DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

Metabolitos antituberculosos de Diospyros anisandra Blake y Gliocladium sp. MR41

Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias presenta:

Q.F.B. Andrés Humberto Uc Cachón

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México

2012



BIOTECHOLOGIA DE PLANTAS

Presidos antitubercalosos de Diospycos endra Blake y Gilcicladium sp. MR44

Cienciae presenta:

of the Millorde Humberto Up Cephon

the relation direction as the Pursual of the

manualt industry, approxi-

2812



Mérida, Yucatári, México; a 6 de julio de 2012

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán. A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apovo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial. le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: Nombre: Arrives hón

CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN, A.C. POSGRADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS

RECONOCIMIENTOS

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "Metabolitos antituberculosos de *Diospyros anisandra* y *Gliocladium* sp. (MR41)" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. y el laboratorio de Farmacognosia del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIN-IMSS) bajo la dirección de las Dras. Rocío de Lourdes Borges Argáez y Gloria María Molina Salinas, dentro de la Opción Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas de este Centro.

Atentamente

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela Director Académico Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo como parte del proyecto "Actividad Antituberculosa de Quinonas Aisladas de Especies de la Península de Yucatán contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensibles y fármaco-resistentes" (No. 60357) financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, así como la beca doctoral (No. 12352) para Andrés Humberto Uc Cachón.

DEDICATORIA

A Dios por su apoyo en cada tropiezo, por cada maravilloso día para poder cumplir mis metas y por regalarme la mejor familia.

A mis padres Edgar Uc Ramos y Manuela Cachón Puc, por todo su apoyo, comprensión, amistad y cariño durante toda mi vida. Gracias por velar mi bienestar y educación, este logro más es de ustedes.

A mis hermanos Wendy y Jesús, porque sé que siempre contaré con su apoyo y su cariño.

Y a la más pequeña mi sobrina Jimenita con mucho cariño.

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras de tesis, la Dra. Rocío Borges y la Dra. Gloria Molina por compartir sus conocimientos conmigo, por su paciencia y su amistad que me brindaron durante el desarrollo de mi tesis.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán y el laboratorio de Farmacognosia del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIN-IMSS), por la infraestructura e instalaciones proporcionas para la realización del presente trabajo.

Al H. Comité Revisor de Tesis, integrado por la Dra. María Marcela Gamboa Angulo, Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez, Dr. Felipe Vázquez Flota, Dr. Salvador Said y Fernández y Dr. Miguel Rosado Vallado, por sus acertadas observaciones para mi tesis.

A la Dra. Mariana Meckes Fischer por su valiosa participación en mi examen predoctoral y por sus acertados comentarios para mi tesis.

Al CONACYT por la beca doctoral (No. 12352) otorgada para la realización de la presente tesis.

A los Drs. Javier Vargas Villarreal y Francisco González Salazar por su apoyo en la realización de los ensayos de citotoxicidad.

A la Dra. Martha Méndez y al Biol. Alfredo Dorantes, por su apoyo en la identificación y colecta del material vegetal.

A la Q.B.B. Mirbella del Rosario Cáceres Farfán, por su apoyo en las actividades realizadas en el laboratorio y el manejo del equipo de HPLC.

Al M. en C. Luis Wiliunfo Torres Tapia, por su apoyo en la determinación de perfiles de cromatografía de gases y rotación óptica de compuestos.

A la Dra. Manuela Reyes Estebanez y Q.I. Irma Leticia Medina Baizabal, por su apoyo en el manejo de la cepa fúngica.

A la I.Q.I. Silvia Beatriz Andrade Canto, por su apoyo en los análisis de cromatografía de gases-masas.

Al Q.I. Santiago Duarte Aranda, por su apoyo en los análisis de infrarrojo de los compuestos.

Al personal de la biblioteca del CICY, Narcedalia Gamboa Angulo, Sergio de Jesús Pérez y Miriam JuanQui Valencia, por su apoyo en la búsqueda de material bibliográfico.

A mis amigos, Abril Díaz, Arely Vargas, Ana Ruiz, Manuela Reyes, Cecilia Guizar, Carlos Quintal, Ángel Cruz, Alejandro Yam, Edgar Caamal, Ignacio Hernández, por todo su apoyo y por compartir una parte de su vida conmigo.

A mis profesores por todos los conocimientos que me trasmitieron estos años y por ser un ejemplo a seguir.

Al personal administrativo del CICY, de manera especial a Landy Rodríguez Solís y Alejandra Arceo por todas las facilidades otorgadas estos cinco años.

Finalmente a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron para el desarrollo de esta tesis.

CONTENIDO

Reconocimientos	i
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	v
Contenido	VII
Lista de tablas	xi
Lista de figuras	XIII
Lista de abreviaturas	XVII
Resumen	xix
Abstract	XXI
Introducción	1
Referencias	4
CAPITULO I	5
Antecedentes	5
I.1 Generalidades de la tuberculosis (TB)	5
1.2 Antecedentes epidemiológicos de la TB	5
1.3 Terapeutica	7
1.4 Productos naturales como tuente de tarmacos anti-1 B	11
1.5 Objetivos	21
1.5.2 Objetivos específicos	21
1.6 Hinótesis	21
1.7 Estrategia experimental	21
I.8 Referencias	23
CAPITULO II	27
Estudio fitoquímico de la corteza de D. anisandra Blake	27
II.1 Antecedentes	27
II.1.1 Descripción botánica de Diospyros anisandra Blake	27
II.1.2 Fitoquímica del género Diospyros	28
II.2 Materiales y métodos	32
II.2.1 Material y equipo de laboratorio para obtención de extractos y purificación de compuestos	32
II.2.2 Material y equipo para la identificación estructural	32
II.2.3 Obtención del material vegetal	33
II.2.4 Obtención de los extractos crudos	33
II.2.5 Fraccionamiento de los extractos orgánicos totales	34
II.2.6 Obtención de compuestos puros de las fracciones del extracto total.	34
II.2.6.1 Purificación de la fracción DAT-4	34
II.2.6.1.1 Purificación de los compuestos I y II	34
II.2.6.1.2 Purificación de los compuestos III v IV	35

II.2.6.1.3 Purificación de los compuestos V, VI, VII y VIII	36
II.2.6.2 Purificación del compuesto IX	40
11.2.6.3 Purificación de los compuestos X, XI y XII	41
11.2.0.4 Pullicación de los compuestos Alli, Alv y Av	40
II.3 1 Rendimientos de extractos crudos de Di anisandra	40
II 3.2 Compuesto I /5.5' dibidrovi 2.2' dimetil 8.8' binaftalen 1.1' 4.4'	40
tetrona maritinona)	40
II 3 3 Compuesto II (aldebído de betulina)	48
II 3 4 Compuesto III (5 5'-dihidroxi-2 2'-dimetil-3 6'-binaftalen-1 1' 4 4'-	51
tetrona chitranona)	0.
II.3.5 Compuesto IV (4(15).5E.10(14)-germacratrien-18-ol)	53
II.3.6 Compuesto V (5-hidroxi-2-metil-1.4-naftalendiona, plumbagina)	59
II.3.7 Compuesto VI (5.5'-dihidroxi-2.2'-dimetil-3.3'-binaftalen-1.1'.4.4'-	61
tetrona, 3,3'-biplumbagina)	
II.3.8 Compuesto VII (epóxido de zeylanona)	64
II.3.9 Compuesto VIII (lupeol)	72
II.3.10 Compuesto IX (3R,4R-dihidro-4,8-dihidroxi-3-metil-1-naftalen-	75
ona, cis-isoshinanolona)	
II.3.11 Compuesto X (5,5'-dihidroxi-2,2'-dimetil-6,6'-binaftalen-	77
1,1',4,4'-tetrona, eliptinona)	
II.3.12 Compuesto XI (betulina)	79
II.3.13 Compuesto XII (ácido betulínico)	80
II.3.14 Compuesto XIII (ent-4a,7a-diol-11-eudesmeno, teucdiol A)	82
II.3.15 Compuesto XIV (3,5-dihidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona,	85
droserona)	
II.3.16 Compuesto XV (selin-4(15)-en-1β,11-diol)	87
	89
II.5 Referencias	90
CAPITULO III Actividad biológica do los compuestos ciclodos do D. chicandra	02
III 1 Antecedentes	93
III 1 1 Estudios farmacológicos del género Diospyros	93
III 1.2 Métodos para determinar la susceptibilidad de M. tuberculosis a	94
compuestos	54
III.1.3 Métodos para evaluar citotoxicidad <i>in vitro</i>	95
III.2 Materiales v métodos	97
III.2.1 Evaluación de fracciones y compuestos puros frente a las cepas	97
de M. tuberculosis	
III.2.1.1 Preparación de los compuestos para su evaluación por el	97
método de MABA	
III.2.1.2 Preparación de los inóculos micobacterianos	97
III.2.1.3 Evaluación de la actividad anti-TB por MABA	97

III.2.2 Evaluación de la citotoxicidad de los compuestos sobre células	98
III.2.3 Evaluación de los compuestos sobre células mononucleares de sangre periférica (CMSP)	99
III.2.3.1 Obtención de células mononucleares de sangre periférica	99
III.2.3.2 Evaluación de la citotoxicidad sobre CMSP	100
III.3 Resultados y discusión	101
III 4 Conclusiones	105
III 5 Referencias	106
	100
CAPITULO IV	
Caracterización química y actividad anti-TB del extracto de Gliocladium sp. MR41	111
IV 1 Antecedentes	111
IV 2 Materiales v métodos	115
IV 2 1 Obtención del extracto crudo de Gliocladium sp. MR41	115
IV 2 1 1 Obtención de la suspensión de esporas de Gliocladium en	115
MR41	115
IV.2.1.2 Cultivo masivo de Gliocladium sp. MR41	115
IV.2.1.3 Obtención del extracto crudo de AcOEt	115
IV.2.2 Fraccionamiento del extracto crudo	116
IV.2.2.1 Partición líquido-líquido	116
IV.2.2.2 Fraccionamiento de la fase de acetonitrilo por columna	116
cromatográfica en permeación en gel	
IV.2.3 Evaluación de la actividad antituberculosa de las fracciones de	117
Gliocladium sp. MR41	
IV.2.4 Análisis de las sub-fracciones activas por HPLC	117
IV.2.4 Purificación de los compuestos mayoritarios de las sub-	117
fracciones MR-A5, MR-B4 v MR-C5	
IV.2.4.1 Purificación del compuesto XVII	118
IV.2.4.2 Purificación del compuesto XVIII	118
IV.2.4.3 Purificación del compuesto XIX	118
IV.2.5 Purificación del compuesto XX	119
IV.3 Resultados y discusión	120
IV.3.1 Obtención de fracciones de AcN	120
IV.3.2 Compuesto XVI (ergostan-5.7.22-trien-3-ol, ergosterol)	125
IV.3.3 Compuesto XVII (5g.8g-epidioxiergosta-6.22E-dien-3-ol.	129
endoperóxido de ergosterol)	
IV.3.4 Compuesto XVIII (1.6-di-O-acetil-2.3.4.5-tetrahidroxihexano)	131
IV.3.5 Compuesto XIX (1.2.3.4.5.6-hexahidroxi-hexano, alitol)	132
IV.3.6 Compuesto XX (2-isopropil-5-benzofuranol)	134
IV.4 Conclusiones	137
IV.5 Referencias	138

Conclusiones generales141Perspectivas143

LISTA DE TABLAS

1.	Fases del ensayo clínico	11
2.	Metabolitos anti-TB con mayor potencia aislados de plantas entre 2001-2009	12
3.	Metabolitos anti-TB con mayor potencia aislados de hongos entre 2001-2009	14
4.	Metabolitos anti-TB con mayor potencia aislados de organismos marinos entre 2001-2009	16
5.	Comparación de los datos de RMN- ¹ H (H, m, $J = Hz$) del compuesto I con los reportados para maritinona (Gu <i>et al.</i> , 2004)	48
6.	Comparación de los datos de RMN- ¹ H (H, m, $J = Hz$) del compuesto II con los reportados para el adehído de betulina (Theerachavanan <i>et al.</i> , 2007)	51
7.	Comparación de los datos de RMN- ¹ H (H, m, $J = Hz$) del compuesto III con los reportados para chitranona (Gu <i>et al.</i> , 2004)	53
8.	Señales de RMN- ¹ H, ¹³ C, COSY y HMBC del 4(15),5E, 10(14)-germacratrien-1β-ol. Señales obtenidas a 400 MHz para ¹ H y 125 MHz para ¹³ C en CDCI ₂	58
9.	Comparación de los datos de RMN- ¹ H (H, m, $J = Hz$) del compuesto VI con los reportados para 3,3'-biplumbagina (Sidhu & Sankaram, 1971)	63
10.	Señales de RMN- ¹ H, ¹³ C, COSY y HMBC del epóxido de zeylanona. Señales obtenidas a 400 MHz para ¹ H y 125 MHz para ¹³ C en CDCI ₂	71
11.	Comparación de los datos de RMN- ¹ H (H, m, $J = Hz$) del compuesto VIII con los reportados para lupeol (Ghosh <i>et al.</i> , 2010)	74
12.	Comparación de los datos de RMN- ¹ H (H, m, $J = Hz$) del compuesto IX con los reportados para <i>cis</i> -isoshinanolona (Bringmann <i>et al.</i> 1999)	77
13.	Comparación de los datos de RMN- ¹ H (H, m, $J = Hz$) del compuesto X con los reportados para eliptinona (Yoshihira <i>et el</i> , 1971)	78
14.	Comparación de los datos de RMN- ¹ H (H, m, $J = Hz$) del compuesto XII con los reportados para el ácido betulínico (Kuroru et al. 2008)	82
15.	Comparación de los datos de RMN- ¹ H (H, m, $J = Hz$) del compuesto XIII con los reportados para el teucdiol A (Lee et al. 2006)	84
16.	Comparación de los datos de RMN- ¹ H (H, m, $J = Hz$) del compuesto XIV con los reportados para droserona	86

(Gunaherath et al., 2006)

- Comparación de los datos de RMN-¹H (H, m, J = Hz) del compuesto XV con los reportados para el selin-4(15)-en- 88 1β,11-diol (Adinarayana *et al.*, 1982)
- Resultados de actividad biológica de los compuestos aislados de *D. anisandra*. MTbS: *M. tuberculosis* sensible (H37Rv); MTbR: M. *tuberculosis* resistente (MDR-UMF 15:99); CAM: células adherentes mononucleares
- Metabolitos aislados del género *Gliocladium* con actividad biológica reportada
 Resultados de la extracción de los lotes con AcOEt
 116
- 21. Resultados de la partición de los cuatro lotes 110
- 22. Resultados de la actividad de los lotes frente a la cepa 121 sensible de *M. tuberculosis* (MTbS)
- 23. Resultados de la actividad de las sub-fracciones de MR-A frente a la cepa sensible de *M. tuberculosis* (SMTb)
- 24. Resultados del fraccionamiento de MR-A, MR-B y MR-C 123
- 25. Comparación de los datos de RMN-¹H (H, m, J = Hz) del compuesto XVI con los reportados para ergosterol (Haque *et* 128 *al.*, 2004)
- Comparación de los datos de RMN-¹H (H, m, J = Hz) del compuesto XVII con los reportados para endoperóxido de 131 ergosterol (Joo-Sang *et al.*, 2008)

LISTA DE FIGURAS

1.	Estructura de fármacos anti-TB de primera línea	8
2.	Estructura de algunos de los fármacos anti-TB de segunda línea	9
3.	Mecanismos de acción de fármacos antituberculosos de primera	40
	y segunda líneas (Zhang, 2005)	10
4.	Estructura de metabolitos anti-TB aislados de plantas	13
5.	Estructura de metabolitos anti-TB aislados de hongos	15
6.	Estructura de metabolitos anti-TB aislados de organismos	477
	marinos	17
7.	Estructura química de la nocathiacina l	18
8.	Estructura del calanolido A y pleuromutiina BC-3781	19
9.	Diagrama general de la estrategia experimental	22
10.	Árbol de Diospyros anisandra	27
11.	Naftoquinonas monoménicas más comunes y abundantes del género Diospyros	28
12.	Naftoquinonas aisladas de especies del género Diospyros	29
13.	Triterpenos de tipo lupano aislados de especies del género	20
	Diospyros	30
14.	Benzopironas aisladas de especies del género Diospyros	31
15.	Polifenoles aislados de especies del género Diospyros	31
16.	Diagrama de purificación de DAT-4	38
17.	Diagrama de purificación de DAT-4	39
18.	Diagrama de purificación de DAT-5	41
19.	Diagrama de punificación de DAT-6	42
20.	Diagrama de purificación de DAT-7R	45
21.	Estructura y espectro de RMN-'H de maritinona. Señales	47
	obtenidas a 400 MHz en CDCl ₃	
22.	Estructura y espectro de RMN-'H del aldehído de betulina.	49
	Señales obtenidas a 400 MHz en CDCl ₃	
23.	EM y fragmentos característicos del aldehido de betulina.	50
24.	Estructura y espectro de RMN-'H del chitranona. Señales	52
	obtenidas a 400 MHz en CDCl ₃	
25.	Estructura y espectro de RMN- H del 4(15),5E,10(14)-	55
	germacratrien-1β-ol. Señales obtenidas a 400 MHz en CDCI3	
26.	Correlaciones del 4(15),5E,10(14)-germacratnen-1p-ol en su	56
07	espectro de HMBC	
27.	Correlaciones del 4(15),5E,10(14)-germacratnen-1p-ol en su	57
00	espectro de HMBC	
28.	Estructura de plumbagina	59
29.	En y tragmentos característicos de plumbagina	60
30.	Estructura y espectro de KMIN- H de 3,3-oipiumbagina. Senales	62
24	Obtenidas a 400 MFIZ en CDUIg	62
31.	Eivi y fragmentos característicos de 3,3 -biplumbagina	03

32.	Estructura y espectro de RMN- ¹ H del epóxido de zeylanona. Señales obtenidas a 400 MHz en CDCIa	65
33.	Espectro de RMN- ¹³ C del epóxido de zeylanona. Señales	66
~ ~	obtenidas a 125 MHz en CDCI3	07
34.	Correlaciones de epoxido de zevianona en el espectro de HMBC	67
35.	Espectro de NOESY-1D del epoxido de zeylanona	68
36.	Espectro de NOESY-2D del epóxido de zeylanona	69
37.	Estructuras de epóxidos de naftoquinonas	70
38.	Estructura y espectro de RMN-'H del lupeol. Señales obtenidas a 400 MHz en CDCl ₃	73
39.	Estructura y espectro de RMN- ¹ H de <i>cis</i> -isoshinanolona.	76
	Señales obtenidas a 400 MHz en CD ₃ COCD ₃	10
40.	Estructura y espectro de RMN- ¹ H de eliptinona. Señales	70
	obtenidas a 400 MHz en CDCl ₃	10
41.	Estructura de betulina	79
42.	Estructura y espectro de RMN- ¹ H del ácido betulínico. Señales	01
	obtenidas a 400 MHz en CDCl ₃	01
43.	Estructura y espectro de RMN- ¹ H del teucdiol A. Señales	0.2
	obtenidas a 400 MHz en CD ₃ COCD ₃	83
44.	Espectro de RMN- ¹³ C del teucdiol A. Señales obtenidas a 125	~ ~
	MHz en CD ₃ COCD ₃	84
45.	EM del teucdiol A	84
46.	Estructura y espectro de RMN- ¹ H de droserona. Señales	00
	obtenidas a 400 MHz en CDCl ₃	86
47.	Estructura v espectro de RMN- ¹ H del selin-4(15)-en-16.11-diol.	~~
	Señales obtenidas a 400 MHz en CDCI	88
48	Imagen de Gliocladium sp. MR41	111
49	Estructura de metabolitos aislados del género Gliocladium	112
50	Estructura química de la enniatina B y la beauvericina	114
51	Diagrama de purificación de MR	119
52	Cromatograma de HPLC de la fracción MR-A7 utilizando el	
52.	método A	121
53	Cromatograma de HPLC de la fracción MR-A8 utilizando el	
00.	método B	122
54	Cromatograma de HPLC de la fracción MR-A9 utilizando el	
J 4 .	método C	122
55	Comparación on CCD de las sub fracciones de los letos MP-A	
55.		122
56	CCD de las sub fracciones del lote MR-D	124
57	Estructura y espectro de RMN- ¹ H del ergosterol. Señales	14-7
57.	obtenidas a 400 MHz en CDCL	126
52	EM del ergosterol y sus fragmentos m/z característicos	127
50.	Estructura y espectro de RMN- ¹ H del endoneróvido de	121
55.	errosterol. Señales obtenidas a 400 MHz en CDCL	130
	ergosterol. Seriales obterildas a 400 Minz en ODOI3	

60.	Estructura y espectro de RMN- ¹ H del 1,6-di-O-acetil,2,3,4,5- tetrahidroxi-hexano. Señales obtenidas a 400 MHz en CD ₂ OD	132
61.	Estructura y espectro de RMN- ¹ H del alitol. Señales obtenidas a	133
	400 MHz en CD ₃ OD	
62.	Estructura y espectro de RMN- ¹ H del 2-isopropil-5-benzofuranol.	135
	Señales obtenidas a 400 MHz en CDCI ₃	155
63.	Espectro de RMN- ¹³ C del 2-isopropil-5-benzofuranol. Señales	125
	obtenidas a 125 MHz en CDCla	155
64.	Derivados naturales del 2-isopropil-5-benzofuranol	136

ABREVIATURAS

AcN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
An	Acetona
Bn	Benceno
CAM	Células adherentes mononucleares
CC	Columna cromatográfica
CCD	Cromatografía en capa delgada
CG	Cromatografía de gases
CI50	Concentración inhibitoria media
CLV	Cromatografía líquida al vacio
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
COSY	Correlation spectroscopy
DMSO	Dimetil sulfóxido
EM	Espectrometría de masas
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy
Hx	Hexano
IE	Impacto electrónico
Int. rel	Intensidad relativa
IR	Infrarrojo
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz
ppm	Partes por millón
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
RMN	resonancia magnética nuclear
TMS	Tetrametil silano
TR	Tiempo de retención
UFC	Unidad formadora de colonias

RESUMEN

En estudios previos realizados en el laboratorio de Biofármacos y Biopesticidas del Centro de Investigación Científica de Yucatán en colaboración con los laboratorios de Farmacognosia del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS se encontró que el extracto hexánico de corteza de *Diospyros anisandra* y el extracto de acetato de etilo de la cepa fúngica *Gliocladium* sp. presentaron una importante actividad antituberculosa (anti-TB). Con base en lo anterior se planteó como objetivo la purificación e identificación de los metabolitos secundarios presentes en dichos extractos.

El análisis fitoquímico del extracto de la corteza de tallo de *D. anisandra* llevó al aislamiento e identificación de 15 compuestos: una nueva naftoquinona dimérica (epóxido de zeylanona), tres naftoquinonas monoméricas (plumbagina, *cis*-isoshinanolona y droserona), cuatro naftoquinonas dimericas (maritinona, 3,3'-biplumbagina, eliptinona y chitranona), cuatro triterpenos de tipo lupano (lupeol, betulina, aldehído de betulina y ácido betulínico), y tres sesquiterpenos, dos de ellos reportados por primera vez en la familia Ebenaceae (4(15), 5E, 10(14)-germacratrien-1β-ol y tecdiol A) y otro aislado previamente de hojas de *D. melanoxylon* (selin-4(15)-en-1β, 11-diol).

De la evaluación anti-TB, las naftoquinonas plumbagina, maritinona y 3,3'biplumbagina resultaron activas frente a las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv (sensible a los fármacos de primera línea) y CIBIN-UMF 15:99 (resistente). Estos compuestos presentaron una concentración mínima inhibitoria (CMI) en el rango de 1.56-3.13 µg/mL. La droserona, el epóxido de zeylanona y el aldehído de betulina presentaron moderada actividad sobre la cepa resistente (CMI de 25 µg/mL, 12.5 µg/mL y 25 µg/mL, respectivamente).

Los compuestos activos fueron evaluados sobre la línea celular Vero (*Cercopithecus aethiops*, ATCC No CC-81) y células adherentes humanas. Las naftoquinonas maritinona y 3,3'-biplumbagina resultaron inocuas sobre las células Vero. Por el contrario las naftoquinonas plumbagina, droserona, *cis*-isoshinanolona y eliptinona resultaron ser citotóxicas (IC₅₀ = 0.75-3.73 µg/mL). Por otra parte, ninguna de las naftoquinonas resultó citotóxica sobre las células adherentes humanas (CI₅₀ ≥ 125 µg/mL), lo que confirma el potencial de estas naftoquinonas como modelos estructurales para el diseño de nuevos fármacos anti-TB.

En el caso de la cepa fúngica las fracciones de AcN presentaron una alta variabilidad en la actividad sobre la cepa sensible de *M. tuberculosis* (CMIs = 3.13 a 50 µg/mL). El análisis químico de las fracciones de AcN permitió la purificación de dos nuevos compuestos: el 2-isopropil-5-benzofuranol y un estereoisómero del 1,6-di-O-acetil-2,3,4,5-tetrahidroxihexano, y tres compuestos conocidos: alitol, ergosterol y endoperóxido de ergosterol.

ABSTRACT

Previous studies of the Biopesticides and Biopharmaceuticals laboratory of Cientific Research Center of Yucatán in collaboration with the Pharmacognosy Laboratory of Biomedical Research Northeast Center of IMSS found that hexane extract from the bark of *Diospyros anisandra* and ethyl acetate extract of fungal strain *Gliocladium* sp. display a strong antitubercular (anti-TB) activity. Therefore, we focused on the purification and identification of secondary metabolites present in these extracts.

Phytochemical analysis of the active extract from the bark of *D. anisandra* led to the isolation and identification of 15 compounds: a new dimeric naphthoquinone (zeylanone epoxide), three monomeric naphthoquinones (plumbagin, droserone and *cis*-isoshinanolone), four dimeric naphthoquinones (maritinone, 3,3 '-biplumbagin, elliptinone and chitranone), four lupane-type triterpenoids (lupeol, betulin, betulin aldehyde and betulinic acid), and three sesquiterpenes, two isolated for the first time in Ebenaceae family (4 (15), 5E, 10 (14)-germacratrien-1 β -ol and tecdiol A and the other one previously isolated from leaves of *D. melanoxylon* (selin-4 (15)-en-1 β , 11-diol).

Naphtoquinones plumbagin, maritinone and 3,3'-biplumbagin were active against the *M. tuberculosis* strains H37Rv (1st-line-drug-sensitive) and CIBIN-UMF15-099 (resistant). These compounds showed a minimum inhibitory concentration (MIC) ranging on 1.56-3.13 µg/mL. Droserone, zeylanone epoxide and betulin aldehyde showed a moderate activity against the resistant strain (MICs = 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, and 25 µg/mL, respectively).

The citotoxicity of the active compounds was evaluated on Vero (*Cercopithecus aethiops*, ATCC No CC-81) and human adherent cells. The naphthoquinones maritinone and 3,3'-biplumbagin did not show citotoxicity on Vero cells. Conversely, the naphthoquinones, plumbagin, droserone, *cis*-isoshinanolone and elliptinone were cytotoxic ($IC_{50} = 0.75$ -3.73 µg/mL). On the other hand, none naphthoquinone was cytotoxic on human cells ($IC_{50} \ge 125 \ \mu g/mL$), this confirming the potential as structural models for the design of new anti-TB drugs.

Regarding to the fungi, the AcN fractions showed a very variable antitubercular activity (MICs = 3.13μ g/mL to 50μ g/mL). The chemical analysis of the AcN derivated fractions allowed the purification of two new compounds: 2-isopropyl-5-benzofuranol and stereoisomer of 1,6-di-O-acetyl-2,3,4,5-tetrahidroxyhexane, and three known compounds: allitol, ergosterol and ergosterol endoperoxide.

Introducción

Desde la antigüedad hasta nuestros días, las enfermedades bacterianas han sido una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Actualmente esto sucede especialmente en los países en desarrollo. Entre estas enfermedades se encuentra la tuberculosis (TB), cuyo principal agente causal es Mycobacterium tuberculosis. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) una tercera parte de la población mundial está infectada con esta bacteria (WHO, 2005). El número de casos de TB aumentó desde poco antes de principios del presente siglo, debido principalmente al crecimiento de la población mundial, la pobreza y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Así mismo, los tratamientos inapropiados e incompletos han favorecido la selección de cepas resistentes a los fármacos anti-TB (Basso et al., 2005; Del Olmo-Fernández et al., 2005), por lo que actualmente existe un creciente interés en la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de esta enfermedad. Existen diversas estrategias en el ámbito mundial para lograr lo anterior, como son la búsqueda de nuevos blancos moleculares para el diseño de fármacos con diferentes mecanismos de acción, utilizando la genómica y proteómica y la síntesis guímica mediante modelado molecular o química combinatoria (Basso et al., 2005). Sin embargo, las plantas, los microorganismos y los organismos marinos continúan siendo las principales fuentes de nuevas estructuras con actividades biológicas importantes. En el período de 1981-2006 cerca del 56% de los fármacos aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) provienen de una fuente natural. Entre los años 2000-2005 se introdujeron al mercado 20 nuevos medicamentos de origen natural (Newman & Cragg, 2007; Chin et al., 2006).

