



**COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS AISLADOS DE LAS  
ESPECIES *Iostephane heterophylla* (Cav) Benth. (Asteraceae) Y  
*Haematoxylon brasiletto* Karst. (Leguminosae).**

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN CIENCIAS QUÍMICAS  
P R E S E N T A  
Q. F. B. EMMA MARTINEZ LUNA

ASESOR: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente	Dr. Leovigildo Quijano
Vocal	Dra. Ma. Luisa Villarreal Ortega
Secretario	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Primer suplente	Dr. Andrés Navarrete Castro
Segundo suplente	Dr. Rafael Castillo Bocanegra.

### **Sitio de realización de la tesis:**


Laboratorio 124 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química  
de la U. N. A. M.

### **Sustentante:**



Q. F. B. Emma Martínez Luna

### **Asesor:**



Dra. Rachel Mata Essayag.

## AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través del siguiente proyecto: “Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America” (NIH GRANT 2U01TW0036).

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Posgrado.

También agradezco a los siguientes académicos por el apoyo brindado a lo largo de la realización de la presente investigación:

A los QFB Rosa Isela del Villar Morales, Oscar S. Yáñez Muñoz (USAI, Facultad de Química, UNAM) y al M. en C. Atilano Gutiérrez (UAM, Iztapalapa) por el registro de los espectros de RMN.

A la QFB Rocío Patiño (Instituto de Química, UNAM) por el registro de los espectros de DC.

A la Q. Marisela Gutiérrez (USAI, Facultad de Química, UNAM) por el registro de los espectros en el IR.

A la Q. Georgina Duarte Lisci (USAI, Facultad de Química, UNAM) por el registro de los espectros de masas

A las M. en C. Laura Acevedo Arteaga e Isabel Rivero Cruz por su valiosa ayuda en varios aspectos técnicos a lo largo del presente trabajo de tesis. En particular a la Maestra Acevedo quien fungió como asesor técnico del presente trabajo.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz y a la M. en C. Blanca Rivero Cruz por su valiosa ayuda otorgada en la realización de mis estudios de maestría.

A los miembros del jurado designado para la revisión del manuscrito de tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones que sin duda alguna enriquecieron la versión final de la tesis, en particular al Doctor Leovigildo Quijano.

Por último, deseo agradecer a la Dra. Rachel Mata Essayag por su invaluable dirección de la presente investigación, con admiración y respeto agradezco sus enseñanzas así como la paciencia y el apoyo brindado a lo largo de mis estudios universitarios.

## DEDICATORIAS

A mis hijos Eduardo y Osvaldo  
Con todo mi amor, agradezco su paciencia y apoyo.

A mi esposo Alfredo  
Por todo el cariño y apoyo hasta ahora brindados

A mi mamá Candelaria Luna                      A mi papá J. Rubén Martínez  
Por brindarme su amor y apoyo incondicional

A mis hermanos:  
María del Carmen,  
Juan Rubén,  
Eusebio y  
José Guadalupe

A mi suegra Concepción Bárcenas  
Por todo el apoyo brindado y el cariño que  
me ha prestado todos estos años.

A mis cuñados  
Lucina, Daniel, Ricardo,  
Emilia, Abraham y Norma.

En memoria de mi suegro Daniel, quien me brindó apoyo y confianza.

A mis sobrinos  
Ricardo, Brenda, Berenice, Andrea, Alejandro y José Rubén.

A la Dra. Rachel Mata con admiración y respeto. Gracias.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 124

Laura, Blanca, Isabel, Fausto, Daniel Chávez, Ma. Elena, Iliana, Sandra, Olga, Mary  
Carmen, Norma, Sergio, Antonio, Janett, Hortensia, Adriana, Lilia, Verónica, y Cecilia  
Salazar.

A las familias que han estado conmigo por muchos años:

Luna Argueta,  
Morales Luna,  
Núñez Bárcenas,  
Medina Bárcenas,  
Bárcenas Piña,  
Bárcenas Guzmán,  
Bárcenas Luna,  
Torres Aramín,  
A Eduardo García y  
Carlos Sánchez

## CONTENIDO

Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Lista de Abreviaturas.....	vi
Lista de Cuadros.....	viii
Lista de Esquemas.....	ix
Lista de Tablas.....	ix
Lista de Figuras.....	x
Lista de Espectros.....	xi
<b>I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
2.1. Antecedentes de la especie <i>Iostephane heterophylla</i> . (Cav)	
Benth. (Asteraceae).....	4
2.2. Antecedentes de la especie <i>Haematoxylon brasiletto</i>	
Karst. (Leguminosae).....	12
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>17</b>
3.1. Material Vegetal.....	17
3.2. Procedimientos Generales.....	17
3.2.1. Análisis Cromatográficos.....	17
3.2.2. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales.....	18



	19
<b>IV. ESTUDIO QUÍMICO DE <i>Iostephane heterophylla</i>.....</b>	
4.1. Preparación del extracto orgánico.....	19
4.2. Fraccionamiento preliminar del extracto total de <i>Iostephane heterophylla</i> .....	20
4.3. Aislamiento y purificación de los productos de las fracciones primarias activas derivadas del extracto íntegro de <i>I. heterophylla</i> .....	21
4.3.1. Aislamiento de xantorizol ( <b>16</b> ) de las fracciones F002 y F003.....	21
4.3.2. Aislamiento de xantorizol ( <b>16</b> ), del ácido traquiloban-19-oico ( <b>1</b> ) y de 16 $\alpha$ -hidroxi- <i>ent</i> -kaurano ( <b>3</b> ) de la fracciones activas F004 y F005.....	22
4.3.3. Aislamiento de los ácidos <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico ( <b>4</b> ) y <i>ent</i> -beyer-15-en-19-oico ( <b>5</b> ) de la fracción secundaria F005-VII.....	24
4.3.4. Aislamiento de 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metil-fenol ( <b>22</b> ) de las fracciones secundarias F005-VI y F005-VII.....	24
<b>V. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA <i>in vitro</i> DE LOS EXTRACTOS, FRACCIONES Y COMPUESTOS PUROS.....</b>	25
5.1. Determinación de la actividad antimicrobiana <i>in vivo</i> del xantorizol ( <b>16</b> ) y del 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metil-fenol ( <b>22</b> ).....	25
<b>VI. ESTUDIO QUÍMICO DE <i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst. (Leguminosae).....</b>	26
6.1. Preparación del extracto orgánico.....	26
6.2. Fraccionamiento preliminar del extracto total de <i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst.....	27

6.3. Aislamiento y purificación de los productos de las fracciones primarias activas derivadas del extracto íntegro de <i>H. brasiletto</i> .....	28
6.3.1. Aislamiento del ácido cafeico (24), galato de metilo (25), ácido gálico (26), floroglucinol (27), ácido 4-hidroxicinámico (28), brazilina (21) y 5- metoxisoraleno (29) de las fracciones primarias H008 y H009.....	28
6.3.2. Aislamiento de haematoxilina (20) de las fracciones primarias H010-H012.....	34
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>36</b>
7.1. Obtención de los metabolitos biodinámicos de la especie <i>Iostephane</i> <i>heterophylla</i> (Cav) Benth. (Asteraceae).....	38
7.2 Elucidación estructural del 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22).....	41
7.3. Actividad antimicrobiana del xantorizol (16) y del 4-(1,5-dimetil-4- hexenil)-2-metilfenol (22).....	43
7.4. Obtención de los metabolitos biodinámicos de la especie <i>Haematoxylon</i> <i>brasiletto</i> Karst. (Leguminosae).....	48
7.5. Caracterización del 5-metoxisoraleno (29).....	51
7.6. Determinación de la actividad antimicrobiana de los compuestos aislados de <i>Haematoxylon brasiletto</i> .....	56
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>98</b>

## RESUMEN

En el marco del proyecto "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America" se realizó la investigación química y la evaluación del potencial antimicrobiano de la raíz de *Iostephane heterophylla* (Cav.) Benth. (Asteraceae) y la corteza de *Haematoxylon brasiletto* Karst. (Leguminosae).

El estudio biodirigido de la raíz de *Iostephane heterophylla* permitió el aislamiento de siete metabolitos secundarios: el ácido traquiloban-19-oico (1), 16 $\alpha$ -hidroxi-*ent*-kaurano (3), ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (4), ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico (5), 16 $\alpha$ -hidroxi-*ent*-kaur-11-eno (9), xantorizol (16) y un nuevo sesquiterpeno de tipo bisaboleno, identificado como el 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22).

Del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH (1:1) de la corteza de *H. brasiletto* se aislaron ocho metabolitos secundarios los cuales fueron identificados como: haematoxilina (20), brazilina (21), ácido cafeico (24), galato de metilo (25), ácido gálico (26), floroglucinol (27), ácido 4-hidroxicinámico (28) y 5-metoxisoraleno (29). De manera general, la elucidación estructural de los productos naturales se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos y quirópticos.

La evaluación del potencial antimicrobiano del extracto de la raíz de *I. heterophylla*, mediante el método de microdilución permitió detectar que los compuestos xantorizol (16) y 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22) presentan actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (CMI 16  $\mu$ g/ml), *Enterococcus faecium* (CMI 16  $\mu$ g/ml), *Bacillus subtilis* (CMI 16  $\mu$ g/ml), *Escherichia coli* (CMI 32  $\mu$ g/ml) y *Klebsiella pneumoniae* (CMI 32  $\mu$ g/ml).

Por otro lado; los compuestos haematoxilina (20), brazilina (21), ácido cafeico (24) y floroglucinol (27) aislados de la especie *H. brasiletto* y evaluados mediante el método de difusión en agar, presentaron actividad contra *Staphylococcus aureus* 375, *Enterococci faecium* y *Escherichia coli imp.* 389.

## ABSTRACT

During the course of our research program to discover bioactive agents from dryland plants of Latin America, the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH (1:1) extracts from the roots of *I. heterophylla* and the stem bark of *H. brasiletto* were selected for bioassay-guided fractionation on the basis of its important antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium*.

Xanthorrhizol (**16**) and 4-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-2-methylphenol (**22**) were identified as the principal antimicrobial components of a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH (1:1) extract derived from *Iostephene heterophylla*. Compound **22** is a new natural product, but has been synthesized. Both compounds exhibited low level activity (MICs of 16-32 µg/ml) against methicillin-resistant staphylococci and vancomycin-resistant enterococci. They were either inactive or poorly active against Gram-negative bacteria and yeast. Compound **16** was tested in an *in vivo* model; it did not provide protection to mice infected with *Staphylococcus aureus*. Compound **22** is the second natural rearranged bisabolene reported in the literature, the first one being 2-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methylphenol (**23**) isolated from *Elvira biflora* DC. (Asteraceae).

Bioactivity guided fractionation of the active extract from *H. brasiletto* led to isolation of haematoxylin (**20**), brazilin (**21**), caffeic acid (**24**), methyl gallate (**25**), gallic acid (**26**), phloroglucynol (**27**), 4-hydroxycinamic acid (**28**) and 5-methoxypsoralen (**29**). Compounds **24**, **25**, **26**, **27** **28** and **29** are novel to this species.

## LISTA DE ABREVIATURAS

%	por ciento
°C	grados centígrados
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
cm	Centímetro
COSY	Correlated spectroscopy
$\delta$	Desplazamiento químico
<i>d</i>	Señal doble
<i>dd</i>	Doble de dobles
DEPT	Distortionless enhancement polarization transfer
HREIMS	High resolution electronic impact mass spectrometry.
eV	Electron volts
g	Gramos
h	Hora
HETCOR	Heteronuclear correlation
hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear multiple bond connectivity
HMQC	Heteronuclear multiple-quantum coherence
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
Hz	Hertz
Int. rel.	Intensidad relativa
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Kg	Kilogramo
l	Litros
$\lambda$	Longitud de onda
$M^+$	Ión molecular
<i>m</i>	Señal Múltiple
<i>m/z</i>	Relación masa-carga

## LISTA DE ABREVIATURAS (continuación)

$\mu\text{g}$	Microgramos
$\mu\text{l}$	Microlitros
mg	Miligramos
MHz	Mega Hertz
ml	Mililitros
mm	Milímetros
nm	Nanómetros
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
p. f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear.
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
s	Señal simple
TMS	Tetrametilsilano
uma	Unidades de masa atómica
UV	Ultravioleta
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
DC	Dicroísmo circular
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CL <sub>50</sub>	Concentración letal media
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva media
USA	Estados Unidos
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Página
1	Propiedades medicinales atribuidas a <i>Iostephane heterophylla</i>	6
2	Metabolitos secundarios aislados de <i>Iostephane heterophylla</i> .	7
3	Propiedades medicinales atribuidas a <i>Haematoxylon brasiletto</i> .	14
4	Resumen del fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna abierta del extracto de la raíz de <i>Iostephane heterophylla</i> .	21
5	Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción F004 de <i>Iostephane heterophylla</i> .	22
6	Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción F005 de <i>Iostephane heterophylla</i> .	23
7	Resumen del fraccionamiento terciario vía cromatografía en columna abierta de la fracción F005-VI y F005-VII de <i>Iostephane heterophylla</i> .	25
8	Resumen del fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna abierta del extracto crudo de <i>Haematoxylon brasiletto</i> .	27
9	Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de las fracciones activas H008-H009 de <i>Haematoxylon brasiletto</i> .	28
10	Resumen del fraccionamiento terciario vía cromatografía en columna abierta de la fracción H019 de <i>Haematoxylon brasiletto</i>	29
11	Resumen del fraccionamiento terciario vía cromatografía en columna abierta de la fracción H022 de <i>Haematoxylon brasiletto</i>	31
12	Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de las fracciones H010-H012 de <i>Haematoxylon brasiletto</i>	34
13	Metabolitos aislados de la raíz de <i>Iostephane heterophylla</i>	38
14	Metabolitos aislados de la corteza de <i>Haematoxylon brasiletto</i> .	48

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema	Contenido	Página
1	Proceso de extracción de la raíz de <i>Iostephane heterophylla</i>	20
2	Proceso de extracción de la corteza de <i>Haematoxylon brasiletto</i> .	26

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Contenido	Página
1	Actividad antimicrobiana de las fracciones primarias de <i>Iostephane heterophylla</i> y <i>Haematoxylon brasiletto</i>	37
2	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto <b>22</b>	41
3	Datos de RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de los compuestos <b>22</b> y <b>16</b>	45
4	Datos de RMN- <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de los compuestos <b>22</b> y <b>16</b>	46
5	Actividad antimicrobiana del xantorizol ( <b>16</b> ) y del compuesto <b>22</b> .	47
6	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del 5-metoxisoraleno ( <b>29</b> ).	51
7	Datos de RMN- <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).	51
8	Datos de RMN- <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	52
9	Actividad antimicrobiana de los metabolitos aislados de <i>H. brasiletto</i> .	56



## LISTA DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
1	<i>Iostephane heterophylla</i> . (Cav) Benth. (Asteraceae)	5
2	<i>Haemayoxylon brasiletto</i> . Karst. (Leguminosae)	13
3	Cromatograma obtenido a nivel preparativo de la fracción <b>H104</b> .	30
4	Cromatograma obtenido a nivel preparativo de la fracción <b>H067</b> .	32
5	Cromatograma generado en forma preparativa durante la separación de la fracción <b>H069</b> .	33
6	Cromatograma obtenido a nivel preparativo de la fracción <b>H035</b> .	35
7	Fragmentos más importantes observados en el espectro de masas por impacto electrónico del 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol ( <b>22</b> )	42
8	Correlaciones observadas en el Espectro HMBC del compuesto <b>22</b>	43
9	Correlaciones observadas en el espectro NOESY del compuesto <b>22</b> .	44
10	Espectro HMBC del compuesto <b>29</b> .	54
11	Correlaciones observadas en el espectro HMBC del compuesto <b>29</b> .	55

## LISTA DE ESPECTROS

Espectro	Contenido	Página
1	Espectro en el IR de 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22).	72
2	Espectro de masas de 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22).	73
3	Espectro de masas del xantorizol (16).	74
4	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22).	75
5	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de xantorizol (16).	76
6	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22).	77
7	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de -xantorizol (16).	78
8	Espectro de RMN-NOESY de 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22).	79
9	Espectro de RMN-HMBC de 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22).	80
10	Espectro de Dicroísmo Circular de 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22).	81
11	Espectro en el IR de haematoxilina (20).	82
12	Espectro de masas de haematoxilina (20).	83
13	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de haematoxilina (20).	84
14	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de haematoxilina (20).	85
15	Espectro en el IR de brazilina (21).	86
16	Espectro de masas de brazilina (21).	87
17	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de brazilina (21).	88
18	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de brazilina (21).	89
19	Espectro en el IR de 5-metoxisoraleno (29).	90
20	Espectro de masas de 5-metoxisoraleno (29).	91
21	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de 5-metoxisoraleno (29).	92
22	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de 5-metoxisoraleno (29) ( <i>ampliación</i> ).	93
23	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H-COSY de 5-metoxisoraleno (29).	94
24	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de 5-metoxisoraleno (29).	95
25	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C-DEPT de 5-metoxisoraleno (29).	96
26	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C-HETCOR de 5-metoxisoraleno (29).	97

## I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

El presente trabajo de tesis se generó en el marco del proyecto de investigación "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America", el cual forma parte de un programa de carácter internacional denominado "International Cooperative Biodiversity Group (ICBG)." Este programa está patrocinado principalmente por el National Institute of Health (NIH) (Timmermann, *et al.*, 1997).

Los objetivos principales del programa ICBG (Suffnes, *et al.*, 1995) son los siguientes:

1. Identificar los recursos renovables en países en vías de desarrollo y proponer estrategias para la conservación de los mismos.
2. Desarrollar, a largo plazo, las estrategias ecológicas y económicas para el establecimiento del cultivo de recursos naturales en países en vías de desarrollo.
3. Implementar estrategias de bajo costo para la investigación de los recursos naturales regionales.
4. Buscar nuevos fármacos de origen natural para tratar enfermedades que ocasionan problemas en vastos sectores de la población.
5. Contribuir al mejoramiento de la infraestructura de investigación de los países en vías de desarrollo que participan en el programa.
6. Contribuir a la formación de recursos humanos capacitados para realizar investigación sobre los recursos naturales renovables de los países participantes.

Los países que hacen una labor conjunta con los Estados Unidos de América del Norte en el proyecto "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America" son: Chile, Argentina y México. Las instituciones norteamericanas a las que compete el desarrollo de la empresa científica antes señalada son: la Universidad de Arizona, donde reside el investigador principal del proyecto, laboratorios, Wyeth-Ayerst y la Universidad de Illinois. En México, la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de la Facultad de Química y el Instituto de Biología, es la responsable de colaborar con el proyecto. En Chile,

la institución participante es la Universidad Católica de Chile; en tanto que en Argentina participan la Universidad de la Patagonia y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA.

En la Facultad de Química, a través de un convenio con la Universidad de Arizona se realizan las siguientes actividades:

- a. Preparación de los extractos vegetales a partir de especies seleccionadas, principalmente mediante un criterio etnomédico.
- b. Envío de los extractos para determinar su potencialidad terapéutica. Las evaluaciones se realizan en los laboratorios Wyeth-Ayerst, así como en el laboratorio de Microbiología, Escuela de Farmacia, Universidad de Illinois, E. E. U. U.
- c. Fraccionamiento de manera biodirigida de los extractos que demuestren una actividad biológica significativa.
- d. Separación y purificación de los compuestos activos responsables de la actividad biológica.
- e. Elucidación de las estructuras moleculares de los componentes aislados de las fracciones activas.

Como se desprende de la información antes mencionada, las actividades que se desarrollan en la Facultad de Química se encuentran enmarcadas en el objetivo número cuatro del programa ICBG. El cumplimiento de este objetivo permitirá el descubrimiento de fármacos potenciales a partir de especies medicinales de las zonas áridas de la República Mexicana.

En el contexto del proyecto “Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America”, las plantas medicinales *Iostephane heterophylla* (Cav) Benth. (Asteraceae) y *Haematoxylon brasiletto* Karst. (Leguminosae) fueron seleccionadas como fuentes de principios antibacterianos de posible interés terapéutico. En consecuencia el objetivo primordial del presente trabajo es el aislamiento y la caracterización de los principios activos responsables de la actividad antibacteriana encontrada en las evaluaciones

preliminares, conducentes a determinar el potencial antimicrobiano de varias especies vegetales de México.

Para el cumplimiento de éste objetivo se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- i.* Preparar los extractos de: la raíz de *I. heterophylla* y de la corteza de *H. brasiletto* mediante un proceso de maceración.
- ii.* Realizar el fraccionamiento biodirigido del extracto total mediante la aplicación de la cromatografía en columna abierta.
- iii.* Separar y purificar los componentes de las fracciones activas, empleando para ello diversos procedimientos cromatográficos.
- iv.* Identificar los compuestos presentes en las fracciones activas mediante la aplicación de métodos espectrométricos y espectroscópicos.
- v.* Contribuir al conocimiento de los recursos naturales empleados en la medicina tradicional Mexicana.

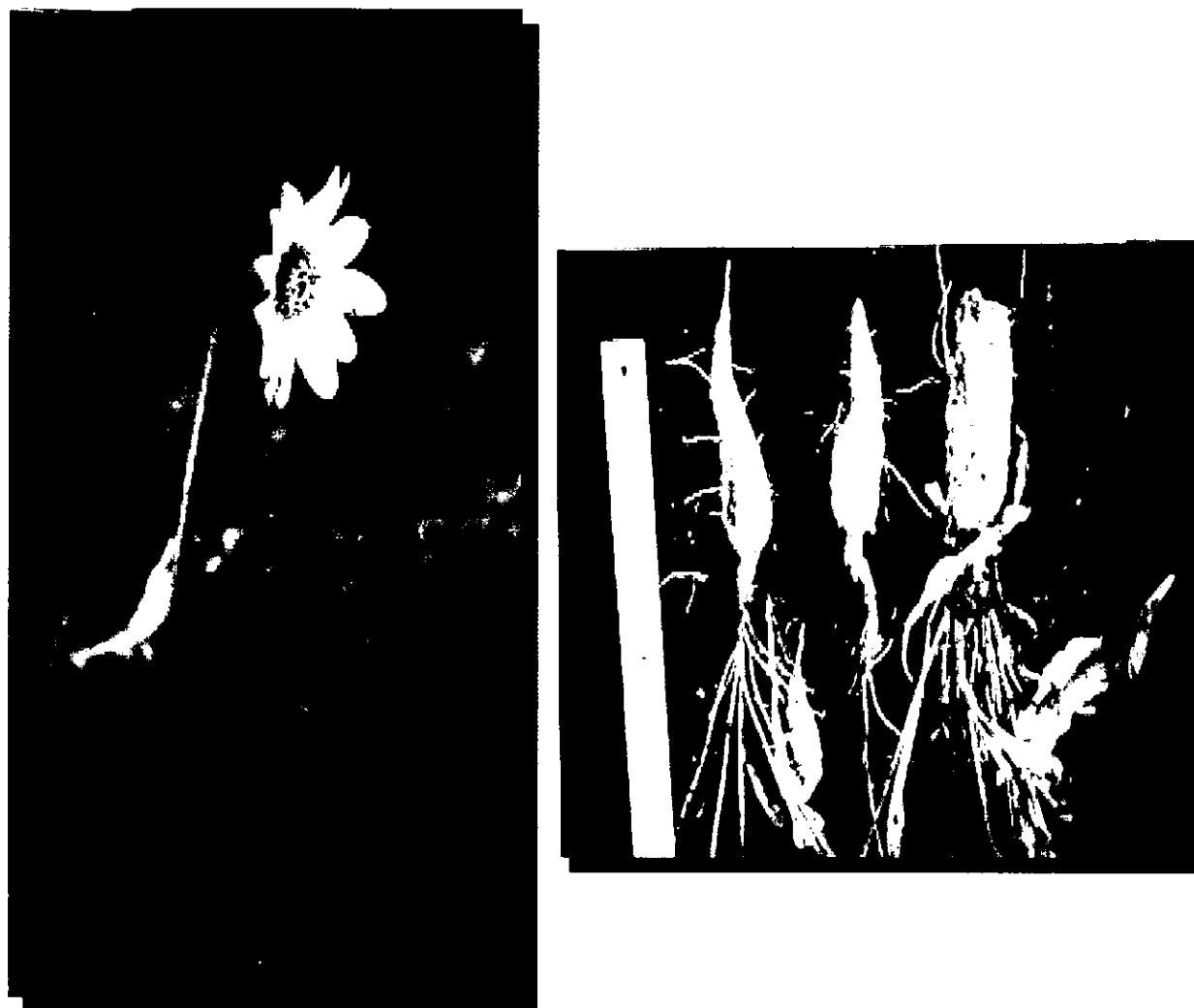
## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Antecedentes de la especie *Iostephane heterophylla*. (Cav) Benth. (Asteraceae)

La especie *Iostephane heterophylla* (Cav) Benth. (Asteraceae) es una planta originaria de México. La especie habita en climas semiseco y templado entre los 1500 y 3000 metros sobre el nivel del mar y se distribuye ampliamente desde Chihuahua hasta Oaxaca. En el Norte de la República Mexicana y las montañas del Estado de México la planta se conoce como “*hierba de Indio*” o “*escorcionera*”; en Morelos como “*hierba del manso*” y en Nayarit como “*tecpahli*”. *I. heterophylla* es una planta herbácea de aproximadamente 30 cm de alto, sus hojas son basales de forma elíptica, de 9 a 15 cm de largo, la base es generalmente sinuada y los bordes dentados, las flores de color rosa se encuentran en cabezuelas terminales (Figura 1).

En la medicina tradicional mexicana y desde principios del periodo Colonial *I. heterophylla* es valorada por sus propiedades medicinales. La infusión de las hojas se utiliza como cicatrizante, para el tratamiento de heridas, quemaduras y toda clase de afecciones de la piel, así como para el tratamiento de la diabetes y desórdenes gastrointestinales, tales como la disentería (Hernández; 1959; Argueta, *et al.*, 1994).

En el centro del país, las hojas de la planta son también altamente valoradas para disminuir dolores reumáticos y artríticos, frotando la tintura en las articulaciones. La raíz machacada se aplica como cataplasma para reducir fiebre o como un antídoto contra picaduras o mordeduras de animales venenosos (Argueta, *et al.*, 1994).



**Figra 1 *Iostephane heterophylla*. (Cav) Benth.(Asteraceae).**

En el estado de Morelos se emplea la decocción de la planta en el temascal para baños posparto. En el estado de Nayarit, la solución resultante de la maceración de la raíz se emplea para aliviar toda clase de dolor corporal.

Otros reportes incluyen el uso de la raíz para el tratamiento de desórdenes hepáticos, esterilidad en la mujer, antipalúdico o para la inflamación de la garganta (Argueta, *et al.*, 1994; Bye, 1986).

En el **Cuadro 1** se resumen algunas de las propiedades medicinales de *I. heterophylla*, así como la vía de administración y la parte de la planta que se emplea para el tratamiento.

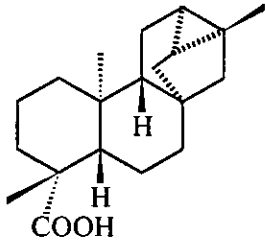
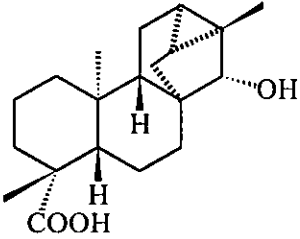
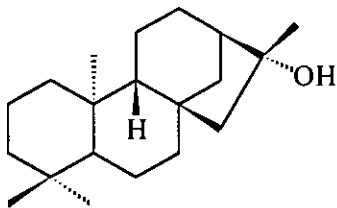
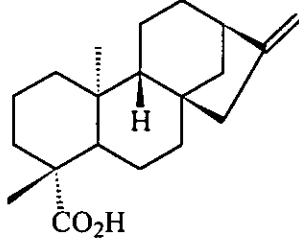
**Cuadro 1.** Propiedades medicinales atribuidas a *Iostephane heterophylla* (Argueta, *et al.*, 1994; Bye, 1986).

USO POPULAR	PARTE DE LA PLANTA	VIA DE ADMINISTRACION
Enfermedades hepáticas	hojas	oral
Afecciones cutáneas	hojas	tópica
Antiséptico	hojas	tópica
Antidiabético	hojas	oral
Antidiarreico	hojas y raíz	oral
Tratamiento de dolores reumáticos y artríticos	toda la planta	tópica
Dolor de pulmón	raíz y hojas	oral y tópico
Purgante	raíz y hojas	oral
Antídoto	raíz	tópico
Padecimientos renales	raíz	oral
Quemaduras y heridas	raíz y hojas	tópico
Antipalúdico	toda la planta	oral
Dolor corporal	toda la planta	oral o tópico
Enfermedades gastrointestinales	raíz y hojas	oral
Antiinflamatorio	hojas y raíz	oral

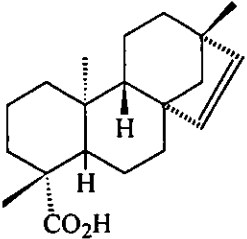
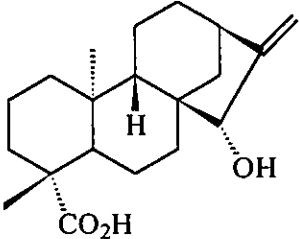
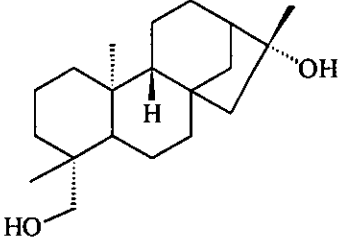
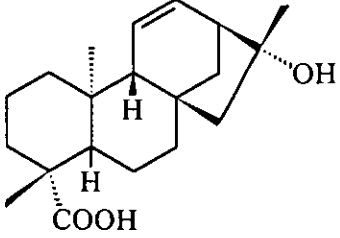
Los distintos estudios químicos realizados a la fecha sobre esta especie permitieron el aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios que se presentan en el **Cuadro 2**. Los metabolitos incluyen diterpenoides de varios tipos, sesquiterpenoides del tipo bisaboleno, cumarinas y esteroides (Aguilar *et al.*, 1993; Aguilar y Delgado, 1995; Delgado y Aguilar, 1996).



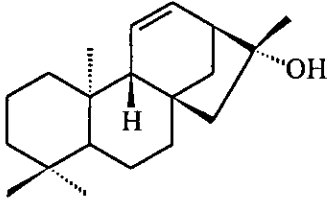
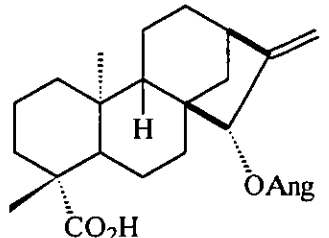
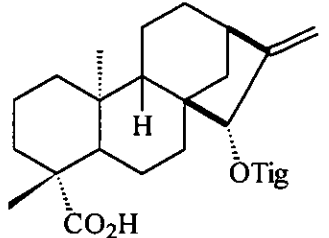
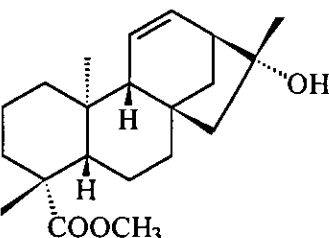
Cuadro 2. Metabolitos secundarios aislados de *Iostephane heterophylla*.

COMPUESTO	REFERENCIA
 <p>ácido traquiloban-19-oico (1)</p>	<p>Aguilar <i>et al.</i>, 1993; Aguilar y Delgado, 1995; Delgado y Aguilar, 1996</p>
 <p>ácido 15<math>\alpha</math>-hidroxi-traquiloban-19-oico (2).</p>	<p>Aguilar <i>et al.</i>, 1993; Aguilar y Delgado, 1995; Delgado y Aguilar, 1996</p>
 <p>16<math>\alpha</math>-hidroxi-<i>ent</i>-kaurano (3).</p>	<p>Aguilar <i>et al.</i>, 1993; Aguilar y Delgado, 1995; Delgado y Aguilar, 1996</p>
 <p>ácido <i>ent</i>-kaur-16-en-19-oico (4).</p>	<p>Aguilar <i>et al.</i>, 1993; Aguilar y Delgado, 1995; Delgado y Aguilar, 1996</p>

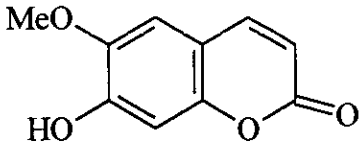
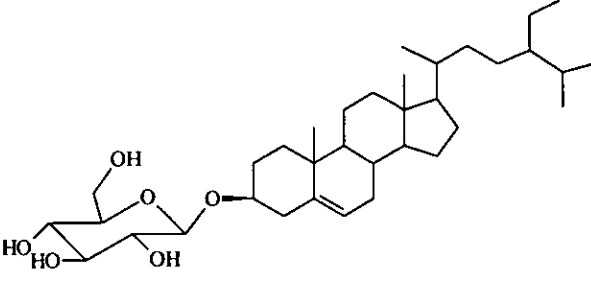
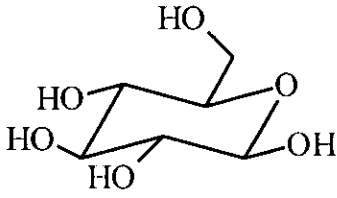
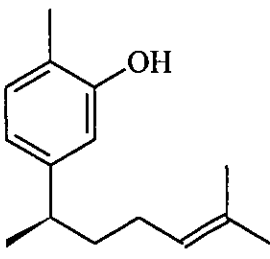
Cuadro 2. Metabolitos secundarios aislados de *Iostephane heterophylla* (continuación).

COMPUESTO	REFERENCIA
 <p>ácido <i>ent</i>-beyer-15-en-19-oico (5).</p>	<p>Aguilar <i>et al.</i>, 1993; Aguilar y Delgado, 1995; Delgado y Aguilar, 1996</p>
 <p>ácido 15<math>\alpha</math>-hidroxi-<i>ent</i>-kaur-16-en-19-oico (6).</p>	<p>Aguilar <i>et al.</i>, 1993; Aguilar y Delgado, 1995; Delgado y Aguilar, 1996</p>
 <p>16<math>\alpha</math>-hidroxi-<i>ent</i>-kaur-19-ol (7).</p>	<p>Aguilar <i>et al.</i>, 1993; Aguilar y Delgado, 1995; Delgado y Aguilar, 1996</p>
 <p>ácido 16<math>\alpha</math>-hidroxi-<i>ent</i>-kaur-11-en-19-oico (8).</p>	<p>Aguilar <i>et al.</i>, 1993; Aguilar y Delgado, 1995; Delgado y Aguilar, 1996</p>

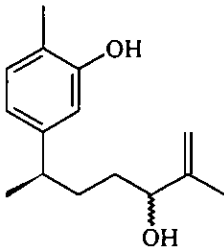
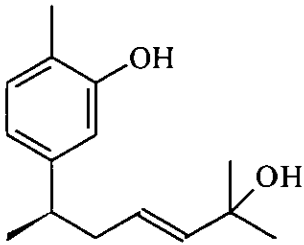
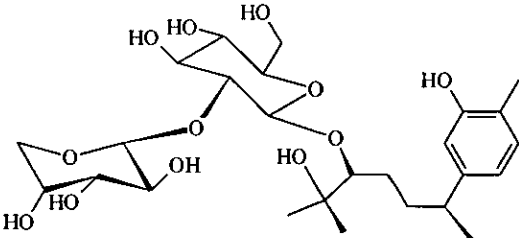
Cuadro 2. Metabolitos secundarios aislados de *Iostephane heterophylla* (continuación).

