



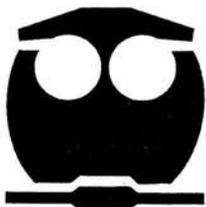
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

COMPUESTOS BIODINAMICOS DE LAS ESPECIES
Larrea divaricata Cov. (Zygophyllaceae) Y
Phoradendron robinsonii Urban (Loranthaceae).

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:
JUAN FRANCISCO PALACIOS ESPINOSA



MÉXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Francisco Palacios Espinosa

FECHA: 09/02/04

FIRMA: Francisco Palacios

Jurado asignado:

Presidente	Dr. Rafael Castillo Bocanegra
Vocal	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Secretario	Dra. Rachel Mata Essayag
1er. Suplente	Dr. Francisco Hernández Luis
2do. Suplente	M. en C. Blanca Estela Rivero Cruz

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 124. Edificio E. Facultad de Química.

Asesor

Rachel Mata de Espindola
Dra. Rachel Mata Essayag

Supervisor Técnico

Rivero Cruz Isabel
M. en C. Isabel del Carmen Rivero Cruz

Sustentante

Francisco Palacios E
Juan Francisco Palacios Espinosa

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación se realizó con el apoyo económico del proyecto "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America" financiado por el NIH (National Institute of Health) de los Estados Unidos de Norteamérica. De manera personal agradezco a esta institución por la beca otorgada a través del mismo proyecto.

A los miembros del jurado designado para la revisión del presente trabajo de tesis, por sus comentarios que permitieron mejorar la versión final de ésta.

Al personal técnico de la USAI (Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación) por el registro de los distintos espectros utilizados en el presente estudio. En particular agradezco a Georgina Duarte, Oscar Yañez y Marisela Gutiérrez.

A las M. en C. Isabel Rivero Cruz y Laura Acevedo Arteaga por el apoyo técnico brindado durante la realización de este trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio 124 por su grata compañía y ayuda desinteresada.

A la Dra. Rachel Mata por el apoyo que me ha brindado, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y sobre todo por sus valiosos consejos.

DEDICATORIAS

Ante todo, a Dios, pues a pesar de todas las dificultades me ha dado fuerza para levantarme y seguir adelante, me ha dado una hermosa familia que me apoya y verdaderos amigos que ofrecen su hombro para sostenerme en esos tiempos de tempestad.

De todo corazón, a mi hermano José Luís (q.p.d), que desde allá arriba nos observa y cuida.

A mis Padres (Sara y Francisco) que quiero tanto, gracias a su esfuerzo y dedicación he llegado a una de mis metas, espero recompensar todo eso que ustedes sacrifican por nosotros, sus hijos.

A mis hermanos (Lourdes, Jesús y Rafael), por los buenos momentos que hemos pasado juntos (y los que vienen), y por soportarme en algunas desveladas.

A todos los amigos del grupo 16 (Pedro, Verónica, Valeria, Vanessa, Eric, Juan, Enrique, José Miguel, Miguel Ángel Ginori, Emilio, Marcela, Erica, Mario Neri, Mario Vela, Ale, Myrna, Lorena, Armando y Lizbeth. **Gracias por todo.**

Muy especialmente a dos personas que han sido más que amigos: a Lourdes Zamora y Juan Luís Cabañas. Gracias por estar ahí, cuando el ojo de la tormenta amenazaba con tragarme.

También a todos los compañeros del laboratorio, Isabel, Blanca, Antonio, Sergio, Iliana, Martha, Mario, Paola y Araceli, por haber hecho de mi estancia una agradable experiencia (y lo que falta).

INDICE

	Página
Lista de figuras	IV
Lista de esquemas	IV
Lista de cuadros	V
Lista de abreviaturas	V
I. ANTECEDENTES	1
1.1 Generalidades acerca de la tuberculosis y agentes de uso terapéutico.	1
1.2 Antecedentes de la especie <i>Phoradendron robinsonii</i> Urban.	5
1.3 Antecedentes de la especie <i>Larrea divaricata</i> Cov.	8
II. OBJETIVOS	14
III. PARTE EXPERIMENTAL	15
3.1. PROCEDIMIENTOS GENERALES	15
3.1.1. Análisis cromatográficos.	15
3.1.2. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.	15
3.2. MATERIAL VEGETAL	16
3.3. ENSAYOS BIOLÓGICOS	16
3.3.1. Determinación de la actividad antimicobacteriana.	16
3.4. PREPARACION DE LOS EXTRACTOS VEGETALES ORGÁNICOS	17
3.5. ESTUDIO QUÍMICO DE LAS ESPECIES OBJETO DE ESTUDIO	17

3.5.1. Fraccionamiento primario del extracto total de <i>P. robinsonii</i> .	17
3.5.2. Aislamiento de la Sakuranetina (17) y el β -sitosterol (37) de las fracciones primarias activas F007 y F008.	18
3.5.3. Aislamiento de la Sakuranetina (17) a partir de la fracción activa F009.	19
3.6. ESTUDIO QUIMICO DE LA ESPECIE <i>Larrea divaricata</i>	20
3.6.1. Fraccionamiento primario del extracto total de <i>L. divaricata</i> ,	20
3.6.2. Aislamiento de la Ermanina (38) y la 6-hidroxiermanina (39) a partir de la fracción primaria activa F008.	20
3.6.3. Aislamiento del ácido nordihidroguaiarético (19) a partir de la fracción primaria F008-IX.	21
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	23
4.1 SELECCION PRIMARIA DE LAS ESPECIES <i>Phoradendron robinsonii</i> Urban y <i>Larrea divaricata</i> Cov. como candidatos idóneos para la obtención de principios antimicobacterianos.	23
4.2 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE LA ESPECIE <i>P. robinsonii</i> .	23
4.2.1. Caracterización de los compuestos aislados.	24
4.2.1.1. Caracterización de la Sakuranetina (17).	24
4.2.1.2. Caracterización del β -sitosterol (37).	28
4.3. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA ESPECIE <i>Larrea divaricata</i> .	28
4.3.1. Caracterización de los compuestos aislados.	29
4.3.1.1. Caracterización de la Ermanina (38) y la 6-hidroxiermanina (39).	29
4.3.2. Caracterización del ácido nordihidroguaiarético (19).	33
4.4. ACTIVIDAD ANTIMICOBACTERIANA DE LOS PRODUCTOS NATURALES AISLADOS	34

V. RESUMEN Y CONCLUSIONES	37
VI. BIBLIOGRAFIA	38
VII. APENDICE DE ESPECTROS	41

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>Phoradendron robinsonii</i> Urban.	6
2	<i>Larrea divaricata</i> Cov.	9
3	Patrón de fragmentación de la Sakuranetina (17).	27
4	Núcleo de tipo flavonol.	29

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema		Página
1	Extracción y fraccionamiento primario de la especie <i>P. robinsonii</i> .	18
2	Extracción y fraccionamiento primario de la especie <i>L. divaricata</i> .	21

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Propiedades terapéuticas de algunas especies vegetales con actividad antimicobacteriana significativa.	4
2	Metabolitos secundarios aislados de algunas especies del género <i>Phoradendron</i> .	6
3	Metabolitos secundarios aislados de algunas especies del género <i>Larrea</i> .	9
4	Fraccionamiento primario biodirigido mediante cromatografía en columna abierta del extracto total de <i>P. robinsonii</i> .	19
5	Fraccionamiento primario biodirigido mediante cromatografía en columna abierta del extracto total de <i>L. divaricata</i> .	22
6	Efecto de los extractos CH ₂ Cl ₂ :MeOH (1:1) de las especies <i>P. robinsonii</i> y <i>L. divaricata</i> sobre el crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	23
7	Actividad antimicobacteriana de las fracciones primarias de <i>P. robinsonii</i> .	24
8	Metabolitos secundarios aislados de las fracciones primarias de <i>P. robinsonii</i> .	25
9	Actividad antimicobacteriana de las fracciones primarias de <i>L. divaricata</i> .	28
10	Metabolitos secundarios aislados de las fracciones primarias de <i>L. divaricata</i> .	30

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la Sakuranetina (17).	26
2	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la Ermanina (38).	32
3	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la 6-hidroxiermanina (39).	33
4	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del ácido nordihidroguaiarético (19).	35
5	Actividad antimicrobacteriana de los productos naturales aislados a partir de las especies vegetales <i>P. robinsonii</i> y <i>L. divaricata</i> .	36

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AcOEt	Acetato de etilo
ATCC	American Type Culture Collection
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
COSY	Correlación homonuclear
HETCOR	Correlación heteronuclear
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
δ	Desplazamiento químico
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
d	Doblete
dd	Doblete de doblete
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMIE	Espectroscopia de Masas por Impacto Electrónico
°C	Grado centígrado
Kg	Kilogramo
mg	Miligramo
µg	Microgramo
Hz	Hertz
Hex	Hexano
IR	Infrarrojo
M ⁺	Ion molecular
L	Litro
<i>v</i> _{max}	Máxima longitud de onda

Lista de tablas y abreviaturas

MeOH	Metanol
%	Por ciento
m	Multiplete
m/z	Relación masa-carga
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
s	Singlete
sa	Singlete ancho
TMS	Tetrametilsilano
t	Triplete
CD ₃ OD	Metanol deuterado

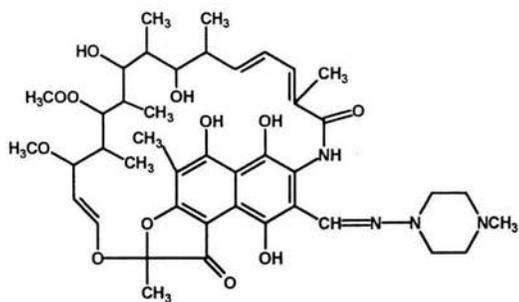
I. ANTECEDENTES

1.1 Generalidades acerca de la tuberculosis y agentes de uso terapéutico.

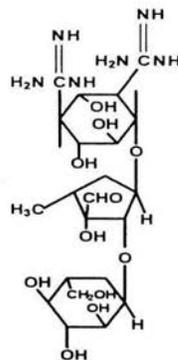
La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas más estudiadas y conocida desde hace siglos, pues no sólo ha sido una causa importante de mortalidad y enfermedad prolongada, sino que también cobra importancia en el hecho de afectar principalmente a la población joven. El agente causal de la tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, pertenece a la familia *Mycobacteraceae*, es una bacteria aerobia, Gram positiva, en forma de bacilo delgado, recto o ligeramente curvo, con los extremos redondeados, que mide entre 0.2 y 0.5 µm de ancho y de 1 a 4 µm de longitud, no forma esporas y carece de cápsula; sin embargo, se caracteriza por poseer una pared celular formada por múltiples capas de ácido micólico y lípidos muy complejos, lo que le confiere un alto grado de resistencia a condiciones ambientales adversas (Joklik *et al.*, 1996; Koneman *et al.*, 1997).

A la fecha, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que anualmente de ocho a diez millones de individuos son víctimas de la tuberculosis y alrededor de tres millones mueren a causa de ella (WHO: IUATLD Working Group, 2000), siendo las regiones más afectadas el África subsahariana, el sureste de Asia y el este de Europa.

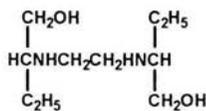
Los agentes terapéuticos de mayor uso para el tratamiento de este padecimiento comprenden un grupo numeroso de compuestos de origen natural y sintético con mecanismos de acción variado, de tal forma que unos inhiben la síntesis e incorporación del ácido micólico en la pared celular bacteriana, otros inhiben la replicación del ADN y otros inhiben la síntesis de proteínas. En general, los medicamentos utilizados para el tratamiento de la tuberculosis pueden dividirse en dos categorías principales: la primera, denominada de primera línea, incluye fármacos con un buen nivel de eficacia y una aceptable toxicidad; algunos ejemplos de estos son: rifampina (1), estreptomycin (2), etambutol (3), pirazinamida (4) e isoniazida (5). La segunda, denominada fármacos de segunda línea, incluye compuestos como la ofloxacina (6), ciprofloxacina (7), amikacina (8), etionamida (9), el ácido aminosalicílico (10) y la cicloserina (11), entre otros (Goodman *et al.*, 2000).



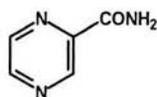
(1)



(2)



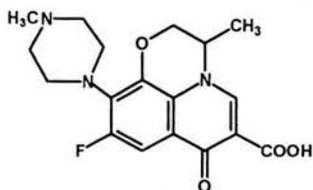
(3)



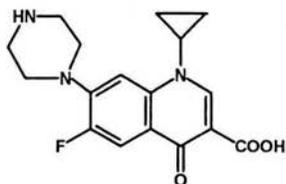
(4)



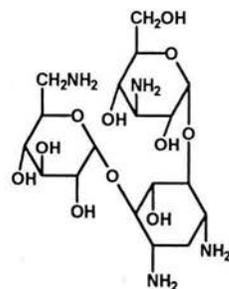
(5)



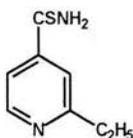
(6)



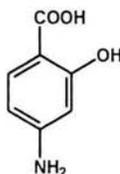
(7)



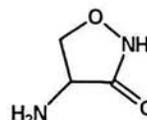
(8)



(9)



(10)



(11)

La quimioterapia del tuberculoso representa un alto riesgo para su salud, debido a las siguientes razones:

a) Los fármacos son empleados en terapias de combinación que involucran la administración de tres a seis compuestos durante periodos prolongados, con la finalidad de aumentar su eficacia.

b) El desarrollo de resistencia microbiana producida entre otras causas por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

c) La toxicidad y aparición de numerosas reacciones secundarias por el tratamiento.

Los inconvenientes antes señalados han provocado que alrededor del mundo se desarrollen programas conducentes a la búsqueda de nuevos fármacos naturales, sintéticos o semisintéticos con estructuras y mecanismos de acción novedosos (Timmermann *et al.*, 1999).

Los productos naturales vegetales constituyen una fuente importante y racional de prototipos estructurales para el diseño y la síntesis de productos novedosos de mayor potencia y eficacia que los compuestos de uso comercial. En este sentido cabe señalar que se conocen muchas especies vegetales medicinales que en ensayos *in vitro* han demostrado tener una actividad antimicobacteriana significativa y las posibilidades de encontrar en estas especies compuestos antimicobacterianos son altas. A manera de ejemplo, en el Cuadro 1 se indican algunas de estas especies así como algunos de sus usos populares. En el caso de la especie *Sanguinaria canadensis* se comprobó la actividad antimicobacteriana significativa de los alcaloides sanguinarina y queleritrina. También se demostró la actividad antibacteriana del bacuchiol, meroterpeno fenólico aislado a partir de las hojas de *Psoralea corylifolia* (Newton *et al.*, 2002).

Cuadro 1. Propiedades terapéuticas de algunas especies vegetales con actividad antimicobacteriana significativa.

ESPECIE	USO POPULAR
<i>Achyranthus aspera</i> Linn <i>Aegle marmelos</i> Corr <i>Allium sativum</i> Linn <i>Borago officinalis</i> Linn <i>Commiphora mukul</i> Engl <i>Equisetum arvense</i> Linn <i>Eucalyptus globulus</i> Labill <i>Foeniculum vulgare</i> Mill <i>Glehnia littoris</i> Fr <i>Glycyrrhiza glabra</i> Linn <i>Helianthus annus</i> Linn <i>Inula helenium</i> Linn <i>Lomatium dissectum</i> <i>Panax ginseng</i> <i>Polygonatum multiflorum</i> Linn <i>Prunus serotina</i> Ehrh <i>Pulmonaria officinalis</i> Linn <i>Rosa canina</i> Linn <i>Sanguinaria canadensis</i> Linn <i>Sanicula europaea</i> Linn <i>Stillingia sylvatica</i> Linn <i>Taraxacum officinale</i> Weber <i>Verbascum thapsus</i> Linn	<p>En el tratamiento de infecciones pulmonares, tos, asma. Enfermedades de la piel y como expectorante.</p>
<i>Agrophyron repens</i> Linn	<p>Antibiótico</p>
<i>Apium graveolens</i> Linn <i>Azadirachta indica</i> <i>Hyssopus officinalis</i> Linn <i>Nigella sativum</i> Linn <i>Psoralea corylifolia</i> Linn <i>Rhamnus cathartica</i> Linn <i>Solanum dulcamara</i> Linn <i>Withania somnifera</i> Dun	<p>Antihelmíntico, antimicótico y en el tratamiento de tos con fiebre.</p>
<i>Centella asiatica</i> Linn <i>Cinnamomum zeylandicum</i> Breyn <i>Geum urbanum</i> Linn <i>Holarrhena pubescens</i> Wall <i>Juniper communis</i> Linn <i>Mentha piperita</i> Linn <i>Saponaria officinalis</i> Linn <i>Teucrium chaemaedrys</i> Linn <i>Viola odorata</i> Linn	<p>En el tratamiento de lepra escrófula, sífilis, gonorrea. Enfermedades de la piel. Disenteria. Antiséptico.</p>

Como estos ejemplos es factible encontrar en la literatura especializada muchos productos naturales con propiedades antimicobacterianas. En México, la gran diversidad vegetal constituye una fuente potencial de principios biodinámicos. Es por ello que, la Facultad de Química de la UNAM en conjunto con la Universidad de Arizona, de los Estados Unidos de Norteamérica, participan en un programa multidisciplinario destinado a explorar el potencial terapéutico de especies selectas de la flora medicinal mexicana con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevos agentes antimicobacterianos. Este programa está patrocinado por varias instituciones gubernamentales de los Estados Unidos, incluyendo National Science Foundation (NSF), U.S. Agency for International Development (USAID) y National Institute of Health (NIH).

