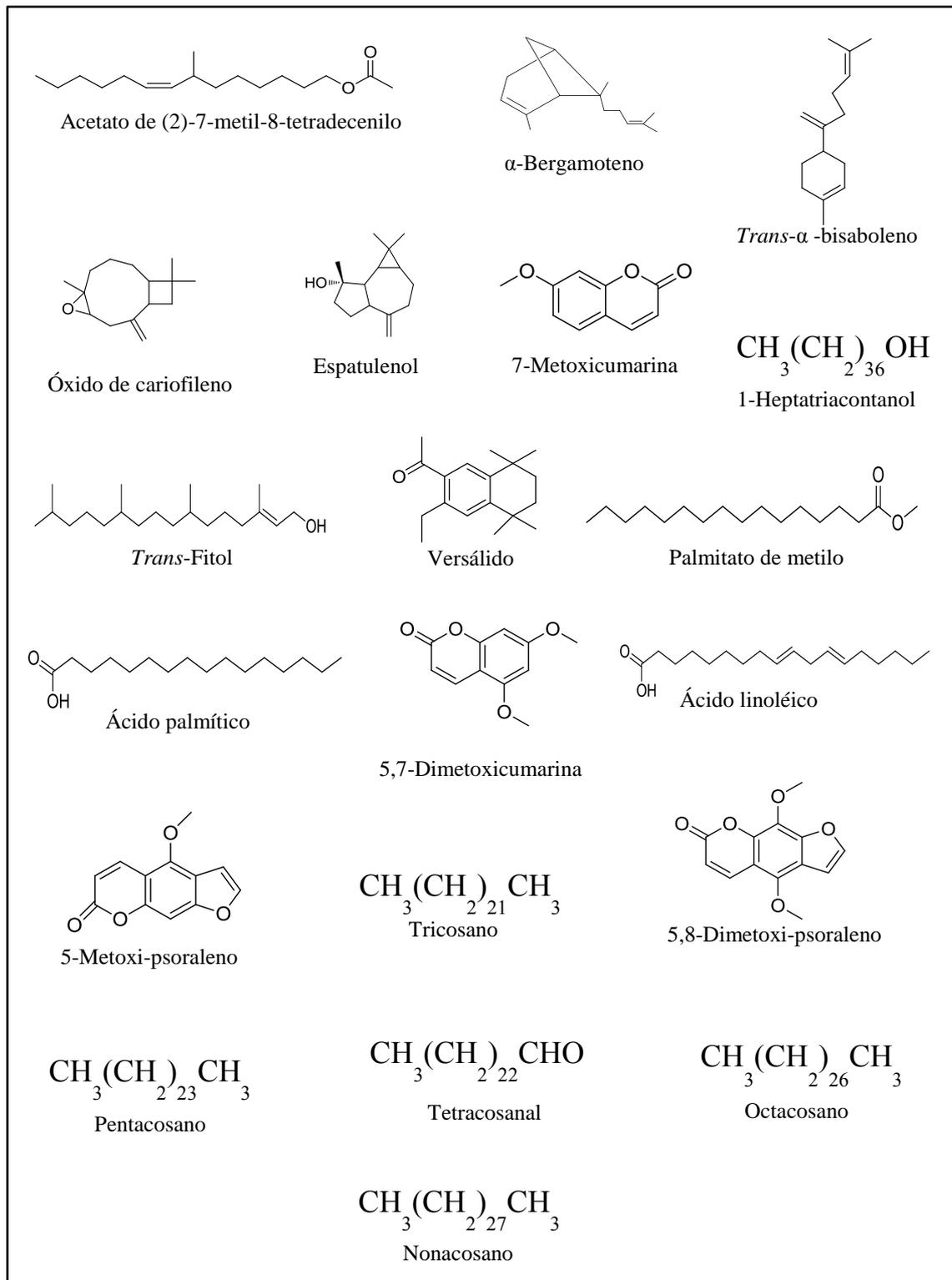


Figura 33. Estructura química de los compuestos identificados del extracto hexánico de

C. aurantifolia

De acuerdo a lo revisado en la literatura en cuanto a la composición química de la cáscara de *C. aurantifolia* (ver antecedentes), nos podemos percatar que está constituida principalmente de terpenos, cumarinas, furanocumarinas, flavonoides, compuestos fenólicos, pectinas, entre otros. También, pudimos observar que la composición química que reportan los investigadores varía de acuerdo a la región donde se recolecta el material vegetal, la estación de colecta, las condiciones en la que se obtienen los aceites esenciales (por presión, destilación, hidro-destilación, etc) o por las condiciones en que se analizan las muestras en el CG-EM (rampas de temperatura, fases estacionarias empleadas, bases de datos). Asimismo, en este proyecto se lograron identificar 22 metabolitos secundarios que anteriormente no habían sido identificados en la cáscara de *C. aurantifolia* y que se describen por primera vez en esta planta, estos compuestos se enlistan en la Tabla 10. Otro aspecto importante a mencionar es que hay solo un reporte previo del estudio químico del extracto hexánico de la cáscara de *C. aurantifolia* donde lograron obtener dos flavonoides (53); mientras que en el presente proyecto de investigación encontramos cumarinas, furanocumarinas, terpenos, compuestos fenólicos, cetonas, entre otros. La diferencia en el contenido de metabolitos secundarios entre ambos estudios puede ser debido probablemente a lo mencionado anteriormente.

TABLA 10

Compuestos identificados por primera vez en la cáscara de *C. aurantifolia*

Compuestos	
Tetrahydro-2-metil-2H-pirano	Acetato de (2)-7-metil-8-tetradecenilo
4-Hexen-3-ona	Espatulenol
Pinacol	1-Heptatriacotanol
Resorcinol	<i>Trans</i> -fitol
1-Metoxi-ciclohexeno	Versáldo
Acetato de crisantenilo	Palmitato de metilo
Corilon	Pentacosano
3-Metil-1,2-cliclopentenediona	Tetracosanal
Formato de geranilo	Octacosano
Ácido oléico	Nonacosano
3-Metil-3-penten-2-ona	3-hexen-2-ona

Entre los compuestos que se lograron aislar, purificar y caracterizar, en este estudio, a partir de la cáscara de *C. aurantifolia*, son: las furanocumarinas y cumarinas, lo cual coincide con la literatura consultada. En el caso de las furanocumarinas se ha observado que algunas plantas las acumulan gracias a que tienen rutas biosintéticas altamente inducibles; sin embargo, *Ruta graveolens* y posiblemente otras especies de Rutaceae no responden al estrés y sintetizan constitutivamente furanocumarinas en todos los tejidos, por lo que es posible que *C. aurantifolia* (Rutaceae) se comporte de manera similar y sintetice este tipo de compuestos a pesar de las condiciones en las que se encuentre (74).

4.4 Actividad Antituberculosa de los Compuestos Identificados y Caracterizados del Extracto Hexánico de la cáscara *C. aurantifolia*

Cuatro de los cinco compuestos aislados, purificados y caracterizados del extracto hexánico de *C. aurantifolia*; así como, 16 de los compuestos identificados por CG-EM fueron ensayados en contra de una cepa sensible (H37Rv) de *M. tuberculosis*, los resultados se muestran en la Tabla 11. Una vez probados con la cepa sensible, los compuestos con actividad antituberculosa fueron ensayados contra tres cepas resistentes a isoniazida y rifampicina, los resultados se muestran en la Tabla 12. Cabe mencionar que los ensayos tanto en la cepa sensible como en las cepas resistentes se realizaron en un rango de concentración de 6.25-200 µg/mL.

TABLA 11

Actividad en contra de *M. tuberculosis* H37Rv de los compuestos identificados en el extracto hexánico de la cáscara de *C. aurantifolia*

Compuesto	CMI	Compuesto	CMI
	(µg/mL)		(µg/mL)
	H37Rv		H37Rv
5-Geranoi-psoraleno (Ca4)	100-50	4-Hexeno-3-ona	100-50
5-Geranoi-7-metoxi cumarina (Ca6)	>200	3-Metil-3-penten-2-ona	>200
5,7-Dimetoxi-cumarina (Ca7)	>200	Óxido de linalol	>200
5,8-Dimetoxi-psoraleno (Ca9)†	50-25	Terpinen-4-ol	200
Carvona	200	Geraniol	200
<i>p</i> -Cimeno	>200	Citral	100-50
Ácido linoléico	100-50	Formato de geraniol	>200
Pinacol	>200	Ácido oleico	100
Resorcinol	200	Palmitato de metilo	>200
3-Metil-1,2-ciclopentenediona	>200	Ácido palmítico†	50-25

† El compuesto fue ensayado a una concentración inicial de 50 µg/mL

TABLA 12

Actividad en contra de cepas resistente de *M. tuberculosis* de los compuestos identificados en el extracto hexánico de la cáscara de *C. aurantifolia*

Compuesto	CMI (µg/mL)		
	H10	M15	M26
5-Geranoxi-psoraleno	200	100	100
5,8-Dimetoxi-psoraleno†	25*	>50	50
Carvona	>200	>200	>200
Ácido linoléico	100	100	100
Resorcinol	200	100	100
4-Hexen-3-ona	>200	>200	>200
Terpinen-4-ol	>200	>200	>200
Geraniol	>200	>200	>200
Citral	>200	>200	200
Ácido oléico	100	100	100
Ácido palmítico†	50*	50	50

*El ensayo del compuesto fue realizado con cepa resistente M20

†El compuesto fue ensayado a una concentración inicial de 50 µg/mL

En cuanto a la actividad antituberculosa y de acuerdo a los resultados observados en las Tablas 11 y 12 podemos decir que la clase de metabolitos secundarios con actividad en contra de *M. tuberculosis* H37Rv son principalmente: furanocumarinas: 5-geranoxi-psoraleno (CMI 100-50 µg/mL), 5,8-dimetoxi-psoraleno (CMI 50-25 µg/mL); ácidos grasos: ácido linoléico (CMI 50-100 µg/mL), ácido oléico (CMI 100 µg/mL), ácido palmítico (CMI 50-25 µg/mL); los terpenos: carvona, terpinen-4-ol y geraniol con valores de CMI de 200 µg/mL, cada uno; 4-hexen-3-ona y citral con valores de CMI 100-50 µg/mL y el compuesto fenólico: resorcinol (CMI 200 µg/mL). Sin embargo, solo las furanocumarinas: 5-geranoxi-psoraleno (CMI 100-200 µg/ml) y 5,8-metoxi-psoraleno (CMI 25 µg/ml) y los ácidos grasos: ácido linoléico (CMI 100 µg/ml), ácido oléico (CMI 100 µg/ml) y el ácido palmítico (CMI

50 µg/ml) son los que presentan actividad en contra de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes. Esto es de gran importancia debido a la presencia que existe hoy en día de cepas multi-fármaco-resistentes, de tal manera que estos compuestos pueden ser modificados químicamente para que presenten una mayor actividad en contra de la bacteria.

En este proyecto fueron ensayados dos psoralenos y dos cumarinas, siendo los psoralenos (5-geranoxi-psoraleno y 5,8-dimetoxi-psoraleno) activos en contra de la cepa sensible y las cepas multifármaco-resistentes de *M. tuberculosis*. Probablemente el anillo furánico sea indispensable para la actividad de estos compuestos ya que en las cumarinas este anillo no se encuentra presente. Es pertinente mencionar que los psoralenos o furanocumarinas se encuentran distribuidas en distintas familias de plantas como Apiaceae, Moraceae, Rutaceae y Leguminosae; asimismo, presentan diferentes actividades biológicas entre las que destacan la capacidad de inactivar enzimas del citocromo P450 y además la habilidad de intercalarse en el ADN y crear uniones covalentes con los residuos de timina (74). En este sentido, es posible que éste sea el mecanismo por el cual el 5-geranoxi- y 5,8-dimetoxi-psoraleno inhiban el crecimiento de *M. tuberculosis*.

Por otro lado los ácidos grasos también presentaron una buena actividad, el ácido palmítico, un ácido graso saturado con 16 carbonos en su estructura, resultó ser el doble de activo que los ácidos linoléico y oléico tanto en la cepa sensible como en las resistentes. Por lo que podemos inferir que posiblemente las insaturaciones presentes en los ácidos linoléico y oléico disminuyan la actividad en contra de *M. tuberculosis*,

así como también la longitud de la cadena de los ácidos, ya que tanto el ácido oléico como el linoléico tienen en su estructura 18 carbonos y diferente grado de insaturación. Cabe mencionar que existen reportes donde los ácidos grasos presentan actividad en contra de bacterias como, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* (75,76), en este sentido existe un reporte donde el ácido exocárpico, aislado de *Exocarpus latifolius*, presentó actividad en contra de *M. tuberculosis* con una CMI 20 µg/mL (77).

Como pudimos ver en las figuras 2 y 3 en el Capítulo I, los fármacos antituberculosos tienen estructuras muy distintas a los metabolitos secundarios activos en este proyecto, en este sentido existen reportes de moléculas aisladas de plantas con actividad antituberculosa. Un ejemplo es el trabajo de Camacho y colaboradores en el 2009, quienes reportaron la actividad antituberculosa de diversos metabolitos secundarios aislados de diferentes plantas: el alcaloide 6-metoxidihydrochelirubina, aislado de *Bocconia arborea*, presentó una CMI de 12.5 µg/mL contra la cepa H37Rv y tres cepas resistentes. Asimismo, el alcaloide “liriodenina”, aislado de *Stephania dinklagei*, presentó una CMI de 3.125 µg/mL en contra de H37Rv y de 100 µg/mL contra una cepa resistente (78). Por otro lado, Gordien y colaboradores encontraron que la actividad antituberculosa del extracto hexánico de *Juniperus communis* L es debida a un sesquiterpeno identificado como “longifoleno” y a dos sesquiterpenos caracterizados como “totarol” y ácido “trans-comúnico”; sin embargo el “totarol” mostró una mejor actividad en contra de *M. tuberculosis* H37Rv (CMI de 73.7 µM) y contra cepas resistentes (79). Asimismo, Murillo y colaboradores realizaron un estudio biodirigido del extracto crudo de *Haplopappus sonorensis* en donde los flavonoides 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona

y 5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona resultaron ser los constituyentes antituberculosos de *Haplopappus sonorensis* (80). Lo anterior nos indica que las plantas son una fuente rica de moléculas que pueden ser utilizadas como modelos moleculares para la síntesis de análogos más activos en contra de *M. tuberculosis* y otras enfermedades.