COMPUESTO	REFERENCIA
 <p>16<math>\alpha</math>-hidroxi-ent-kaur-11-eno (9).</p>	<p>Aguilar <i>et al.</i>, 1993; Aguilar y Delgado, 1995; Delgado y Aguilar, 1996</p>
 <p>ácido 15<math>\alpha</math>-angeloiloxi-ent-kaur-16-en-19-oico (10).</p>	<p>Aguilar <i>et al.</i>, 1993; Aguilar y Delgado, 1995; Delgado y Aguilar, 1996</p>
 <p>ácido 15<math>\alpha</math>-trigloiloxi-ent-kaur-16-en-19-oico (11).</p>	<p>Aguilar <i>et al.</i>, 1993; Aguilar y Delgado, 1995; Delgado y Aguilar, 1996</p>
 <p>metil-16<math>\alpha</math>-hidroxi-ent-kaur-11-en-19-oato (12).</p>	<p>Aguilar <i>et al.</i>, 1993; Aguilar y Delgado, 1995; Delgado y Aguilar, 1996.</p>

Cuadro 2. Metabolitos secundarios aislados de *Iostephane heterophylla* (continuación).

COMPUESTO	REFERENCIA
 <p>escopoletina (13)</p>	<p>Aguilar <i>et al.</i>, 1993; Aguilar y Delgado, 1995; Delgado y Aguilar, 1996.</p>
 <p><math>\beta</math>-sitosteril-<math>\beta</math>-D-glucopiranosido (14)</p>	<p>Aguilar <i>et al.</i>, 1993; Aguilar y Delgado, 1995; Delgado y Aguilar, 1996.</p>
 <p><math>\beta</math>-D-glucopiranososa (15)</p>	<p>Aguilar <i>et al.</i>, 1993; Aguilar y Delgado, 1995; Delgado y Aguilar, 1996.</p>
 <p>xantorizol (16)</p>	<p>Aguilar <i>et al.</i>, 1993; Aguilar y Delgado, 1995; Delgado y Aguilar, 1996.</p>

Cuadro 2. Metabolitos secundarios aislados de *Iostephane heterophylla* (continuación).

COMPUESTO	REFERENCIA
 <p>2-metil-5-(5-hexenil-4-hidroxi-1,5-dimetil)fenol (17)</p>	<p>Aguilar <i>et al.</i>, 1993; Aguilar y Delgado, 1995; Delgado y Aguilar, 1996.</p>
 <p>2-metil-5-(3-hexenil-5-hidroxi-1,5-dimetil)fenol (18)</p>	<p>Aguilar <i>et al.</i>, 1993; Aguilar y Delgado, 1995; Delgado y Aguilar, 1996.</p>
 <p>1-O-[12-O-(12S)-dihidro-12,13-dihidroixantorrizol]-β-L-arabinopiranosil-(1→2)-β-D-glucopiranosido (19)</p>	<p>Aguilar <i>et al.</i>, 1993; Aguilar y Delgado, 1995; Delgado y Aguilar, 1996</p>

En investigaciones previas de la raíz de *Iostephane heterophylla* se demostró que el extracto clorofórmico presenta toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* (CL<sub>50</sub> 30.1 ppm), y una actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* (CMI 24.3 µg/ml; 24.4 µg/ml y 32 µg/ml, respectivamente; Aguilar y Delgado, 1995; Delgado y Aguilar, 1996). Así mismo, se comprobó que el bisabolenoleno xantorrizol (16), constituyente mayoritario de la especie, posee actividad antifúngica contra *Candida albicans* (CMI = 68.75 µg/ml) y toxicidad contra el crustáceo *A. salina* (CL<sub>50</sub> 4.3 µg/ml). El bisabolenoleno

**16** también presentó un efecto citotóxico marginal contra la línea celular derivada del carcinoma nasofaríngeo humano (KB), la concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) fue de 4.90  $\mu\text{g/ml}$  (Aguilar y Delgado, 1995; Delgado y Aguilar, 1996). Por último, se demostró que el xantorizol (**16**) inhibe las contracciones del útero de rata inducidas por KCl (60mM),  $\text{CaCl}_2$  (1.0 mM) y BAY K 8644, (Ponce-Monter, *et al.*, 1999) y provoca una relajación de la contracción inducida por noradrenalina (NA,  $10^{-6}\text{M}$ ) en aorta de rata (Campos, *et al.*, 2000).

## 2.2 Antecedentes de la especie *Haematoxylon brasiletto* Karst. (Leguminosae).

*Haematoxylon brasiletto* Karst (Leguminosae) es una especie originaria del Norte de Granada y habita en climas cálidos, semicálidos, semisecos y templados. La planta es silvestre y está asociada a bosques tropicales (caducifolio y subcaducifolio), así como a bosques espinosos, mesófilo de montaña, de encino y de pino (Argueta *et al.*, 1994).

*H. brasiletto* es un árbol de 7 a 15 metros de altura, las ramas poseen espinas duras de 1 a 3 cm de largo. La corteza es de color café claro a rojiza y el centro del tallo es de color café oscuro a rojo intenso. Las hojas en forma de moño, se dividen en seis hojuelas. Presenta racimos de flores amarillas, los frutos son legumbres aplanadas muy largas y las semillas son de forma alargada (**Figura 2**). La especie se distribuye ampliamente en la República Mexicana principalmente en los Estados de Baja California Sur, Sonora, Morelos, Nayarit, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Guanajuato y en el Estado de México. En nuestro país el árbol se conoce popularmente con los nombres de “azulillo”, “corteza de Brasil”, “palo Brasil”, “palo de tinta” y “palo tinto”.

Desde principios del Siglo XVI, *H. brasiletto* es ampliamente valorada por sus propiedades medicinales. En la medicina tradicional mexicana se emplea la infusión del tallo para el tratamiento de padecimientos del sistema cardiovascular, tales como ritmo cardíaco

acelerado, mareos y desmayos. En Baja California Sur y en el Estado de México, la decocción del centro del tallo se emplea para controlar la presión arterial y aliviar algunos padecimientos cardiacos. En el Estado de Morelos la decocción de la corteza se usa para purificar la sangre y en combinación con *Citrus sp* se emplea para disminuir el nerviosismo (Argueta *et al.*, 1994).



**Figura 2 *Haematoxylon brasiletto* Karst. (Leguminosae).**

En el centro del país, la infusión de la corteza y el tronco se emplea para aliviar padecimientos renales, y algunos malestares estomacales, los que incluyen dolor estomacal, diarrea y úlcera gástrica. La infusión de las flores se emplea para aliviar dolores de espalda, tos y resfriado. Así mismo, *H. brasiletto* es apreciada por sus propiedades astringentes y con suma frecuencia se emplea para disminuir los ataques epilépticos, controlar la diabetes y disminuir la fiebre (Argueta *et al.*, 1994)

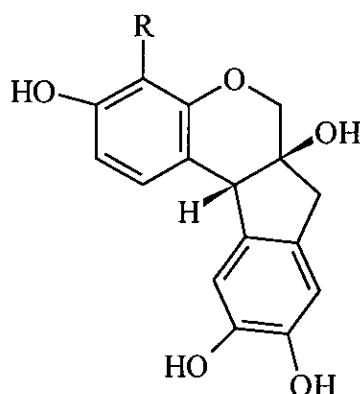
En el **Cuadro 3** se resumen algunas de las propiedades medicinales de la especie, así como la vía de administración y la parte de la planta que se emplea para el tratamiento.

**Cuadro 3.** Propiedades medicinales atribuidas a *Haematoxylon brasiletto* Karst. (Argueta *et al.*, 1994)

USO POPULAR	PARTE DE LA PLANTA	VIA DE ADMINISTRACION
Padecimientos renales	corteza y tronco	oral
Problemas cardiovasculares	tallo y corteza	oral
Antidiabético	toda la planta	oral
Antidiarreico	corteza y tronco	oral
Antiséptico	corteza y tronco	oral
Tratamiento de dolores de espalda	flores	tópica y oral
Dolor de pulmón	raíz y hojas	oral y tópico
Enfermedades gastrointestinales	corteza y tallo	oral
Dolor corporal	toda la planta	oral o tópico
Antiinflamatorio	hojas, flores y corteza	oral
Padecimientos biliares	corteza y tronco	oral
Dolor de bazo	corteza y tronco	oral y tópico
Dolor de dientes	corteza y tallo	oral
Control de la ictericia	toda la planta	oral
Antianémico	flores	oral
Antipirético	toda la planta	oral
Colorante	tallo y corteza	-



Los estudios químicos realizados a la fecha sobre esta especie han permitido el aislamiento y la caracterización de dos compuestos aromáticos; la haematoxilina (20) y la brazilina (21) (Pratt y Yuzuriha, 1959).



R = OH haematoxilina (20)

R = H brazilina (21)

Por otro lado, los distintos estudios biológicos conducidos sobre la especie permitieron demostrar que los extractos acuosos de la madera y la corteza presentan importantes propiedades antimicrobianas (Sánchez *et al.*, 1958). Del primer extracto se obtuvo respuesta positiva frente a *Salmonella typhosa* y *Staphylococcus aureus*, en tanto que el extracto de la corteza fue activo contra tres especies del género *Brucella*: *B. abortus*, *B. flexneri* y *B. suis* (MIC = 100 µg/ml), *Shigella flexneri* y *Staphylococcus aureus* (Sánchez, *et al.*, 1958; Pratt y Yuzuriha, 1959).

Otras investigaciones realizadas sobre la corteza de *H. brasiletto* demostraron que la planta es una fuente importante de agentes colorantes de importancia comercial en las industrias textil y cosmética (Paris y Rousselet, 1958; Lolor y Martin, 1959). En la industria

cosmética *H. brasiletto* se emplea en la fabricación de geles o cremas para teñir el cabello, así como, en la formulación de cremas para la piel. En la industria textil, se utiliza para teñir telas, principalmente la seda (Lolor y Martín, 1959). Los principios colorantes de la planta son la haematoxilina (20) y la brazilina (21).

La haematoxilina (20) y la brazilina (21) presentan también una gran variedad de propiedades farmacológicas. Hikino y colaboradores (1977) demostraron su actividad antiinflamatoria. En otra investigación se demostró que estos productos inhiben de manera dependiente de la concentración las contracciones inducidas por KCl y CaCl<sub>2</sub> en aorta de rata (Xie *et al.*, 2000). Así mismo, varios estudios han permitido comprobar las propiedades antisépticas de estos compuestos (Takechi y Tanaka, 1982).

La **brazilina** disminuye notablemente los niveles de glucosa en ratones diabéticos. Aparentemente este producto acelera el metabolismo de la glucosa (Moon *et al.*, 1985 y 1993; Kim *et al.*, 1998). Este principio aromático también presenta una importante actividad antimicrobiana y este efecto se atribuye a la inhibición de la enzima reductasa del semialdehído succínico (SSAR) la cual degrada al ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) (Beak, *et al.*, 2000). Hwang y colaboradores (1998) demostraron que la **brazilina** inhibe la actividad de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y la entrada de Ca<sup>++</sup> extracelular en casos de trombosis. Otro grupo de investigadores demostró sus propiedades antioxidantes; esta última propiedad se propuso con base en el efecto protector que presentó el compuesto frente a la toxicidad inducida por BrCCl<sub>3</sub> en hepatocitos aislados de rata (Moon, *et al.*, 1992). Un estudio *in vivo* con ratones tratados con halotano permitió comprobar que la **brazilina** incrementa los niveles de inmunoglobulina M (IgM). Este hallazgo indica que el producto podría ser de utilidad para el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Choi, *et al.*, 1997). Por último, la **brazilina** incrementa la producción de la melanina y la actividad de la enzima tirosinasa en melanocitos (Lee, *et al.*, 1997). Estas actividades le confieren al producto natural propiedades bronceadoras.

### III PARTE EXPERIMENTAL.

#### 3.1 Material Vegetal.

La raíz de la especie *Iostephane heterophylla* se adquirió el 29 de octubre de 1995 en el mercado La República en San Luis Potosí, México. Un ejemplar de referencia se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional MEXU (Voucher: Bye 20528), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.

La corteza de la especie *Haematoxylon brasiletto* se adquirió en el Mercado de Sonora de la Ciudad de México el 12 de Octubre de 1995. Un ejemplar de referencia se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional MEXU (Voucher: Bye 20339), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.

En ambos casos la identificación de las especies estuvo a cargo del Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, UNAM.). El material vegetal se desecó a temperatura ambiente bajo sombra y se molió en un molino Willey Modelo 4.

#### 3.2 Procedimientos Generales.

##### 3.2.1 Análisis Cromatográficos.

Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron de acuerdo con las técnicas convencionales, utilizando placas de vidrio o aluminio (20 × 20 cm), recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60 GF<sub>254</sub>, Merck) con un espesor de 0.25 mm y diferentes sistemas de elución y como agentes reveladores sulfato cérico y vainillina (Sthal, 1969; Lowrey *et al.*, 1993). Para las separaciones cromatográficas en columna abierta se empleó gel de sílice (Merck) y Sephadex LH-20 (Pharmacia) como adsorbentes.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se realizó en un cromatógrafo marca Waters (Milipore Corp., Waters Chromatography División Milford, MA, USA) equipado con un detector de UV Dual (600). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa software Millennium 2000 (Waters).

Para lograr la separación de los constituyentes de una muestra, se empleó el método de cromatografía de líquidos de alta resolución analítica (CLARa). Los análisis se realizaron en una columna analítica de fase reversa Nova-Pack®, empacada con dimetiloctadecilsilil HCR-18 con un tamaño de partícula de 6  $\mu\text{m}$  y un tamaño de poro de 60 Å. El diámetro interno de la columna es de 3.6 mm y la longitud de 300 mm. La concentración de las muestras problema utilizada en estos análisis fue de 0.5 mg en un volumen inyectado de 20  $\mu\text{l}$ . La velocidad de flujo fue de 0.35 ml/min. Una vez determinadas las condiciones analíticas se realizó el escalamiento a una columna preparativa de fase reversa, lo que nos permitió la separación y la purificación de los constituyentes de las fracciones primarias, secundarias o terciarias. La velocidad de flujo fue de 6.5 ml/min. Para todas las separaciones se utilizó un sistema de gradiente y la fase móvil consistió en una mezcla binaria de acetonitrilo-agua. La longitud de onda utilizada para la detección de los compuestos fue de 288 nm.

Para la purificación de los compuestos, se recurrió a la técnica de corte de núcleo y reinyección de la muestra. Este método consistió en someter a los picos mayoritarios de interés a un corte, eliminando así la contaminación causada por los componentes minoritarios eluidos antes y después del pico en cuestión, mismo que fue reinyectado en el sistema cromatográfico tantas veces como fue necesario hasta alcanzar la purificación.

### **3.2.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales.**

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. Los espectros en el IR se registraron en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer FT 1605; en pastilla de KBr o película.

Para el registro de los espectros de masas por la técnica de impacto electrónico se utilizó un espectrómetro de masas JEOL SX 102A mediante introducción directa a 70 eV.

Los espectros en el UV se obtuvieron de un espectrofotómetro UV Lambda II, en solución metanólica.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, NOESY, HMBC y HMQC) se generaron en un aparato Bruker DMX500 a 500 MHz para RMN- $^1\text{H}$  y 125 MHz para RMN- $^{13}\text{C}$  o en un aparato Varian Unity INOVA a 300 MHz para ( $^1\text{H}$ ) o 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Los espectros se registraron en  $\text{CDCl}_3$ , DMSO o acetona deuterada y los desplazamientos químicos se asignaron en unidades  $\delta$  (ppm), referidos al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. La obtención de los espectros de RMN se realizó en la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM, y en la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), plantel Iztapalapa.

Los espectros de dicroísmo circular (CD) se obtuvieron de un espectropolarímetro CD6, las mediciones se realizaron en solución metanólica bajo temperatura controlada. Los espectros se registraron en el Instituto de Química, UNAM.

## IV Estudio químico de *Iostephane heterophylla*.

### 4.1 Preparación del extracto orgánico.

El material vegetal seco y molido (2.3 Kg), se extrajo inicialmente mediante un proceso de maceración con una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH}$  (1:1). Posteriormente, el material vegetal se sometió a una segunda maceración con metanol. En el **Esquema 1** se resume el procedimiento experimental. Los dos extractos resultantes se combinaron ya que demostraron una gran similitud en los análisis cromatográficos en capa delgada.

Para el registro de los espectros de masas por la técnica de impacto electrónico se utilizó un espectrómetro de masas JEOL SX 102A mediante introducción directa a 70 eV.

Los espectros en el UV se obtuvieron de un espectrofotómetro UV Lambda II, en solución metanólica.

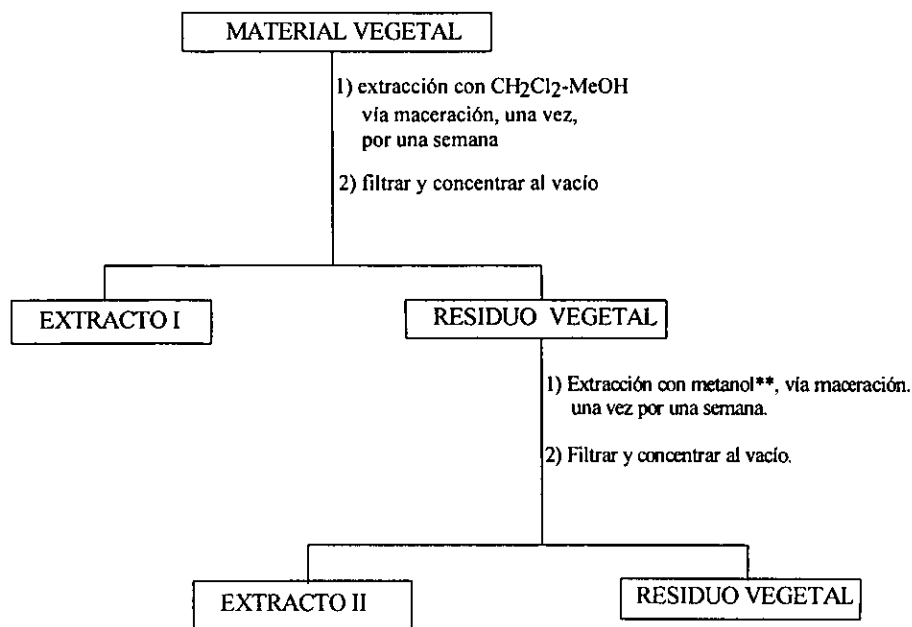
Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, NOESY, HMBC y HMQC) se generaron en un aparato Bruker DMX500 a 500 MHz para RMN- $^1\text{H}$  y 125 MHz para RMN- $^{13}\text{C}$  o en un aparato Varian Unity INOVA a 300 MHz para ( $^1\text{H}$ ) o 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Los espectros se registraron en  $\text{CDCl}_3$ , DMSO o acetona deuterada y los desplazamientos químicos se asignaron en unidades  $\delta$  (ppm), referidos al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. La obtención de los espectros de RMN se realizó en la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM, y en la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), plantel Iztapalapa.

Los espectros de dicroísmo circular (CD) se obtuvieron de un espectropolarímetro CD6, las mediciones se realizaron en solución metanólica bajo temperatura controlada. Los espectros se registraron en el Instituto de Química, UNAM.

## IV Estudio químico de *Iostephane heterophylla*.

### 4.1 Preparación del extracto orgánico.

El material vegetal seco y molido (2.3 Kg), se extrajo inicialmente mediante un proceso de maceración con una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ - $\text{CH}_3\text{OH}$  (1:1). Posteriormente, el material vegetal se sometió a una segunda maceración con metanol. En el **Esquema 1** se resume el procedimiento experimental. Los dos extractos resultantes se combinaron ya que demostraron una gran similitud en los análisis cromatográficos en capa delgada.



- \*Volumen total de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH} = 12 \text{ l}$ .
- \*\*Volumen total de metanol = 8 l.
- Peso combinado de los extractos I y II = 263 g.

**Esquema 1.** Proceso de extracción de la raíz de *Iostephane heterophylla*.

#### 4.2 Fraccionamiento preliminar del extracto total de *Iostephane heterophylla*.

El extracto total (263 g) se fraccionó en una columna abierta utilizando como adsorbente 2.5 Kg de gel de sílice. El proceso de elución se efectuó con hexano, mezclas de hexano- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , mezclas de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH}$  y  $\text{CH}_3\text{OH}$ . Se recolectaron 137 fracciones de 500 ml cada una. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina y se combinaron todas aquellas que resultaron cromatográficamente similares. Este proceso generó un total de 11 fracciones primarias. En el **Cuadro 6**, se resume el fraccionamiento realizado mediante cromatografía en columna abierta del extracto total de la raíz de *I. heterophylla*.

**Cuadro 4.** Resumen del fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna abierta del extracto crudo de la raíz de *Iostephane heterophylla*.

ELUYENTE	PROPORCION %	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVES	PESO (g)
HEXANO	100	1-67	1-27	F001*	7.1130
HEXANO-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	68-77	28	F002*	0.2074
	80:20	78-83	29	F003*	19.3685
	60:40	84-90	30-36	F004*	123.2714
	50:50	91-94	37-94	F005*	92.0000
	30:70	95-98	95-116	F006	14.3761
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	99-102	117-119	F007	10.0195
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	103-111	120	F008	3.4202
	80:20	112-118	121-129	F009	26.4004
	70:30	119-124	130	F010	3.7567
	50:50	125-132	131-135	F011	1.356
	30:70	133-136			
MeOH	100	137			

\*Fracciones con actividad antimicrobiana.

### 4.3 Aislamiento y purificación de los productos de las fracciones primarias derivadas del extracto íntegro de *I. heterophylla*.

#### 4.3.1 Aislamiento de xantorizol (16) de las fracciones F002 y F003.

La fracción F002 (200 mg, Cuadro 4) se sometió a un proceso de cromatografía de capa fina preparativa, utilizando placas de gel de sílice con un espesor de 0.25 mm. El proceso de elución se efectuó con hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1). Este procedimiento permitió la obtención de 100 mg de un aceite amarillo caracterizado como xantorizol (16).

La purificación de dos gramos de la fracción F003 (Cuadro 4) mediante cromatografía en capa fina preparativa, utilizando las mismas condiciones que en el caso de F002, condujo al aislamiento de 1.2 g adicionales de xantorizol (16).



### 4.3.2 Aislamiento de xantorizol (16), del ácido traquiloban-19-oico (1), de 16 $\alpha$ -hidroxi-*ent*-kaurano (3) y del 16 $\alpha$ -hidroxi-*ent*-kaur-11-eno (9) de las fracciones activas F004 y F005.

La fracción F004 (123 g, Cuadro 4) se sometió a un fraccionamiento secundario en una columna cromatográfica abierta, utilizando 1.2 Kg de gel de sílice como adsorbente. El proceso de elución se realizó con hexano, mezclas de hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH y CH<sub>3</sub>OH. Se recolectaron 74 fracciones de 500 ml cada una. Se analizaron por cromatografía en capa fina y se combinaron todas aquellas que presentaron similitud cromatográfica. El proceso generó un total de 15 fracciones secundarias. En el Cuadro 5 se resume este fraccionamiento secundario.

**Cuadro 5** Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción F004 de *Iostephane heterophylla*.

ELUYENTE	PROPORCION %	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVES	PESO (g)
HEXANO	100	1	1-5	004-I	0.1957
HEXANO-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	2-6	6-8	004-II	1.0349
	70:30	7-12	9-12	004-III	11.6370
	50:50	13-20	13-21	004-IV	30.425
	30:70	21-26	22-24	004-V	6.8451
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	27-36	25	004-VI	3.5294
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> OH	99:1	37-41	26-40	004-VII	19.1287
	98:2	42-53	41-45	004-VIII	3.4183
	95:5	54-58	46	004-IX	1.9288
	90:10	59-64	47-48	004-X	5.9894
	70:30	65-70	49-51	004-XI	2.3110
	50:50	71-74	52-53	004-XII	0.0568
				54-56	004-XIII
			57-67	004-XIV	0.6773
			68-74	004-XV	0.2808

De la fracción F004-II (Cuadro 5) se obtuvo por cristalización espontánea 500 mg de un sólido de color blanco soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, con punto de fusión 214-218°C. Este sólido se caracterizó espectroscópicamente como 16 $\alpha$  hidroxi-*ent*-kaurano (3).

De la fracción F004-X (Cuadro 5) precipitaron de manera espontánea 500 mg de un sólido de punto de fusión 158-160°C, que se identificó espectroscópicamente como el ácido

**traquiloban-19-oico (1)**. Las fracciones F004-III a F004-X (**Cuadro 5**) resultaron muy similares, se detectó que estas fracciones contenían como constituyente mayoritario al xantorrizol (**16**). Al combinar estas fracciones y purificar un gramo de la fracción resultante, por cromatografía en capa fina preparativa, fue posible obtener 0.553 mg de xantorrizol (**16**). Este experimento indicó que el conjunto de esas fracciones podría generar 41.28 g de xantorrizol (**16**).

La fracción F005 (92 g, **Cuadro 4**) se sometió a un fraccionamiento secundario en una columna cromatográfica abierta, utilizando 794.5 g de gel de sílice. El proceso de elución se realizó con hexano, mezclas de hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH y CH<sub>3</sub>OH. Se recolectaron 73 fracciones de 500 ml cada una. Se analizaron por cromatografía en capa fina y se combinaron todas aquellas que presentaron similitud cromatográfica. El proceso generó un total de 12 fracciones secundarias. En el **Cuadro 6** se resume este fraccionamiento secundario.

**Cuadro 6.** Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción F005 de *Iostephane heterophylla*.

ELUYENTE	PROPORCION	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVES	PESO (g)
HEXANO	100	1-5	1	F005-I	-
HEXANO-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	85:15	6-9	2-8	F005-II	0.1465
	75:25	10-19	9-10	F005-III	2.4041
	60:40	20-25	11-14	F005-IV	0.4728
	45:55	26-33	15-24	F005-V	25.4186
	30:70	34-44	25-32	F005-VI	11.1203
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	45-54	33-40	F005-VII	13.6396
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> OH	90:10	55-68	41-49	F005-VIII	6.0836
	80:20	69-70	50-55	F005-IX	2.1416
	60:40	71	56-57	F005-X	29.0000
	40:60	72	58-64	F005-XI	1.3536
CH <sub>3</sub> OH	100	73	65-73	F005-XII	1.5117

De las fracciones F005-III cristalizaron 406 mg del compuesto caracterizado como **16 $\alpha$ -hidroxi-ent-kaurano (3)**. Por otro lado, de las fracciones F005-IV a F005-X (**Cuadro 6**), cristalizaron 8 g adicionales del **ácido traquiloban-19-oico (1)** y de la fracción F005-XI se

aislaron 623 mg del compuesto caracterizado espectroscópicamente como el **16 $\alpha$ -hidroxi-ent kaur-11-eno (9)**.

#### **4.3.3 Aislamiento de los ácidos *ent*-kaur-16-en-19-oico (4) y *ent*-beyer-15-en-19-oico (5) de la fracción secundaria F005-VII.**

De la fracción F005-VII (**Cuadro 6**) precipitaron de manera espontánea 1.6 g de un sólido de color blanco, soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y con un punto de fusión de 135-138°C. Este sólido resultó ser una mezcla de diterpenos, constituida por los ácidos ***ent*-kaur-16-en-19-oico (4)** y ***ent*-beyer-15-en-19-oico (5)**. Esta mezcla resultó inactiva y por lo tanto no se procedió a su separación.

#### **4.3.4 Aislamiento de 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22) de las fracciones secundarias F005-VI y F005-VII.**

Las fracciones secundarias F005-VI y F005-VII (**Cuadro 6**) se reunieron ya que ambas resultaron similares en el análisis cromatográfico; 14 g de la fracción resultante se sometieron a un tercer fraccionamiento sobre una columna cromatográfica abierta, utilizando 185 g de gel de sílice como adsorbente. El proceso de elución se efectuó con hexano, mezclas de hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH (9:1). Se recolectaron 140 fracciones de 50 ml cada una. Todas y cada una de las fracciones resultantes se analizaron por cromatografía en capa fina, combinándose todas aquellas que presentaron similitud cromatográfica. Este proceso generó un total de ocho fracciones terciarias. En el **Cuadro 7** se resume este fraccionamiento.

**Cuadro 7** Resumen del fraccionamiento terciario vía cromatografía en columna abierta de las fracciones secundarias F005-VI y F005-VII de *Iostephane heterophylla*.

ELUYENTE	PROPORCION	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVES	PESO (g)
HEXANO	100	1-4	1-29	005-XIII	1.0326
HEXANO-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	5-10	30-49	005-XIV	2.0798
	80:20	11-23	50-63	005-XV	0.740
	70:30	24-63	64-72	005-XVI	1.8280
	60:40	64-104	73-101	005-XVII	3.2726
	50:50	105-116	102-115	005-XVIII	1.6347
	30:70	117-132	116-137	005-XIX	2.2124
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	133-137	138-140	005-XX	1.1515
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> OH	90:10	138-140			

Por otra parte, la fracción F005-XV (350 mg) se purificó por cromatografía en capa delgada sobre gel de sílice. Se emplearon 16 placas de gel de sílice de 20 x 20 y de 0.25 mm de espesor (20 mg por placa) y como sistema de elución hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7:3). La elución se repitió cuatro veces. Este proceso permitió la obtención de 19.3 mg de 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22).

## V Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos, fracciones y compuestos puros.

La actividad antimicrobiana *in vitro* se determinó en los laboratorios Wyeth-Ayerst de acuerdo a los protocolos establecidos en la literatura (Ríos, *et al.*, 1988; Singh, *et al.*, 2000). Como microorganismos de prueba se utilizaron dos bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* 375 y *Enterococcus faecium* 436), una bacteria Gram negativa (*Escherichia coli* 442) y una levadura (*Candida albicans* 54). Ver sección experimental de la publicación incluida en el anexo 2.

### 5.1 Determinación de la actividad antimicrobiana *in vivo* del xantorizol (16) y del 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22).

La actividad antimicrobiana *in vivo* se realizó basándose en los protocolos establecidos por los laboratorios Wyeth-Ayerst previamente descritos por Singh y colaboradores (2000). Ver sección experimental de la publicación incluida en el anexo 2.

**Cuadro 7** Resumen del fraccionamiento terciario vía cromatografía en columna abierta de las fracciones secundarias F005-VI y F005-VII de *Iostephane heterophylla*.

ELUYENTE	PROPORCION	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVES	PESO (g)
HEXANO	100	1-4	1-29	005-XIII	1.0326
HEXANO-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	5-10	30-49	005-XIV	2.0798
	80:20	11-23	50-63	005-XV	0.740
	70:30	24-63	64-72	005-XVI	1.8280
	60:40	64-104	73-101	005-XVII	3.2726
	50:50	105-116	102-115	005-XVIII	1.6347
	30:70	117-132	116-137	005-XIX	2.2124
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	133-137	138-140	005-XX	1.1515
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> OH	90:10	138-140			

Por otra parte, la fracción F005-XV (350 mg) se purificó por cromatografía en capa delgada sobre gel de sílice. Se emplearon 16 placas de gel de sílice de 20 x 20 y de 0.25 mm de espesor (20 mg por placa) y como sistema de elución hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7:3). La elución se repitió cuatro veces. Este proceso permitió la obtención de 19.3 mg de 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (**22**).

## V Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos, fracciones y compuestos puros.

La actividad antimicrobiana *in vitro* se determinó en los laboratorios Wyeth-Ayerst de acuerdo a los protocolos establecidos en la literatura (Ríos, *et al.*, 1988; Singh, *et al.*, 2000). Como microorganismos de prueba se utilizaron dos bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* 375 y *Enterococcus faecium* 436), una bacteria Gram negativa (*Escherichia coli* 442) y una levadura (*Candida albicans* 54). Ver sección experimental de la publicación incluida en el anexo 2.

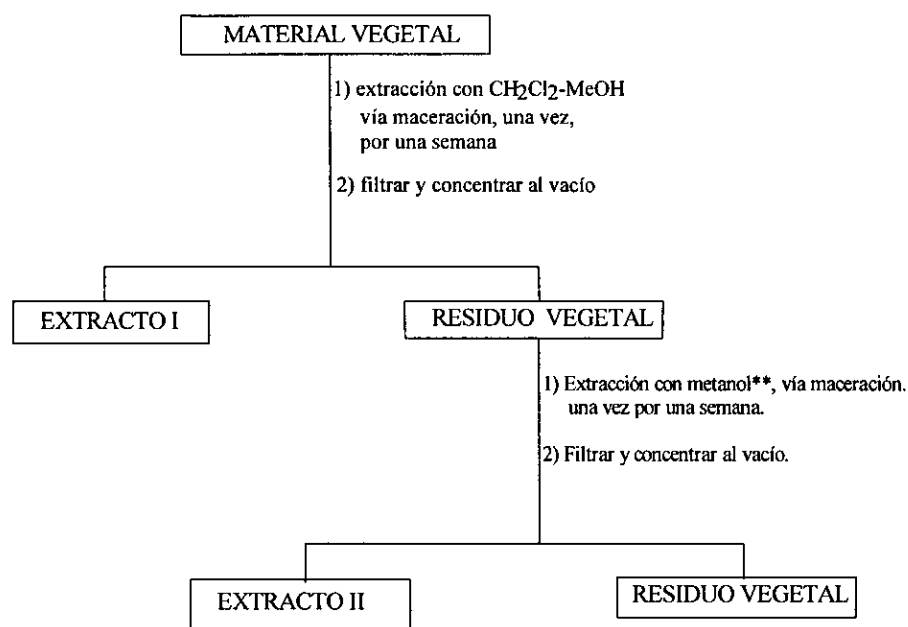
### 5.1 Determinación de la actividad antimicrobiana *in vivo* del xantorizol (**16**) y del 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (**22**).

La actividad antimicrobiana *in vivo* se realizó basándose en los protocolos establecidos por los laboratorios Wyeth-Ayerst previamente descritos por Singh y colaboradores (2000). Ver sección experimental de la publicación incluida en el anexo 2.

## VI Estudio químico de *Haematoxylon brasiletto* Karst. (Leguminosae)

### 6.1 Preparación del extracto orgánico.

El material vegetal seco y molido (1.7 Kg), se extrajo inicialmente mediante un proceso de maceración con una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ - $\text{CH}_3\text{OH}$  (1:1). Posteriormente, el material vegetal se sometió a una segunda maceración con metanol. En el **Esquema 2** se resume el procedimiento de extracción. Los dos extractos resultantes se combinaron ya que demostraron una gran similitud en los análisis cromatográficos en capa delgada.