En este marco de referencia surgió el presente proyecto de investigación, el cual describe la caracterización de compuestos con actividad antimicobacteriana de las especies *Larrea divaricata* Cov. (Zygophyllaceae) y *Phoradendron robinsonii* Urban (Loranthaceae). Para evaluar el potencial antifímico de estas especies se prepararon los extractos orgánicos a partir del material vegetal desecado, estas evaluaciones se realizaron en el Instituto de Investigaciones sobre la Tuberculosis de la Universidad de Illinois en Chicago, Illinois, EUA, utilizando un ensayo de tipo fluorimétrico (MABA) (Franzblau *et al.*, 1998). Los resultados de estas evaluaciones indicaron que los extractos evaluados inhiben de manera significativa el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*.

1.2 Antecedentes de la especie *Phoradendron robinsonii* Urban.

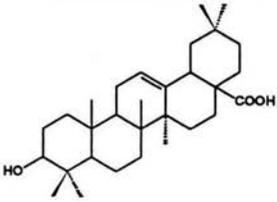
La especie *P. robinsonii* Urban (Figura 1), conocida como Kuchóoko entre los indios Tarahumaras, es un arbusto verdoso parásito de dicotiledóneas. La infusión de las partes aéreas se emplea como purgante, para el tratamiento de la tos, trastornos gastrointestinales y de algunas enfermedades venéreas. *P. robinsonii* florece durante todo el año, su hábitat se encuentra en las zonas áridas del norte de México y se distribuye principalmente en el Estado de Chihuahua (Martínez, 1989).



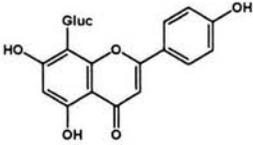
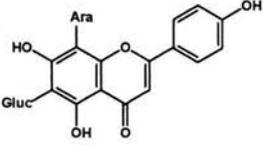
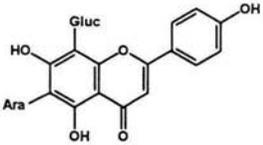
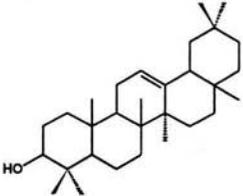
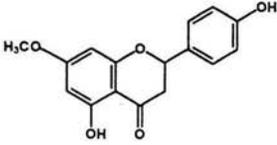
Figura 1. *Phoradendron robinsonii* Urban.

La investigación química de algunas especies del género *Phoradendron* ha permitido el aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios ilustrados en el Cuadro 2 y que incluyen flavonoides y triterpenoides de tipo oleanano.

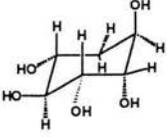
Cuadro 2. Metabolitos secundarios aislados de algunas especies del género *Phoradendron*.

ESTRUCTURA	ESPECIE	REFERENCIA
 <p>ácido oleanólico (12)</p>	<p><i>P. gregii</i> <i>P. coryae</i> <i>P. junispermum</i></p>	<p>Domínguez <i>et al.</i>, 1971 Yoshiki <i>et al.</i>, 1998</p>

Cuadro 2. Metabolitos secundarios aislados de algunas especies del género *Phoradendron* (continuación).

ESTRUCTURA	ESPECIE	REFERENCIA
 <p data-bbox="251 531 383 560">vitexina (13)</p>	<i>P. tomentosu</i>	Dosaji <i>et al.</i> , 1983
 <p data-bbox="251 754 420 783">schaftósido (14)</p>	<i>P. tomentosu</i>	Dosaji <i>et al.</i> , 1983
 <p data-bbox="235 978 436 1007">isoschaftósido (15)</p>	<i>P. tomentosu</i>	Dosaji <i>et al.</i> , 1983
 <p data-bbox="259 1257 411 1286">β-amirina (16)</p>	<i>P. coryae</i>	Dominguez <i>et al.</i> , 1971
 <p data-bbox="222 1485 401 1514">sakuranetina (17)</p>	<i>P. coryae</i>	Dominguez <i>et al.</i> , 1971

Cuadro 2. Metabolitos secundarios aislados de algunas especies del género *Phoradendron* (continuación).

ESTRUCTURA	ESPECIE	REFERENCIA
 <p>quercitol (18)</p>	<i>P. coryae</i>	Dominguez <i>et al.</i> , 1971

1.3 Antecedentes de la especie *Larrea divaricata* Cov.

La especie *Larrea divaricata* Cov. (Figura 2), perteneciente a la familia Zygophyllaceae, es un arbusto pequeño cuyas medidas oscilan entre los 50 cm y 3.5 m de altura; presenta un tallo con numerosas ramas que salen desde la base y se ramifican en forma divaricada y ascendente; las ramas miden de 1 a 4 mm de largo; sus hojas están formadas por dos folíolos unidos por medio del raquis, oblicuamente ovaladas a lanceoladas y miden entre 3 y 6 mm de ancho; sus flores miden 2.5 cm de diámetro y tienen pétalos amarillos.

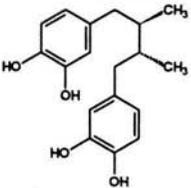
Filogenéticamente se encuentra estrechamente relacionada con los géneros *Zygophyllum* y *Covillea*. En este contexto, este taxón tiene como sinonimias *Zygophyllum tridentatum* Moc. et Sessé ex DC y *Covillea tridentata* Moc. & Sessé ex DC. Esta especie también habita en zonas áridas. En México, se encuentra distribuida principalmente en los Estados de Durango y Chihuahua. Popularmente la población de estos lugares designa a la especie con los nombres de “gobernadora”, “falsa alcaparra”, “hediondilla” o “huamis”. En la literatura etnobotánica se describe el uso de la infusión de las hojas de esta especie para el lavado de heridas, el tratamiento de la disuria (dificultad para orinar), cálculos renales, trastornos gastrointestinales y otras enfermedades de tipo venéreo. También se ha reportado el uso de la especie en la agricultura como cultivo de cobertura y forraje (Martínez, 1989; Niembro, 1986).



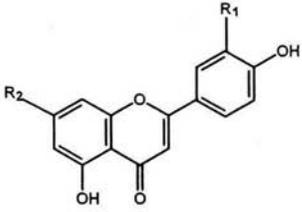
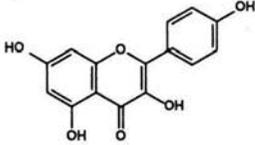
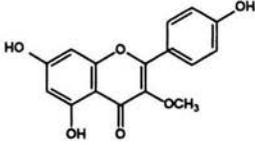
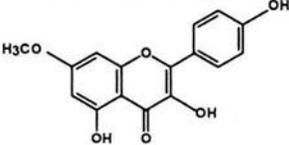
Figura 2. *Larrea divaricata* Cov.

Desde el punto de vista fitoquímico, los estudios realizados sobre las especies *L. divaricata*, *L. tridentata*, *L. nitida* y *L. cuneifolia* permitieron el aislamiento de varios compuestos de tipo flavonoide [flavanonas, flavonoles, dihidroflavonoles, chalconas, entre otros], ésteres de ácidos grasos y lignanos. En el Cuadro 3 se ilustran las estructuras de los metabolitos aislados.

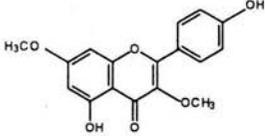
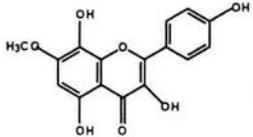
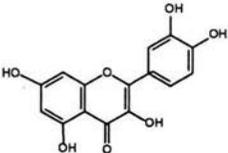
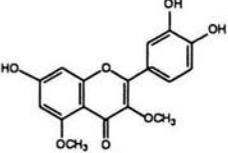
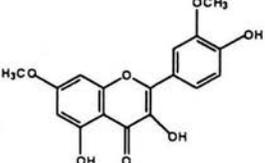
Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados de algunas especies del género *Larrea*.

ESTRUCTURA	ESPECIE	REFERENCIA
 <p>ácido nordihidroguaiarético (19)</p>	<p><i>L. nitida</i> <i>L. tridentata</i> <i>L. divaricata</i> <i>L. cuneifolia</i></p>	<p>Sakakibara <i>et al.</i>, 1975, 1976, 1977.</p>

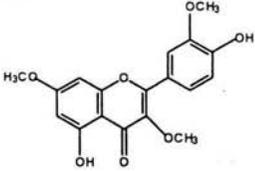
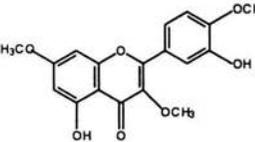
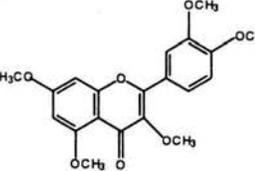
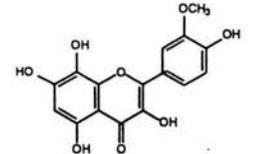
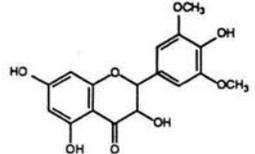
Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados de algunas especies del género *Larrea* (continuación).

ESTRUCTURA	ESPECIE	REFERENCIA												
 <table border="0" data-bbox="112 616 487 799"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">R₁</td> <td style="text-align: center;">R₂</td> </tr> <tr> <td>apigenina (20)</td> <td style="text-align: center;">H-</td> <td style="text-align: center;">-OH</td> </tr> <tr> <td>genkwanina (21)</td> <td style="text-align: center;">H-</td> <td style="text-align: center;">CH₃O-</td> </tr> <tr> <td>velutina (22)</td> <td style="text-align: center;">CH₃O-</td> <td style="text-align: center;">CH₃O-</td> </tr> </table>		R₁	R₂	apigenina (20)	H-	-OH	genkwanina (21)	H-	CH ₃ O-	velutina (22)	CH ₃ O-	CH ₃ O-	<p style="text-align: center;"><i>L. divaricata</i> <i>L. tridentata</i></p>	<p style="text-align: center;">Sakakibara <i>et al.</i>, 1975, 1976, 1977.</p>
	R₁	R₂												
apigenina (20)	H-	-OH												
genkwanina (21)	H-	CH ₃ O-												
velutina (22)	CH ₃ O-	CH ₃ O-												
 <p style="text-align: center;">camferol (23)</p>	<p style="text-align: center;"><i>L. nitida</i> <i>L. tridentata</i></p>	<p style="text-align: center;">Sakakibara <i>et al.</i>, 1975, 1976, 1977. Timmermann <i>et al.</i>, 1979</p>												
 <p style="text-align: center;">isocamferida (24)</p>	<p style="text-align: center;"><i>L. cuneifolia</i></p>	<p style="text-align: center;">Valesi <i>et al.</i>, 1972</p>												
 <p style="text-align: center;">ramnocitrina (25)</p>	<p style="text-align: center;"><i>L. nitida</i> <i>L. tridentata</i></p>	<p style="text-align: center;">Timmermann <i>et al.</i>, 1979 Valesi <i>et al.</i>, 1972</p>												

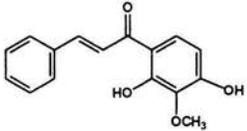
Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados de algunas especies del género *Larrea* (continuación).

ESTRUCTURA	ESPECIE	REFERENCIA
 <p>kumatakenina (26)</p>	<i>L. cuneifolia</i> <i>L. nitida</i>	Valesi <i>et al.</i> , 1972 Timmermann <i>et al.</i> , 1979
 <p>polenitina (27)</p>	<i>L. cuneifolia</i> <i>L. nitida</i>	Valesi <i>et al.</i> , 1972 Timmermann <i>et al.</i> , 1979
 <p>quercetina (28)</p>	<i>L. nitida</i> <i>L. tridentata</i>	Timmermann <i>et al.</i> , 1979 Chirikdjian <i>et al.</i> , 1973
 <p>cariatina (29)</p>	<i>L. nitida</i> <i>L. tridentata</i>	Timmermann <i>et al.</i> , 1979 Chirikdjian <i>et al.</i> , 1973
 <p>ramnazina (30)</p>	<i>L. cuneifolia</i> <i>L. divaricata</i> <i>L. tridentata</i>	Timmermann <i>et al.</i> , 1979 Sakakibara <i>et al.</i> , 1975, 1976, 1977.

Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados de algunas especies del género *Larrea* (continuación).

ESTRUCTURA	ESPECIE	REFERENCIA
 <p>paquipodol (31)</p>	<i>L. cuneifolia</i> <i>L. divaricata</i> <i>L. tridentata</i> <i>L. nitida</i>	Sakakibara <i>et al.</i> , 1975, 1976, 1977. Timmermann <i>et al.</i> , 1979 Valesi <i>et al.</i> , 1972
 <p>ayanina (32)</p>	<i>L. cuneifolia</i> <i>L. divaricata</i> <i>L. tridentata</i>	Sakakibara <i>et al.</i> , 1975, 1976, 1977. Timmermann <i>et al.</i> , 1979
 <p>retusina (33)</p>	<i>L. divaricata</i> <i>L. tridentata</i>	Sakakibara <i>et al.</i> , 1975, 1976, 1977.
 <p>gosipetina (34)</p>	<i>L. divaricata</i> <i>L. tridentata</i>	Sakakibara <i>et al.</i> , 1975, 1976, 1977
 <p>dihidrosiringetina (35)</p>	<i>L. tridentata</i>	Sakakibara <i>et al.</i> , 1975, 1976, 1977.

Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados de algunas especies del género *Larrea* (continuación).

ESTRUCTURA	ESPECIE	REFERENCIA
 <p>larreína (36)</p>	<i>L. nitida</i>	Sakakibara <i>et al.</i> , 1975, 1976, 1977.

II. OBJETIVOS.

El objetivo primordial del presente trabajo de tesis es obtener los principios antimicobacterianos de los extractos activos de *L. divaricata* y *P. robinsonii* mediante la realización de un estudio fitoquímico biodirigido, y así contribuir al posible desarrollo de nuevos agentes terapéuticos de posible utilidad para el tratamiento de la tuberculosis.

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

- a) Preparar los extractos orgánicos a mediana escala de las especies seleccionadas mediante un proceso de maceración.
- b) Realizar el fraccionamiento biodirigido de los extractos obtenidos y separar los principios activos a partir de las fracciones activas, empleando métodos cromatográficos convencionales.
- c) Caracterizar los compuestos activos mediante el empleo de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

III. PARTE EXPERIMENTAL.

3.1 Procedimientos generales.

3.1.1 Análisis cromatográficos.

La cromatografía por adsorción en columna abierta se realizó sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck (tamaño de partícula, 0.063–0.200 mm, 70–230 mesh ASTM). Los análisis cromatográficos, en las modalidades de cromatografía en capa fina analítica (CCF) y cromatografía en capa fina preparativa (CCFP), se realizaron de acuerdo a las técnicas convencionales (Marcel, 1992) empleando diversos sistemas de elución. La CCF se efectuó sobre placas de aluminio de diferentes dimensiones recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla 3.5–7.0 ASTM) de 0.25 mm de espesor. Como agente revelador se empleó sulfato cérico amoniacal, para el desarrollo de color fue necesario calentar durante dos minutos a 100 °C aproximadamente. Antes de revelar con el reactivo anterior, se procedió a visualizar las placas con luz UV (onda corta 254 nm y onda larga 365 nm).

3.1.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns, estos se reportan sin corregir. Los espectros en el IR (película o pastilla) se registraron en un espectrofotómetro de rejilla Modelo 599-B, marca Perkin-Elmer. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-¹H, 300 MHz) y de carbono 13 (RMN-¹³C, 75 MHz) se registraron en un aparato Unity-Inova, marca Varian utilizando CDCl₃, CD₃OD o DMSO-*d*₆ como disolventes y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los espectros de masas por la técnica de impacto electrónico (EMIE) se obtuvieron mediante un espectrómetro de masas HP 5890 (serie II) por introducción directa a 70 eV y un barrido de 33 a 800 unidades de masa-carga (m/z) por segundo.