Por otra parte, México es considerado como el cuarto país con mayor diversidad de especies vegetales. Se estima que en nuestro país existen cerca de 26,000 especies de plantas; de las cuales el 52% son endémicas (Arellano-Rodríguez *et al.*, 2003).

En cuanto a la diversidad de hongos se estima que en México existen entre 120,000-140,000 especies (Guzmán, 1994).

A pesar de esta enorme riqueza biológica, en nuestro país sólo un número muy reducido de plantas ha sido objeto de estudios botánicos y químicobiológicos. Para los hongos, los estudios realizados son dramáticamente más escasos, en especial los microscópicos.

En Yucatán existen cerca de 2,300 especies vegetales, entre éstas se encuentran las del género *Diospyros*, del cual se han reportado cuatro especies y únicamente *D. cuneata* y *D. anisandra* se han estudiado en cuanto a su potencial como fuente de metabolitos citotóxicos y anti-TB respectivamente (Duran et al., 1998; Quintal-Novelo, 2009; Borges-Argáez et al., 2007). Por otro lado, se reportó un estudio químico sobre *D. cuneata*

(Quintal-Novelo, 2009). Con respecto a *D. anisandra* es importante continuar con los estudios químico-farmacológicos que lleven al aislamiento de las moléculas responsables de la actividad de *D. anisandra* contra TB. En relación a los hongos existen reportes de aislamientos de hongos microscópicos en cenotes de Yucatán y en restos vegetales de los estados de Tabasco, Veracruz y Yucatán. Algunos extractos obtenidos a partir de estos hongos presentaron potencial como fuentes de compuestos antimicrobianos y antioxidantes. Cabe mencionar que el extracto orgánico de la cepa fúngica *Gliocladium* sp. MR41, aislada de la hojarasca en el estado de Veracruz, presentó importante actividad anti-TB (De la Rosa-Garcia, 2007; Reyes-Estebanez, 2009; comunicación personal Dra. Marcela Gamboa Angulo y Dra. Gloria Molina Salinas).

En el presente trabajo se realizó el aislamiento e identificación de los metabolitos responsables de la actividad anti-TB presentes en los extractos de *D. anisandra* Blake, especie nativa de la península de Yucatán. Además, se describe la purificación de los metabolitos del extracto orgánico bioactivo de la cepa fúngica *Gliocladium* sp. MR41.

Para la caracterización química se emplearon diversas técnicas de identificación (EM, RMN, UV, IR) que permitieron la elucidación estructural de 15 compuestos presentes en el extracto hexánico activo de corteza de D. anisandra, los cuales incluyen: siete naftoquinonas, cuatro triterpenos, tres sesquiterpenos, así como un nuevo derivado dimérico de plumbagina. Cada compuesto fue evaluado sobre una cepa sensible (H37Rv) y multifármacoresistente (CIBIN-UMF 15:99) de M. tuberculosis. Los compuestos activos fueron las naftoquinonas plumbagina, maritinona, 3,3'-biplumbagina, chitranona, epóxido de zeylanona y el triterpeno betulinaldehído con valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) en el rango de 1.56-50 µg/mL. Para determinar la inocuidad de los compuestos activos se emplearon la línea celular de mono Vero y células adherentes humanas. De los compuestos evaluados únicamente maritinona y 3,3'-biplumbagina resultaron inocuas sobre la línea celular Vero con una concentración inhibitoria media (Cl₅₀) \geq de 232 µg/mL y todas las naftoquinonas resultaron ser inocuas sobre las células adherentes humanas (Cl₅₀ ≥ 125 µg/mL).

Respecto a la cepa fúngica, esta fue cultivada en forma masiva en medios de cultivo de arroz fermentado y posteriormente se realizó una extracción con AcOEt. Se obtuvieron cuatro lotes diferentes de extractos de AcOEt, cada uno fue particionado entre los disolventes Hx y AcN. Las fracciones obtenidas fueron evaluadas sobre la cepa sensible de *M. tuberculosis* (H37Rv), obteniendo únicamente las fracciones de AcN como activas. El subfraccionamiento de la fracción de AcN más activa permitió la obtención de cuatro subfracciones activas sobre *M. tuberculosis* (H37Rv), las cuales

no fue posible purificar debido a la escasa cantidad obtenida de muestra. Sin embargo, las fracciones fueron analizadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) obteniéndose sus respectivos perfiles cromatográficos.

Adicionalmente, se realizó el fraccionamiento y purificación de fracciones no activas de *Gliocladium* sp MRH41. identificándose dos ergosteroles, dos azúcares no ciclados y un nuevo benzofurano.

REFERENCIAS

- Arellano-Rodríguez, J. A., J.S. Flores-Guido, J. Tun-Garrido and M. M, Cruz-Bojórquez (2003). Etnoflora yucatanense. Nomenclatura, forma de vida, uso, manejo y distribución de las especies vegetales de la Península de Yucatán. Mérida, Yucatán: CONACYT, UADY, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; Fascículo 20, p 87.
- Basso, L., L. Pereira, A. Fett, W. Filgueira, I. Souza, M. Palma, J. Batista, S. Astolfi, R. Ribeiro, M. Pereira and D. Santos (2005). The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases- A review. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 100, 475-506.
- Borges-Argáez R., C. I. Canche-Chay, L. M. Peña-Rodríguez, S. Said-Fernández and G. M. Molina-Salinas (2007). Antimicrobial activity of *Diospyros anisandra*. Fitoterapia, 78, 370-372.
- Chin, Y., M. Balunas, H. Chai, and A. Douglas (2006). Drug discovery from natural sources. The American Association of Pharmaceutical Scientists, 8, E239-E253.
- De la Rosa-García, S, del C. (2007). Evaluación del potencial antmicrobiano de microorganimos aislados de cenotes de la península de Yucatán. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.
- Del Olmo-Fernández, E., J. L. López-Pérez, J., A. San Feliciano, and A. E. García (2005). Desarrollo de nuevos agentes antituberculosos. Enfermedades Emergergentes, 7, 22-33.
- Duran, R., J. C. Trejo, and G. Ibarra-Manríquez (1998). Endemic phytotaxa of the peninsula of Yucatan. Harvard Papers in Botany, 3, 263-314.
- Guzmán, G. Las colecciones de hongos en México y su problemática en la biodiversidad del país. (1994) Boletín de la Sociedad Botánica de México, 55, 35-37
- Newman, D. and G. Cragg (2007). Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. Journal of Natural Products, 70, 461-477.
- Quintal-Novelo, C. J (2009). Actividad citotóxica de metabolitos aislados de Diospyros cuneata Standl. Tesis de Maestria. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.
- Reyes-Estebanez, M. M. de J (2009). Estudio exploratorio de la bioactividad de hongos microscópicos asociados a restos vegetales, en zonas tropicales de México. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.
- World Health Organization. (2005) Global tuberculosis. Control surveillance, planning, and financing. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Capítulo I

Antecedentes

I.1 GENERALIDADES DE LA TUBERCULOSIS (TB)

La TB es una enfermedad infecciosa, cuyo principal agente causal es *Mycobacterium tuberculosis*, descubierto por Robert Koch en 1882. Se ha documentado que esta enfermedad existe desde al menos el año 8,000 a.C., ya que en restos humanos que datan de ese tiempo se encontraron lesiones que son típicas de TB ósea. De hecho, en antiguos escritos hindúes y chinos ya se hacía mención de esta enfermedad (Schlossberg, 1999).

Además del principal agente causal de la TB, M. bovis, M. africanum y M. microti también son causantes de esta enfermedad. Estas cuatro especies constituyen el complejo M. tuberculosis. Las micobacterias son bacilos rectos o ligeramente curvos, miden entre 0.2-0.6 um de ancho y de 1-10 um de largo, no forman esporas, son inmóviles y aerobios. Cuando son cultivados en medio líquido forman aglomerados. Las siguientes dos características distinguen a las micobacterias del grupo M. tuberculosis: 1) su pared celular, la cual es rica en cadenas largas de ácidos grasos llamados micólicos, mismos que le dan la característica cerosa a sus colonias v 2) su lento crecimiento, entre 3 a 8 semanas (Saviola & Bishai, 2006). La infección se transmite por vía aérea, cuando se inhalan pequeñas gotas de saliva: cada una de éstas puede contener de 3 a 4 micobacterias. Estas gotas son expulsadas por personas enfermas cuando hablan, tosen o estornudan. Cabe mencionar que no todas las personas infectadas desarrollan una enfermedad activa; esto depende de varios factores, entre los principales están la patogenicidad de la bacteria y la respuesta inmune del hospedero (Tiruviluamala et al., 2002; Clark et al., 2003).

I.2 ANTECEDENTES EPIDEMIOLÓGICOS DE LA TB

En los últimos años el número de casos de TB ha aumentado. En 1990 se reportaron 6.6 millones de casos, en el 2000 la cifra ascendió a 8.3 millones, y el último dato del 2010 fue de 8.8 millones. La mayoría de los casos reportados correspondieron a India (2.25 millones), China (1.1 millones), Sudáfrica (0.49 millones), Indonesia (0.45 millones) y Pakistán (0.40 millones). La prevalencia de TB en el 2010 fue de 12 millones y el número de muertes fue de 1.4 millones, incluidas las personas con VIH (WHO, 2009; WHO, 2010; WHO, 2011).

En México, según datos de la Secretaría de Salud (SSA) se reportaron 14,371 nuevos casos de TB en 2011, y los estados con mayor número de

casos fueron Veracruz (1,766), Baja California (1,275) y Nuevo León (1,197). Para la semana 22 de 2012 ya se han reportado 6,231 nuevos casos (SSA, 2012).

El tratamiento inapropiado, la falta de adherencia al tratamiento debido a su larga duración o efectos adversos de los fármacos (Basso et al., 2005; del Olmo-Fernández et al., 2005) son factores que han propiciado el surgimiento de cepas resistentes y multifármaco-resistentes (MDR, por sus siglas en inglés). La TB-MDR es definida como la TB causada por organismos resistentes a rifampicina e isoniazida, los dos medicamentos contra la TB de primera línea más eficaces. El número de casos de TB causadas por cepas MDR estimados para el 2010 fueron de 290.000 y los países más afectados fueron India (64.000), China (63.000), Rusia (31.000), Pakistán (9,700) y Sudáfrica (9,100) (WHO, 2011). En México existen reportes de resistencia a fármacos anti-TB; en 186 cepas de M. tuberculosis aisladas de derechohabientes del IMSS en Monterrey, Nuevo León, 32% fueron resistentes al menos a un fármaco anti-TB de primera línea y 18% fueron MDR (Said-Fernández et al., 2001). En un estudio realizado en tres estados de México (Baja California, Oaxaca y Sinaloa) en 460 cepas aisladas de pacientes, 19% se catalogaron resistentes a isoniazida, 9.3% a rifampicina y 7.3% MDR (Granich et al., 2000). En otro reporte realizado en Orizaba, Veracruz, se aislaron 326 cepas de M. tuberculosis de las cuales un 24.2% eran resistentes al menos a uno de los fármacos anti-TB y 7.7% fueron MDR (García-García et al., 2000). En 2006 se reportó que en México el 5.6% de los casos de TB eran MDR, en Estados Unidos 4.6%, Corea del Sur 15%, y Letonia 19% (WHO, 2008). La situación se agravó ese mismo año cuando la OMS reconoció la existencia de una nueva modalidad de fármaco-resistencia llamada TB con resistencia extendida (XDR, por sus siglas en inglés). Las cepas XDR son MDR que además son resistentes a capreomicina, amikacina o kanamicina y a una fluorquinolona (WHO, 2009). En 2001, 19 países reportaron al menos un caso de TB-XDR y para el 2002, 45 países va habían reportado al menos un caso. En el periodo 2002-2007 los países con mayor número de casos de TB-XDR correspondieron a Estonia (58 casos), Azerbaiyán (55), Letonia (52), Óblast de Tomsk (30), Lituania (25) y en México se reportó al menos un caso (WHO, 2009). A principios del 2010, 58 países va reportaban al menos un caso de TB-XDR (WHO, 2011).

Por lo anteriormente mencionado, en el ámbito mundial hoy en día existe la necesidad y el interés por la búsqueda de nuevos fármacos, que sean más eficaces y seguros, con menos efectos adversos para el tratamiento de la TB, además de que sean eficaces contra TB-MDR y TB-XDR.

I.3 TERAPÉUTICA

Los medicamentos empleados en el tratamiento de la TB pueden dividirse en fármacos de primera y segunda líneas (Figuras 1 y 2). Los de primera línea son los más eficaces; en cambio, los de segunda línea, lo son menos y producen más efectos secundarios no deseados que los de la primera. La estreptomicina (1) fue el primer fármaco eficaz contra la TB desarrollado, salió al mercado en 1944. Posteriormente se incorporaron al mercado la isoniazida (2, 1952), la pirazinamida (3, 1952), el etambutol (4, 1961), y la rifampicina (5, 1965). Todos son fármacos anti-TB de primera línea y su uso terapéutico, combinando tres y últimamente cuatro de estos medicamentos redujo la incidencia de TB, especialmente en los países desarrollados (Zhang, 2005; Ledermann, 2003). Entre los fármacos de segunda línea se encuentran la rifabutina, la etionamida (6), la cicloserina (7), el ácido paminosalicílico (8), la clofazamina, los aminoglucósidos distintos a la estreptomicina (kanamicina (9), amikacina, capreomicina, viomicina) y las fluoroguinolonas (ciprofloxacina (10), ofloxacina). En la figura 3 se presentan los mecanismo de acción de algunos de los fármacos de primera v segunda líneas (Zhang, 2005).





Figura 1. Estructura de fármacos anti-TB de primera línea.



Figura 2. Estructura de algunos de los fármacos anti-TB de segunda línea.


Figura 3. Mecanismos de acción de fármacos antituberculosos de primera y segunda líneas (Zhang, 2005).

1.4 PRODUCTOS NATURALES COMO FUENTE DE FÁRMACOS ANTI-TB

Las moléculas de origen natural constituyen una fuente importante de nuevos fármacos tal es el caso del primer fármaco anti-TB, la estreptomicina, aislada del actinomiceto Streptomyces griseus (del Olmo-Fernandez et al., 2005). La rifampicina aunque no es de origen natural, es un derivado semi-sintético de la rifamicina B aislada de Streptomyces mediterranei (del Olmo-Fernandez et al., 2005). Actualmente existe un número considerable de compuestos activos reportados contra M. tuberculosis de naturaleza química diversa, obtenidos de las plantas superiores, microorganismos y organismos marinos. Existen varias revisiones de rastreo de productos anti-micobacterianos, en conjunto se reportan más de 750 moléculas (Cantrell et al., 2001; Okunade et al., 2004; De Souza, 2005; Copp. 2003; Copp & Pearce, 2007; Rogosa et al., 2011; Negi et al., 2009; Van Minh et al., 2005). Las principales moléculas aisladas de plantas, hongos y organismos marinos con mayor potencia anti-TB (CMI ≤ 2µq/mL) se pueden observar en las Tablas 2, 3 y 4, respectivamente. Para el desarrollo de estos compuestos activos hasta la obtención de un fármaco. aún es necesario corroborar su inocuidad y eficacia anti-TB en modelos in vivo. Posteriormente, los compuestos eficaces e inocuos se someten a un ensavo clínico, el cual consta de tres etapas, mismas que se describen en la Tabla 1 (Magos-Guerrero & Lorenzana-Jiménez, 2009; Marovac, 2001).

Tabla 1. Fases del ensayo clínico.

Fase I	Se establece la dosis segura y se reúne información sobre la absorción, distribución, efectos metabólicos, la excreción y toxicidad del compuesto. Se utiliza un número pequeño de voluntarios sanos.
Fase II	Se obtiene evidencia de la seguridad y eficacia del compuesto. Los ensayos se realizan en personas que tienen la enfermedad y el número de voluntarios es mayor en comparación de la fase l y pueden ascender a cientos.
Fase III	Se establece firmemente la eficacia del compuesto y los efectos secundarios que pudiera tener el mismo. El número de voluntarios es de miles.

Pocos son los compuestos reportados en estas revisiones que han sido desarrollados como medicamentos anti-TB. Esto puede deberse a su baja potencia, su toxicidad o a la falta de eficacia anti-TB en estudios *in vivo*, entre otros (Copp & Pearce, 2007).

Metabolito	CMi (µg/mL)	Planta	Familia	Referencia
idigoferabietona (11)	0.38	Indigofera longeracemosa	Fabaceae	Rogosa et al., 2011
shinanolona (12)	1.00	Euclea natalensi	Ebenaceae	De Souza, 2005
metoxijuglona (13)	0.20	Engelhardia oxburghian	Juglandaceae	Copp & Pearce, 2007
12-demetilmulticaulina (14)	0.46	Salvia multicaulis	Lamiaceae	Cantrell et al., 2001
engelhardiona (15)	0.20	Micromelum hirsutum	Rutaceae	Copp & Pearce, 2007
neodiospirina (16)	0.50	Euclea natalensis	Ebenaceae	Negi et al., 2009
estigmast-5,22-dien-3β-ol- 7-ona (17)	1.00	Thalia multiflora	Marantaceae	Negi et al., 2009
micromólido (18)	1.50	Micromelum hirsutun	Rutaceae	Rogosa et al., 2011

Tabla 2. Metabolitos anti-TB con mayor potencia aislados de plantas entre 2001-2009.



Figura 4. Estructura de metabolitos anti-TB aislados de plantas.

	Tab	a 3.	Metab	olitos	anti-	TB	con	ma	vor	potencia	aislados	de	hongos	entre	2001	-2009
--	-----	------	-------	--------	-------	----	-----	----	-----	----------	----------	----	--------	-------	------	-------

Metabolito	CMI (µg/mL)	Hongo	Familia	Referencia
phomoxantona (19)	0.40	Phomopsis sp.	Diaporthaceae	Rogosa et al., 2011
ácido 3-nitropropiónico (20)	0.50	Phomopsis sp.	Diaporthaceae	Copp & Pearce, 2007
hirsutellona A (21)	0.78	Hirsutella nívea	Ophiocordycipitaceae	Copp & Pearce, 2007
desoxipreussomerina (22)	1.56	Microsphaeropsis sp.	Leptosphaeriaceae	Okunade et al., 2004



Metabolito	CMi (µg/mL)	Organismo marino	Familia (organismo)	Referencia	
ecteinascidina (23)	0.10	Ecteinascidia thurstoni	Perophoridae (animal)	Соор, 2003	
hidroximanzamina (24)	0.40	Acanthostrongylophora sp.	Petrosiidae (esponja)	Copp & Pearce, 2007	
ircinol (25)	1.9	Amphimedon sp.	Niphatidae (esponja)	Van Minh <i>et al.</i> , 2005	
3-axisonitrilo (26)	2.0	Axinella cannabina	Axinellidae (esponja)	Сорр, 2003	
saringosterol (27)	0.25	Lessonia nigrescens	Lessoniaceae (alga)	Соор, 2003	

Tabla 4. Metabolitos anti-TB con mayor potencia aislados de organismos marinos entre 2001-2009.



Figura 6. Estructura de metabolitos anti-TB aislados de organismos marinos.

Entre los compuestos que se encuentran actualmente en ensayos clínicos están la nocathiacina I (Figura 7) aislada del actinomiceto *Nocardia* sp. Este compuesto ha presentado la mayor potencia anti-TB con un valor de CMI de 0.008 µg/mL. El mecanismo de acción reportado para este compuesto es mediante la inhibición de la síntesis proteica de la bacteria por unión a la unidad 50S del ribosoma, y recientemente se han realizado derivados de este metabolito, debido a que presentaba problemas de solubilidad y sus derivados han concluido la fase preclínica (Copp & Pearce, 2007; Lam, 2007; Xu, *et al*, 2009).



Figura 7. Estructura química de la nocathiacina I.

Dos compuestos actualmente en fase II del ensayo clínico son el calanólido A (28) y un derivado de la pleuromutilina (BC-3781, 29); sus estructuras se presentan en la figura 8. El calanólido A es una cumarina aislada del fruto y

ramas del árbol Calophyllum lanigerum. Este compuesto inicialmente se encontró como un inhibidor de la transcriptasa reversa del VIH v posteriormente se observó que presenta actividad sobre M. tuberculosis con una CMI de 3.13 µg/mL. De concluir de manera exitosa el ensavo clínico. este compuesto podría utilizarse en personas infectadas con VIH y TB (Saklani & Kutty: Copp & Pearce 2007). Respecto a la pleuromutilina, ésta corresponde a un diterpeno aislado del basidiomiceto Pleurotus mutilus; presentó una CMI de 3.1 µg/mL contra M. tuberculosis; adicionalmente ha presentado actividad sobre bacterias Gram-positivas y mycoplasmas. Este compuesto fue identificado desde 1951 y sus derivados ahora sintéticos se utilizan en la medicina veterinaria. Su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis proteica bacteriana por unión al ribosoma procariótico; este mecanismo es similar al de los aminoglucósidos, sin embargo, su sitio de unión al ribosoma es diferente (De Souza, 2009; Novak, 2011). Esta característica permite que no exista resistencia cruzada en pacientes con cepas resistentes a aminoglucósidos, razón por la cual las pleuromutilinas son atractivas para el uso en humanos.



Figura 8. Estructura del calanólido A y pleuromutiina BC-3781.

Uno de los compuestos que actualmente se utiliza como fármaco es la ecteinascidina; este compuesto fue desarrollado por PharmaMar (Zeltia) y Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development LLC, el cual presentó una de las más potentes actividades sobre *M. tuberculosis* (CMI = 0.1 µg/mL), sin embargo, su uso en la terapéutica es para el tratamiento del sarcoma de tejidos blandos y recientemente se encuentra en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer de próstata, mama y sarcoma de tejidos blandos pediátricos (Cassier *et al.*, 2010)

En estudios realizados por el grupo de Biofármacos y Biopesticidas del CICY en colaboración con el laboratorio de Farmacognosia del Centro de

Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIN-IMSS) detectaron que el extracto hexánico de la corteza de *D. anisandra* presenta actividad sobre dos cepas de *M. tuberculosis* una sensible a los medicamentos anti-TB de primera línea (cepa H37Rv) y un aislado clínico resistente a los mismos (cepa CIBIN-UMF 15:99), con valores de CMI de 12.5 y 6.25 µg/mL, respectivamente. Estos mismos grupos de investigación también determinaron que el extracto de acetato de etilo de la cepa fúngica de *Gliocladium* sp. presenta una potente actividad contra la cepa sensible de *M. tuberculosis* con valores de CMI de 0.78 µg/mL. Tanto el extracto hexánico de *D. anisandra* como el de acetato de etilo de *Gliocladium* sp. tienen un potencial muy interesante como fuentes de nuevos compuestos anti-TB. Por lo anterior en el presente trabajo se realizó el aislamiento, purificación e identificación de los metabolitos responsables de la actividad anti-TB de los extractos hexánico de la corteza del tallo de *D. anisandra* y de acetato de etilo de *Gliocladium* sp.

I.5 OBJETIVOS

1.5.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar, purificar e identificar los metabolitos responsables de la actividad anti-TB detectada *in vitro* en extractos de corteza de *Diospyros anisandra* Blake y de un cultivo del hongo anamórfico *Gliocladium* sp. MR41.

1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener el extracto hexánico de corteza del tallo de *D. anisandra* Blake y el extracto de acetato de etilo de *Gliocladium* sp. MR41.
- Purificar los metabolitos mayoritarios presentes en los extractos orgánicos de origen vegetal y fúngico.
- Identificar los diferentes metabolitos aislados mediante el empleo de técnicas espectrométricas y/o espectroscópicas.
- Evaluar los metabolitos aislados sobre la cepa sensible de M. tuberculosis H37Rv (ATCC No 27294).
- Evaluar los metabolitos activos sobre aislados clínicos de *M. tuberculosis* fármaco-resistentes (CIBIN-UMF 15:99).
- Evaluar la citotoxicidad de los metabolitos con propiedades anti-TB en células Vero (ATCC No CC-81) y células mononucleares de sangre períferica.

I.6 HIPÓTESIS

El extracto hexánico de la corteza de *D. anisandra* y el extracto de acetato de etilo de la cepa de *Gliocladium* sp. MR41 presentan actividad anti-TB *in vitro*, por lo que estos extractos contienen metabolitos secundarios que son los responsables de dicha actividad.

I.7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

De manera general la estrategia experimental consistió en la obtención del material vegetal y fúngico. Se realizaron los extractos orgánicos de ambos materiales y posteriormente estos fueron sometidos a diversas técnicas cromatográficas hasta la obtención de compuestos puros. Los compuestos puros se identificaron mediante estudios espectroscópicos y espectrométricos. Se determinó la actividad anti-TB de los compuestos puros obtenidos del material vegetal y de las fracciones y sub-fracciones del material fúngico. Finalmente los compuestos anti-TB fueron evaluados sobre dos líneas celulares de mamífero. En la Figura 9 se presenta el diagrama de la estrategia experimental.



Figura 9. Diagrama general de la estrategia experimental.

I.8 REFERENCIAS

- Basso, L., L. Pereira, A. Fett, W. Filgueira, I. Souza, M. Palma, J. Batista, S. Astolfi, R. Ribeiro, M. Pereira and D. Santos (2005). The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases- A review. Memorias do Institutto Oswaldo Cruz, 100, 475-506.
- Cantrell, C. L., S. G. Franzblau and N. H. Fischer (2001). Antimycobacterial plant terpenoids. Planta Medica, 67, 685-694.
- Cassier, P. A., A. Duret, O. Trédan, N. Carrabin, P. Méeus, I. Treilleux, J. P. Guastalla, and I. Ray-Coquard (2010). New developments in treatment of ovarian carcinoma: focus on trabectedin. Cancer Management and Research, 2, 233-242.
- CENACEVE, Secretaría de Salud. Home page: http://www.salud.gob.mx/ (consultado junio de 2012)
- Clark, J. and S. Haydel (2003). Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. Annual Review of Microbiology, 57, 517-549.
- Copp, B (2003). Antimycobacterial natural products. Natural Products Reports, 20, 535-557.
- Copp, B. and . Pearce (2007). Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. Natural Products Reports, 24, 278-297.
- Del Olmo-Fernández E., J. L. López-Pérez, A. San Feliciano and A. García, (2005). Desarrollo de nuevos agentes antituberculosos. Enfermedades Emergentes, 7, 22-33.
- De Souza, M. V. N (2005). Plants and fungal products with activity against tuberculosis. The Scientific World Journal, 5, 609-628.
- De Souza, M. V. N (2009). Promising candidates in clinical trials against multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) based on natural products. Fitoterapia, 80, 453-460.
- García-García, M. L., M. E. Jiménez-Corona, A. Ponce-de León, A. Jiménez-Corona, M. Palacios-Martínez, S. Balandrano-Campos, L. Ferreyra-Reyes, L. Juárez-Sandino, J. Sifuentes-Osornio, H. Olivera-Díaz, J. L. Valdespino-Gómez and P. M. Small (2000). Mycobacterium tuberculosis drug resistance in a suburban community in Southern Mexico. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 4, S168–S170.
- Granich, R., S. Balandrano, A. Santaella, N. Binkin, K. Castro, A. Marquez, G. Anzaldo, M. Zarate, M. Jaimes, O. Velazquez, L. Salazar, C. Alvarez, P. Kuri, A. Flisser, J. Santos, C. Ruiz, R. Tapia and J. Tappero (2000). Survey of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in 3 mexican states. Archives of Internal Medicine, 160, 639-644.