- \*Volumen total de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ - $\text{MeOH}$  = 12 l.
- \*\*Volumen total de metanol = 8 l.
- Peso combinado de los extractos I y II = 300 g.

**Esquema 2.** Proceso de extracción de la corteza de *Haematoxylon brasiletto* Karst. (Leguminosae)

## 6.2 Fraccionamiento preliminar del extracto total de *Haematoxylon brasiletto* Karst.

El extracto total (300 g) se fraccionó en una columna de vidrio utilizando 3.4 kg de gel de sílice como adsorbente. El proceso de elución se efectuó con mezclas de hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona, acetona y CH<sub>3</sub>OH. Se recolectaron 107 fracciones de 250 ml cada una. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina y se combinaron todas aquellas que resultaron cromatográficamente similares. Este proceso generó un total de 15 fracciones primarias. En el **Cuadro 8**, se resume el fraccionamiento realizado mediante cromatografía en columna abierta del extracto total de *H. brasiletto*.

**Cuadro 8.** Resumen del fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna abierta del extracto crudo de *Haematoxylon brasiletto*.

ELUYENTE	PROPORCION %	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVES	PESO (g)
HEXANO-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1:1	1-18	1-10	H001	0.2744
HEXANO-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2:8	19-29	11-16	H002	16.200
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	30-47	17-36	H003	3.800
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -ACETONA	7:3	48-69	37-58	H004	0.6239
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -ACETONA	3:7	70-91	59-60	H005	2.4300
ACETONA	100	92-105	61-63	H006	2.0100
CH <sub>3</sub> OH	100	106-115	64-65	H007	2.2300
			66-69	H008*	8.7000
			70-79	H009*	35.4000
			80-83	H010*	57.6000
			84-85	H011*	45.4000
			86-92	H012*	95.3000
			93-100	H013*	16.4000
			101-106	H014*	33.2000
			107	H015	81.5000

\*Fracciones con actividad antimicrobiana.

### 6.3 Aislamiento y purificación de los productos de las fracciones primarias activas derivadas del extracto íntegro de *H. brasiletto*.

#### 6.3.1 Aislamiento de ácido cafeico (24), galato de metilo (25), ácido gálico (26), floroglucinol (27), ácido 4-hidroxicinámico (28), brazilina (21) y 5-metoxisoraleno (29) de las fracciones primarias H008 y H009.

Las fracciones primarias H008 y H009 (Cuadro 8) se unieron debido a su similitud; 44 g de la fracción resultante se sometieron a un fraccionamiento secundario en una columna abierta utilizando 850 g de gel de sílice. El proceso de elución se efectuó con hexano, mezclas de hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona, acetona y CH<sub>3</sub>OH. Se recolectaron un total de 185 fracciones de 200 ml cada una y se analizaron por cromatografía en capa fina, combinándose todas aquellas que presentaron similitud cromatográfica. El proceso generó un total de diez fracciones secundarias. En el Cuadro 9 se resume este fraccionamiento secundario.

**Cuadro 9.** Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de las fracciones activas H008 y H009 de *Haematoxylon brasiletto*.

ELUYENTE	PROPORCION %	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVES	PESO (g)
HEXANO	100	1-28	1-134	H016	0.5217
HEXANO-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	95:5	29-40	135-154	H017	0.1018
HEXANO-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	85:15	41-56	155-159	H018	0.0771
HEXANO-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	75:25	57-67	160-165	H019*	1.4800
HEXANO-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	68-110	166	H020*	0.5549
HEXANO-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	111-120	167	H021*	0.8095
HEXANO-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	121-133	168-172	H022*	10.6100
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	134-147	173-177	H023*	19.7900
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -ACETONA	90:10	148-173	178	H024*	0.1276
ACETONA	100	174-180	179-185	H025*	0.8553
CH <sub>3</sub> OH	100	181-185			

\*Fracciones con actividad antimicrobiana.



Parte de las fracciones activas **H019** a **H021** (300 mg) se combinaron y se purificaron por cromatografía en capa fina preparativa; se emplearon nueve placas de vidrio (20 x 20 cm) recubiertas de gel de sílice (0.25 mm de espesor) y como sistema de elución se utilizó  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$  (9:1). Este proceso permitió la obtención de 31.2 mg de ácido cafeico (**24**), 11.8 mg de ácido 4-hidroxicinámico (**28**), 52.7 mg de galato de metilo (**25**) y 52.1 mg de ácido gálico (**26**).

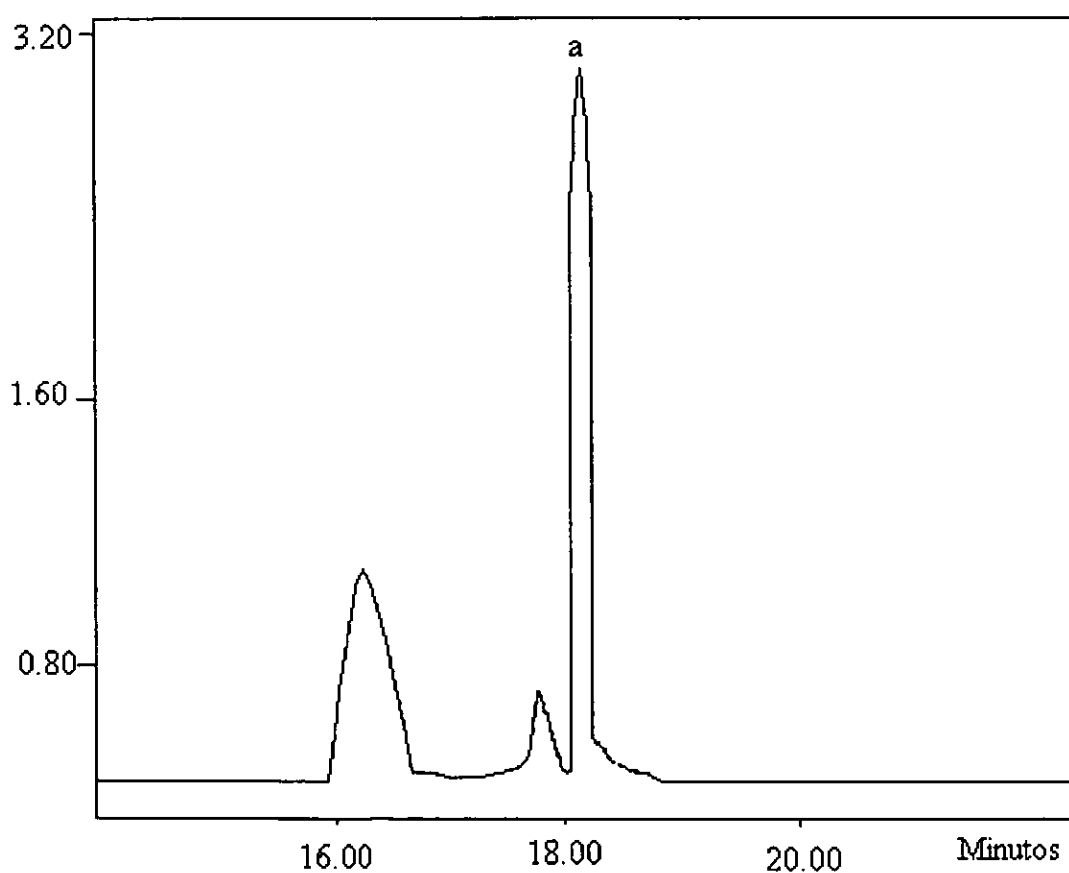
Por otro lado, el remanente de la fracción **H019** (1 g) se sometió a un tercer fraccionamiento en una columna de Sephadex LH-20. El proceso de elución se realizó con  $\text{CH}_3\text{CN}$ , y mezclas de  $\text{CH}_3\text{CN}$ -agua. Se recolectaron 18 fracciones de 20 ml cada una. Cada fracción fue analizada por cromatografía en capa fina y se combinaron todas aquellas que presentaron similitud en el análisis. En el **Cuadro 10** se resume este fraccionamiento.

**Cuadro 10** Resumen del fraccionamiento terciario vía cromatografía en columna abierta de la fracción **H019** de *Haematoxylon brasiletto*.

ELUYENTE	PROPORCION %	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVES	PESO (g)
$\text{CH}_3\text{CN}$	100	1-5	1-5	H103	0.0123
$\text{CH}_3\text{CN:AGUA}$	90:10	6-8	6	H104	0.0279
$\text{CH}_3\text{CN:AGUA}$	80:20	9-11	7-8	H105	0.1308
$\text{CH}_3\text{CN:AGUA}$	70:30	12-14	9-10	H106	0.1889
$\text{CH}_3\text{CN:AGUA}$	60:40	15-17	11	H107	0.2431
$\text{CH}_3\text{CN:AGUA}$	50:50	18	12-15	H108	0.2052
			16-18	H109	0.1332

El aislamiento y la purificación de los constituyentes presentes en las fracciones terciarias **H103**→**H109** se realizó mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) indicada en el inciso 3.2.1. Para la separación del constituyente mayoritario presente en la fracción H104 se utilizó un sistema de gradiente. La fase móvil consistió en una mezcla binaria de  $\text{CH}_3\text{CN}$ -agua (30:70→70:30).

El cromatograma de la fracción **H104** se muestra en la **Figura 3** y como se puede apreciar, la fracción contenía un compuesto mayoritario (pico **a**). Para lograr la purificación del compuesto (**29**) correspondiente al pico **a**, se realizaron sucesivas cromatografías utilizando la técnica de corte de núcleo. Este proceso permitió la obtención de 15.1 mg de un sólido de color blanco, con un punto de fusión de 188-191°C e identificado como el 5-metoxisoraleno (**29**).



**Figura 3** Cromatograma obtenido a nivel preparativo de la fracción **H104** Condiciones de análisis Detector UV/visible,  $\lambda = 288$  nm. Sistema de elución: gradiente de acetonitrilo-agua (30:70→70:30). Flujo de 6.5 ml/min. Concentración de la muestra 6 mg/100 $\mu$ l. Picos a:  $t_R$  18.5 min

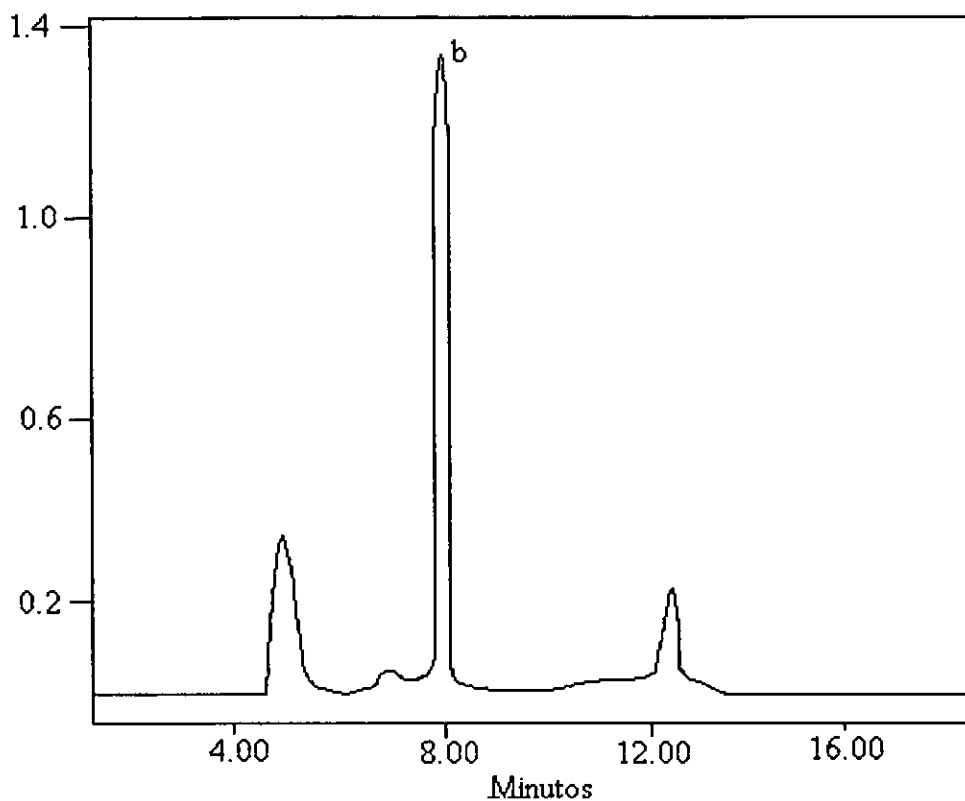
La fracción **H022** (2.5g, **Cuadro 9**) se sometió a un tercer fraccionamiento utilizando una columna de Sephadex LH-20 (Nawwar, *et al.*, 1982). El proceso de elución se realizó con mezclas de agua-CH<sub>3</sub>OH, CH<sub>3</sub>OH y mezclas de CH<sub>3</sub>OH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se recolectaron un total de 112 fracciones de 40 ml cada una. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina, combinándose aquellas que resultaron semejantes. En el **Cuadro 11** se resume este fraccionamiento.

**Cuadro 11** Resumen del fraccionamiento terciario vía cromatografía en columna abierta de la fracción H022 de *Haematoxylon brasiletto*.

ELUYENTE	PROPORCION %	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVES	PESO (g)
AGUA-CH <sub>3</sub> OH	50:50	1-14	1-22	H065	0.0602
AGUA-CH <sub>3</sub> OH	30:70	15-32	23-25	H066*	0.0264
AGUA-CH <sub>3</sub> OH	20:80	33-42	26-33	H067*	0.3956
AGUA-CH <sub>3</sub> OH	10:90	43-53	34-37	H068*	0.2316
CH <sub>3</sub> OH	100	54-74	38-41	H069*	0.0424
CH <sub>3</sub> OH-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	95:5	75-77	42-50	H070	0.6282
CH <sub>3</sub> OH-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	78-101	51-52	H071	0.0476
CH <sub>3</sub> OH-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	102-112	53-62	H072	0.0382
			63-65	H073	0.3152
			66-112	H074	0.0256

\*Fracciones con actividad antimicrobiana.

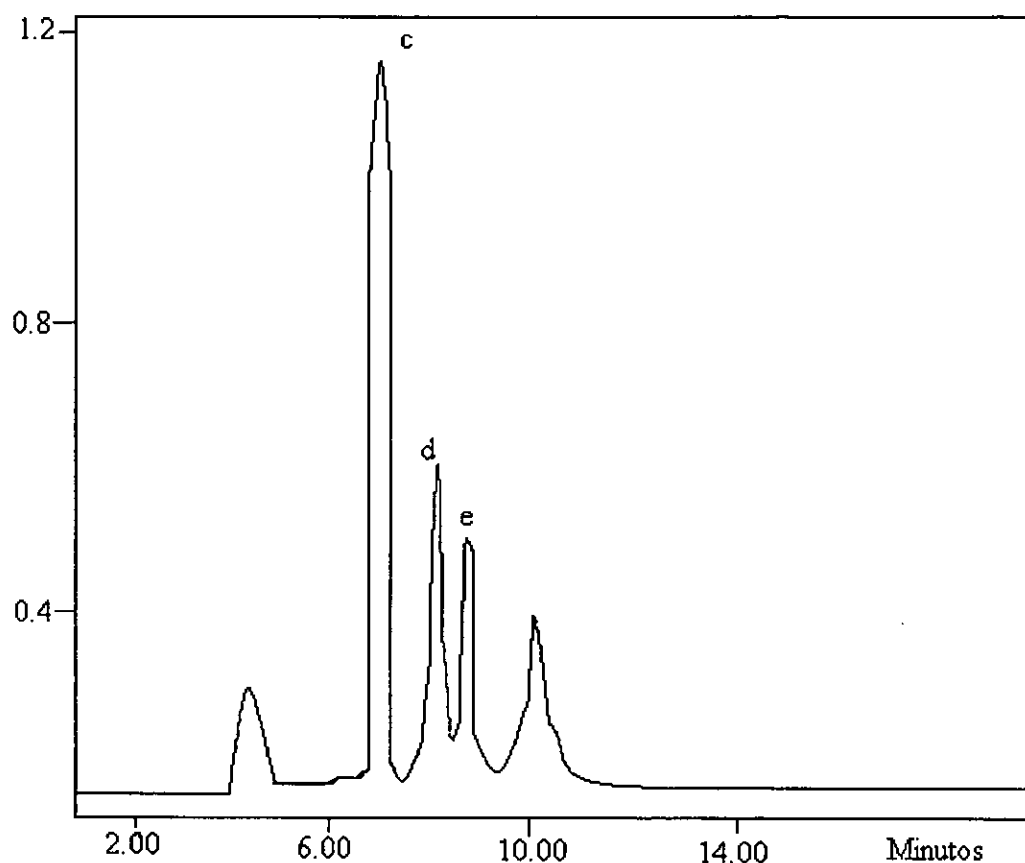
El aislamiento y la purificación de los constituyentes presentes en las fracciones terciarias H066 a H069 también se realizó mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). El cromatograma de la fracción H067 se muestra en la **Figura 4** y como se puede apreciar, la fracción contenía un compuesto mayoritario (pico **b**). Para lograr la purificación del compuesto (**21**) correspondiente al pico **b**, se realizaron sucesivas cromatografías utilizando la técnica de corte de núcleo. Este proceso permitió la obtención de 295.6 mg de un sólido de color rojo intenso identificado como brazilina (**21**).



**Figura 4** Cromatograma obtenido a nivel preparativo de la fracción **H067**. Condiciones de análisis Detector UV/visible,  $\lambda = 288$  nm. Sistema de elución: gradiente de  $\text{CH}_3\text{CN}$ -agua (30:70→70:30). Flujo de 6.5 ml/min. Concentración de la muestra 10 mg/100 $\mu\text{l}$ . Pico **b**:  $t_R$  8.0 min

La purificación de la fracción H068 mediante cromatografía de líquidos de alta resolución permitió la obtención de 215.7 mg adicionales de brazilina (**21**). El análisis se llevó a cabo bajo las condiciones especificadas al pie de la **Figura 3**.

El cromatograma de la fracción H069 indicó que la misma contenía tres compuestos mayoritarios (picos c-e; Figura 5).



**Figura 5** Cromatograma generado en forma preparativa durante la separación de la fracción H069. Concentración de la muestra 4 mg/ 200  $\mu$ l. Picos: c  $t_R$  7.5 min, d  $t_R$  8.4 min., e  $t_R$  9.4 min.

Para lograr la purificación de los compuestos presentes en la fracción H069 se utilizó la técnica de corte de núcleo (parte experimental 3.2.1). El empleo de esta<sup>o</sup> técnica permitió el aislamiento de 35 mg de un compuesto identificado como el floroglucinol (27). Este compuesto corresponde al pico mayoritario c (Figura 5).

### 6.3.2 Aislamiento de haematoxilina (20) de las fracciones primarias H010→H012.

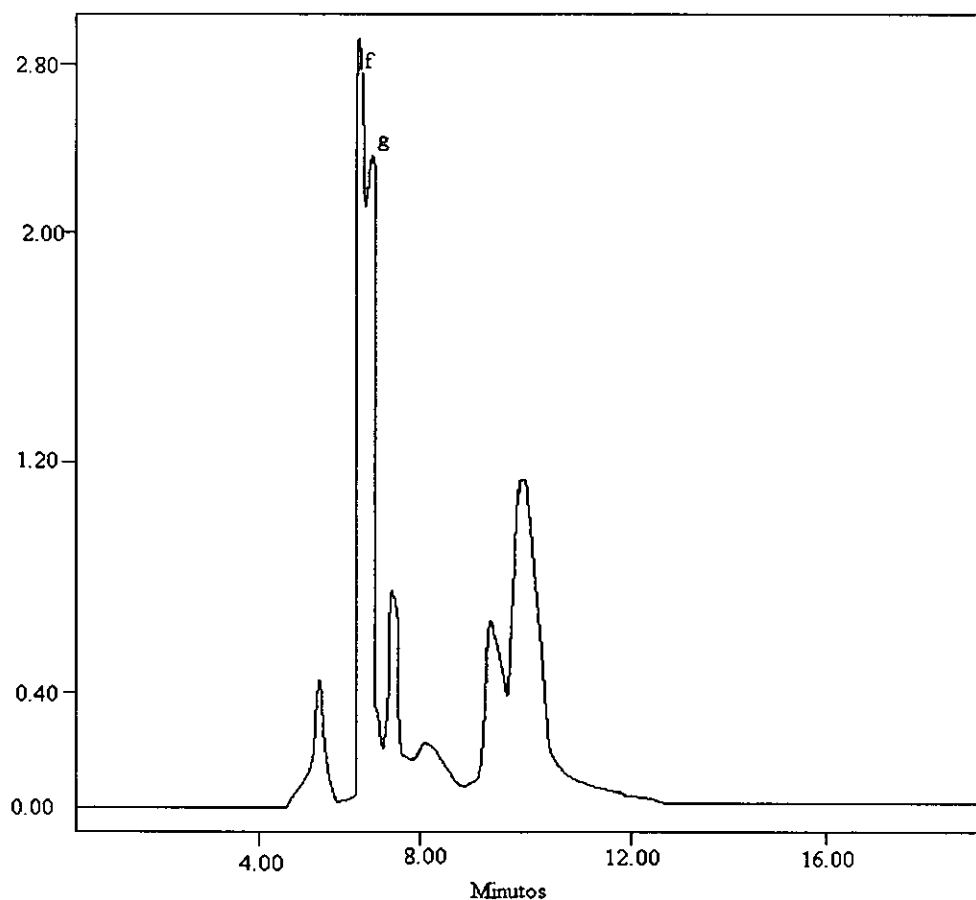
La combinación de las fracciones primarias H010→H012 generó 148 g de un residuo de color café, el cuál se sometió a un fraccionamiento secundario en una columna de gel de sílice (1.5 Kg). El proceso de elución se efectuó con hexano, mezclas de hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH y CH<sub>3</sub>OH. Se recolectaron un total de 75 fracciones de 500 ml cada una y se analizaron por cromatografía en capa fina, combinándose todas aquellas que presentaron similitud cromatográfica. El proceso generó once fracciones secundarias. En el Cuadro 12 se resume este fraccionamiento secundario.

**Cuadro 12** Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de las fracciones H010→H012 de *Haematoxylon brasiletto*.

ELUYENTE	PROPORCION %	FRACCIONES	RACCIONES OMBINADAS	CLAVES	PESO (g)
HEXANO	100	1-10	1-28	H026	0.3879
HEXANO-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	8:2	11-23	29-33	H027	0.1041
HEXANO-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1:1	24-32	34-37	H028	0.0582
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	33-47	38-52	H029	0.3157
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> OH	9:1	48-63	53-54	H030	3.5700
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> OH	1:1	64-69	55	H031	0.8052
CH <sub>3</sub> OH	100	70-75	56-57	H032	3.0000
			58-61	H033*	7.8800
			62-63	H034*	9.0800
			64-69	H035*	53.3300
			70-75	H036*	22.8800

\*Fracciones con actividad antimicrobiana.

El aislamiento y purificación de los constituyentes presentes en las fracciones secundarias activas se realizó mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) indicada en el inciso 3.2.1. Para la resolución de la fracción H035 (500 mg) se determinaron en primer lugar las condiciones analíticas óptimas de separación. Posteriormente, se procedió a realizar la separación en columna preparativa; el cromatograma resultante se muestra en la Figura 6 y como se puede apreciar, la fracción contenía dos compuestos mayoritarios (picos f-g).



**Figura 6** Cromatograma obtenido a nivel preparativo de la fracción **H035**. Condiciones de análisis Detector UV/visible,  $\lambda = 288$  nm. Sistema de elución: gradiente de acetonitrilo-agua.(30:70→70:30). Flujo de 6.5 ml/min. Concentración de la muestra 1mg/ $\mu$ l. Picos **f**:  $t_R$  6.0 min y **g**  $t_R$  6.5 min.

Para la purificación del compuesto **20** correspondiente al pico **f**, también se utilizó la técnica de corte de núcleo. Este proceso permitió la obtención de 112.3 mg de haematoxilina (**20**) bajo la forma de un polvo color anaranjado.

La purificación del compuesto correspondiente al pico **g** permitió la obtención de 52.3 mg adicionales de brazilina (**21**)

## VII. RESULTADOS Y DISCUSION

La selección primaria de *Iostephane heterophylla* y *Haematoxylon brasiletto* como fuente de principios activos se realizó de acuerdo a un criterio etnomédico. Este criterio se fundamenta en el hecho de que las plantas utilizadas en las prácticas médicas populares han demostrado ser de primordial importancia para el descubrimiento de fármacos de aplicación terapéutica (Phillipson, 2001). Es importante enfatizar que los principios activos que se aislen de las especies preseleccionadas de acuerdo a un criterio etnomédico pueden o no presentar actividades biológicas relacionadas con las propiedades que se le atribuyen en las prácticas médicas populares. En este sentido cabe mencionar el caso de la vincristina y vinblastina, principios antitumorales de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) empleada en las prácticas médicas populares de Madagascar como un agente hipoglucemiante y no contra el cáncer (Evans, 1991).

Una vez realizado el proceso de selección primaria se procedió a la preparación de los extractos en pequeña escala. Posteriormente, los extractos resultantes se sometieron a una serie de evaluaciones biológicas. Estas evaluaciones se efectuaron en los laboratorios participantes en el proyecto "Bioactive Agents from Dryland Plants of Latin America". En esta ocasión se detectó que los extractos íntegros de *Iostephane heterophylla* y *Haematoxylon brasiletto* eran activos contra *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecium* a las concentraciones de 0.2 y 1 µg/ml. Con base en los resultados obtenidos de los ensayos biológicos así como aquellos derivados de estudios previos (Aguilar *et al.*, 1993; Delgado y Aguilar, 1996; Sánchez, *et al.*, 1958, Pratt y Yuzuriha, 1959) se estableció que *I. heterophylla* y *H. brasiletto* contienen principios antibacterianos de posible interés terapéutico. En consecuencia se procedió a la realización del estudio fitoquímico biodirigido de estas especies y así obtener los principios activos. Como ensayo biológico de monitoreo se empleó el mismo que permitió detectar la actividad antibacteriana a nivel de los extractos crudos (Rojas, *et al.*, 1987; Singh *et al.*, 2000).

La preparación de los extractos se realizó mediante un proceso de maceración como se indicó en la sección experimental (inciso 4.1). Posteriormente cada extracto se fraccionó



de manera preliminar mediante cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. Este proceso permitió la obtención de once fracciones primarias (F002 a F011, Cuadro 4) en el caso de *I. heterophylla* y 15 fracciones primarias (H001 a H015, Cuadro 8) para el extracto de *H. brasiletto*. Para la detección de la actividad antimicrobiana de cada una de las fracciones primarias se utilizó el método de difusión en agar descrito en la literatura (Singh, *et al.*, 2000). En el caso de *I. heterophylla* la actividad antimicrobiana se concentró en las fracciones F002 a F005, en tanto que las fracciones H008 a H015 del extracto de *H. brasiletto* fueron las antibacterianas. Los resultados de las evaluaciones de las fracciones se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1** Actividad antimicrobiana de las fracciones primarias de *Iostephane heterophylla* y *Haematoxylon brasiletto*.

<i>Iostephane heterophylla</i>			<i>Haematoxylon brasiletto</i>		
FRACCION	MICROORGANISMOS DE PRUEBA		FRACCION	MICROORGANISMOS DE PRUEBA	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
F001	10 <sup>a</sup>	+	H001	9 <sup>a</sup>	±
F002*	11 <sup>a</sup>	+	H002	0	-
F003*	10 <sup>a</sup>	+++	H003	0	-
F004*	11 <sup>a</sup>	++++	H004	0	-
F005*	11 <sup>a</sup>	++++	H005	0	±
F006	10 <sup>b</sup>	+	H006	8 <sup>a</sup>	+
F007	0	-	H007	9 <sup>b</sup>	+
F008	0	-	H008*	18 <sup>a</sup>	+++
F009	0	-	H009*	20 <sup>a</sup>	++++
F010	0	-	H010*	18 <sup>a</sup>	++++
F011	0	-	H011*	12 <sup>a</sup>	+++
			H012*	12 <sup>a</sup>	+++
			H013*	13 <sup>a</sup>	+++
			H014*	12 <sup>a</sup>	++
			H015*	13 <sup>a</sup>	++

Ensayo de difusión en agar (200 µg/pozo)

toxicidad para *E. coli* (100 µg/pozo)

- inactiva; ± ligeramente activa; + poco activa;

++ activa; +++ muy activa; ++++ extremadamente activa.

<sup>a</sup> = halo de inhibición en mm.

<sup>b</sup> = halo de inhibición difuso (mm)

\*Fracciones con actividad antimicrobiana.

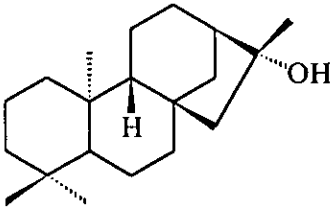
**\*\*Nota:** Los datos de actividad biológica se presentan tal y como fueron proporcionados por los laboratorios Whyeth-Ayerst.

## 7.1 Obtención de los metabolitos biodinámicos de la especie *Iostephane heterophylla* (Cav) Benth (Asteraceae).

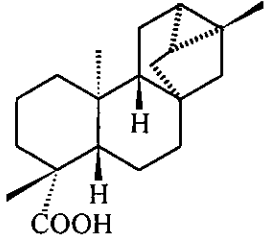
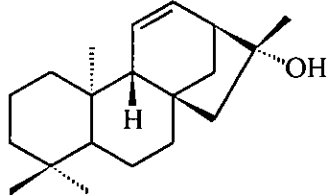
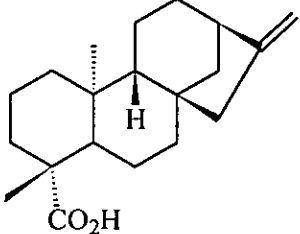
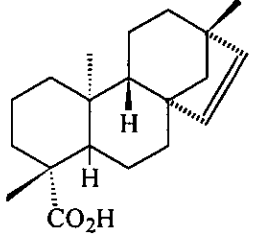
El aislamiento y purificación de los compuestos presentes en las fracciones primarias activas se realizó mediante la aplicación de diversas técnicas cromatográficas. Este proceso permitió el aislamiento y purificación de seis metabolitos secundarios. De estos, cinco ya se habían descrito con anterioridad en la especie (Delgado y Aguilar, 1996). Los compuestos aislados incluyeron cinco diterpenoides y dos sesquiterpenoides de tipo bisaboleno. Los diterpenoides se caracterizaron como 16 $\alpha$ -hidroxi-*ent*-kaurano (3), ácido traquiloban-19-oico (1), una mezcla de los ácidos *ent*-kaur-16-en-19-oico (4) y *ent*-beyer-15-en-19-oico (5) y 16 $\alpha$ -hidroxi-*ent*-kaur-11-eno (9). Los dos sesquiterpenoides de tipo bisaboleno se identificaron como el xantorizol (16), componente mayoritario de la especie, y el 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22). Este último constituye un nuevo producto natural.

En el Cuadro 13 se presentan los metabolitos aislados de la raíz de *Iostephane heterophylla* en este estudio y su rendimiento.

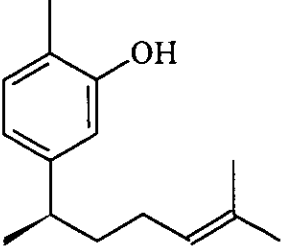
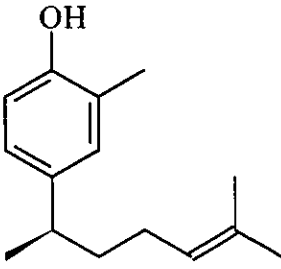
**Cuadro 13** Metabolitos aislados de la raíz de *Iostephane heterophylla*.

COMPUESTO	RENDIMIENTO EN BASE AL MATERIAL VEGETAL SECO (%)
 <p>16<math>\alpha</math>-hidroxi-<i>ent</i>-kaurano (3)</p>	<p>1.4 x 10<sup>-3</sup></p>

Cuadro 13 Metabolitos aislados de la raíz de *Iostephane heterophylla* (continuación).

COMPUESTO	RENDIMIENTO EN BASE AL MATERIAL VEGETAL SECO (%)
 <p>ácido traquiloban-19-oico (1)</p>	$3.7 \times 10^{-1}$
 <p>16<math>\alpha</math>-hidroxi-<i>ent</i>-kaur-11-eno (9)</p>	$1.76 \times 10^{-2}$
 <p>ácido <i>ent</i>-kaur-16-en-19-oico (4)</p>	$6.95 \times 10^{-2}$
 <p>ácido <i>ent</i>-beyer-15-en-19-oico (5)</p>	$6.95 \times 10^{-2}$

**Cuadro 13** Metabolitos aislados de la raíz de *Iostephane heterophylla* (continuación).

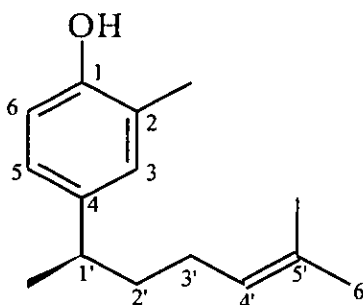
COMPUESTO	RENDIMIENTO EN BASE AL MATERIAL VEGETAL SECO (%).
 <p data-bbox="397 627 605 658">Xantorrizol (16)</p>	2.3
 <p data-bbox="219 996 779 1027">4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22).</p>	$8.4 \times 10^{-4}$

En general, los compuestos puros aislados se caracterizaron mediante la aplicación de técnicas espectrométricas (EM), espectroscópicas (IR, UV, RMN) y quiroópticas (DC) convencionales. Para identificar los compuestos **1**, **3**, **4**, **5**, **9** y **16**, se compararon las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas con aquellas descritas previamente en la literatura (Aguilar, *et al.*, 1993; Aguilar y Delgado, 1995; Delgado y Aguilar, 1996). En todos los casos las constantes se encontraban en perfecta armonía con las reportadas.

## 7.2 Elucidación estructural del 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (**22**).

Las constantes físicas, espectrométricas y algunas constantes espectroscópicas del compuesto **22** se resumen en la **Tabla 2**.