El registro de los espectros se efectuó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

3.2 Material vegetal.

El material vegetal, planta completa y las hojas, de las especies *P. robinsonii* y *L. divaricata*, respectivamente; se recolectaron en el Estado de San Luis Potosí en Agosto de 1995.

La recolecta y clasificación de las dos especies estuvieron a cargo del Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, UNAM). Un ejemplar de cada espécimen se depositó como referencia en la colección etnobotánica del Herbario Nacional MEXU del Instituto de Biología, con los números de Voucher: Bye 20473 para *P. robinsonii* y Bye 20321 para la especie *L. divaricata*.

3.3 Ensayos biológicos.

3.3.1 Determinación de la actividad antimicobacteriana.

La determinación de la actividad antimicobacteriana del extracto, fracciones y compuestos puros obtenidos a lo largo del estudio biodirigido de las especies *P. robinsonii* y *L. divaricata*, se realizó en el Instituto de Investigaciones sobre la Tuberculosis de la Universidad de Illinois, Chicago, Illinois, E.U.A. Para ello se aplicó un bioensayo de tipo fluorimétrico MABA (Microplate Alamar Blue Assay) contra *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇RV ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD) de acuerdo con los protocolos previamente descritos en la literatura (Collins y Franzblau, 1997; Cantrell *et al.*, 1998).

La prueba de susceptibilidad microbiana se realizó por el método de microdilución sobre una microplaca de 96 pozos de fondo claro (Packard Instrument Co., Meriden, Conn), donde se colocaron una serie de diluciones (1:2) de las muestras de prueba. A continuación se evaporó el disolvente y se procedió a sembrar 0.1 mL de inóculo de la cepa de *M. tuberculosis* H₃₇ RV ATCC 27294 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) previamente desarrollada en el medio Middlebrook 7H9 broth (Difco) y estandarizada a 2×10^5 UFC (unidades formadoras de colonias). El volumen necesario para obtener las concentraciones apropiadas se completó con el mismo medio de cultivo.

De manera adicional, se preparó un control positivo (medio y rifampina 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y un control de crecimiento (medio e inóculo) en la misma placa, la cual se incubó a 37 °C durante 4 días. Al cabo de este periodo, se adicionaron a cada pozo 20 μL de la solución reveladora de azul de alamar y 12.5 μL de “Tween” 80 (20 %); la placa se incubó nuevamente a 37 °C; la lectura de las placas se realizó a las 12 y 24 h de incubación. El cambio de color de azul a rosa fluorescente indica el crecimiento celular o viabilidad. El crecimiento se mide con un fluorímetro o espectrómetro en unidades de fluorescencia (UF) o visualmente. La concentración mínima inhibitoria (CMI), se encuentra definida como la concentración más baja de muestra donde ya no hay cambio de color. El porcentaje de inhibición se determina de acuerdo a la relación $[1-(\text{UF de la muestra}/\text{UF del control positivo}) \times 100]$.

3.4 Preparación de los extractos vegetales orgánicos.

El proceso de desecación del material vegetal se llevó a cabo a temperatura ambiente. Una vez desecado se fragmentó en un molino de cuchillas Modelo Willey 4.

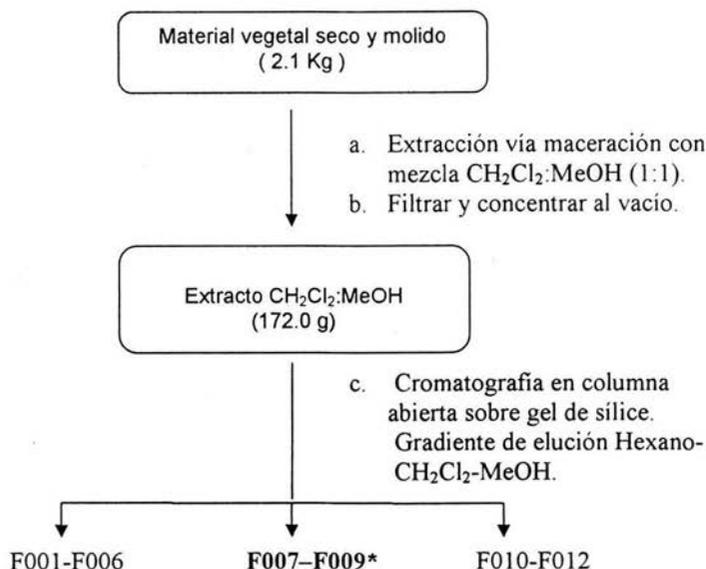
El material vegetal seco y molido de la especie *P. robinsonii* (2.1 Kg) se extrajo mediante un proceso de maceración utilizando una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH en una proporción 1:1. El extracto final se filtró y concentró al vacío obteniéndose 172.0 g de un residuo café-verdoso.

De la misma forma 250.0 g de hojas secas y molidas de *L. divaricata* se maceraron con una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) para así obtener 60.0 g de un residuo verdoso.

3.5 Estudio químico de las especies objeto de estudio.

3.5.1 Fraccionamiento primario del extracto total de *P. robinsonii*.

El extracto resultante (172.0 g) se sometió a un fraccionamiento primario utilizando gel de sílice como fase estacionaria (1.75 kg), el proceso de elución se efectuó con un gradiente de polaridad entre Hexano- CH_2Cl_2 -MeOH. Este proceso generó un conjunto de 12 fracciones primarias (F001-F012). En el Esquema 1 se resumen los procesos de extracción y fraccionamiento primario.



*** Fracciones activas**

Esquema 1. Extracción y fraccionamiento primario de la especie *P. robinsonii*.

La evaluación de las fracciones obtenidas sobre la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis*, permitió determinar que la actividad biológica se concentraba en las fracciones F007-F009. El proceso cromatográfico correspondiente al fraccionamiento primario del extracto total de *P. robinsonii* se resume en el Cuadro 4.

3.5.2 Aislamiento de la sakuranetina (17) y el β -sitosterol (37) a partir de las fracciones activas F007 y F008.

Las fracciones activas F007 y F008 (4.4 g) se combinaron con base en su similitud cromatográfica y se recromatografiaron mediante una cromatografía en columna abierta [43 g de gel de sílice; Hex (1:0) \Rightarrow CH₂Cl₂ (0:1) \Rightarrow MeOH (0:1)]. El proceso anterior generó un conjunto de 11 fracciones secundarias (F007-F008-I-F007-F008-XI).

De la fracción **F007-F008-IX** precipitaron de manera espontánea 585 mg de un sólido amorfo el cual se purificó mediante cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) empleando como sistema de elución CH_2Cl_2 -MeOH (9:1). De este proceso se obtuvieron 345 mg de la sakuranetina (**17**) como unos cristales blancos con un punto de fusión de 137–139 °C.

De la fracción secundaria **F007-F008-IV** precipitaron 74 mg de unos cristales de color blanco con punto de fusión 138–140 °C. Este compuesto se identificó como el β -sitosterol (**37**) por comparación con una muestra auténtica.

Cuadro 4. Fraccionamiento primario biodirigido mediante cromatografía en columna abierta del extracto total de *P. robinsonii*.

Fase móvil	Proporción	Eluatos	Fracciones reunidas	Clave
Hexano- CH_2Cl_2	9:1	1-3	1-4	F001
Hexano- CH_2Cl_2	8:2	4.-5	5-6	F002
Hexano- CH_2Cl_2	7:3	6-7	7	F003
Hexano- CH_2Cl_2	1:1	8-12	8	F004
Hexano- CH_2Cl_2	4:6	13-14	9-13	F005
Hexano- CH_2Cl_2	2:8	15-16	14-15	F006
CH_2Cl_2		17-24	16-20	F007*
CH_2Cl_2 -MeOH	9:1	25-29	21-25	F008*
CH_2Cl_2 -MeOH	8:2	30-35	26-33	F009*
CH_2Cl_2 -MeOH	7:3	36	34	F010
CH_2Cl_2 -MeOH	6:4	37	35-37	F011
CH_2Cl_2 -MeOH	1:1	38	38-40	F012
CH_2Cl_2 -MeOH	3:7	39		
MeOH		40		

*Fracciones activas

3.5.3 Aislamiento de la sakuranetina (**17**) a partir de la fracción primaria activa **F009**.

La fracción primaria activa **F009** (19.3 g) se recromatografió en una columna abierta de gel de sílice (150.0 g). El proceso de elución se llevó a cabo con Hex- CH_2Cl_2 -MeOH (diferentes proporciones). Este proceso generó un total de 12 grupos de fracciones

secundarias. De la fracción secundaria **F009-XII** cristalizaron de manera espontánea cantidades adicionales (1.14 g) de la sakuranetina (**17**) como un sólido cristalino blanco.

3.6 Estudio químico de la especie *Larrea divaricata*.

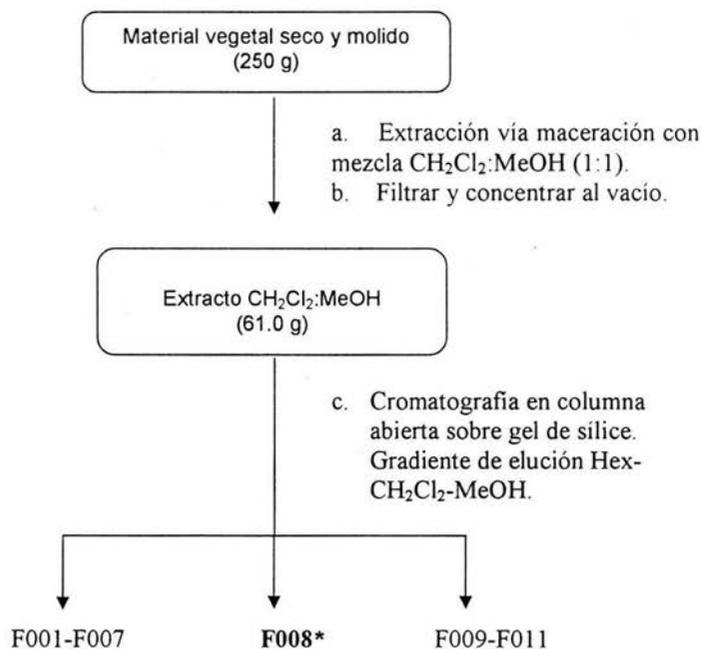
3.6.1 Fraccionamiento primario del extracto total de *L. divaricata*.

El extracto total de la especie *L. divaricata* (60.0 g) se fraccionó mediante una cromatografía en columna abierta, empleándose como fase estacionaria gel de sílice (600 g); el proceso de elución se efectuó con un gradiente de polaridad Hex-CH₂Cl₂-MeOH en diferentes proporciones (Cuadro 5). Este proceso permitió la obtención de 11 grupos de fracciones primarias (Esquema 2). Las fracciones resultantes se evaluaron de manera independiente mediante el ensayo MABA sobre *M. tuberculosis*. El resultado de estas evaluaciones permitió determinar que la actividad biológica se concentraba en la fracción primaria **F008**.

3.6.2 Aislamiento de la ermanina (38**) y la 6-hidroxiermanina (**39**) a partir de la fracción primaria activa **F008**.**

La fracción primaria activa **F008** fue recromatografiada mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (50.0 g) utilizando como fase móvil Hex-CH₂Cl₂-MeOH. Este proceso generó un conjunto de 15 fracciones secundarias. La resolución de la fracción secundaria **F008-IV** mediante CCFP [eluyente: Hex-CH₂Cl₂-MeOH (1:94:5)] permitió la obtención de 13.0 mg de un sólido amarillo con un punto de fusión de 236–238 °C. Este producto fue identificado como la 6-hidroxiermanina (**39**).

De la fracción secundaria **F008-VII** cristalizaron de manera espontánea 52 mg de unos cristales en forma de agujas amarillas con punto de fusión de 266–268 °C. Este producto fue identificado como la ermanina (**38**).



*Fracción activa

Esquema 2. Extracción y fraccionamiento primario de la especie *Larrea divaricata*.

3.6.3 Aislamiento del ácido nordihidroguaiarético (19) a partir de la fracción primaria F008-IX.

El ácido nordihidroguaiarético (19) (685 mg) fue aislado de la fracción secundaria F008-IX [$\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ (95:5)] mediante sucesivas cromatografías preparativas en capa delgada utilizando como sistema de elución $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ (95:5). El producto se obtuvo como un sólido rojizo, con un punto de fusión de 179–180 °C.

Cuadro 5. Fraccionamiento primario biodirigido mediante cromatografía en columna abierta del extracto total de *L. divaricata*.

Sistema de elución	Proporción	Eluatos	Fracciones reunidas	Clave
Hexano-CH ₂ Cl ₂	9:1	1-6	1-6	F001
Hexano-CH ₂ Cl ₂	8:2	7-10	7-13	F002
Hexano-CH ₂ Cl ₂	7:3	11-13	14-15	F003
Hexano-CH ₂ Cl ₂	1:1	14-21	16-21	F004
Hexano-CH ₂ Cl ₂	4:6	22-25	22-31	F005
Hexano-CH ₂ Cl ₂	3:7	26-33	32-48	F006
Hexano-CH ₂ Cl ₂	2:8	34-39	49-53	F007
CH ₂ Cl ₂		40-52	54-61	F008*
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	9:1	53-62	62-69	F009
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	8:2	63-69	70-77	F010
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	6:4	70-78	78-95	F011
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	1:1	79-86		
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	3:7	87-92		
MeOH		93-95		

*Fracción activa

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Selección primaria de las especies *Phoradendron robinsonii* Urban y *Larrea divaricata* Cov. como candidatos idóneos para la obtención de principios antimicobacterianos.

La selección primaria de las especies *P. robinsonii* y *L. divaricata* se realizó con base en consideraciones de tipo etnomédico. Este criterio tiene su fundamento en el hecho de que las plantas utilizadas en las prácticas médicas populares han demostrado ser de primordial importancia para el descubrimiento de principios bioactivos con posible aplicación terapéutica (Cox y Balick, 1994; Prance, 1994).

Una vez realizado el proceso de selección primaria, se procedió a la recolección de las especies y a la preparación de los extractos orgánicos en pequeña escala. Los resultados obtenidos de la evaluación del efecto de los extractos orgánicos de *P. robinsonii* y *L. divaricata* sobre el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, permitieron determinar el potencial antimicobacteriano de los mismos (Cuadro 6). En consecuencia ambas especies se seleccionaron para conducir un estudio biodirigido y así obtener los principios activos responsables del efecto antibacteriano.

Cuadro 6. Efecto de los extractos CH₂Cl₂:MeOH (1:1) de las especies *P. robinsonii* y *L. divaricata* sobre el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*.

Muestra evaluada	Actividad antimicobacteriana % de inhibición
<i>P. robinsonii</i> ^b	100
<i>L. divaricata</i> ^b	99
rifampina ^a	97

^a control positivo (0.015 µg/mL)

^b concentración evaluada de los extractos 100 µg/mL.

4.2 Aislamiento y purificación de los principios activos de la especie *P. robinsonii*.

La preparación del extracto vegetal destinado a la separación y purificación de los principios antimicobacterianos presentes en la especie *P. robinsonii* se realizó mediante un

proceso de maceración con una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH (1:1) como disolvente. El extracto activo se fraccionó mediante una cromatografía en columna abierta, usando gel de sílice como fase estacionaria. Este proceso generó un conjunto de doce fracciones primarias [F001-F012]. La evaluación del efecto antifímico de las mismas mediante el ensayo azul Alamar (Cantrell *et al.*, 1998) indicó que la actividad antimicobacteriana se concentraba en las fracciones **F007-F009**. Los resultados de dicha evaluación se muestran a continuación:

Cuadro 7. Actividad antimicobacteriana de las fracciones primarias de *P. robinsonii*.

Fracción evaluada	% inhibición sobre el crecimiento de <i>M. tuberculosis</i>	
	100 µg/mL	33 µg/mL
F007	99	97
F008	100	100
F009	99	98
Rifampina^a	98	98

^a control positivo (0.031 µg/mL)

Posteriormente, la resolución de las fracciones activas mediante la aplicación de diversas técnicas cromatográficas condujo al aislamiento de la sakuranetina (17), flavonoide descrito anteriormente en la especie relacionada *P. coryae* (Domínguez *et al.*, 1971) y el β-sitosterol (37). En el Cuadro 8 se muestran las estructuras de los compuestos aislados, su rendimiento con relación al peso del material vegetal seco y las fracciones de donde se obtuvieron.

4.2.1 Caracterización de los compuestos aislados.

De manera general, la caracterización de los compuestos aislados en el presente estudio se realizó mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas

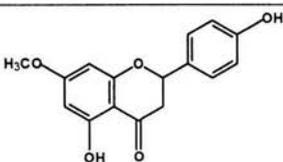
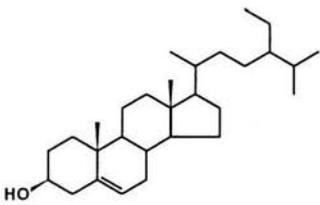
4.2.1.1 Caracterización de la sakuranetina (17).