Es importante mencionar que esta es la primera vez que se reporta la actividad antituberculosa para los compuestos ensayados en este proyecto. Encontrando un gran interés en el 5,8-dimetoxi psoraleno y el ácido palmítico, ya que el primero presentó actividad de 50-25 µg/mL contra la cepa H37Rv y de 50 y 25 µg/mL contra dos cepas resistentes; asimismo, el ácido palmítico mostró actividad de 50-25 µg/mL contra la cepa H37Rv y de 50 µg/mL en contra de tres cepas resistentes. Los resultados encontrados en este proyecto son de gran interés ya que estas moléculas pueden servir de base para la síntesis de análogos con mayor actividad, de manera tal que se tendrían mejores fármacos para el tratamiento de la tuberculosis, siendo ideal una molécula que disminuya el tiempo de tratamiento, disminuya los efectos adversos, fácil administración y sobre todo que sea eficaz contra las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a los fármacos ya existentes.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

A partir del extracto hexánico de la cáscara de *C. aurantifolia*, se lograron aislar, purificar y caracterizar estructuralmente por RMN los siguientes compuestos: 5-geranoxi-psoraleno, 5-geranoxi-7-metoxi-cumarina, 5,7-dimetoxi-cumarina y 5,8-dimetoxi-psoraleno, y 5-metoxi-psoraleno.

En el extracto hexánico de la cáscara de *C. aurantifolia* se lograron identificar por CG/EM, 40 compuestos volátiles, de los cuales nueve son monoterpenos, cinco sesquiterpenos, cinco cetonas, cuatro alcanos, cuatro cumarinas, tres ácidos grasos, tres alcoholes, dos ésteres, dos éteres, un fenol, un aldehído y una hidroxiacetona.

De los compuestos identificados por CG/EM 22 no han sido reportados en *C. aurantifolia* de los cuales el resorcinol, la 4-hexen-3-ona y el ácido oléico presentaron actividad en contra de *M. tuberculosis*.

Los compuestos que presentaron actividad en contra de *M. tuberculosis* H37Rv fueron el ácido palmítico (CMI 50-25 µg/mL), 5,8-metoxi-psoraleno (CMI 50-25 µg/mL), 5-geranoxi-psoraleno (CMI 100-50 µg/mL), ácido linoléico (CMI 100-50 µg/mL), 4-hexen-3-ona (CMI 100-50 µg/mL), citral (CMI 100-50 µg/mL) y ácido oléico (CMI 100 µg/mL).

Los compuestos que resultaron más activos en contra de las tres cepas multifármaco resistentes fueron el 5-geranoxi-psoraleno (CMI 100-200 µg/mL), el

ácido linoléico (CMI 100 µg/mL), el ácido oléico (CMI 100 µg/mL) y el ácido palmítico (CMI 50 µg/mL).

Los compuestos 5-geranoxi-psoraleno, ácido palmítico, ácido oléico y ácido linoléico, son moléculas prometedoras para el tratamiento de la tuberculosis ya que fueron los compuestos activos en contra de *M. tuberculosis* sensible y tres multifarmacorresistente.

CAPÍTULO VI

FUTURAS INVESTIGACIONES

1. Evaluar en contra de *M. tuberculosis* los compuestos que no fueron evaluados y que se identificaron por CG/EM.
2. Establecer el mecanismo de acción de los compuestos que tuvieron actividad en contra de *M. tuberculosis*.
3. Sintetizar análogos de los compuestos activos con el fin de obtener moléculas con mayor actividad antituberculosa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Murray, P., *et.al.* Microbiología Médica. Harcourt Brace. 2ª Edición. p.p 320-322. España. (1997).
2. Alsteens D., Verbelen C., *et.al.* Organization of the mycobacterial cell wall: a nanoscale view. Pflügers Archiv European Journal of Physiology. 456: 117-125. (2008).
3. Robbins, S., Kumar, V. Patología Humana. Interamericana McGraw-Hill. 4ª Edición. p.p 444. (1987).
4. Lozano, J. Tuberculosis. Patogenia, diagnóstico y Tratamiento. OFFARM. Vol 21, Núm 8. (2002). Consultado el 08/09/10 en: <http://external.doyma.es/pdf/4/4v21n08a13035870pdf001.pdf>.
5. Brogolia, B., Bonifachich, E., *et.al.* Criterios de Diagnóstico y Tratamiento de la tuberculosis infantil. Archivos Argentinos de Pediatría. 100(2). p.p 162-163.(2002). Recuperado el día 08/09/10 en: [http://www.sap.org.ar/docs/profesionales/consensos/159\(1\).pdf](http://www.sap.org.ar/docs/profesionales/consensos/159(1).pdf)
6. Joklik, W., Willet, H., Amos, D. Zinsser Microbiología. 17a Edición. p.p 611-631. (1983).
7. Organización Mundial de la Salud. La vacuna antituberculosa. Recuperado el día 13/09/10 en: http://www.who.int/immunization/wer7904BCG_Jan04_position_paper_SP.pdf
8. Mudd, S. Infectious agents and host reactions. W.B. Saunders Company. p.p 230. (1970).
9. Coll, P. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. 21(6): 299-308. (2003).

10. Brunton, L, B., Lazo, J, S., Parker, K, L. Goodman y Gilman. Las bases de la farmacología de la terapéutica. McGraw-Hill – Interamericana. Edición 11. p.p 1203-1215. México. (2007).
11. World Health Organization. Global Tuberculosis Control: 2010. (2010).
12. Secretaria de Salud. Situación actual de la Tuberculosis en México... Avances y Desafíos. Recuperado 27/04/11 en: <http://www.cenave.gob.mx/tuberculosis/diamundial/Presentación%20oficial%20TB%202010%20México.pdf>
13. Organización Mundial de la Salud. Tuberculosis. Recuperado el día 15/09/09 en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/index.html>.
14. Organización Mundial de la Salud. Prevención y control de la tuberculosis multirresistente y ultrarresistente. 62ª Asamblea Mundial de la Salud. 16 de abril de 2009. Recuperado el día 15/09/09 en: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/A62/A62_20-sp.pdf.
15. Organización Mundial de la Salud. La tuberculosis farmacorresistente alcanza niveles desconocidos hasta ahora. Recuperado el día 23/09/10 en: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/drug_resistant_tb_20100318/es/.
16. Organización Mundial de la Salud. Información en tratamiento. Recuperado el día 15/09/09 en: <http://www.who.int/whr/2004/chapter5/es/index3.html>.
17. Organización Mundial de la Salud. Medicina Tradicional. Recuperado el día 23 de septiembre de 2010 en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/es/>.
18. Lozoya, X., Zolla, C. Medicina Tradicional en México. Boletín de la oficina sanitaria Panamericana, Abril 1984. Recuperado el día 23/09/10 en: <http://hist.library.paho.org/Spanish/BOL/v96n4p360.pdf>.

19. Organización Panamericana de la Salud. Sistemas de Salud Tradicionales en América Latina y el Caribe: Información de base. Recuperado el día 15/09/09 en: http://www.paho.org/Spanish/AD/THS/OS/indi13_esp.pdf.
20. Medicina Tradicional Indígena 22/02/2006. Recuperado el día 23/09/10 en: http://e-mexico.gob.mx/index.php?option=com_flexicontent&view=items&id=10697.
21. Química Viva. Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. (Agosto 2007). Recuperado el día 15/09/09 en: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v6n2/barquero.pdf>.
22. Camacho-Corona M del R., *et.al.* Activity against drug resistant-tuberculosis strains of plants used in Mexican traditional medicine to treat tuberculosis and other respiratory diseases. *Phytotherapy Research*. 22(1):82-5 (2008).
23. Francis, J. *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle. Recuperado el día 27/09/10 en: <http://www.fs.fed.us/global/iitf/pdf/shrubs/Citrus%20aurantiifolia.pdf>.
24. SAGARPA. Plan Rector Sistema Nacional Limón Mexicano. (2005). Recuperado el día 24 de septiembre de 2010 en: http://w4.siap.gob.mx/sispro/IndModelos/PRector/00_NAC/LMexicano.pdf.
25. Lota, M., De Roca, D., Camille, F., Casanova, J. Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 796-805. (2002).
26. Frutos Tropicales. Lima (*Citrus aurantifolia*. Familia. Rutáceas). Recuperado el día 24/09/10 en: <http://www.mercadosmunicipales.es/uploads/frutas/Lima.pdf>.
27. Piccinelli, A., Mesa, M., Armenteros, D. *et.al.* HPLC-PDA-MS and NMR characterization of C-glycosyl flavones in a hydroalcoholic extract of *Citrus*

- aurantifolia* leaves with antiplatelet activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56: 1574-1581. (2008).
28. Remedios populares. Limón. Recuperado el día 30/09/09 en: <http://www.remediospopulares.com/limon.html>
 29. Caldwell, A., Jones, E. Constituents of expressed West Indian lime oil. Journal of the Chemical Society. 540-3. (1945).
 30. Stanley, W., Vannier, S. Psoralens and substituted coumarins from expressed oil of lime. Phytochemistry. 6 (4): 585-96. (1967).
 31. Tapanes, R., Perez, Z., Fanghaenel, E. Analysis of the terpene fraction of the distilled essential oil from the lime (*Citrus aurantifolia*) produced in Cuba. Revista CENIC, Ciencias Físicas. 3(1): 99-110. (1971).
 32. Tapanes, R., Perez, Z. Identification of carbonyl compounds in the distilled lime essential oil produced in Cuba. Revista CENIC, Ciencias Físicas. 5(1):13-27. (1974).
 33. Balbaa, S., Karawya, M., Hifnawy, M. Peel oils lemon, lime, and mandarin growing in Egypt. American Perfumer and Cosmetics. 86(6): 53-6. (1971).
 34. Perez, Z., Tapanes, R. Analysis of the terpene and sesquiterpene hydrocarbon fractions of the centrifuged lime (*Citrus aurantifolia*) essential oil produced in Cuba. Revista CENIC, Ciencias Físicas. 5(1): 1-11. (1974).
 35. Alexander, M., Sulebele, G. Characterization of pectins from Indian citrus peels. Journal of Food Science and Technology. 14(4):180-2. (1980).
 36. Clark, B., Chamblee, T., Lacobucci, G. HPLC isolation of the sesquiterpene hydrocarbon germacrene B from lime peel oil and its characterization as an important flavor impact constituent. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 35(4):514-18. (1987).

37. Park, Y., Pastore, G. Determination of limonin in citrus fruits of the Campinas region. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. 9(1):12-20. (1989).
38. Nigg, H., Nordby, H., Beier, R., Dillman, A., Macias, C., Hensen, R. Phototoxic coumarins in limes. *Food and Chemical Toxicology*. 31(5):331-5. (1993).
39. Jantan, I., Ahmad, A., Ahmad, A., Ali, N., Ayop, N. Chemical composition of some citrus oils from Malaysia. *Journal of Essential Oil Research*. 8(6):627-32. (1996).
40. Haggag, E., Abdel, W., El-Zalabany, S., Moustafa, E., El-Kherasy, E., Mabry T. Volatile oil and pectins from *Citrus aurantifolia* (lime) and *Citrus limonia* (lemon). *Asian Journal of Chemistry*. 10(4):828-833. (1998).
41. Chisholm, M., Wilson, M., Taylor, N., Mitchell, A. Differences in the aroma composition of cold pressed and distilled essential oils of key and persian limes. Book of abstracts, 216th ACS national Meeting. 23-27. (1998).
42. Chisholm, M., Wilson, M., Gaskey, G. Characterization of aroma volatiles in key lime essential oils (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Flavor and Fragrance Journal*. 18(2):106-115. (2003).
43. Venkateshwarlu, G., Selvaraj, Y. Changes in the peel oil composition of Kagzi lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) during ripening. *Journal of Essential Oil Research*. 12(1):50-52. (2000).
44. Feger, W., Brandauer, H., Ziegler, H. Sesquiterpene hydrocarbons of cold-pressed lime oils. *Flavour and Fragrance Journal*. 15(4):281-284. (2000).
45. Shivashankara, K., Roy, T., Rao, V. A study of volatile composition of Indian "Kagzi" lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) peel by SPME, during ripening. *Indian Perfumer*. 46(4):315-319. (2002).

46. Nickavar, B., Mojab, F. Volatile constituents of the dried fruit of *Citrus aurantifolia* from Iran. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*. 25(2):400-401. (2003).
47. Ubando, J., Navarro, A., Valdivia, M. Mexican lime peel: comparative study on contents of dietary fibre and associated antioxidant activity. *Food Chemistry*. 89(1):57-61. (2004).
48. Craske, J., Suryadi, N., Wootton, M. A comparison of the peel oil components of Australian native lime (*Microcitrus australe*) and Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85(2):522-525. (2005).
49. Chowdhury, J., Nandi, N., Uddin, M. Aromatic plants of Bangladesh: chemical constituents of the leaf and peel oil of *Citrus aurantifolia* (christ.) swingle. *Essential Oil Association of India*. 50(2):54-55. (2006).
50. Phi, N., Tu, N., Nishiyama, C., Sawamura, M. Characterization of the odour volatiles in *Citrus aurantifolia* Persa lime oil from Vietnam. *Developments in Food Science*. 43:193-196. (2006).
51. Agocs, A., Nagy, V., Szabo, Z., Mark, L., Ohmacht, R., Deli, J. Comparative study on the carotenoid composition of the peel and the pulp of different citrus species. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 8(3):390-394. (2007).
52. Johann, S., Smania, A., Pizzolatti, M., Schripsema, J., Braz, R., Branco, A. Complete ¹H and ¹³C NMR assignments and antifungal activity of two 8-hydroxy-flavonoids in mixture. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 79(2):215-222. (2007).

53. Afolayan, A., Asekun, O. Comparative study chemical profiles of the essential oils of ripe and rotten fruits of *Citrus aurantifolia* Swingle. *Natural Products Communications*. 3(7):1133-1136. (2008).
54. Green, C., Whwatley, A., Osagie, A., Dilworth, L., Morrison, E., Asemota, H. Characterization of health-promoting polymethoxylated flavones from Jamaican and Mexican citrus peels. *Acta Horticulturae*. 841:511-514. (2009).
55. Subbarao, M., Satyanarayana, T. Antibacterial activity of some plant essential oils. *Indian Drugs*. 23(3):140-1. (1985).
56. Eban, R., Madunagu, B. Microbiological exploitation of cardiac glycosides and alkaloids from *Garcinia kola*, *Borreria ocymoides*, *Kola nitida* and *Citrus aurantifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*. 71(5):398-401. (1991).
57. Ulate, J., Schafer, H., Zottola, E., Davidson, P. Inhibition of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Micrococcus luteus* by linear furanocoumarins in a model food system. *Journal of Food Protection*. 60(9):1050-1054. (1997).
58. Aibinu, I., Adenipekun, T., Adelowotan, T., Ogunsanya, T., Odugbemi, T. Evaluation of the antimicrobial properties of different parts of *Citrus aurantifolia* (lime fruit) as used locally. *African journal of traditional complementary and alternative medicines*. 4(2):185-90. (2006).
59. Patil, J., Chidambara, M., Tichy, S., Chetti, M., Patil, B. Apoptosis-mediated proliferation inhibition of human colon cancer cells by volatile principles of *Citrus aurantifolia*. *Food Chemistry*. 114(4):1351-1358. (2009).
60. Patil, J., Murthy, K., Jayaprakasha, G., Chetti, M., Patil, B. Pancreatic cancer inhibitory effects of limonoids and flavonoids of *Citrus aurantifolia* Swingle. *American Chemical Society*. 22-26. (2009).