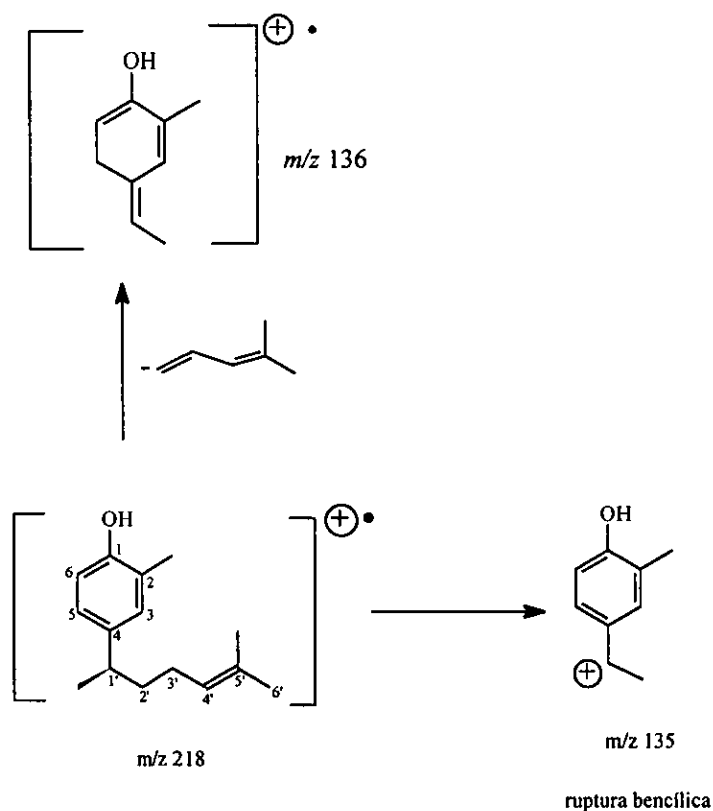
**Tabla 2** Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto **22**



4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (**22**)

<b>Fórmula Molecular</b>	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O
<b>Peso Molecular (uma)</b>	218
<b>IR<sub>v</sub>max película cm<sup>-1</sup></b>	3436, 3041, 2955, 2924, 2854, 1611,
<b>Espectro 1</b>	1510, 1454, 1376, 1264, 1121
<b>HREIMS m/z (Int. Rel.)</b>	218 [M <sup>+</sup> (90)], 203(10), 161(68),
<b>Espectro 2</b>	148(90), 135(100), 121 (45)
<b>[α]<sub>D</sub> (c 1 mg/ml, en MeOH)</b>	-6.0°
<b>UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (ε) nm</b>	276 (2218), 257 (1709), 204(22581)
<b>CD (MeOH) Δε (nm)</b>	-1.44 x 10 <sup>3</sup> (277), -2.75 x 10 <sup>4</sup> (205)
<b>Espectro 10</b>	

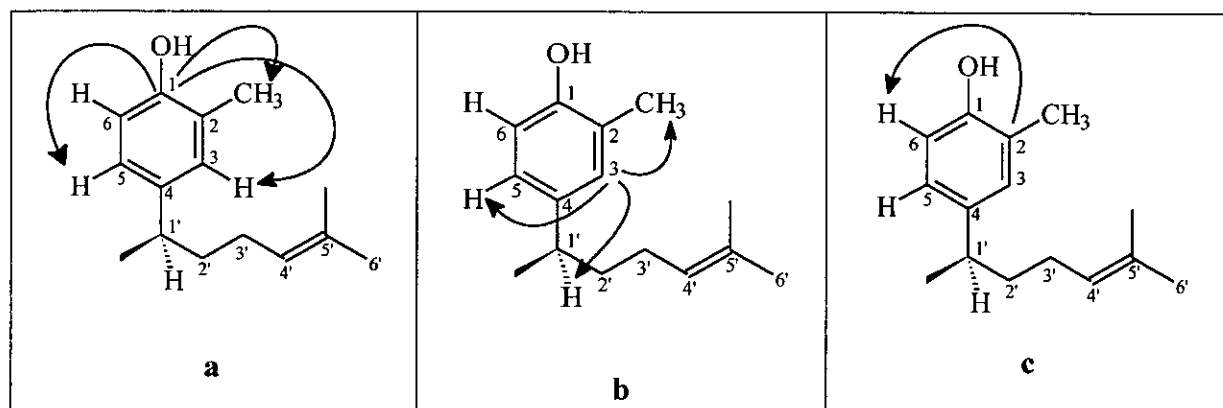
El espectro de masas generado por el compuesto **22** resultó idéntico al del xantorrizol (**16**) (**Espectro 3**); en ambos casos el ión molecular ( $M^+$ ) se presentó en una relación de  $m/z$  correspondiente a 218 uma (**Espectro 2**), de acuerdo con la fórmula molecular  $C_{15}H_{22}O$ . Esta fórmula permite cinco grados de insaturación. En los dos espectros, el pico base se presentó en una relación  $m/z$  de 135 uma, el cual corresponde a la ruptura de tipo bencílica de la cadena lateral  $C_8$  de un sesquiterpenoide de tipo bisabolenol. (**Figura 7**).



**Figura 7** Fragmentos más importantes observados en el espectro de masas por impacto electrónico del 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (**22**)

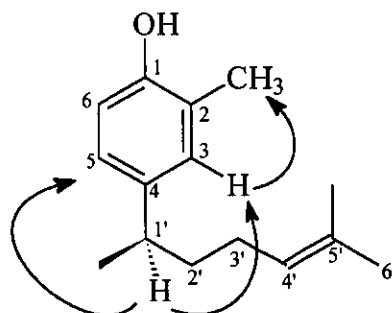
El espectro en el IR (**Espectro 1**) presenta bandas asociadas con un núcleo aromático ( $3041$ ,  $1611$  y  $1510\text{ cm}^{-1}$ ) y funciones hidroxilo ( $3436\text{ cm}^{-1}$ ). El carácter aromático del producto se confirmó con base en los máximos de absorción observados en el espectro UV (Tabla 2).

Los espectros unidimensionales de RMN del compuesto **22** también presentaron similitud con los del xantorizol (**16**) (Tablas 4-5). En ambos espectros se observa claramente la presencia de señales para un grupo isopropilideno, un metino bencílico, un metilo sobre anillo aromático y tres protones aromáticos. Estos últimos aparecen como un sistema *ABX* en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 4). La principal diferencia observada entre los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de ambos compuestos es el desplazamiento químico de los protones aromáticos que conforman el sistema *ABX* [ $\delta_{\text{H}}$  6.92 (1H, *d*,  $J = 2$  Hz, H-3),  $\delta_{\text{H}}$  6.88 (1H, *dd*,  $J = 8$  y 2.5 Hz, H-5) y  $\delta_{\text{H}}$  6.69 (*d*,  $J = 8$  Hz, H-6) para el compuesto **22** y  $\delta_{\text{H}}$  7.01 (1H, *d*,  $J = 7.7$  Hz, H-3),  $\delta_{\text{H}}$  6.67 (1H, *dd*,  $J = 7.7$  y 1.5 Hz, H-4) y  $\delta_{\text{H}}$  6.60 (1H, *d*,  $J = 1.5$  Hz, H-6) para el xantorizol (**16**)]. Esta información permitió inferir *a priori* que la disposición de los grupos hidroxilo y metilo en el anillo aromático del compuesto **22** era inversa a la del xantorizol (**16**). El análisis detallado de los espectros NOESY y HMBC (Espectros 8 y 9) confirmaron esta suposición. Así, las correlaciones C-1/H-3, Me-2, H-5 (Figura 8a); C-3/Me-2, H-1' y H-5 (Figura 8b) y C-2/H-6 (Figura 8c) observadas en el espectro HMBC son congruentes con la ubicación del hidroxilo fenólico en C-1 (*para*- a la cadena 1,5-dimetil-4-hexenil) y del grupo metilo en C-2.



**Figura 8** Correlaciones ( $^3J_{\text{C-H}}$ ) observadas en el Espectro HMBC del compuesto **22**.  
 a) Correlación del C-1 con Me-2, H-3 y H-5; b) Correlación del C-3 con Me-2, H-1' y H-5; c) Correlación del C-2 con H-6.

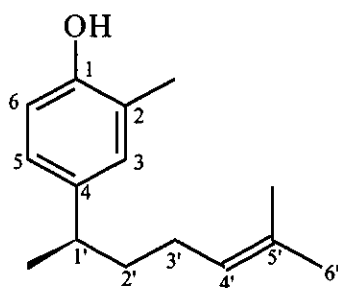
Por otro lado, las correlaciones H-3/Me-2 y H-1'/H-3, H-5 (Figura 9) son consistentes con la propuesta anterior.



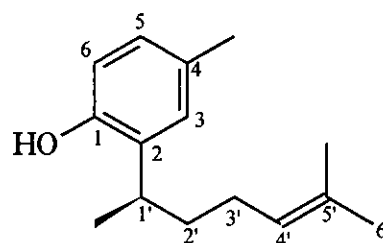
**Figura 9.** Correlaciones observadas en el espectro NOESY del compuesto **22**.

El signo negativo de la rotación óptica del compuesto **22** indicó que la configuración absoluta en C-1' es idéntica a la de los compuestos **16** y el (-)-cucurfenol (Aguilar *et al.*, 1993; McEnroe *et al.*, 1978). De manera adicional, los espectros de dicroísmo circular (CD) de los compuestos **16** y **22** presentaron un efecto Cotton negativo a 277 nm.

El compuesto **22** es el segundo bisaboleno rearrreglado de origen natural descrito en la literatura, anteriormente se registró el aislamiento del 2-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metilfenol (**23**) a partir de las partes aéreas de *Elvira biflora* DC, (Asteraceae) (Dennison, *et al.*, 1975).

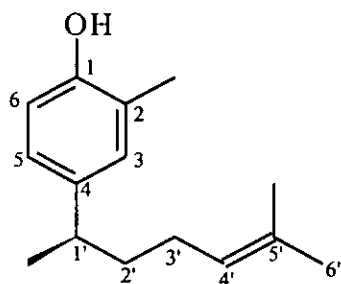


4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (**22**)

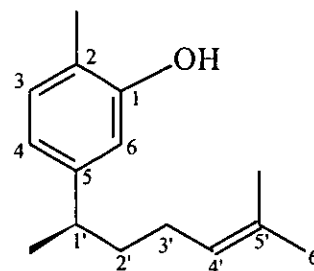


2-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metilfenol (**23**)



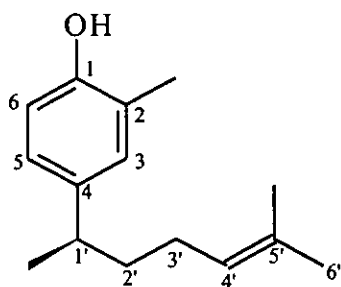
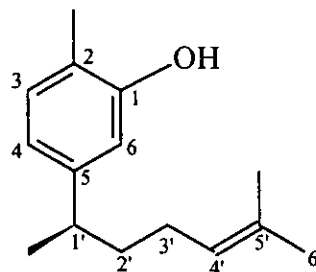
Tabla 3 Datos de RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de los compuestos 22 y 16

4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22)



xantorizol (16)

POSICIÓN	COMPUESTO 22 ( $\delta_H, J$ )	COMPUESTO 16 ( $\delta_H, J$ )
1	-	
2	-	
3	6.92( <i>d</i> ; 2)	7.01 ( <i>d</i> ; 8)
4	-	6.67 ( <i>dd</i> ; 8, 1.5)
5	6.88( <i>dd</i> ; 8, 2.5)	-
6	6.69( <i>d</i> ; 8)	6.60 ( <i>d</i> ; 2.1)
1'	2.59 ( <i>tq</i> ; 7, 7)	2.6 ( <i>m</i> )
2'	1.56 ( <i>m</i> )	1.86 ( <i>m</i> )
3'	1.86 ( <i>m</i> )	1.59 ( <i>m</i> )
4'	5.08 ( <i>tqq</i> ; 7.2, 1.5, 1.5)	5.08 ( <i>m</i> )
5'	-	-
6'	1.55 ( <i>d</i> ; 1.5)	1.53 ( <i>s</i> )
2-CH <sub>3</sub>	2.23 ( <i>sa</i> )	2.21 ( <i>s</i> )
1'-CH <sub>3</sub>	1.19 ( <i>d</i> ; 7)	1.20 ( <i>d</i> ; 7)
5'-CH <sub>3</sub>	1.67 ( <i>d</i> ; 1)	1.67 ( <i>s</i> )
1-OH	4.5 ( <i>sa</i> )	4.68 ( <i>sa</i> )

**Tabla 4** Datos de RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de los compuestos **22** y **16**.4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (**22**)xantorizol (**16**)

POSICIÓN	COMPUESTO 22	COMPUESTO 16
	$\delta_c$	$\delta_c$
1	151.7	153.3
2	122.1	121.0
3	129.6	130.8
4	139.9	119.5
5	125.3	147.2
6	114.7	113.7
1'	38.6	39.1
2'	38.6	38.5
3'	26.1	26.2
4'	124.6	124.6
5'	131.3	131.4
6'	17.6	17.7
2-CH <sub>3</sub>	15.8	15.3
1'-CH <sub>3</sub>	22.5	22.3
5'-CH <sub>3</sub>	25.7	25.7
1-OH	-	-

### 7.3 Actividad antimicrobiana del xantorizol (16) y del 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22)

La evaluación preliminar *in vitro* de los metabolitos secundarios aislados de *I. heterophylla* se realizó mediante la técnica de difusión en agar (Singh, *et al.*, 2000). Este método indudablemente es el de mayor aplicación preliminar para la detección de agentes antimicrobianos. La técnica antes mencionada ofrece las siguientes ventajas: es rápida, sencilla y requiere de pequeñas cantidades de muestra (Singh *et al.*, 2000).

La selección de los microorganismos de prueba se hizo de acuerdo a criterios convencionales (Singh *et al.*, 2000). Estos microorganismos son huéspedes normales del hombre a excepción de *B. subtilis*. Como se puede observar en la **Tabla 5** los productos **22** y **16** resultaron activos contra *S. aureus* (cepas 375, 310-MR y ATCC25923); *E. faecium* (cepas 379-VR y 436), *B. subtilis* (cepa 327), y una cepa de *E. coli* (imp. 389). La CMI fue de 16 µg/ml en la mayoría de los casos. Sin embargo, ambos compuestos fueron inactivos contra *E. coli*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* con valores de CMI iguales o mayores a 128 µg/ml. Los resultados obtenidos para *C. albicans* contrastan con los descritos previamente para el xantorizol (16). En el presente estudio se comprobó que el bisabolenol es inactivo contra esta levadura.

**Tabla 5.** Actividad antimicrobiana del xantorizol (16) y del compuesto 22.

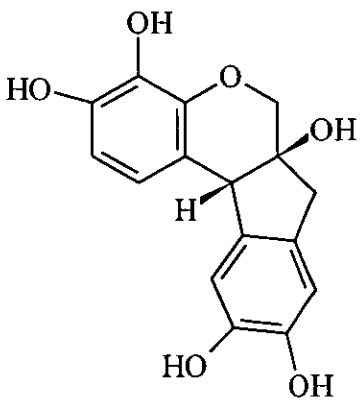
Microorganismo	CMI (µg/ml)		
	Xantorizol (16)	Compuesto 22	Penicilina G*
<i>Staphylococcus aureus</i> 375	16	16	0.06
<i>Staphylococcus aureus</i> 310 (MR)	32	32	64.00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	16	16	0.06
<i>Enterococcus faecium</i> 379 (VR)	16	16	32
<i>Enterococcus faecium</i> 436	16	16	32
<i>Bacillus subtilis</i> 327	16	16	32
<i>Escherichia coli</i> imp 389	32	32	2
<i>Escherichia coli</i> imp 442	>128	>128	32
<i>Escherichia coli</i> imp ATCC25922	>128	>128	128
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 425	32	32	128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 339	>128	>128	>128
<i>Candida albicans</i> 54	128	128	>128

Método microdilución. \* Control positivo

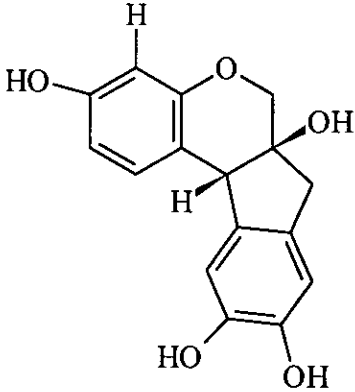
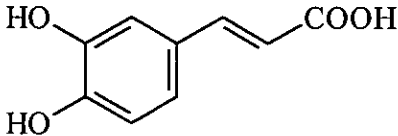
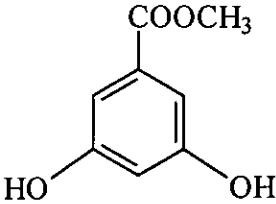
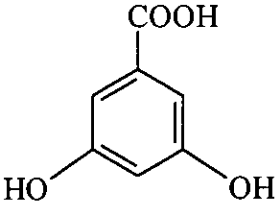
#### 7.4 Obtención de los metabolitos biodinámicos de la especie *Haematoxylon brasiletto* Karst. (Leguminosae).

El aislamiento y la purificación de los compuestos presentes en las fracciones primarias activas se realizó mediante la aplicación de las técnicas cromatográficas en columna abierta y de líquidos de alta resolución. Este proceso permitió el aislamiento de ocho metabolitos secundarios: dos bencilcromenos [la haematoxilina (20) y brazilina (21)], cinco compuestos aromáticos simples [el ácido cafeico (24), el galato de metilo (25), el ácido gálico (26), el floroglucinol (27) y el ácido 4-hidroxicinámico (28)] y una furanocumarina lineal [el 5-metoxisoraleno (29)]. En el Cuadro 14 se presentan los metabolitos aislados de la corteza de *Haematoxylon brasiletto* en este estudio.

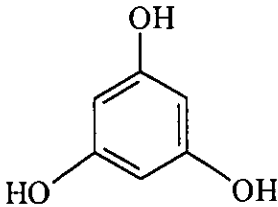
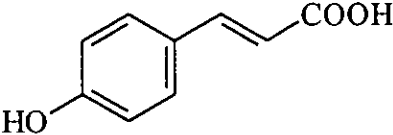
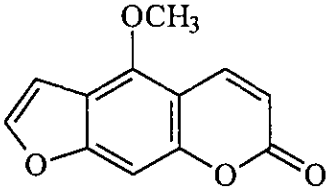
**Cuadro 14** Metabolitos aislados de la corteza de *Haematoxylon brasiletto*.

COMPUESTO	RENDIMIENTO EN BASE AL MATERIAL VEGETAL SECO (%)
 <p>haematoxilina (20)</p>	3.96

Cuadro 14 Metabolitos aislados de la corteza de *Haematoxylon brasiletto* (continuación).

COMPUESTO	RENDIMIENTO EN BASE AL MATERIAL VEGETAL SECO (%)
 <p>brazilina (21)</p>	13.19
 <p>ácido cafeico (24)</p>	$1.25 \times 10^{-2}$
 <p>galato de metilo (25)</p>	$2.1 \times 10^{-2}$
 <p>ácido gálico (26)</p>	$4.1 \times 10^{-2}$

Cuadro 14 Metabolitos aislados de la corteza de *Haematoxylon brasiletto* (continuación).

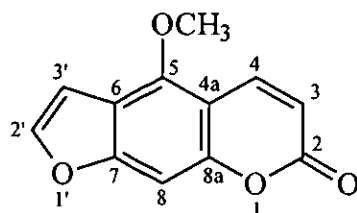
COMPUESTO	RENDIMIENTO EN BASE AL MATERIAL VEGETAL SECO (%).
 <p>floroglucinol (27)</p>	$2.47 \times 10^{-1}$
 <p>ácido 4-hidroxi-cinámico (28)</p>	$4.7 \times 10^{-3}$
 <p>5-metoxisoraleno (29)</p>	$4.1 \times 10^{-3}$

De los compuestos indicados en el Cuadro 14, sólo la haematoxilina (20) y la brazilina (21) se habían caracterizado previamente en la especie. En general, los compuestos puros aislados se caracterizaron mediante la aplicación de técnicas espectrométricas (EM) y espectroscópicas (IR, UV, RMN) convencionales. Para identificar los compuestos 20, 21, 24-28 se compararon sus constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas con aquellas descritas previamente en la literatura. (Cymerman-Craig, *et al.*, 1965; Namikoshi, *et al.*, 1987a, 1987b; Masuda, *et al.*, 1991; Facino *et al.*, 1993; Cao, *et al.*, 1996; Sharma, *et al.*, 1998).

## 7.5 Caracterización del 5-metoxisoraleno (29).

Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del producto **29** se resumen en las Tablas 6-8.

**Tabla 6.** Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del 5-metoxisoraleno (**29**).

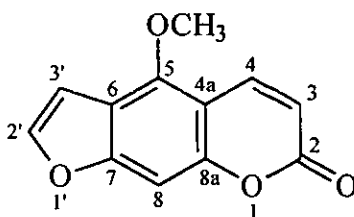


5-metoxisoraleno (**29**)

<b>Fórmula Molecular</b>	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
<b>Peso Molecular(uma)</b>	216
<b>Punto de fusión (°C)</b>	188-191
<b>IR<sub>v</sub>max<sup>película</sup> cm<sup>-1</sup> (Espectro 19)</b>	3000, 2921, 1732, 1624, 1469, 1124, 1101
<b>HREIMS <i>m/z</i> (Int. Rel.) (Espectro 20)</b>	216 [M <sup>+</sup> (100)], 201 (25), 173 (40), 145 (15), 89 (10), 63 (5).

**Tabla 7** Datos de RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

protón	δ <sub>H</sub> (ppm)	Multiplicidad, <i>J</i> (Hz)
3	6.28	<i>d</i> , 9.8
4	8.16	<i>dd</i> , 9.8, 0.7
8	7.14	<i>dd</i> , 0.7, 1
2'	7.59	<i>d</i> , 2.4
3'	7.02	<i>dd</i> , 2.5, 0.9
OCH <sub>3</sub>	4.27	<i>s</i>

**Tabla 8** Datos de RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

posición	$\delta_c$ (ppm)
C-2	161.25
C-3	112.54
C-4	139.28
C-4a	106.39
C-5	149.55
C-6	112.65
C-7	158.36
C-8	93.84
C-8a	152.69
C-2'	144.78
C-3'	105.03
OCH <sub>3</sub>	60.08

El espectro en el IR (**Espectro 19**) presenta absorciones asociadas con el carácter aromático de la molécula (3000 cm<sup>-1</sup>, 1624 cm<sup>-1</sup>, 1605 cm<sup>-1</sup>) y con la presencia de carbonilo de lactona (1732 cm<sup>-1</sup>). El espectro de masas (**Espectro 20**) generado por este compuesto presenta el ión molecular en una relación de *m/z* de 216 uma y también corresponde al pico base. La fórmula molecular se estableció como C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub> y permite nueve grados de insaturación.

La información proporcionada por la espectrometría de masas y el análisis detallado de los espectros de RMN (**Espectros 22 y 24**), permiten establecer que el compuesto **29** es una furanocumarina lineal (Steck y Bailey, 1969; Steck y Mazurek, 1972; Elgamal, *et al.*, 1979; Harkar *et al.*, 1984).



Las características más importantes del espectro de RMN-<sup>1</sup>H (**Espectro 22**) se resumen a continuación:

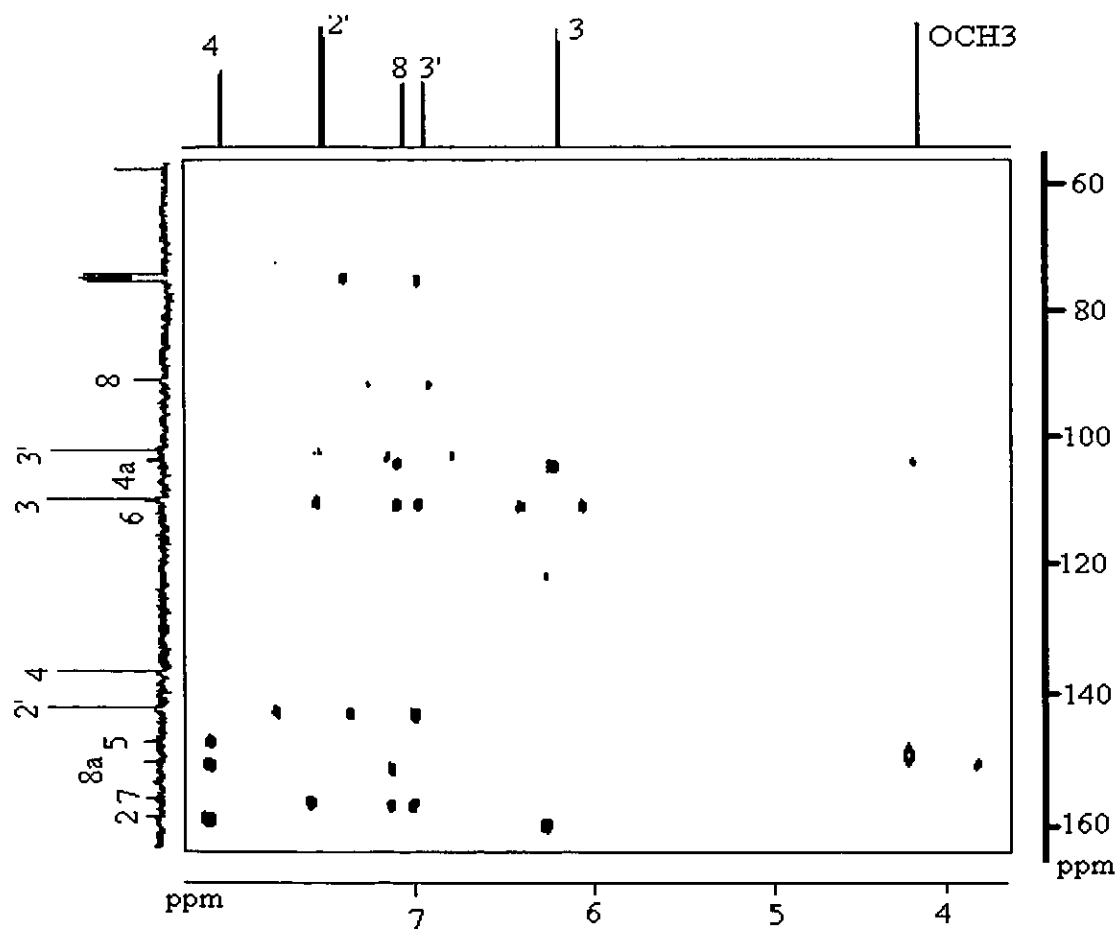
1. En la zona donde absorben los hidrógenos aromáticos se observan dos señales dobles en  $\delta_{\text{H}}$  6.28 (H-3, *d*,  $J = 9.9$  Hz) y en  $\delta_{\text{H}}$  8.16 (H-4, *dd*,  $J = 9.9, 0.75$  Hz) consistente con la presencia del anillo  $\alpha$ -pirona de una cumarina.
2. En  $\delta_{\text{H}}$  7.59 (H-2') se aprecia un doblete ( $J = 2.4$  Hz) y en  $\delta_{\text{H}}$  7.02 (H-3') una señal doble de doble ( $J = 2.5, 0.9$  Hz), típicas del anillo furánico de una furanocumarina.
3. En  $\delta_{\text{H}}$  7.14 (H-8, *dd*,  $J = 0.9, 1.0$  Hz) aparece una señal doble atribuible a un protón de tipo aromático.
4. En  $\delta_{\text{H}}$  4.25 aparece una señal típica de un grupo metoxilo unido a un anillo aromático.

El espectro de RMN-<sup>13</sup>C (**Espectro 24**) presenta señales para 12 carbonos, en armonía con la fórmula molecular establecida por espectrometría de masas. El espectro de RMN-<sup>13</sup>C en su modalidad DEPT (**Espectro 25**) indica claramente que estas señales corresponden a: cinco metinos; un metoxilo y seis carbonos cuaternarios. Los metinos son de naturaleza aromática y se observan en  $\delta_{\text{C}}$  112.54, 139.28, 144.78, 105.03 y 93.84. Estas señales muestran correlación en el espectro HETCOR (**Espectro 26**) con las señales en  $\delta_{\text{H}}$  6.28, 8.16, 7.59, 7.02 y 7.14, respectivamente. La señal del metoxilo en  $\delta_{\text{C}}$  60.08 muestra correlación en el espectro HETCOR con la señal en  $\delta_{\text{H}}$  4.27 en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H.

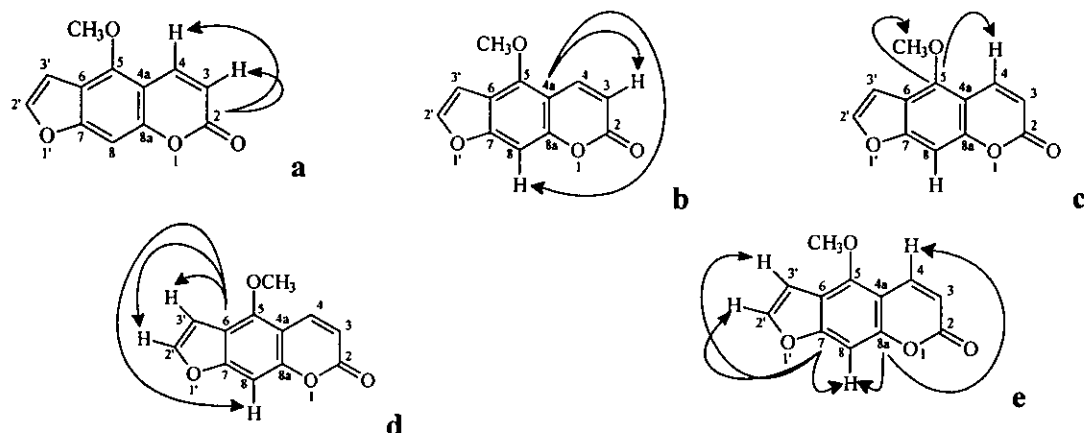
Las señales de los carbonos cuaternarios se establecieron de la siguiente manera:

La señal en  $\delta_{\text{C}}$  161.25 se asignó al carbonilo de la función lactona evidenciado en el espectro en el IR (**Espectro 19**); las señales restantes corresponden a carbonos aromáticos, tres de ellas ( $\delta_{\text{C}}$  149.55, 152.69 y 158.36) sustituidas con funciones oxigenadas de acuerdo a la magnitud de su desplazamiento químico. Estas funciones corresponden a carbonos *ipso* a los oxígenos que forman parte de los heterociclos y al del grupo metoxilo. Los últimos carbonos cuaternarios se encuentran en  $\delta_{\text{C}}$  112.65 y  $\delta_{\text{C}}$  106.39 y son asignables a los carbonos C-6 y C-4a, respectivamente.

El análisis efectuado hasta el momento de los espectros en el IR, masas y RMN permiten corroborar que el producto natural es una furanocumarina sustituida en el anillo carbocíclico con un grupo metoxilo. El análisis detallado del espectro HMBC (**Figuras 10**) permitió establecer la disposición del metoxilo y del anillo furánico. Así, las correlaciones C-4a/H-3, H-8 (**Figura 11b**); C-7/H-2', H-8, H-3' y C-8a/H-4 y H-8 (**Figura 11e**) son congruentes con la disposición lineal del anillo furánico. Por otro lado, las correlaciones en C-5/H-4, -OCH<sub>3</sub> (**Figura 11c**) permitieron establecer la posición del grupo metoxilo en C-5.



**Figura 10.** Espectro HMBC del compuesto 29.

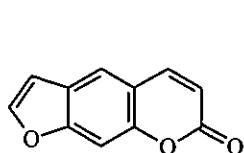


**Figura 11.** Correlaciones observadas en el espectro HMBC del compuesto **29**.

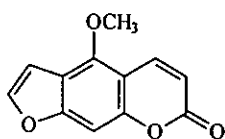
Cabe mencionar que los cuadros de conectividad observados en el espectro NOESY fueron congruentes con la ubicación del metoxilo en C-5.

Todas las evidencias presentadas permitieron establecer que el compuesto **29** es el 5-metoxisoraleno (**29**) (Steck y Bailey, 1969, Kutney *et al.*, 1972).

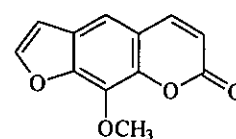
Los soralenos son una clase de compuestos presentes en una gran variedad de plantas, principalmente de la familia Umbelliferae. Entre los soralenos naturales de mayor importancia se encuentran: el soraleno (**30**), el 5-metoxisoraleno (**29**) y el 8-metoxisoraleno (**31**). Estos compuestos se han identificado como fitoalexinas, y forman parte del complejo de defensa de la planta contra hongos, bacterias e insectos (Berenbaum y Feeny, 1981; Scheel *et al.*, 1963). Sin embargo, los soralenos son agentes fototóxicos en animales y humanos. Los humanos se encuentran constantemente expuestos a estos compuestos, ya que se distribuyen ampliamente en una gran variedad de frutas y vegetales como el camote, el apio, la zanahoria, el perejil. Además muchos de estos compuestos se adicionan a una gran variedad de bronceadores comerciales.



soraleno (**30**)



5-metoxisoraleno (**29**)



8-metoxisoraleno (**31**)

Las furanocumarinas actúan como irritantes de la piel en presencia de luz ultravioleta. La fotodermatitis producida por estos compuestos se ha atribuido a la fotocicloaddición entre una molécula de soraleno y una o dos bases pirimidínicas del DNA epidérmico (Grande, *et al.*, 1986).

Debido a la actividad fototóxica de los soralenos, los mismos se utilizan en la fotoquimioterapia de las enfermedades de la piel, tales como el vitiligo, la soriasis y la micosis fúngica (Kornhauser, *et al.*, 1982). Esta aplicación involucra la administración oral de algún soraleno seguida de irradiación con luz UVA (Kornhauser, *et al.*, 1982).

Así, los soralenos se emplean en la fotoquimioterapia pero presentan una desventaja, reaccionan covalentemente con el DNA indicando un riesgo potencial de mutagenicidad (deformación de cromosomas) y oncogenicidad (Ashwood-Smith, *et al.*, 1980).