La sakuranetina (17), fue aislada como un sólido cristalino blanco, con un punto de fusión de 137-139 °C. Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del producto se resumen en la Tabla 1.

El espectro en el IR, presentó bandas de absorción características para grupos hidroxilo (3363 cm^{-1}), carbonilo de γ -pirona (1640 cm^{-1}) y dobles enlaces (1618 , 1519 , 828 y 773 cm^{-1}).

Las constantes espectroscópicas antes mencionadas, así como consideraciones de tipo quimiotaxonómico (Dominguez *et al.*, 1971), permitieron sugerir la naturaleza flavonoide del compuesto (Dosaji *et al.*, 1983; Dominguez *et al.*, 1971; Timmermann *et al.*, 1979).

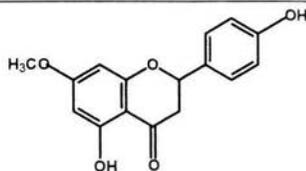
Cuadro 8. Metabolitos secundarios aislados de las fracciones primarias de *P. robinsonii*.

COMPUESTO	RENDIMIENTO (%)	FRACCIÓN
 <p>sakuranetina (17)</p>	8.2×10^{-2}	F007-F009
 <p>β-sitosterol (37)</p>	3.5×10^{-3}	F007-F008

El espectro de masas (Espectro 1), generado por la técnica de impacto electrónico, del compuesto 17 presentó un ión molecular con una relación masa-carga (m/z) de 286 uma, el cual corresponde a la fórmula $C_{16}H_{14}O_5$.

El patrón de fragmentación (Figura 3) observado en el espectro de masas, así como, el análisis detallado de los espectros de RMN (Espectros 2 y 3) indicaron que el producto (17) era una flavanona (Dosaji *et al.*, 1983; Dominguez *et al.*, 1971; Timmermann *et al.*, 1979). Las características más relevantes observadas en estos últimos se indican a continuación:

Tabla 1. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la sakuranetina (17).



sakuranetina (17)

Fórmula molecular	C ₁₆ H ₁₄ O ₅
Punto de fusión	137-139 °C
IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) cm ⁻¹	3363, 1640, 1618, 1573, 1519, 1204, 1191, 1157, 1088, 828, 773
EMIE m/z (int.rel.)	286 [M ⁺ , 100], 269 (7), 193 (27), 167 (78)
(Espectro 1)	
RMN- ¹ H (CDCl ₃) 300 MHz	12.01 (<i>s</i> , OH-5), 7.32 (<i>d</i> , $J=8.1$ Hz, H-2' y H-6'), 6.88 (<i>d</i> , $J=9.0$ Hz, H-3' y H-5'), 6.07 (<i>d</i> , $J=2.1$ Hz, H-6), 6.04 (<i>d</i> , $J=2.4$ Hz, H-8), 5.35 (<i>dd</i> , $J=3.0$ y 12.6 Hz, H-2) 5.35 (<i>s</i> , OH-4'), 3.58 (<i>s</i> , OCH ₃), 3.09 (<i>dd</i> , $J=12.7$ y 17.1 Hz, H-3 _B), 2.78 (<i>dd</i> , $J=3.0$ y 17.4 Hz, H-3 _A)
(Espectro 2)	
RMN- ¹³ C (CDCl ₃) 75 MHz	196.14 (C-4), 168.03 (C-4'), 164.01 (C-7), 162.90 (C-5), 156.13 (C-10), 130.48 (C-1'), 127.93 (C-2' y C-6'), 115.66 (C-3' y C-5'), 103.14 (C-9), 95.11 (C-8), 94.28 (C-6), 78.94 (C-2), 55.65 (OCH ₃), 43.13 (C-3)
(Espectro 3)	

1) En δ_{H} 12.01 y 5.35 se observan dos singuletes asignables a dos grupos hidroxilo. El desplazamiento químico de la primera señal sugirió que uno de los hidroxilos se encuentra quelatado con un grupo carbonilo. Ambas señales desaparecen al equilibrar el espectro con D₂O.

2) En δ_{H} 7.32 (*d*, $J=8.1$ Hz, H-2' y H-6') y 6.88 (*d*, $J=9.0$ Hz, H-3' y H-5') se observa un sistema A₂B₂ congruente con la presencia de un anillo aromático *para* sustituido. Este anillo es asignable al anillo B ubicado en la posición C-2 de un flavonoide. La presencia en

Resultados y Discusión

el espectro de masas del fragmento en m/z 193 (Figura 3) es congruente con la presencia de un grupo hidroxilo en la posición C-4' del anillo B.

3) De manera adicional, en la región aromática se aprecia un sistema AB en δ_H 6.07 (d , $J=2.1$ Hz, H-6) y 6.04 (d , $J=2.4$ Hz, H-8). Las señales del sistema son asignables a dos hidrógenos aromáticos *meta* relacionados. Estas señales correlacionan en el espectro de correlación heteronuclear (HETCOR) (Espectro 3a) con los metinos en δ_C 94.28 y 95.11.

4) En δ_H 5.35 (dd , $J=3.0$ y 12.6 Hz, H-2) se observa un doblete de doblete atribuible al protón H-2 de una flavanona. Esta señal correlaciona con el metileno en δ_C 78.94 en el espectro HETCOR (Espectro 3a).

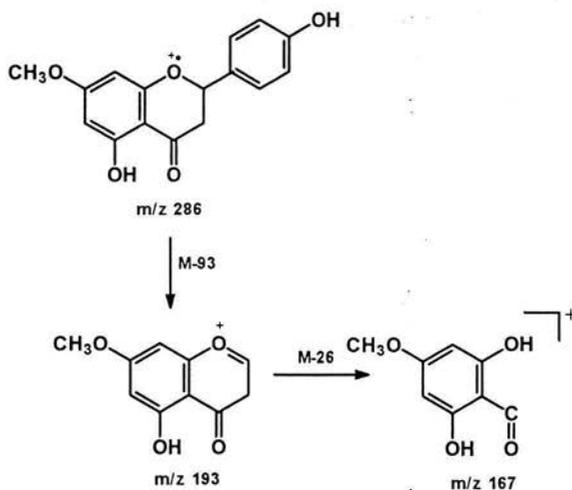


Figura 3. Patrón de fragmentación de la sakuranetina (17).

5) En δ_H 3.8 se observa un singulete característico de un grupo metoxilo. Esta señal correlaciona en el espectro HETCOR con la señal en δ_C 55.65.

6) Finalmente, en δ_H 3.09 (dd , $J=12.7$ y 17.1 Hz, H-3_B) y 2.78 (dd , $J=3.0$ y 17.4 Hz, H-3_A) se aprecian las señales características del metileno en C-3 de compuestos de tipo flavanona. Estas señales correlacionan con la señal del metileno en δ_C 43.13 en el espectro HETCOR y con la señal en δ_H 5.35 (H-2) en el espectro COSY.

Con base en las evidencias presentadas, el compuesto **17** se identificó como la sakuranetina, flavanona previamente descrita en la especie *P. coryae* (Dominguez *et al.*, 1971). Cabe destacar que el aislamiento de este metabolito a partir de *P. robinsonii* constituye el segundo reporte de su presencia en el género *Phoradendron*.

4.2.1.2 Caracterización del β -sitosterol (37).

El β -sitosterol (37) identificado como un sólido cristalino color blanco con punto de fusión de 138-140 °C fue caracterizado por comparación de sus constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas con aquellas de una muestra auténtica.

4.3 Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios activos de la especie *L. divaricata*.

La preparación del extracto activo en mediana escala de la especie *L. divaricata* se realizó mediante un proceso de maceración como se indicó en la sección experimental (inciso 3.4). Posteriormente, el extracto se fraccionó de manera preliminar mediante una cromatografía en columna abierta, usando gel de sílice como adsorbente. Este procedimiento permitió la obtención de once conjuntos de fracciones primarias (Cuadro 5, sección experimental). Cada una de las fracciones primarias se evaluó mediante el ensayo de azul de alamar encontrándose que la actividad antimicobacteriana se concentraba en la fracción primaria **F008**.

Cuadro 9. Actividad antimicobacteriana de las fracciones primarias de *L. divaricata*.

Fracción evaluada	% inhibición sobre el crecimiento de <i>M. tuberculosis</i>	
	100 $\mu\text{g/mL}$	33 $\mu\text{g/mL}$
F008	100	63
Rifampina^a	98	98

^a control positivo (0.031 $\mu\text{g/mL}$)

La fracción primaria activa F008 fue sometida a sucesivos fraccionamientos aplicando

los métodos cromatográficos convencionales con la finalidad de aislar los compuestos activos responsables de la actividad antifimica. Así, fue posible aislar dos compuestos de tipo flavonoide [ermanina (38) y 6-hidroxiermanina (39)] y un lignano [ácido nordihidroguaiarético (19)]. En el Cuadro 10 se indican las estructuras de los compuestos identificados y sus rendimientos con base en el peso seco de la droga cruda.

4.3.1 Caracterización de los compuestos aislados.

En general, los compuestos aislados se caracterizaron mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

4.3.1.1 Caracterización de la ermanina (38) y la 6-hidroxiermanina (39).

La ermanina (38), fue aislada como un sólido cristalino amarillo, con un punto de fusión de 266-268 °C. Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del producto se resumen en la Tabla 2.

El espectro en el IR, presentó bandas de absorción características para grupos hidroxilo (3284 cm^{-1}), carbonilo de γ -pirona (1660 cm^{-1}) y dobles enlaces (1608 , 1510 , 995 y 802 cm^{-1}).

La información proporcionada por los espectros de masas y de RMN (Espectros 4 - 6), permitieron comprobar que el producto 38 era un flavonoide con un núcleo de tipo flavonol (Figura 4) (Harborne *et al.*, 1994).

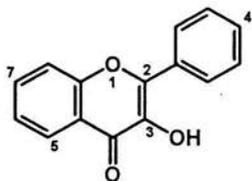


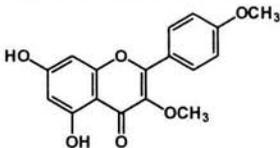
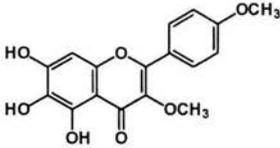
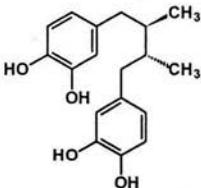
Figura 4. Núcleo de tipo flavonol.

El ión molecular observado en el espectro de masas mostró una relación masa-carga (m/z) de 314 uma y correspondió a la fórmula $C_{17}H_{14}O_6$.

Las características más importantes de los espectros de RMN se resumen a continuación:

1) En δ_H 12.69 y 9.6 se observan dos señales atribuibles a dos grupos hidroxilo. Estas señales desaparecen al equilibrar el espectro con D_2O .

Cuadro 10. Metabolitos secundarios aislados de las fracciones primarias de *L. divaricata*.

COMPUESTO	RENDIMIENTO (%)
 <p>ermanina (38)</p>	0.021
 <p>6-hidroxiermanina (39)</p>	5.2×10^{-3}
 <p>ácido nordihidroguaiarético (19)</p>	0.274

2) En δ_H 7.99 (*d*, $J=9.3$ Hz, H-2' y H-6') y 6.97 (*d*, $J=9.0$ Hz, H-3' y H-5') se observa la presencia de un sistema A_2B_2 característico de un anillo aromático *para* sustituido. Las señales del sistema A_2B_2 correlacionan en el espectro HETCOR con los metinos en δ_C 129.70 y 115.32, respectivamente.

3) En δ_H 6.46 ($d, J=2.1$ Hz, H-8) y 6.32 ($d, J=2.4$ Hz, H-6) se observa un sistema AB diagnóstico de dos hidrógenos aromáticos *meta* relacionados. Estas señales correlacionan en el espectro HETCOR con los δ_C 97.27 y 91.50, respectivamente.

4) En δ_H 3.88 y 3.84 se observan dos singuletes asignables a dos grupos metoxilos. Estas señales correlacionan en el espectro HETCOR con las absorciones en δ_C 59.43 y 55.25, respectivamente.

La ausencia de la señal característica del OH-3 de un flavonol en el espectro de RMN- 1H , sugiere que la molécula es un 3-metoxi-flavonol. Además el producto contiene otro grupo metoxilo y dos hidroxilos, uno de los cuales debía encontrarse en C-5, de acuerdo al desplazamiento químico observado a un hidroxilo en δ_H 12.7 en el espectro de RMN- 1H . Al comparar las señales de ^{13}C y 1H del producto **38** con las de una serie de derivados de la kumatakenina (**25**) descritos en la literatura (Valesi *et al.*, 1972; Timmermann *et al.*, 1979) se encontró que las mismas correspondían a las de la ermanina. Así, con base en las evidencias anteriores la estructura del compuesto **38** se estableció como la de la ermanina.

Finalmente, cabe destacar que este es el primer reporte de este metabolito en la especie *L. divaricata*. Sin embargo, la ermanina (**38**) se ha aislado previamente de algunas especies de los géneros *Betula*, *Cistus*, *Flourensia* y *Cardus*, entre otras (Proksch *et al.*, 1984).

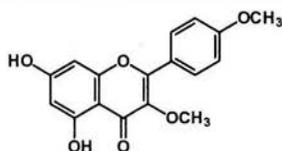
La 6-hidroxiermanina (**39**) se obtuvo como un sólido amarillo con punto de fusión de 236-238 °C. Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del producto se resumen en la Tabla 3.

El espectro en el IR, evidenció la presencia de grupos hidroxilo (3404 y 3255 cm^{-1}) y de una función γ -pirona (1600 cm^{-1}). El espectro de masas generado por la técnica de impacto electrónico permitió determinar su fórmula molecular como $C_{17}H_{14}O_7$. El ión molecular observado en m/z de 330 una tenía 16 unidades de masa más que para el producto **38**.

Los espectros de RMN (Espectros 8 y 9), resultaron muy similares a los del producto (**38**), difiriendo fundamentalmente en el caso del producto **39** en la ausencia del

sistema AB característico de dos hidrógenos aromáticos *meta* relacionados. En su lugar se observa un singulete en δ_H 6.42 y un singulete ancho en δ_H 9.65. Esta última señal desaparece al equilibrar el espectro con D_2O , por lo que se asignó a un grupo fenólico. Así, la diferencia entre los productos **38** y **39** radica en el grado de hidroxilación del anillo A. Estas observaciones, aunadas a la diferencia de 16 unidades de masa en el EM permitía inferir que el producto **39** era la 6-hidroxiermanina. Cabe destacar que este producto también se describe por vez primera como constituyente de la especie *L. divaricata*.

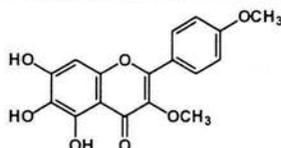
Tabla 2. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la ermanina (**38**).



ermanina (**38**)

Fórmula molecular	$C_{17}H_{14}O_6$
Punto de fusión	266-268 °C
IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1}	3404, 3255, 1600, 1498, 1346, 1286, 1228, 1172, 999, 823
EMIE m/z (int.rel.)	314 [M^+] (100), 271 (33), 121 (23), 57 (33)
(Espectro 4)	
RMN- 1H ($CDCl_3$) 300 MHz	12.69 (s, OH-5), 9.65 (sa, OH-7), 7.99 (d, $J=9.3$ Hz, H-2' y H-6'), 6.97 (d, $J=9.0$ Hz, H-3' y H-5'), 6.46 (d, $J=2.1$ Hz, H-8), 6.32 (d, $J=2.4$ Hz, H-6), 3.88 (s, OCH_3 -3), 3.84 (s, OCH_3 -4')
(Espectro 5)	
RMN- ^{13}C ($CDCl_3$) 75 MHz	178.21 (C-4), 159.78 (C-5), 161.33 (C-7), 164.82 (C-4'), 156.20 (C-9), 156.10 (C-2), 129.70 (C-2' y C-6'), 120.7 (C-3 y C-1'), 115.32 (C-3' y C-5'), 105.40 (C-10), 97.27 (C-8), 91.50 (C-6), 59.43 (OCH_3 -3), 55.25 (OCH_3 -4')
(Espectro 6)	

Tabla 3. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la 6-hidroxiermanina (39).