61. Patil, J., Jayaprakasha, G., Chidambara, M., Chetti, M., Patil, B. Isolation and identification of colon cancer inhibitory coumarins from *Citrus aurantifolia* Swingle. American Chemical Society. 16-20. (2009).
62. Razzaghi, A., Shams, G., Rezaee, M., Saberi, R., Yoshinari, T. Chemical composition and antiaflatoxic activity of *Carum carvil* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. Food Control. 20(11):1018-1024. (2009).
63. Guimares, R., Barros, L., Barreira, J., Sousa, M., Carvalho, A., Ferreira, I. Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon and orange. Food and Chemical Toxicology. 48(1):99-106. (2010).
64. Asnaashari, S., Delazar, A., Habibi, B., Vasfi, R., Nahar, L., Hamedeyazdan, S., Sarker, S. Essential oil from *Citrus aurantifolia* prevents ketotifen-induced weight-gain in mice. Phytotherapy Research. 24(12):1893-1897. (2010).
65. Lakshmi, B., Naidu, K. Antimicrobial efficacy of essential oil *Syzygium aromaticum* against common infectants of storage cereals and fruits. Journal of Pharmacy Research. 3(10):2544-2545. (2010).
66. Lee, J., Lee, J. Chemical composition and antifungal activity of plant essential oils against *Malassezia furfur*. Han'guk Misaengmul-Saengmyongkong Hakhoechi. 38(3):315-321. (2010).
67. Ojiezeh, T., Nwachikwu, S., Udoh, S. Antimicrobial effect of *Citrus aurantifolia* juice and *Veronica amygdaline* on common bacteria isolates. Pharma Chemica. 3(1):1-7. (2011).
68. Franzblau, SG., Witzig RS., McLaughlin JC., Torrez P., Madico G., Hernandez A., Degnan MT., Cook MB., Quenzer VK., Ferguson RM., Gilman RH. Rapid low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis*

- isolates by using the microplate alamar blue assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 36(2)362-366. (1998).
69. Jimenez –Arellanez A., Meckes MN., Ramirez R., Torrez J., and Luna-Herrera J. Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phytotherapy Research*.17, 903-908. (2003).
70. Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., Yano, M. Isolation of furanocoumarins from bergamot fruits as HL-60 differentiation-inducing compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(10):4073-4078. (1999).
71. Miyake, Y., Hiramitsu, M. Isolation and extraction of antimicrobial substances against oral bacteria from lemon peel. *Journal of Food and Science Technology*. DOI 10.1007/s13197-011-0330-3. (2011).
72. Hongwei, Y., Bogang, L., Changsong, L., Guolin, Z. Chemical Study on *Evodia vestita*.*Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*. 16(1):72-75. (2010).
73. Miyazawa, M., Tsukamoto, T., Anzai, J., Ishikawa, Y. Insecticidal effect of phthalides and furanocoumarins from *Angelica acutiloba* against *Drosophila melanogaster*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:4401-4405. (2004).
74. Bourgaud, F., Hehn, A., Larbat, R., Doerper, S., Gontier, E., Kellner, S., Matern, U. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unraveled form cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry Reviews*. 5:293-308. DOI 10.1007/s11101-006-9040-2. (2006).

75. Skalicka, L., Los, R., Glowniak, K., Malm, A. Antimicrobial activity of fatty acids from fruits of *Peucedanum cervaria* and *P. alsaticum*. *Chemistry & Biodiversity*. 7(11):2748-54. (2010).
76. Lograda, T., Chaker, AN., Chalchat, JC., Ramdani, M., Silini, H., Figueredo, G., Chalarde, P. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Genista ulicina* and *G. vepres*. *Natural Products Communications*. 5(5):835-8. (2010).
77. Koch, M., Bugni, T., Sondossi, M., Ireland, C., Barrows, L. Exocarpic acid inhibits mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Planta Medica*. 76: 1678-1682. (2010).
78. Camacho, M., Favela, J., González, O., Garza, E., Molina, G., Said, S., Delgado, G., Luna, J. Evaluation of some plant-derived secondary metabolites against sensitive and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Mexican Chemical Society*. 53(2):71-75. (2009).
79. Gordien, AY., Gray, Al., Franzblau, SG., Seidel, V. Antimycobacterial terpenoids from *Juniperus communis* L. (Cupressaceae). *Journal Ethnopharmacology*. 126(3):500-505. (2009).
80. Murillo, J., Encarnación, DR., Malmstrom. J., Christopherse, C., Franzblau, SG. Antimycobacterial flavones from *Haplopappus sonorensis*. *Fitoterapia*. 74(3):226-230. (2003).