## 7.6 Determinación de la actividad antimicrobiana de los compuestos aislados de *Haematoxylon brasiletto*.

A la fecha sólo se ha realizado la evaluación biológica de la haematoxilina (20), brazilina (21), ácido cafeico (24) y floroglucinol (27); los resultados se indican en la **Tabla 9**. La evaluación de la actividad antimicrobiana de las metabolitos restantes aislados de *H. brasiletto* se encuentra en proceso, aunque dada la naturaleza de los productos aislados esta especie no resultó de interés para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

**Tabla 9.** Actividad antimicrobiana de los metabolitos aislados de *H. brasiletto*.

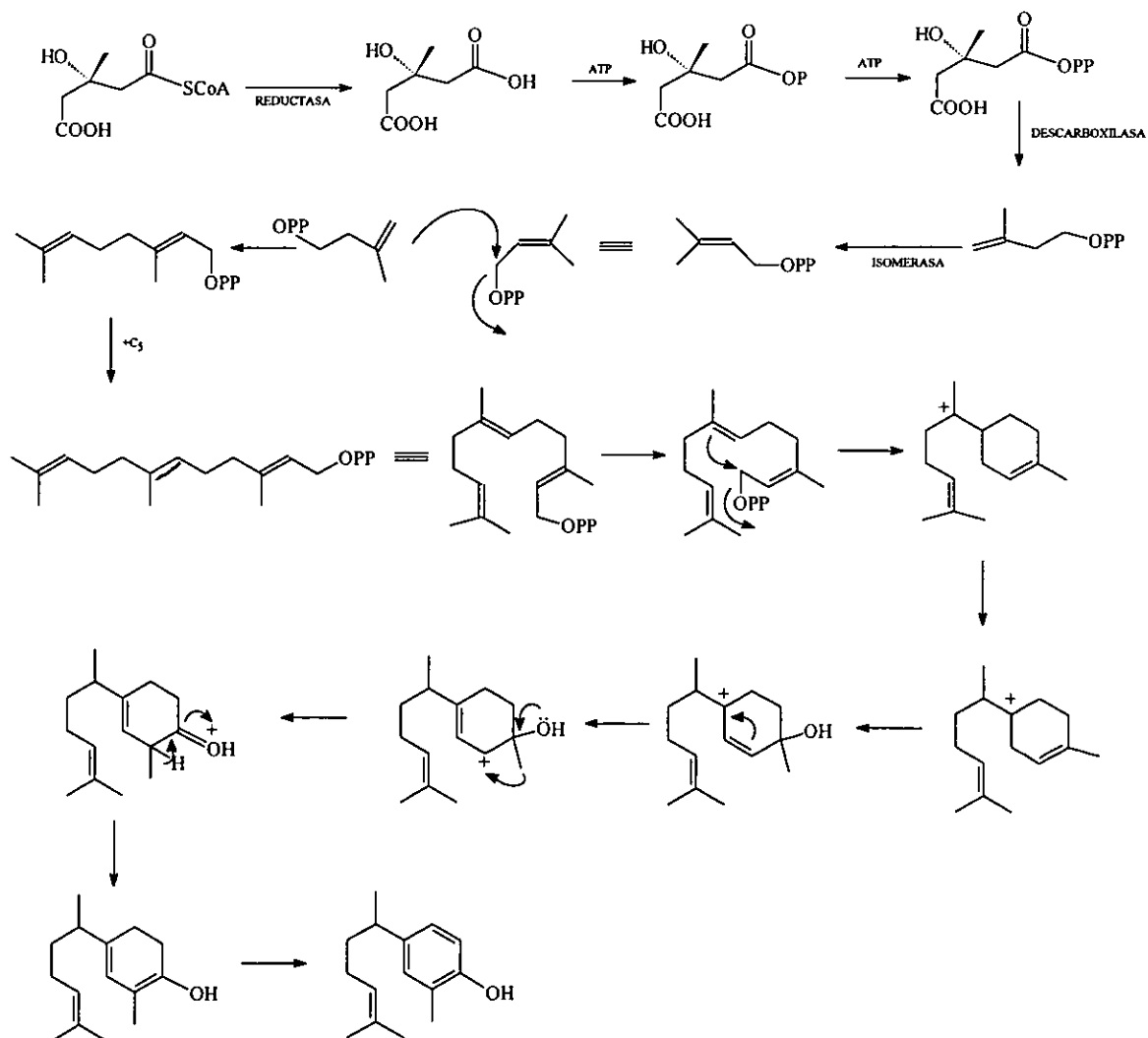
Microorganismo	Zona de inhibición (mm)			
	Compuesto			
	20	21	24	27
<i>Staphylococcus aureus</i> 375	15	13	8	11
<i>Enterococcus faecium</i> 379(VR)	15	12	7	11
<i>Escherichia coli imp</i> 389	17	14	5	10

20 Haematoxilina, 21 Brazilina, 24 Acido cafeico, 27 Floroglucinol, Control positivo penicilina G

**Nota:** los datos de actividad biológica se presentan tal y como fueron proporcionados por los laboratorios Whyeth-Ayerst.

## VIII CONCLUSIONES

1. El estudio químico biodirigido de la especie *Iostephane heterophylla* permitió el descubrimiento de un nuevo producto natural caracterizado por métodos espectroscópicos, espectrométricos y quirópticos como el 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (**22**). Este metabolito es un bisabolenos rearrreglado y constituye el segundo producto natural con estas características (Dennison *et al.*, 1975). Posiblemente la biogénesis de este producto tiene lugar de acuerdo a la secuencia de reacciones que se indica a continuación.



2. Los bisabolenos xantorrizol (16) y 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22) presentaron actividad antimicrobiana contra *S. aureus* (cepas 375, 310-MR y ATCC25923); *E. faecium* (cepas 379-VR y 436), *B. subtilis* (cepa 327), y *E. coli* (*imp.* 389). En todos los casos, la concentración mínima inhibitoria fue de 16 µg/ml. Sin embargo, cuando se administraron a ratones infectados con una cepa letal de *Staphylococcus aureus*, no protegieron a los ratones tratados. En consecuencia estos productos no presentan actividad antimicrobiana *in vivo* y no son de interés para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos.
3. El estudio fitoquímico de la especie *Haematoxylon brasiletto* permitió el aislamiento de cinco compuestos aromáticos simples [el ácido cafeico (24), el galato de metilo (25), el ácido gálico (26), el floroglucinol (27) y el ácido 4-hidroxi cinámico (28)] y una furanocumarina lineal [5-metoxisoraleno (29)], además de los bencilcromenos haematoxilina (20) y brazilina (21). Los compuestos aromáticos simples y la furanocumarina no se habían descrito con anterioridad en la especie y de esta manera, la presente investigación contribuye de manera original al conocimiento de la química de esta importante especie.
4. Este estudio constituye una aportación adicional al conocimiento de los recursos naturales empleados en la medicina tradicional mexicana, al campo de los sesquiterpenos de tipo bisaboleno y a la detección de compuestos antimicrobianos de origen natural.

## IX BIBLIOGRAFÍA.

Aguilar, M. I.; Delgado G.; Bye R.; Linares E. (1993). *Bisabolenes, polycyclic diterpenoids from the roots of Iostephane heterophylla*. *Phytochemistry*, **33**, 1161-1163.

Aguilar, M. I.; Delgado G. (1995). *Novel bisabolene glycoside and other constituents from the roots of the medicinal plant Iostephane heterophylla (Asteraceae)*. *Phytochemistry*, **35**, 155-162.

Ashwood-Smith, M. J.; Poulton, G. A.; Barber, M.; Mildenerger, M. (1980). *5-methoxypsoralen, an ingredient in several suntan preparations and clastogenic properties*. *Nature*, **285**, 407-409.

Argueta, V., Cano, A.; Rodarte, M. E. (1994). *Atlas de las Plantas Medicinales de la Medicina Tradicional Mexicana*. **772**, 1099 y 1100. México D. F. Instituto Nacional Indigenista.

Beak, N.; Seong, G.; Eun-Mi, J.; Bahn, J. H.; Jang, J. S.; Cho, S.; Park, J. K.; Choi, S. Y. (2000). *Anticonvulsant compounds from the wood of Caesalpinia sappan L*. *Archives. Pharmacal Res.* **23**, 344-348.

Berenbaum, M.; Feeny, P. (1981). *Toxicity of angular furanocoumarins to Swallowtail butterflies: Escalation in a coevolutionary arms race?*. *Science*, **212**, 927-929.

Brown, S. A. (1970). *Biosynthesis of furanocoumarins in parsnips*. *Phytochemistry*, **9**, 2471-2475.

Bye, R. A. Jr. (1986). *Medicinal plants of the Sierra Madre: Comparative study of Tarahumara and Mexican plants*. *Economic Botany*, **40**, 103-124.

Campos, M. G.; Oropeza, M. V.; Villanueva, T.; Aguilar, M. I.; Delgado, G.; Ponce, H. A. (2000). *Xanthorrhizol induces endothelium-independent relaxation of rat thoracic aorta*. *Life Science*, **67**, 327-333.

Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. (1996). *Antioxidant capacity of tea and common vegetables*. *Journal Agriculture Food Chemistry*, **44**, 3426-3431.

Choi, S. Y.; Moon, C. K. (1997a). *Effects of brazilin on the altered immune functions in the early phase of halothane intoxication of C57BL/6 mice*. *Planta Medica*, **63**, 400-400.

Choi, S. Y.; Yang, K.; Kim, J. H.; Khil, L.; Chang, T. S.; Moon, C. K. (1997b). *Brazilin modulates immune function mainly by augmenting T cell activity in halothane administered mice*. *Planta Medica*, **63**, 405-408.

Cymerman-Craig, J.; Naik, A. R.; Pratt, R.; Johnson, E.; Bhacca, N. S. (1965). *Nuclear Magnetic resonance spectra and stereochemistry of the antibacterial principle from Haematoxylon braziletto*. *Journal Chemical Society*. **30**, 1573-1576.

Delgado, G.; García, P. E.; Bye, R. A.; Linares, E. (1991). *Eremophilanoides from Roldana Sessilifolia*. *Phytochemistry*, **30**, 1716-1719.

Delgado, G.; Aguilar, M. I. (1996). *Chemical constituents from species belonging to the "cachani" complex of medicinal plants. Secondary metabolites from Mexican plants: chemistry and biological properties*, 69-76p.

Dennison, N. R.; Mirrington, R. N.; Stuart, A. D. (1975). *The synthesis of a phenolic sesquiterpene isolated from Elvira biflora (Compositae)*. *Australian Journal Chemistry*, **28**, 1339-1343.

Elgamal, M. H. A.; Elewa, N. H.; Elkhris, E. A.; Duddeck, H. (1979). *<sup>13</sup>C NMR chemical shifts and carbon-proton coupling constants of some furocoumarins and furochromones*. *Phytochemistry*, **18**, 139-143.



- El-Sayed, N. H.; Michael, H. N.; Kandil, F. E.; Ishak, M. S.; Mabry, T. J. (1994). *Flavonoids and other phenolics of Haematoxylon campechianum. Biochemical Syntematics and Ecology*, **22**, 763-764.
- Evans, W. C.(1991). *Pharmacognosy. Décima tercera edición, Ed. Bailliere Tindall. Londres.*
- Facino, R. M.; Carm, M.; Aldini, G. (1993). *Direct Characterization of caffeic acid and caffeoyl esters with antihyaluronidase activity in crude extracts from Echinaceae angustifolia roots. Farmaco*, **48**, 1447-1461
- Fukke, C.; Yamahara, J.; Shimokawa, T.; Kinjo, J.; Tomimatsu, T.; Nohara, T. (1985). *Two aromatic compounds related to brazilin from Caesalpinia sappan. Phytochemistry*, **24**, 2403-2405.
- Grande, M.; Aguado, A. T.; Mancheño, B.; Piera, F. (1986). *Coumarins and ferulol esthers from Cachrys sicula.. Phytochemistry*, **25**, 505-507.
- Hamburger, M.; Hostettmann, K. (1991). *Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. Phytochemistry*, **30**, 3864-3874.
- Harkar, S.; Razdan, T. K.; Waight, E. (1984). *Steroids, chromone and coumarins from Angelica officinalis. Phytochemistry*, **23**, 419-426.
- Hernández, F. (1959). *Historia Natural de la Nueva España. Obras Completas.[II:37-38]* México D. F. UNAM.
- Hikino, H.; Taguchi, T.; Fujimura, H.;Hiramatsu, Y. (1977). *Antiinflammatory principles of Caesalpinia sappan ood and of Haematoxylon campechianum wood. Planta Medica*, **31**, 241-220.

Hwang, G. ; Kim, J.; Chang, T.; Jeon, S.; So, D.; Moon, C. (1998). *Effects of brazilin on the phospholipase A<sub>2</sub> activity and changes of intracellular free calcium concentration in rat platelets*. *Archives Pharmacol Res.* **21**, 774-778.

Jurd, L.; King, A.; Mihara, K.; Stanley, W. (1971). *Antimicrobial properties of natural phenols and related compounds*. *Appl. Microbiology.*, **21**, 507-510.

Kandil, F. E.; El-Sayed, N. H.; Michael, H. N.; Ishak, M. S.; Mabry, T. J. (1996). *Gallotannins and flavonoids from Haematoxylon campechianum*. *Phytochemistry*, **42**, 1243-1245.

Kandil, F. E.; Michael, H. N.; Ishak, M. S.; Mabry, T. J. (1999). *Phenolics and flavonoids from Haematoxylon campechianum*. *Phytochemistry*, **51**, 133-134.

Kandil, F. E.; Michael, H. N.; Ishak, M. S.; Mabry, T. J. (1999). *Phenolics and flavonoids from Haematoxylon campechianum*. *Phytochemistry*, **51**, 133-134.

Kim, G.; Kim, Y.; Khil, L.; Jeon, S., So, D.; Moon, C. (1998). *Brazilin inhibits activities of protein kinase C and insulin receptor serine kinase in rat liver*. *Archives of Pharmacol Res.* **21**, 140-146.

Kornhauser, A.; Warner, W. G.; Giles, A. L. (1982). *Psoralen phototoxicity: Correlation with serum and epidermal 8-methoxypsoralen and 5-methoxypsoralen in the Guinea pig*. *Science*, **217**, 733-735.

Kutney, J. P.; Verma, A. K.; Young, R. N.(1972). *Studies on constituents of Thamnosma montana Torr. and Frem. The structure of thamnosmin, a novel coumarin epoxide*. *Tetrahedron*, **28**, 5091-5104.

Lee, K. T.; Kim, J. H. *Brazilin as new suntanning agent*. (1997). *Sci. Conf. Asian Soc. Cosm. Sci.* **3<sup>rd</sup>**.33-36.

- Lolor, G. C.; Martin, S. L. (1959). *Haematoxylin and hematein, the coloring principles of logwood I. Journal Society Dyers Colourists*. **75**, 513-517.
- Lowrey, C. (1993). *Reagent chemicals. American Chemical Society Specification, Washington, D. C.* pp. 90-91.
- Masuda, H.; Ohtani, K.; Mizutani, K.; Ogawa, S.; Kasai, R.; Tanaka, O. (1991). *Chemical study on Haematoxylon campechianum: a sweet principle and new Dibenz[b,d]oxocin derivatives. Chemical. Pharmaceutical Bulletin*. **39**, 1382-1384.
- McEnroe, F. J.; Fenical, W. (1978) *Sesquiterpen from Curcuma xanthorrhiza*. *Tetrahedron*, **34**, 1661-1664.
- Moon, C. (1986). *Drugs from Caesalpinia. Ger. offen*. **1**, 49.
- Moon, C.; Yun, Y. P.; Lee, J. H.; Wagner, H.; Shin, Y. S. (1985). *Inhibition of lens-aldose reductase activity by brazilin and hematoxylin. Planta Medica*. **1**, 66-67.
- Moon, C.; Park, K. S.; Kim, S. G., Won, H. S.; Chung, J. H. (1992). *Brazilin protects cultured rat hepatocytes from BrCCl<sub>3</sub>-induced toxicity. Drug and Chemical Toxicology*. **15**, 81-91.
- Moon, C.; Lee, S. H.; Lee, M. O.; Kim, S. G. (1993). *Effects of brazilin on glucose oxidation, lipogenesis and therein involved enzymes in adipose tissues from diabetic KK-mice. Life Sciences*, **53**, 1291-1297.
- Namikoshi, M.; Nakata, H.; Yamada, H.; Nagai, M.; Saitoh, T. (1987a). *Homoisoflavonoids and related compounds. II. Isolation and absolute configurations of 3,4-dihydroxylated homoisoflavans and brazilins from Caesalpinia sappan L. Chemical Pharmaceutical Bulletin*. **35**, 2761-2773.

Namikoshi, M.; Nakata, H. M.; Saitoh, T. (1987b). *Homoisoflavonoids from Caesalpinia sappan*. *Phytochemistry*, **26**, 1831-1833.

Nawwar, M. A.; Buddrus, J.; Bauer, H. (1982). *Dimeric constituents from the roots of Tamarix nilotica*. *Phytochemistry*, **21**, 1755-1758.

Paris, R. R.; Rousselet, R. (1958). *Characterization of dyes of vegetable origin by paper chromatography*. *Ann. Pharm. Franc.* **16**, 747-756.

Phillipson, J. D. (2001). *Phytochemistry and medicinal plants*. *Phytochemistry*, **56**, 237-243.

Ponce-Monter, H.; Campos, M. G.; Aguilar, I.; Delgado, G. (1999). *Phytotherapy Research*. **13**, 202-205.

Pratt, R.; Yuzuriha, Y. (1959). *Antibacterial activity of the heartwood of Haematoxylon brasiletto*. *Journal American Pharm. Assoc.* **48**, 69-72.

Ríos, J. L.; Recio, M. C.; Villar, A. (1988). *Screening for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature*. *Journal of Ethnopharmacology*, **23**, 127-149.

Rojas, A.; Hernández, L.; Pereda-Miranda, R.; Mata, R.. (1987). *Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants*. *Journal of Ethnopharmacology*, **35**, 275-283.

Sánchez, M. A.; Ligeia-García.; Méndez, M. (1958). *Brazilin antibacterial substance from Haematoxylon brasiletto*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. **1**, 225-232.

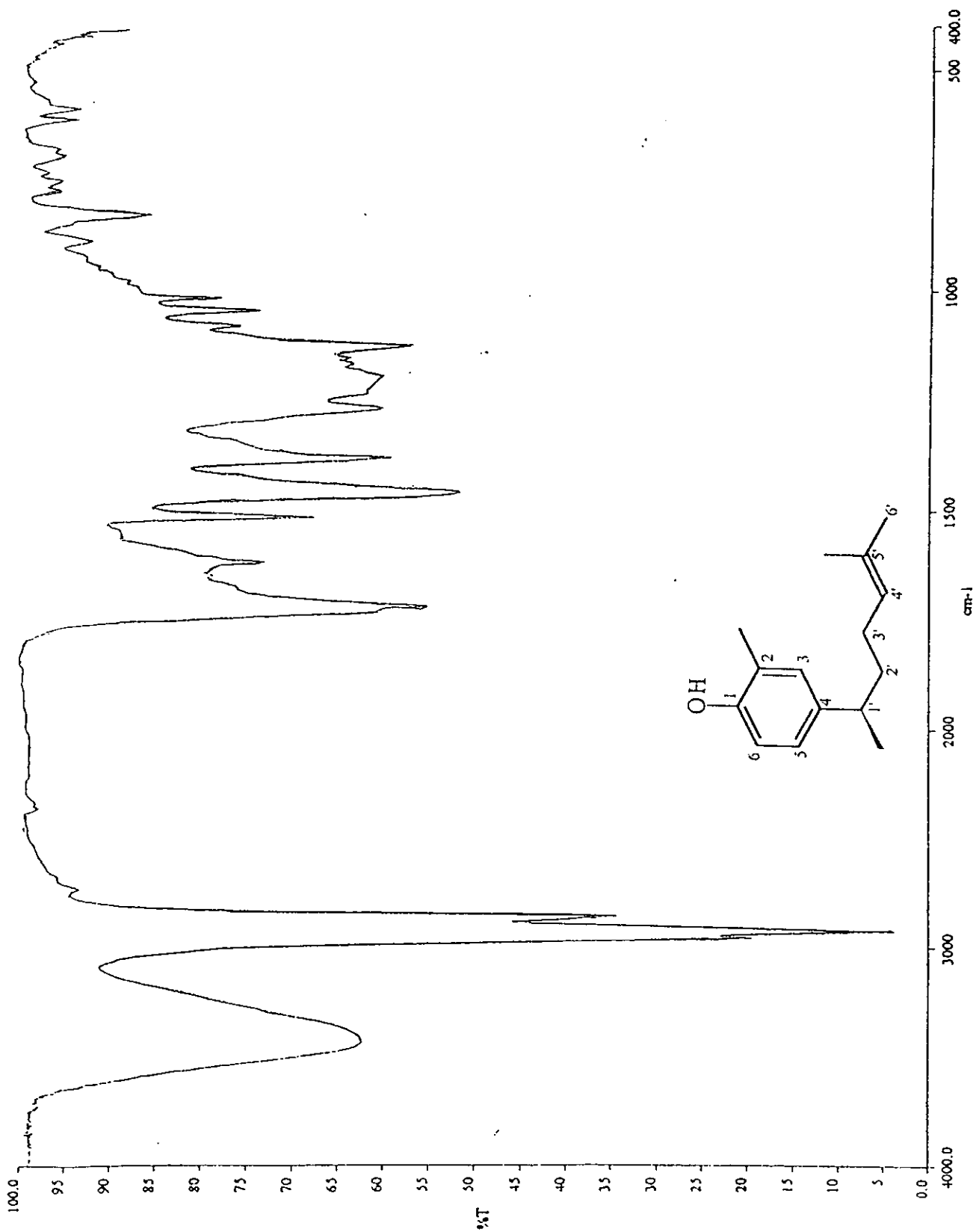
Scheel., L.; Perone, V.; Larkin, R.; Kupel, R. (1963). *Psoralen̄s*. *Biochemistry*, **2**, 1127.

- Sharma, O. P.; Baht, T. K.; Singh, B. (1998). *Thin-layer chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, p-coumaric acid, ferulic acid and tannic acid*. *Journal of Chromatography A*, **822**, 167-171.
- Singh, M. P., Petersen, P. J., Kong, F., Greenstein, M. (2000). *Saccharomicins, Novel Heptadecaglycoside Antibiotics Produced by saccharothrix espanaensis: Antibacterial and Mechanistic Activities*. *Antimicrobiology Agents Chemotherapy*, **44**, 2154-2159.
- Suffnes, M.; Cragg, C.; Grever, M; Grifo, F.; Johnson, G.; Mead, J.; Schepartz, S.; Venditti, J.; Wolpert, M. (1995). *The National Cooperative Natural Products Drug Discovery Group (NCPDDG) and International Cooperative Biodiversity Group (ICBG) Program*. *International Journal of Pharmacognosy*. **33**, supplement, 5-16.
- Sthal, E. (1969). *Thin Layer chromatography*. Academic Press Inc., New York.
- Steck, W. (1969). *The role of marmesin and columbianetin in the biosynthesis of furanocoumarins*. *Tetrahedron Letters*, **54**, 4805-4808.
- Steck, W.; Bailey, B. K. (1969a). *Leaf coumarins of Angelica archangelica*. *Canadian Journal of Chemistry*, **47**, 2425-2430.
- Steck, W.; Bailey, B. K. (1969b). *Characterization of plantf coumarins by combined gas chromatographym ultraviolet absorption spectroscopy and nuclear magnetic resonance analysis*. *Canadian Journal of Chemistry*, **47**, 3577-3583.
- Steck, W. (1970). *Leaf furanocoumarins of Heracleum lanatum*. *Phytochemistry*, **9**, 1145-1146.
- Steck, W.; Bailey, B. K.; Shyluk, J. P.; Gamborg, O. L. (1971). *Coumarins and alkaloids from cell cultures of Ruta graveolens*. *Phytochemistry*, **10**, 191-194.
- Steck, W.; Mazurek, M. (1972). *Identification of natural coumarins by NMR Spectroscopy*. *Lloydia*, **359**, 419-439.
- Takechi, M.; Tanaka, Y. (1982). *Haematoxylon campechianum*. *Planta Medica*. **10**, 252.

Timmermann, B. N.; Wächter, G.; Valcic, S.; Hutchinson, B.; Casler, C.; Henzel, J.; Currim, F.; Manak, R.; Franzblau, S.; Maiese, W.; Calinis, D.; Suarez, E.; Fortunato, R.; Saavedra, E.; Bye, R.; Mata, R.; Montenegro, G. (1999). *The Latin American ICBG: the first five years. Pharmaceutical Biology.* 37, 35-54.

Xie, Y.; Ming, D.; Xu, H.; Dong, H.; But, P. P: (2000). *Vasorelaxing effects of Caesalpinia sappan Involvement of endogenous nitric oxide. Life Sciences.* 67, 1913-1918.

## **ANEXO I**

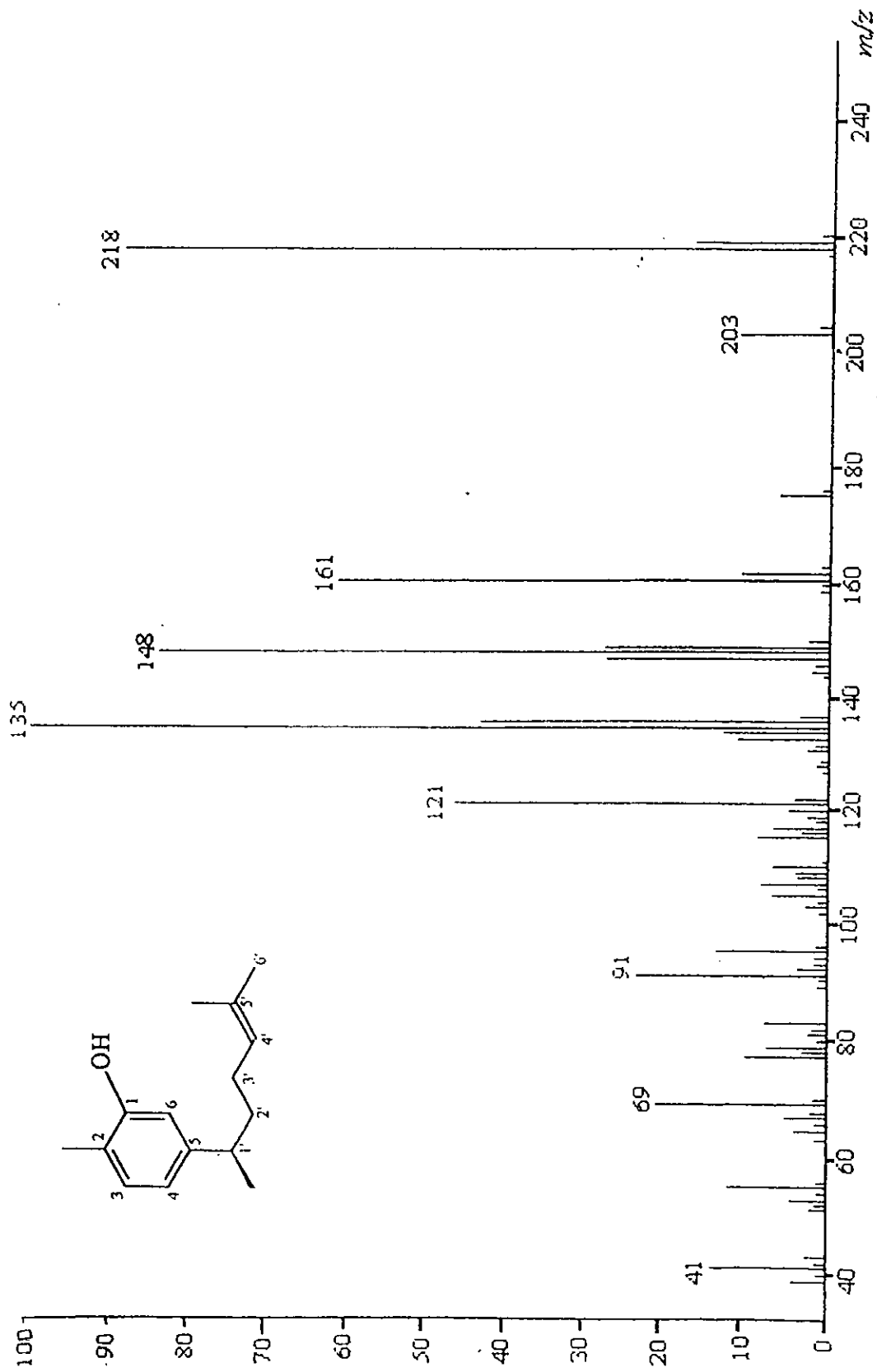


Espectro 1. Espectro en el IR de 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22)

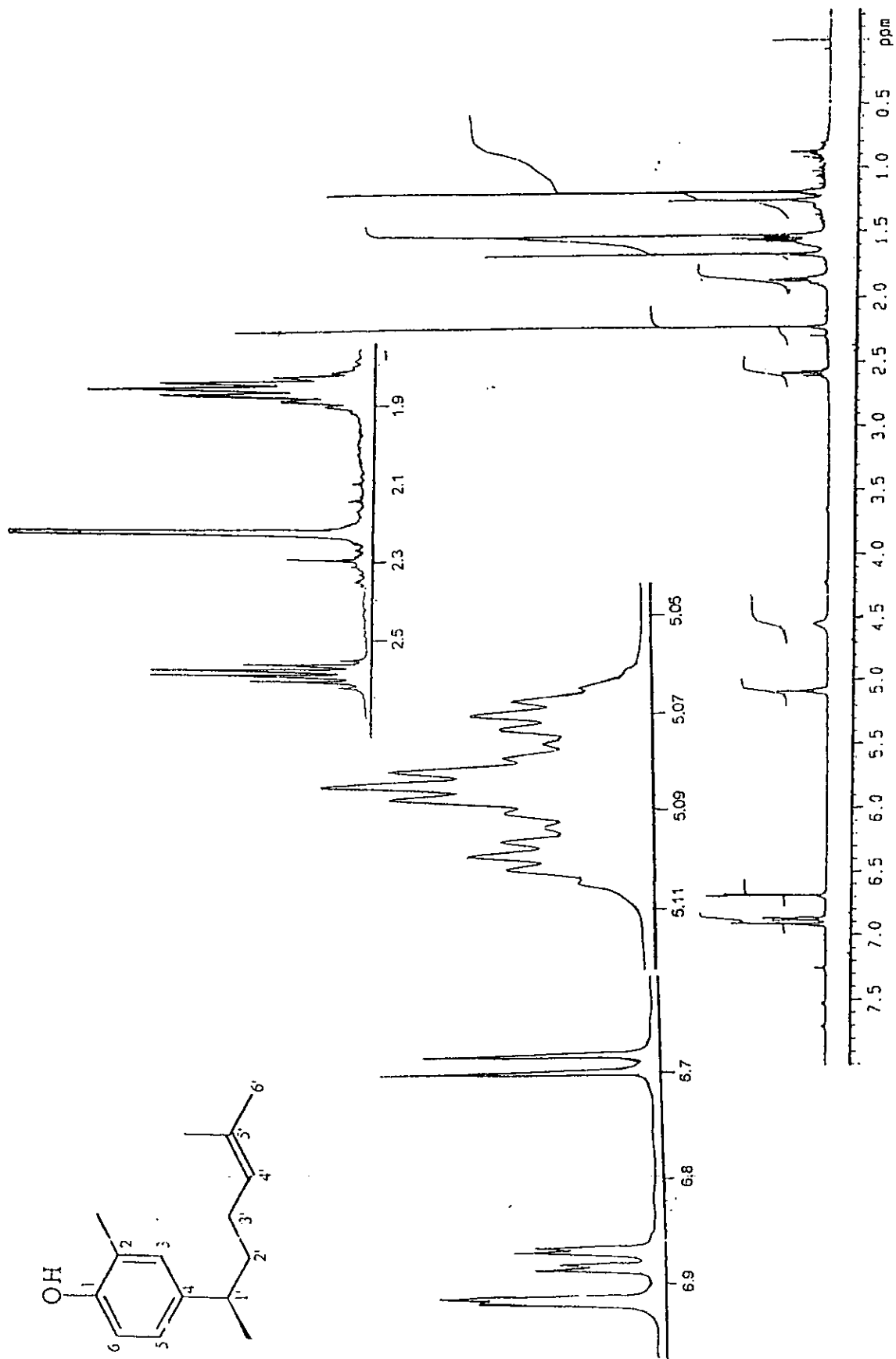
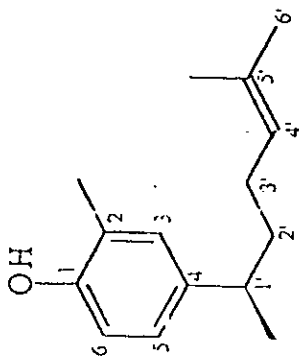




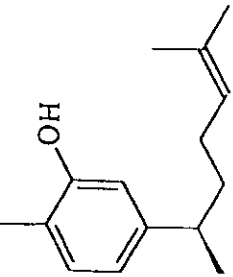
Espectro 2. Espectro de masas modalidad IE de 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22)



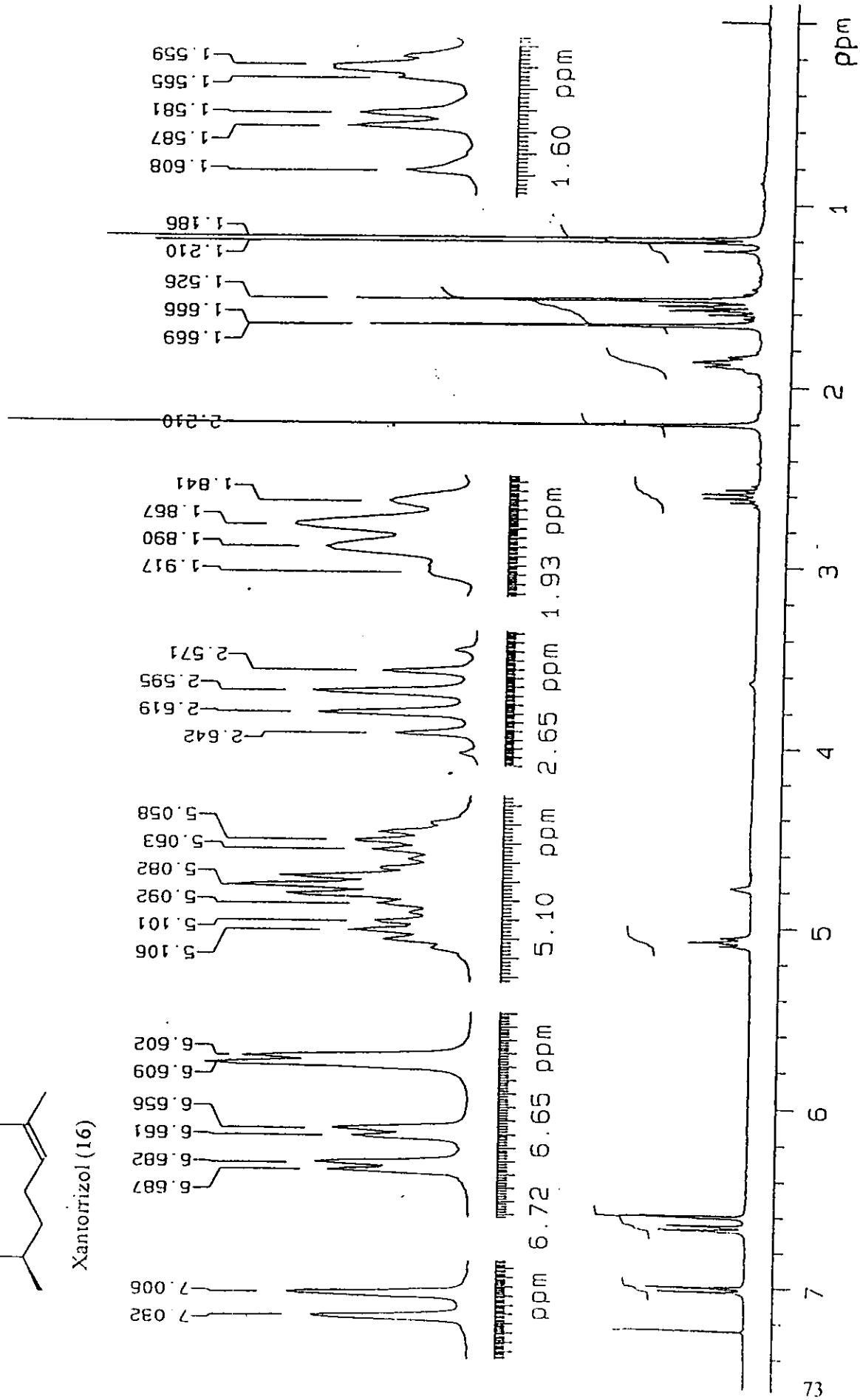
Espectro 3. Espectro de masas modalidad IE del xantorrizol (16)