- Lam, K. S (2007). New aspects of natural products in drug discovery. Trends in Microbiology, 15, 279–289.
- Ledermann, W (2003). La tuberculosis después del descubrimiento de Koch. Revista Chilena de Infectología edición aniversario, 48-50.
- Magos-Guerrero, G. A. and M. Lorenzana-Jiménez (2009). Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos. Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM, 52, 260-264.
- Marovac, J (2001). Investigación y desarrollo de nuevos medicamentos: de la molécula al fármaco. Revista Médica de Chile, 129, 99-106.
- Negi, A. S., J. K. Kumar, S. Luqman, D. Saikia and S. P. S. Khanuja (2010). Antitubercular potential of plants: a brief account of some important molecules. Medicinal Research Reviews, 30, 603-645.
- Novak, R (2011). Are pleuromutilin antibiotics finally fit for human use? Antimicrobial Therapeutics Reviews, 1241, 71-81.
- Okunade, A., P. Elvin and W. Lewis (2004). Natural antimycobacterial metabolites: current status. Phytochemistry, 65, 1017-1032.
- Rogoza, L. N., N. F. Salakhutdinov and G. A. Tolstikov (2011). Antitubercular activity of natural products: recent developments. Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry, 103-120.
- Said-Fernández, S., J. Enciso, J. Torres-López, J. Castro-Garza, L. Navarro-Marmolejo, P. Becerril-Montes, M. Rojas-Alvarado, G. Caballero-Olin, H. Valdez, L. Flores, L. Pernas, S. Valdovinos-Chávez, H. Martínez-Rodríguez and J. Luna-Herrera (2001). Epidemiología molecular de la tuberculosis pulmonar en el Norte de México. En García C, H. Reyes, L. Viniegra Eds. Las Múltiples facetas de la investigación en salud. Editorial Sestantes, México, DF. Pp 201-219.
- Saklani, A. and S. K. Kutty (2008). Plant-derived compounds in clinical trials. Drug Discovery Today, 13, 161-171.
- Saviola, B. and W. Bishai (2006). The genus *Mycobacterium*. Medical. Prokaryotes, 3, 919-933.
- Schlossberg, D (1999). Tuberculosis e infecciones por micobacterias no tuberculosas, 4ta ed.; Mc-Graw.Hill Interamericana, Eds.; México, p 3.
- Tiruviluamala, P. and L. Reichman (2002). Tuberculosis. Annu. Rev. Public Health, 23, 403-426.
- Van-Minh, C., P. Van-Kiem and N. Hai-Dang (2005). Marine natural products and their potential application in the future. Journal for Science and Technology Development, 22, 297-311.
- World Health Organization, (2008) "Anti-tuberculosis, drug resistance in the world report No 4" World Health Organization, Geneva.
- World Health Organization, (2009) "World Health Organization global tuberculosis control surveillance, planning, and financing," World Health Organization, Geneva.
- World Health Organization, (2010) "Global tuberculosis control 2010"

- World Health Organization, (2011) "World Health Organization global tuberculosis control".
- Xu, L., A. K. Farthing, J. F. Dropinski, P. T. Meinke, C. McCallum, P. S. Leavitt, E.J. Hickey, L. Colwell, J. Barrett and K. Liu (2009). Nocathiacin analogs: Synthesis and antibacterial activity of novel water-soluble amides. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 19, 3531-3535.
- Zhang, Y (2005). The magic bullets and tuberculosis drug targets. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 45, 529-564.



Capítulo II

Estudio fitoquímico de la corteza de D. anisandra Blake

II.1 ANTECEDENTES

II.1.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE DIOSPYROS ANISANDRA BLAKE

D. anisandra es un arbusto que alcanza hasta 5 m de altura, tiene ramas cortas y lampiñas; hojas subfasciculadas en las puntas de las ramas con el ápice más amplio que la base, redondeadas y retusas en el ápice y cuneadas en la base, miden de 2-6 cm de largo y 1.2-3 de ancho; inflorescencias axilares; flores estaminadas con pedicelos de 1-2 mm de largo, cáliz infundibuliforme de 4 mm de largo, los 4 lóbulos lanceolados, acuminados de 1.5 mm de largo y los pétalos urceolados con cerca de 14 mm; fruto globoso, con cerca de 1 cm de diámetro y de color negro brillante cuando madura (Standley *et al.*, 1967). En la Figura 10 se observan las hojas y frutos de *D. anisandra.*



Figura 10. Árbol de Diospyros anisandra.

Clasificación	taxonómica de Diospyros anisandra (Cronquist, 1981).
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Magnoliidae
Orden	Ebenales
Familia	Ebenaceae
Género	Diospyros
Especie	Diospyros anisandra Blake

D. anisandra es conocida con los nombres mayas de k'ak'alche', k'akalche', x-kache', x-nobche' y sak silil (Duran *et al.*, 1998). Esta planta se distribuye en los estados de Yucatán, Campeche, Quintana Roo y también en Guatemala. Es usada como fuente maderable, para instrumentos y utensilios, como comestible y medicinal para el tratamiento de forúnculos y micosis de la piel (Durán *et al.*, 1998).

II.1.2 FITOQUÍMICA DEL GÉNERO DIOSPYROS

El número de metabolitos que se han aislado de este género es extenso e incluye benzopironas, esteroides, naftoquinonas, polifenoles, taninos terpenos, entre otros (Mallavadhani *et al.*, 1998).

Algunos de los metabolitos representativos de las especies del género *Diospyros* son las naftoquinonas, especialmente las de tipo 1,4naftoquinona. Éstas se pueden encontrar como monómeros, dímeros y rara vez como trímeros o tetrámeros. La plumbagina (**30**) y la 7-metil-juglona (**31**) son las naftoquinonas monoméricas (Figura 11) más comunes y abundantes encontradas en las especies de este género (Mallavadhani *et al.*, 1998).



Figura 11. Naftoquinonas monoméricas más comunes y abundantes del género Diospyros.

Otras naftoquinonas (Figura 12) son la 6-(1-etoxietil)-plumbagina (**32**), la etilidene-3,3'-biplumbagina (**33**) y la etilidene-3,6'-biplumbagina (**34**), todas aisladas de *D. maritima* (Higa *et al.*, 2002). De *D. greeniwayi* se aisló una naftoquinona dimérica, la 5-5'-dihidroxi-2,7'-dimetil-3,8'-binaftaleno-1,1',4, 4'-tetrona (**35**) (Khan *et al.*, 1998) y de la corteza de la raíz de *D. mafiensis* una tetramérica, la 6'',8'-bisdiosquinona (**36**) (Khan *et al.*, 1999).



Figura 12. Naftoquinonas aisladas de especies del género Diospyros.

Otro de los metabolitos distintivos de este género son los terpenos, especialmente los triterpenos pentacíclicos. El tipo de esqueleto frecuentemente reportado en el género es el lupano, que incluye a la 3-(E)-feruloilbetulina (**37**) y la 28-acetil-3-(E)-cumaroilbetulina (**38**), ambas aisladas de *D. maritima* y el lup-20(29)-ene- 3α ,27-diol (**39**) aislado de *D. peregrina*, sus estructuras se presentan en la Figura 13 (Mallavadhani *et al.*, 1998; Kuot *et al.*, 1997).



Figura 13. Triterpenos de tipo lupano aislados de especies del género Diospyros.

Así también se ha encontrado un número significativo de benzopironas (cumarinas y flavonoides) y la mayoría en forma de glicósidos (Figura 15). Por mencionar uno, se reporta el gerberinol (40) aislado de las raíces de dos variedades de *D. kaki* (Paknikar *et al.*, 1996). De las hojas de *D.*

cathayensis se aislaron 12 flavonoides glicosilados de los cuales seis son derivados de kaempferol (**41**) y seis de quercitina (**42**). De *D. rhombifolia* se aislaron dos flavonoides glicosilados derivados de kaempferol (Furusawa *et al.*, 2005).



Figura 14. Benzopironas aisladas de especies del género Diospyros.

El efecto astringente del género se debe a los polifenoles y los taninos que contiene. En *D. kaki* se han detectado polifenoles (Figura 15) como la delphinidina (43), la cianidina (44) y el ácido gálico (45), además se ha detectado que presenta un alto porcentaje de taninos (Mallavadhani *et al.*, 1998).



Figura 15. Polifenoles aislados de especies del género Diospyros.

En el presente capítulo se describe el aislamiento, purificación e identificación de los compuestos mayoritarios del extracto hexánico de la corteza del tallo de *D. anisandra*.

II.2 MATERIAL Y MÉTODOS

II.2.1 MATERIAL Y EQUIPO DE LABORATORIO PARA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS Y PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS

El el desarrollo del trabajo experimental se utilizaron disolventes grado industrial, punificados por destilación en el laboratorio y grado reactivo analítico. Para el secado de la muestras se utilizó un evaporador rotatorio marca Büchi 461, modelo RE-11 (Büchi Labortechnik AB, Flawil, Switzerland) equipado con un baño de agua a 40 °C y para eliminar por completo el disolvente se utilizó una bomba de alto vacío marca Welch modelo 2534B-01 (Gardner Denver Thomas, Inc., Wayne, PA, USA).

Para el análisis cualitativo en cromatografía de capa delgada (CCD) se utilizaron placas cromatográficas con soporte de aluminio impregnadas con gel de sílice 60F₂₅₄, de 0.20 mm de espesor (Merck, Darmstadt, Germany). Los componentes separados por CCD fueron visualizados bajo luz UV de onda corta (254 nm) y larga (365 nm) con un iluminador marca Equipar, modelo UVGL-25 (Equipar S.A de C.V., México D.F., México). Para la visualización permanente se usaron reveladores químicos, uno general, disolución al 4% de ácido fosfomolíbdico (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) y trazas de sulfato cérico (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) en H₂SO₄ (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) al 5% y otro específico para naftoquinonas, disolución al 5% de KOH (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) en etanol.

Las columnas cromatográficas de permeación en gel se empacaron con Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden). Para la cromatografía líquida al vacío (CLV), la de gravedad y la tipo flash se utilizó gel de sílice 60 de diferentes tamaños de malla (70-230, 200-400 marca Merck, Darmstadt, Germany). Para las cromatografías en placa preparativa se emplearon placas de vidrio de 20 × 20 cm impregnadas con gel de sílice 60F₂₅₄ de 0.25 mm de espesor (Merck, Darmstadt, Germany).

II.2.2 MATERIAL Y EQUIPO PARA LA IDENTIFICACIÓN ESTRUCTURAL

Los análisis por cromatografía de gases-espectroscopía de masas (CG-EM) se realizaron en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies modelo 6890N Network GC system (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA), acoplado a un detector de masas Agilent Technologies modelo 5975B inter MSD (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) controlado por una computadora. Se usaron dos tipos de métodos: (1) una columna no polar Ultra 1 (100% dimetilpolisiloxano, 25 m × 0.321 D, 0.52 µm grosor de la película) y como programa de temperaturas $T_1 = 140$ °C, $T_2 = 280$ °C con un gradiente de 10°C/min; (2) una columna de mediana polaridad DB-5MS (polímero de fenil arileno equivalente a 5% de fenil-

metilpolisiloxano, 30 m × 0.32 D, 0.5 µm de grosor de la película) y como programa de temperaturas $T_1 = 140$ °C, $T_2 = 300$ °C con un gradiente de 8°C/min. Helio de ultra alta pureza se utilizó como gas acarreador en ambos métodos a un flujo de 1.5 mL/min. Los espectros de masas de los picos mayoritarios de los cromatogramas obtenidos se analizaron en la base de datos NIST05MS, cuya última actualización D.05.01, se registró en febrero de 2006.

Los análisis de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H) y de carbono 13 (RMN-¹³C) mono y bidimensionales homo y heteronucleares se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance Ultrashield 400 con sonda dual de 5 mm (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA). Para la disolución de las muestras se utilizó cloroformo, acetona o metanol deuterado. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm).

Para determinar el punto de fusión de los compuestos se utilizó un equipo Mel-Temp II (Electrothermal Engineering, Ltd., Rochford, Essex, UK) y un termómetro digital Fluke 51 (Fluke Corporation, Everett, WA, USA).

Los análisis de infrarrojo se realizaron en un equipo Nicolet Protégé 460 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) utilizando pastillas de bromuro de potasio (KBr, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) como soporte.

II.2.3 OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Se realizaron dos colectas de *D. anisandra*, la primera en el mes de octubre de 2007 en el camino Libre Unión-Yaxcabá en el estado de Yucatán; las plantas colectadas eran pequeñas y tenían frutos. La segunda colecta se realizó en el mes de abril de 2008, en el camino Libre-Unión-cenote Xtojil. En esta ocasión se colectaron árboles que no presentaban frutos. Las plantas fueron identificadas por la Dra. Martha Méndez y un ejemplar de la especie de cada colecta se depositó en el herbario del CICY (No. de colecta 1451 y 1474). De las plantas se obtuvo en fresco la corteza del tallo, la cual fue secada en un desecador de herbario y se pulverizó en un molino de cuchillas marca Pagani, con número de malla seis (Pagani-Dycomet, S.A. de C.V., México D.F., México). De la primera colecta se obtuvieron 805 g y de la segunda 1,400 g de material vegetal.

II.2.4 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

El material vegetal de cada colecta se extrajo con hexano (Hx) por maceración a temperatura ambiente durante 24 h. Se realizaron tres extracciones y al término de cada extracción el disolvente se decantó, filtró y evaporó a presión reducida.

II.2.5 FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS TOTALES

Los extractos orgánicos de la primera (DA-1) y de la segunda (DA-2) colectas se fraccionaron por CLV. El sistema de elución empleado fue Hx, Hx-acetona (An) en las siguientes proporciones: 95:5, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, An, An-metanol (MeOH) (1:1) y MeOH. El volumen de las fracciones fue de 250 mL.

Las fracciones obtenidas de ambas colectas se reunieron en 11 subfracciones (DAT-1-11) de acuerdo a su similitud en CCD.

II.2.6 OBTENCIÓN DE COMPUESTOS PUROS DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO TOTAL

II.2.6.1 PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN DAT-4

II.2.6.1.1 PURIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS I Y II

DAT-4 (320 mg) fracción obtenida de la reunión de las subfracciones obtenidas de la elución con Hx:An (95:5), se sometió a un proceso de purificación mediante cromatografía en columna por gravedad, empleando una columna de 2 cm de diámetro y 44 cm de alto. Se utilizaron como eluyentes benceno (Bn) y mezclas de Bn/An. Se colectaron 314 alícuotas de 3 mL cada una, las cuales se reunieron en 14 sub-fracciones (DAT-4A-N) de acuerdo a su similitud en CCD.

La sub-fracción DAT-4J (38.4 mg) se purificó mediante cromatografía en placa preparativa de fase normal. El sistema utilizado fue Bn/An (95:5). Se obtuvieron los compuestos I (1 mg) y II (2.5 mg) en forma pura.

Compuesto I (4,4'-dihidroxi-7,7'-dimetil-1,1'-binaftalen-5,5',8,8'-tetrona, maritinona): cristales rojos; pf 196-197 °C; IR v_{max} (KBr): 3500 (O-H), 2921(C-H), 1645 (C=O), 1456 (CH₃-C=C), 1218 (C-OH) cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.01 (6H, d, J = 2.9 Hz, H-9 y H-9'), 7.29 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-6 y H-6'), 7.19 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-7 y H-7'), 6.81 (2H, q, J = 2.9 Hz, H-3, H-3'), 12.58 (2H, s, OH-5 y OH-5'); IE-EM m/z (int. rel): 374 [M]⁺ (100), 331 (40), 317 (23), 303 (81), 278 (32), 250 (49), 207 (33), 139 (22).

Compuesto II (aldehído de la betulina): polvo blanco amorfo; pf 187-188 °C; IR v_{max} (KBr) 3396 (O-H), 2940-2,867 (C-H), 1708 (C=O), 1452 (CH₂ y CH₃) 1380 (gem dimetilo), 1037 (HC-OH), 885 (C=CH₂) y 736 (CH₂) cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃), δ 0.74 (3H, s, H-24), 0.81 (3H, s, H-25), 0.90 (3H, s, H-23), 0.95 (3H, s, H-26), 0.96 (3H, s, H-27), 1.68 (3H, s, H-30), 2.80 (1H, td, J = 11.2, 6.0 Hz, H-19), 3.17 (1H, dd, J = 11.2, 5.2 Hz, H-3), 4.62 (1H, sa, H-29a), 4.75 (1H, sa, H-29b), 9.6 (1H, s, H-28); IE-EM *m/z* (int. rel): 440 [M]⁺ (22), 411 (29), 207 (60), 189 (100), 175 (49), 135 (64), 121 (66), 107 (69), 93 (72), 81 (75), 69 (62).

II.2.6.1.2 PURIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS III Y IV

Otra parte de DAT-4 (400 mg) se purificó mediante cromatografía de permeación en gel, en una columna de 2 cm de diámetro por 44 cm de largo. Como sistema de elución se utilizó CHCl₃/MeOH (1:1). Se colectaron 43 alícuotas de 5 mL cada una, las cuales se reunieron en 8 sub-fracciones (DAT-4A'-H') de acuerdo con su similitud por CCD.

La sub-fracción DAT-4E' (75 mg) se purificó por cromatografía en columna por gravedad, las dimensiones de la columna fueron de 1 cm de diámetro por 56 cm de altura, como eluyente se utilizó Hx/CH₂Cl₂ (4:6) de manera isocrática. Se colectaron 225 alícuotas de 3 mL cada una. Éstas se reunieron en 11 sub-fracciones (DAT-4E'1-11) de acuerdo con su similitud por CCD.

La sub-fracción DAT-4E'-4 (28 mg) se purificó mediante cromatografía en placa preparativa. El sistema de elución utilizado fue benceno/An (95:5). Se obtuvieron los compuestos III (1.4 mg) y IV (19.4 mg).

Compuesto III (5,5'-dihidroxi-2,2'-dimetil-3,6'-binaftalen-1,1',4,4'-tetrona, chitranona): cristales color naranja; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃), δ 2.06 (3H, s, H-11), 2.23 (3H, d, J = 1.2 Hz, H-11'), 6.86 (1H, d, J = 1.2 Hz, H-3'), 7.28 (1H, dd, J = 8.4, 1.2 Hz, H-6), 7.48 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-7'), 7.64 (1H, dd, J = 8,4, 7.6 Hz, H-7), 7.71 (1H, dd, J = 7.6, 1.2 Hz, H-8), 7.75 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-8'), 11.94 (1H, s, OH-5), 12.28 (1H, s, OH-5').

Compuesto IV (4(15), 5E, 10(14)-germacratrien-1β-ol): aceite incoloro; [α]^D₂₅ = -105° (0.004, CHCl₃) ; IR v_{max} (KBr) 3434 (O-H), 2954-2871 (C-H), 1714 (C=C exocíclico), 757 (C=C), 898 (C=C) cm⁻¹ (C=C); RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃), δ 0.81 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-12), 0.89 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-13), 1.49 (1H, sept, J = 6.7 Hz, H-11), 3.75 (1H, dd, J = 11.7, 3.4 Hz, H-1), 4.84 (1H, s, 15a), 4.92 (1H, s, 15b), 4.99 (1H, s, 14a), 5.26 (1H, s, 14b), 5.42 (1H, dd, J = 15.8, 10.3 Hz, H-6), 5.99 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-5); RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃), δ 20.6 (C-12), 20.8 (C-13), 30.1 (C-3), 31.9 (C-11), 34.6 (C-9), 36.3 (C-8), 36.4 (C-2), 52.6 (C-7), 76.1 (C-1), 110.7 (C-14), 113.0 (C-15), 129.7 (C-5), 138.1 (C-6), 146.8 (C-4), 153.6 (C-10); IE-EM *m/z* (int. rel): 220 [M]⁺ (7), 202 (15), 177 (22), 159 (47), 109 (84), 91 (100), 79 (80).

II.2.6.1.3 PURIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS V, VI, VII Y VIII

Otra parte de DAT-4 (1.007 g) se particionó por extracción líquido-líquido con una disolución acuosa de KOH al 5% (500 mL) y CHCl₃ (1000 mL). La fase orgánica se concentró mediante evaporación obteniéndose DAT-4A (856 mg). La fase acuosa se aciduló con una disolución de HCl al 10% y se extrajo con CHCl₃ obteniéndose la fracción DAT-4B (128 mg).

La fracción DAT-4B (120 mg) se sometió a una cromatografía en columna tipo flash. Las dimensiones de la columna fueron de 2 cm de diámetro y 40 cm de alto, la elución de los componentes se realizó con Hx-acetato de etilo (AcOEt) en gradiente. Se colectaron 125 alícuotas de 10 mL, las cuales se reunieron en 7 sub-fracciones (DAT-4B-1-7) de acuerdo a su similitud en CCD. En la sub-fracción DAT-4B-1 se obtuvo el compuesto V (22.1 mg) de forma pura. Además en la sub-fracción DAT-4B-6 se purificaron 16 mg adicionales del compuesto I. En la sub-fracción DAT-4B-4 (16 mg) se encontró un metabolito de forma semipura. Éste fue purificado mediante una cromatografía por gravedad en una columna de 1 cm de diámetro por 20 cm de alto, como eluyente se utilizó CHCl₃ de forma isocrática. Se colectaron 54 alícuotas de 1 mL, las cuales fueron reunidas en cuatro sub-fracciones (DA-4B-4A-D) de acuerdo con su similitud en CCD. La sub-fracción DA-4B-4C contenía el compuesto VI (12.3 mg) de forma pura.

La sub-fracción DAT-4B-7 (16 mg) se purificó mediante una cromatografía por gravedad, con una columna de 1 cm de diámetro y 29 cm de alto y se eluyeron los componentes con CHCl₃ de manera isocrática. Se colectaron 61 alícuotas, las cuales se reunieron en seis sub-fracciones (DAT-4B-7A-F) de acuerdo con su similitud en CCD. En la sub-fracción DAT-4B-7B se encontró de forma pura el compuesto VII (4 mg).

La fracción DAT-4A (850 mg) se purificó a través de una cromatografía en columna tipo flash. Las dimensiones de la columna fueron de 2.8 cm de diámetro y 40 cm de alto. Como eluyente se utilizó Hx/An en gradiente. Se colectaron 149 fracciones de 20 mL cada una, estas fueron reunidas en 18 fracciones (DA-5A-1-18) de acuerdo a su similitud en CCD. En la fracción DA-5A-4 se obtuvo de manera pura el compuesto VIII (8 mg).

En las Figuras 16 y 17 se presenta el diagrama general de purificación de DAT-4.

Compuesto V (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftalendiona, plumbagina): cristales color amarillo-naranja; pf. 74-75 °C; IR v_{max} (KBr) 3500 (C-OH), 1641 (C=O), 1452 (CH₃-C=C), 1255 (C-OH); IE-EM *m*/z (int. rel): 188 [M]⁺ (100), 173 (26), 160 (22), 131 (48), 120 (22), 92 (26), 63 (22).

Compuesto VI (5,5'-dihidroxi-2,2'-dimetil-3,3'-binaftalen-1,1',4,4'-tetrona, 3,3'-biplumbagina): cristales color naranja; pf. 215-217 °C; IR ν_{max} (KBr) 3490 (O-H), 1627 (C=O), 1456 (CH₃-C=C), 1286 (C-OH) cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 2.01 (6H, s, H-11-11'), 7.29 (2H, dd, J = 8.2, 1.2 Hz, H-9-9'), δ 7.66 (2H, t, J = 8.4, 7.6 Hz, H-8-8'), δ 7.72 (2H, dd, J = 7.2, 1.2 Hz, H-7-7'), δ 11.21 (2H, s, OH-6-6') ; IE-EM *m*/*z* (int. rel): 374 [M]^{*} (87), 359 (100), 331 (20), 120 (33), 92 (63).

Compuesto VII (epóxido de zeylanona): agujas amarillas; pf. 231-232 °C; UV λ_{max} MeOH (log ϵ): 355 (3.76) nm, 231 (4.38) nm; IR ν_{max} (KBr): 3450 (C-OH), 1639 (C=O), 1250 (C-O-C) y 673 (C-H) cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 1.62 (3H, s, H-11), 2.73 (1H, dd, J = 15.0, 7.6 Hz, H-11'a), 3.01 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-3), 3.63 (1H, d, J = 15.0 Hz, H-11'b), 7.24 (1H, dd, J = 8.0, 1.2 Hz, H-7'), 7.26 (1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz, H-7), 7.55 (1H, dd, J = 7.2, 1.2 Hz, H-9'), 7.62 (1H, t, J = 8.0 Hz, H-8'), 7.65 (1H, t, J = 8.0 Hz, H-8), 7.68 (1H, dd, J = 7.6, 2.0 Hz, H-9), 11.17 (1H, s, OH-6'), 12.15 (1H, s, OH-6); RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 17.9 (C-11), 28.9 (C-11'), 51.6 (C-3), 54.1 (C-2), 66.8 (C-2'), 69.9 (C-3'), 115.2 (C-5'), 117.5 (C-5), 119.1 (C-9), 120.0 (C-9'), 124.3 (C-7), 125.3 (C-7'), 132.8 (C-10'), 135.4 (C-10), 137.1 (C-8'), 137.6 (C-8), 161.8 (C-6), 162.5 (C-6'), 188.5 (C-1'), 193.5 (C-4'), 193.9 (C-1), 201.0 (C-4); EIMS 70 eV, *m/z* (ret. int.): 390.1 [M]+ (100), 347.0 (27), 226.0 (44), 120.0 (58), 92.0 (53); HR-EIMS m/z: 390.1103 [M]+ (calcd. para C₂₂H₁₃O₇, 390.0739).

Compuesto VIII (lupeol): polvo blanco amorfo; pf. 214-215 °C; IR v_{max} (KBr) cm⁻¹ 3297 (O-H), 2917-2848 (C-H), 1637 (C=C), 1461 (CH₂, CH₃) 1378 (gem dimetilo), 1037 (HC-OH); RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0.75 (3H, s, H-23) 0.78 (3H, s, H-24) 0.82 (3H, s, H-25), 0.94 (3H, s, H-26), 0.98 (3H, s, H-27), 1.02 (3H, s, H-28), 1.67 (3H, s, H-30), 2.37 (2H, td, *J* = 11.08, 5.8 Hz, H-19), 3.18 (1H, m, H-3), 4.56 (1H, dd, *J* = 2.4, 1.3 Hz, H-29b), 4.68 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-29a). IE-EM *m/z* (int. rel): 426 [M]⁺ (31), 207 (87), 189 (89), 135 (80), 121 (80), 107 (87), 95 (100), 81 (93), 67 (76).



Figura 16. Diagrama de purificación de DAT-4 (parte 1).



Figura 17. Diagrama de purificación de DAT-4 (parte 2).

II.2.6.2 PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO IX

La fracción DAT-5 (560 mg) obtenida de la reunión de las subfracciones eluidas con Hx:An (95:5) a Hx:An (90:10), se particionó entre una disolución acuosa de KOH al 5% (200 mL) y CHCl₃ (400 mL). La fase orgánica se concentró mediante evaporación obteniéndose DAT-5A (430 mg). La fase acuosa se aciduló con una disolución de HCl al 10% (150 mL) y se extrajo con CHCl₃ (400 mL) obteniéndose la fracción DAT-5B (98 mg). La fracción DAT-5B (92 mg) se sometió a una cromatografía de permeación en gel con una columna de 1 cm y 50 cm de alto. Como fase eluyente se utilizó MeOH de manera isocrática. Se obtuvieron 18 fracciones, que por su similitud en CCD se reunieron en ocho fracciones (DAT-5B-1-8). La fracción DA-5B-4 contenía el compuesto IX (8.1 mg) de forma pura. El diagrama de purificación se presenta en la Figura 18.

Compuesto IX (3R,4R-dihidro-4,8-dihidroxi-3-metil-1-naftalen-ona, *cis***isoshinanolona**): aceite color naranja; $[\alpha]_{25}^{D} = +22.22^{\circ}$ (0.006, CHCl₃); RMN-¹H (400 MHz, CD₃COCD₃) δ 1.11 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-9), 2.44 (1H, m, H-3), 2.58 (1H, dd, *J* = 17.5, 4.3 Hz, H-2a) 2.79 (1H, dd, *J* = 17.5, 10.2 Hz, H-2b), 4.54 (1H, sa, OH-4), 4.76 (1H, sa, H-4), 6.84 (1H, dd, *J* = 8.3, 0.92 Hz, H-5), 6.99 (1H, d, *J* = 7.4, H-7), 7.54 (1H, t, *J* = 8.2, 7.5 Hz, H-6), 12.42 (1H, s, OH-8). IE-EM *m/z* (int. rel): 192 [M]⁺ (87), 150 (33), 121 (100).



Figura 18. Diagrama de purificación de DAT-5.

II.2.6.3 PURIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS X, XI Y XII

La muestra DAT-6 (500 mg) obtenida de la reunión de las subfracciones eluidas con Hx:An (90:10), se sometió a una columna cromatográfica flash, utilizando una columna de 3 cm de diámetro por 26 cm de largo. El sistema de elución consistió en varias mezclas de Hx/AcOEt de polaridad creciente. Se colectaron 63 alícuotas. En las alícuotas ocho, nueve y diez se formó un precipitado color rojo, el cual se purificó por cristalización sucesiva con An obteniéndose el compuesto X (1.0 mg). En las fracciones 13 a la 18 se formó un precipitado de color blanco que también se purificó por cristalización sucesiva con An obteniéndose el compuesto XI (5.4 mg). Las 63 alícuotas se reunieron en 15 sub-fracciones (DAT-6A-O) de acuerdo a su similitud en CCD.

La fracción DAT-6J se sometió a una cromatografía en columna por gravedad con una columna de 1 cm de diámetro y 29 cm de alto, la elución

de los componentes se realizó con CHCI₃ de manera isocrática. Se colectaron 40 alícuotas de 1 mL cada una, las cuales se reunieron en cuatro sub-fracciones (DAT-6J-1-4) de acuerdo a su similitud en CCD. La fracción DAT-6-J-4 contenía al compuesto XII de forma pura (10.1 mg). El diagrama de purificación se presenta en la Figura 19.

Compuesto X (5,5'-dihidroxi-2,2'-dimetil-6,6'-binaftalen-1,1',4,4'-tetrona, eliptinona): polvo color naranja; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.20 (6H, d, J = 1.6 Hz, H-9 y H-9'), 6.80 (2H, q, J = 1.6 Hz, H-3 y H-3'), 7.70 (4H, s, H-7, H,7', H-8 y H-8'); 12.50 (2H, s, OH-5 y OH-5'); IE-EM *m/z* (int. rel): 374 [M]⁺ (100), 278 (14), 165 (10).