6-hidroxiermanina (39)

Fórmula molecular	C ₁₇ H ₁₄ O ₇
Punto de fusión	236-238 °C
IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) cm ⁻¹	3404, 3255, 1600, 1498, 1346, 1286, 1228, 1172, 999, 823
EMIE m/z (int. rel.)	330 [M ⁺] (100), 271 (33), 121 (23), 57 (33)
(Espectro 7)	
RMN- ¹ H (CDCl ₃) 300 MHz	12.25 (<i>s</i> , OH-5), 9.65 (<i>sa</i> , OH-6 y OH-7), 8.10 (<i>d</i> , $J=9.3$ Hz, H-2' y H-6'), 6.96 (<i>d</i> , $J=9.0$ Hz, H-3' y H-5'), 6.42 (<i>s</i> , H-8), 3.96 (<i>s</i> , OCH ₃ -3), 3.83 (<i>s</i> , OCH ₃ -4')
(Espectro 8)	
RMN- ¹³ C (CDCl ₃) 75 MHz	178.63 (C-4), 153.13 (C-5), 156.16 (C-7), 125.87 (C-6), 159.85 (C-4'), 120.96 (C-1'), 137.47 (C-3), 143.36 (C-2), 130.12 (C-2' y C-6'), 104.71 (C-10), 115.26 (C-3' y C-5'), 152.91 (C-9), 94.47 (C-8), 59.44 (OCH ₃ -3), 55.93 (OCH ₃ -4')
(Espectro 9)	

4.3.2 Caracterización del ácido nordihidroguaiarético (19).

El ácido nordihidroguaiarético (19), fue aislado como un sólido cristalino amarillo, con un punto de fusión de 179-180 °C. Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del producto se resumen en la Tabla 4.

El espectro en el IR, presenta bandas de absorción características para grupos hidroxilo (3462 y 3195 cm⁻¹) y aromaticidad (2962, 1238, 960 y 789cm⁻¹). El espectro de masas generado por la técnica de impacto electrónico presenta un ión molecular en una relación masa-carga (m/z) de 302 uma y corresponde a la fórmula C₁₈H₂₂O₄.

La información proporcionada por la espectrometría de masas y el análisis de los espectros de RMN (Espectros 10-12), así como, consideraciones de tipo quimiotaxonomico permitieron comprobar que el producto **19** era un lignano del tipo aril butano (Ayres *et al.*, 1990), sustituido en las posiciones C-3, C-4, C-3' y C-4' con grupos hidroxilo. Las características más importantes observadas en los espectros de RMN se indican a continuación:

1) En δ_H 6.66 (*d*, $J=8.0$ Hz, H-5 y 5'), 6.58 (*d*, $J=2.0$ Hz, H-2 y 2') y 6.45 (*dd*, $J=2.5$ y 8.0 Hz, H-6 y 6'), se observan las señales asignables a los protones de los anillos aromáticos del núcleo base.

2) En el espectro de RMN- ^{13}C las señales de los anillos aromáticos aparecen en δ_C 145.96 (C-3 y 3'), 144.11 (C-4 y 4'), 134.88 (C-1 y 1'), 121.47 (C-6 y 6'), 117.02 (C-2 y 2') y 116.18 (C-5 y 5'). El conjunto de señales descrito sugiere la presencia de anillos aromáticos trisustituídos. Así mismo, el desplazamiento químico de las señales en δ_C 145.96 y 144.11, indica que dos de los sustituyentes de los anillos aromáticos son oxigenados.

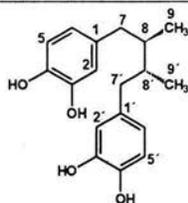
3) Finalmente, los espectros contienen las señales diagnósticas para la cadena propanoide del núcleo base. En primer lugar se observan las señales para los hidrógenos bencílicos y en δ_H 2.64 (*dd*, $J=5.0$ y 13.5 Hz, H-7_A y 7_A') y 2.16 (*dd*, $J=9.0$ y 13.5 Hz, H-7_B y 7_B'). En δ_H 1.69 se observa la señal del metino en C-8 y 8'. Por último en δ_H 0.80 se observa un doblete ($J=6.5$ Hz) asignable a los metilos terminales de la cadena propanoide. Con base en las evidencias presentadas el producto natural se caracterizó como el ácido nordihidroguaiarético (**19**), metabolito aislado en un estudio fitoquímico previo a partir de la misma especie (Ayres *et al.*, 1990). Además, las constantes espectroscópicas y espectrométricas se encuentran en perfecta armonía con las descritas en la literatura.

4.4 Actividad antimicobacteriana de los productos naturales aislados.

El potencial antifímico de los productos naturales aislados a partir de las especies *P. robinsonii* y *L. divaricata* se resume en la Tabla 5. Los resultados obtenidos utilizando el bioensayo descrito en la parte experimental (inciso 3.3), se encuentran expresados como

concentraciones mínimas inhibitorias (CMI). El criterio de actividad empleado considera como activo a un compuesto que presente una CMI menor o igual a 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Cantrell *et al.*, 1998)

Tabla 4. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del ácido nordihidroguaiarético (19).



ácido nordihidroguaiarético (19)

Fórmula molecular	$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_4$
Punto de fusión	179-180 °C
IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) cm^{-1}	3462, 3195, 2962, 2866, 1610, 1516, 1142, 1238, 960, 789
EMIE m/z (int.rel.) (Espectro 10)	302 [M^+] (42), 123 (100), 77 (8)
RMN- ^1H (CD $_3$ OD) 500 MHz (Espectro 11)	6.66 (<i>d</i> , $J=8.0$ Hz, H-5 y 5'), 6.58 (<i>d</i> , $J=2.0$ Hz, H-2 y 2'), 6.45 (<i>dd</i> , $J=2.5$ y 8.0 Hz, H-6 y 6'), 4.83 (<i>s</i> , OH-4, 4' y OH-5, 5'), 2.64 (<i>dd</i> , $J=5.0$ y 13.5 Hz, H-7 _A y 7 _A '), 2.16 (<i>dd</i> , $J=9.0$ y 13.5 Hz, H-7 _B y 7 _B '), 1.69 (<i>m</i> , H-8 y 8'), 0.80 (<i>d</i> , $J=6.5$ Hz, H-9 y 9')
RMN- ^{13}C (CD $_3$ OD) 125 MHz (Espectro 12)	145.96 (C-3 y 3'), 144.11 (C-4 y 4'), 134.88 (C-1 y 1'), 121.47 (C-6 y 6'), 117.02 (C-2 y 2'), 116.18 (C-5 y 5'), 40.52 (C-8 y 8'), 39.62 (C-7 y 7'), 16.59 (C-9 y 9')

Con base en estas consideraciones, todos los compuestos aislados presentaron una actividad antifúngica significativa. A la fecha no se ha descrito ningún estudio relacionado con la actividad antimicobacteriana para estos compuestos, de tal forma que este trabajo representa el primer reporte de actividad antifúngica de los productos naturales aislados.

Tabla 5. Actividad antimicobacteriana de los productos naturales aislados a partir de las especies *P. robinsonii* y *L. divaricata*.

Compuesto evaluado	Actividad antimicobacteriana Concentración Mínima Inhibitoria CMI ($\mu\text{g/mL}$)
sakuranetina (17)	128
ermanina (38)	50
6-hidroxiermanina (39)	50
ácido nordihidroguaiarético (19)	50
rifampina ^a	0.25

^a control positivo

V. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

1. Los resultados de la presente investigación corroboraron que la preselección de especies vegetales con base en el criterio etnomédico en conjunto con la determinación del potencial biológico mediante evaluaciones apropiadas puede conducir al descubrimiento de productos de posible utilidad terapéutica.
2. El estudio fitoquímico biodirigido del extracto antimicobacteriano preparado a partir de la especie *P. robinsonii* permitió el aislamiento de dos metabolitos secundarios identificados como la sakuranetina (17) y el β -sitosterol (37). Cabe destacar que la sakuranetina presentó una actividad inhibitoria significativa del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* (CIM 128 $\mu\text{g/mL}$) y se describe por primera vez en esta especie.
3. El estudio fitoquímico biodirigido del extracto antifímico a partir de las hojas de la especie *L. divaricata* permitió el aislamiento de dos flavonoides identificados como la ermanina (38) y la 6-hidroxiermanina (39), además del ácido nordihidroguaiarético (19). Este estudio representa el primer reporte de los compuestos 38 y 39 en esta especie. Todos los productos naturales aislados presentaron una actividad inhibitoria significativa (CIM 50 $\mu\text{g/mL}$, en todos los casos) del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* y podrían constituir prototipos apropiados para el desarrollo de nuevos fármacos antifímicos.
4. La presente investigación fitoquímica constituye una contribución original al conocimiento del contenido metabólico secundario de los géneros *Phoradendron* y *Larrea* y de la flora medicinal de las zonas áridas de México.

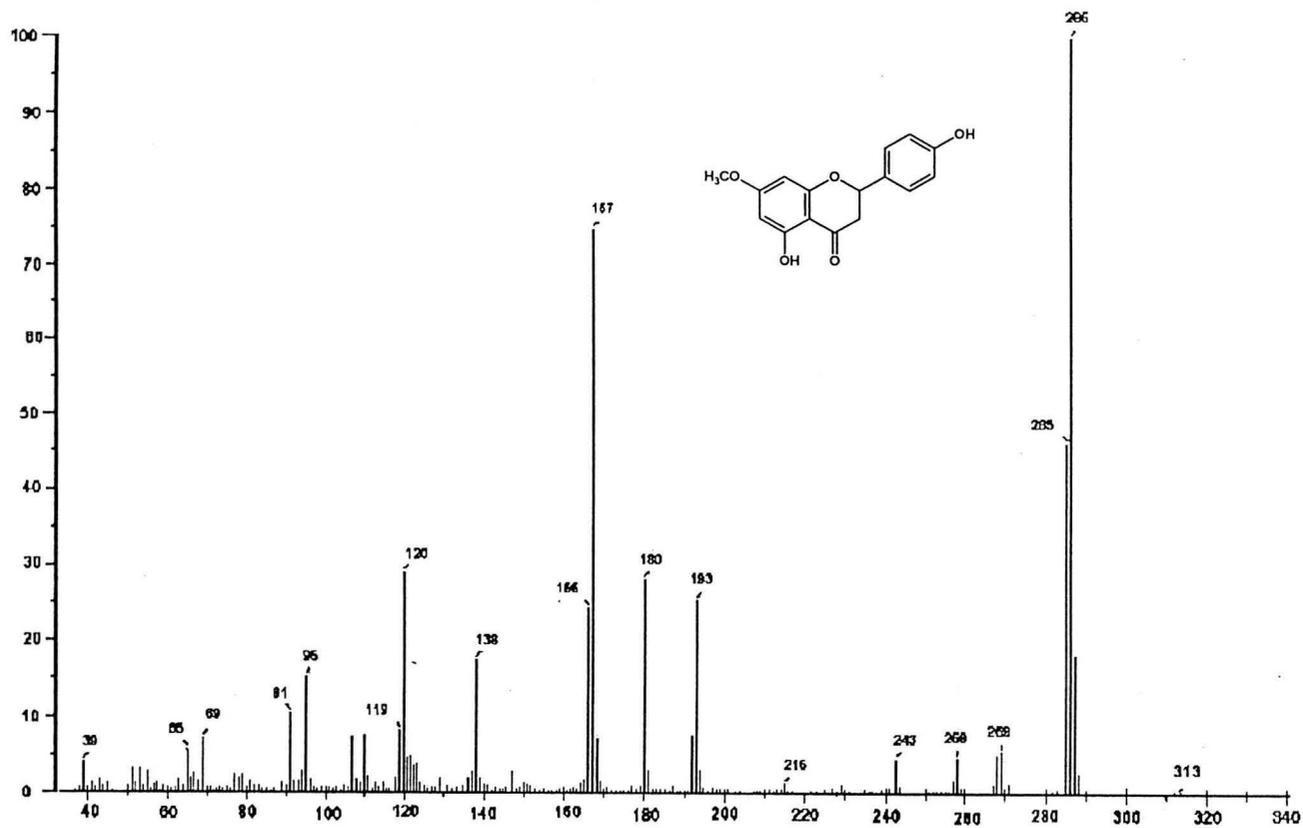
VI. BIBLIOGRAFIA.

1. Ayres, D. C. and Loine, J. D. (1990). Lignans. Chemical, biological and clinical properties. 1a edición. Edit. Cambridge University Press, New York.
2. Cantrell, C., Fischer, N., Urbatsch, L., McGuire, M. and Franzblau, S. (1998). Antimycobacterial crude extract from South, Central and North America. *Phytomedicine*, **5** (2), 137.
3. Collins, L. and Franzblau, S. (1997). Microplate Alamar Blue Assay Versus BACTEC 460 system for high throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**, 1004.
4. Cox, P. A. and Balick, M. J. (1994). The ethnobotanical approach to drug discovery. *Scientific American*, **82**.
5. Domínguez, X. A., Armas, B. A. and Jáuregui, F. (1972). Estudio químico del *Phoradendron coryae*. *Revista Latinoamericana de Química*, **3**, 28.
6. Domínguez, X. A., Rojas, P. and Ridaura, S. V. (1971). Oleanolic acid from *Phoradendron greggii*. *Phytochemistry*, **10**, 1962.
7. Dossaji, S. F., Becker, H. and Exner, J. (1983). Flavone C-glycosides of *Phoradendron tomentosum* from different host trees. *Phytochemistry*, **22**, 311.
8. Evans, W. C. (2002). Pharmacognosy, 15a edición. Edit B. Saunders. Londres.
9. Franzblau, S. G., Witzig, R. S., McLaughlin, J. C., Torres, P., Madico, G., Hernandez, A., Dignan, M. T., Cook, M. B., Quenzer, V. K., Ferguson, R. M. and Guilman, R. H. (1998). Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the Microplate Alamar Blue Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, 362.

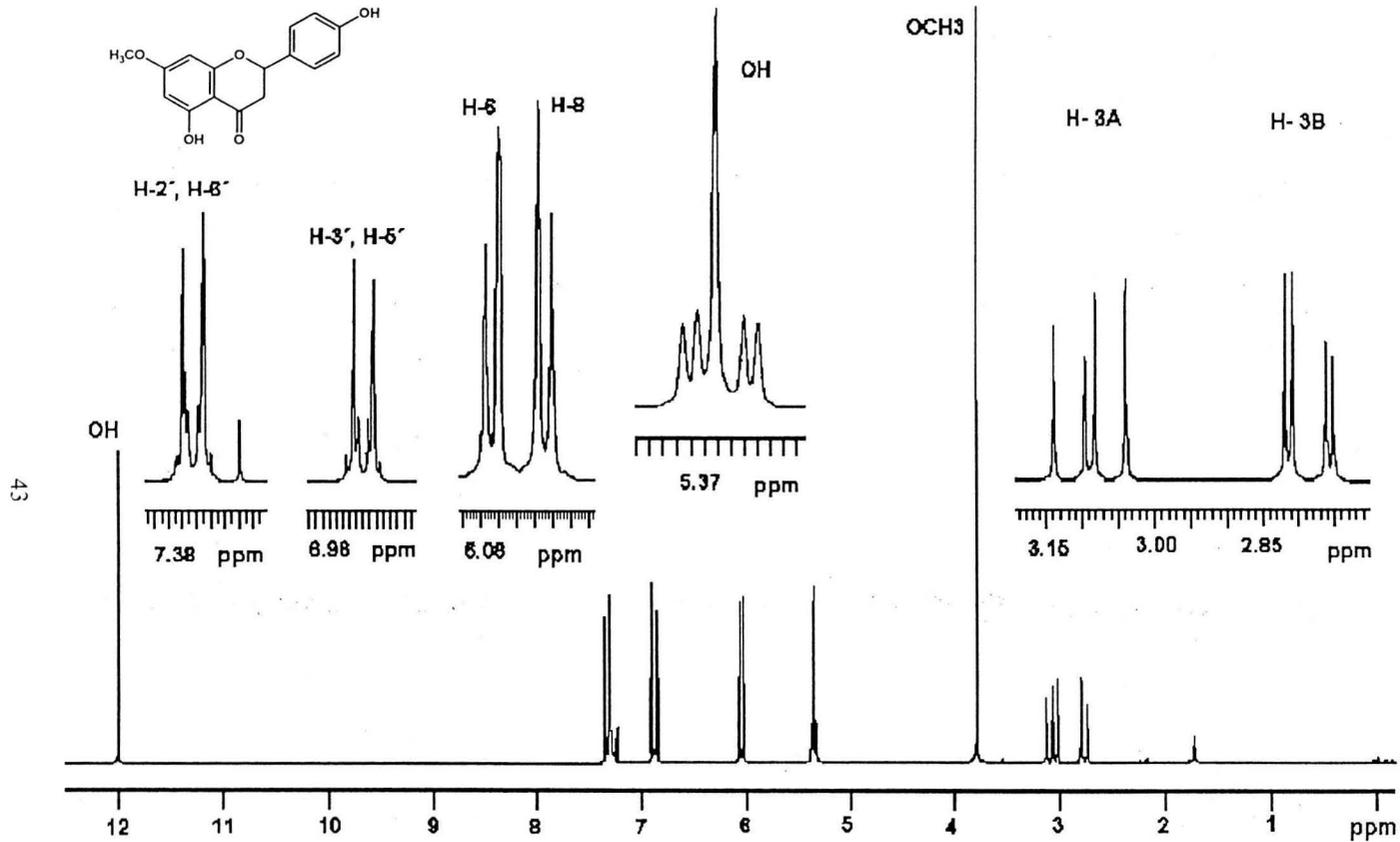
10. Goodman, G., Hardman, J., Limbird, L., Molinoff, P. and Ruddon, R. (2000). Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10a edición. Edit. McGraw-Hill Interamericana, México D.F., Tomo II cap. 48. 2176 pp
11. Joklik, W., Willet, and Amos, B. (1996). Zinsser Microbiología. 20a edición. Edit. Médica Panamericana. Buenos Aires. cap 34. 1454 pp.
12. Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C. and Winn, W. C. Jr. (1997). Diagnostic Microbiology. 5th edition. Lippincott. Philadelphia.
13. Marcel, D. (1992). Chromatographic Science Series: Modern Thin-Layer chromatographic. Edit. Nelu Grinberg. New York.
14. Martínez, M. (1989). Las plantas medicinales de México. Sexta edición. Ed. Botas. México, D. F. 656 pp.
15. Newton, S., Lau, C., Sudagar, S. G., Gurdyal, S. B. and Colin, W. W. (2002). The evaluation of forty-three plant for in vitro antimycobacterial activities; isolation of active constituents from *Psoralea coryfolia* and *Sanguinaria Canadensis*. *Journal of Ethnopharmacology*. **79**, 57.
16. Niembro R., A. (1986). Árboles y arbustos útiles de México. Ed. Limusa. México, D. F. 206 pp.
17. Pederiva, R., Kavka, J. and D'Arcangelo, A.T. (1975). *Anuario de la Asociación Química Argentina.*, **63**, 85.
18. Prance, G.T. (1994). Ethnobotany and the search for new drugs. Ciba Foundation Symposium 185. Edit. John Wiley and Sons, New York. 290 pp.
19. Proksch, P. and Gülz, P. G. (1984). Methylated flavonoids from *Cistus ladanifer* and *Cistus palhinhae* and their taxonomic implications. *Phytochemistry*, **23**, 470.