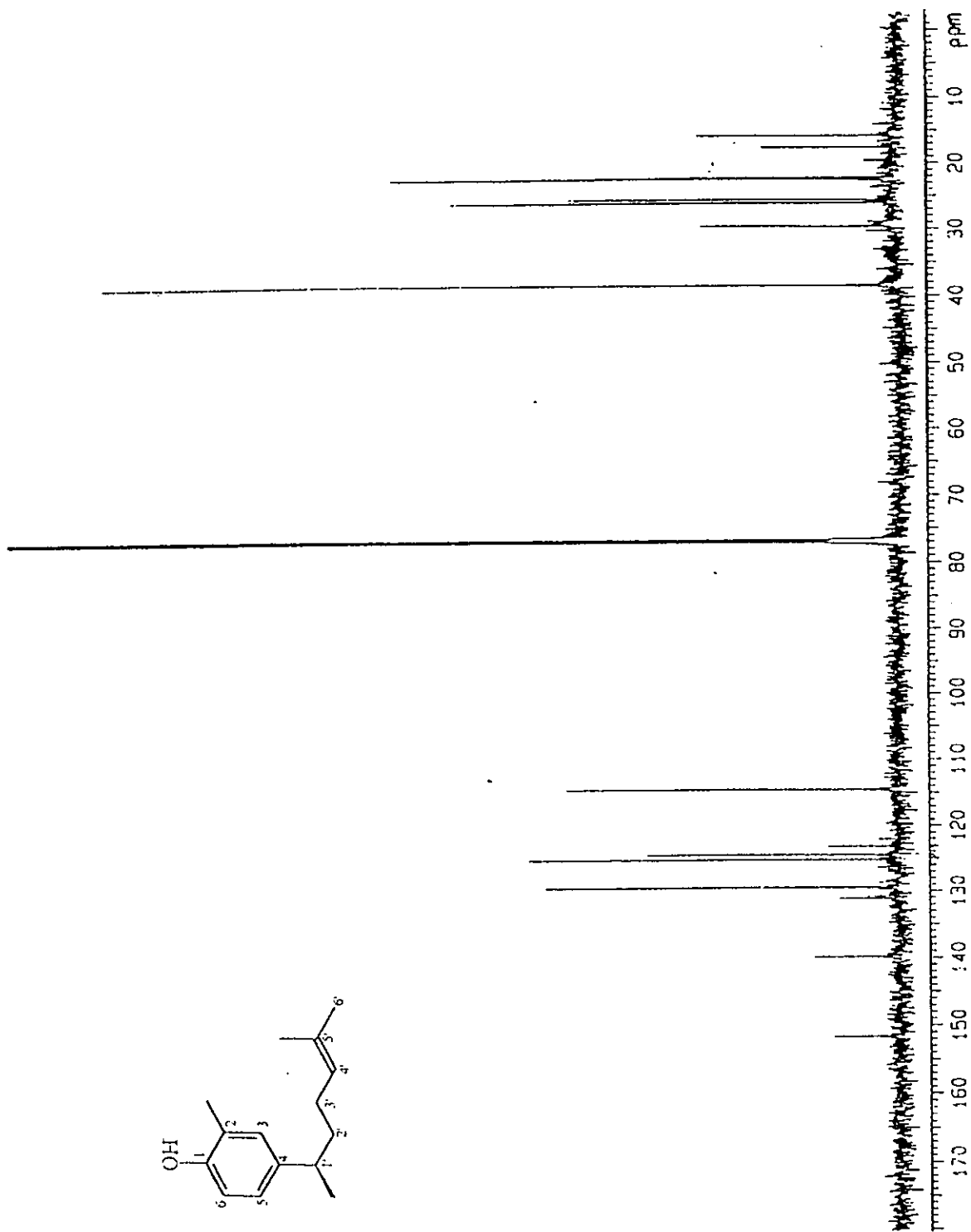
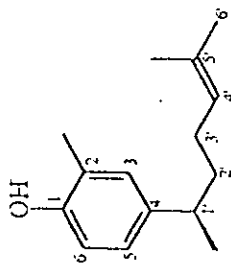
Espectro 4. Espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  de 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22)



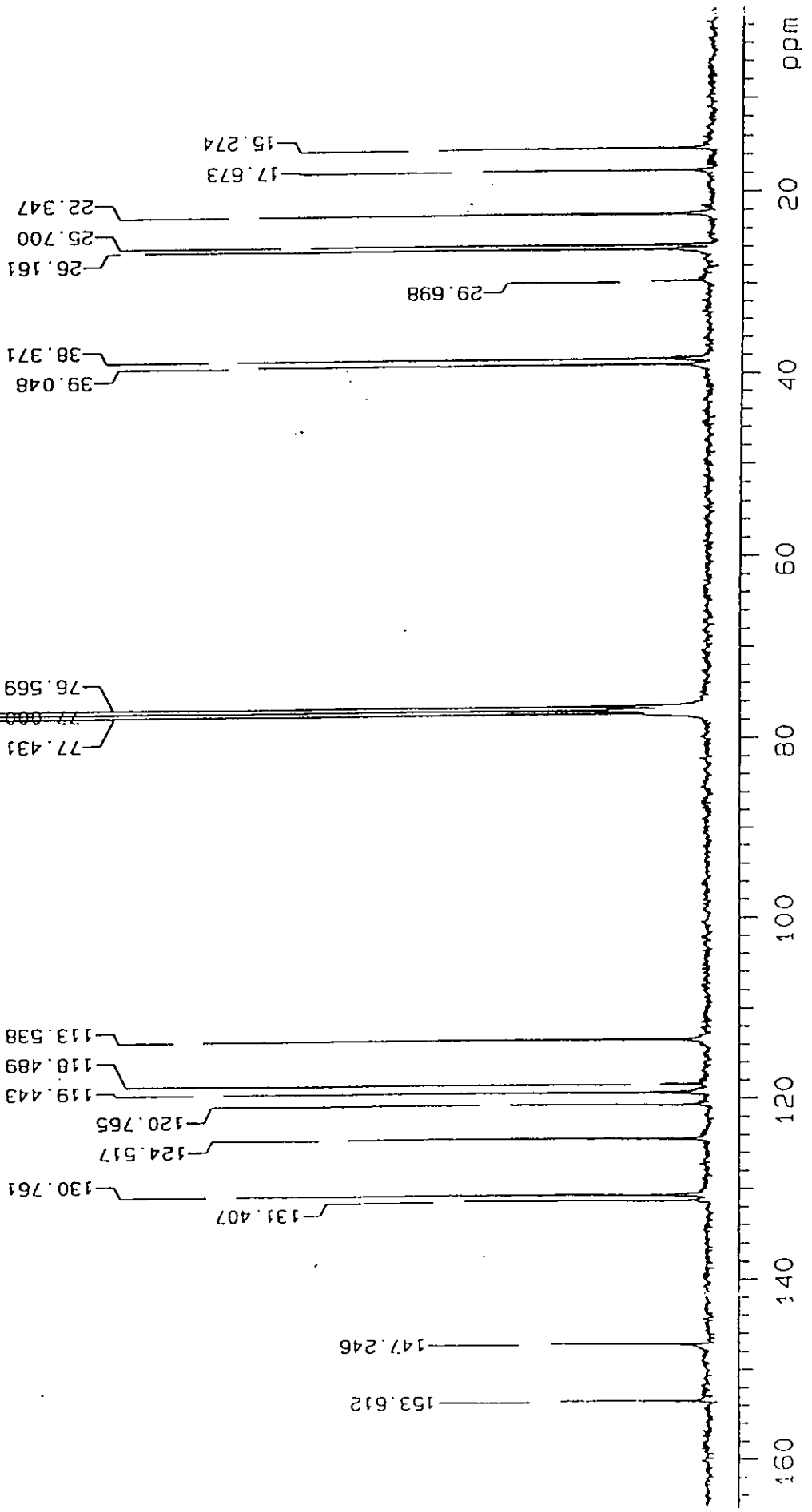
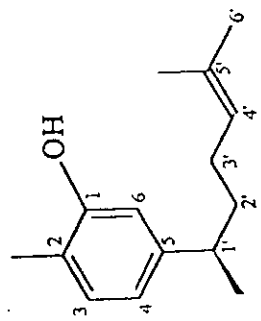
Xantorrizol (16)



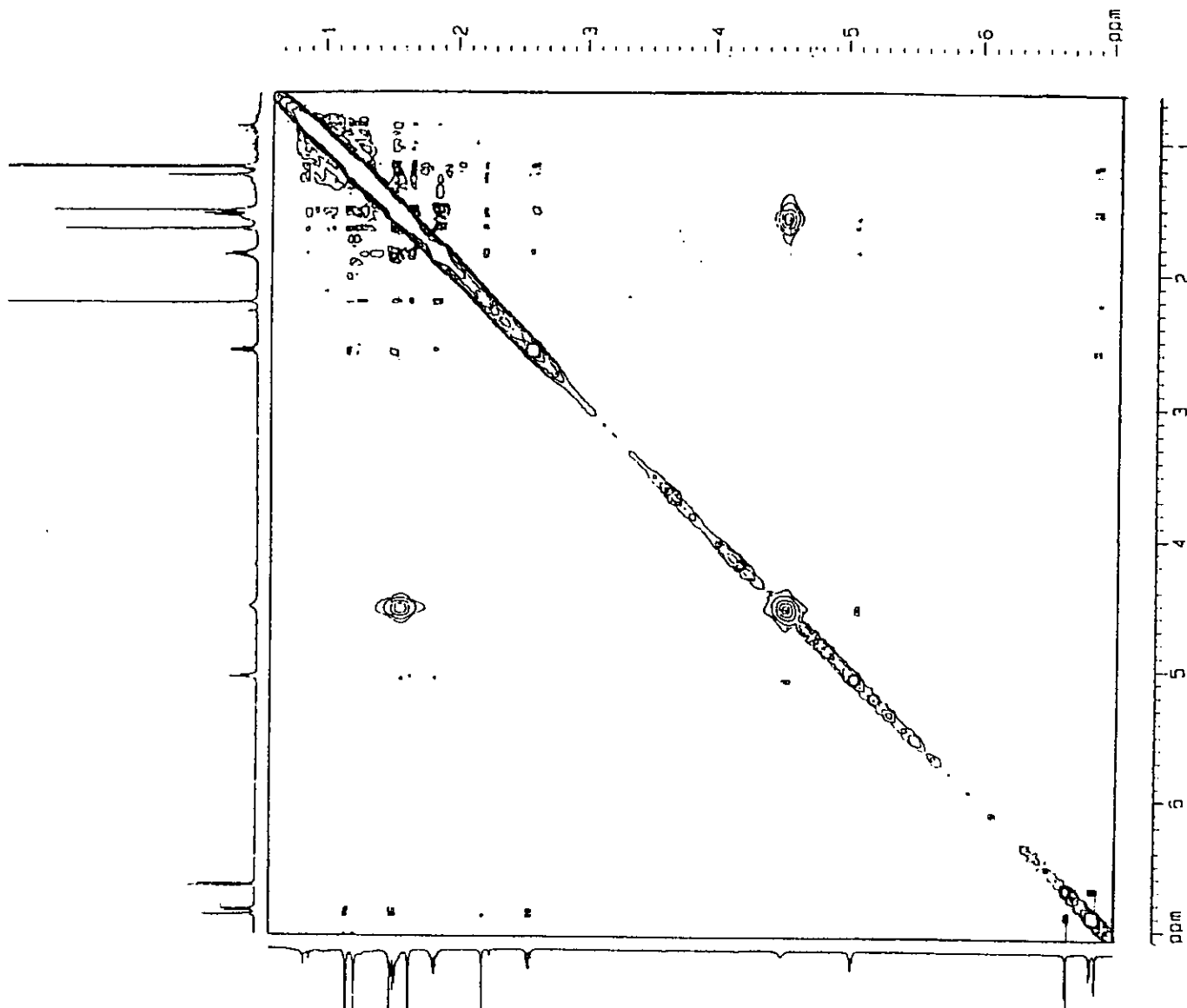
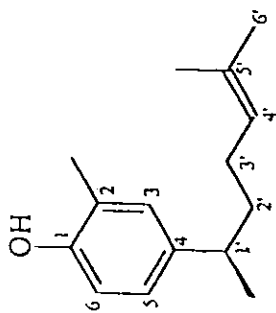
Espectro 5. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del xantorrizol (16)



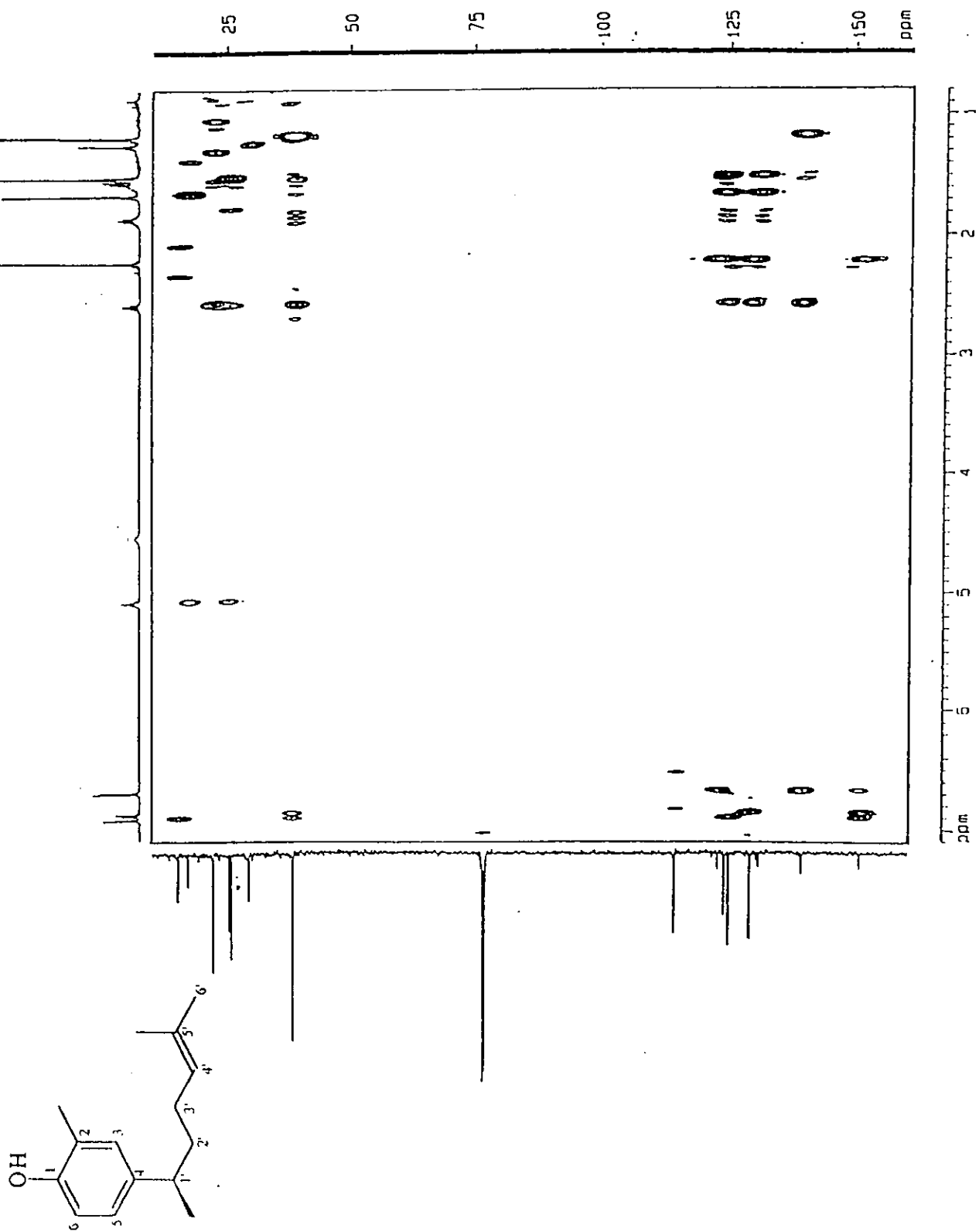
Espectro 6. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22)



Espectro 7. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del xantorrizol (16)

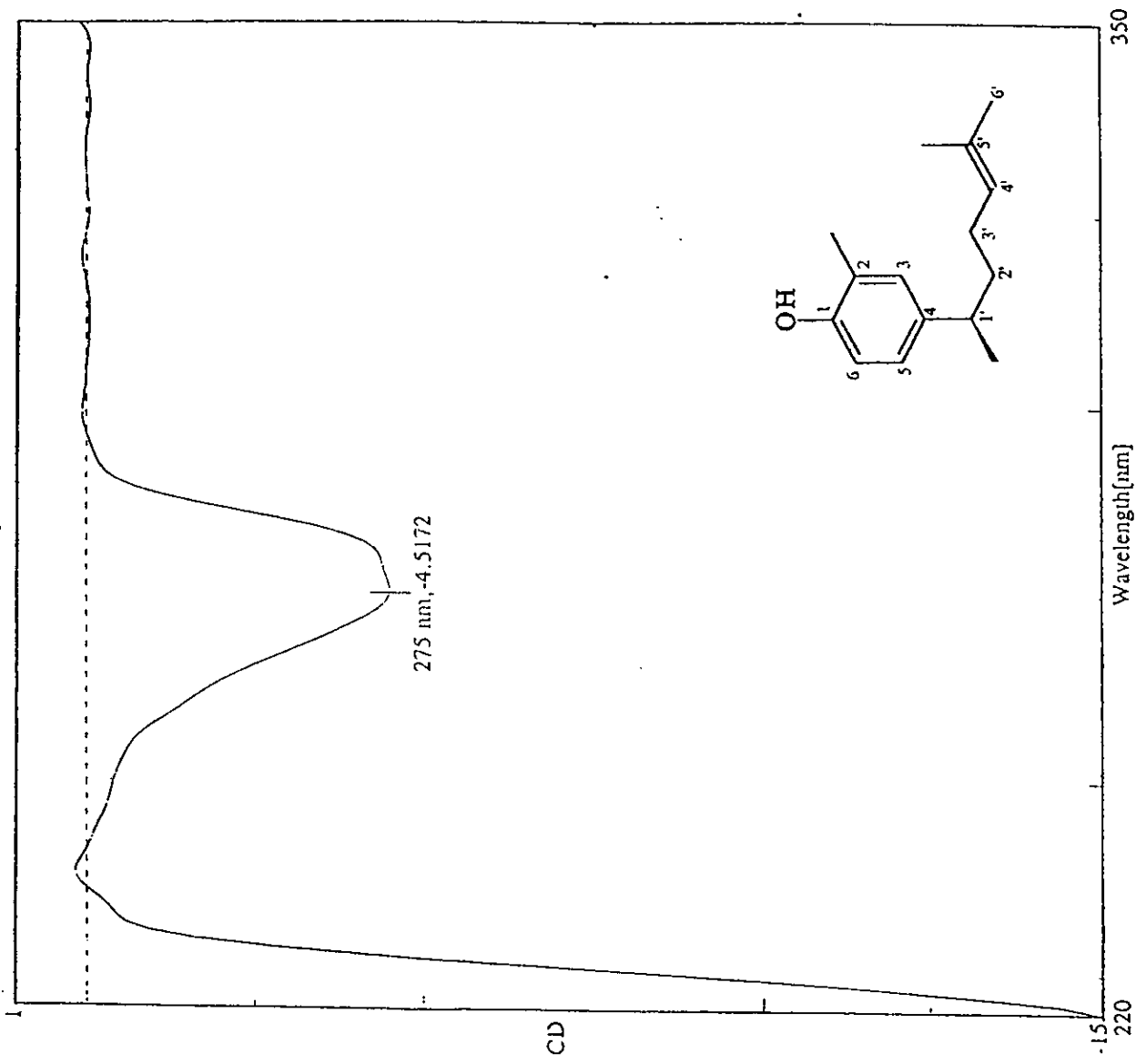


Espectro 8. Espectro de RMN-NOESY de 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22)

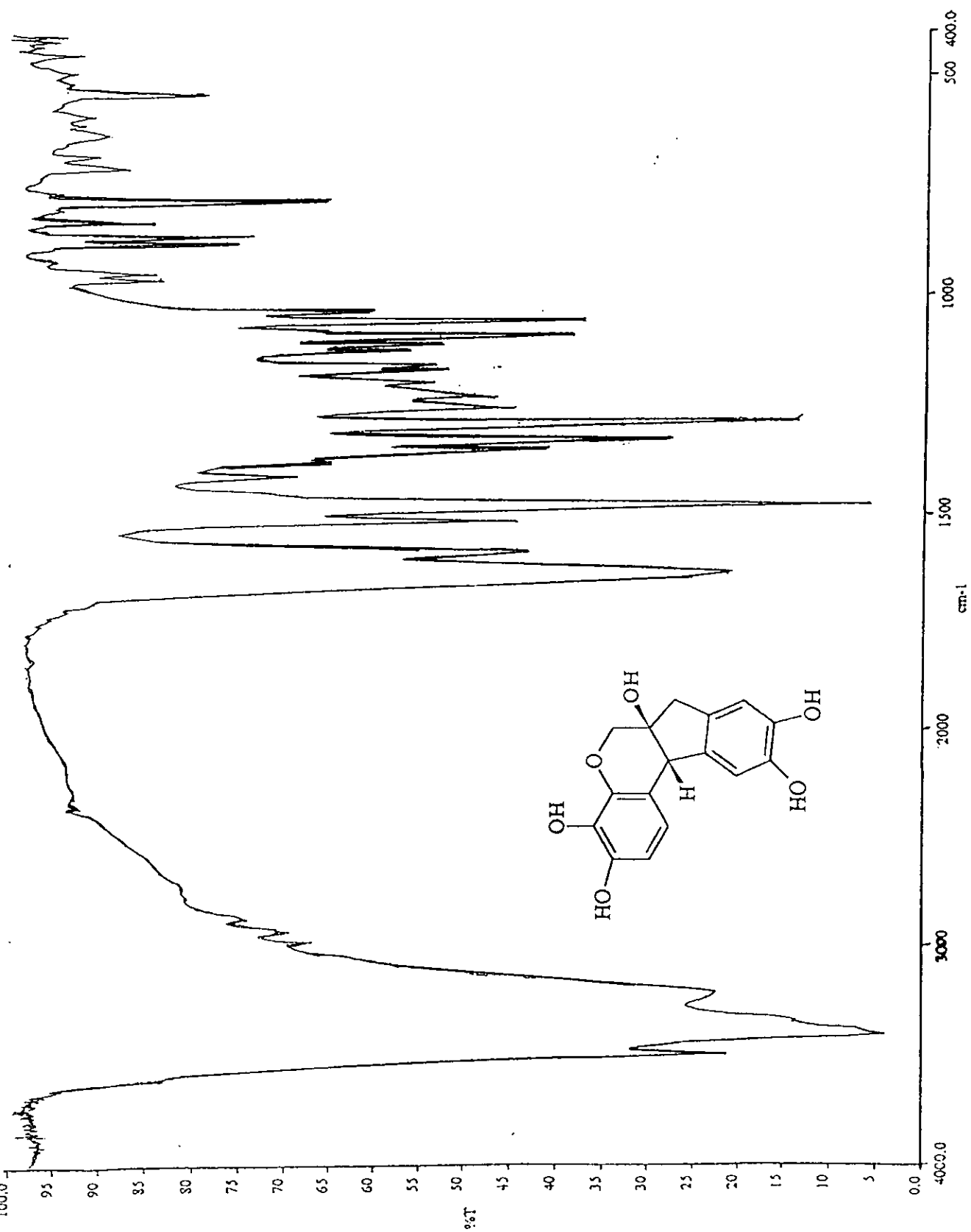


Espectro 9. Espectro de RMN-HMBC de 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22)



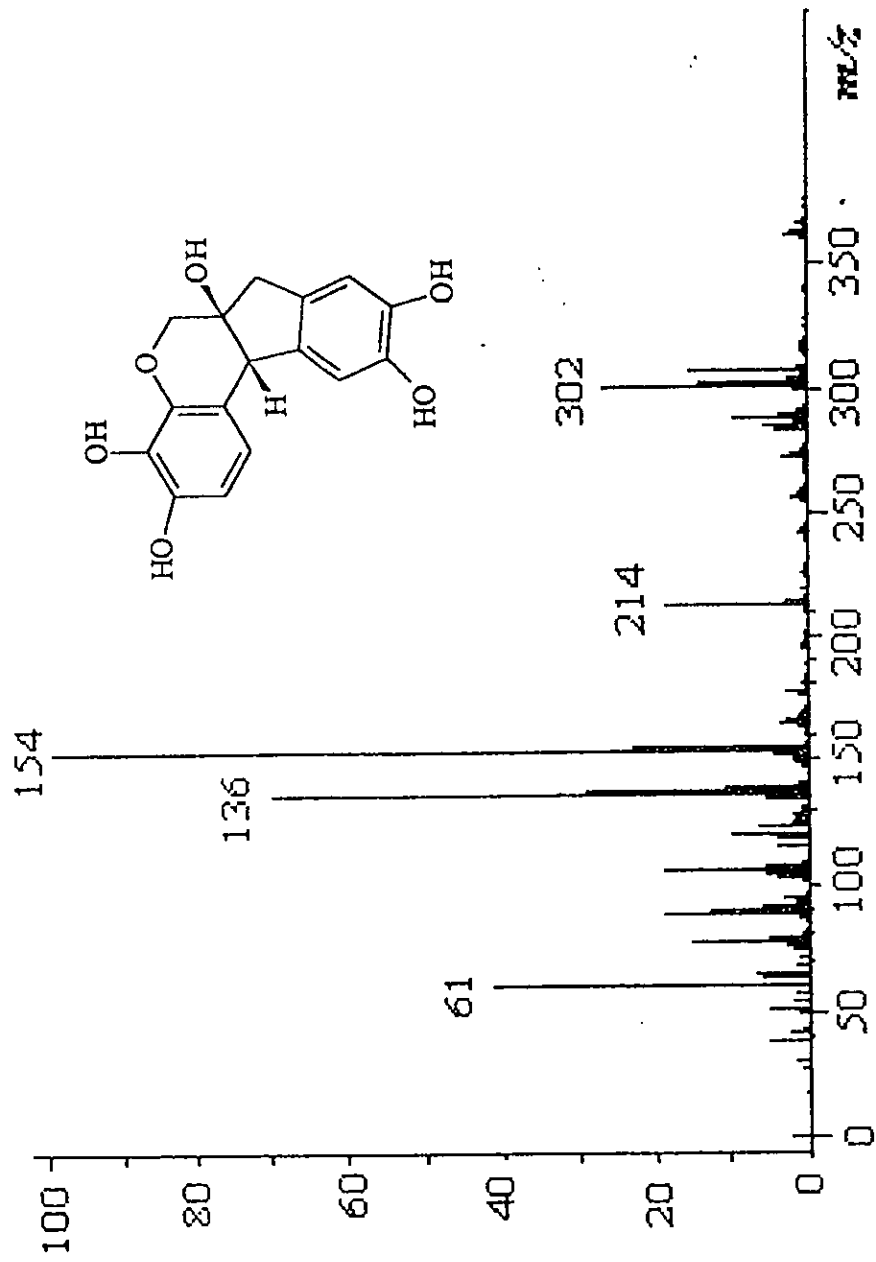


Espectro 10. Espectro de Dicroismo Circular del 4-(1,5-dimetil-4-hexenil)-2-metilfenol (22)

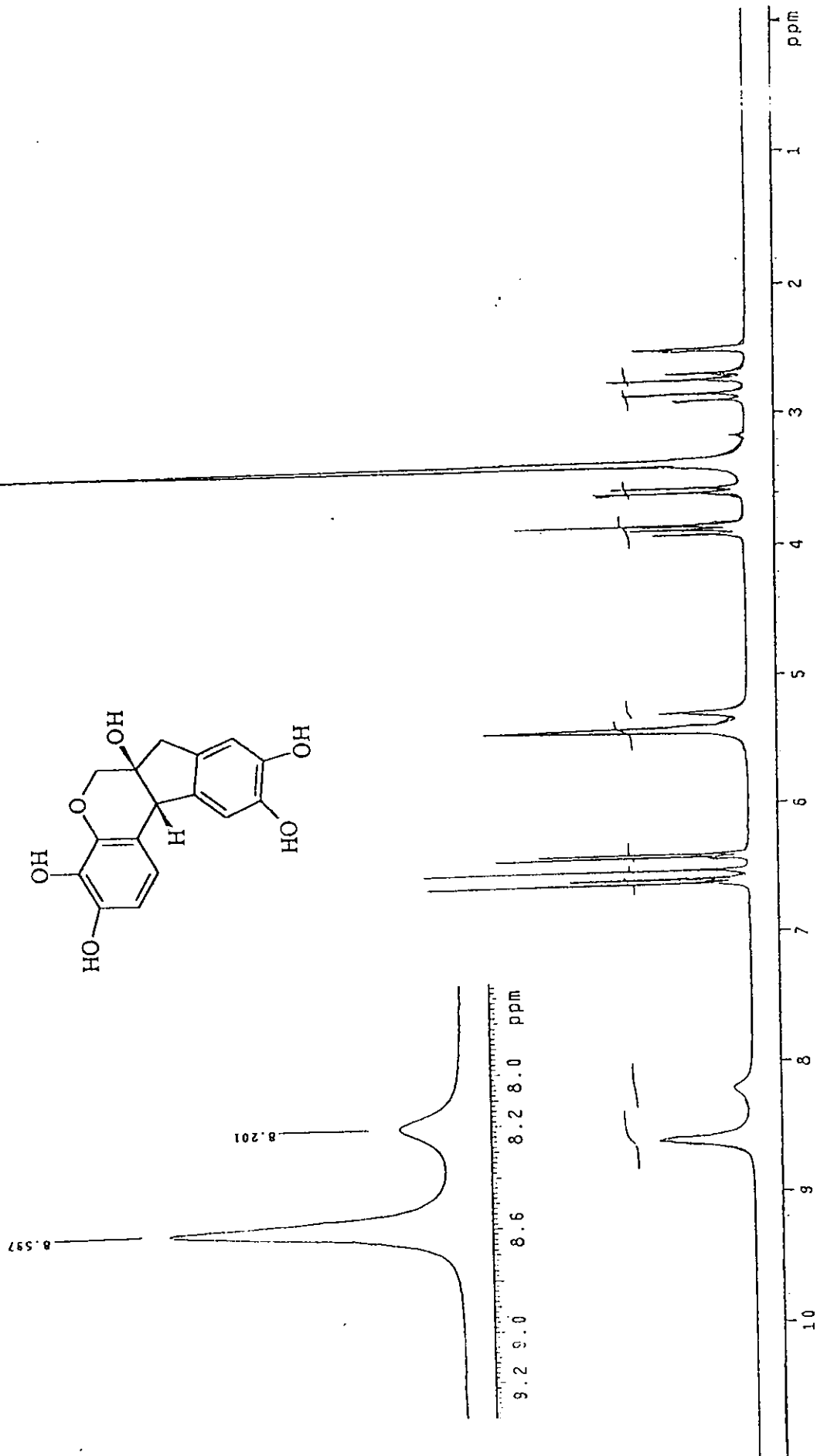


Espectro 11. Espectro en el IR de haematoxilina (20)

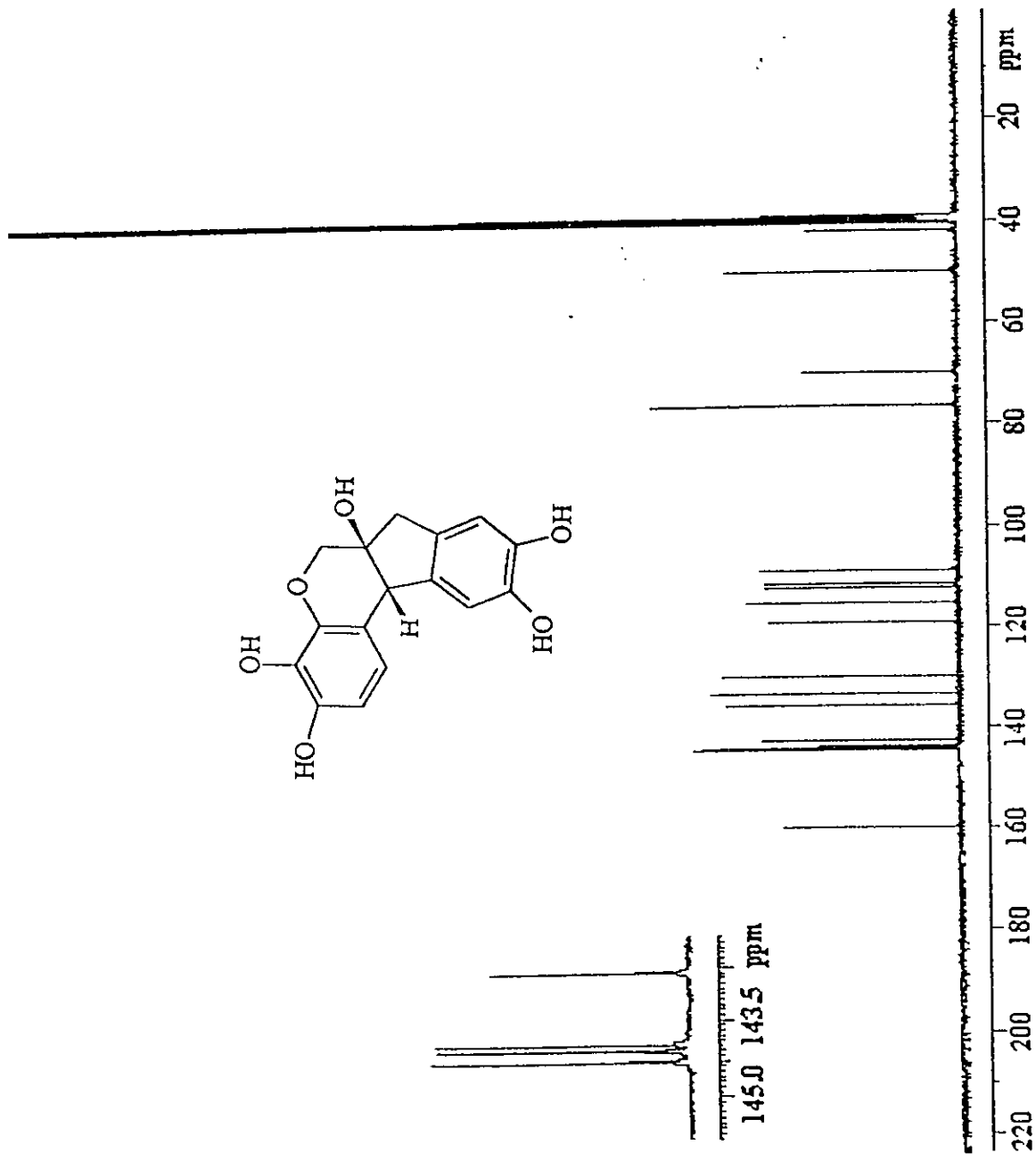
ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