Compuesto XI (betulina): polvo blarico; pf. 258-259 °C; IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹ 3351 (O-H), 2932-2856 (C-H), 1456 (CH₂, CH₃), 1375 (gem dimetilo), 1025 (HC-OH); IE-EM *m*/z (int. rel): 442 [M]⁺ (14), 411 (41), 207 (69), 189 (100), 135 (90), 105 (90), 43 (86).+

Compuesto XII (ácido betulínico): polvo blanco amorfo; pf. 281-283 °C; IR v_{max} (KBr) cm⁻¹ 3448 (O-H), 2940 (C-H), 1687 (C=O), 1454 (CH₂, CH₃) 1375 (gem dimetilo), 1039 (HC-OH); RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0.75 (3H, s, H-24), 0.82 (3H, s, H-25), 0.93 (3H, s, H-23), 0.96 (3H, s, H-26), 0.97 (3H, s, H27), 1.69 (3H, s, H-30), 2.99 (1H, ddd, J = 11.08, 4.6 Hz, H-19), 3.19 (1H, dd, J = 11.2, 4.8 Hz, H-3), 4.60 (1H, s, H-29a), 4.68 (1H, s, H-29b).



Figura 19. Diagrama de purificación de DAT-6.

II.2.6.4 PURIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS XIII, XIV Y XV

Las fracciones DAT-7 y DAT-8 se obtuvieron mezclando las subfracciones eluidas con Hx:An (80:10). Como DAT-7 y DAT-8 presentaron un perfil cromatográfico similar en CCD, ambas se reunieron para obtener la fracción DAT-7R (900 mg). DAT-7R fue sometida a una CLV. Se utilizó una columna de 2.5 cm de diámetro y 5 cm de alto. Para eluir los componentes se utilizaron varias mezclas de Hx/An de polaridad creciente. Se obtuvieron 27 alícuotas de 25 mL cada una. Éstas se reunieron en 13 fracciones (DAT-7R-1-13) de acuerdo con su similitud en CCD.

La sub-fracción DAT-7R-4 (230 mg) se sometió a una cromatografía de permeación en gel con una columna de 2 cm de diámetro y 50 cm de alto. Como eluyente se utilizó An/CHCl₃ (95:5) de manera isocrática. Se obtuvieron 38 alícuotas, que por su similitud en CCD se reunieron en cuatro sub-fracciones (DAT-7R-4-A-D). La sub-fracción DAT-7R-4-D (53 mg) se sometió a una cromatografía por gravedad. La columna utilizada era de 1 cm de diámetro y 39 cm de alto, la elución de los componentes se realizó con una mezcla de CH₂Cl₂/An (9:1) de manera isocrática. Se colectaron 65 alícuotas de 1 mL cada una, las cuales se reunieron en nueve sub-fracciones (DAT-7R-4-D-I-9) de acuerdo con su similitud en CCD. En la sub-fracción DAT-7R-4-D-9 se obtuvo el compuesto XIII (3.0 mg) de forma pura.

La sub-fracción DAT-7R-5 (271 mg) se sometió a una cromatografía por gravedad en una columna de 2.2 cm de diámetro por 50 cm de alto. Como eluyente se utilizaron mezclas de CH_2Cl_2/An de polaridad creciente. Se obtuvieron 141 alícuotas de 10 mL cada una, las cuales se reunieron en siete sub-fracciones (DAT-7R-5-A-G) de acuerdo con su similitud en CCD. La sub-fracción DAT-7R-5-B (50 mg) se aplicó a una columna cromatográfica por gravedad de 1 cm de diámetro por 64 de alto y sus componentes se eluyeron con una mezcla de Hx/CH₂Cl₂/MeOH (68:26:6) de manera isocrática. Se colectaron 75 alícuotas de 1 mL cada una, las cuales se reunieron en seis sub-fracciones (DAT-7R-5-B-1-6) de acuerdo con su similitud en CCD. Por medio de un proceso de cristalización con An se obtuvo de la sub-fracción DAT-7R-5-B-6 el compuesto XIV (5.1 mg) de forma pura.

La sub-fracción DAT-7R-5-D (18.6 mg) se aplicó a una placa preparativa de 20 \times 20 cm; para la elución se uso el sistema CH₂Cl₂/MeOH (9:1), obteniéndose de forma pura el compuesto XV (8.0 mg). El diagrama de purificación se presenta en la Figura 20.

Compuesto XIII (ent-4α,7α-diol-11-eudesmeno, teucdiol A): aceite incoloro; IR v_{max} (KBr) 3380 (O-H), 2912 (C-H), 1452 (CH₂ y CH₃), 900 (C=CH₂) cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CD₃COCD₃) δ 0.89 (3H, s, H-15), 1.04 (3H, s, H-14), 1.81 (3H, m, H-13), 3.05 (1H, s, OH-4, OH-7), 4.72 (1H, m, H-12a), 5.04 (1H, m, H-12b); RMN-¹³C (125 MHz, CD₃COCD₃) δ 17.8 (C-13),

19.2 (C-14), 20.3 (C-2), 22.4 (C-15), 31.2 (C-8), 31.4 (C-9), 34.7 (C-10), 40.0 (C-1), 40.9 (C-6), 43.9 (C-3), 48.9 (C-5), 72.1 (C-7), 74.7 (C-4), 109.1 (C-12), 152.6 (C-11); IE-EM *m/z* (int. rel): 238 [M]⁺ (22), 135 (31), 123 (100), 69 (37), 43 (60).

Compuesto XIV (3,5-dihidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona, droserona): cristales amarillos; pf 180-181°C; IR v_{max} (KBr) 3400 (O-H), 1633 (C=O), 1454 (CH₃-C=C), 1197 (C-OH) cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.10 (3H, s, H-9), 7.20 (1H, dd, J = 8.0, 1.4 Hz, H-6), 7.62 (1H, t, J = 7.9, 7.6 Hz, H-7), 7.66 (1H, dd, J = 7.48, 1.52 Hz, H-8), 11.11 (1H, s, OH-5). IE-EM m/z (int. rel): 204 [M]⁺ (100), 176 (20), 147 (36), 121 (29), 102 (31), 28 (47), 18 (69).

Compuesto XV (selin-4(15)-en-1β,11-diol): aceite incoloro; ${}^{[\alpha]}D_{25}$ = +56 (c = 0.012, CHCl₃); IR v_{max} (KBr) 3392 (O-H), 2939 (C-H), 1650 (C=C exocíclico), 1459 (CH₂ y CH₃), 1025 (HC-OH), 890 (C=CH₂) cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0.63 (3H, d, J = 0.6 Hz, H-14), 1.18 (6H, d, J = 0.8 Hz, H-12 y H-13), 3.47 (1H, dd J = 8.0, 4.2 Hz, H-1), 4.66 (1H, dd, J = 3.5, 1.7 Hz, H-15a), 4.80 (1H, dd, J = 3.5, 1.7 Hz, H-15b). IE-EM m/z (int. rel): 238 [M]⁺ (5), 187 (33), 177 (22), 162 (54), 147 (64), 131 (61), 120 (49), 105 (60), 95 (49), 91 (53), 79 (52), 59 (100).



Figura 20. Diagrama de purificación de DAT-7R.
II.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.3.1 RENDIMIENTOS DE EXTRACTOS CRUDOS DE D. ANISANDRA

El rendimiento para la primera colecta (DA-1) fue de 1.3% y para la segunda (DA-2) fue de 1.5%. Se pudo observar rendimientos muy similares en ambas colectas, sin embargo en la segunda colecta se observó un rendimiento ligeramente mayor debido a que el material vegetal de esta colecta fue molido en un molino casero, obteniéndose partículas más finas lo que permitió una mayor superficie de contacto con el disolvente lo que llevó a una extracción más eficiente y, por consiguiente, a la obtención de una mayor cantidad de extracto crudo.

II.3.2 COMPUESTO I (5,5'-DIHIDROXI-2,2'-DIMETIL-8,8'-BINAFTALEN-1,1',4,4'-TETRONA, MARITINONA)

El compuesto I (46. 17 mg) se obtuvo como cristales roios solubles en CHCl₃, con un factor de retención (R_f) de 0.70 en el sistema de disolventes Hx/AcOEt 8:2. Este compuesto mostró la característica coloración púrpura/rojiza con el revelador específico de naftoquinonas. Al analizar su espectro de RMN-¹H (figura 21) se observan únicamente cinco señales, una de ellas desplazada a campos bajos (δ 12.58) como un singulete de un único protón, señal típica de puente de hidrógeno, característico de las naftoquinonas con hidroxilos en posición ß al carbonilo. La presencia del carbonilo se confirma por la banda a 1645 cm⁻¹ en el espectro de IR y la del hidroxilo con la banda a 3500 cm⁻¹. Otras dos señales a δ 2.01 (d. J = 2.9 Hz) y 6.81 (g, J = 2.9 Hz) corresponden a un grupo metilo y un protón guinónico respectivamente, que presentan acoplamiento alílico. En la región de aromáticos se observan las señales de protones en acoplamiento orto a δ 7.29 (d, J = 8.7 Hz) v δ 7.19 (d, J = 8.7 Hz). Los datos de RMN-¹H obtenidos son similares a los reportados para la naftoquinona plumbagina, sin embargo, la ausencia de un protón aromático y el ion molecuar de m/z 374 obtenido en el análisis de CG-EM sugiere que el compuesto es un dímero simétrico de esta naftoquinona cuyo ion molecular m/z fue de 188. La ausencia del protón aromático sugiere que la unión de ambas moléculas de plumbagina es de tipo areno-areno. De acuerdo con los datos espectroscópicos y los descritos en la literatura (tabla 5), este compuesto corresponde a la 5,5'-dihidroxi-2,2'-dimetil-8,8'-binaftalen-1,1',4,4'-tetrona, a la cual se le asignó el nombre trivial de maritinona y se aisló previamente de D. maritima (Higa et al., 1998; Gu et al., 2004).



Posición	Compuesto I (400 MHz, CDCI ₃)	Maritinona (500 MHz, CDCI ₃)
3	6.81 (1H, q, 2.9)	6.80 (1H, q, 1.5)
6	7.29 (1H, d, 8.7)	7.29 (1H, d, 8.7)
7	7.19 (1H, d, 8.7)	7.21 (1H, d, 8.4)
9	2.01 (3H, d, 2.9)	2.01 (3H, d, 1.5)
5-OH	12.58 (1H, s)	12.50 (1H, s)
3'	6.81 (1H, q, 2.9)	6.80 (1H, q, 1.5)
6'	7.29 (1H, d, 8.7)	7.29 (1H, d, 8.7)
7'	7.19 (1H, d, 8.7)	7.21 (1H, d, 8.4)
9'	2.01 (3H, d, 2.9)	2.01 (3H, d, 1.5)
5'-OH	12.58 (1H, s)	12.50 (1H, s)

Tabla 5. Comparación de los datos de RMN-¹H (H, m, J = Hz) del compuesto I con los reportados para maritinona (Gu et al., 2004)

II.3.3 COMPUESTO II (ALDEHÍDO DE BETULINA)

El compuesto II (47, 2.5 mg) se obtuvo como un polvo blanco amorfo soluble en CHCl₃ y An con un R_f de 0.55 en el sistema de disolventes Hx/An 95:5. En su espectro de RMN-¹H (Figura 22) se observa la presencia de cinco señales atribuibles a grupos metilo a δ 0.74 (s), 0.81 (s), 0.90 (s), 0.95 (s) y 0.96 (s); además, la presencia de un singulete a δ 1.68 (s) de un metilo en posición alílica, junto con las señales de dos protones exometilénicos a δ 4.62 (sa) y 4.75 (sa) corroboran la presencia de un grupo isopropenilo. El análisis del espectro de RMN-¹H junto con el de CG-EM corroboran que el compuesto II corresponde a un triterpeno de tipo lupano.

En el análisis de CG-EM, el compuesto presentó un tiempo de retención (T_R) de 20.6 min con un ion molecular de *m/z* 440.4, en el espectro de EM (Figura 17) se observan fragmentos característicos de un esqueleto de tipo lupano a *m/z* 189, 218, 220 y 232 (Ogunkoya 1980; Figura 23). El fragmento a *m/z* 232 junto con las señales de RMN-¹H a δ 9.6 (s) y la presencia de una banda a 1708 cm⁻¹ (C=O) en su espectro de IR corroboran la presencia de un grupo aldehído en el carbono 28. De acuerdo con lo previamente descrito y comparando los datos espectroscópicos obtenidos (Tabla 6), el compuesto II corresponde al aldehído de betulina.

El aldehído de betulina se ha aislado de diferentes plantas, incluso de especies del género *Diospyros*, como *D. rhodocalyx* (Theerachayanan *et al.*, 2007).





Figura 23. EM y fragmentos característicos del aldehído de betulina.

Decisión	Compuesto II	Aldehído de la betulina
Posicion	(400 MHz, CDCI ₃)	(400 MHz, CDCI ₃)
3	3.17 (1H, dd, 11.2, 5.2)	3.20 (1H, q)
19	2.80 (1H, td, 11.2, 6.0)	2.80 (1H, m)
23	0.90 (3H, s)	0.84 (3H, s)
24	0.74 (3H, s)	0.68 (3H, s)
25	0.81 (3H, s)	0.75 (3H, s)
26	0.95 (3H, s)	0.90 (3H, s)
27	0.96 (3H, s)	1.19 (3H, s)
28	9.60 (1H, s)	9.60 (1H, s)
29	4.62 (1H, sa)	4.56 (1H, d, 2.0)
	4.75 (1H, sa)	4.69 (1H, d, 2.0)
30	1.68 (3H, s)	1.62 (3H, s)

Tabla 6. Comparación de los datos de RMN-¹H (H, m, J = Hz) del compuesto II con los reportados para el adehído de betulina (Theerachayanan et al., 2007).

II.3.4 COMPUESTO III (5,5'-DIHIDROXI-2,2'-DIMETIL-3,6'-BINAFTALEN-1,1',4,4'-TETRONA, CHITRANONA)

El compuesto III (48, 1.4 mg) se obtuvo en forma de cristales color naranja, solubles en CHCl₃ con un R_f de 0.8 en el sistema de disolventes Bn/An 95:5. En el espectro de RMN-¹H (Figura 24) presentó señales características de un compuesto de tipo naftoquinona, se observaron dos señales a δ 11.94 (s) y 12.28 (s) correspondientes a dos protones de hidroxilos que forman puentes de hidrógeno con grupos carbonilo; este dato sugiere que el compuesto es una naftoquinona dimérica. La presencia de una señal para un metilo a δ 2.06 (s) y señales a δ 7.28 (dd, J = 1.2, 8.4 Hz), 7.64 (dd, J = 7.6, 8,4 Hz) y 7.71 (dd, J = 1.2, 7.6 Hz) sugieren que una de las naftoquinonas del dímero está unida en su parte quinónica. Para la otra naftoquinona se observan señales a δ 2.23 (d, J = 1.2 Hz), 6.86 (d, J = 1.2Hz), 7.48 (d, J = 8.0 Hz) y 7.75 (d, J = 7.6 Hz) indicando que su unión es en su parte bencénica. Los datos de RMN-¹H fueron comparados con lo reportado en la literarura (Tabla 7) y el compuesto III correspondió a la 5,5'dihidroxi-2,2'-dimetil-3,6'-binaftalen-1,1',4,4'-tetrona, comúnmente conocida como chitranona. Este compuesto se ha aislado previamente de D. maritima (Higa et al., 1998).



Posición	Compuesto III	Chitranona (500 MHz, CDCL)
<u> </u>		
0	7.20 (1H, úú, ó.4, 1.2)	7.27 (IH, dd, o.U, 1.5)
7	7.64 (1H, dd, 8.4, 7.6)	7.64 (1H, dd, 8.0, 7.5)
8	7.71 (1H, dd, 7.6, 1.2)	7.71 (1H, dd, 7.5, 1.5)
9	2.06 (3H, s)	2.06 (3H, s)
5-OH	11.94 (1H, s)	11.94 (1H, s)
3′	6.86 (1H, d, 1.2)	6.86 (1H, q, 1.5)
7′	7.48 (1H, d, 8.0)	7.49 (1H d, 7.5)
8´	7.75 (1H, d, 7.6)	7.75 (1H, d, 7.5)
9′	2.23 (3H, d, 1.2)	2.23 (3H, d, 1.5)
5'-OH	12.28 (1H, s)	12.28 (1H, s)

Tabla 7. Comparación de los datos de RMN-¹H (H, m, J = Hz) del compuesto III con los reportados para chitranona (Gu et al., 2004).

II.3.5 COMPUESTO IV (4(15),5E,10(14)-GERMACRATRIEN-1β-OL)

El compuesto IV (49, 19.4 mg) se obtuvo como un aceite incoloro, soluble en CHCl₃ con un Rf de 0.45 en el sistema benceno/An 95:5. En el análisis de CG-EM presentó un T_R de 8.59 min con un ion molecular de m/z 220.2. En el espectro de RMN-¹H (Figura 25) se observan señales a δ 1.49 (sept, J = 6.7 Hz), 0.81 (d, J = 6.8 Hz) y 0.89 (d, J = 6.8 Hz) que corresponden a una unidad de isopropilo; dos señales a δ 5.99 (d. J = 15.8 Hz), 5.42 (dd, J = 15.8, 10.3 Hz) características de dos protones vinílicos con acoplamiento trans; cuatro señales a δ 4.84 (s), 5.26 (s), 4.92 (s) y 4.99 (s) características de protones vinílicos exocíclicos (C=C, IR = 1714 cm⁻¹); una señal a δ 3.75 (dd, J = 11.7, 3.4), característica del protón de un carbono base de alcohol (C-OH, IR = 3434 cm⁻¹), lo cual se confirma en el EM que presenta un fragmento m/z de 202 [M - OH]⁺ Los espectros de ¹³C y DEPT-135 revelaron la presencia de 15 carbonos, entre los que se encuentran dos metilos, seis metilenos, cinco metinos y dos carbonos cuaternarios. Con base en los espectros de RMN y el ion molecular se determinó que la fórmula molecular del compuesto corresponde a $C_{15}H_{24}O_{15}$ cuvo índice de deficiencia de hidrógeno sugiere una estructura con cuatro insaturaciones. Con los datos previamente descritos, el compuesto corresponde a un ciclo de 10 carbonos que presenta un hidroxilo, un doble enlace trans, dos dobles enlaces exocíclicos y una unidad de isopropilo. Los datos obtenidos sugieren que el compuesto IV corresponde al sesquiterpeno de tipo germacrano 4(15),5E,10(14)-germacratrien-1-ol. Las posiciones del hidroxilo y los dobles enlaces exocíclicos se confirmaron en el espectro de HMBC (Figuras 26 y 27) donde se observa que el protón del carbono base de alcohol presenta correlaciones ²J y ³J con los carbonos olefínicos C-10 (δ 153.6) y C-14 (δ 110.7), respectivamente. Por otra parte, los protones vinílicos exocíclicos H-14 y H-15 se correlacionan a ${}^{3}J$ con el carbono base de alcohol C-1 (δ 76.1) y carbono vinílico C-5 (δ 129.7), respectivamente. Este es el primer reporte de la espectroscopía de RMN completa para el compuesto IV (Tabla 8), únicamente existe en la literatura resultados de RMN de 1 H y 13 C.

El compuesto 4(15),5*E*,10(14)-germacratrien-1-ol presenta dos centros quirales, lo cual indica que pueden existir cuatro posibles estereoisómeros. Para obtener la estereoisomería del compuesto se le determinó la rotación óptica y se comparó el valor obtenido con lo reportado en la literatura, indicando que el compuesto corresponde al 4(15),5*E*,10(14)-germacratrien-1β-ol, previamente aislado de *Artemisia annua* (Brown *et al.*, 2003).









Figura 26. Correlaciones del 4(15), 5E, 10(14)-germacratrien-1 β -ol en su espectro de HMBC.



H-15b y H-15a



Figura 27. Correlaciones del 4(15),5E,10(14)-germacratrien-1β-ol en su espectro de HMBC.

Posición	δ _H	δ _c	CORV	H	MBC
	(H, m, J = Hz)		COST	2J	3J
1	3.75 (1H, dd, 11.7, 3.4)	76.1	H2a, H2b	C-2, C-10	C-9, C-14
2	a) 1.67 (1H, m) b) 2.04 (1H, m)	36.4	H1, H3a, H3b	C-3, C-1	C-9, C-4
3	a) 2.1 (1H, m) b) 2.42 (1H, ddd, 12.8, 4.8)	30.1	H2a, H2b	C-2, C-4	C-1, C-15, C-5
4		146.8			
5	5.99 (1H, d, 15.8)	129.7	H6	C-4	C-3, C-7, C-15
6	5.42 (1H, dd, 15.8, 10.3)	138.1	H7, H5	C-7	C-11, C-8, C-4
7	1.8 (1H, m)	52.6	H6	C-8	
8	a) 1.67 (1H, m) b) 2.04 (1H, m)	36.3	H9a, H9b		C-10, C-6
9	a) 1.63 (1H, m) b) 2.61 (1H, m)	34.6	H8a, H8b	C-10	C-7, C-1, C-14
10	-/	153.6			
11	1.49 (1H, sept, 6.7)	31.9	H12, H13	C-12, C-13, C-7	C-8, C-6
12	0.81 (3H. d. 6.8)	20.6	H7	C-11	C-13, C-7
13	0.89 (3H, d, 6.8)	20.8	H7	C-11	C-12, C-7
14	a) 4.99 (1H, s) b) 5.26 (1H, s)	110.7			C-1, C-9
15	a) 4.84 (1H, s) b) 4.92 (1H, s)	113.0			C-3, C-5

Tabla 8. Señales de RMN-¹H, ¹³C, COSY y HMBC del 4(15),5E,10(14)germacratrien-1β-ol. Señales obtenidas a 400 MHz para ¹H y 125 MHz para 13 C en CDCl₃.

II.3.6 COMPUESTO V (5-HIDROXI-2-METIL-1,4-NAFTALENDIONA, PLUMBAGINA)

El compuesto V (**50**, 22.1 mg) (Figura 28) se obtuvo como cristales en forma de aguja de color amarillo-naranja soluble en CHCl₃ y An, con un R_f de 0.45 en el sistema de disolventes Hx/AcOEt 95:5. En el análisis de CG-EM, presentó un T_R de 7.395 min con un ion molecular de *m/z* 188.1 y fragmentos a 173 [M – CH₃]⁺, 160 [M – CO]⁺, 131 [M – CO – HCO]⁺, 120 [M – C₃H₄ – CO]⁺, 92 [C₆H₄O]⁺ (Figura 29) (Stensen & Jensen, 1995), característicos de la 5-hidroxi-2-metil-1,4-naftalendiona comúnmente conocida como plumbagina. La plumbagina fue la primera naftoquinona aislada en el género de *Diospyros* y desde entonces se ha encontrado en una gran cantidad de especies de este género (Mallavadhani *et al.*, 1998)



Figura 28. Estructura de plumbagina.



m/z 120 m/z 92 Figura 29. EM y fragmentos característicos de plumbagina.

II.3.7 COMPUESTO VI (5,5'-DIHIDROXI-2,2'-DIMETIL-3,3'-BINAFTALEN-1,1',4,4'-TETRONA, 3,3'-BIPLUMBAGINA)

El compuesto VI (51, 12.3 mg) se obtuvo como cristales de colores naranja, solubles en CHCl₃ y An, presentó un R_f de 0.68 en el sistema de disolventes Hx/AcOEt 8:2. En el espectro RMN-¹H (Figura 30) se observan señales a δ 11.94 (2H, s) característica de protones en puente de hidrógeno con un grupo carbonilo (C=O, IR = 1627 cm⁻¹), además de protones aromáticos en un sistema ABC a δ 7.28 (dd, J = 8.4, 1.2 Hz), 7.64 (dd, J = 8.4, 7.6 Hz) v 7.71 (dd, J = 7.6, 1.2 Hz), y una señal a δ 2.06 (s) correspondiente a un metilo. Estas señales son similares a lo reportado para la naftoguinona plumbagina con la diferencia que el compuesto VI no presenta la señal del protón quinónico. Este compuesto se analizó por CG-EM y presentó un T_{R} de 21.4 min con un ion molecular de m/z 374; este dato junto con lo reportado en el espectro de RMN-¹H sugieren que el compuesto corresponde a una dímero simétrico de plumbagina. La ausencia de señales de protones quinónicos en el espectro RMN-¹H y los fragmentos m/z 120 y 92 del EM (Figura 31) sugiere que ambas unidades de plumbagina están unidas en su parte quinónica. Al comparar los datos obtenidos con lo reportado en la literatura (Tabla 9) se obtuvo que el compuesto VI corresponde a la 5.5'-dihidroxi-2.2'-dimetil-3.3'-binaftalen-1.1'.4.4'-tetrona. comúnmente conocida como 3,3'-biplumbagina.

La 3,3'-biplumbagina se aisló previamente de *Plumbago zeylanica* (Sidhu & Sankaram, 1971) y de los frutos de *D. maritima* (Higa *et al.*, 2002).





Figura 31. EM y fragmentos característicos de 3,3'-biplumbagina.

 Tabla 9. Comparación de los datos de RMN-¹H (H, m, J = Hz) del compuesto VI con los reportados para 3,3'-biplumbagina (Sidhu & Sankaram, 1971).

 Sankaram, 1971).

Posición	Compuesto VI	3,3'-biplumbagina
	(400 MHz, CDCI ₃)	(70 MHz, CDCI ₃)
6	7.28 (1H, dd, 8.4, 1.2)	7.30-7.47 (1H, q)
7	7.64 (1H, dd, 8.4, 7.6)	7 70 7 80 (24 +)
8	7.71 (1H, dd, 7.6, 1.2)	7.70-7.80 (211, 1)
9	2.06 (3H, s)	2.08 (3H, s)
5-OH	11.94 (1H, s)	11.83 (1H, s)
6'	7.28 (1H, dd, 8.4, 1.2)	7.30-7.47 (1H, q)
7'	7.64 (1H, dd, 8.4, 7.6)	7 70-7 80 (2H t)
8'	7.71 (1H, dd, 7.6, 1.2)	7.70-7.00 (211, 1)
9'	2.06 (3H, s)	2.08 (3H, s)
5'-OH	11.94 (1H, s)	11.83 (1H, s)

II.3.8 COMPUESTO VII (EPÓXIDO DE ZEYLANONA)

El compuesto VII (52, 4 mg) se obtuvo como cristales en forma de aguja de color amarillo solubles en An, con un R, de 0.45 en el sistema de disolventes Hx/An 7:3 y un punto de fusión de 231-232 °C. En el análisis de CG-EM de alta resolución presentó un T_R de 18.34 min con un ion molecular de m/z de 390.1103, el cual corresponde a la fórmula molecular C₂₂H₁₄O₇ El índice de deficiencia de hidrógeno sugiere una estructura con 16 insaturaciones. En el espectro de IR presentó bandas de absorción características de grupos OH (3450 cm⁻¹), grupos C=O (1639 cm⁻¹), estiramientos simétricos C-C de un anillo de epóxido (1,250 cm⁻¹) y de flexión C-H de aromáticos (673 cm⁻¹). En el espectro de RMN-H¹ (Figura 32) se observa dos señales a δ 11.17 (s) y 12.15 (s), características de protones en puente de hidrógeno; y un sistema ABX a 5 3.01 (d, J = 7.6 Hz), 3.63 (d, J = 15.0 Hz) y 2.73 (dd, J = 7.6 y 15.0 Hz). Adicionalmente, se observa la señal de un metilo a δ 1.62 y seis protones aromáticos en posiciones orto y meta a o 7.24 (dd, J = 1.2 y 8.0 Hz), δ 7.26 (dd, J = 2.0 y 8.0 Hz), δ 7.55 (dd, J = 1.2 y 7.2 Hz), δ 7.65 (t, J = 8.0 Hz) y δ 7.68 (dd, J = 2.0 y 7.6 Hz), sugiriendo la presencia de dos anillos aromáticos trisustituidos. El espectro de RMN-13C (Figura 33), en combinación con el espectro de HSQC, muestra la presencia de cuatro carbonilos (ô 201.0, 193.9, 193.5 y 188.5), dos carbonos aromáticos oxigenados (δ 162.5 y 161.8), cuatro carbonos cuaternarios aromáticos (δ 135.4, 132.8, 117.5 y 115.2), seis carbonos correspondientes a metinos aromáticos (ö 137.6, 137.1, 125.3, 124.3, 120.0 y 119.1), dos carbonos cuaternarios oxigenados (δ 69.9 and 66.8), un carbono cuaternario (δ 54.1), un metino (δ 51.6), un metileno (δ 28.9) y un metilo (δ 17.9). Excepto por la presencia de dos carbonos cuaternarios oxigenados (δ 69.9 y 66.8), en lugar de dos carbonos cuaternarios olefínicos (δ 150.6 y 149.5), los espectros de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto VII son muy similares a los de la naftoquinona dimérica zevlanona, aislada de Plumbago zevlanica (Sankaram & Rao, 1979). Estos resultados fueron confirmados en el experimento de HMBC (Figura 34) que muestra una clara correlación 3J entre el H-11' y H-3 con el C-3' (δ 69.8) y una correlacion ²J entre el H-11' y C-2' (5 66.8); mientras que H-11 mostró una correlación a 3 con el C-3'(5 69.8) (Figura 34). En el espectro de HMBC de la zeylanona se observan una correlación ³J de los protones del metilo H-11 con el carbono cuaternario olefínico C-3' (5149.5), y una correlación del protón H-3 con el carbono olefínico C-2' (δ150.6) (Gu et al., 2004). De acuerdo con los datos previamente descritos (Tabla 10), el compuesto VII corresponde al epóxido de zeylanona, un nuevo compuesto natural. La estereoquímica relative de las posiciones C-2 y C-3 fue establecida por la interacción obrservada en el espectro de NOESY-1D (Figure 35). En el experimento de NOESY-1D, el H-3 fue irradiado y se observó un aumento significativo en las señales de los

H-11 y H-11'a. Este resultado establece una relación *cis* entre el H-11 y el H-3. El experimento de NOESY-2D (Figura 36) confirmó estas observaciones.