20. Sakakibara, M., Timmermann, B. N., Nakatani, N., Waldrum, H. and Mabry, T. J. (1975). New 8-hydroxyflavonols from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry*, **14**, 849.
21. Sakakibara, M., di Feo, Jr. D., Nakatani, N., Timmermann, B. and Mabry, T. J. (1976). Flavonoid methyl ethers on the external leaf surface of *Larrea tridentata* and *L. divaricata*. *Phytochemistry*, **15**, 727.
22. Sakakibara, M., Mabry, T. J., Bouillant, M. L. and Chopin, J. (1977). 6,8-diglucosylflavones from *Larrea tridentata* (Zygophyllaceae). *Phytochemistry*, **16**, 1113.
23. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *Antituberculosis drug resistance in the world*. Report No. 2. Geneva. World Health Organization. 2000.
24. Timmermann, B. N., Valesi, A. G. and Mabry, T. J. (1979). Flavonoids from *Larrea nitida* and *L. cuneifolia* (Zygophyllaceae). *Revista Latinoamericana de Química*, **10**, 81.
25. Timmermann, B., Wächter, G., Valcic, S., Hutchinson, B., Casler, C., Henzel, J., Ram, S., Currim, F., Manak, R., Franzblau, S., Maiese, W., Galinis, D., Suarez, E., Fortunato, R., Saavedra, E., Bye, R., Mata, R. y Montenegro, G. (1999). The Latin American: ICBG: The First Five Years. *Pharmaceutical Biology*, **37**, 35.
26. Valesi, A. G., Rodríguez, E., Vander, V. G. and Mabry, T. J. (1972). Methylated flavonols in *Larrea cuneifolia*. *Phytochemistry*, **11**, 2821.
27. WHO/IUATLD Global Working Group on Antimicrobial Drug Resistance Surveillance. *Guidelines for Surveillance of Drug Resistance in Tuberculosis*. (1997). Geneva. 253 pp.

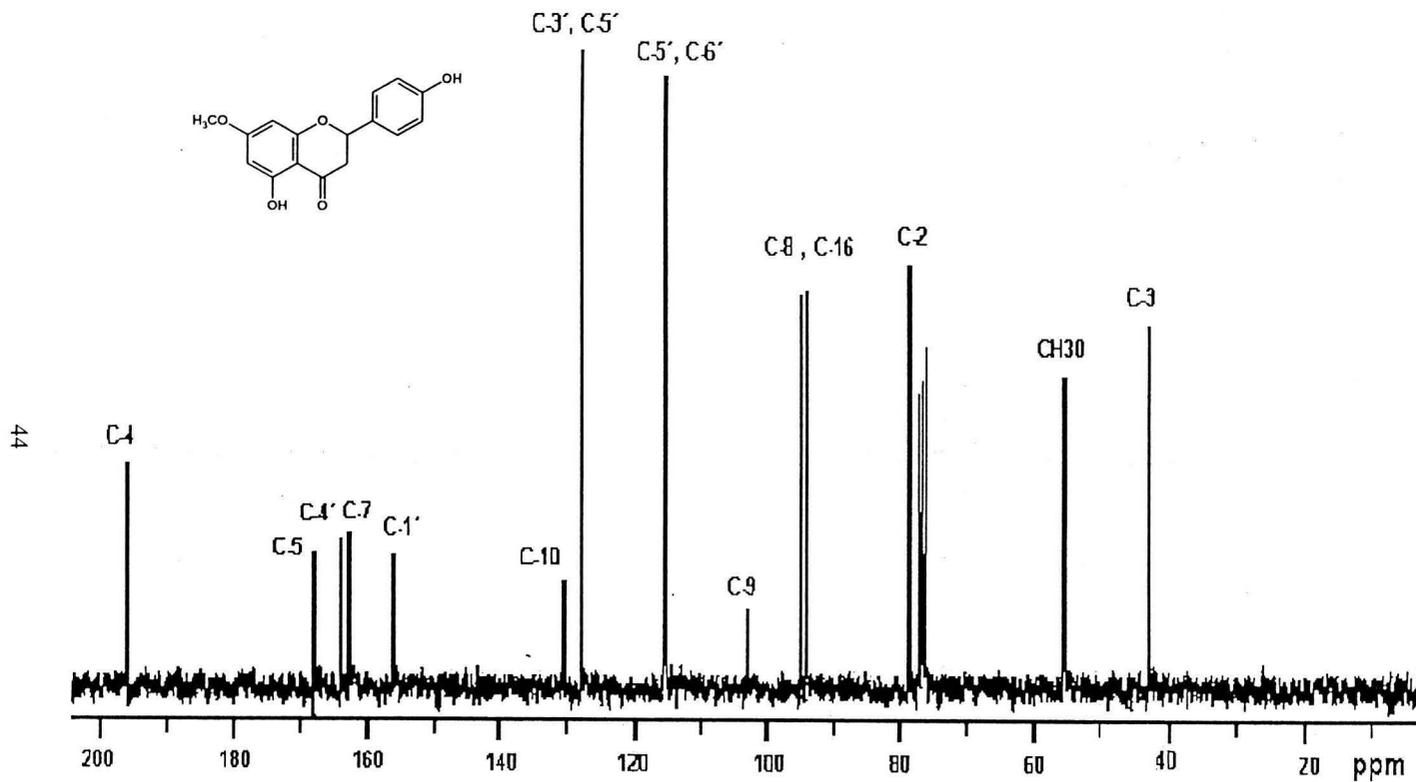
APENDICE
DE
ESPECTROS



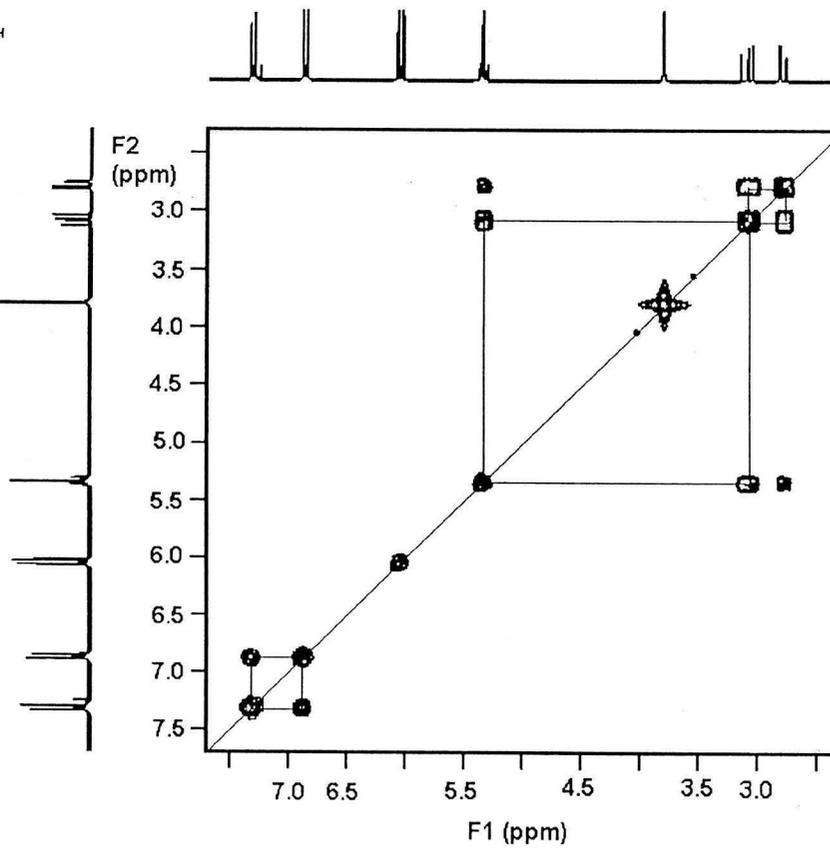
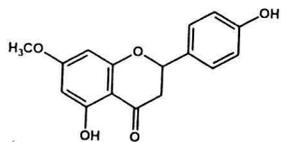
Espectro 1. Espectro de Masas de la Sakuranetina (17).



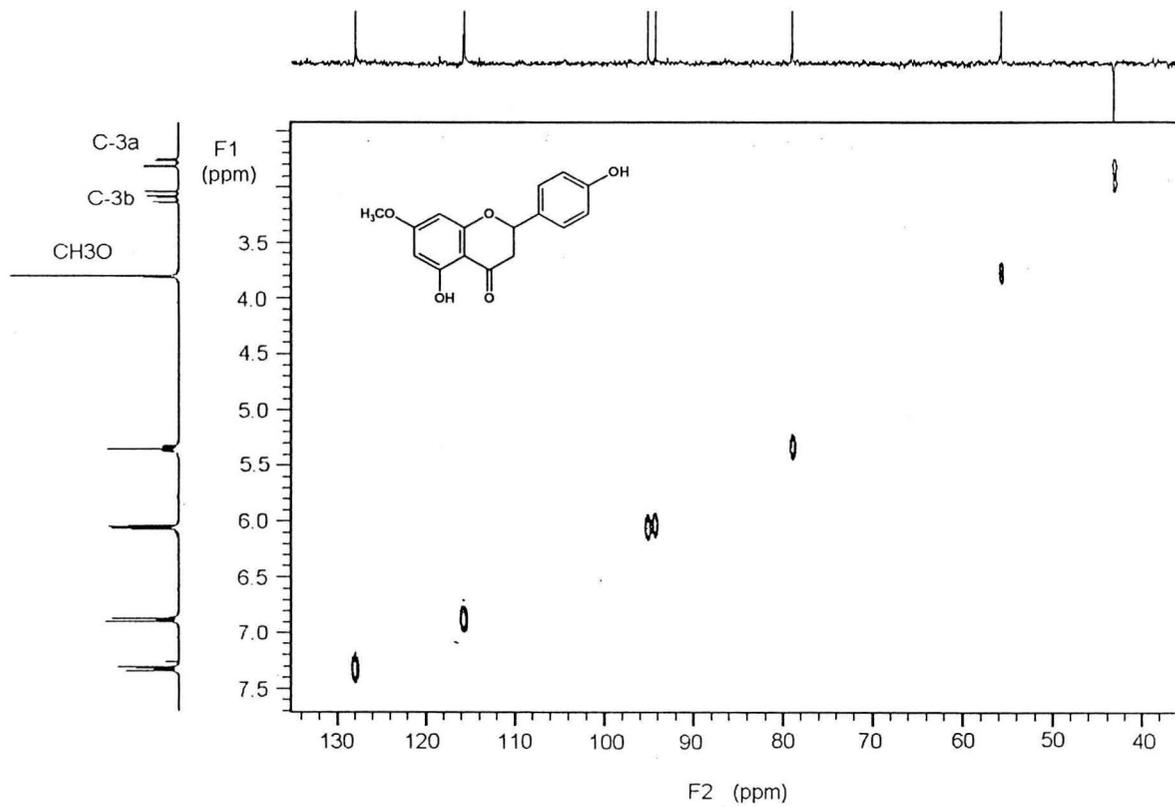
Espectro 2. Espectro de RMN-¹H de la Sakuranetina (17).



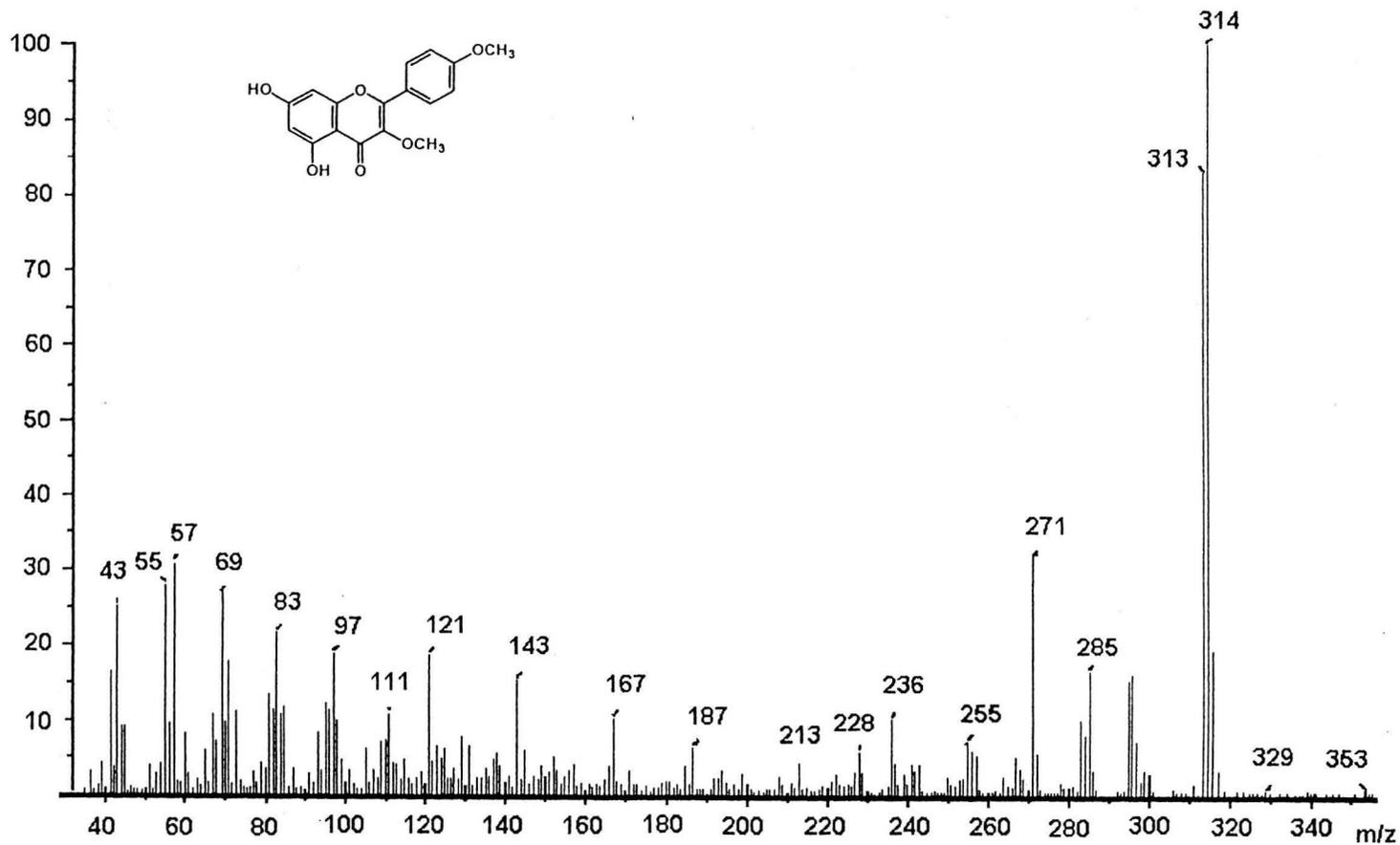
Espectro 3. Espectro de RMN-¹³C de la Sakuranetina (17).