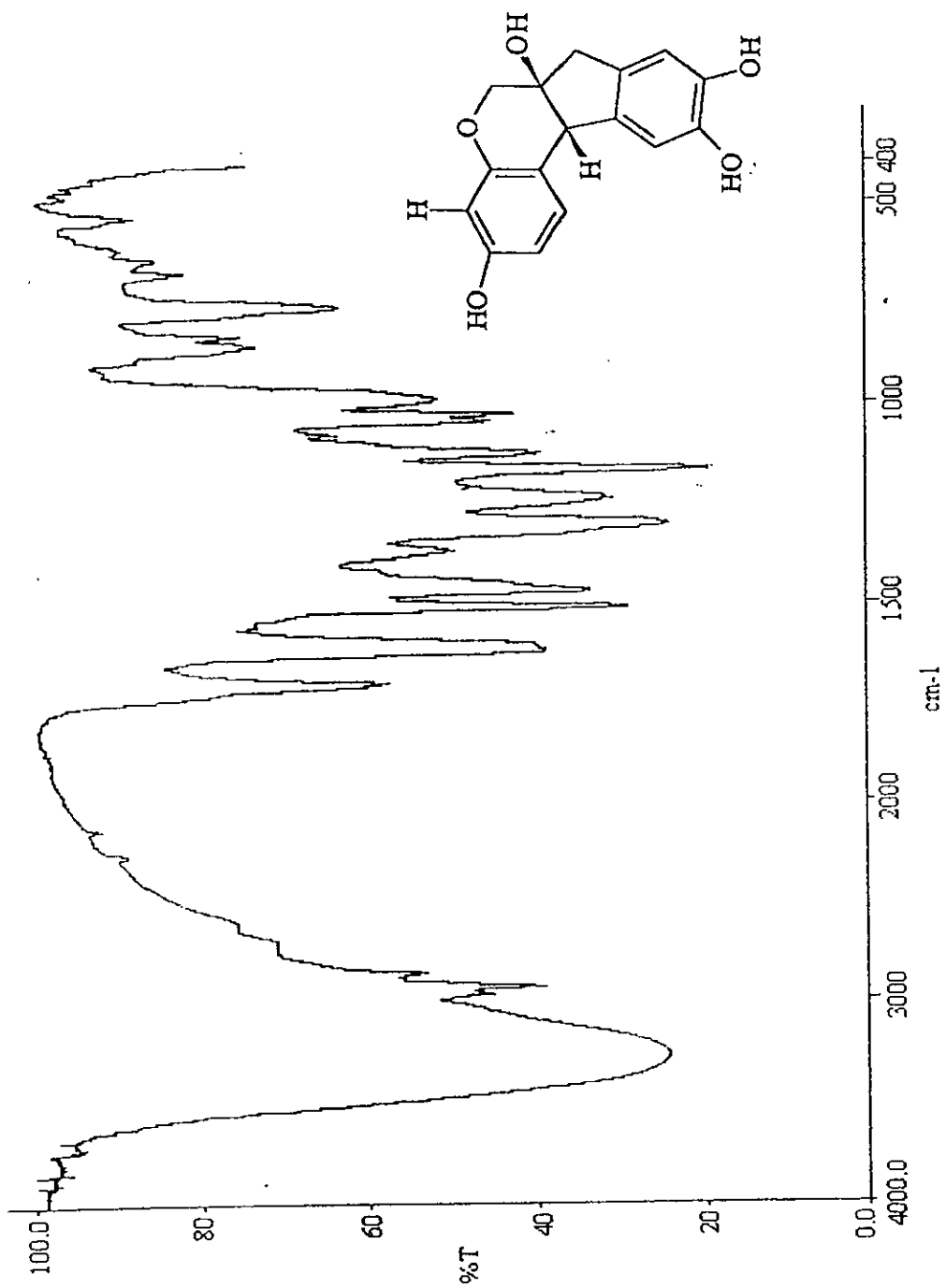
Espectro 12. Espectro de masas modalidad FAB<sup>+</sup> de haematoxilina (20)



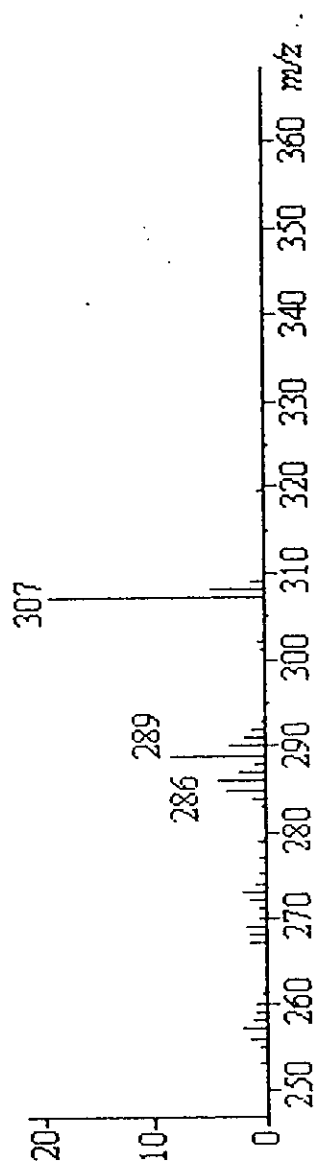
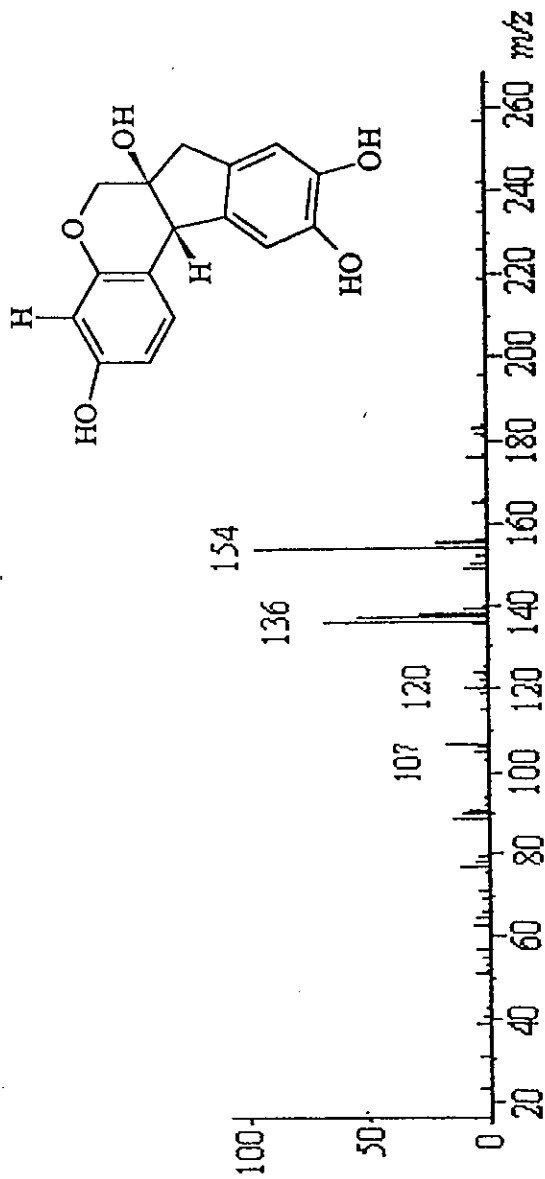
Espectro 13. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de haematoxilina (20)



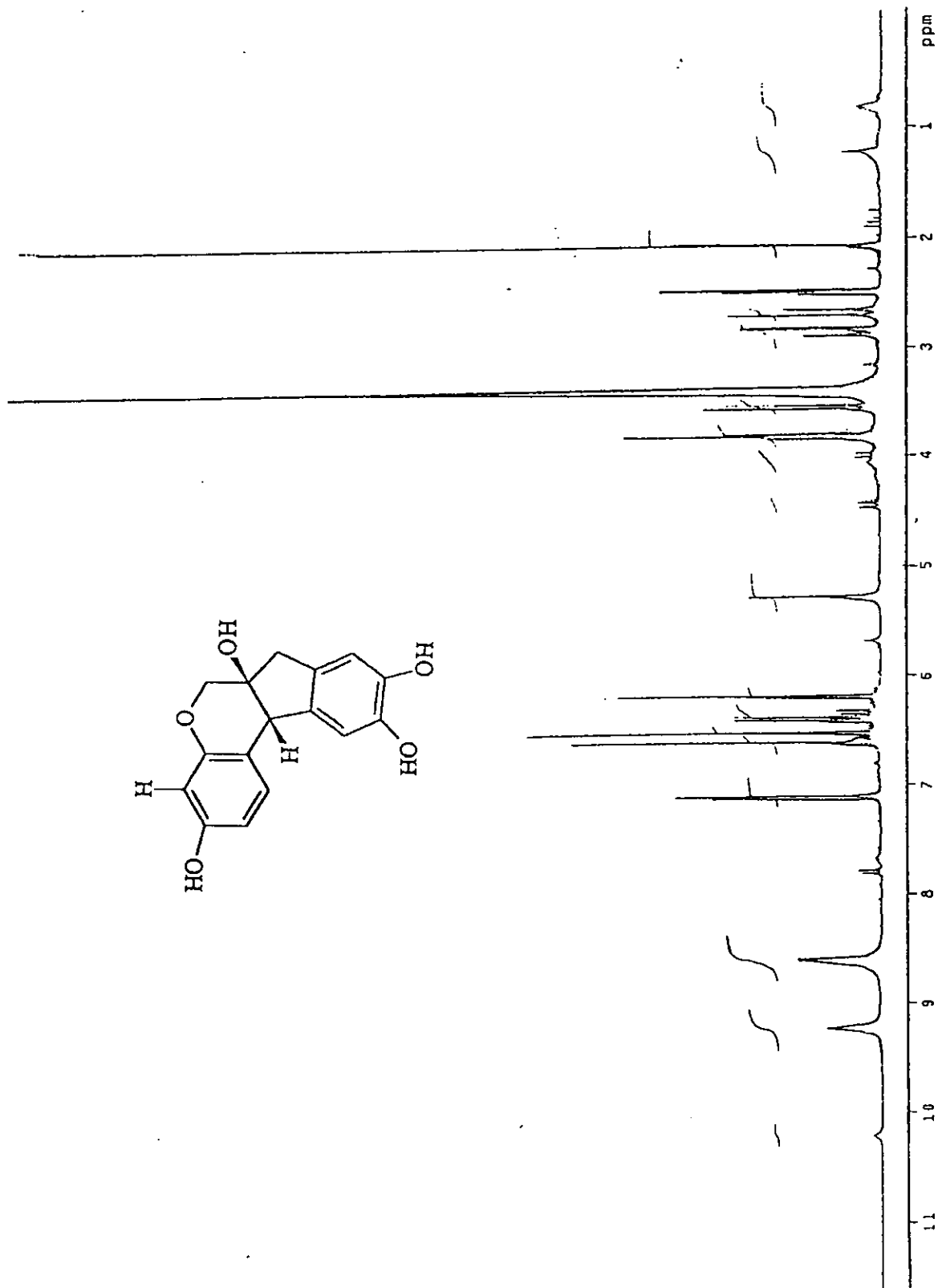
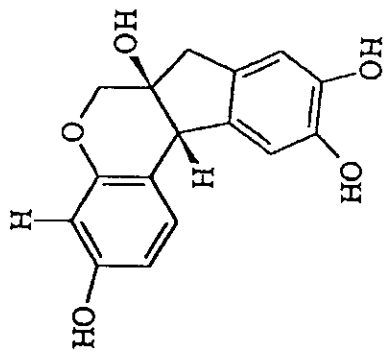
Espectro 14. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de haematoxilina (20)



Espectro 15. Espectro en el IR de brazililina (21)

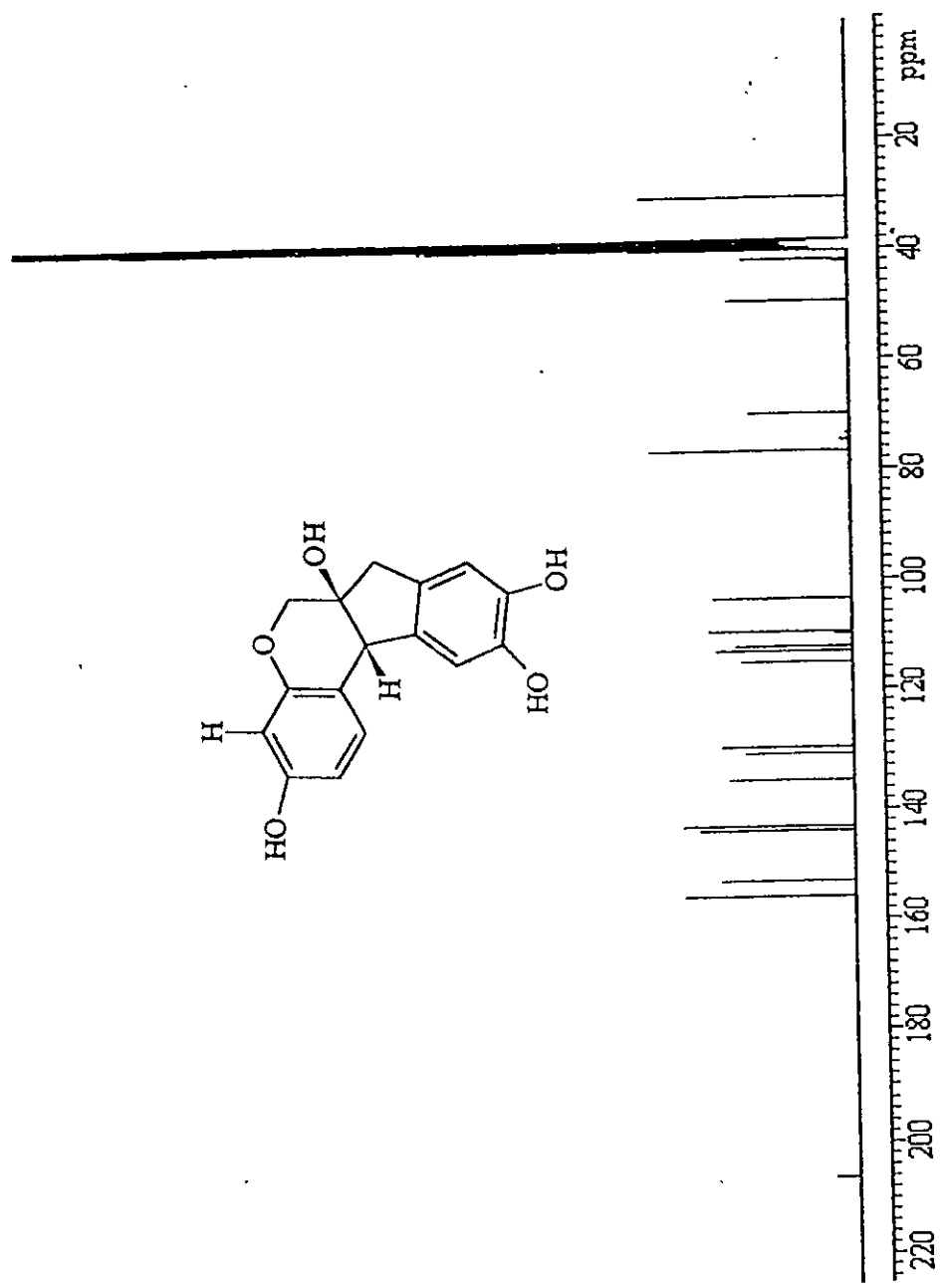


Espectro 16. Espectro de masas modalidad FAB<sup>+</sup> de brazililina (21)

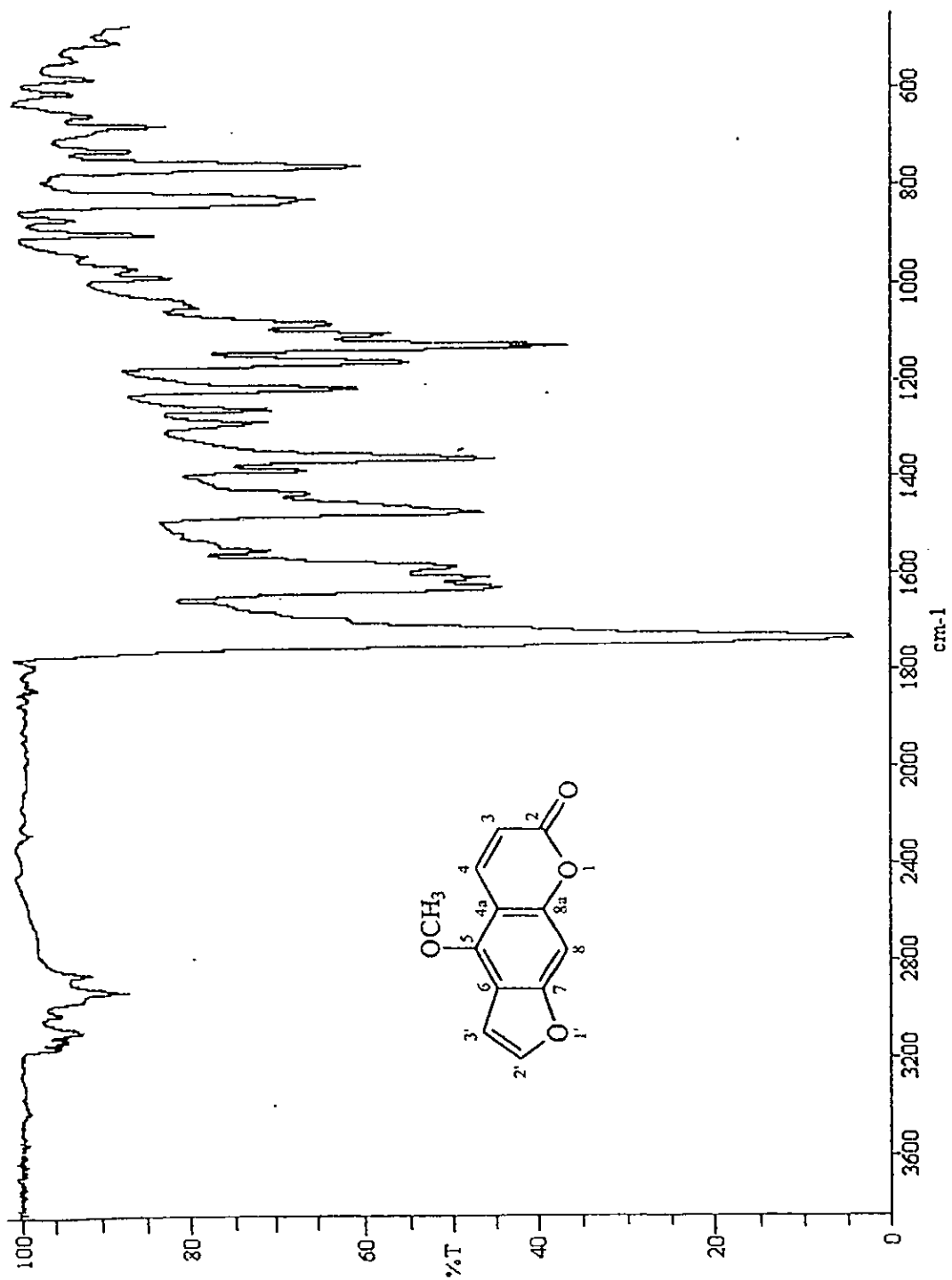


Espectro 17. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de brazilina (21)

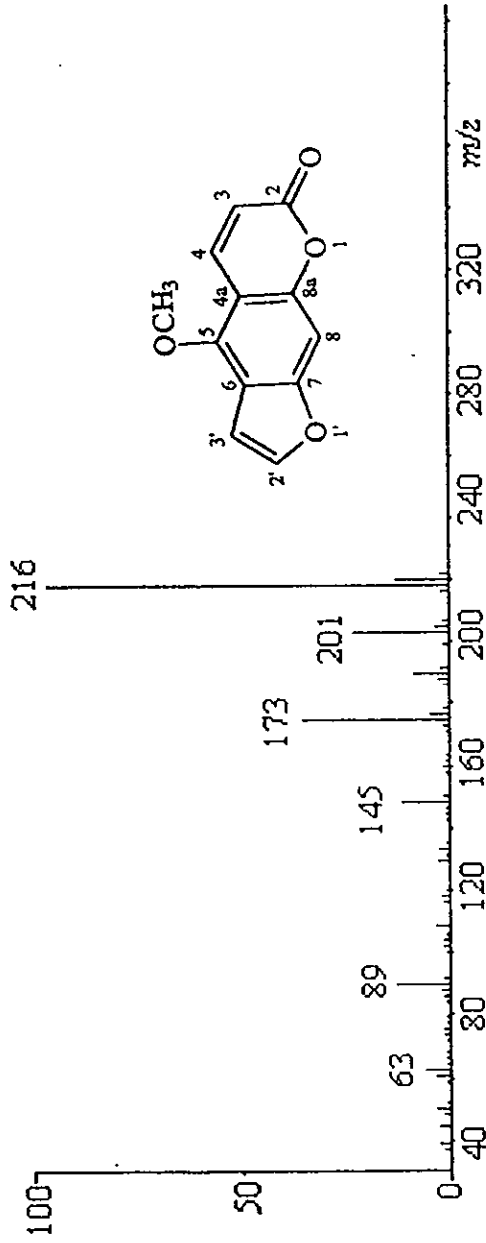




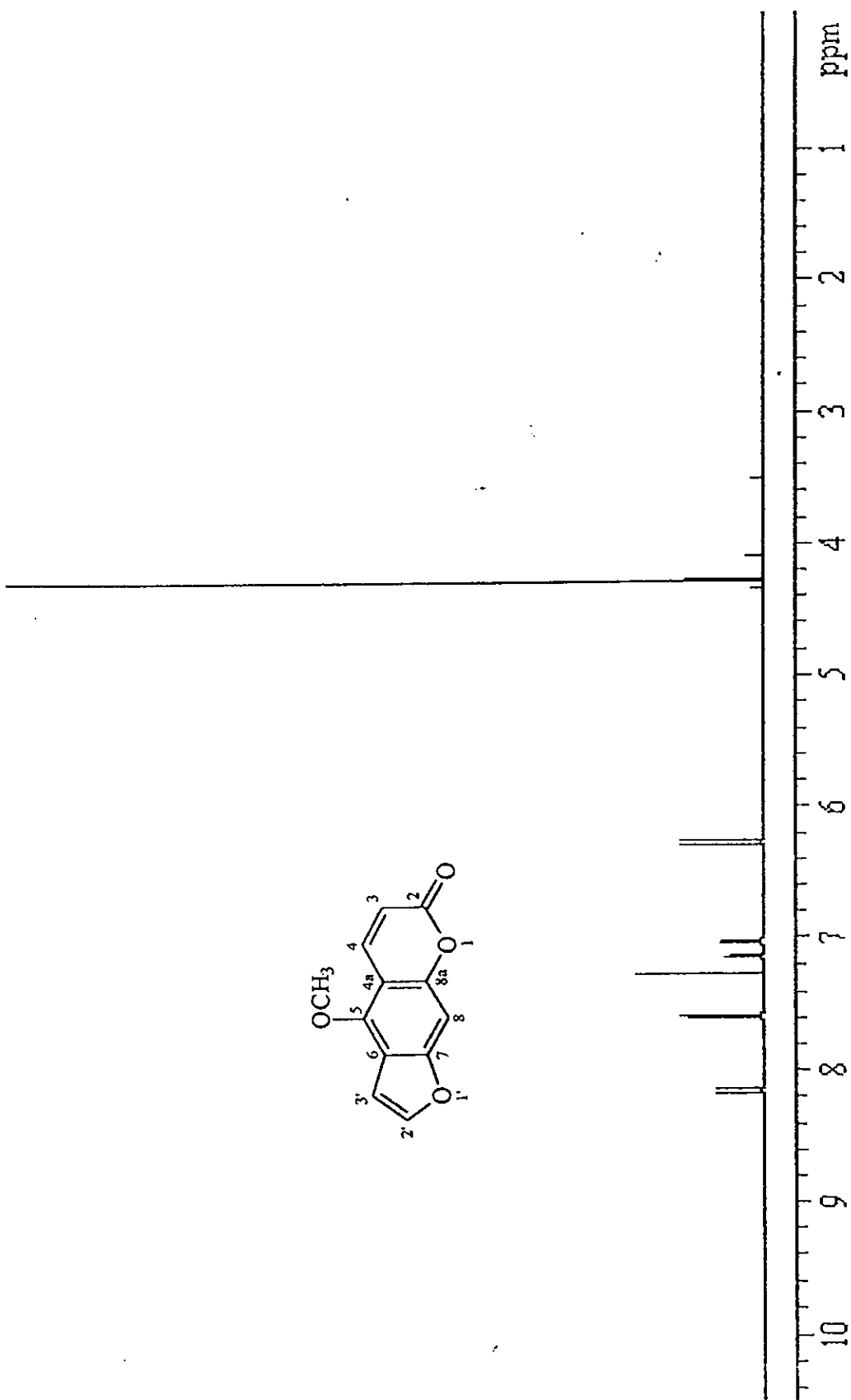
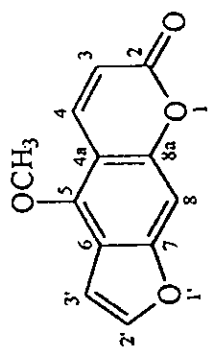
Espectro 18. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de brazililina (21)



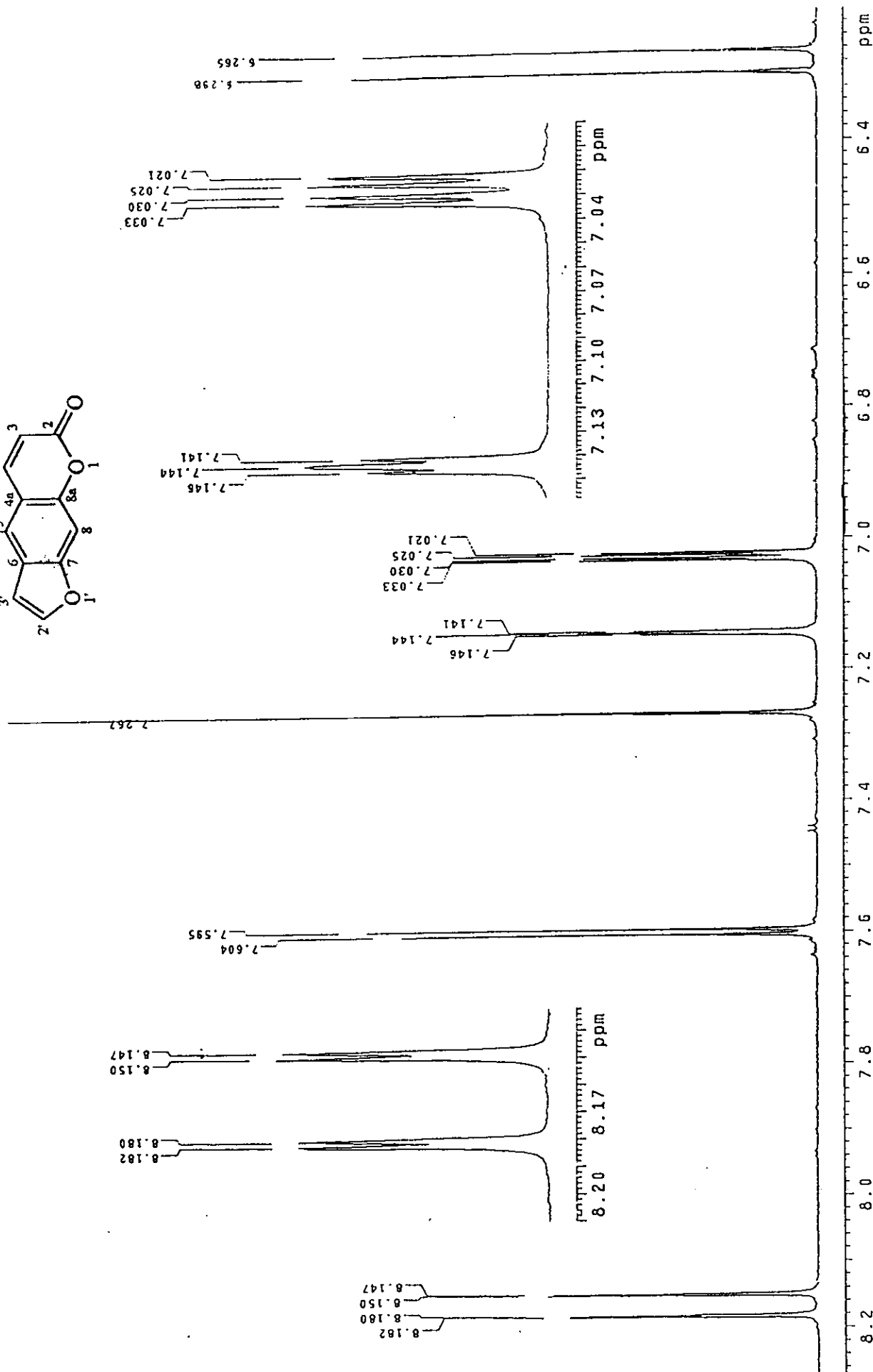
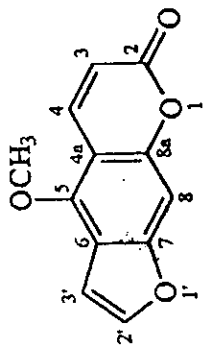
Espectro 19. Espectro en el IR del 5-metoxisoraleno (29)



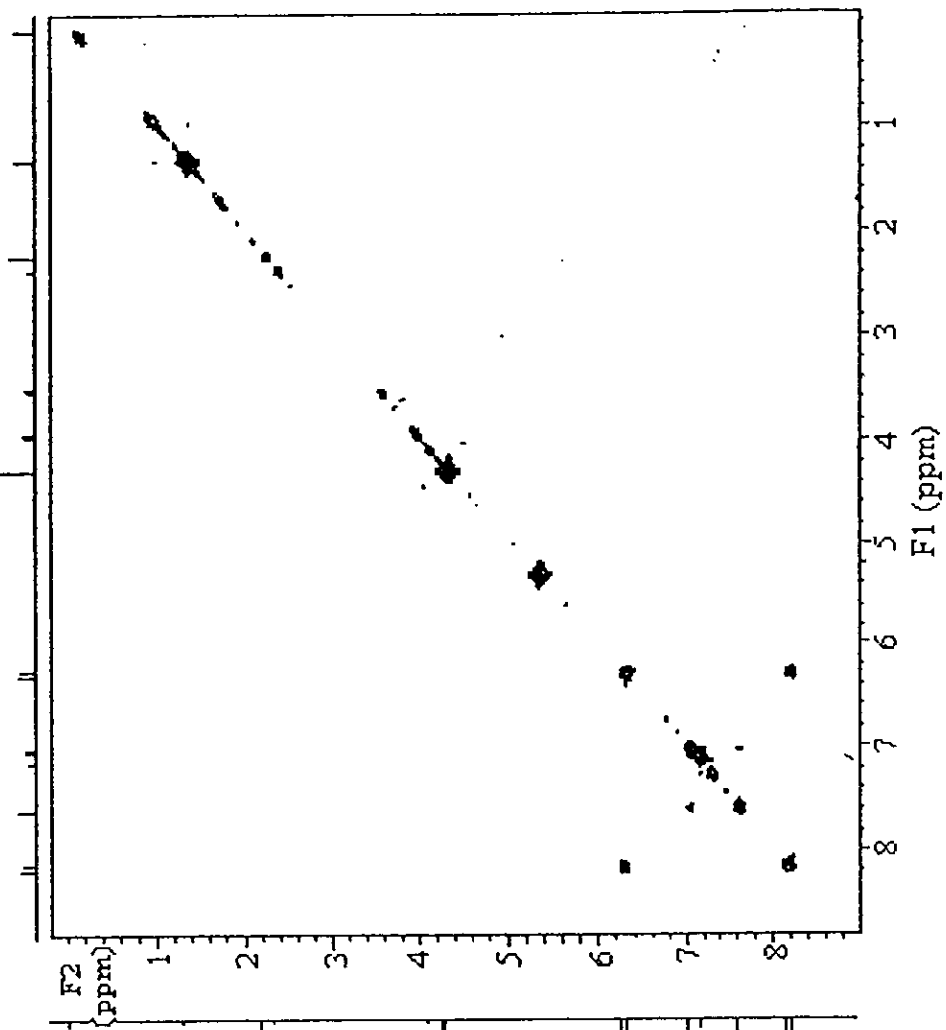
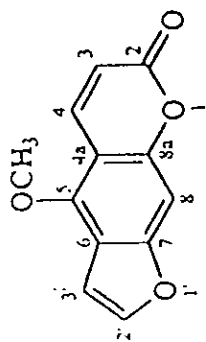
Espectro 20. Espectro de masas por Impacto Electrónico del 5-metoxisoraleno (29)



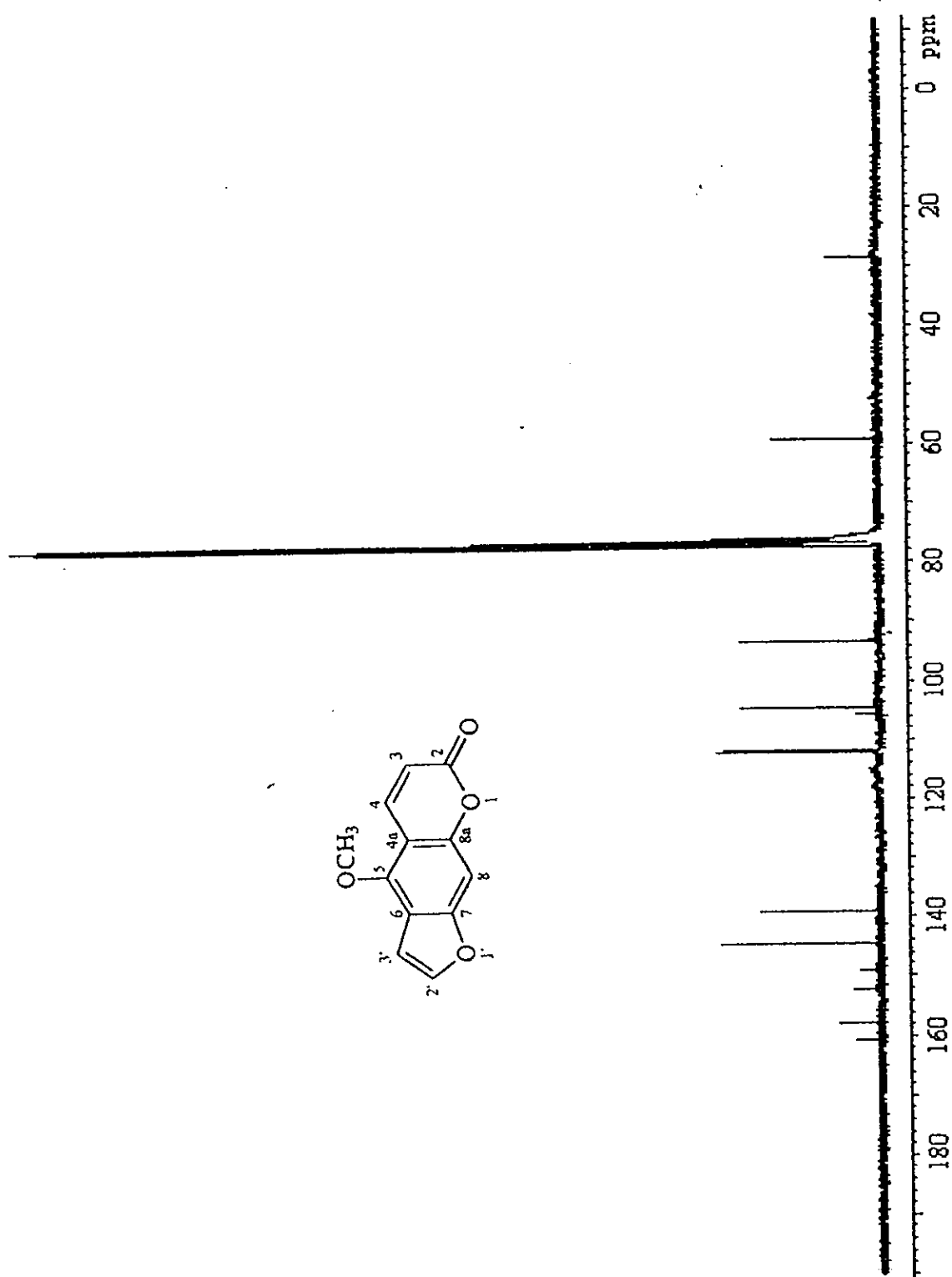
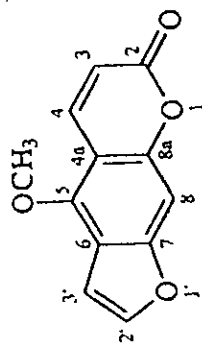
Espectro 21. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del 5-metoxisoraleno (29)