APÉNDICE

Espectros de masas de los compuestos identificados del extracto

hexánico de *Citrus aurantifolia*

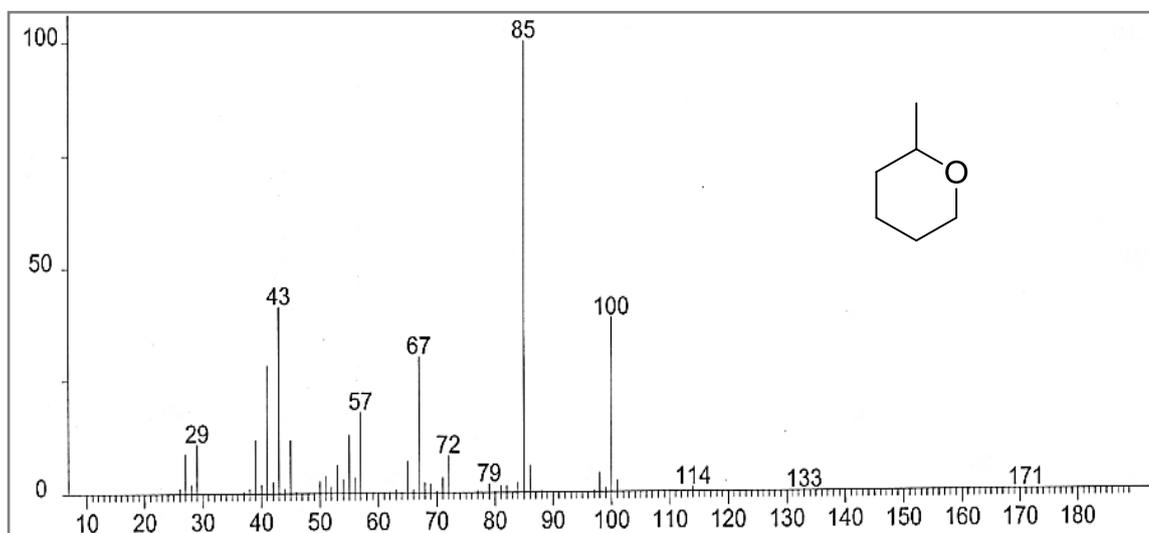


Figura 34. Espectro de masas del compuesto tetrahydro-2-metil-2H-pirano

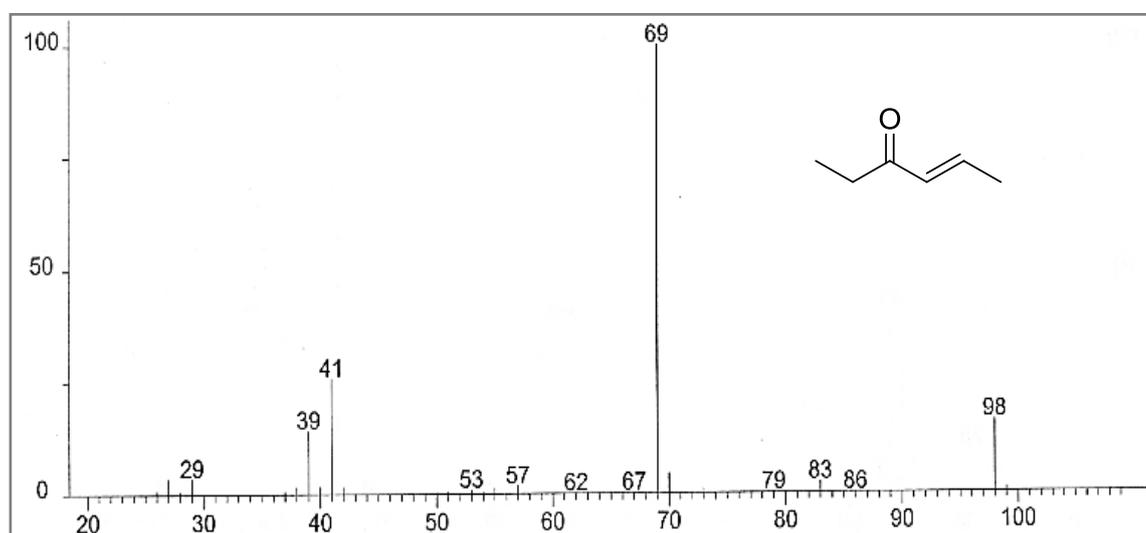


Figura 35. Espectro de masas del compuesto 4-hexen-3-ona

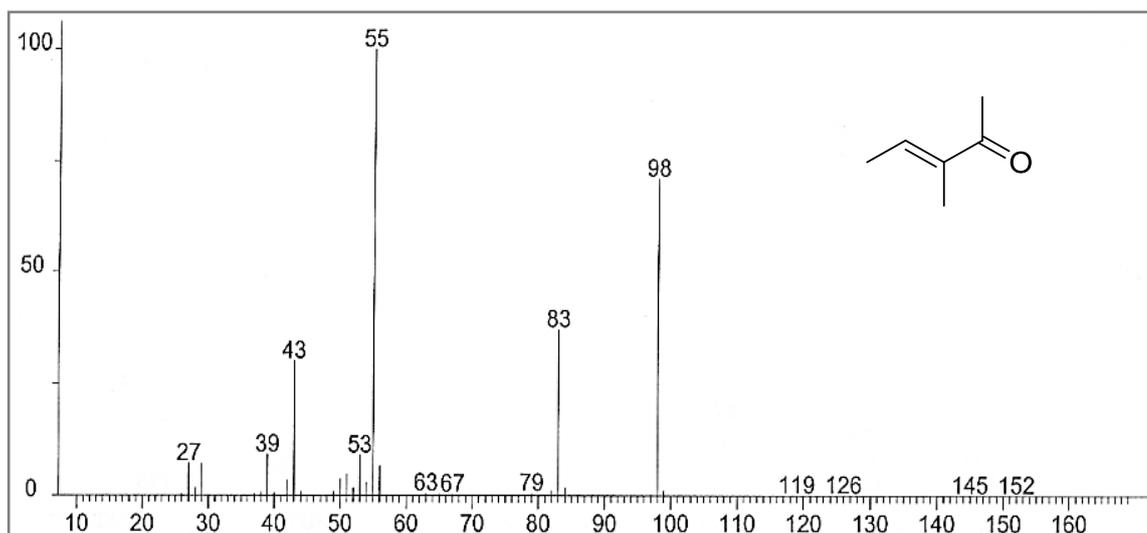


Figura 36. Espectro de masas del compuesto 3-metil-3-penten-2-ona

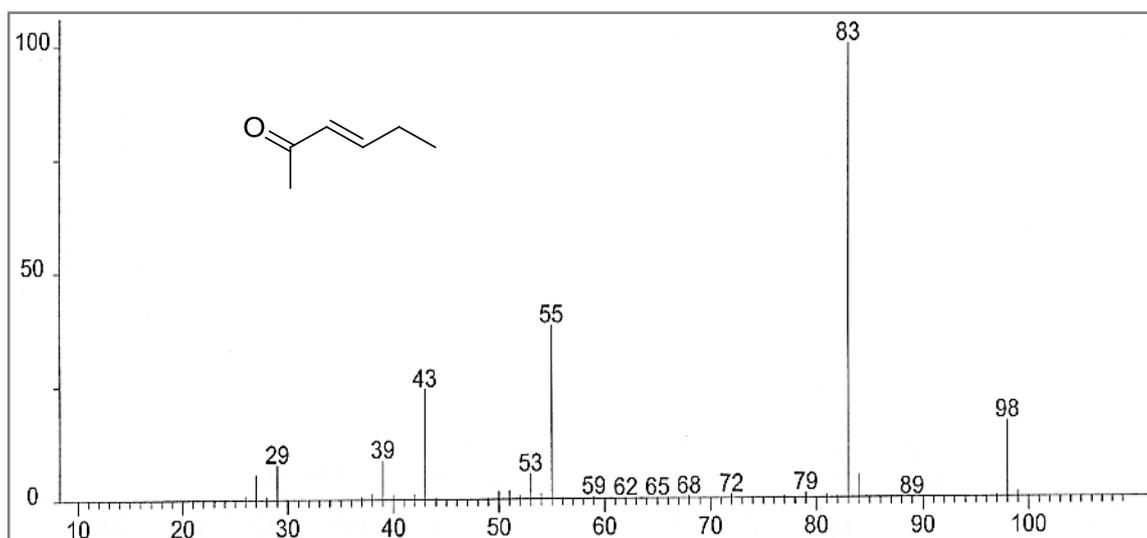


Figura 37. Espectro de masas del compuesto 3-hexen-2-ona

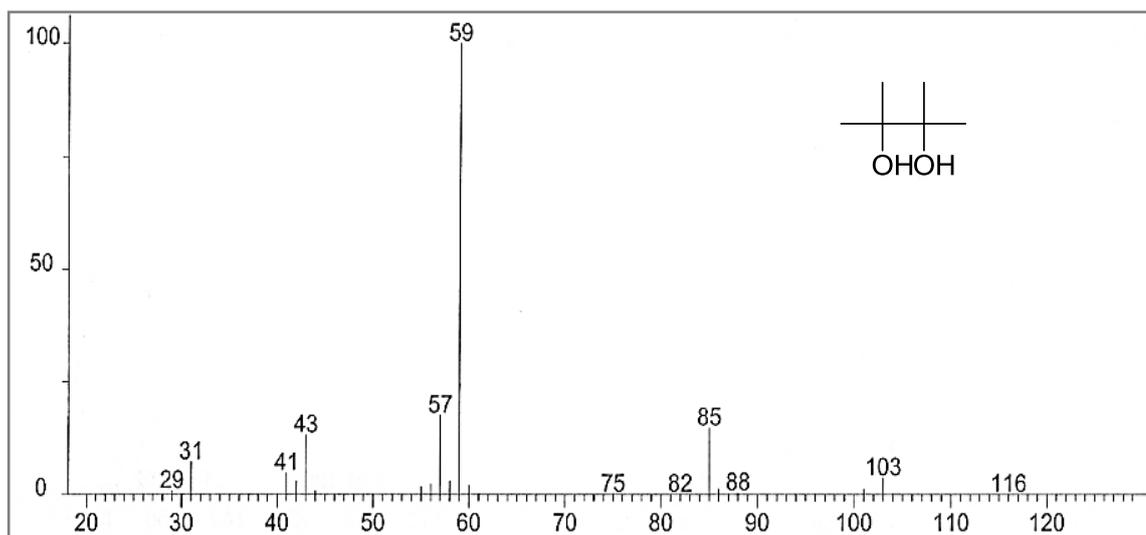


Figura 38. Espectro de masas del compuesto pinacol

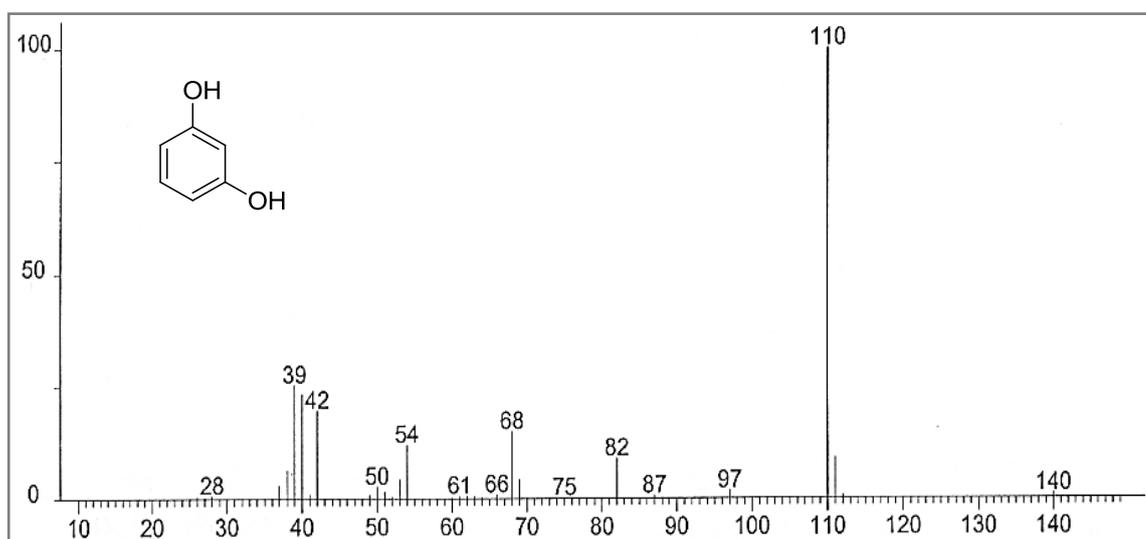


Figura 39. Espectro de masas del compuesto resorcinol

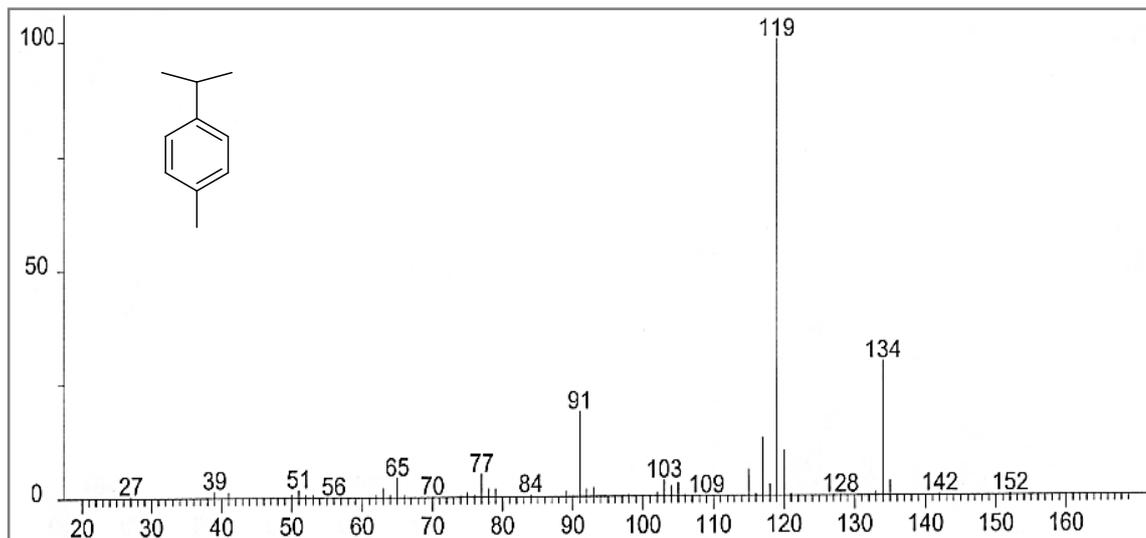


Figura 40. Espectro de masas del compuesto *p*-cimeno

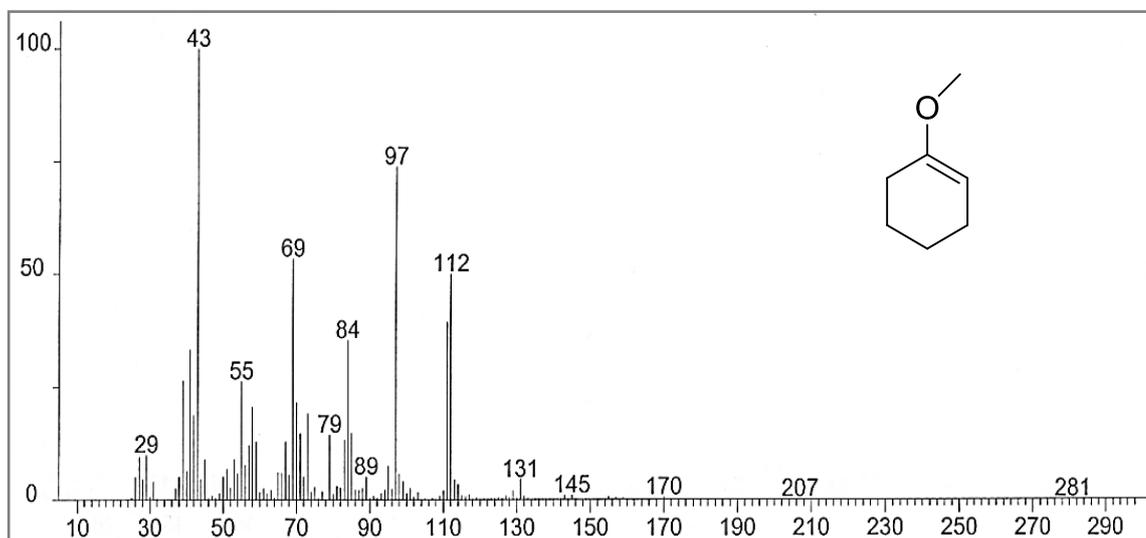


Figura 41. Espectro de masas del compuesto 1-metoxi-ciclohexeno

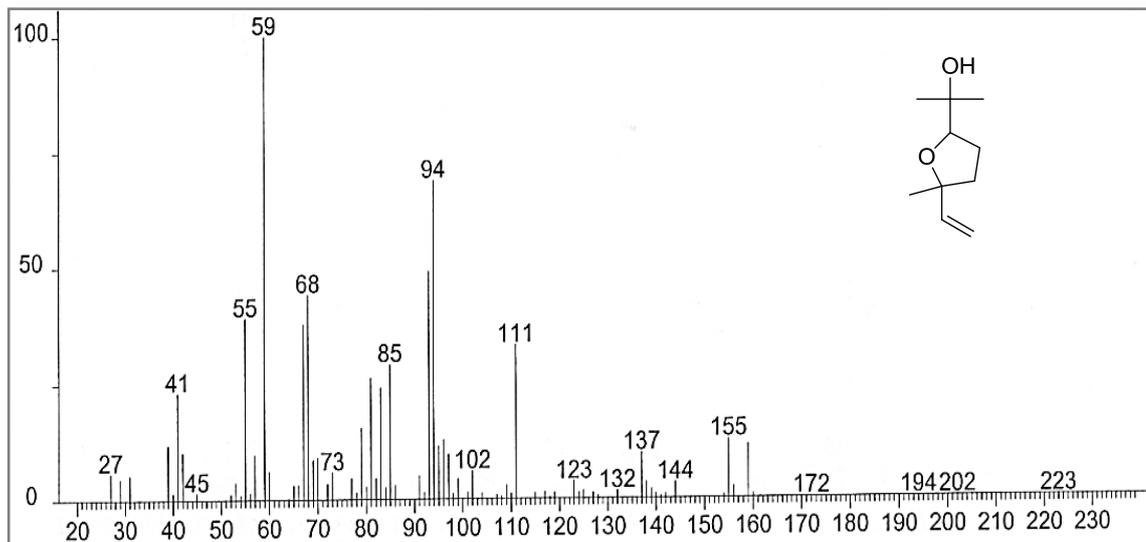