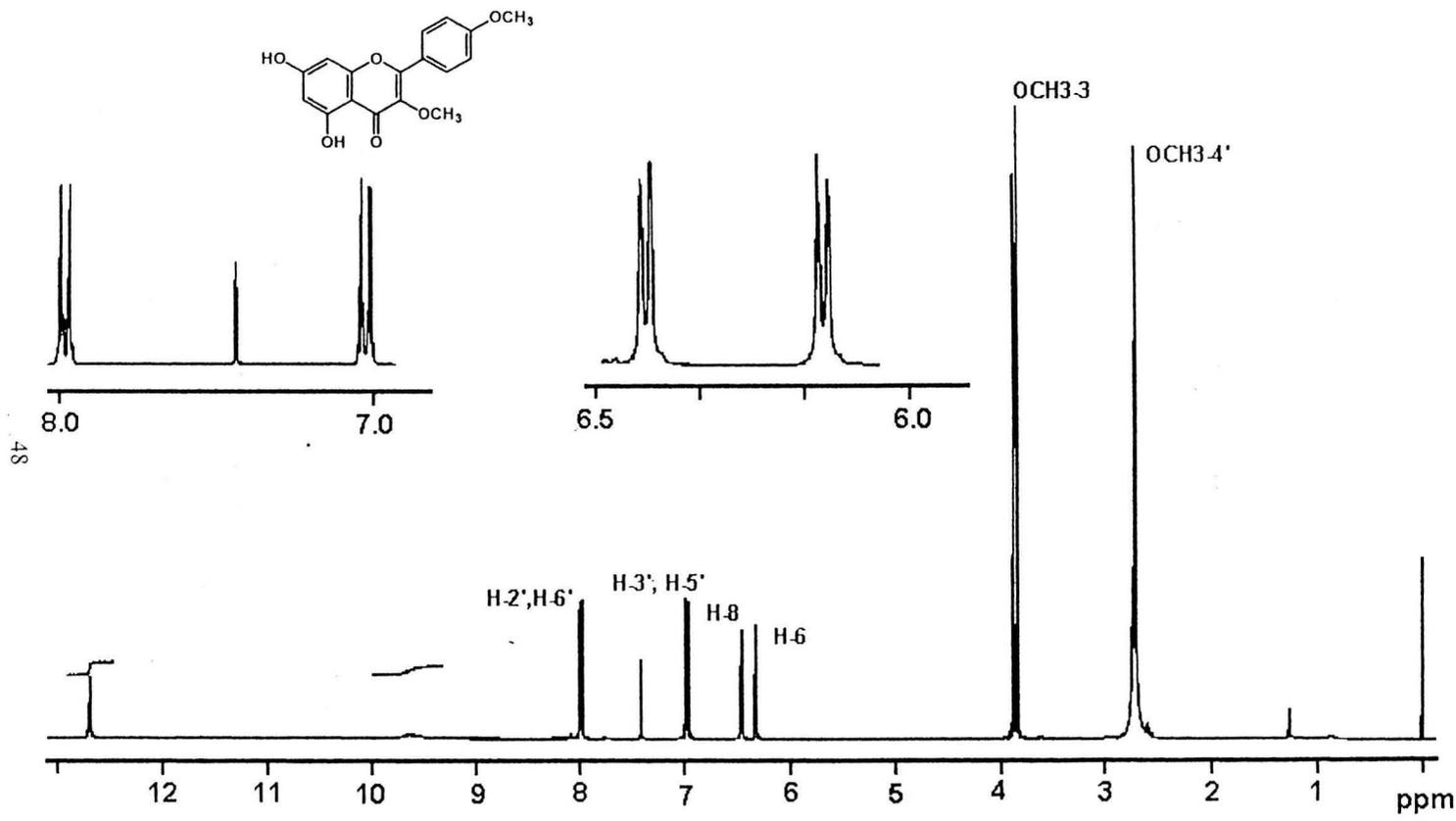
Espectro 2a. Espectro de RMN ¹H modalidad COSY de la Sakuranetina (17)



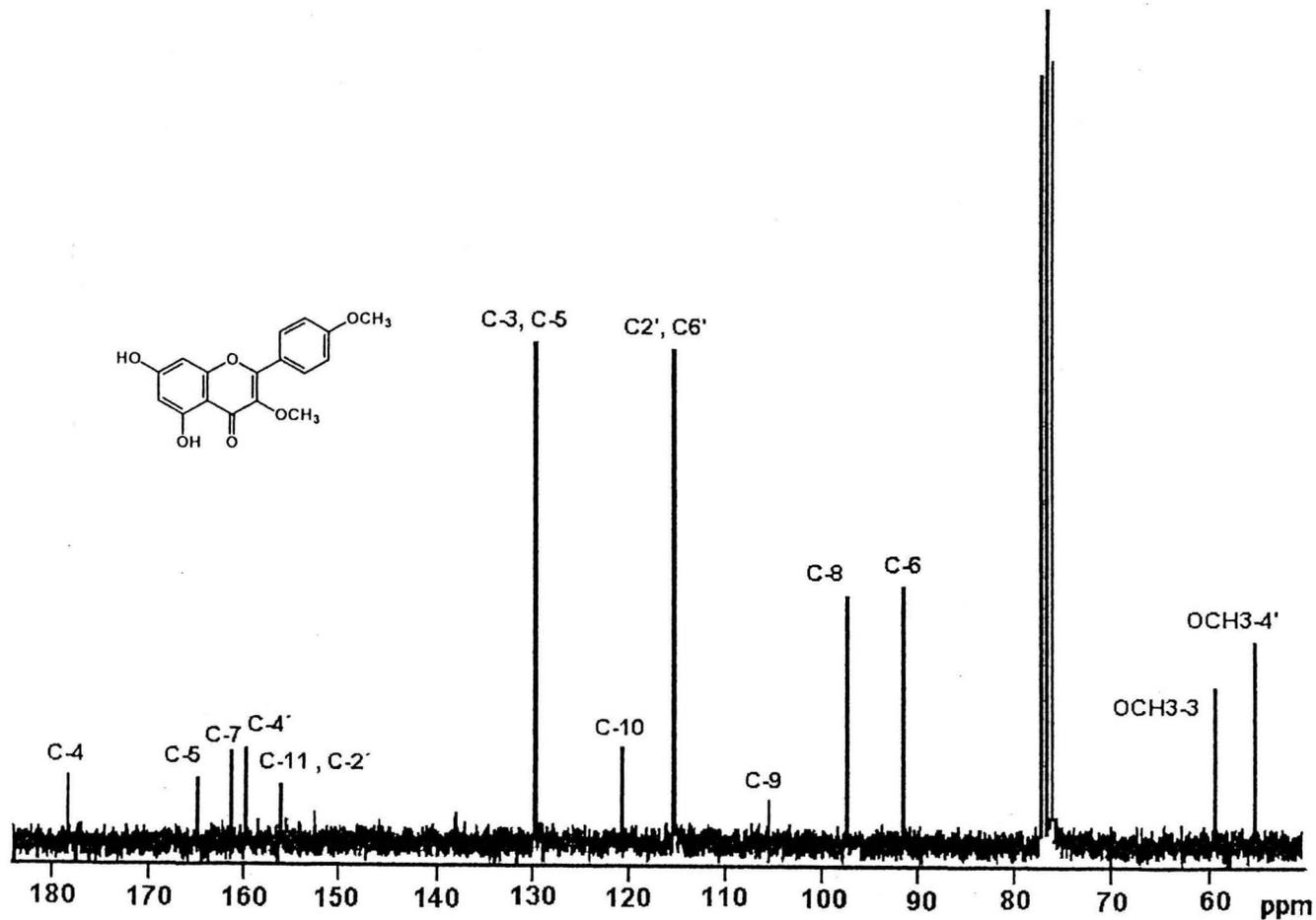
Espectro 3a. Espectro de correlación heteronuclear (HETCOR) de la Sakuranetina (17).



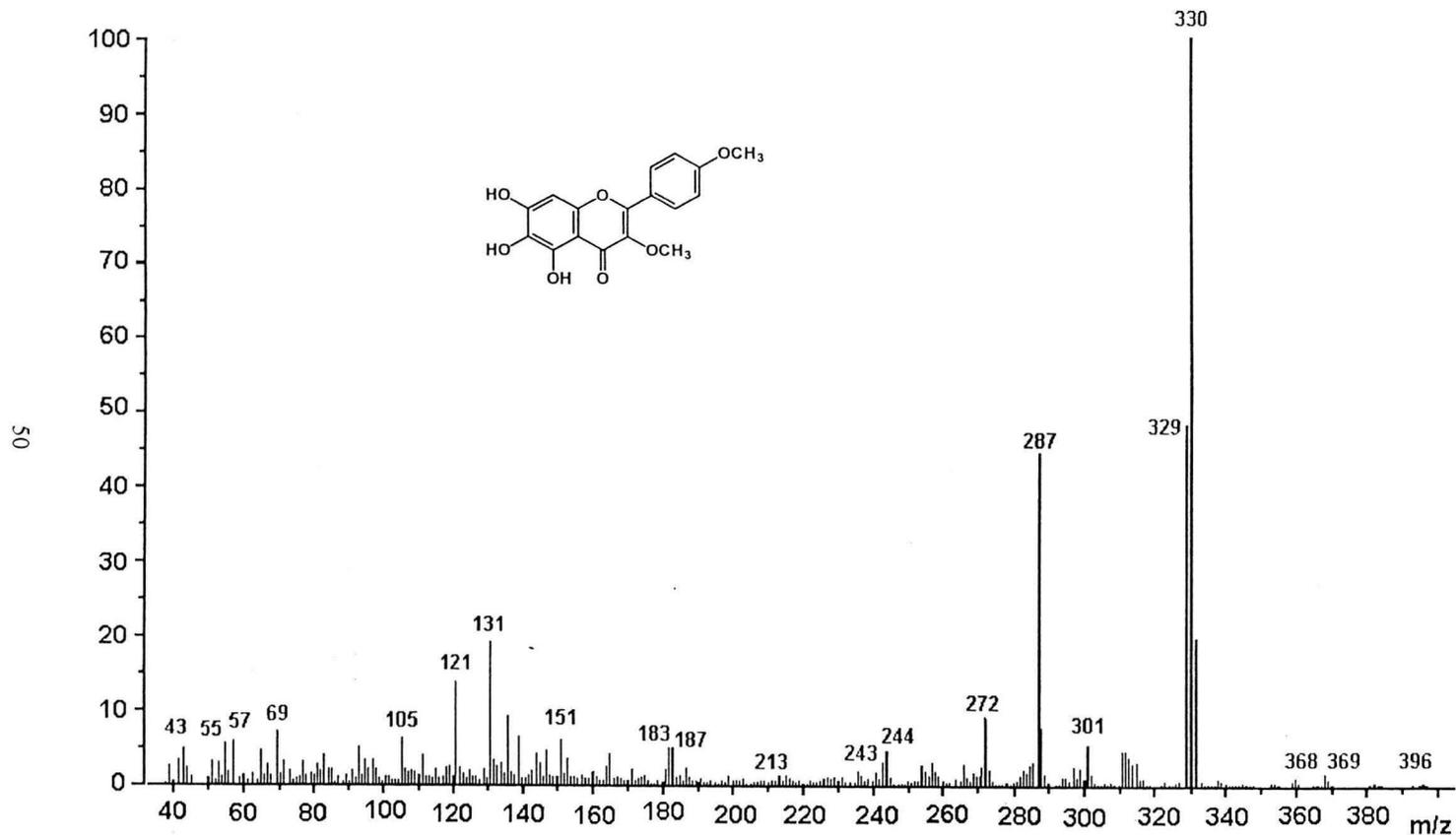
Espectro 4. Espectro de Masas de la Ermanina (38).



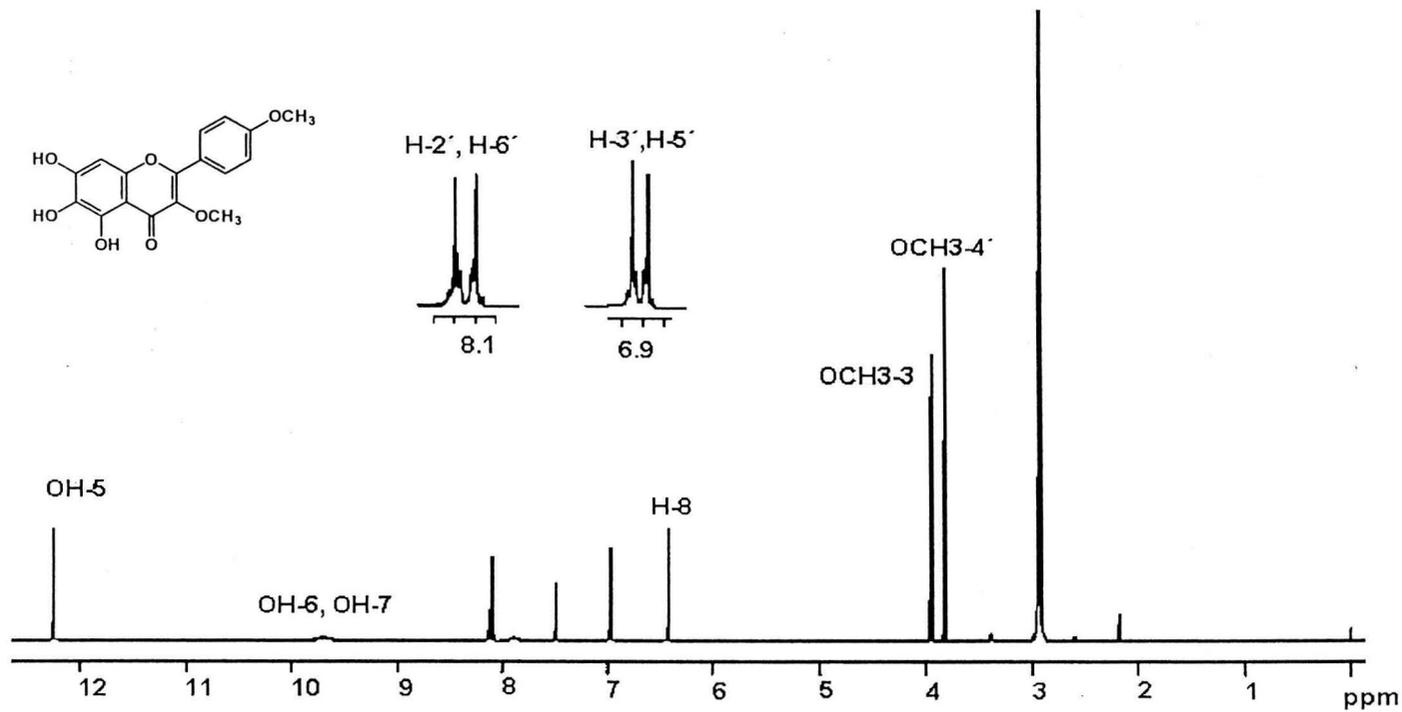
Espectro 5. Espectro de RMN ¹H de la Ermanina (38).