Espectro 27 Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del 5-metoxisraleno (29) (ampliación)

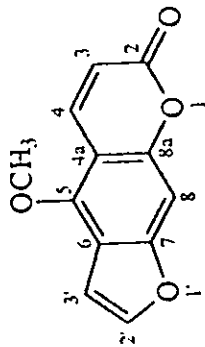
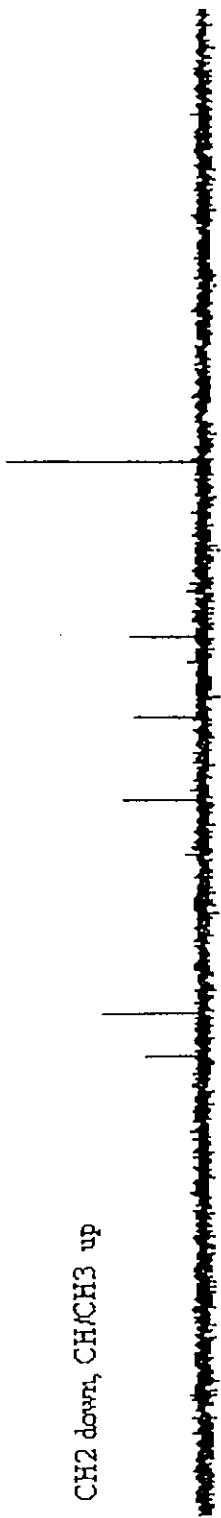


Espectro 23. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H-COSY del 5-metoxisoraleno (29)

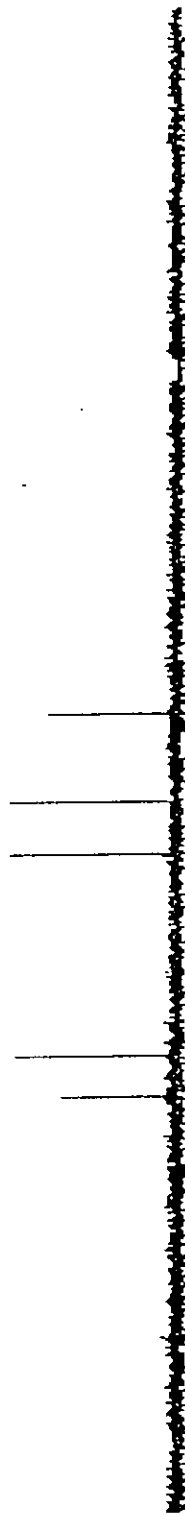


Espectro 24. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del 5-metoxisoraleno (29)

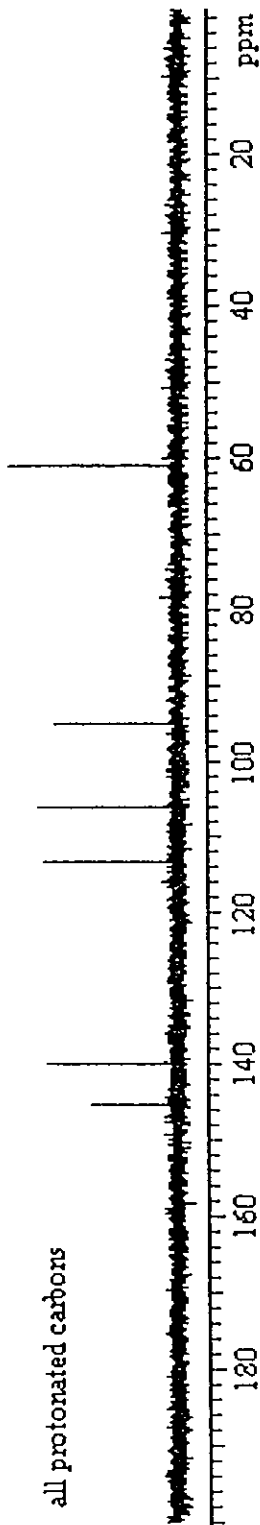
CH2 down, CH/CH3 up



CH carbons

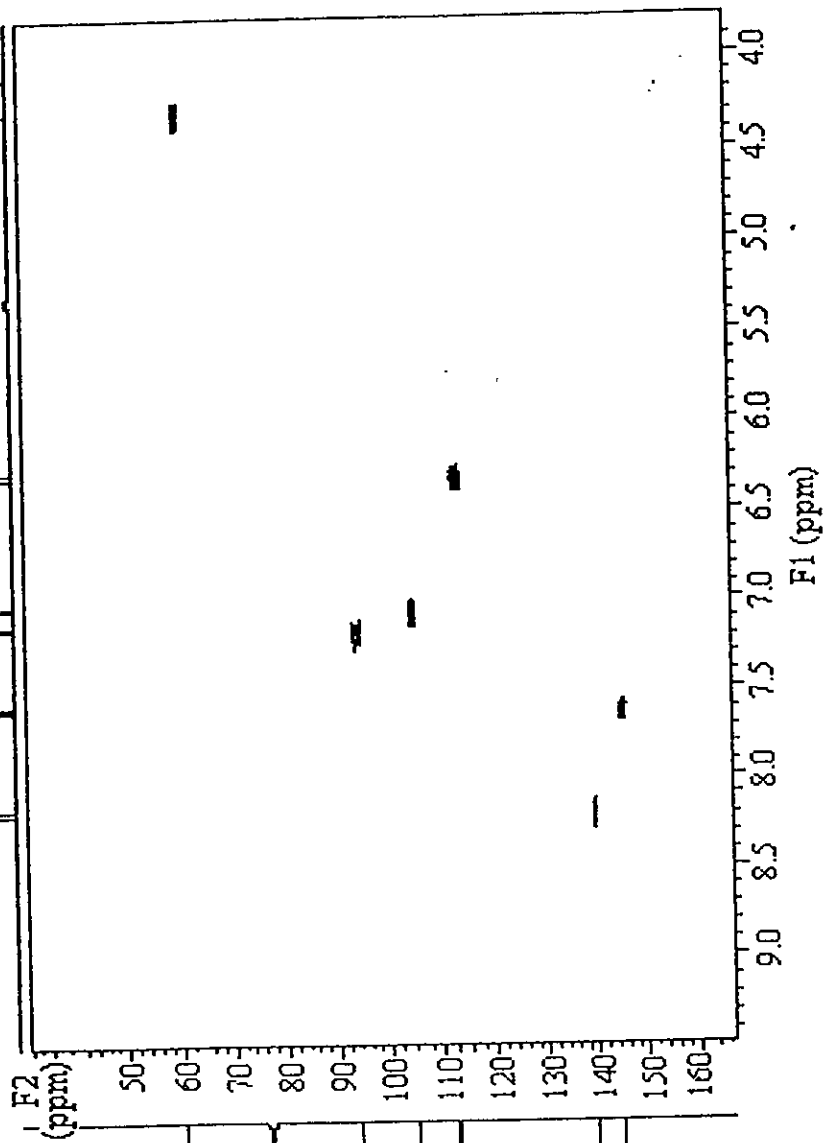
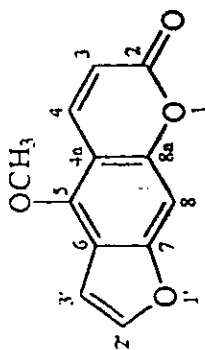


all protonated carbons



Espectro 25. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C-DEPT del 5-metoxisoraleno (29)





Espectro 26. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ -HETCOR del 5-metoxisoraleno (29)

## **ANEXO II**

---

**Biological and Mechanistic Activities of  
Xanthorizol and 4-(1',5'-Dimethylhex-4'-  
enyl)-2-methylphenol Isolated from  
*Iostephane heterophylla***

---

**Rachel Mata, Emma Martínez, Robert Bye, Gustavo Morales,  
Maya P. Singh, Jeffrey E. Janso, William M. Maiese, and  
Barbara Timmermann**

Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad  
Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México, Natural  
Products Research, Wyeth-Ayerst Research, Pearl River, New York  
10965, Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional  
Autónoma de México, México D.F. 04510, México, and College of  
Pharmacy, The University of Arizona, Tucson, Arizona 85721-0207

**JOURNAL OF  
NATURAL  
PRODUCTS®**

Reprinted from  
Volume 64, Number 7, Pages 911-914

## Biological and Mechanistic Activities of Xanthorrhizol and 4-(1',5'-Dimethylhex-4'-enyl)-2-methylphenol Isolated from *Iostephane heterophylla*<sup>1</sup>

Rachel Mata,<sup>\*,†</sup> Emma Martínez,<sup>†</sup> Robert Bye,<sup>‡</sup> Gustavo Morales,<sup>‡</sup> Maya P. Singh,<sup>§</sup> Jeffrey E. Janso,<sup>§</sup> William M. Maiese,<sup>§</sup> and Barbara Timmermann<sup>\*,1</sup>

Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México, Natural Products Research, Wyeth-Ayerst Research, Pearl River, New York 10965, Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México, and College of Pharmacy, The University of Arizona, Tucson, Arizona 85721-0207

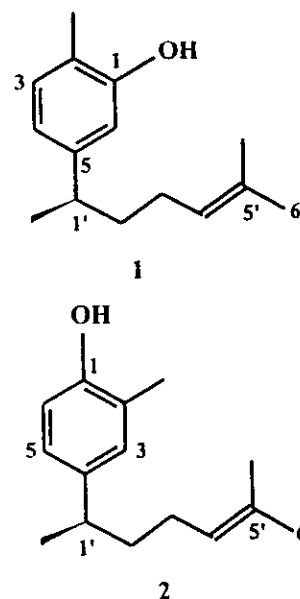
Received February 13, 2001

Xanthorrhizol (1) and 4-(1',5'-dimethylhex-4'-enyl)-2-methylphenol (2) were identified as the principal antimicrobial components of a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) extract derived from *Iostephane heterophylla*. Compound 2 is a new natural product, but has been synthesized. Both compounds exhibited low level activity (MICs of 16–32 µg/mL) against methicillin-resistant staphylococci and vancomycin-resistant enterococci. They were either inactive or poorly active against Gram-negative bacteria and yeast. Mechanistic studies performed in *Escherichia coli imp* suggested nonspecific inhibition of DNA, RNA, and protein synthesis by both of these compounds. Compound 1 was tested in an in vivo model; it did not provide protection to mice infected with *Staphylococcus aureus*.

*Iostephane* Benth. (Asteraceae) is a genus of four species native to Mexico. While three species are restricted to Chiapas, Oaxaca, and Chihuahua, *Iostephane heterophylla* (Cav.) Hemsl. has the widest distribution (from Chihuahua in the north to Oaxaca in the south) and the greatest morphological variation. This yellow-flowered perennial herb, known as "raíz de indio", "hierba de manso", and "escorcionera", is widely used as a medicinal agent throughout México and is available in the markets. The root, when processed as a fresh cataplasm, a decoction, or a roasted powder, is commonly employed in treating skin abrasions, wounds, sores and inflammations. This decoction as well as an alcoholic tincture can be topically applied to reduce arthritis, rheumatism, back pain, and general body pain. In addition, the weak decoction is drunk to alleviate diabetes and gastrointestinal ailments such as dysentery. A stronger potion is an effective purgative. Minor reports include its use in treating liver ailments and sterility in women.<sup>2,3</sup> Previous chemical investigation of *I. heterophylla* led to the isolation and identification of a number of bioactive bisabolene-type sesquiterpenoids, including xanthorrhizol (1), a few diterpenoids, scopoletin, and 8-hydroxy-6-acetyl-2,2-dimethylchromene.<sup>4–6</sup> It was also demonstrated that xanthorrhizol (1) possessed antifungal activity against *Candida albicans* (MIC = 68.75 µg/mL), toxicity to *Artemia salina* (LC<sub>50</sub> = 4.3 µg/mL), cytotoxicity against human nasopharyngeal carcinoma cell line (KB, EC<sub>50</sub> = 4.90 µg/mL),<sup>5</sup> inhibitory activity of rat uterus contractions induced by KCl, CaCl<sub>2</sub>, and BAY K 8644,<sup>7</sup> and induced endothelium-independent relaxation of rat thoracic aorta.<sup>8</sup>

During the course of our research program to discover bioactive agents from dryland plants of Latin America, a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) extract from the roots of *I. heterophylla* was selected for bioassay-guided fractionation on the

basis of its important antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium*. In the present investigation we describe the identification of a new naturally occurring bisabolene, namely, 4-(1',5'-dimethylhex-4'-enyl)-2-methylphenol (2), as well as the mechanism of antibacterial activity of xanthorrhizol (1) and 2.



### Results and Discussion

At concentrations of 0.2 or 1 µg/mL, a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) root extract of *I. heterophylla* exhibited antimicrobial activity against *S. aureus* and *E. faecium* when tested in the agar diffusion method. The active extract was fractionated on a silica gel column to yield 11 primary fractions (F001–F011). Fractions F002–F005 concentrated the antimicrobial activity. Extensive chromatography of the active fractions led to the isolation of xanthorrhizol (1),<sup>4,9,10</sup> 16- $\alpha$ -hydroxy-*ent*-kaurane,<sup>4</sup> trachyloban-19-oic acid,<sup>4</sup> 16- $\alpha$ -hydroxy-*ent*-kaur-11-ene,<sup>4</sup> *ent*-kauren-16-en-19-oic acid,<sup>4</sup> *ent*-

\* To whom correspondence should be addressed. Tel: (525) 622-5289 or (520) 626-248. Fax: (525) 622-5329 or (520) 626-4063. E-mail: rachel@servidor.unam.mx or btimmer@pharmacy.arizona.edu.

<sup>†</sup> Departamento de Farmacia, Facultad de Química.

<sup>‡</sup> Jardín Botánico, Instituto de Biología.

<sup>§</sup> Wyeth-Ayerst Research Laboratories.

<sup>1</sup> The University of Arizona.

Table 1. NMR Data for Compound 2

position	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m, $J$ in Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	HMBC (H - C)	NOESY
1		151.7	3, 5, 2-Me	
2		122.1	6, 4	
3	6.92 (d, 2)	129.6	2-Me	2-Me, 1', 2', 1'-Me
4		139.9	6, 1'	
5	6.88 (dd, 8, 2.5)	125.3	3, Me-1'	6, 1', 2', 1'-Me
6	6.69 (d, 8)	114.7		1-OH, 5
1'	2.59 (qt 7, 7)	38.6	4, 6, 3', Me-1'	3, 5, 2', 1'-Me
2'	1.56 (m)	38.6	4', Me-1'	3, 5, 3', 1'-Me
3'	1.86 (p, 7.5)	26.1	1'	1', 2-Me, 5'-Me, 6'-Me
4'	5.08 (tqq 7.25, 1.5, 1.5)	124.6	Me-5', 6', 2'	3', 2', 6'-Me
5'		131.3	3'	
6'	1.55 (d, 0.5)	17.60	Me-5', 4'	5'-Me, 4'
2-Me	2.23 (bs)	15.8	3	3, 3', 2', Me-5'
1'-Me	1.19 (d, 7)	22.5	4, 6, 3'	1', 3, 5
5'-Me	1.67 (d, 1)	25.7	6', 4'	6', 4', Me-2
OH-1	4.5 (bs)			6

<sup>a</sup> 500 MHz in  $\text{CDCl}_3$ . <sup>b</sup> 125 MHz in  $\text{CDCl}_3$ .

beyer-15-en-19-oic acid,<sup>4</sup> and 4-(1',5'-dimethylhex-4'-enyl)-2-methylphenol (2). Compound 2 is a new naturally occurring bisabolene, previously synthesized as a racemic mixture to confirm the structure of 2-(1',5'-dimethylhex-4'-enyl)-4-methylphenol, a phenolic sesquiterpene isolated from *Elvira biflora* DC. (Asteraceae).<sup>11</sup> In this report only partial <sup>1</sup>H NMR information on the racemate synthesized was reported. The remaining compounds were previously isolated from this species.<sup>4</sup>

Compound 2 was obtained as a viscous optically active oil which showed phenolic absorptions in its IR and UV spectra. HREIMS established its molecular formula as  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$ . The one-dimensional NMR spectra (Table 1) were clearly analogous to those of xanthorrhizol, showing also an isopropylidene group, a secondary benzylic methyl, an aromatic methyl, and three aromatic protons, which appeared as an ABX system in the <sup>1</sup>H NMR. The most obvious difference between the <sup>1</sup>H NMR spectra of both compounds resulted in the chemical shift of the aromatic protons comprising the ABX system [6.92 (1H, d,  $J = 2$  Hz, H-3), 6.88 (1H, dd,  $J = 8, 2.5$  Hz, H-5), 6.69 (1H, d,  $J = 8$  Hz, H-6) in 2; 7.01 (1H, d,  $J = 8$  Hz, H-3), 6.67 (1H, dd,  $J = 8, 1.5$  Hz, H-4), 6.60 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6) in 1], suggesting that the positions of the phenolic and methyl groups in 2 were the reverse of that in 1. Detailed analysis of the NOESY and HMBC spectra confirmed this assumption. Thus, the HMBC correlations C-1/Me-2, H-3, H-5, C-3/Me-2, H-1', H-5, and C-2/H-6 as well as the NOESY correlations H-3/Me-2, H-1'/H-3, H-5 were consistent with the placement of the phenolic and the aromatic methyl groups at C-1 and C-2, respectively. The optical rotation of compound 2 was negative, revealing that the absolute configuration at C-1' was identical to that of 1 and (-)-curcuphenol.<sup>4,9,10,12</sup> Furthermore the CD spectra of 1 and 2 were identical, possessing a strong negative Cotton effect at 205 nm and a weak negative Cotton effect at 277 nm.

Compound 2 is the second natural rearranged bisabolene reported in the literature, the first one being 2-(1',5'-dimethylhex-4'-enyl)-4-methylphenol isolated from *Elvira biflora* DC. (Asteraceae).<sup>11</sup>

Xanthorrhizol (1) and compound 2 were found to be equipotent against a panel of Gram-positive and Gram-negative bacteria and *C. albicans* (Table 2). The MIC values of both compounds were 16–32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  against a panel of Gram-positive bacteria, including methicillin-resistant *S. aureus* and vancomycin-resistant *E. faecium*. However, 1 and 2 were essentially inactive against *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *C. albicans*, with MIC values equal to or greater than 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Table 2. Antimicrobial Activity<sup>a</sup> of Xanthorrhizol (1) and Compound 2

organism	MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		
	xanthorrhizol (1)	compound 2	penicillin G <sup>b</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> 375	16	16	0.06
<i>S. aureus</i> 310 (MR)	32	32	64
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	16	16	0.06
<i>Enterococcus faecium</i> 379 (VR)	16	16	32
<i>Enterococcus faecium</i> 436	16	16	32
<i>Bacillus subtilis</i> 327	16	16	32
<i>Escherichia coli</i> imp 389	32	32	2
<i>E. coli</i> 442	>128	>128	32
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>128	>128	128
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 425	32	32	128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 339	>128	>128	>128
<i>Candida albicans</i> 54	128	128	>128

<sup>a</sup> Method: microbroth dilution method. <sup>b</sup> Standard drug.

Table 3. Mechanism of Action of Xanthorrhizol (1) and Compound 2 in *E. coli* imp<sup>a</sup>

compound	conc ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Tdr	Udr	AA
xanthorrhizol (1)	128	1.52	1.91	17.12
	64	7.03	8.72	23.39
	32	35.75	48.56	33.57
	16	99.98	91.13	96.92
	8	95.33	96.87	102.10
2	128	30.71	34.04	25.34
	64	37.82	39.08	39.06
	32	48.24	50.02	44.20
	16	63.06	60.35	52.28
	8	75.57	66.73	68.00
ciprofloxacin-HCl	0.25	4.42	87.10	96.16
rifampin	0.25	89.56	1.17	27.82
chloramphenicol	25	82.98	85.76	18.96

<sup>a</sup> Data presented as % of untreated control. Tdr = tritiated thymidine. Udr = tritiated uridine. AA = tritiated amino acids.

Inhibition of DNA, RNA and protein synthesis was determined by measuring the incorporation of <sup>3</sup>H-Tdr, <sup>3</sup>H-Udr, and <sup>3</sup>H-AA, respectively, into TCA-precipitable material of a logarithmic-phase culture of *E. coli* imp. Control drugs affected the anticipated macromolecular processes, whereas treatment with xanthorrhizol (1) and compound 2 inhibited incorporation of all three radiolabeled precursors, suggesting disruption of membrane integrity. Although xanthorrhizol (1) at the higher concentrations (128 and 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) demonstrated a greater degree of inhibition of DNA and RNA synthesis than compound 2 at similar concentrations, both compounds inhibited all three macromolecular processes at their MIC or higher (Table 3). Thus, the mechanistic studies performed in *Escherichia coli* imp

Table 4. In Vivo Activity (Acute Lethal Infection with *S. aureus* in Mice) and Toxicity

route	xanthorrhizol (1)		vancomycin	
	ED <sub>50</sub>	LD <sub>50</sub> /ED <sub>50</sub>	ED <sub>50</sub>	LD <sub>50</sub> /ED <sub>50</sub> <sup>d</sup>
SOD <sup>a</sup>	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	230	ND <sup>c</sup>
SSC <sup>b</sup>	>32	ND <sup>c</sup>	1	>1000

<sup>a</sup> Single oral dose. <sup>b</sup> Single subcutaneous dose. <sup>c</sup> Not determined. <sup>d</sup> LD<sub>50</sub> of vancomycin were determined to be >1024 mg/kg by oral and subcutaneous.

suggested nonspecific inhibition of DNA, RNA, and protein synthesis by compounds **1** and **2**.

Xanthorrhizol (**1**) was also tested in an in vivo model. The results summarized in Table 4 clearly reveal that it did not provide protection to mice infected with *Staphylococcus aureus*, even at the higher dose tested.

The remaining isolates were all tested, and only trachyloban-19-oic acid exhibited weak activity against susceptible *S. aureus* (MIC 128 µg/mL); therefore compounds **1** and **2** made up the bulk of the antibacterial activity within the extracts.

## Experimental Section

**General Experimental Procedures.** Melting point determinations for the known diterpenes were performed on a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. IR spectra were obtained using KBr disks or films on a Perkin-Elmer FT 1605 spectrophotometer. UV spectra were obtained on a Lambda II UV spectrometer in MeOH solution. NMR spectra including COSY spectra, NOESY, HMBC, and HMQC experiments were recorded on a Bruker DMX500 at 500 MHz (<sup>1</sup>H) or 125 MHz (<sup>13</sup>C) NMR or on a Varian Unity INOVA at 300 MHz (<sup>1</sup>H) or 75 MHz (<sup>13</sup>C). CD spectra were measured at room temperature in MeOH using a CD6 spectropolarimeter. Optical rotations were measured on a Perkin-Elmer 241 polarimeter. EIMS were obtained on a JEOL SX 102A mass spectrometer. Open column chromatography: Si gel 60 (70–230 mesh, Merck). TLC: silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck).

**Plant Material.** The roots of *I. heterophylla* were collected in San Luis Potosí, San Luis Potosí, México, on October 25, 1995. A voucher specimen (R. Byc, E. Linares, G. Morales, M. Mendoza 20528) was deposited in the Ethnobotanical Collection of the National Herbarium (MEXU), Instituto de Biología, UNAM.

**Antimicrobial Activity.** In vitro antimicrobial activities against methicillin-sensitive (MSSA Sa 375) and -resistant (MRSA Sa 310) *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant *Enterococci faecium* (VREF Ef 379), *E. coli*, *E. coli imp* Ec 389 (a mutant strain with increased permeability to large molecular weight compounds),<sup>13</sup> and *Candida albicans* Ca 54 were determined by the agar diffusion method.<sup>14</sup> Media used were Difco nutrient agar (pH 6.8) for *S. aureus*, LB (Luria-Bertani) agar for *E. faecium* and *E. coli*, and YM agar for *C. albicans*. Assay plates (12 in. × 12 in. Sumilon) were prepared by pouring 125 mL of agar medium (tempered at 50 °C) inoculated with an overnight broth culture of the test organisms (adjusted to approximately 10<sup>6</sup> cells per µL), as previously described.<sup>14</sup> Ten microliters of the antibiotic solution diluted in DMSO were spotted onto the agar surface, and the plates were incubated at 37 °C for 18 h. The zone of growth inhibition was measured using a hand-held digital caliper. DMSO control (20 mL/well or 2.5% v/v in liquid broth) did not inhibit bacterial growth.

Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by the standard broth microdilution method as described earlier.<sup>15</sup> Briefly, 5 µL of an overnight broth bacterial culture (adjusted to a density of 1 × 10<sup>7</sup> to 5 × 10<sup>7</sup> CFU/mL) was added to 0.1 mL of broth medium in polystyrene plates containing the drug at 0.03–128 µg/mL concentration. The MIC was defined as the lowest concentration of antibiotic that prevented visual turbidity after 18–20 h of incubation at 37 °C

**Mechanistic Studies.** Macromolecular synthesis in *E. coli imp* was studied by measuring the incorporation of appropriate radiolabeled precursors into trichloroacetic acid (TCA)-precipitable material.<sup>15</sup> An overnight culture was diluted 1:500 in fresh modified minimal medium (50 mL medium/250 mL Erlenmeyer flask) and incubated at 37 °C and 200 rpm to an A<sub>600</sub> of 0.20. Aliquots of 100 µL were dispensed into microtiter wells containing 5 µL of antibiotic, and plates were incubated for 2–14 min at 37 °C with vigorous agitation. Cells were pulse-labeled for 5 min by adding one of the following radiolabeled precursors at the indicated final concentrations: [<sup>3</sup>H]-Tdr (1 µCi/mL with 0.05 µg/mL of unlabeled thymidine/mL), [<sup>3</sup>H]Udr (1 µCi with 0.12 µg unlabeled uridine/mL), or [<sup>3</sup>H]AA (10 µCi/mL). To determine specific incorporation into DNA, RNA, and protein, 100 µL of chilled (4 °C) TCA (10%) supplemented with 0.5 mg of unlabeled precursors per mL was added to each well, and the plate was immediately refrigerated for 1 h. The precipitate was collected on a glass fiber filter (Wallac filtermat B, Wallac 1205–404) using a Skatron 96-well cell harvester (Model 11050) programmed for a 3 s prewet with chilled DI water, a 12 s wash with 5% chilled TCA, and a 5 s drying cycle. Filter mats were dried for 7 min at high power in a microwave oven (Quasar, 700 W), solid scintillant (Meltilex B, Pharmacia 1205–402) was applied, and the isotope that was retained on the filter was quantitated in an LKB Betaplate scintillation counter (Wallac 1205). The levels of incorporation of [<sup>3</sup>H]Tdr, [<sup>3</sup>H]Udr, and [<sup>3</sup>H]AA are expressed as a percent of that of the untreated control.

**In Vivo Activity.** The in vivo activity was assessed in female mice, strain CD-1 (from Charles River Laboratories, NY), weighing 20 ± 2 g each, infected intraperitoneally with sufficient bacterial cells suspended in broth or about 5% mucin to kill 95–100% of the untreated mice within 48 h. Antibiotic was administered subcutaneously in single doses 30 min after infection. Seven-day survival ratios from 3 or 4 separate tests each with 5 dose levels and 5 animals per dose level were pooled for the determination of the median effective dose (ED<sub>50</sub>) by probit analysis.<sup>15</sup>

**Extraction and Bioassay-Directed Fractionation.** The air-dried plant material (2.4 kg) was ground into powder and extracted by maceration with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) at room temperature. After filtration, the extract was evaporated under reduced pressure to yield 263 g of residue, which was subjected to column chromatography over Si gel (2.5 kg) and eluted with a gradient of hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10:0 – 0:10) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9:1 – 3:7). Fractions of 500 mL each were collected and pooled based on TLC profiles to yield 11 major fractions (F001–F011). Fractions F002–F005 were active against Gram-positive bacteria. Extensive preparative TLC of fractions F002 (200 mg) and F003 (19 g) using hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) led to the isolation of **1** (100 mg and 12 g, respectively) as a yellowish oil. Further column chromatography of fraction F004 (123 g) on Si gel (1.2 kg), eluting with a concentration gradient of hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH, starting with hexane afforded 15 secondary fractions (F004-I–F004-XV). Fractions F004-II to F004-IV exhibited very good activity and F004-1 and F004-V through F004-XV showed poor activity against the Gram-positive organisms. From active fraction F004-II (1 g, eluted with hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9:1)) spontaneously crystallized 500 mg of 16- $\alpha$ -hydroxy-*ent*-kaurane. From fraction F004-X, eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9:1), crystallized 500 mg of trachyloban-19-oic acid. Fractions F004-III–IX rendered an additional 41.28 g of **1**. Active fraction F005 (92 g) was further fractionated by column chromatography on silica gel (795 g) and eluted with a gradient of hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10:0 – 0:10) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9:1 – 0:10). This chromatographic process led to 15 secondary fractions (F005-I to F005-XII) of which F005-III and F005-IV were more active than the rest. From fractions F005-III to F005-VI, eluted with hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7.5:2.5, 6:4, and 4.5:5.5, respectively) crystallized additional amounts (8 g) of trachyloban-19-oic acid. From fraction F005-X, eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (6:4), crystallized 406 mg of 16- $\alpha$ -hydroxy-*ent*-kaur-19-*enc*-19-oic. The mother liquors from fractions F005-VI and fraction F005-VII were combined (14 g) and rechromatographed on a silica gel column (185 g), eluting with

concentration gradient of hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10:0 — 0:10), to yield eight tertiary fractions (F005-XIII—F005-XX). Extensive preparative TLC [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, four runnings] of fraction F005-XX (740 mg), eluted with hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8:2), yielded 2 (19.3 mg) and additional amounts of 1 (280 mg). From fraction F005-XVIII, eluted with hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1), crystallized 1.6 g of a mixture of *ent*-kauren-16-en-19-oic and *ent*-beyer-15-en-19-oic acids.

**4-(1',5'-Dimethylhex-4'-enyl)-2-methylphenol (2):** colorless oil; [α]<sub>D</sub> -60 (c 1 mg/mL MeOH); UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (ε) 276 (2218), 257 (1709), 204 (22581) nm; CD (MeOH) Δε (nm) -1.44 × 10<sup>3</sup> (277), -2.75 × 10<sup>4</sup> (205); IR ν<sub>max</sub> (film) 3436, 2955, 2924, 2854, 1611, 1510, 1454, 1376, 1264, 1121 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (Table 1); EIMS *m/z* 218 [M<sup>+</sup> (90)], 203 (10), 161 (68), 148 (90), 135 (100), 121 (45); HRMS *m/z* 218.164 (calcd for C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O, 218.162).

**Acknowledgment.** This work was supported by the "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America" grant U01 TW 00316 from the National Institute of Health (NIH) and National Science Foundation, and USAID. We thank Rosa I. Del Villar, Oscar S. Yañez-Muñoz, Graciela Chávez, Marisela Gutiérrez, and Georgina Duarte-Lisci, Facultad de Química, UNAM, for obtaining some NMR, IR, and HRFABMS spectra. Special thanks are due to Guadalupe Pérez Castorena, Laura Acevedo, Edelmira Linares, and Mirna Mendoza for technical assistance. E.M. acknowledges the

fellowship awarded by CONACyT, México, to carry out graduate studies.

## References and Notes

- (1) This work represents part of the MS thesis submitted to the Graduate School of Chemistry, UNAM, México, by E.M.
- (2) Hernández, F. *Historia Natural de Nueva España. Obras Completas* [11:37–38]; México DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 1959.
- (3) Bye, R. *Econ. Bot.* 1986, 40, 103–124, and references therein.
- (4) Aguilar, M. I.; Delgado, G.; Bye, R.; Linares, E. *Phytochemistry* 1993, 33, 1161–1163.
- (5) Aguilar, M. I.; Delgado, G. *Nat. Prod. Lett.* 1995, 7, 155–162.
- (6) Delgado, G.; Aguilar, M. I. In *Secondary Metabolites from Mexican Plants: Chemistry and Biological Properties*; Rodríguez, L., Ed.; Research Signpost: Trivandrum, India, 1996; pp 69–76.
- (7) Ponce-Monter, H.; Campos, M. G.; Aguilar, I.; Delgado, G. *Phytother. Res.* 1999, 13, 202–205.
- (8) Campos, M. G.; Oropeza, M. V.; Villanueva, T.; Aguilar, M. I.; Delgado, G.; Ponce, H. *Life Sci.* 2000, 67, 327–333.
- (9) Rimpler, H.; Hansel, R.; Kochendoerfer, L. *Z. Naturforsch.* 1970, 25b, 995.
- (10) John, T. K.; Krishna-Rao, G. S. *Indian J. Chem.* 1985, 24B, 35–37.
- (11) Dennison, N. R.; Mirrington, R. N.; Stuart, A. D. *Aust. J. Chem.* 1976, 28, 1339–1343.
- (12) McEnroe, F. J.; Fenical, W. *Tetrahedron* 1978, 34, 1661–1664.
- (13) Sampson, B. A.; Misra, R.; Benson, S. A. *Genetics* 1989, 122, 491–501.
- (14) Hewitt, W.; Vincent, S. *Theory and Application of Microbiological Assay*; Academic Press: London, 1988; pp 38–79.
- (15) Singh, M. P.; Petersen, P. J.; Weiss, W. J.; Kong, F.; Greenstein, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000, 44, 2154–2159.

NP010076O