Figura 42. Espectro de masas del compuesto óxido de linalol

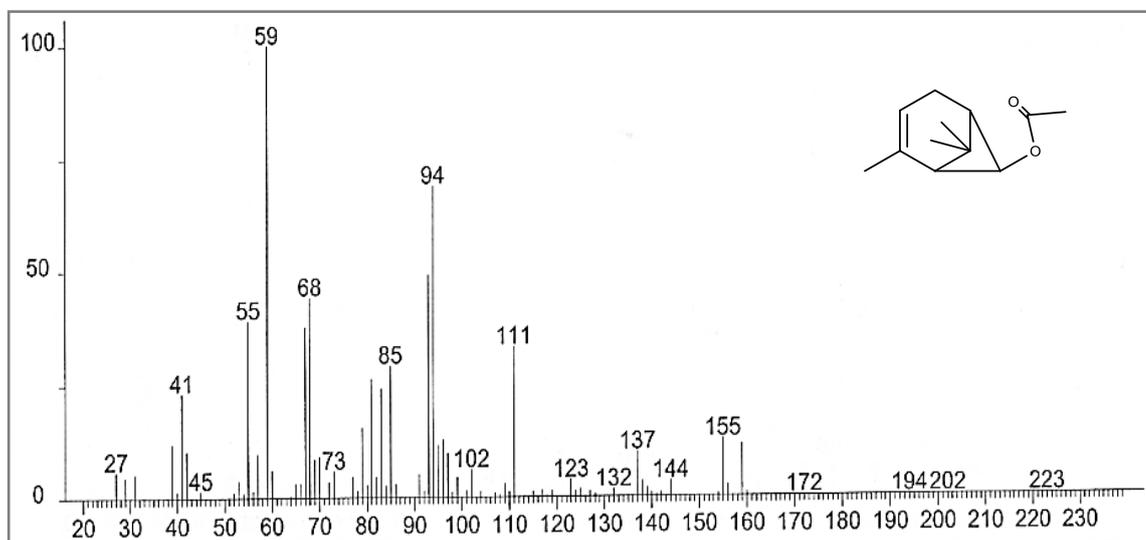


Figura 43. Espectro de masas del compuesto acetato de crisantenilo

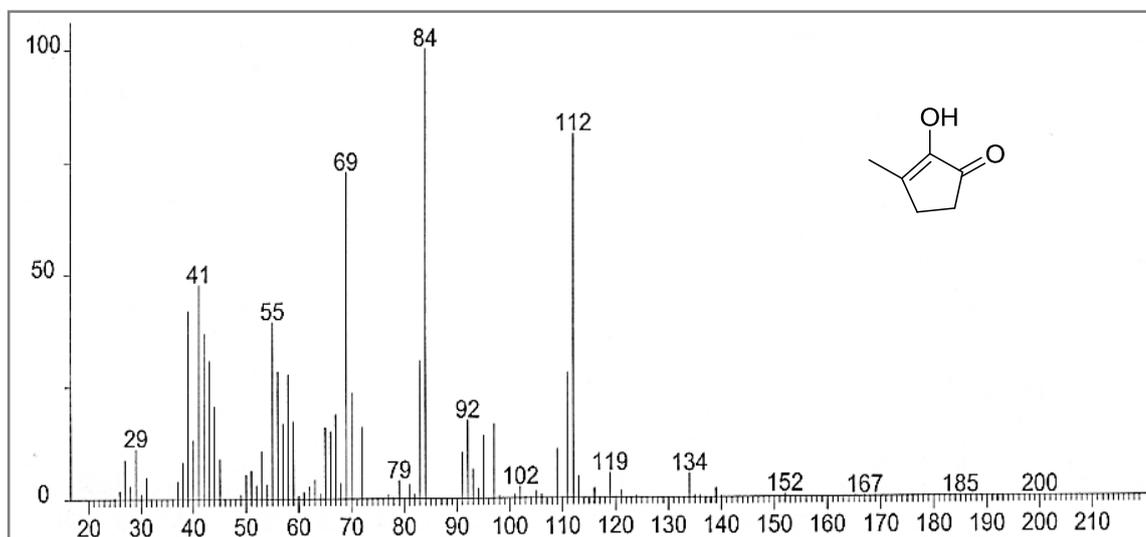


Figura 44. Espectro de masas del compuesto corilon

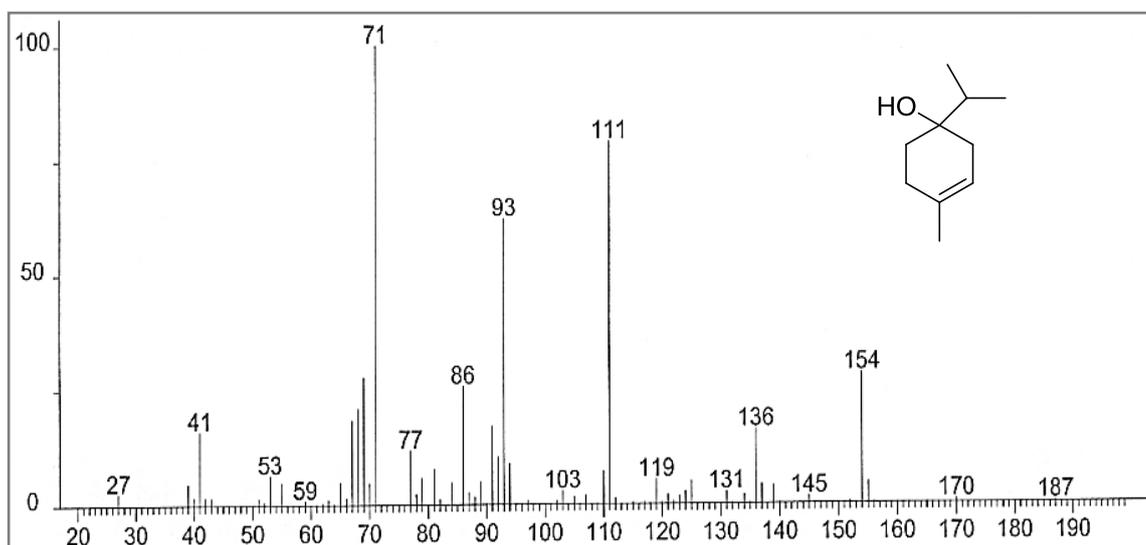


Figura 45. Espectro de masas del compuesto terpinen-4-ol

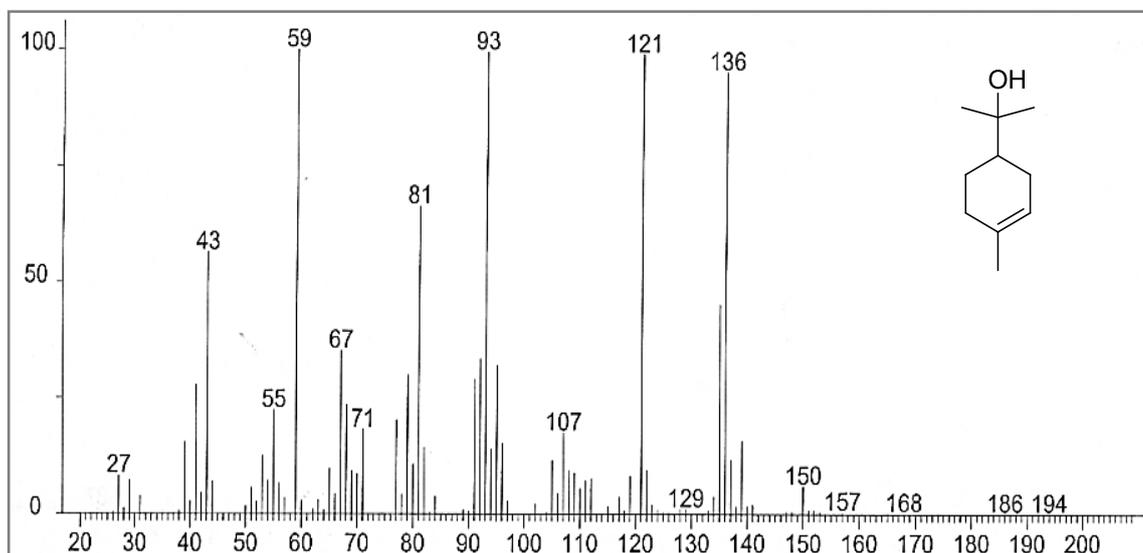


Figura 46. Espectro de masas del compuesto α -terpineol

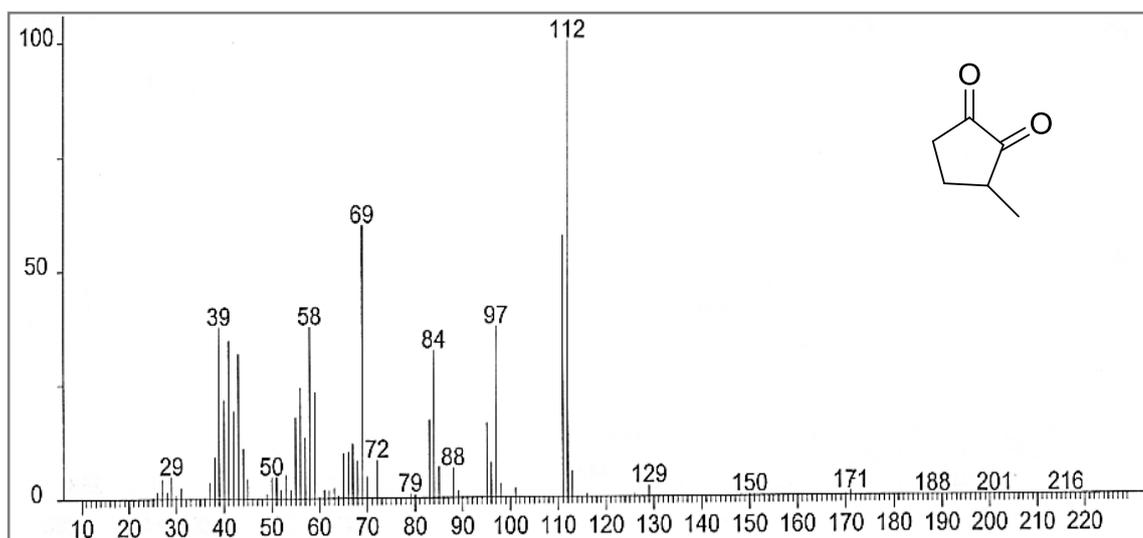


Figura 47. Espectro de masas del compuesto 3-metil-1,2-ciclopentanediona

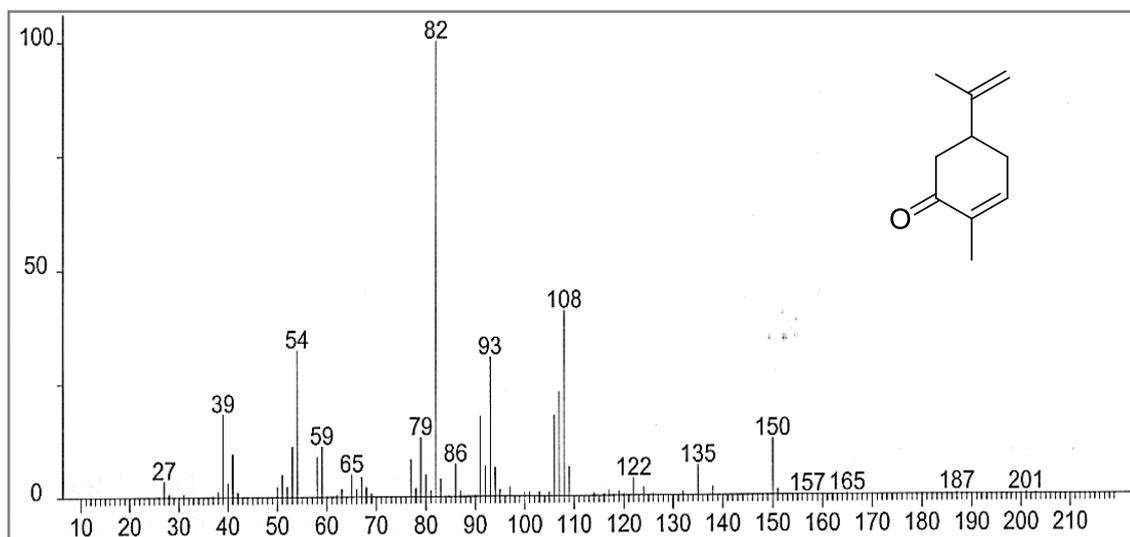


Figura 48. Espectro de masas del compuesto carvona

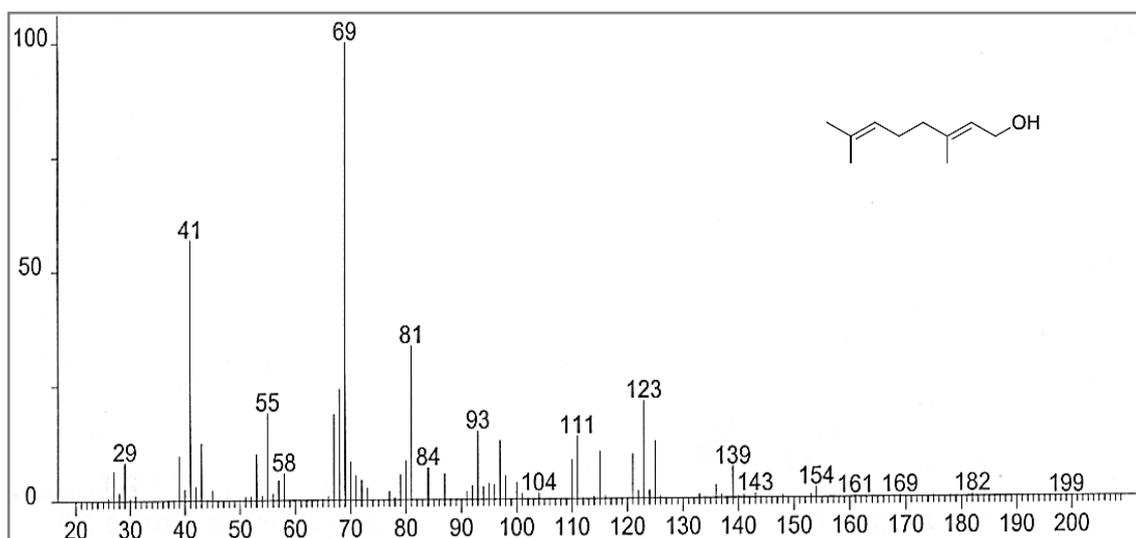


Figura 49. Espectro de masas del compuesto geraniol

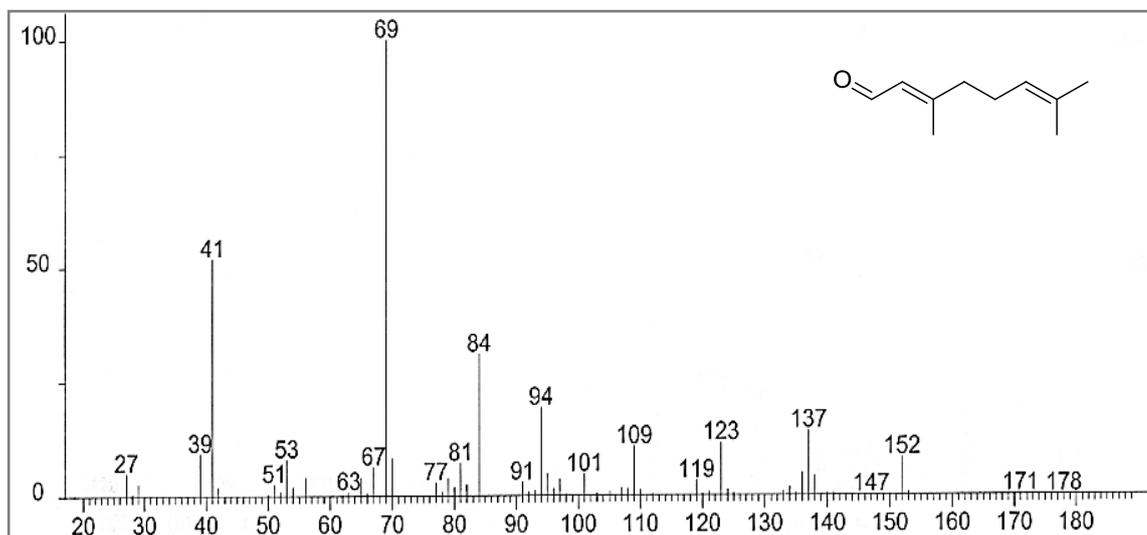


Figura 50. Espectro de masas del compuesto citral

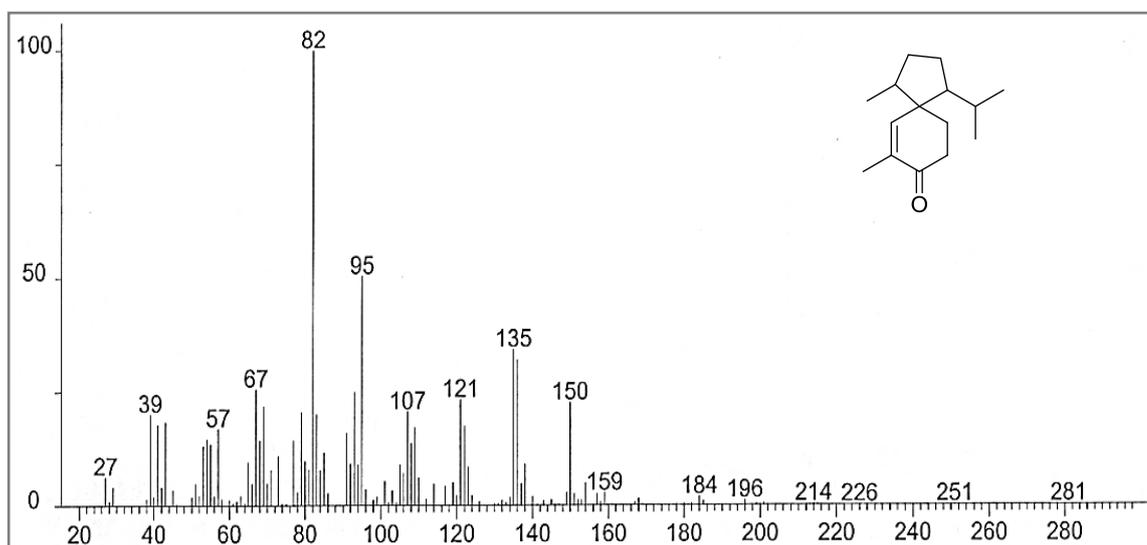


Figura 51. Espectro de masas del compuesto 1,8-dimetil-4-(1-metiletil)-spiro[4,5]dec-6-en-8-ona