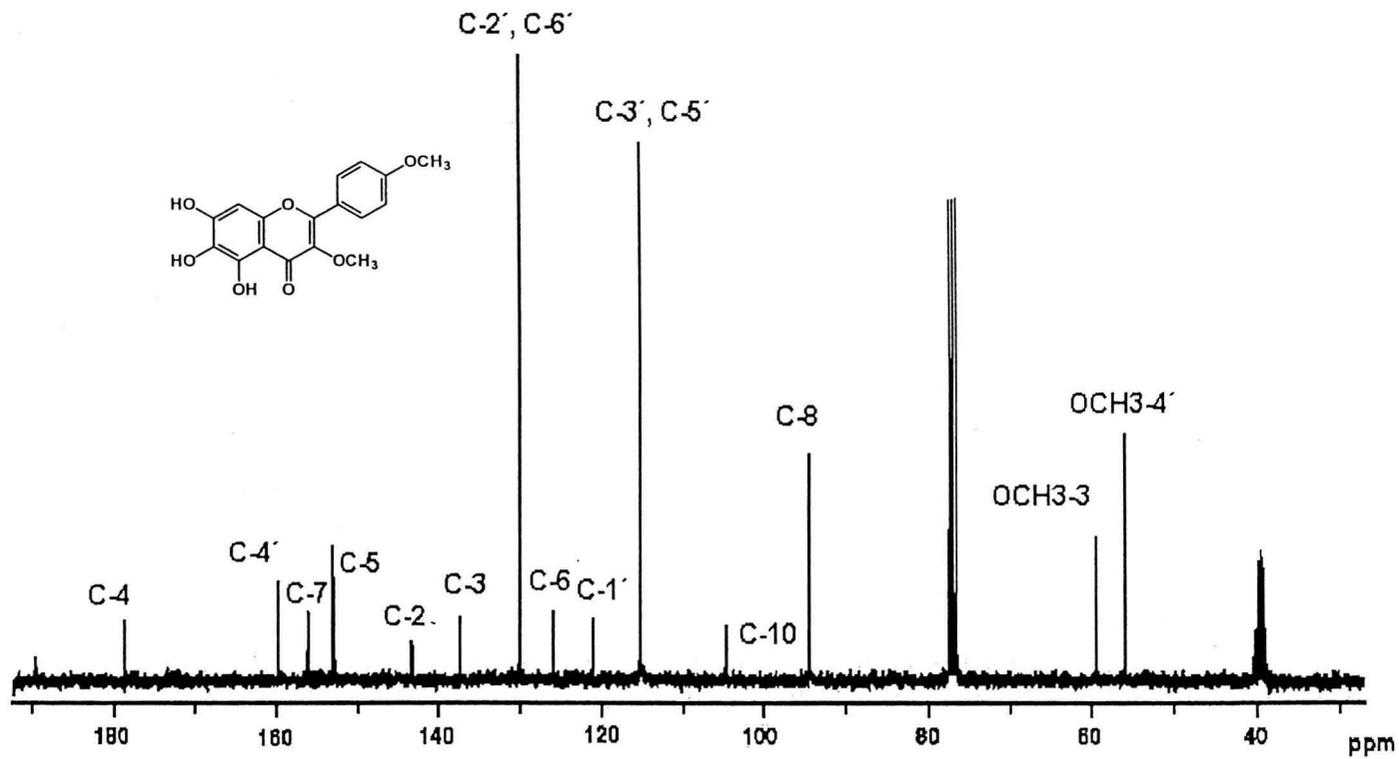
Espectro 6. Espectro de RMN ^{13}C de la Ermanina (38).

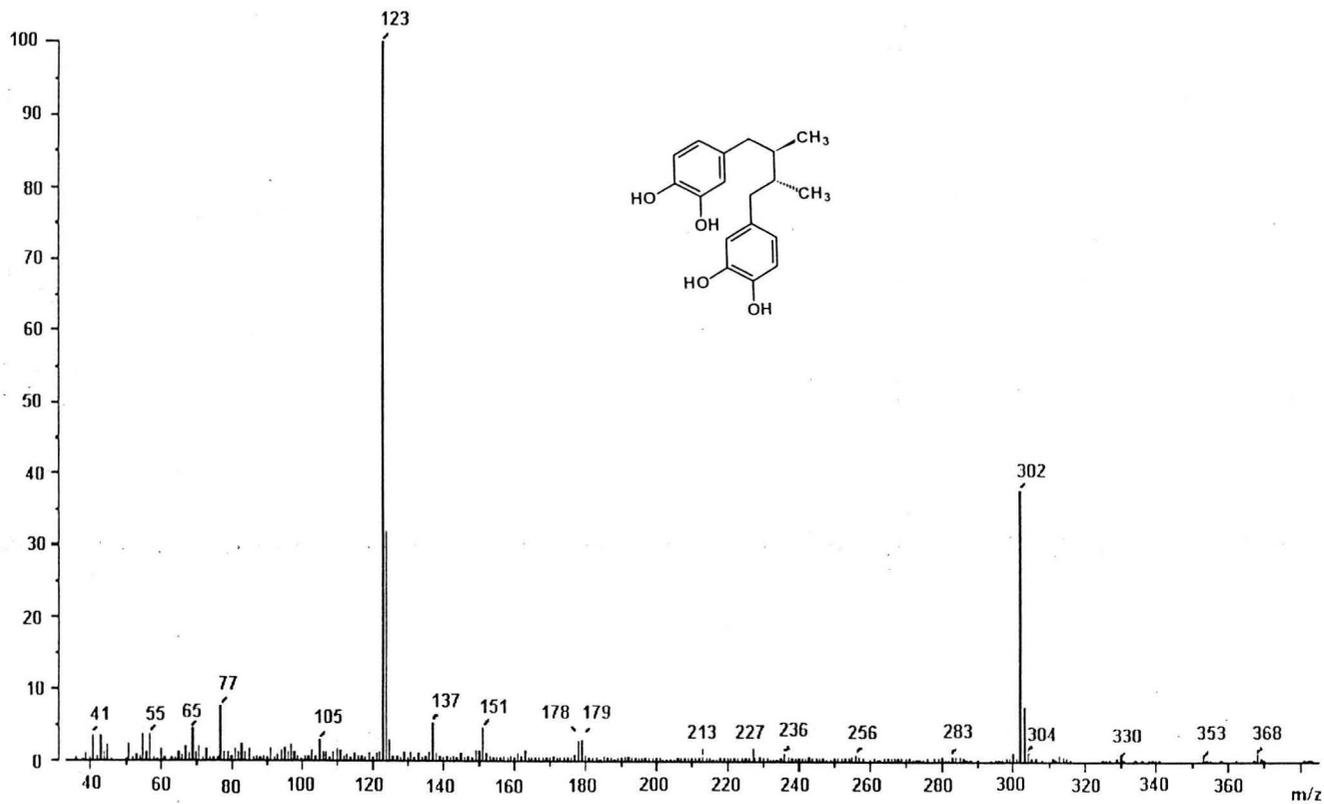


Espectro 7. Espectro de Masas de la 6-hidroxiermanina (39)

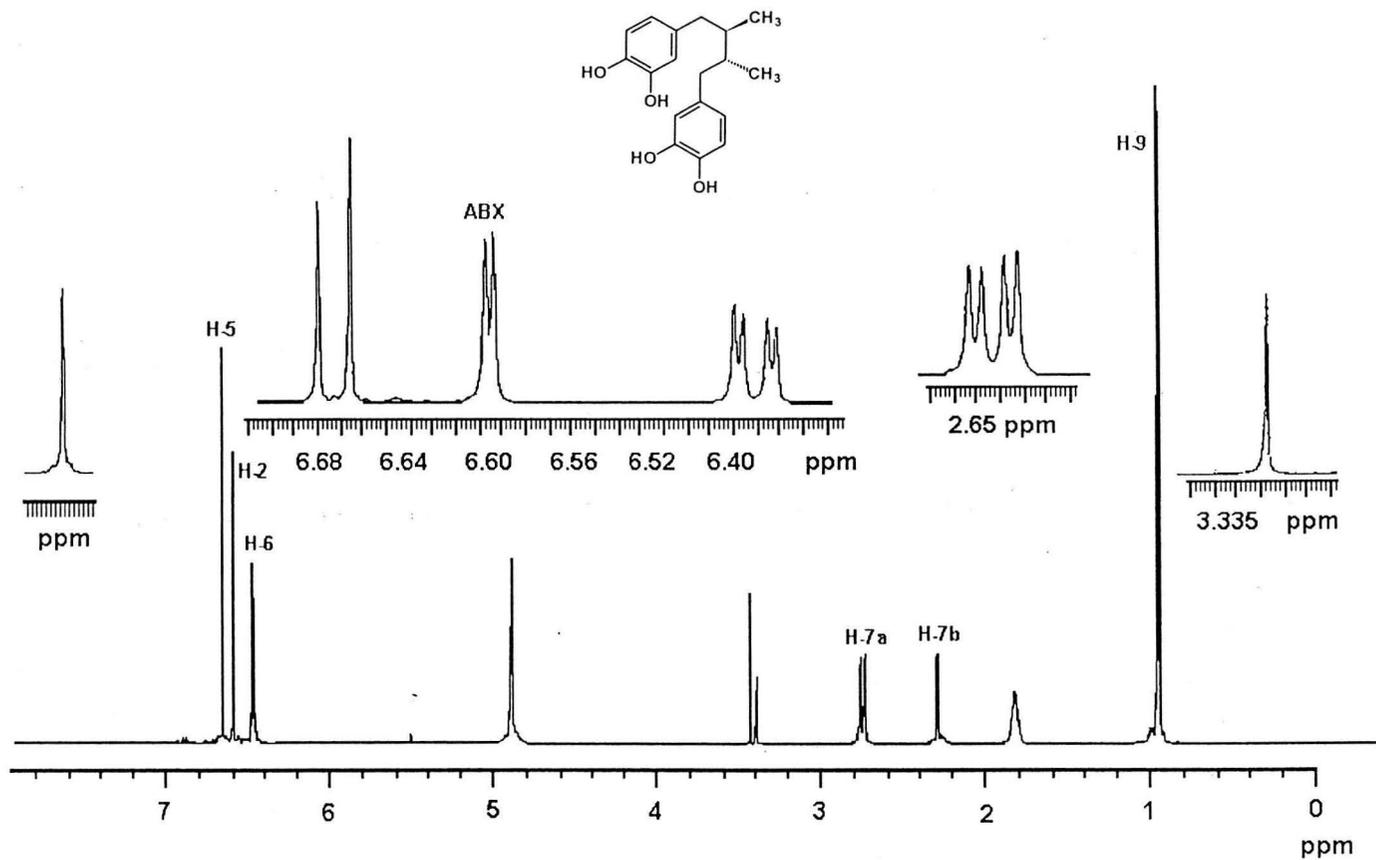


Espectro 8. Espectro de RMN- ^1H de la 6-hidroxiermanina (39)

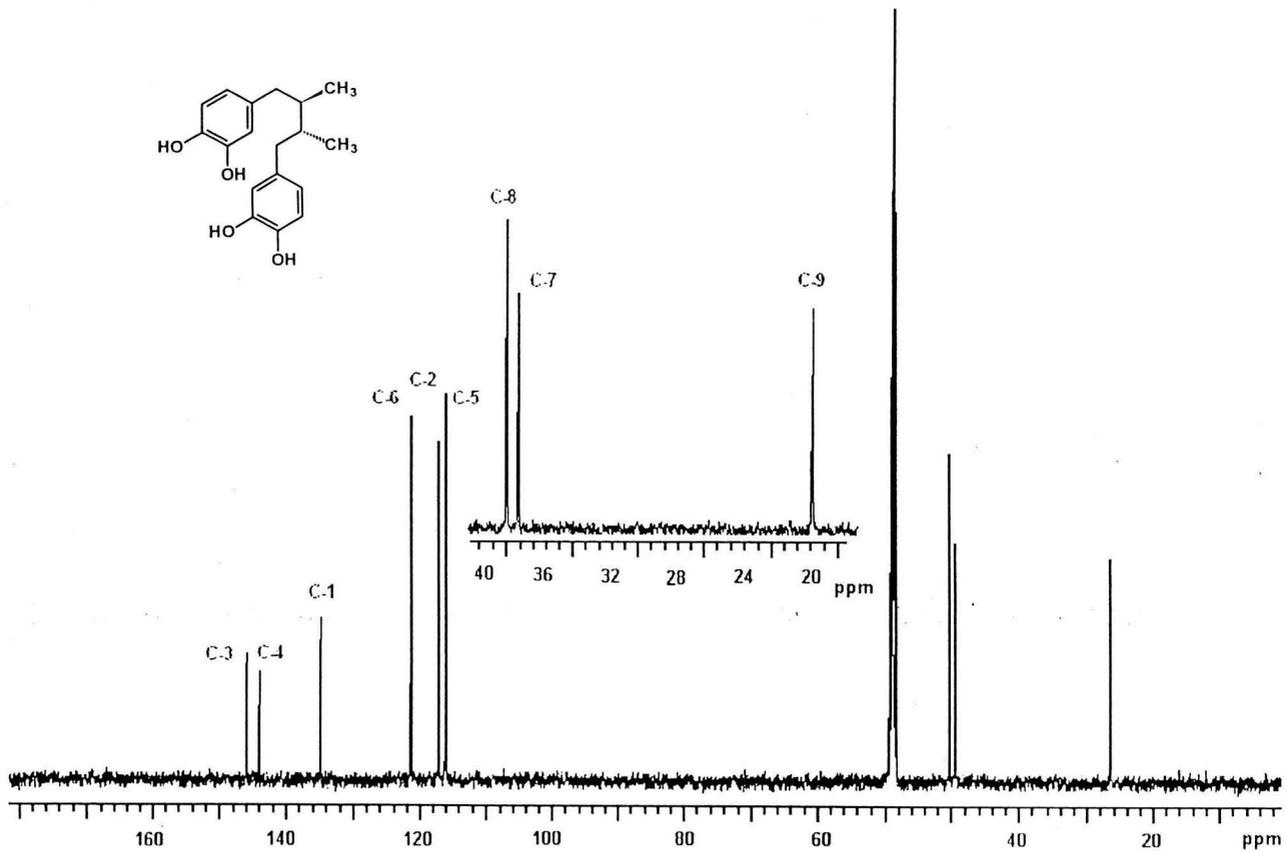
Espectro 9. Espectro de RMN ^{13}C de la 6-hidroxiermanina (39)



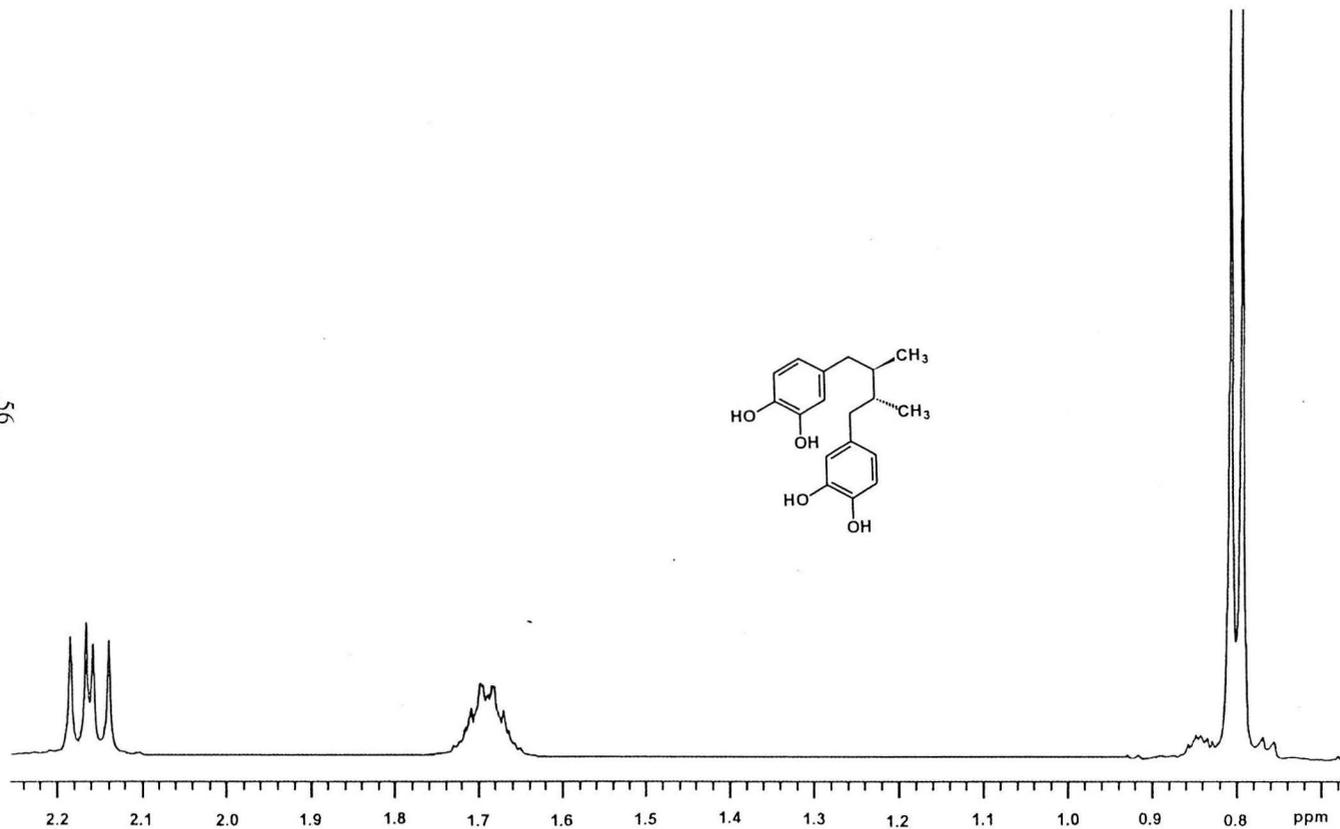
Espectro 10. Espectro de Masas del ácido nordihidroguaiarético (19).



Espectro 11. Espectro de RMN- ^1H del ácido nordihidroguaiarético (19).



Espectro 12. Espectro de RMN- ^{13}C del ácido nordihidroguaiarético (19).



Espectro 13. Vista parcial (δ_{H} 0.8 – 2.2 ppm) del espectro de RMN ^1H del ácido nordihidroguaiarético (19).

57