Figura 32. Estructura y espectro de RMN-¹H del epóxido de zeylanona. Señales obtenidas a 400 MHz en CDCI₃.



Figura 33. Espectro de RMN-¹³C del epóxido de zeylanona. Señales obtenidas a 125 MHz en CDCl₃.







El aislamiento del epóxido de zeylanona constituye el tercer hallazgo de una naftoquinona dimérica con un anillo de epóxido. Previamente, de *D. batocana* se aisló la batocanona (**53**) y de *D. mespiliformis* se aisló la diosquinona (**54**) (Correia-Alves & Cruz-Costa, 1980; Adeniyi *et al.*, 2003). Además, se han aislado naftoquinonas monoméricas con epóxidos, tal es el caso de la 2,3-epoxi-plumbagina (**55**) aislada de *D. marítima* (Figura 37) (Higa *et al.*, 2002).



Figura 37. Estructuras de epóxidos de naftoquinonas.

Posición	δμ	δ	COSY	H	MBC
	(H, m, J = Hz)	-0		² J	³ J
1	-	193.9			
2	-	54.1			
3	3.01 (1H, d, 7.6)	51.6	H11'a	C-4	C-11, C-3'
4	-	201.0			
5	-	117.5			
6	-	161.8			
7	7.26 (1H, dd, 2.0, 8.0)	124.3	H8	C-6	C-9
8	7.65 (1H, t, 8.0)	137.1	H7, H9	C-7	C-10
9	7.68 (1H, dd, 2.0, 7.6)	119.1	H8		C-1, C-5, C-7
10	-	135.4			
11	1.62 (3H, s)	17.9		C-2	C-3, C-3'
1'	-	188.5			
2'	-	66.8			
3'	-	69.9			C-2'
4'	-	193.5			
5'	-	115.2			C-7'
6'	-	162.5			
7'	7.24 (1H, dd, 1.2, 8.0)	125.3	H8'		C-9'
8'	7.62 (1H, t, 8.0)	137.6	H7', H9'		C-6'
9'	7.55 (1H, dd, 1.2, 7.2)	120.0	H8'		C-1', C-5', C-7'
10'	-	132.8			
11'	a) 2.73 (1H, dd,	28.9	H3,	C-3	C-4
	7.6, 15.0);		H11'b	C-2',C-3	C-2, C-4,
	b) 3.63 (1H, d, 15.0)		H11'a		C-3'
6-OH	12.15 (3H, s)	-			
6'-OH	11.17 (3H, s)	-			

Tabla 10. Señales de RMN-¹H, ¹³C, COSY y HMBC del epóxido de zeylanona. Señales obtenidas a 400 MHz para ¹H y 125 MHz para ¹³C en CDCl₃.

II.3.9 COMPUESTO VIII (LUPEOL)

El compuesto VIII (**56**, 8 mg) se obtuvo como un polvo blanco amorfo soluble en CHCl₃ y An, con un R_f de 0.375 en el sistema Hx/An 9:1. El espectro de RMN-¹H (Figura 38) del compuesto VIII presenta seis señales a δ 0.75 (s), 0.78 (s), 0.82 (s), 0.94 (s), 0.98 (s) y 1.02 (s) correspondientes a grupos metilo; una señal a δ 3.18 (m) característica del protón de un carbono base de alcohol (C-OH, IR = 3297 cm⁻¹); y tres señales a δ 1.67 (3H, s), 4.56 (dd, *J* = 2.4, 1.3 Hz) y 4.68 (d, *J* = 2.3 Hz) que corroboran la presencia de un grupo isopropenilo. El análisis de RMN-¹H sugiere que el compuesto VIII corresponde a un triterpeno de tipo lupano. En el análisis de GC-EM se observó un T_R de 18.2 min con un ion molecular de *m/z* 426.5 y fragmentos de *m/z* 189 y 218; estos datos confirman que el compuesto corresponde a un triterpeno de tipo lupano. Los datos obtenidos se compararon con lo reportado en la literatura (Tabla 11) y el compuesto VIII correspondio al lupeol.

El lupeol es un triterpeno natural que se encuentra en frutos como el mango, cereza, uva e higo. Previamente se ha aislado de especies del género *Diospyros* como *D. manni* y *D. cornii* (Mallavadhani *et al.*, 1998; Jeffreys *et al.*, 1983; Khan *et al.*, 1980).



Posición	Compuesto VIII (400 MHz, CDCI ₃)	Lupeol (300 MHz, CDCl ₃)
3	3.18 (1H, m)	3.20 (1H, dd, 9.6, 6.2)
19	2.37 (1H, td, 11.1, 5.8)	NR
23	0.75 (3H, s)	0.75 (s)
24	0.78 (3H, s)	0.77 (s)
25	0.82 (3H, s)	0.80 (s)
26	0.94 (3H, s)	0.92 (s)
27	0.98 (3H, s)	0.94 (s)
28	1.02 (3H, s)	1.02 (s)
29	4.56 (1H, dd, 2.4, 1,3)	4.58 (1H, d, 0.4)
	4.68 (1H, d, 2.3)	4.65 (1H, dq, 0.5, 0.4)
30	1.67 (3H, s)	1.66 (d, 0.5)

Tabla 11. Comparación de los datos de RMN-¹H (H, m, J = Hz) del compuesto VIII con los reportados para lupeol (Ghosh et al., 2010).

NR: no reportado.

II.3.10 COMPUESTO IX (3R,4R-DIHIDRO-4,8-DIHIDROXI-3-METIL-1-NAFTALEN-ONA, C/S-ISOSHINANOLONA)

El compuesto IX (57, 8.1 mg) se obtuvo como un aceite color naranja soluble en CHCl₃ y An, con un R_f de 0.375 en el sistema de disolventes CH₂Cl₂/MeOH 98:2. En el espectro de RMN-¹H (Figura 39) se observó una señal a 12.42 (s) característica de un protón en puente de hidrógeno; tres señales de protones aromáticos δ 6.84 (dd, J = 8.3, 0.92 Hz), δ 6.99 (d, J = 7.4 Hz) y δ 7.54 (t, J = 8.2, 7.5 Hz), que proponen que el compuesto IX es un derivado de plumbagina. El espectro de RMN-¹H presenta adicionalmente una señal a δ 1.11 (d, J = 6.8 Hz) que corresponde a un metilo unido a un metino. la señal del protón del metino se observa a δ 2.44 (1H, m), este dato indica que probablemente el doble enlace del anillo quinónico encontrado en plumbagina no se encuentra en el compuesto IX. Las señales a δ 2.58 (dd, J = 17.5, 4.3 Hz) y δ 2.79 (dd, J = 17.5, 10.2 Hz) confirmaron la pérdida del doble enlace en este compuesto; estas dos señales corresponden a los protones de un metileno que presentan un acoplamiento geminal. Adicionalmente, en el espectro de RMN-¹H se observó una señal a δ 4.76 (s) perteneciente al protón de un carbono unido a un hidroxilo, lo cual se confirmó con la señal a δ 4.54 (sa) asignada al protón de un hidroxilo. Este último dato sugirió que probablemente uno de los dos carbonilos presentes en plumbagina corresponde a un grupo hidroxilo en el compuesto IX. En el análisis de CG-EM el compuesto IX presentó un T_R de 8.07 min con un ion molecular de m/z de 192.1; la adición de 4 uma respecto a la m/z de plumbagina confirman que este compuesto corresponde a un derivado de plumbagina que carece del doble enlace del anillo quinónico y presenta la reducción de uno de sus carbonilos. De acuerdo con los datos espectroscópicos y los ya descritos en la literatura (Tabla 12), este compuesto corresponde al 3R,4R-dihidro-4,8-dihidroxi-3metil-1-naftalen-ona, comúnmente conocida como cis-isoshinanolona. La asignación de la estereoquímica del compuesto se determinó por comparación de la rotación óptica del mismo con lo reportado por Bringmann et al., 1999. La cis-isoshinanolona es una tetrona acetogénica que se ha aislado de varias familias de plantas i.e. Iridaceae, Plumbaginaceae, Nepenthaceae, Dioncophyllaceae, Ancistrocladaceae y Ebenaceae (Bringmann et al., 1999; Bringmann et al., 2001). Se ha descrito también en varias especies del género Diospyros (Mallavadhani et al., 1998), como un precursor de plumbagina y se ha observado que se produce en mayor cantidad bajo condiciones de estrés químico, físico o biótico (Bringmann et al., 1999).



al., <i>1999)</i> .				
Boololón	Compuesto IX	Cis-soshinanolona		
FUSICION	(400 MHz, CD ₃ COCD ₃)	(250 MHz, CDCI ₃)		
2	2.58 (1H, dd, 17.5, 4.3)	2.56 (1H, ddd, 17.7, 4.3, 0.9)		
	2.79 (1H, dd, 17.5, 10.2)	2.87 (1H, dd, 17.7, 11.0)		
3	2.44 (1H, m)	2.44 (1H, m)		
4	4.76 (1H, sa)	4.75 (1H, d, 2.5)		
5	6.84 (1H, dd, 8.3, 0.9)	6.92 (1H, d, 7.3)		
6	7.54 (1H, dd, 8.2, 7.5)	7.48 (1H, dd, 8.3, 7.3)		
7	6.99 (1H, d, 7.4)	6.94 (1H, dd, 8.5, 1.2)		
8-OH	12.42 (1H, s)	12.42 (1H, s)		
9	1.11 (3H, d, 6.8)	1.19 (3H, d, 6.7)		

Tabla 12. Comparación de los datos de RMN-¹H (H, m, J = Hz) del compuesto IX con los reportados para cis-isoshinanolona (Bringmann et 21, 1000)

II.3.11 COMPUESTO X (5,5'-DIHIDROXI-2,2'-DIMETIL-6,6'-BINAFTALEN-1,1',4,4'-TETRONA, ELIPTINONA)

El compuesto X (58, 1 mg) se obtuvo como un polvo color naranja, parcialmente soluble en CHCl₃. En el espectro de RMN-¹H (Figura 40) se observan señales características de una naftoquinona; las señales a δ 2.2 (3H, d, J = 1.6 Hz) y $\overline{0}$ 6.8 (1H, q, J = 1.6 Hz) corresponden al metilo y el protón vinílico que presentan acoplamiento alílico; una señal a 8 12.5 que corresponde a un protón que forma un puente de hidrógeno con un grupo carbonilo; y una señal que corresponde a dos protones aromáticos a δ 7.7 (2H, s). El ion molecular de m/z 374 obtenido para el compuesto sugiere que corresponde a una naftoquinona dimérica. La ausencia de multiplicidad en los protones aromáticos dificultó sugerir el carbono de unión de ambas unidades de naftoquinona. Los datos obtenidos junto con el punto de fusión se compararon con lo reportado en la literatura (Tabla 13) y se determinó que el compuesto corresponde a la 5,5'-dihidroxi-2,2'-dimetil-6,6'-binaftalen-1.1'.4,4'-tetrona, comúnmente conocida como eliptinona. Es interesante que los protones 7 y 8 no correspondan a dos señales dobles con acoplamiento orto en el espectro de RMN-¹H. Este compuesto se ha aislado previamente de D. mollis (Yoshihira et al., 1971).



Posición	Compuesto X (400 MHz, CDCI ₃)	Eliptinona (70 MHz, CDCI ₃)
3	6.80 (1H, q, 1.6)	7.02 (1H, d, 1.5)
7 8	7.70 (2H, s)	7.84 (2H, s)
5-OH	12.50 (1H, s)	NR
9	2.20 (3H, d, 1.6)	2.28 (3H, d, 1.5 Hz)
3'	6.80 (1H, q, 1.6)	7.02 (1H, d, 1.5)
7' 8'	7.70 (2H, s)	7.84 (2H, s)
5'-OH	12.50 (1H, s)	NR
9'	2.20 (3H, d, 1.6)	2.28 (3H, d, 1.5 Hz)

Tabla 13. Comparación de los	datos de RMN-	¹ H (H, m, J = Hz) del
compuesto X con los reportados	para eliptinona	(Yoshihira et al., 1971).

NR: no reportado.

II.3.12 COMPUESTO XI (BETULINA)

El compuesto XI (**59**, 5.4 mg) se obtuvo como un polvo blanco soluble en MeOH, presentó R_f de 0.375 en el sistema Hx/AcOEt/MeOH 80:18:2 y un punto de fusión de 258-259 °C. En el análisis de CG-EM presentó un T_R de 23.5 min y un ion molecular *m/z* de 442.4. En el EM se pueden observar fragmentos a *m/z* de 189 y 220, los cuales son característicos de triterpenos de tipo lupano. Por comparación del ion molecular del compuesto XI con el del lupeol (426.5), previamente descrito, se observa un incremento de 16 unidades, sugiriendo que el compuesto XI presenta un grupo hidroxilo adicional. La presencia de un fragmento *m/z* de 234, sugiere que el hidroxilo adicional se encuentra en el anillo D o E de la estructura. Los datos obtenidos se compararon con lo reportado en la literatura y el compuesto XI correspondió a la betulina (Figura 41), lo cual se corroboró por CCD con una muestra auténtica.

La betulina es un triterpeno natural de tipo lupano que se encuentra en árboles y arbustos, y se ha aislado de un gran número de plantas, así como también de muchas especies del género *Diospyros*, como *D. mannii y D. maingayi* (Mallavadhani *et al.*, 1998; Jeffreys *et al.*, 1983; Zhong *et al.*, 1984).



Figura 41. Estructura de betulina.

II.3.13 COMPUESTO XII (ÁCIDO BETULÍNICO)

El compuesto XII (60, 10.1 mg) se obtuvo como un polvo blanco amorfo soluble en An, con un Rr de 0.35 en el sistema CHCl₃/MeOH 99:1. El espectro de RMN-¹H (Figura 42) presenta señales características de un triterpeno de tipo lupano, la señal a δ 1.69 junto con las señales a δ 4.60 (1H, s) y otra a δ 4.68 (1H, s) corresponden a la unidad de isopropenilo; la señal a δ 3.19 (1H, dd, J = 11.2, 4.8 Hz) es característica del protón del carbono unido al hidroxilo; y las señales a o 0.75, 0.82, 0.93, 0.96 y 0.97 corresponden a cinco metilos. Este último dato indica que probablemente el carbono 28 no corresponde a un metilo como lo observado en el lupeol. El espectro de IR presenta una banda a 1687 cm-1 indicando la presencia de un grupo carbonilo en el compuesto, adicionalmente se puede observar que la banda de absorción de O-H es ancha y se sobrepone sobre la banda de absorción de C-H; este efecto es característico de grupos carboxilo de ácido debido a que se dimerizan a través de puentes de hidrógeno (Silverstein et al., 2005). El carbono 28 debe corresponder a un ácido carboxílico. La comparación de los datos espectroscópicos con lo reportado en la literatura (Tabla 14) indica que el compuesto XII corresponde al ácido betulínico.

El ácido betulínico es un triterpeno que se ha aislado de una gran cantidad de especies de plantas, incluso de especies del género *Diospyros* como *D. discolor, D. ebenum, D. ferrea*, entre otras (Mallavadhani *et al.*, 1998).



Figura 42. Estructura y espectro de RMN-¹H del ácido betulínico. Señales obtenidas a 400 MHz en CDCl₃.
Posición	Compuesto XII (400 MHz, CDCI ₃)	Ácido betulínico (300 MHz, CDCI ₃)		
3	3.19 (1H, dd, 1.2, 4.8)	3.40 (1H, sa)		
19	2.99 (1H, td, 11.1, 4.6)	3.01 (1H, dt)		
23	0.93 (3H, s)	0.81 (3H, s)		
24	0.75 (3H, s)	0.83 (3H, s)		
25	0.82 (3H, s)	0.93 (3H, s)		
26	0.96 (3H, s)	0.99 (3H, s)		
27	0.97 (3H, s)	1.02 (3H, s)		
29	4.60 (1H, s)	4.74 (1H, sa)		
	4.68 (1H, s)	4.65 (1H, sa)		
30	1.69 (3H, s)	1.69 (3H, s)		

Tabla 14. Comparación de los datos de RMN-¹H (H, m, J = Hz) del compuesto XII con los reportados para el ácido betulínico (Kweyu et al.,

II.3.14 COMPUESTO XIII (ENT-4α,7α-DIOL-11-EUDESMENO, TEUCDIOL A)

El compuesto XIII (61, 3 mg) se obtuvo como un aceite incoloro soluble en CHCl₃ y An con un R_f de 0.125 en el sistema de disolventes CH₂Cl₂/An 9:1. En el espectro de RMN-¹H (Figura 43) (CD₃COCD₃) se observan dos señales para metilos a δ 0.89 (3H, s), y δ 1.04 (3H, s); tres señales a δ 1.81 (3H, m), 4.72 (1H, m) y 5.04 (1H, m) características de una unidad de isopropenilo; una señal a ō 3.05 (1H, s) característica del protón de un alcohol (C-OH, IR = 3380 cm⁻¹). En el espectro de RMN-¹³C (Figura 44) se observan 15 señales, dato que indica que el compuesto podría corresponder a un sesquiterpeno similar al compuesto IV. El análisis de CG-EM presentó un T_R de 6.99 min y un ion molecular m/z de 238.2. En el EM (Figura 45) se pueden observar fragmentos de 220 [M - OH]* y 202 [M -20H1⁺, lo cual sugiere que el compuesto presenta dos hidroxilos; este dato se confirma con la presencia de dos señales para carbonos oxigenados (ō 74.7. 72.1) en el espectro de RMN-13C. Con los datos obtenidos podemos inferir que la fórmula molecular del compuesto XIII corresponde a C15H26O2. El índice de deficiencia de hidrógeno sugiere una estructura con tres insaturaciones, lo cual indica una estructura con dos ciclos, que presenta una unidad de isopropenilo, dos metilos y dos hidroxilos. De acuerdo con los datos obtenidos y lo reportado en la literatura (Tabla 15), el compuesto corresponde al ent-4a.7a-diol-11-eudesmeno, comúnmente conocido como teucdiol A.

Es la primera vez que se reporta la presencia del teucdiol A en una especie de la familia Ebenaceae, previamente este compuesto se ha aislado de

Teucrium heterophyllum (Lamiaceae) y de Aster spathulifolios (Asteraceae) (Lee et al., 2006).







Tabla 15. Comparación de los datos de RMN- ¹ H (H, m	, J = Hz) del
compuesto XIII con los reportados para el teucdiol A (Le	e et al., 2006).

Posición	Compuesto XIII (400 MHz, CD ₃ COCD ₃)	Teucdiol A (500 MHz, CDCl ₃)		
12	4.72 (1H, m)	5.01 (1H, t, 0.5)		
	5.04 (1H, m)	5.09 (1H, sa)		
13	1.81 (3H, m)	1.81 (3H, sa)		
14	1.04 (3H, s)	1.11 (3H, s)		
15	0.89 (3H, s)	0.95 (3H, s)		

II.3.15 COMPUESTO XIV (3,5-DIHIDROXI-2-METIL-1,4-NAFTOQUINONA, DROSERONA)

El compuesto XIV (62, 5.1 mg) se obtuvo como cristales amarillos solubles en CHCl₃ v An con un R_f de 0.625 en el sistema Hx/CH₂Cl₂/MeOH 44:50:6. El espectro de RMN-¹H (Figura 46) presenta características de un derivado de plumbagina, como son la presencia de tres señales a δ 7.20 (dd, J = 8.0, 1.4 Hz), δ 7.62 (t, J = 7.9, 7.6 Hz) y δ 7.66 (dd, J = 7.48, 1.52 Hz); la señal a δ 11.11 (1H, s) del protón que forma puente de hidrógeno con un grupo carbonilo; y a δ 2.10 (s) la señal de un metilo. La ausencia de desplazamiento para protón vinílico del anillo quinónico sugiere, que el carbono 3 está sustituido. En el análisis por CG-EM el compuesto presentó un T_P de 6.30 min con un ion molecular de m/z de 204.1, la diferencia en peso con respecto a la plumbagina son 16 unidades, este dato junto con las señales del espectro de RMN-¹H sugieren que el compuesto es un derivado de plumbagina que presenta un hidroxilo en el carbono 3. Por lo anteriormente expuesto, el compuesto XIV corresponde a la 3,5-dihidroxi-2metil-1,4-naftoguinona comúnmente conocida como droserona (Tabla 16). La naftoquinona droserona se ha aislado de una gran cantidad de plantas incluidas las del género Diospyros, como D. melanoxylon y D. maritima (Bringmann et al., 1999).



Tabla 16.	Comparación de los datos de RMN-'H (H, m, J = Hz) del
compuesto	XIV con los reportados para droserona (Gunaherath et al.,

Posición	Compuesto XIV (400 MHz, CDCl ₃)	Droserona (60 MHz, CDCI ₃)	
6	7.20 (1H, dd, 8.0, 1.4)		
7	7.62 (1H, t, 7.9, 7.6)	7.70-710 (3H, m)	
8	7.66 (1H, dd, 7.48, 1.5)		
9	2.10 (3H, s)	2.10 (3H, s)	
5-OH	11.11 (1H, s)	11.03 (1H, s)	

II.3.16 COMPUESTO XV (SELIN-4(15)-EN-1β,11-DIOL)

El compuesto XV (63, 8 mg) se obtuvo como un aceite incoloro soluble en CHCl₃ v An con un R_f de 0.42 en el sistema de disolventes Hx/CH₂Cl₂/MeOH 44:50:6. En el espectro de RMN-¹H (Figura 47) se observa la señal para un metilo a δ 0.63 (d, J = 0.6); la señal a δ 1.18 (d, J =0.8) que integra para dos metilos. El desplazamiento de los metilos a campo baio y el fragmento observado en el EM a m/z 59 sugiere que el compuesto contiene como sustituvente un radical 2-hidroxi-propanilo. Adicionalmente, en el espectro de RMN-¹H se observa una señal a 3.47 (dd J = 8.0, 4.2 Hz) característica del protón de un carbono unido a un hidroxilo (C-OH, IR = 3392 cm⁻¹) v dos señales a δ 4.66 (dd, J = 3.5, 1.7 Hz) v δ 4.80 (dd, J = 3.5, 1.7 Hz) características de protones vinílicos exocíclicos (C=C, IR = 1650 cm⁻ ¹). En el análisis por CG-EM presentó un T_R de 12.01 min con un ion molecular de m/z de 238. Con los datos espectroscópicos se sugiere que el compuesto corresponde a un sesquiterpeno que presenta un doble enlace exocíclico, dos hidroxilos y tres metilos. Los datos espectroscópicos obtenidos (Tabla 17) junto con los datos de rotación óptica del mismo proponen que corresponde al selin-4(15)-en-1 β ,11-diol, el cual se ha aislado previamente de D. melanoxilon (Mallavadhani & Mahapatra, 2005). De D. anisandra se ha aislado el isómero 7-epi-selin-4(15)-en-18.11-diol (Ariona-Canul, 2011).



Figura 47. Estructura y espectro de RMN-¹H del selin-4(15)-en-1 β ,11-diol. Señales obtenidas a 400 MHz en CDCl₃.

compuest	o XV con los reportados para	el selín-4(15)-en-1β,11-diol
	(Adinarayana et al.	, 1982).
osición	Compuesto XV	selin-4(15)-en-1β,11-diol

Tabla 17. Comparación de los datos de	$RMN^{-1}H(H, m, J = Hz) del$
compuesto XV con los reportados para	el selin-4(15)-en-1ß,11-diol

Posición	(400 MHz, CDCl ₃)	(60 MHz, CDCI ₃)		
1	3.47 (1H, dd, 8.0, 4.2)	3.40 (1H, q)		
12 13	1.18 (6H, d, 0.8)	1.20 (6H, s)		
14	0.63 (3H, 0.6)	0.68 (3H, s)		
15	a) 4.66 (1H, dd, 3.5, 1.7) b) 4.80 (1H, dd, 3.5, 1.7)	a) 4.50 (sa) b) 4.77 (sa)		

II.4 CONCLUSIONES

Del extracto hexánico de la corteza de *D. anisandra* se purificaron e identificaron 15 compuestos que correspondieron a:

- El epóxido de zeylanona, un nuevo producto natural.
- Siete naftoquinonas previamente reportadas presentes en especies del género *Diospyros*: plumbagina, maritinona, 3,3'-biplumbagina, chitranona, eliptinona, *cis*-isoshinanolona y droserona.
- Dos sesquiterpenos reportados por primera vez de una especie del género *Diospyros*: 4(15),5E,10(14)-germacratrien-1β-ol y tecdiol A.
- Un sesquiterpeno previamente descrito en *D. melanoxilon:* selin-4(15)en-1β,11-diol.
- Cuatro triterpenos previamente descritos en especies del género *Diospyros*: lupeol, betulina, aldehído de la betulina y ácido betulínico.

II.5 REFERENCIAS

- Adeniyi, B. A., M. F. Robert, H. Chai, H. H. S. Fong (2003). In vitro cytotoxicity activity of diosquinone a naphthoquinone epoxide. Phytotherapy Research, 17, 282-284.
- Arjona-Canul, A. L (2011). Sesquiterpenoides aislados de *Diospyros* anisandra y su evaluación citotóxica en líneas celulares de cáncer. Tesis de Maestria. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.
- Bringmann, G., M. Munchbach, K. Messer, D. Koppler, M. Michel, O. Schupp, M. Wenzel and A. Louis (1999). *Cis-* and *trans-*isoshinanolone from *Dioncophyllum thollonii*: absolute configuration of two known, wide-spread natural products. Phytochemistry, 51, 693-699.
- Bringmann, G., K. Messer, W. Saeb, E. Peters, and K. Peters (2001). The absolute configuration of (+)-isoshinanolone and in situ LC-CD analysis of its stereoisomers from crude extracts. Phytochemistry, 56, 387-391.
- Brown, G., G. Liang and L. Sy (2003). Terpenoids from the seeds of Artemisia annua. Phytochemistry, 64, 303-323.
- Correia-Alves, A. and M. A. Cruz-Costa (1980). Batocanone, a new naphthoquinone epoxide. Tetrahedron Letters, 21, 2459-2460.
- Cronquist, A (1981). An integrated system of classification of flowering plants. The New York botanical garden. Columbia university press. New York.
- Duran, R., J. C. Trejo, and G. Ibarra-Manríquez (1998). Endemic phytotaxa of the peninsula of Yucatan. Harvard Papers in Botany, 3, 263-314.
- Furusawa, M., T. Tanaka, T. Ito, K. Nakaya, I. Iliya, M. Ohyama, M. Iinuma, H. Murata, Y. Inatomi, A. Inada, T. Nakanishi, S. Matsushita, Y. Kubota, R. Sawa and Y. Takahashi (2005). Flavonol glycosides in leaves of two *Diospyros* species. Chemical Pharmaceutical Bulletin, 53, 591-593.
- Ghosh, P., A. Mandal, P. Chakraborty, M. Rasul, M. Chakraborty and A. Saha (2010). Triterpenoids from *Psidium guajava* with biocidal activity. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 72, 504–507.
- Gu, J., T. Graf, D. Lee, H. Chai, Q. Mi, L. Kardono, F. Setyowati, R. Ismail, S. Riswan, N. Farnsworth, G. Cordell, J. Pezzuto, S. Swanson, D. Kroll, J. Falkinham, M. Wall, M. Wani, D. Kinghorn and N. Oberlies (2004). Cytotoxic and antimicrobial constituents of the bark of *Diospyros maritima* collected in two geographical locations in Indonesia. Journal of Natural Products, 67, 1156-61.
- Gunaherath, K., L. Gunatilaka, U. Sultanbawa and S. Balasubramaniam (1983). 1,2(3)-tetrahydro-3,3'-biplumbagin: a naphthoquinone and

other constituents from *Plumbago zeylanica*. Phytochemistry, 22, 1245-1247.