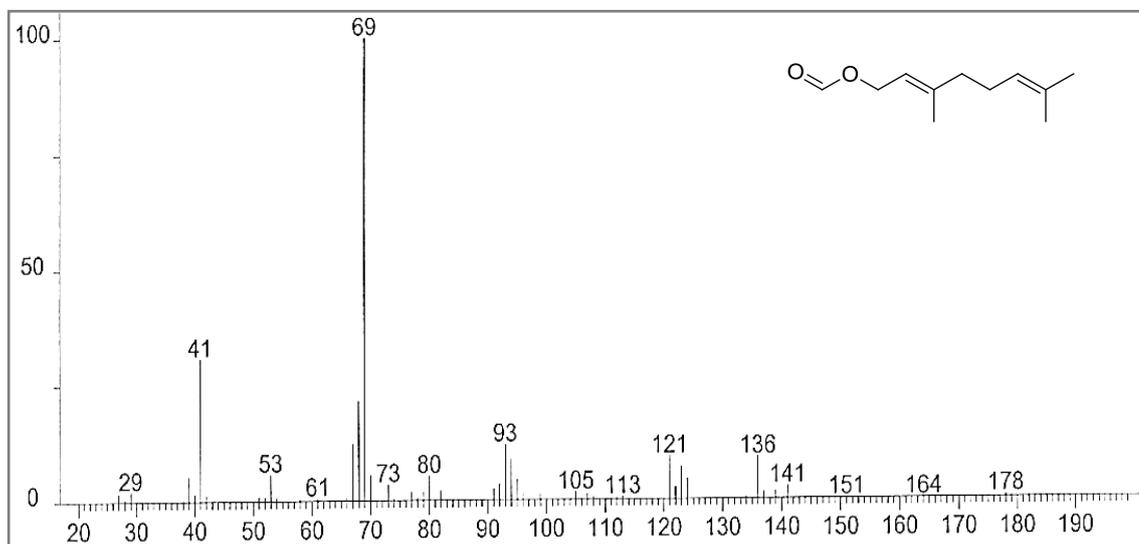


Figura 52. Espectro de masas del compuesto formato de geranilo

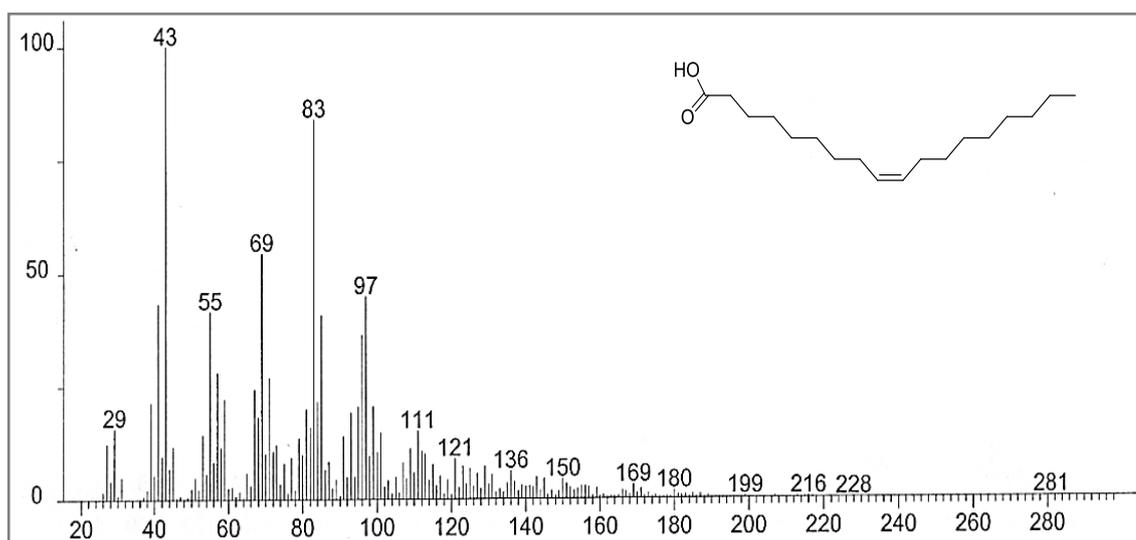


Figura 53. Espectro de masas del compuesto ácido oléico

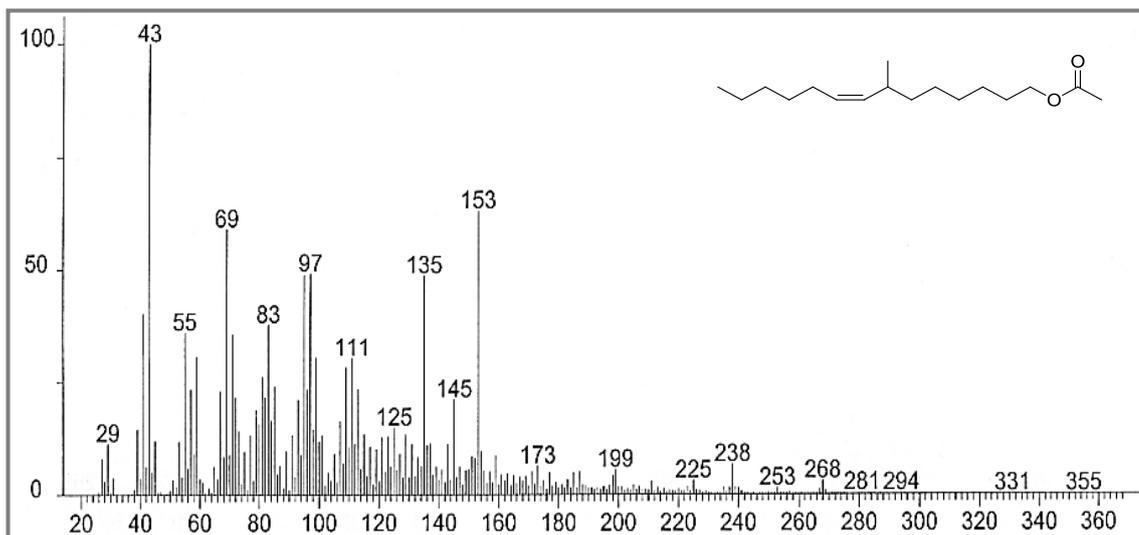


Figura 54. Espectro de masas del compuesto Acetato de (2)-7-metil-8-tetradecenilo

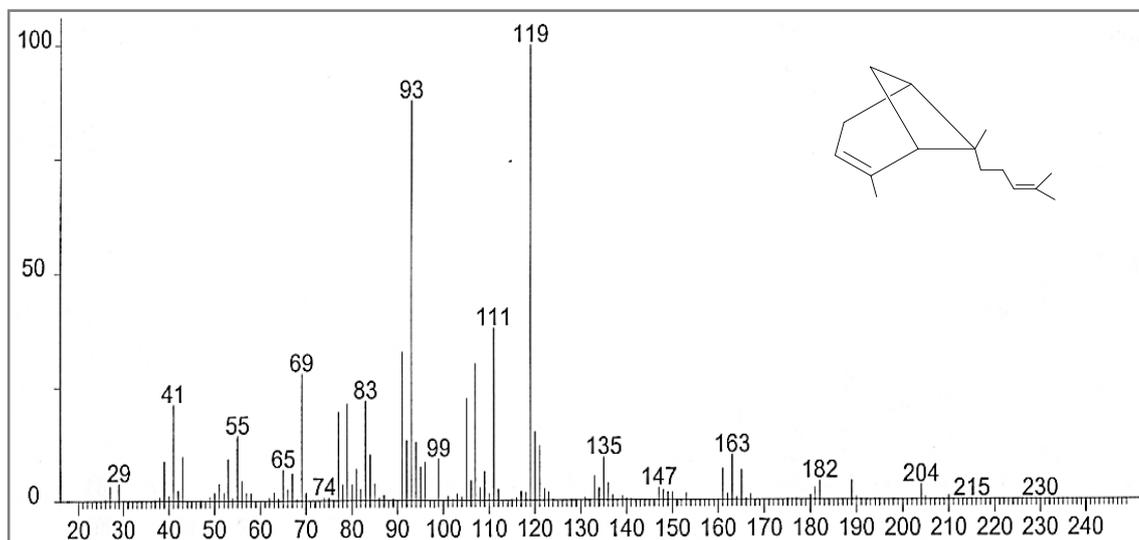


Figura 55. Espectro de masas del compuesto α -bergamoteno

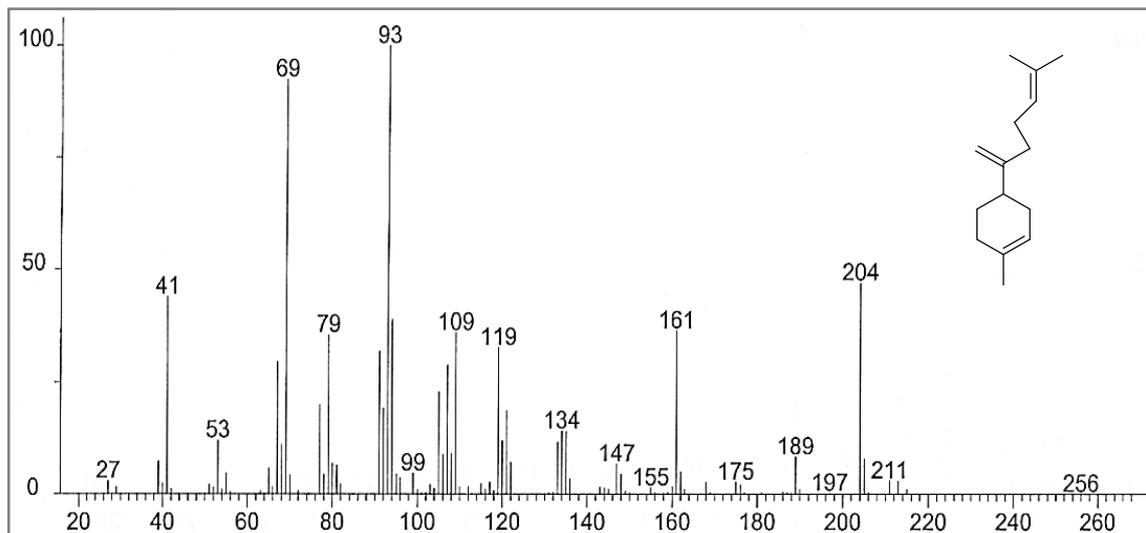


Figura 56. Espectro de masas del compuesto *trans*- α -bisaboleno

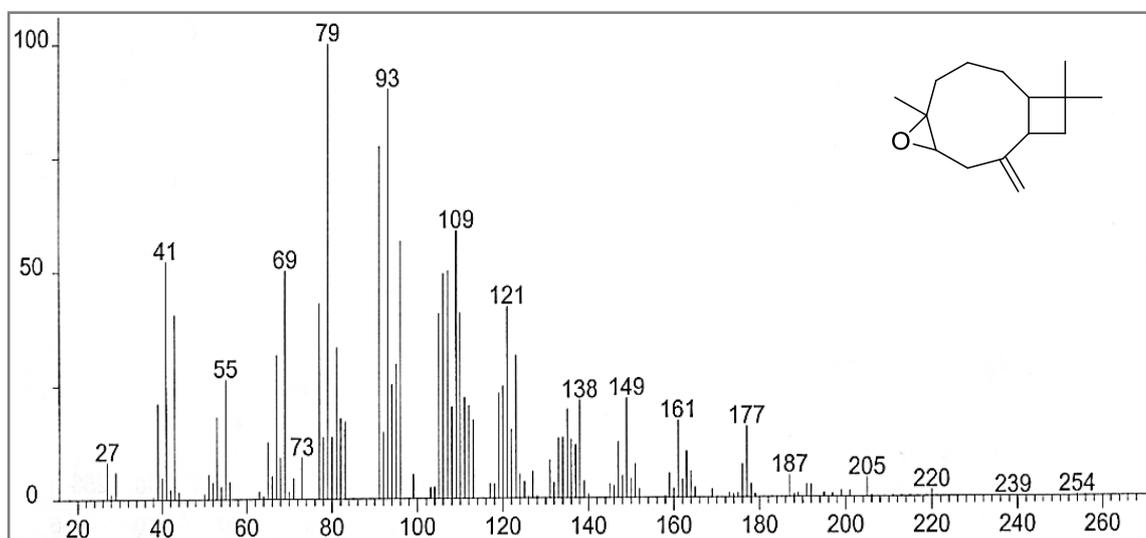


Figura 57. Espectro de masas del compuesto óxido de cariofileno

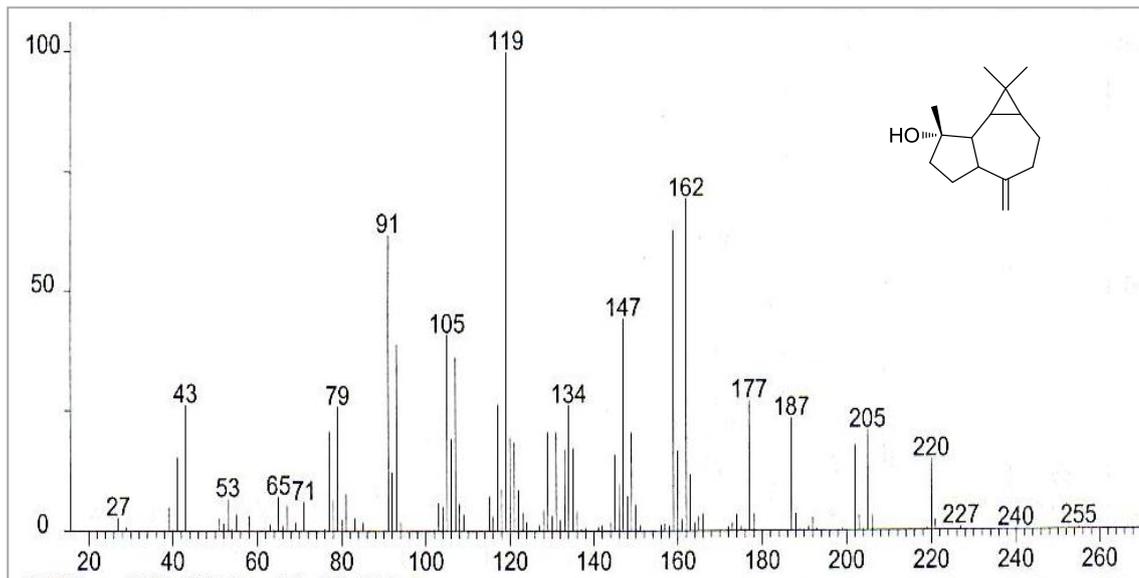


Figura 58. Espectro de masas del compuesto spatulenol

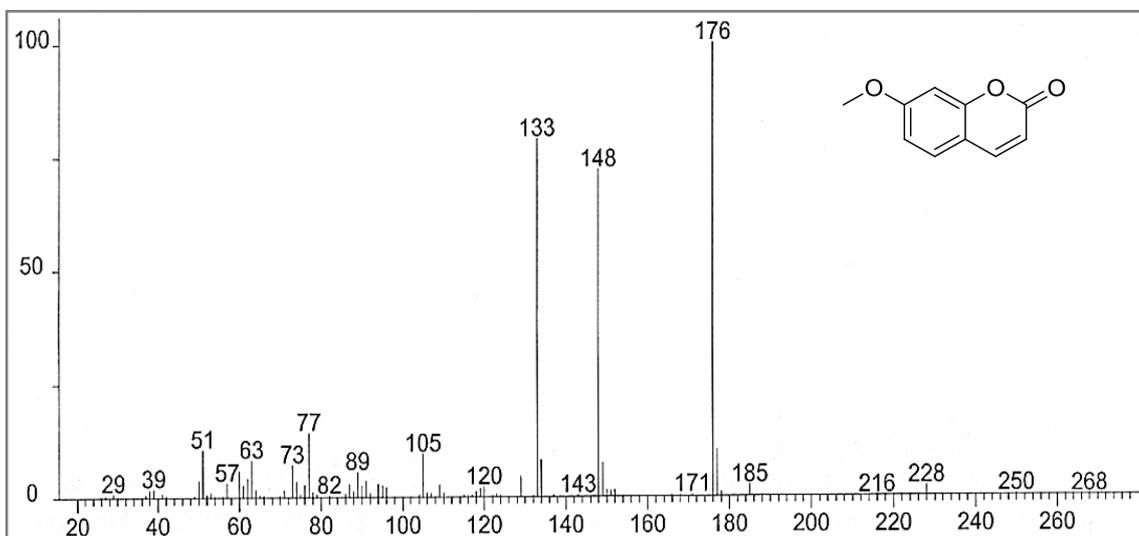


Figura 59. Espectro de masas del compuesto 7-metoxi-cumarina

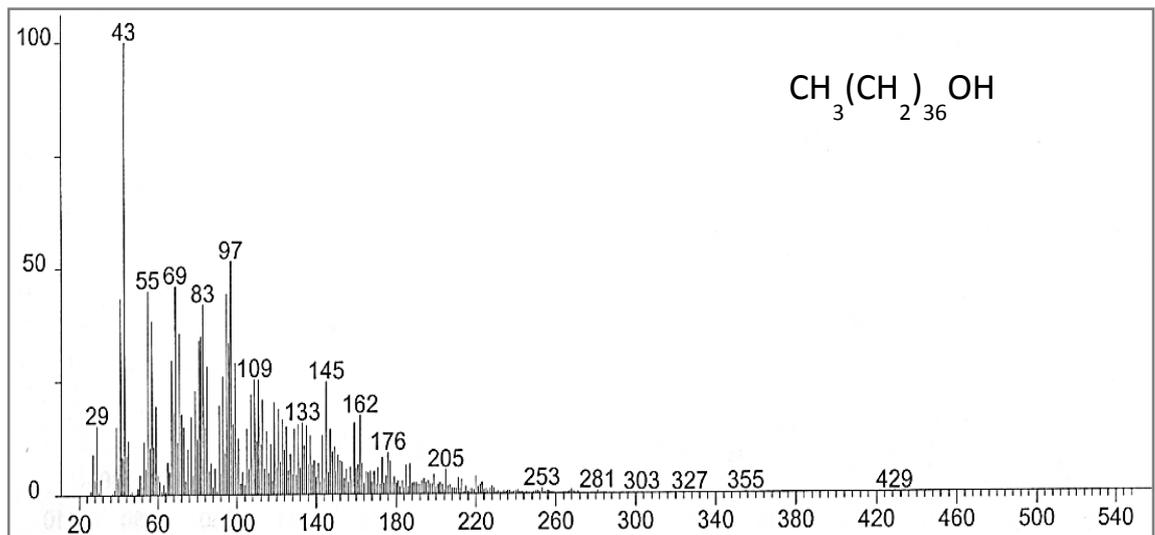


Figura 60. Espectro de masas del compuesto 1-heptatriacotanol

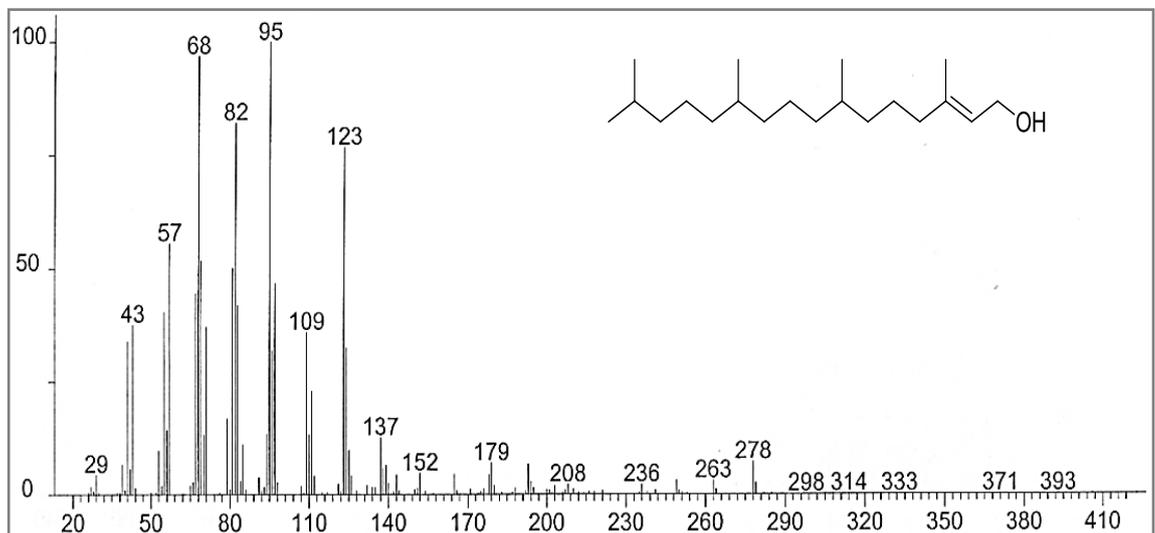


Figura 61. Espectro de masas del compuesto *trans*-fitol

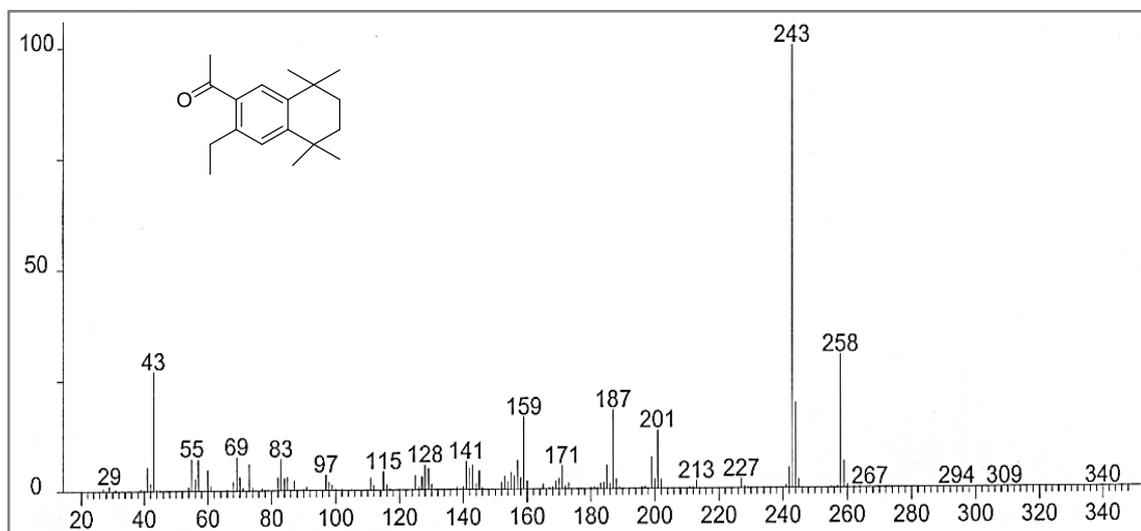


Figura 62. Espectro de masas del compuesto versávido

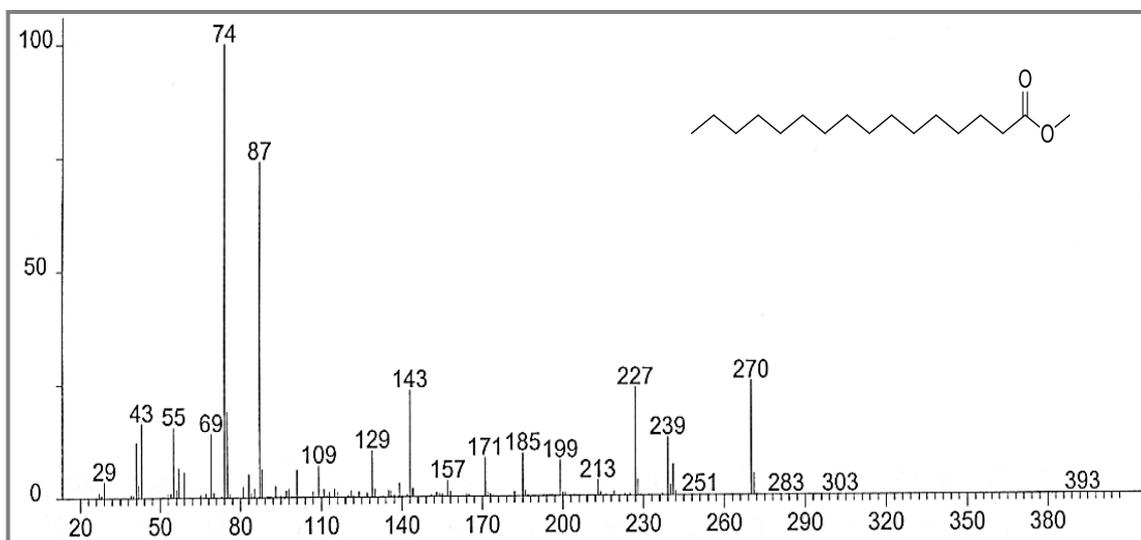


Figura 63. Espectro de masas del compuesto palmitato de metilo

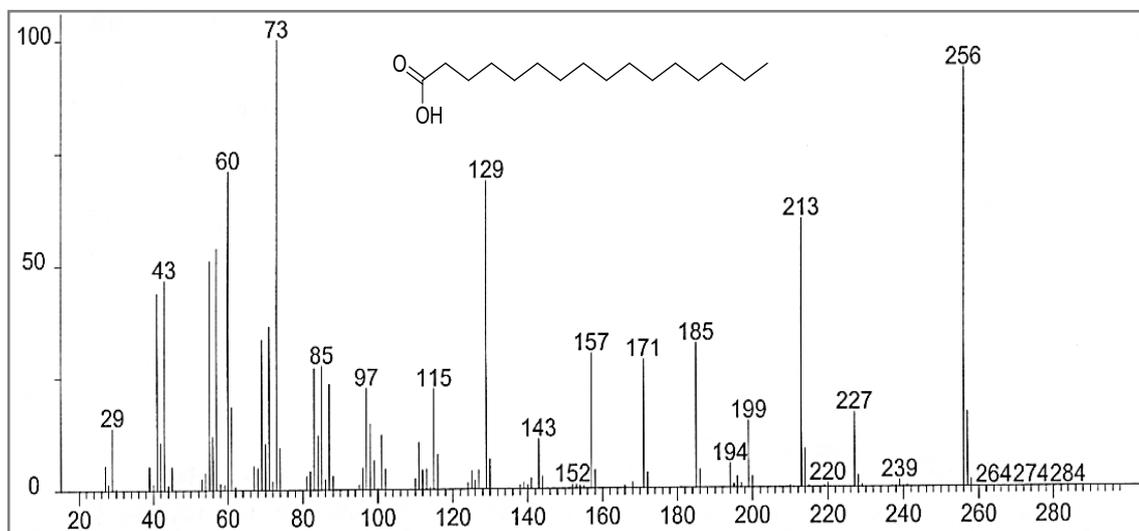


Figura 64. Espectro de masas del compuesto ácido palmítico

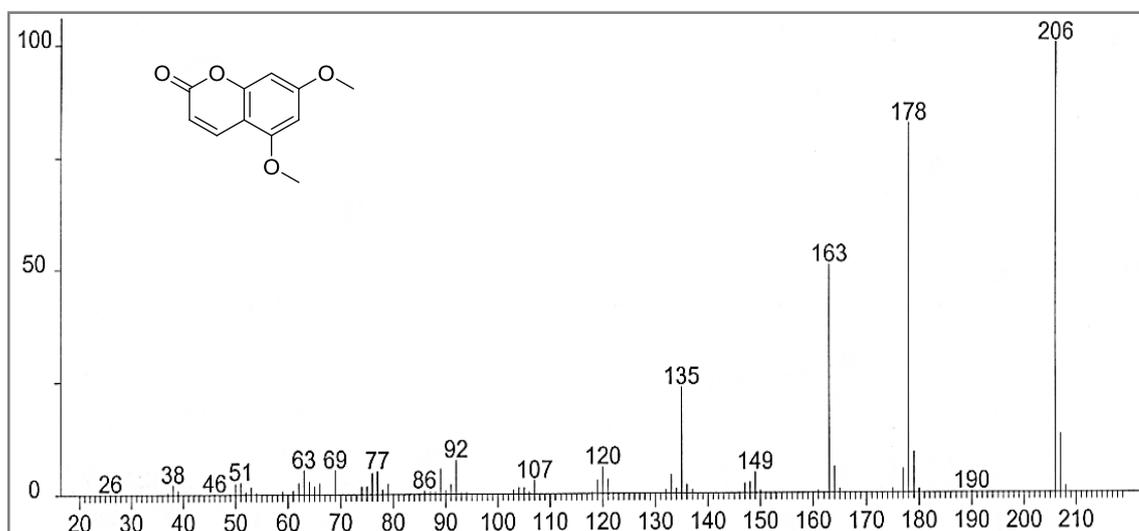


Figura 65. Espectro de masas del compuesto 5,7-dimetoxi-cumarina

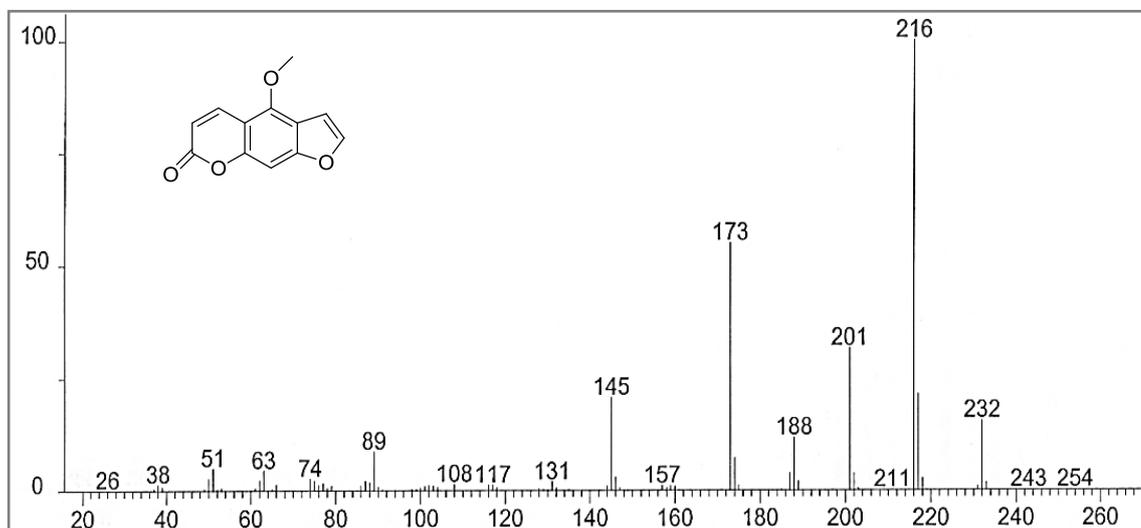


Figura 66. Espectro de masas del compuesto 5-metoxi-psoraleno

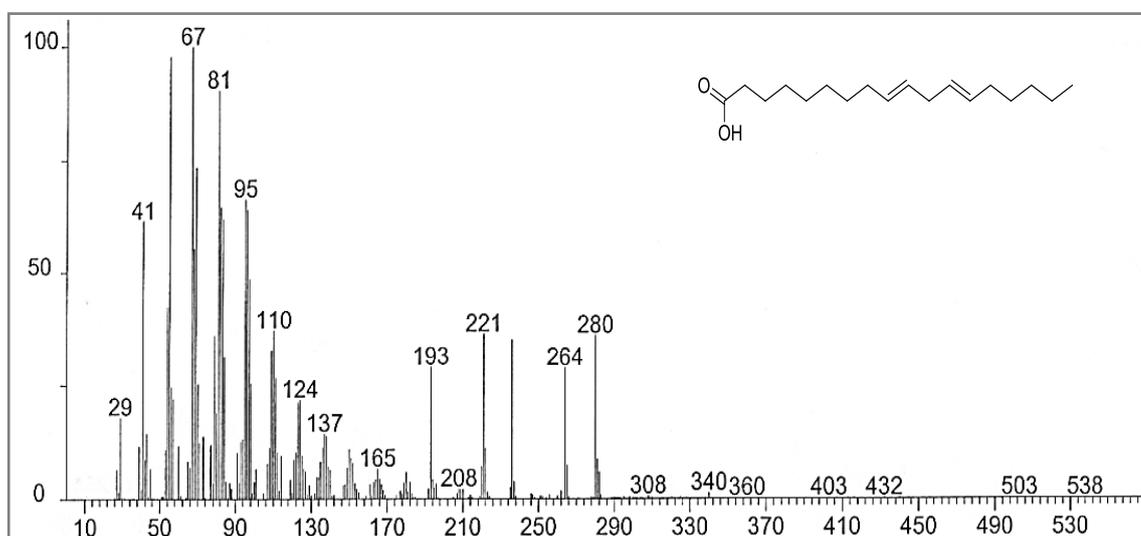


Figura 67. Espectro de masas del compuesto ácido linoléico