- Higa, M., K. Ogihara and S. Yogi (1998). Bioactive naphthoquinone derivatives from *Diospyros maritima* Blume. Chemical Pharmaceutical Bulletin, 46, 1189-1193.
- Higa, M., N. Noha, H. Yokaryo, K. Ogihara and S. Yogi (2002). Three new naphthoquinone derivatives from *Diospyros maritima* Blume. Chemical Pharmaceutical Bulletin, 50, 590-593.
- Jeffreys, J., M. Zakaria and P. Waterman (1983). 3'-methoxydiospyrin, a 7methyljuglone dimer from *Diospyros mannii*. Phytochemistry, 22, 1832-1833.
- Khan, M., M. Nkunya and H. Wevers (1980). Triterpenoids from leaves of *Diospyros* species. Planta Medica, 38, 380-381.
- Khan, R. and Rwekikab, E (1998). A binaphthoquinone from *Diospyros* greeniwayi. Phytochemistry, 49 2501-2503.
- Khan, R. and E. Rwekika (1999). 6",8'-Bisdiosquinone from *Diospyros mafiensis.* Phytochemistry, 50, 143-146.
- Kuot, Y., C. Chang and Y. Haurkuo (1997). Triterpenes from *Diospyros* maritima. Phytochemistry, 46, 1135-1137.
- Lee, S., S. Zin, S. Un, G. Hee, Y. Choong and K. Ro (2006). Cytotoxic terpene hydroperoxides from the aerial parts of *Aster spathulifolius*. Archives of Pharmacal Research, 29, 845-848
- Mallavadhani, U., A. Panda and Y. Rao (1998). Pharmacology and chemotaxonomy of *Diospyros*. Phytochemistry, 49, 901-951.
- Mallavadhani, U. and A. Mahapatra (2005). A new aurone and two rare metabolites from the leaves of *Diospyros melanoxilon*. Natural Product Research., 19, 91-97.
- Ogunkoya, C (1981). Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes. Phytochemistry, 20, 121-126.
- Paknikar, S., K. Paifondekar, J. Kirtany and S. Natori (1996). 4-hydroxy-5methylcoumarin derivatives from *Diospyros kaki* Thunb and *D. kaki* var. sylvestris makino; structure and synthesis of 11-methylgerberinol. Phytochemistry, 41, 931-933.
- Sankaram, A. V. B., A. S. Rao and J. N. Shoolery (1979). Zeylanone and isozeylanone, two novel quinones from *Plumbago zeylanica*. Tetrahedron, 35, 1777-1782.
- Sidhu, G. S. and A. V. B. Sankaram (1971). New biplumbagin and 3chloroplumbagin from *Plumbago zeylanica*. Tetrahedron Letters, 26, 2385-2388.
- Silverstein, R. M., F. X. Webster and D. J. Kiemle (2005). Spectrometric identification of organic compounds. John Wiley & Sons, INC. 95 p.
- Standley, P. and L. Williams (1967). Flora de Guatemala. Fieldiano Botany, 24, parte III, número 3. Published by Field Museum of Natural History.

- Stensen W. and Jensen E (1995). Structural determination of 1,4naphthoquinones by mass spectrometry/mass spectrometry. Journal of Mass Spectrometry, 30, 1126-1132.
- Theerachayanan, T., B. Sirithunyalug and S. Piyamongkol (2007). Antimalarial and antimycobacterial activities of dimeric naphthoquinone from *Diospyros glandulosa* and *Diospyros rhodocalyx*. Journal of Natural Sciences, 6, 253-259.
- Yoshihira, K., M. Tezuka, P. Kanchanapee and S. Natori (1971). Naphthoquinone derivatives from the Ebenaceae. I. Diospyrol and the related naphthoquinones from *Diospyros mollis* Griff. Chemical Pharmaceutical Bulletin, 19, 2271-2277.
- Zhong, S., P. Waterman and J. Jeffreys (1984). Naphthoquinones and triterpenes from African *Diospyros* species. Phytochemistry, 23, 1067-1072.

Capítulo III

Actividad biológica de los compuestos aislados de *D. anisandra*

III.1 ANTECEDENTES

III.1.1 ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS DEL GÉNERO DIOSPYROS

Diospyros es un género que pertenece a la familia Ebenácea, con más de 350 especies. Muchas de las especies de este género son reconocidas por sus usos medicinales desde la antigüedad. Están documentadas como plantas medicinales en muchas culturas del mundo. En India, *D. melanoxylon* y *D. peregrina* son las plantas más usadas medicinalmente. La corteza y las hojas de *D. peregrina* son usadas para tratar las mordeduras de serpientes mientras que *D. melanoxylon* es usada en problemas urinarios e inflamaciones del bazo (Mallavadhani *et al.*, 1998). En la medicina oriental las hojas de *D. kaki* son usadas como antihipertensivo y para prevenir los problemas cerebro-vasculares (Yin *et al.*, 2005).

En la medicina tradicional africana se reporta el uso de *D. mespiliformis* como analgésico y antipirético, propiedades que se encontraron en un estudio *in vivo* realizado al extracto metanólico de la corteza de su tallo (Adzu *et al.*, 2002a) mientras que su extracto acuoso posee actividad sedante al prolongar el sueño inducido por pentobarbital y disminuir la actividad locomotora de ratones (Adzu *et al.*, 2002b).

El extracto de tallo de *D. variegata* es usado en la medicina tradicional tailandesa como analgésico y antiinflamatorio; en un estudio *in vivo* realizado al extracto hexánico del tallo de esta especie, se encontró que presenta una actividad antipirética y analgésica similar a la aspirina, también se observó una actividad antiinflamatoria similar a la fenilbutazona (Trongsakul *et al.*, 2003).

Los extractos no polares de hojas de D. montana han presentado actividad contra Bacillus subtilis y Corynebacterium pyogenes. El extracto etéreo de los frutos de D. peregrina también posee actividad antibacteriana (Mallavadhani et al., 1998). De D. piscatoria se aislaron dos naftoquinonas, diospyrina e isodiospirina, ambas moléculas fueron activas contra Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae. Salmonella choleraesuis, Mycobacterium chelonae y Pseudomonas aeruginosa (Adeniyi et al., 2000). Diospyrina se ha aislado también de D. montana y presentó actividad contra una cepa sensible y resistente de M. tuberculosis (Lall et al., 2003). De D. nigra se obtuvo un glucósido de diospyrina, el cual fue activo contra Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa (Biswanath et al., 2006). Los extractos

metanólicos de *D. canaliculata* y *D. clasiflora* presentaron importante actividad frente a *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*; del extracto *D. canaliculata* se aislaron las naftoquinonas diospyrona y plumbagina y del extracto de *D. clasiflora* se aislaron la naftoquinona crassiflorona y plumbagina y estos metabolitos fueron evaluados frente a ambas micobacterias, encontrándose que son los responsables de la actividad antimicobacteriana (Kuete *et al.*, 2009). Adicionalmente, la plumbagina ha presentado otras actividades biológicas como antifúngica, antimicrobiana y anti-TB (Dzoyem *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2003; Mossa *et al.*, 2004). En el caso de *D. anisandra* sólo existe el reporte de Borges-Argáez *et al.* (2007) sobre actividad biológica del extracto hexánico de la corteza del tallo. Éste presentó actividad contra una cepa sensible y otra MDR de *M. tuberculosis* (CMI = 12.5 y 6.25 µg/mL, respectivamente) así como también una actividad significativa contra Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, *Candida albicans, Aspergillus niger y Colletotrichum gloeosporioides.*

III.1.2 MÉTODOS PARA DETERMINAR LA SUSCEPTIBILIDAD DE M. TUBERCULOS/S A COMPUESTOS

Se han descrito diversos métodos para la evaluación de susceptibilidad de M. tuberculosis a compuestos naturales y sintéticos. Entre los primeros bioensavos descritos se encuentra el de difusión en agar. Este método consiste en colocar un disco de papel impregnado con el compuesto a evaluar sobre la superficie de una placa con agar, donde previamente se inoculó M. tuberculosis. Este método no es cuantitativo y una de las principales desventajas es que las micobacterias, por su pared celular rica en ácidos grasos son más susceptibles a compuestos poco polares y los compuestos de este tipo se difunden poco o nada en el agar, dando una impresión errónea de poca actividad. Posteriormente, se empleó el método de dilución en agar, el cual es cuantificable. Para este método se preparan medios de agar con series de concentraciones del compuesto a evaluar. Posteriormente, se inocula M. tuberculosis y se espera hasta su crecimiento, de esta forma se puede determinar la CMI. Sin embargo, este método requiere de mucho tiempo y se necesitan grandes cantidades del compuesto a evaluar (Gautam et al., 2007; Bueno-Sánchez & Kouznetsov, 2010)

El método de microdilución en caldo tiene ventajas sobre los métodos que utilizan agar. En el medio líquido los compuestos se encuentran a una concentración definida y las cantidades que se utilizan son pequeñas. El crecimiento bacteriano se mide por turbidimetría. La formación de aconglomerados de algunas micobacterias y la poca solubilidad que pudieran presentar los compuestos a evaluar causan interferencia en las medidas de turbidimetría, siendo ésta la principal desventaja de este método. Una variación de este método es el de alamar azul en microplaca (MABA, por sus siglas en inglés). En el MABA el crecimiento bacteriano se determina mediante la adición del colorante Alamar azul, cuyo principio activo es la resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido), el cual es un colorante de óxido/reducción. La resazurina es de color azul y en presencia de actividad metabólica se reduce a resorufina que es de color rosa y fluorescente. El crecimiento se puede determinar con un fluorómetro o un espectrofotómetro o de manera visual (Bueno-Sánchez & Kouznetsov, 2010; Collins & Franzblau, 1997).

Otro de los métodos empleados es el radiométrico utilizando el equipo BACTEC 460®. Este equipo mide el ¹⁴CO₂ producido por el metabolismo del (1-¹⁴C)-ácido palmítico contenido en el medio líquido Middlebrook 7H12. Con este método se pueden medir múltiples concentraciones y de esta forma determinar la CMI. Entre las desventajas de este método es el alto costo de los radioisótopos (Bueno-Sánchez & Kouznetsov, 2010).

Se han descrito otros métodos utilizando citometría de flujo y HPLC. Sin embargo, los equipos para desarrollar estos métodos son costosos (Bueno-Sánchez & Kouznetsov, 2010).

La comparación de los métodos para realizar los ensayos distingue al MABA, el cual presenta grandes ventajas entre las que están rapidez, bajo costo de materiales y equipo, buena sensibilidad y buena especificidad.

III.1.3. MÉTODOS PARA EVALUAR CITOTOXICIDAD IN VITRO

La evaluación *in vitro* de la inocuidad de compuestos que presentan actividad sobre algún microrganismo se ha vuelto parte indispensable para el desarrollo de un nuevo medicamento. Para el bioensayo se pueden emplear células de mamíferos e inclusive células normales humanas. Entre las células de mamíferos utilizadas se encuentran las Vero. Estas provienen de un riñón normal de *Cercopithecus aethiops* (mono verde africano). Por otra parte, para la evaluación sobre células humanas se emplea un cultivo primario de células mononucleares de sangre periférica. La evaluación sobre estas células ofrece ventajas en comparación con las células animales, ya que los resultados obtenidos en células animales no siempre se pueden extrapolar a los posibles resultados del uso de un compuesto en células humanas *in vivo* (González-Salazar & Said-Fernández, 2006).

Existen cuatro métodos no radiactivos para determinar la viabilidad celular: conteo de células o colonias, unión de colorantes a macromoléculas, de metabolismo celular y de integridad de membrana (Skehan, 2002).

El método por conteo de células puede ser tedioso y consumir demasiado tiempo. Se cuentan células morfológicamente intactas, sin embargo, no es posible distinguir células muertas de vivas (Skehan, 2002).

El método de unión de colorantes a macromoléculas es un método rápido, sensible y cuantificable. Entre los colorantes utilizados para este método se encuentra la sulforodamina B (SRB). La SRB es un colorante rosa brillante

con dos grupos sulfónicos que se unen a residuos de aminoácidos básicos bajo condiciones ligeramente ácidas, y se disocia en condiciones básicas. La unión de SRB es estequiométrica, la cantidad de colorante extraído de las células teñidas es directamente proporcional a la masa celular. Para la medición se puede emplear un espectrofotómetro (Vichai & Kirtikara, 2006).

Los métodos por metabolismo celular, utilizan colorantes de óxido/reducción. Entre estos colorantes se encuentra el bromuro de 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). El bioensayo se basa en la reducción del MTT por la succinato-deshidrogenasa de células vivas. El MTT es un colorante soluble en agua de color amarillo al ser reducido se forma un derivado de formazán de color azul intenso e insoluble en agua. La cuantificación se realiza por espectrofotometría (Hördegen *et al.*, 2006; Denizot & Lang, 1986).

Finalmente, los métodos de integridad de membrana se basan en la habilidad de las células vivas de ser impermeables a moléculas extracelulares. Estos métodos utilizan colorantes como el azul de tripán. El azul de tripán es un colorante de exclusión; en células viables la membrana plasmática evita que el azul de tripán entre y tiña el núcleo, en contraste, en células muertas la permeabilidad de la membrana plasmática deja de ser una barrera y el azul de tripán fácilmente tiñe el núcleo. Para la determinación de la viabilidad celular se realiza el conteo de al menos 100 células en un hematocitómetro (Skehan, 2002).

En el presente capítulo se describe la actividad antimicobacteriana de los compuestos aislados de la corteza de tallo de *D. anisandra*. Adicionalmente, los compuestos con actividad anti-TB fueron evaluados sobre la línea celular de mono Vero y células mononucleares humanas de sangre periférica.

III.2 MATERIALES Y MÉTODOS

III.2.1 EVALUACIÓN DE FRACCIONES Y COMPUESTOS PUROS FRENTE A LAS CEPAS DE *M. tuberculosis*

III.2.1.1 PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS PARA SU EVALUACIÓN POR EL MÉTODO DE MABA

Los compuestos y/o fracciones se disolvieron en dimetil-sulfóxido (DMSO) a una concentración de 2 mg/mL.

III.2.1.2 PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS MICOBACTERIANOS

Los extractos crudos y las fracciones se evaluaron únicamente frente a una cepa sensible (H37Rv), en tanto que los compuestos puros se evaluaron frente a esta cepa sensible y una cepa MDR (CIBIN-UMF 15:99). Ambas cepas micobacterianas se cultivaron en medio sólido Lowenstein-Jensen (Merck, Darmstadt, Germany), a partir del cual se tomó una asada de colonias para realizar la suspensión bacteriana en 2 mL de agua bidestilada con ayuda de perlas estériles de 3 mm de diámetro. Los cultivos secundarios se realizaron inoculando 0.1 mL de esta suspensión en 2.5 mL de medio Middlebrook 7H9 enriquecido con 2% de glicerol y OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa, catalasa) (Becton Dikinson, Franklin Lakes, NY, USA); se cultivó hasta que la bacteria alcanzó su fase logarítmica comparable al estándar No. 1 de Mc Farland, para lo cual se empleó un nefelómetro. Posteriormente, se preparó una dilución 1:50 que contenía 6 × 10^6 UFC/mL, correspondiente con el inóculo de trabajo.

III.2.1.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-TB POR MABA

Los extractos crudos, las fracciones y los compuestos puros se evaluaron por MABA utilizando la cepa sensible H37Rv (ATCC No 27294) o MDR (CIBIN-UMF 15:99) de *M. tuberculosis*, siguiendo el método descrito por Molina-Salinas *et al.* (2006a). Para la evaluación se utilizó microplacas de poliestireno de 96 pozos con baja evaporación y estériles (Corning Inc., Corning NY, USA). En los pozos de la periferia se adicionaron 200 µL de agua desionizada estéril para minimizar la evaporación. Las placas se manejaron en 10 hileras con 6 filas cada una. Se agregaron 100 µL de medio Middlebrook enriquecido al resto de los micropozos. Cien µL de los extractos, fracciones o compuestos a evaluar se añadieron al primer micropozo de cada fila y se realizaron diluciones utilizando las 6 hileras disponibles. Se incluyeron dos hileras con diluciones seriadas para el control positivo rifampicina (2.00-0.06 µg/mL). En otra hilera se destinaron los siguientes micropozos: uno para el control de esterilidad del medio de cultivo (sin inóculo), cuatro para los controles de crecimiento de las micobacterias (inóculo libre de anti-TB o la preparación de interés) y uno para el control de crecimiento con la dilución 1:100 del inóculo de trabajo (método de las proporciones, recomendado para Micobacteriología). A cada uno de los micropozos se le agregaron 100 µL del inóculo bacteriano (excepto al del control de esterilidad) y 100 µL de las disoluciones de los metabolitos prueba, los medicamentos anti-TB y los controles de crecimiento. El rango de concentración final para los compuestos y/o fracciones fue de 100-3.13 µg/mL. En algunos casos fue necesario evaluar concentraciones menores de 3.13 µg/mL. Cada microplaca se introdujo en una bolsa de plástico e incubada a 37 °C por 5 días en atmósfera de CO₂ al 5%. A uno de los controles de crecimiento, arriba descritos, se le agregaron 32 µL de Alamar Azul y Tween 80 al 20% v/v 1.6:1 (v/v) (Sigma Chemical Co. St. L. MO. USA) y la placa se re-incubó por 24 h. Un cambio de color de azul a rosa indicó que los cultivos estaban metabólicamente activos, por lo que seguidamente se adicionó Alamar azul (32 µL) a cada uno del resto de los micropozos. Las microplacas se re-incubaron por 24 h y se registraron los resultados. La actividad anti-TB de los compuestos y/o fracciones se reportó como CMI. La CMI correspondió a la mayor dilución del compuesto en el cual el color azul no cambió a rosa. Los resultados se confirmaron por observación directa con un microscopio invertido en campo claro con un objetivo 100×.

III.2.2 EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS SOBRE CÉLULAS VERO

Para la realización de los ensavos de citotoxicidad se utilizó el método descrito por Vargas-Villarreal y Said-Fernández (2006) sobre la línea celular Vero, de mono verde africano (Cercopithecus aethiops, ATCC No CC-81). Las células se cultivaron en cajas de polipropileno de 25 cm, a 37 °C, en atmósfera de CO2 al 5% hasta que alcanzaron la confluencia. A cada caja se le agregó 1 mL de tripsina-EDTA al 0.25% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y se re-incubaron hasta que la mayoría de las células se despegaron del sustrato. Las suspensiones celulares se centrifugaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL (Sigma Chemical. Co. St. L. MO. USA) a 1,500 rpm por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se re-suspendió en 1.5 mL de medio completo MEM o RPMI (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Se determinó la concentración de las células con una cámara de Neubawer y se incubaron 15,000 células/200 µL por pozo en una microplaca de 96 pozos (Sigma Chemical Co. St. L. MO. USA). Las microplacas se incubaron a 37 °C por 24 h en atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Posteriormente, se aspiraron los 200 µL de medio y se agregaron 200 µL de medio MEM o RPMI con suero fetal bovino (SFB) al 10%, en ambos

casos (medios completos, control positivo), con SDS 1% (control negativo) o medio MEM o RPMI completos donde se realizaron las diluciones de los compuestos (dilución seriada con un rango de concentraciones de 100 a 0.390 µg/mL o concentraciones menores. Las preparaciones se reincubaron por 24 h. Se retiró el medio de cada pozo y se agregaron 50 µL de tripsina-EDTA 0.25%; las placas se reincubaron 15-30 min en atmósfera de CO₂ al 5%. Se transvasaron las suspensiones celulares de cada pozo, por separado, a tubos Eppendorf de 1.5 mL. La proporción de células viables se determinó en cada preparación utilizando como indicador Azul Tripán (20 µL, al 0.2 %, Sigma Chemical Co. St. L. MO. USA). El porcentaje de viabilidad fue igual al número de células no teñidas/total de células × 100. Los ensayos se realizaron por triplicado y las Cl₅₀ se determinaron por el método Probit con el paquete estadístico SPSS.

III.2.3 EVALUACIÓN DE LOS COMPUESTOS SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (CMSP)

Para la realización de los ensayos de citotoxicidad sobre CMSP adherentes se utilizó el método descrito por González-Salazar y Said-Fernández (2006).

III.2.3.1 OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

Se colectó sangre venosa periférica de un voluntario sano, utilizando tubos Vacutainer, (Becton Dikinson, Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NY, USA) estériles de 16 × 100 mm y 10 mL de capacidad, conteniendo heparina sódica como anticoagulante. Se utilizó una aguja de calibre 22 mm. A cada tubo se le agregaron 3 mL de PBS estéril. El contenido de cada tubo se transfirió suavemente y en condiciones de esterilidad, a un tubo cónico de polipropileno (Corning Inc, Corning NY, USA) de 15 mL con tapón de rosca, conteniendo 3 mL de Ficoll-Hypaque estéril manteniendo las fases separadas. Las preparaciones se centrifugaron a 400 × g por 10 min, para separar las CMSP.

La capa de CMSP se recuperó de cada uno de los tubos con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril. Todas las CMSP se distribuyeron en tubos cónicos nuevos, los cuales se terminaron de llenar con PBS estéril y se centrifugaron a 400 x g 10 min. El sobrenadante se retiró y las pastillas de células se resuspendieron y se mezclaron en un solo tubo. Estas células se lavaron con PBS estéril y se sedimentaron nuevamente por centrifugación. Las células se re-suspendieron en 2 mL de medio RPMI (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), adicionado con 10% de suero bovino fetal (Bioxon, Ciudad de México, México) y fueron contabilizadas con la ayuda de un hematocitómetro para determinar la densidad celular. Finalmente, se agregó medio RPMI para ajustar a una densidad de 2 ×10⁶ células/mL.

III.2.3.2 EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD SOBRE CMSP

Para evaluar la citotoxicidad de los compuestos sobre las CMSP, se utilizaron placas de 96 pozos (Corning Inc., Corning NY, USA). Se agregaron 100 µL por pozo de la suspensión celular (conteniendo 2×10^6 células), posteriormente se agregaron 100 µL por pozo de las diferentes concentraciones de los compuestos diluidos en medio RPMI adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Las placas se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 72 h. Posteriormente, se aspiró el medio de cultivo de cada pozo y las células adherentes mononucleares (CAM) se colocaron en tubos Eppendorf. Se determinó la viabilidad por tinción diferencial con azul de tripán. El porcentaje de viabilidad fue igual al número de células no teñidas/total de células × 100. Los ensayos se realizaron por triplicado y se analizaron en el programa Excel de Microsoft 2007.

III.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de actividad biológica de los compuestos aislados de *D. anisandra* se presentan en la Tabla 18.

La naftoquinona plumbagina presentó actividad frente a ambas cepas de *M. tuberculosis* (CMI = 1.56 µg/mL). Sin embargo, sus derivados naturales, los monómeros *cis*-isoshinanolona y droserona no fueron activos, probablemente la presencia del doble enlace y el hidrógeno en posición 3 son necesarios para la actividad en los monómeros de plumbagina. Para plumbagina existen dos reportes de actividad frente a la cepa sensible de *M. tuberculosis* (H37Rv), el primero reportado por Mossa *et al.* en 2004 (CMI de 1.25 µg/mL) y el segundo por Kuete *et al.* en 2009 (CMI de 4.88 µg/mL), sin embargo, éste es el primer reporte de actividad anti-TB sobre una cepa MDR. Las naftoquinonas diméricas maritinona y 3,3'-biplumbagina al igual que plumbagina fueron activas frente a las dos cepas de *M. tuberculosis* (3.13 µg/mL); la chitranona (50 µg/mL) fue moderadamente activa y la eliptinona (>100 µg/mL) no mostró actividad. Cabe mencionar que la eliptinona presentó problemas de solubilidad.

Los resultados sugieren que la posición de unión de plumbagina para formar los dímeros es importante para exhibir actividad anti-TB. La unión de ambas plumbaginas en posición 8-8' y 3-3' favorecen la actividad anti-TB, pero la unión en posiciones 3-6' y 6-6' causa la disminución y/o la pérdida de dicha actividad. El epóxido de zeylanona (12.5-25 µg/mL) presentó moderada actividad frente a ambas cepas de *M. tuberculosis*. Es importante resaltar que los fármacos anti-TB rifampicina y estreptomicina fueron menos activos sobre la cepa resistente de *M. tuberculosis* (100 y \geq 100 µg/ml, respectivamente) que las naftoquinonas plumbagina, maritinona, 3,3'-biplumbagina, chitranona y epóxido de zeylanona. Adicionalmente, plumbagina, maritinona y 3,3'-biplumbagina resultan ser más activas sobre la cepa resistente en comparación con el fármaco etambutol (8 µg/mL) (Molina-Salinas *et al.*, 2006b).

Previamente, la maritinona se evaluó sobre otras micobacterias como *M. smegmatis* y *M. avium* no exhibiendo actividad sobre estas micobacterias (Copp and Pearce, 2007). Por otra parte, la maritinona y la chitranona han presentado actividad citotóxica sobre las líneas celulares de carcinoma oral epidermoide humano (KB), cáncer humano de pulmón (Lu1), cáncer humano de próstata hormona dependiente (LNCaP) y células endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVEC) (Gu *et al.*, 2004). Para la 3,3'-biplumbagina únicamente se reportó su actividad ictiotóxica (Higa *et al.*, 2002).

Compuestos	CMI (µg/mL)		Vero	CAM	Indice de	
	MTbS	MTbR	Сі ₅₀ (µg/mL)	Cl ₅₀ (µg/mL)	selectividad	
(46)	3.13	3.13	232.69	>125	74.3	
II (47)	50	25				
III (48)	50	50				
IV (49)	100	100				
V (50)	1.56	1.56	3.73	>125	2.3	
VI (51)	3.13	3.13	607.57	>125	194.1	
VII (52)	25	12.5	3.89	>125		
VIII (56)	>100	100				
IX (57)	>100	>100	0.146	>125		
X (58)	>100	>100	0.126	>125		
XI (59)	>100	>100				
XII (60)	>100	>100				
XIII (61)	>100	>100				
XIV (62)	>100	25	0.933	>125		
XV (63)	>100	>100				

Tabla 18. Resultados de actividad biológica de los compuestos aislados de D. anisandra. MTbS: M. tuberculosis sensible (H37Rv); MTbR: M. tuberculosis resistente (MDR-UMF 15:99); CAM: células adherentes

mononucleares

I.maritinona, II.aldehído de betulina, III.chitranona, IV.germacra-5,4(15),10(14)-trien-1β-ol, V.plumbagina, VI.3,3'-biplumbagina, VII.epóxido de zeylanona, VIII.lupeol, IX.cis-isoshinanolona, X.eliptinona, XI.betulina, XII.ácido betulínico, XIII.teucdiol A, XIV.droserona, XV.selin-4(15)-en-1β,11diol.

Los triterpenos betulina, lupeol y ácido betulínico no fueron activos frente a ambas cepas, pero el aldehído de la betulina presentó moderada actividad sobre ambas cepas de *M. tuberculosis* (CMI = 25-50 µg/mL). Previamente, se ha reportado la actividad anti-TB del aldehído de betulina (CMI = 25 µg/mL) sobre una cepa sensible (H37Ra) de *M. tuberculosis* (Theerachayanan *et al.*, 2007), lo que coincide con nuestros resultados.

En la evaluación de la actividad citotóxica sobre células Vero, las naftoquinonas diméricas maritinona y 3,3'-biplumbagina no resultaron citotóxicas, presentando la maritinona un índice de selectividad (IS) de 74.3, es decir, que es necesario 74.3 veces la cantidad de maritinona que inhibe apoximadamente al 90% de *M. tuberculosis* para causar la mortalidad del 50% de las células Vero. La 3,3'-biplumbagina resultó aún menos citotóxica con un IS de 194.1. En el caso de plumbagina (Cl₅₀ = $3.73 \mu g/mL$), droserona (Cl₅₀ = 0.933), isoshinanolona (Cl₅₀ = 0.146), epóxido de

zeylanona ($CI_{50} = 3.89$) y eliptinona ($CI_{50} = 0.126$) todas resultaron ser citotóxicas sobre las células Vero.

M. tuberculosis se aloja y reproduce en los macrófagos alveolares. Para corroborar la inocuidad de las naftoquinonas sobre estas células se realizó el ensayo frente a las células adherentes humanas. De la evaluación de las naftoquinonas bioactivas sobre las células adherentes, ninguna mostró evidencia de actividad citotóxica a la concentración más alta evaluada (125 µg/mL). Estos datos constituyen el primer reporte de la evaluación de las naftoquinonas sobre un cultivo primario de células mononucleares humanas.