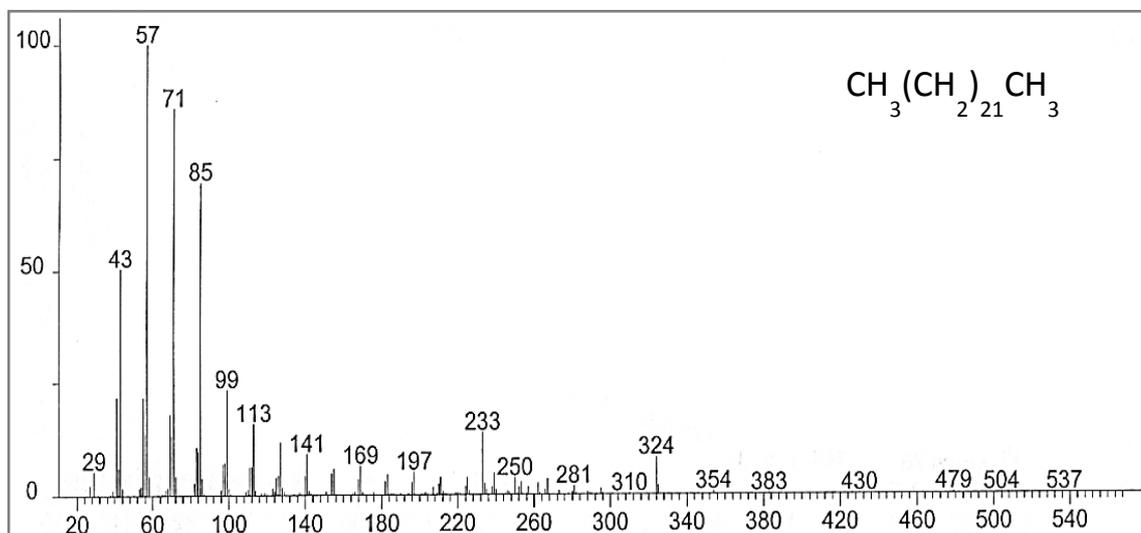


Figura 68. Espectro de masas del compuesto tricosano

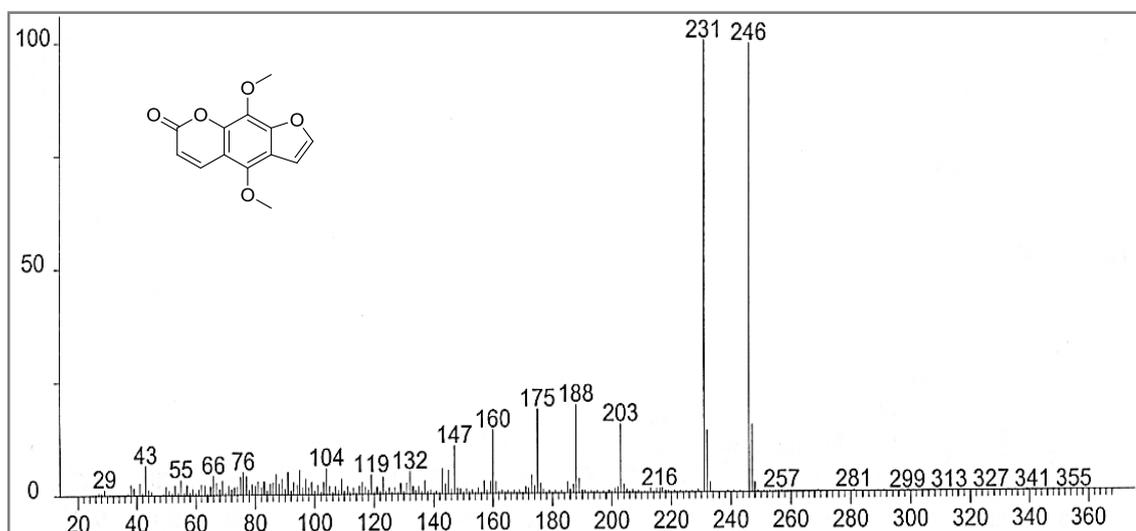


Figura 69. Espectro de masas del compuesto 5,8-dimetoxi-psoraleno

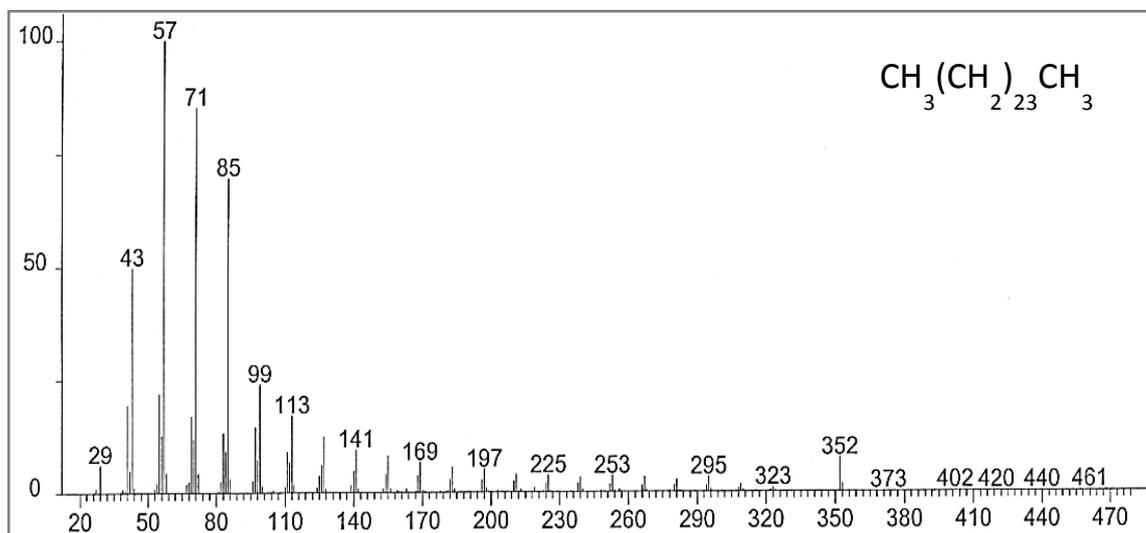


Figura 70. Espectro de masas del compuesto pentacosano

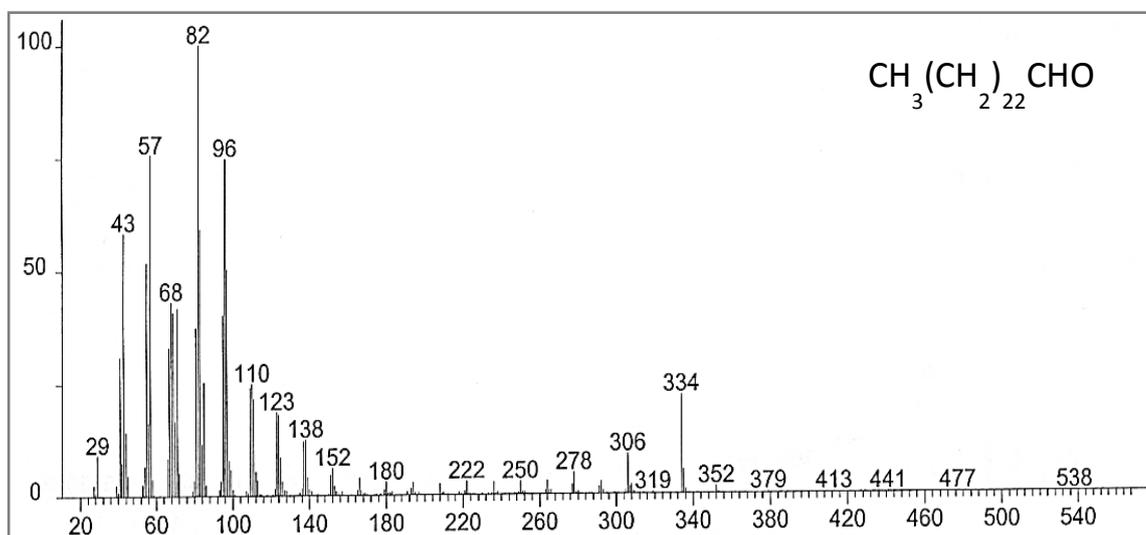


Figura 71. Espectro de masas del compuesto tetracosanal

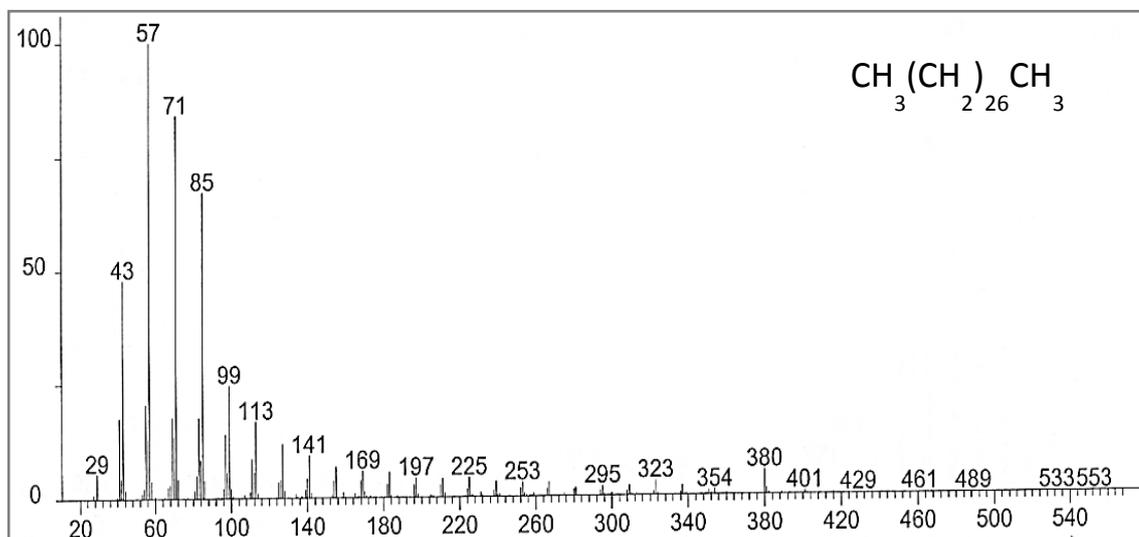


Figura 72. Espectro de masas del compuesto octacosano

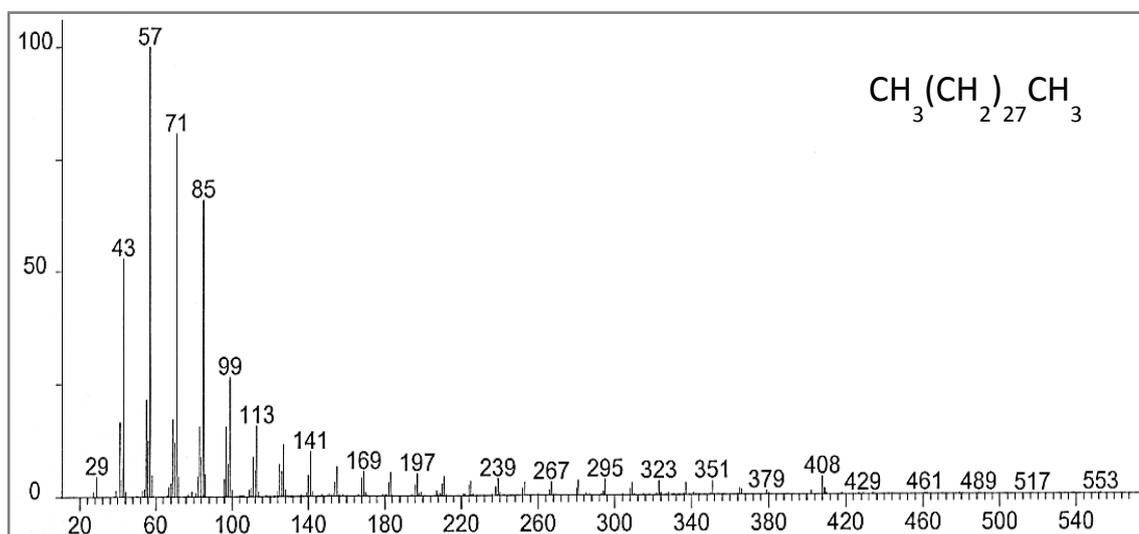


Figura 73. Espectro de masas del compuesto nonacosano

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Nallely Elizabeth Sandoval Montemayor

Candidato para el Grado de
Maestro en Ciencias con Especialidad en Farmacia

Tesis: AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN
BIOLÓGICALOS

CONSTITUYENTES ANTITUBERCULOSOS DE *Citrus aurantifolia*

Campo de estudio: Química y Farmacología de Productos Naturales

Biografía:

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 2 de Octubre de 1987, hija de Carlos Francisco Sandoval Coronado y Ludivina Montemayor Garza.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Químico Farmacéutico Biólogo en 2009.

Experiencia Profesional: Hospital San José Tec de Monterrey de Agosto a Octubre de 2008 y Hospital Clínica Nova de Enero a Mayo de 2009.