Los fármacos anti-TB de primera línea presentan diferentes mecanismos de acción como la inhibición en la síntesis de componentes de la pared celular (isoniazida, etambutol), de proteínas (estreptomicina), de ácidos nucleicos (rifampicina), y de energía (pirazinamida) (Zhang, 2005). Sin embargo, se han reportado cepas resistentes a todos los fármacos anti-TB de primera línea. Los mecanismos para adquirir resistencia son la disminución de la producción, alteración o pérdida del blanco del fármaco y recientemente se han identificado bombas de eflujo de fármacos (Spratt, 1994; Danilchanka et al., 2008; Pasca et al., 2004; Silva et al., 2001). Sorprendentemente, los compuestos activos plumbagina, maritinona y 3,3'-biplumbagina presentaron la misma CMI en ambas cepas de M. tuberculosis, probablemente el mecanismo de acción es diferente al de los fármacos de primera línea. Recientemente se reportó que un derivado de plumbagina mostró efectos sobre la cadena de transporte de electrones, midiéndose por la inhibición del consumo de oxígeno en M. smegmatis (Mathew et al., 2010). Se ha sugerido que las naftoquinonas pueden interactuar con enzimas de la cadena de transporte de electrones de Mycobacterium debido a su similitud con la menaguinona, la guinona natural involucrada en el transporte de electrones de M. tuberculosis (Van der Koov et al., 2006). Este mecanismo de acción resulta selectivo debido a que los mamíferos utilizan guinonas diferentes a la menaquinona, las cuales no presentan similitud con las naftoquinonas. Sin embargo, plumbagina fue citotóxica sobre las células Vero probablemente a causa de otros mecanismos ya descritos en células de mamíferos, como la habilidad de unirse a la topoisomerasa II y su capacidad de formar especies reactivas de oxígeno las cuales causan la oxidación de los componentes celulares (Bender et al., 2007; Inbaraj & Chignell, 2003). Por otra parte, los dímeros de plumbagina maritinona y 3,3'biplumbagina no fueron citotóxicos sobre las células Vero, posiblemente su estructura no permite su unión a la topoisomerasa II y/o no tienen la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno, sin embargo, son necesarios estudios adicionales para demostrarlo.

Todas las naftoquinonas aisladas en este trabajo, excepto la maritinona y la 3,3'-biplumbagina resultaron citotóxicas sobre las células Vero y ninguna sobre las células adherentes humanas a las concentraciones evaluadas. Como previamente se describió, la citotoxicidad de las naftoquinonas podría atribuirse a la formación de radicales libres (Babula *et al.*, 2009; Ventura-Pinto & Lisboa de Castro, 2009). Los efectos oxidantes de los radicales libres pueden ser mitigados por antioxidantes como el glutatión (Viera-Castro *et al.*, 2008); probablemente las cantidades de glutatión en las células adherentes humanas son mayores a la de las células Vero. Previamente, plumbagina y 3,3'-biplumbagina han sido evaluadas sobre un cultivo primario de células murinas y únicamente plumbagina (Cl₅₀ < 0.1 μ g/mL) fue citotóxica (Kayser *et al.*, 2000). Estudios adicionales *in vivo* son necesarios para corroborar la seguridad de las naftoquinonas con posible aplicación en el futuro para el tratamiento de la TB MDR.

III.4 CONCLUSIONES

1) De la evaluación anti-TB *in vitro* sólo las naftoquinonas plumbagina, maritinona y 3,3'-biplumbagina resultaron activas para las cepas sensible (H37Rv) y resistente (MDR-UMF 15:99) con valores de CMI de 1.56, 3.13 y 3.13 μg/mL, respectivamente.

2) De la evaluación citotóxica, las naftoquinonas plumbagina, *cis*isoshinanolona, droserona y eliptinona resultaron altamente tóxicas con una CI_{50} de 3.73, 0.146, < 0.933 y < 0.126 µg/mL, respectivamente.

3) El IS frente a *M. tuberculosis* en comparación con las células Vero de las naftoquinonas diméricas, maritinona y 3,3'-biplumbagina fue de 74.3 y194.1, respectivamente.

4) Del ensayo con células mononucleares adherentes humanas todas las naftoquinonas resultaron inocuas a la concentración más alta evaluada de 125 μg/mL.

5) Los resultados de actividad biológica de los compuestos nos indican que la plumbagina, maritinona y 3,3'-biplumbagina son moléculas con potencial para nuevos fármacos anti-TB ya que se trata de compuestos naturales extraordinariamente activos, incluso frente a una cepa que no sólo es resistente a isoniazida y rifampicina (condición que la define como multifármaco-resistente), sino a todos los medicamentos de primera línea.

III.5 REFERENCIAS

- Adeniyi, B., H, Fong,vJ. Pezzuto, L. Luyengi and H. Odelola (2000). Antibacterial activity of diospyrin, isodiospyrin and bisisodiospyrin from the root of *Diospyros piscatoria* (Gurke) (Ebenaceae). Phytotherapy Research, 14, 112–117.
- Adzu, B., S. Amos, S. Dzarma, I. Muazzam and K. Gamaniel (2002a). Pharmacological evidence favouring the folkloric use of *Diospyros mespiliformis* Hochst in the relief of pain and fever. Journal of Ethnopharmacology, 82, 191-195.
- Adzu, B., S. Amos, I. Muazzam, U. Inyang and K. Gamaniel (2002b). Neuropharmacological screening of *Diospyros mespiliformis* in mice. Journal of Ethnopharmacology, 83, 139-143.
- Babula, P., V. Adam, L. Havel and R. Kizek (2009). Noteworthy secondary metabolites naphthoquinones-their occurrence, pharmacological properties and analysis. Current Pharmaceutical Analysis, 5, 47-68.
- Bender, R., A. Ham and N. Osheroff (2007). Quinone-induced enhancement of DNA cleavage by human topoisomerase IIα: adduction of cysteine residues 392 and 405. Biochemistry, 46, 2856-2864.
- Biswanath, D., B. Abhijit, C. Utpal, A. Shiho, T. Hiroaki and H. Yoshihiro (2006). Antimicrobial C-glucoside from aerial parts of *Diospyros nigra*. Chemical Pharmaceutical Bulletin, 54(5) 679-68.
- Borges-Argáez, R., C. I. Canche-Chay, L. M. Peña-Rodríguez, S. Said-Fernández and G. M. Molina-Salinas (2007). Antimicrobial activity of *Diospyros anisandra*. Fitoterapia, 78, 370-372.
- Bueno-Sánchez, J. G. and V. Kouznetsov (2010). Antimycobacterial susceptibility testing for natural products research. Braziliam Journal of Microbiology, 41, 270-277.
- Collins, L. A. and S. G. Franzblau (1997). Microplate alamar blue assay versus Bactec 460 system fro high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 41, 1004-1009.
- Copp, B. and N. Pearce (2007). Natural product growth inhibitors of Mycobacterium tuberculosis. Natural Product. Reports, 24, 278-297.
- Danilchanka, O., C. Mailaender and M. Miederweis (2008). Identification of a novel multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 52, 2503–2511.
- Denizot, F. and R. Lang (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Journal of Immunological Methods, 89, 271-277.
- Dzoyem, J., J. Tangmouo, D. Lontsi, X. Etoa and P. Lohoue (2007). In vitro antifungal activity of extract and plumbagin from the stem bark of *Diospyros crassiflora Hierri* (Ebenaceae). Phytotherapy Research, 21, 671-674.

- Gautam, R., A. Saklani and S. M. Jachak (2007). Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents. Journal of Ethnopharmacology, 110, 200-234.
- González-Salazar, F. and S. Said-Fernández (2006). Determinación de actividad citotóxica de productos naturales sobre cultivos primarios de células mononucleares periféricas humanas. En Said-Fernández, S., E. del Olmo, C. Leal and A. San Feliciano, Eds. Manual de Técnicas de Bioevaluación de Nuevos Agentes Anti-tuberculosos. Editorial Proyecto X.11 (CYTED), España. Pp 145-148.
- Gu, J., T. Graf, D. Lee, H. Chai, Q. Mi, L. Kardono, F. Setyowati, R. Ismail, S. Riswan, N. Farnsworth, G. Cordell, J. Pezzuto, S. Swanson, D. Kroll, J. Falkinham, M. Wall, M. Wani, D. Kinghorn and N. Oberlies (2004). Cytotoxic and antimicrobial constituents of the bark of *Diospyros maritima* collected in two geographical locations in Indonesia. Journal of Natural Products, 67, 1156-61.
- Higa, M., N. Noha, H. Yokaryo, K. Ogihara and S. Yogi (2002). Three new naphthoquinone derivatives from *Diospyros maritima* Blume. Chemical Pharmaceutical Bulletin, 50, 590-593.
- Hördegen, P., J. Cabaret, H. Hertzberg, W. Langhans and V. Maurer (2006). In vitro screening of six anthelmintic plant products against larval *Haemorichus contortus* with a modified methyl-thiazolyl-tetrazolium reduction assay. Journal of Ethnopharmacology, 108, 85-89.
- Inbaraj, J. J. and C. F.Chignell (2004). Cytotoxic action of juglone and plumbagin: a mechanistic study using HaCaT keratinocytes. Chemical Research in Toxicology, 17, 55-62.
- Kayser, O., A. Kiderlen, H. Laatsch and S. Croft (2000). *In vitro* leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. Acta Tropica, 77, 307-314.
- Kuete, V., J. Tangmouoc, M. Meyer and N. Lall (2009). Diospyrone, crassiflorone and plumbagin: three antimycobacterial and antigonorrhoeal naphthoquinones from two *Diospyros spp*. International Journal of Antimicrobial Agents, 34(4), 322-325.
- Lall, N., M. Das, B. Hazra and J. Meyer (2003). Antimycobacterial activity of diospyrin derivatives and a structural analogue of diospyrin against *Mycobacterium tuberculosis in vitro*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 51, 435-438.
- Mallavadhani, U., A. Panda and Y. Rao (1998). Pharmacology and chemotaxonomy of *Diospyros*. Phytochemistry, 49, 901-951.
- Mathew, R., A. K. Kruthiventi, J. V. Prasad, S. P. Kumar, G. Srinu and D. Chatterji (2010). Inhibition of mycobacterial Growth by plumbagin derivatives. Chemical Biology and Drug Design, 76, 34–42.
- Molina-Salinas, G. M., P. Becerril-Montes and S. Said-Fernández (2006a). Caracterización de la actividad anti-TB como bactericida o bacteriostática. Determinación de la concentración mínima bactericida

(CMB). En Said-Fernández, S., E. del Olmo, C. Leal, A. San Feliciano, Eds. Manual de Técnicas de Bioevaluación de Nuevos Agentes Anti-tuberculosos. Editorial Proyecto X.11 (CYTED), Salamanca, España. Pp 117-121.

- Molina-Salinas, G. M., M. C. Ramos-Guerra, J. Vargas-Villarreal, B. D. Mata-Cárdenas, P. Montes-Becerril and S. Said-Fernández (2006b). Bactericidal Activity of Extracts from *Flourensia cemua* DC against Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Archives of Medical Research, 37, 45-49.
- Mossa, J., F. El-Feraly and I. Muhammad (2004). Antimycobacterial constituents from *Juniperus procera*, *Ferula communis* and *Plumbago zeylanica* and their *in vitro* synergistic activity with isonicotinic acid hydrazide. Phytotherapy Research, 18, 934-937.
- Pasca, M.R., P. Guglierame, F. Arcesi, M. Bellinzoni, E. de Rossi and G. Riccardi (2004). Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, an ABC fluoroquinolone efflux pump in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48, 3175–3178.
- Ribeiro, S., M. Figueiredo, T. Aragão and M. Coelho (2003). Antimicrobial activity *in vitro* of plumbagin isolated from *Plumbago* species. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 98(7), 959-961.
- Silva, P.E.A., F. Bigi, M. P. Santangelo, M. I. Romano, C. Martín, A. Cataldi and J. A. Ainsa (2001). Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45, 800-804.
- Skehan, P (2002). Cell growth and cytotoxicity assays. En Studzinski, G. P., Ed. Cell growth, differentiation and senescence. Editorial the Practical Approach Series, Estados Unidos de América. Pp 33-34.
- Spratt, B.G (1994). Resistance to antibiotics mediated by target alterations. Science, 264, 388-393.
- Theerachayanan, T., B. Sirithunyalug and S. Piyamongkol (2007). Antimalarial and antimycobacterial activities of dimeric naphthoquinone from *Diospyros glandulosa* and *Diospyros rhodocalyx*. Journal of Natural Sciences, 6(2), 253-259.
- Trongsakul, S., A. Panthong, D. Kanjanapothi and T. Taesotikul (2003). The analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activity of *Diospyros variegata Kruz*. Journal of Ethnopharmacology, 85, 221–225.
- Van der Kooy, F., J. J. M. Meyer and N. Lall (2006). Antimycobacterial activity and possible mode of action of newly isolated neodiospyrin and other naphthoquinones from *Euclea natalensis*. South African Journal of Botany, 72, 349-352.
- Vargas-Villarreal, J., S. Said-Fernández (2006). Cuantificación de la actividad de extractos o compuestos de plantas sobre diferentes líneas celulares. En Said-Fernández, S., E. del Olmo, C. Leal and A. San Feliciano, Eds. Manual de Técnicas de Bioevaluación de Nuevos

Agentes Anti-tuberculosos. Editorial Proyecto X.11 (CYTED), Salamanca, España. Pp 141-144.

- Ventura-Pinto, A. and S. Lisboa-de Castro(2009). The trypanocidal activity of naphthoguinones: A Review. Molecules, 14, 4570-4590.
- Vichai, V. and K. Kirtikara (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. Nature Protocols, 1, 1112-1116.
- Vieira-Castro, F., D. Mariani, A. Dolly-Panek, E. Araújo-Eleutherio and M Dias-Pereira (2008). Cytotoxicity mechanism of two naphthoquinones (menadione and plumbagin) in *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS One, 3, e3999.
- Yin, M., D. Kang, D. Choi, T. Kwon and H. Lee (2005). Screening of vasorelaxant activity of some medicinal plants used in oriental medicines. Journal of Ethnopharmacology, 99, 113–117.
- Zhang, Y (2005). The magic bullets and tuberculosis drug targets. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 45, 529-564.



Capítulo IV

Caracterización química y actividad anti-TB del extracto de *Gliocladium* sp. MR41

IV.1 ANTECEDENTES

Gliocladium es un género con especies de hongos saprófitos que habitan generalmente en el suelo, aunque se han encontrado en asociación con plantas y animales de ambientes acuáticos, ya sea de agua salada o dulce (Huang *et al.*, 2007). Las especies de este género presentan conidióforos hialinos; la parte superior con ramas peniciliadas formando un "cepillo" compacto como *Penicillium*; los conidios son unicelulares, son hialinos o de colores brillantes, producidos apicalmente en forma sucesiva, conectándose en gotas mucilaginosas (Barnett, 1998). En la Figura 48 se presenta la imagen de conidióforos y conidios de *Gliocladium* sp. MR41.



Figura 48. Imagen de Gliocladium sp. MR41.

Clasificación ta	xonómica de Gliocladium.
Reino:	Fungi
División:	Eumycota
Subdivisión:	Deuteromycotina
Clase:	Hyphomycetes
Orden:	Moniliales
Familia:	Moniliaceae
Género:	Gliocladium
Especie:	Gliocladium sp. MR41

Los hongos de este género se han estudiado debido a que producen una gran diversidad de metabolitos con importantes actividades biológicas. En la Figura 49 y Tabla 19 se presentan algunos de estos metabolitos con su actividad biológica.

Ninguno de los metabolitos aislados del género *Gliocladium* se ha evaluado frente a *M. tuberculosis*. Sin embargo, compuestos producidos por especies de la familia Moniliaceae, tales como la enniatina B (*Verticillium hemipterigenum*, 68) y la beauvericina (*Paecilomyces tenuipes*, 69) mostraron importante actividad anti-TB con CMI's de 3.12 y 12.5 µg/mL, respectivamente (Nilanonta *et al.*, 2003; Nilanonta *et al.*, 2000). Las estructuras de la enniatina B y la beuvericina se presentan en la Figura 50.







Figura 49. Estructura de metabolitos aislados del género Gliocladium.

Tabla 19.	Metabolitos	aislados de	l género	Gliocladium	con	actividad	biológica.

Metabolito	Especie	Actividad biológica	Origen	Referencia
ácido secalónico (64)	Gliocladium sp.	Citotóxico frente a las liíneas celulares tumorales P388, A549, K562, con Cl ₅₀ de 0.03, 0.26 y 5.76 µM, respectivamente.	Liquen	Ren <i>et al</i> ., 2006
ácido heptelídico (65)	Gliocladium virens	Antibacteriano frente a Bacteroides fragilis con CMI de 0.4 µg/mL.	Muestra de suelo	ltoh <i>et al</i> ., 1980
verticillina (66)	Gliocladium sp.	Inhibición de la inducción del c-fos proto-oncogen a 0.5 µM.	Hojarasca	Chu <i>et al</i> ., 1995
argifina (67)	Gliocladium sp.	Inhibición de actividad de quitinasa a 0.1 µM	Muestra de suelo	Omura <i>et al</i> ., 2000



68



Figura 50. Estructura química de la enniatina B y la beauvericina.

En este capitulo se presenta la actividad anti-TB de las sub-fracciones obtenidas a partir de extracto de AcOEt. Adicionalmente, se describe el estudio químico de las sub-fracciones más abundantes.

IV.2 MATERIALES Y MÉTODOS

IV.2.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DE GLIOCLADIUM SP. MR41

IV.2.1.1 OBTENCIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE ESPORAS DE GLIOCLADIUM SP. MR41.

El cultivo padre del hongo *Gliocladium* sp. MR41 se obtuvo del cepario de la Unidad de Biotecnología (responsable: María Marcela Gamboa-Angulo). Cabe mencionar que el hongo fue obtenido en Rancho Guadalupe, Xalapa, 19° 30'Lat. N., 96° 56-57' Lon. O., en el mes de abril de 2004. El hongo se reactivó mediante el empleo del medio agar-maíz (A-M). Para la preparación del A-M se utilizaron 250 g de elote en grano (La Huerta^{MR}) por cada litro de agua y 18 g de agar técnico (Becton, Dickinson CO, MA, USA); la disolución se calentó hasta ebullición, posteriormente se esterilizó a 121°C y 15 lb/in² de presión, durante 20 minutos. El medio estéril se vertió en cajas de Petri de 10 cm de diámetro. La cepa fúngica se inoculó en el medio de A-M y se incubó en fotoperiodo 12-12 h luz/oscuridad a 25 °C por aproximadamente 7-8 días. Finalmente, a cada caja de Petri se le agregaron 5 mL de disolución salina 0.85% y las esporas se removieron suavemente con ayuda de un portaobjetos. La suspensión de esporas resultante se utilizó para sembrar en el medio de arroz fermentado.

IV.2.1.2 CULTIVO MASIVO DE GLIOCLADIUM SP. MR41

El hongo *Gliocladium* sp. MR41 se cultivó en forma masiva, utilizando arroz fermentado como sustrato. La fermentación se realizó en frascos de vidrio de 255 mL en los cuales se colocaron 20 g de arroz (La Merced^{MR}) y 30 mL de agua destilada. Los frascos se dejaron reposar a temperatura ambiente durante una noche para la fermentación del arroz. Posteriormente, se esterilizaron en posición inclinada a 121 °C y 15 lb/in² de presión durante 20 minutos. Los frascos con medio de arroz se inocularon con 2 mL de la suspensión de esporas obtenida como previamente se describió. Los frascos se incubaron durante 40 días a 25 °C con un fotoperiodo 12-12 h luz/oscuridad. Al final del crecimiento, los cultivos se congelaron, se liofilizaron y se molieron. Se cultivaron un total de tres lotes (MR-B, MR-C y MR-D), con un total de 5.6 kg de arroz fermentado.

IV.2.1.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DE AcOEt

El material fúngico de cada lote se extrajo con AcOEt por maceración a temperatura ambiente durante 24 h. Se realizaron tres extracciones y al

término de cada extracción el disolvente se decantó, filtró y evaporó a presión reducida.

Se obtuvieron tres extractos de AcOEt de la cepa fúngica y otro más fue proporcionado por la Dra. Marcela Gamboa y se denominó MR-A (8 g). En la tabla 20 se puede observar la cantidad de material fúngico y extracto obtenido para cada lote así como el rendimiento.

Lote	Material	Extracto AcOEt	Rendimiento
	fúngico (g)	(g)	p/p (%)
MR-B	252	14.24	5.6
MR-C	231	13.17	5.7
MR-D	935	65.92	7.0

IV.2.2 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO CRUDO

IV.2.2.1 PARTICIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

Los extractos de AcOEt de cada lote se particionaron entre Hx y AcN en proporción 3:1 por tres veces. Posteriormente las fases se separaron y se evaporaron hasta sequedad. Durante la evaporación de las fracciones de AcN se obtuvo un precipitado el cual se purificó por cristalización con An, obteniéndose el compuesto XVI (230 mg).

Compuesto XVI (Ergosta-5,7,22-trien-3-ol, ergosterol): cristales incoloros; pf. 150-152 °C; IR v_{max} (KBr) 3420 (O-H), 2930 (C-H), 1456 (CH₂ y CH₃) cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0.62 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, d, J =6.4 Hz, H-28), 0.84 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-27), 0.91 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-26), 0.94 (3H, s, H-19), 1.03 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-21), 3.64 (1H, m, H-1), δ 5.16 (1H, dd, J = 7.6 Hz, 15.3, H-22), 5.22 (1H, dd, J = 7.0, 15.3 Hz, H-23), 5.38 (1H, dd, J = 2.6, 5.4 Hz, H-7), 5.57 (1H, dd, J = 2.1, 5.4 Hz, H-6); IE-EM *m*/z (int. rel): 396 [M]⁺ (60), 363 (100), 337 (34), 253 (37), 207 (43), 157 (37), 143 (48), 69 (57), 55 (44).

IV.2.2.2 FRACCIONAMIENTO DE LA FASE DE ACETONITRILO POR COLUMNA CROMATOGRÁFICA EN PERMEACIÓN EN GEL

Las fracciones de AcN de cada lote se sub-fraccionaron de manera separada en una cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria Sephadex LH-20 y como eluyente MeOH de manera isocrática. Las dimensiones de la columna fueron de 2.2 cm de diámetro por 55 cm de

alto. Las sub-fracciones se analizaron por CCD y se reunieron de acuerdo a su similitud, obteniéndose nueve fracciones de MR-A, nueve de MR-B, ocho de MR-C y nueve de MR-D, respectivamente.

IV.2.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-TB DE LAS FRACCIONES DE GLIOCLADIUM SP. MR-41

Las fracciones y sub-fracciones se evaluaron frente a la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* en un rango de 100-1.56 µg/mL siguiendo la metodología descrita en el capítulo 3.

IV.2.4. ANÁLISIS DE LAS SUB-FRACCIONES ACTIVAS HPLC

Las sub-fracciones analizadas se disolvieron en MeOH grado HPLC (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) a una concentración de 1 mg/mL, posteriormente fueron filtradas a través de filtros Millipore de 0.45 µm. El análisis se realizó en un sistema HPLC de la marca Perkin Elmer Flexar equipado con una bomba binaria y un sistema de arreglo de diodos (Perkin Elmer, Inc., Waltham, MA, USA). La separación cromatográfica se realizó en una columna C-18, Alltima de 250 mm × 4.6 mm, 5 µm (Grace Davison Discovery Sciences, Deerfield, IL, USA). El volumen de inyección fue de 20 µL. Como fase móvil se empleó metanol (A) y agua. Los métodos utilizados se describen a continuación:

Método A: 0-0.5 min, 70% A (flujo: 0.7 mL/min); 0.5-4.5 min, 70% A (0.6); 4.5-8.5 min, 80% A (0.7); 8.5-12.5 min, 90% A (0.7); 12.5-32.5 min, 100% A (0.7).

Método B: 0-1.5 min, 65% A (1.0); 1.5-5.5 min, 70% A (1.0); 5.5-23.5 min, 75% A (1.0).

Método C: 0-2.5 min, 55% A (0.7); 2.5-6.5 min, 60% A (0.8); 6.5-36.5 min, 65% A (1.0); 36.5-56.5 min, 60% A (0.9).

La detección de los compuestos en los tres métodos se realizó a 300 nm.

IV.2.4 PURIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS DE LAS SUB-FRACCIONES MR-A5, MR-B4 Y MR-C5

Los mejores rendimientos se obtuvieron con las fracciones MR-A5, MR-B4 y MR-C5, las cuales presentaron un perfil similar en CCD; estas fracciones se reunieron para dar origen a la fracción MR con un peso de 1.25 g. La fracción MR se sometió a una CLV (Figura 51). Las dimensiones de la columna fueron de 2.7 cm de diámetro y 6 cm de alto, la elución de los componentes se realizó con Hx/CH₂Cl₂/MeOH en polaridad ascendente. Se colectaron 38 alícuotas de 25 mL cada una, que se reunieron de acuerdo a su similitud en CCD en 18 fracciones: MR-1 a MR-18.
IV.2.4.1 PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO XVII

La fracción MR-1 (180 mg) se sometió a una cromatografía en columna de tipo flash. Las dimensiones de la columna fueron de 1 cm de diámetro y 35 cm de alto, la elución de los componentes se realizó con mezclas de Hx/AcOEt en polaridad creciente. Se colectaron 138 alícuotas de 9 mL cada una, que por similitud en CCD se reunieron para dar origen a 8 sub-fracciones (MR-1A a MR-1H). En la fracción MR-1F se encontraba de forma pura el compuesto XVII (4 mg).

Compuesto XVII (8α-epidioxiergosta-6,22E-dien-3-ol, endoperóxido de ergosterol): cristales incoloros; pf. 180-182 °C; IR ν_{max} (KBr) 3358 (O-H), 2920 (C-H), 1460 (CH₂ y CH₃) cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0.81 (3H, s, H-18), 0.81 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-26), 0.82 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-27), 0.88 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-28), 0.99 (3H, d J = 6.6 Hz, H-21), 3.95 (1H, m, H-3), 5.13 (1H, dd, J = 8.2, 15.3 Hz, H-22), 5.21 (1H, dd, J = 7.48, 15.3 Hz, H-23), 6.24 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-6), 6.50 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-7).

IV.2.4.2 PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO XVIII

La fracción MR-9 (210 mg) se particionó entre AcOEt y agua en proporción 1:3. La fase orgánica se evaporó hasta sequedad obteniéndose la fracción MR-9A (86 mg) y la fase acuosa se liofilizó obteniéndose la fracción MR-9B (115 mg). De la fracción acuosa MR-9B se obtuvo el compuesto XVIII en forma pura.

Compuesto XVIII (1,6-diacetil-2,3,4,5-tetrahidroxihexano): sólido de color blanco; $[\alpha]^{D}_{25} = 0$ (c = 0.014, MeOH); pf. 126-128°C; IR v_{max} (KBr) 3328 (O-H), 1743 (C=O), 1234 (C-(C=O)-C), 1078 (C-O) cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 2.08 (3H, s, H-2), 3.79 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-5), 3.87 (1H, m, H-4), 4.17 (1H, dd, J = 6.0 Hz, 11.5, H-3a), 4.38 (1H, dd, J = 2.4, 11.5 Hz, H-3b); RMN-¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ 20.8, 67.9, 70.1, 70.4, 173.2.

IV.2.4.3 PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO XIX

La fracción MR-15 (83.2 mg) se disolvió en Ari y se obtuvo un precipitado, el cual se sometió a una purificación por cristalización con An para obtener el compuesto XIX en forma pura (10.1 mg).

Compuesto XIX (1,2,3,4,5,6-hexahidroxihexano, alitol): sólido de color blanco; $[\alpha]^{D}_{25} = 0$ (c = 0.006, MeOH); pf. 154-156 °C; IR v_{max} (KBr) 3282 (O-H), 1020-1083 (C-O) cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CD₃OD) \overline{o} 3.62 (1H, dd, J =

5.8, 10.9 Hz, H-1a), 3.69 (1H, m, H-2), 3.77 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-3), 3.81 (1H, dd, *J* = 3.4, 10.9 Hz, H-1b).



Figura 51. Diagrama de purificación de MR.

IV.2.5 PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO XX

La fracción MR-D8 (21 mg) se sometió a una cromatografía en columna por gravedad. Las dimensiones de la columna fueron de 1 cm de diámetro y 20 cm de alto, la elución de los componentes se realizó con CHCl₃ de manera isocrática. Se colectaron 21 alícuotas de 0.5 mL cada una, al final se reunieron en 4 sub-fracciones (MR-D-8-A-D) de acuerdo a su similitud en CCD. En la sub-fracción MR-D-8C se obtuvo el compuesto XX en forma pura (4.2 mg).

Compuesto XX (2-isopropil-5-benzofuranol): cristales incoloros; UV λ_{max} MeOH (log ϵ): 294 (6.31) nm, 250 (6.24) nm, 210 (6.17) nm; IR v_{max} (KBr) 3345 (O-H), 2964-2923 (C-H), 1619 (C=C aromático), 1454 (C=C aromático), 1195 (C-O), 794 (C-H aromático) cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.33 (6H, d, J = 6.9 Hz, H-9, H-10), 3.03 (1H, sept, J = 6.9 Hz, H-8), 6.26 (1H, s, H-3), 6.77 (1H, dd, J = 2.6, 8.7 Hz, H-6), 6.94 (1H, d, J = 2.6Hz, H-4), 7.24 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-7); RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 21.0 (C-9,C-10), 28.4 (C-8), 99.8 (C-3), 105.7 (C-4), 111.2 (C-6), 111.5 (C-7), 129.9 (C-3a), 149.7 (C-7a), 151.3 (C-5), 166.3 (C-2). IE-EM *m/z* (int. rel): 176 [M]⁺ (33), 161 (100).

IV.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.3.1 OBTENCIÓN DE FRACCIONES DE AcN

Los extractos de AcOEt obtenidos se prepurificaron por partición entre Hx y AcN. En la Tabla 21 se presentan las cantidades obtenidas para las fracciones de Hx y AcN de cada lote, así como el rendimiento de las fracciones de AcN.

Lote	Fracción	Fracción	Rendimiento
	Hx (g)	AcN (g)	p/p (%)
MR-A	7.34	0.51	6.37
MR-B	12.13	1.46	10.25
MR-C	10.99	1.67	12.68
MR-D	59.15	5.55	8.41

Tabla 21. Resultados de la partición de los cuatro lotes.

En general, las fracciones hexánicas fueron las mayoritarias y las de AcN con los componentes de mediana polaridad presentaron un rendimiento entre 6-12%.

De la evaluación de las fracciones de AcN de los lotes MR-A, MR-B y MR-C frente a la cepa sensible de M. tuberculosis (Tabla 22) únicamente la fracción MR-A presentó una potente actividad (MIC≤ 3.13 µg/mL), mientras que las fracciones MR-B (25 µg/mL) y MR-C (50 µg/mL) presentaron una moderada actividad anti-TB. Con el objetivo de biodirigir la purificación de los compuestos activos, la fracción MR-A se sometió a un fraccionamiento y posteriormente las sub-fracciones obtenidas se evaluaron frente a la cepa sensible de M. tuberculosis. Como se puede observar en la Tabla 23 las fracciones cinco, seis, siete, ocho y nueve son las que presentan actividad (<1.56-50 µg/mL). Las fracciones siete, ocho y nueve que resultaron ser las fracciones más activas (≤1.56 µg/mL) se analizaron por HPLC. Las fracciones siete y ocho (Figuras 52 y 53) resultaron complejas en cuanto al número de compuestos, además, éstos presentan una polaridad similar, lo que dificultó obtener un perfil que presente una buena separación de los mismos. Los compuestos mayoritarios de la fracción siete presentaron un T_R a 11.574, 12.074, 13.702 y 14.588 min, y los de la fracción ocho a 12.320, 14.548. 17.630 y 18.763 min. De manera interesante, el análisis de la fracción nueve (Figura 54) resultó en una fracción con tres compuestos mayoritarios con T_R a 17.588, 20.320 y 26.344 min, lo cual se puede corroborar en el perfil cromatográfico por CCD (Figura 55). Adicionalmente, los compuestos presentan una separación adecuada para ser purificados, sin embargo la limitante para lograr lo anterior fue el bajo rendimiento de la fracción debido a que se obtuvo una cantidad inferior a 5 mg.

de M. tuberculosis (MTbS).		
CMI (µg/mL)		
MTbS		
≤ 3.13		
25		
50		

 Tabla 22. Resultados de la actividad de los lotes frente a la cepa sensible de M. tuberculosis (MTbS).

 Tabla 23. Resultados de la actividad de las sub-fracciones de MR-A frente a la cepa sensible de M. tuberculosis (MTbS).

Fracción	CMI (µg/mL) MtbS
MR-A1	>50
MR-A2	>50
MR-A3	>50
MR-A4	>50
MR-A5	50
MR-A6	6.25
MR-A7	≤1.56
MR-A8	≤1.56
MR-A9	≤1.56





Figura 53. Cromatograma de HPLC de la fracción MR-A8 utilizando el método B.



método C.

Las fracciones activas se compararon por CCD con las fracciones obtenidas de MR-B y MR-C y como se observa en la Figura 55, los lotes MR-B y MR-C comparten algunos de los compuestos presentes en las sub-fracciones del lote MR-A, sin embargo, el rendimiento de las fracciones activas de MR-B y MR-C son inferiores en comparación con las de MR-A (datos en la Tabla 24).



Figura 55. Comparación en CCD de las sub-fracciones de los lotes MR-A, MR-B y MR-C.

Fracción	Rendimiento p/p (%)		
-	MR-A	MR-B	MR-C
1	17.57	3.70	0.36
2	12.63	7.82	0.76
3	15.53	14.87	3.17
4	18.86	59.35	5.92
5	13.36	3.87	85.02
6	9.36	6.2	2.66
7	4.86	4.27	0.24
8	6.41	0.27	0.23
9	1.12	0.27	-

Tabla 24. Resultados del fraccionamiento de MR-A, MR-B y MR-C.

La pérdida de la actividad de las fracciones de AcN obtenidas probablemente se debe a la cantidad de esporas inoculadas en el medio de arroz, ya que no se siembra un inóculo de concentración conocida de esporas. Se ha observado que la cantidad de esporas empleadas podría tener un efecto en el pH del medio de cultivo, y que éste a su vez podría influir en el metabolismo fúngico y, por consiguiente, en la producción de metabolitos activos. Estudios realizados en la cepa fúngica Arthrinium saccharicola, se observó que a medida que se acidificaba el medio de cultivo se incrementaba la actividad biológica (Miao et al., 2006). Sin embargo, en otros hongos como el Aspergillus nidulans la alcalinización del medio favorece el incremento de la producción de metabolitos antibacterianos como lo son las penicilinas (Espeso et al., 1993). Este cambio en el metabolismo de los hongos por influencia del pH podría deberse a un intento por compensar el pH del medio, produciendo compuestos ácidos en medios de cultivo alcalinos y viceversa (Miao et al., 2006).

Un inóculo excesivo de esporas también podría ocasionar una baja disponibilidad de nutrientes y agua. Este efecto parece favorecer la producción de ciertos metabolitos secundarios, como lo observado en el hongo *Phoma* sp. que incrementa la producción de escualestatina S1 en condiciones de estrés de agua y nutrimentos (Aldred *et al.*, 2001). Por otra parte, el inocular una menor cantidad de esporas podría favorecer la disponibilidad de los nutrientes. En cierto hongos es necesario un abastecimiento adecuado de carbono y nitrógeno para estimular la producción de compuestos activos (Miao *et al.*, 2006).

Se han realizado estudios donde se mide la influencia del tamaño de inóculo de esporas en la producción de compuestos de interés farmacológico, como el reportado para *Aspergillus terreus* en donde se observó que un inóculo mayor de esporas favorece la producción del ácido mevinolínico el cual es transformado a lovastatina, un compuesto natural utilizado para el tratamiento de la hipercolesterolemia. Sin embargo, en especies del género *Monascus* la cantidad de esporas inoculadas en el medio de cultivo produjo efectos para ciertos compuestos como la monacolina K, el incremento del inóculo favorece la producción de éste, pero en el caso del ácido γ-aminobutírico no provocó ningún efecto significativo (Yuan-Chi *et al.*, 2003). Es de especial interés realizar la estandarización del cultivo de la cepa de *Gliocladium* sp. MR41 en cuanto a la cantidad de inóculo empleado y otros factores como temperatura, pH, cantidad de nutrientes para incrementar la cantidad de los compuestos activos para su posterior purificación.

Debido a que se obtuvieron cantidades mínimas de las fracciones activas, se realizó el cultivo de un lote adicional denominado MR-D. Al someter la fracción de AcN del lote MR-D a la columna en permeación en gel se obtuvieron nueve sub-fracciones (Figura 56). Sin embargo, las últimas subfracciones que presentan similitud con las activas, desafortunamente, al igual que los lotes anteriores, se obtuvieron en cantidades mínimas, además presentan una mayor complejidad en cuanto al número de componentes por CCD. A pesar de esto se logró la purificación de un compuesto de la fracción MR-D-8.



Figura 56. CCD de las sub-fracciones del lote MR-D.

A continuación se describen los compuestos purificados del hongo *Gliocladium sp.* MR41.

IV.3.2 COMPUESTO XVI (ERGOSTA-5,7,22-TRIEN-3-OL, ERGOSTEROL)

El compuesto XVI (70, 230 mg) se obtuvo como cristales incoloros solubles en CHCl₃ v An con un R₆ de 0.55 en el sistema CHCl₃/MeOH 95:5. El compuesto XVI se analizó por RMN-1H (Figura 57) y presentó seis señales para metilos a δ 0.62 (s), δ 0.82 (d, J = 6.4 Hz), δ 0.84 (d, J = 6.4 Hz), δ 0.91 (d, J = 6.8 Hz), $\delta 0.94$ (s) v $\delta 1.03$ (d, J = 6.6 Hz); una señal de un protón de carbono base de alcohol (C-OH, IR = 3420 cm⁻¹) a δ 3.64 (m); dos señales correspondientes a un doble enlace con isomería E a δ 5.16 (dd, J = 7.6, 15.3 Hz) y 5.22 (dd, J = 7.0, 15.3 Hz); y adicionalmente dos señales de protones vinílicos a δ 5.38 (dd, J = 5.4, 2.6 Hz) y 5.57 (dd, J = 5.4, 2.6 Hz) (figura 45). Los datos de RMN-¹H sugieren que el compuesto XVI corresponde a un esterol. En el análisis de CG-EM presentó un T_R de 22.33 min con un ion molecular de m/z de 396.4, v fragmentos m/z de 378 [M - $H_2O]^+$, 363 $[M - H_2O - CH_3]^+$, 337 $[M - C_3H_7O]^+$, 271 $[M - C_9H_{17}]^+$ y 253 $[M - C_9H_{17}]^+$ y 253 [M $C_{0}H_{17} - H_{2}Ol^{+}$ (Figura 58). Los datos fueron comparados con lo reportado en la literatura (Tabla 25) y el compuesto XVI correspondió al ergosta-5,7,22-trien-3-ol comúnmente conocido como ergosterol. Este compuesto ha presentado una actividad moderada sobre la línea celular de leucemia promielocítica HL-60 (Matsuda et al., 2009). En otro estudio el ergosterol se evaluó sobre una cepa sensible de M. tuberculosis sin respuesta alguna de actividad (Kanokmedhakul et al., 2002).



Figura 57. Estructura y espectro de RMN-¹H del ergosterol. Señales obtenidas a 400 MHz en CDCl₃.



Figura 58. EM del ergosterol y sus fragmentos m/z característicos.

	Compuesto XVI (400 MHz, CDCI ₃)	ergosterol (400 MHz, CDCl ₃)
3	3.64 (1H, m)	3.63 (1H, m)
6	5.57 (1H, dd, 5.4, 2.6)	5.56 (1H, dd, 5.8, 2.6)
7	5.38 (1H, dd, 5.4, 2.6)	5.38 (1H, m)
18	0.62 (3H, s)	0.62 (3H, s)
19	0.94 (3H, s)	0.94 (3H, s)
21	1.03 (3H, d, 6.6)	1.04 (3H, d, 6.6)
22	5.16 (1H, dd, 7.6, 15.3)	5.17 (1H, m)
23	5.22 (1H, dd, 7.0, 15.3)	5.21 (1H, m)
26	0.91 (3H, d, 6.8)	0.90 (3H, d, 6,8)
27	0.84 (3H, d, 6.4)	0.84 (3H, d, 7.0)
28	0.82 (3H, d, 6.4)	0.82 (3H, d, 6.9)

Tabla 25. Comparación de los datos de RMN-¹H (H, m, J = Hz) del compuesto XVI con los reportados para ergosterol (Haque et al., 2004).

IV.3.3 COMPUESTO XVII (5α,8α-EPIDIOXIERGOSTA-6,22E-DIEN-3-OL, ENDOPERÓXIDO DE ERGOSTEROL)

El compuesto XVII (71, 4 mg) se obtuvo como cristales incoloros solubles en CHCl₃ v An con un R_f de 0.45 en el sistema de disolventes CHCl₃/MeOH 95:5. En el espectro de RMN-¹H (Figura 59) se observan seis señales para metilos a δ 0.81 (3H, s), δ 0.81 (3H, d, J = 6.6 Hz), δ 0.82 (3H, d, J = 6.6 Hz), δ 0.88 (3H, s), δ 0.90 (3H, d, J = 6.8 Hz) y δ 0.99 (3H, d J = 6.6 Hz); una señal a δ 3.95 (1H, m) característica del protón de un carbono base de alcohol (C-OH, IR = 3358 cm⁻¹); v cuatro señales de protones vinílicos a δ 5.13 (1H, dd, J = 8.2, 15.3 Hz), δ 5.21 (1H, dd, J = 7.4, 15.3 Hz), 6.24 (1H, d, J = 8.5 Hz) y 6.50 (1H, d, J = 8.5 Hz). Los datos de RMN-¹H obtenidos sugieren que el compuesto XVII es un derivado del ergosterol. Las diferencias más significativas de los datos obtenidos para el compuesto XVII con respecto a los del ergosterol son el desplazamiento a campo bajo de dos de los protones vinílicos, adicionalmente, estos protones presentan un acoplamiento con J de 8.5 Hz dato característico de los protones de un doble enlace con isomería Z. Estos datos (Tabla 26) sugirieron que el compuesto podría ser el endoperóxido de ergosterol. Para confirmar la identidad del compuesto se le determinó el punto de fusión el cual 5a.8a-epidioxiergosta-6.22E-dien-3-ol comúnmente correspondió al conocido como endoperóxido de ergosterol. Este compuesto se ha aislado de una gran cantidad de hongos, sin embargo, podría ser un artefacto formado a partir de la oxidación del ergosterol por efecto de la luz v el oxígeno (Iwashima et al., 2002). El endoperóxido de ergosterol ha presentado actividad citotóxica sobre las líneas celulares de cáncer de pulmón humano (A-549), cáncer de colon humano (HCT-15), cáncer de sistema nervioso central (XF-498), cáncer de piel humano (SK-MEL-2) y cáncer de ovario humano (SK-OV-2) en un rango de 15.81-9.76 µg/mL (Cheol-Kwon et al., 2002). Tambien se ha observado que este compuesto tiene la capacidad de inhibir a la ADN topoisomerasa l a concentraciones de 100 µg/mL (Yang-Kuo, et al., 2005). Cabe mencionar que este compuesto se ha evaluado sobre la cepa sensible de M. tuberculosis, encontrándose que presenta una potente actividad con un valor de CMI = 1 µg/mL (Cantrell. et al., 1999).



Figura 59. Estructura y espectro de RMN-¹H del endoperóxido de ergosterol. Señales obtenidas a 400 MHz en CDCl₃.

	Compuesto XVII (400 MHz, CDCI ₃)	endoperóxido de ergosterol (400 MHz, CDCI ₃)
3	3.95 (1H, m)	3.94 (1H, m)
6	6.24 (1H, d, 8.5)	6.22 (1H, d, 8.4)
7	6.50 (1H, d, 8.5)	6.48 (1H, d, 8.4)
18	0.81 (3H, s)	0.80 (3H, s)
19	0.88 (3H, s)	0.87 (3H, s)
21	0.99 (3H, d, 6.6)	0.98 (3H, d, 6.6)
22	5.13 (1H, dd, 8.2, 15.3)	5.11 (1H, m)
23	5.21 (1H, dd, 7.4, 15.3)	5.23 (1H, m)
26	0.81 (3H, d, 6.6)	0.80 (3H, d, 6,6)
27	0.82 (3H, d, 6.6)	0.82 (3H, d, 6.3)
28	0.90 (3H, d, 6.8)	0.89 (3H, d, 6.6)

Tabla 26. Comparación de los datos de RMN- ^{1}H (H, m, J = Hz) del compuesto XVII con los reportados para endoperóxido de ergosterol (Joo-Sang et al. 2008)

IV.3.4 COMPUESTO XVIII (1,6-DI-O-ACETIL-2,3,4,5-TETRAHIDROXI-HEXANO)

El compuesto XVIII (72, 115 mg) en su espectro de RMN-¹H (Figura 60) se observan cuatro señales de protones unidos a carbonos oxigenados (δ 3.79. 3.87, 4.17 y 4.38) y una señal a δ 2.08 (s) característica de un metilo unido a un grupo carbonilo de tipo éster; este dato se confirmó en el espectro de RMN-¹³C (δ 20.8, CH₃ y δ 173.2) e IR (1743 cm⁻¹, C=O) del compuesto. Adicionalmente, el espectro de RMN-13C (CD3OD) mostró tres señales de carbonos oxigenados (δ 67.9, 70.1 v 70.4). Los datos sugerían que el compuesto XVIII presentaba cinco carbonos, sin embargo la integración de las señales de protón sugerían siete hidrógenos unidos a carbonos. El número impar de hidrógenos estableció que únicamente se estaban observando señales de la mitad de la molécula en sus espectros de RMN de ¹H v ¹³C debido a que es simétrica. Los datos sugieren que el compuesto corresponde al 1,6-di-O-acetil-2,3,4,5-tetrahidroxi-hexano. El compuesto 1,6-di-O-acetil-2,3,4,5-tetrahidroxi-hexano presenta cuatro centros quirales, lo que representa que existen 16 isómeros, pero únicamente se ha reportado el 1,6-di-O-acetil-galactitol. Al compuesto XVIII se le determinó la rotación óptica y el punto de fusión, se observó que es ópticamente inactivo, dato similar al 1.6-di-O-acetil-galactitol, sin embargo, el punto de fusión no correspondió, por lo que el compuesto XVIII corresponde a un nuevo isómero del 1,6-di-O-acetil-2,3,4,5-tetrahidroxi-hexano.



Figura 60. Estructura y espectro de RMN-¹H del 1,6-di-O-acetil-2,3,4,5tetrahidroxi-hexano. Señales obtenidas a 400 MHz en CD₃OD.

IV.3.5 COMPUESTO XIX (1,2,3,4,5,6-HEXAHIDROXI-HEXANO, ALITOL)

El compuesto XIX (73, 10.1 mg) presentó en su espectro de RMN-¹H (Figura 61) señales similares al compuesto XVIII, previamente descrito. Se observan cuatro señales de protones unidos a carbonos oxigenados (5 3.62, 3.69. 3.77 y 3.81), datos similares al compuesto XVIII, sin embargo el compuesto XIX no presenta los grupos metilo. Estos datos sugieren que el compuesto XIX es un derivado del compuesto XVIII sin los grupos acetilo, por lo que debe corresponder al 1,2,3,4,5,6-hexahidroxihexano. Este compuesto al igual que el compuesto XVIII presenta cuatro centros quirales y por lo tanto 16 isómeros. El compuesto fue ópticamente inactivo y presentó un punto de fusión de 154-156 °C, estos datos se compararon con lo reportado en la literatura y corresponden al alitol. Este compuesto se ha aislado previamente del hongo Tylopilus plumbeoviolaceus (Shao-Hua et al., 2000). El alitol es conocido como un azúcar no cíclico, su abundancia en la naturaleza es escasa lo cual lo convierte en un producto costoso. Se obtiene purificándolo de Iteailcifolia o Himanthalia elongate (Oosaka, 2009). El alitol se utiliza como materia prima para la preparación de D-psicosa, la cual es usada como edulcorante de productos dietéticos, además de utilizarse como un agente neuroprotector (Takeshita *et al.*, 2000; Poonperm *et al.*, 2007; Gullapalli *et al.*, 2007)



Figura 61. Estructura y espectro de RMN-¹H del alitol. Señales obtenidas a 400 MHz en CD₃OD.

IV.3.6 COMPUESTO XX (2-ISOPROPIL-5-BENZOFURANOL)

El compuesto XX (79, 4.2 mg) se obtuvo como cristales incoloros solubles en CHCl₃ y An, con un Rf de de 0.55 en el sistema CH₂Cl₂/MeOH 95:5. En el análisis de CG-EM presentó un T_R de 7.04 min con un ion molecular de m/z 176.1. Al analizar su espectro de RMN-¹H (Figura 62) se observan únicamente seis señales, tres de ellas corresponden a protones aromáticos con acoplamiento orto y meta a δ 6.77 (1H, dd, J = 2.6, 8.7 Hz), 6.94 (1H, d, J = 2.6 Hz) y 7.24 (1H, d, J = 8.6 Hz); estas señales junto con la absorción de UV máxima a 210, 250 y 294 nm indican la presencia de un anillo de benzofurano (Toyoda et al., 2005). Otra de las señales a δ 6.26 (1H, s) indican la presencia de un protón vinílico en el anillo de benzofurano. Estos datos sugieren que el compuesto XX es un anillo de benzofurano disustituido. Uno de los sustituyentes corresponde a una unidad de isopropilo, este dato se corrobora con las señales a δ 1.33 (6H, d, J = 6.9 Hz) y δ 3.03 (1H, sept. J = 6.9 Hz). En el espectro de RMN-¹³C (Figura 63) se observan las señales de la unidad de isopropilo a δ 21.0 y 28.4; la señal del carbono vinílico a δ 99.8; los tres metinos aromáticos a δ 105.7, δ 111.2 y δ 111.5; un carbono vinílico oxigenado y un carbono aromático cuaternario a δ 129.9 y δ 149.77 respectivamente: así como dos carbonos aromáticos oxigenados, uno correspondiente al anillo de benzofurano a δ 151.3 v otro característico de un carbono aromático unido a un hidroxilo a δ 166.3, lo cual sugiere que el otro sustituyente del anillo es un hidroxilo, dato que se confirma con la señal a 3345 cm⁻¹ (O-H) del espectro de IR. Con los datos previamente descritos el compuesto XX corresponde al 2-isopropil-5benzofuranol, un nuevo producto natural. Se han descrito estructuras similares (Figura 64), como dos compuestos aislados de una especie fúngica del género Acremonium, la acremina D (74) y E (75) y tres compuestos aislados de las raíces de Zanthoxylum wutaiense, el 7metoxianodendroato (76), 7-metoxiwutaifuranal (77) y wutaiensal (78) (Assante et al., 2005; Huang et al., 2008).





Figura 64. Derivados naturales del 2-isopropil-5-benzofuranol.

IV.4 CONCLUSIONES

1) De la evaluación anti-TB de las fracciones de AcN de los lotes MR-A, MR-B y MR-C, sólo MR-A resultó con importante actividad sobre la cepa sensible de *M. tuberculosis* (CMI \leq 3.13 µg/mL)

2) De la evaluación de las sub-fracciones de la fracción de MR-A resultaron activas la fracciones MR-A6, MR-A7, MR-A8 y MR-A9 (CMI = 6.25, ≤ 1.56 , ≤ 1.56 , ≤ 1.56 , ≤ 1.56 µg/mL, respectivamente). Sin embargo, el rendimiento de estas fracciones es muy bajo para purificar los compuestos responsables de la actividad anti-TB.

3) Las sub-fracciones MR-A7, MR-A8 y MR-A9 se analizaron por HPLC. Las fracciones MR-A7 y MR-A8 fueron complejas en cuanto al número de compuestos y presentaron una pobre separación entre los mismos. Por otra parte, la fracción MR-A9 presentó tres compuestos mayoritarios con una separación adecuada para su posterior purificación con T_R de 17.588, 20.320 y 26.344 min.

3) Por otro lado, se purificaron cinco compuestos a partir de las subfracciones MR-A5, MR-B4, MR-C5 y MR-D8, los cuales correspondieron a:

- el 2-isopropil-5-benzofuranol, un nuevo producto natural.
- el ergosterol y su endoperóxido previamente aislados de una gran cantidad de especies fúngicas.
- el 1,6-di-O-acetil-2,3,4,5-tetrahidroxihexano, un nuevo estereoisómero.
- y el alitol aislado por primera vez del género Gliocladium.

IV.5 REFERENCIAS

- Aldred, D., N. Magan and B. Lane (1999). Influence of water activity and nutrients on growth and production of squalestatin S1 by a *Phoma sp.* Journal of Applied Microbiology, 87, 842-848.
- Assante, G., S. Dallavalle, L. Malpezzi, G. Nasini, S. Burruanod and L. Torta (2005). Acremines A–F, novel secondary metabolites produced by a strain of an endophytic Acremonium, isolated from sporangiophores of *Plasmopara viticola* in grapevine leaves. Tetrahedron, 61, 7686-7692.
- Cantrell, C., M. Rajab, S. Franzblau, F. Fronczek and N. Fischer (1999) Antimycobacterial ergosterol-5,8-endoperoxide from *Ajuga remota*. Planta Medica, 65, 732-734.
- Cheol-Kwon, H., S. Deuk-Zee, S. Yun-Cho, S. Un-Choi and K. Ro-Lee (2002). Cytotoxic ergosterols from *Paecilomyces* sp. J300. Archives of Pharmacal Research, 25, 851-855.
- Chu, M., I. Truumees, M. L. Rothofsky, M. G. Patel, F. Gentile, P. R. Das and M. S. Puar (1995). Inhibition of *c-fos* proto-oncogene induction by Sch 52900 and Sch 52901 novel diketopiperazines produced by *Gliocladium* sp. The Journal of Antibiotics, 48, 1440-1445.
- Espeso, E., J. Tilburn, H. Arst and M. Pehalval (1993). pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. The EMBO Journal, 12, 3947-3956.
- Gullapalli, P., G. Takata, W. Poonperm, D. Rao, K. Morimoto, K. Akimitzu, S. Tajima and K. Izumoni (2007). Bioproduction of d-psicosa from allitol with *Enterobacter aerogenes* IK7: a new frontier in rare ketosa production. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 71, 3048-3054.
- Haque, A., S. Hossain, R. Rahman, S. Hossain, M. Mosihuzzaman, N. Nilufar and S. I. Khan (2005). Isolation of bioactive secondary metabolites from the endophytic fungus of *Ocimum basilicum*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 4, 127-130.
- Huang, Y. F., I. Tiam, H. M. Hua and Y. H. Pei (2007). Two diketopiperazines from marine fungus *Gliocladium* sp. YUP08. Journal of Asian Natural Products Research, 9, 197–201.
- Huang, H. I., T. Ishikawa, C. F. Peng, I. L. Tsai and I. S. Chem (2008). Constituents of the root wood of *Zanthoxylum wutaiense* with antitubercular activity. Journal of Natural Products, 71, 1146-1151.
- Itoh, Y., K. Kodama, K. Furuya, S. Takahashi, T. Haneishi, Y. Takiguchi and M. Arai (1980). A sesquiterpene antibiotic, heptelidic acid producing organisms, fermentation, isolation and characterization. The Journal of Antibiotics, 33, 468-473.
- Iwashima, M., I. Terada, K. Iguchi and T. Yamori (2002). New biologically active marine sesquiterpenoid and steroid from the Okinawan sponge

of the *genus Axinyssa*. Chemical Pharmaceutical Bulletin, 50, 1286-1289.

- Joo-Sang, L., M. Chao-Mei, P. Dong-Ki, Y. Yasuharu, H. Minoru and H. Masao (2008). Transformation of ergosterol peroxide to cytotoxic substances by rat intestinal bacteria. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 31, 949-954.
- Kanokmedhakul, S., K. Kanokmedhakul, N. Phonkerd, K. Soytong, P. Kongsaeree and A. Suksamrarn (2002). Antimycobacterial anthraquinone-chromanone compound and diketopiperazine alkaloid from the fungus *Chaetomium globosum* KMITL-N0802. Planta Medica, 68, 834-836.
- Matsuda, H., J. Akaki, S. Nakamura, Y. Okazaki, H. Kojima, M. Tamesada and M. Yoshikawa (2009). Apoptosis-inducing effects of sterols from the dried powder of cultured mycelium of *Cordyceps sinensis*. Chemical Pharmaceutical Bulletin, 57, 411-414.
- Miao, L., T. Kwong and P. Qian (2006). Effect of culture conditions on mycelial growth, antibacterial, and metabolite profiles of the marinederived fungus *Arthtinium c.f. sacchaticoloa*. Applied Microbiology and Biotechnology, 72, 1063–1073.
- Nilanonta, C., M. Isaka, P. kitakoop, P. Palittapongampim, S. Kamchonwongpaisan, D. Pittayakhajonwut, M. Tanticharoen and Y. Thebtaranonth (2000). Antimycobacterial and antiplasmodial cyclodepsipeptides from the insect pathogenic fungus *Paencilomyces tenuipes* BCC 1614. Planta Medica, 66, 756-758.
- Nilanonta, C., M. Isaka, R. Chanphen, N. Thong, M. Tanticharoen and Y. Thebtaranonth (2003). Unusual enniatins produced by the insect pathogenic fungus *Verticillium hemiptengenum*: isolation and studies on precursor-directed biosynthesis. Tetrahedron, 59, 1015-1020.
- Omura, S. N. Arai, Y. Yamaguchi, R. Masuma, Y. Wai, M. Namikoshi, A. Turberg, H. Kolbl and K. Shiomi (2000). Argifin, a new chitinase inhibitor, produced by *Gliocladium* sp. FTD-0668. Taxonomy, fermentation and biological activities. The Jounal of Antibiotics, 53, 603-608.
- Oosaka, K (2009). Possibility as monosaccharide laxative of rare sugar alcohols. The Pharmaceutical Society of Japan, 129, 575-580.
- Poonperm, W., G. Takata, Y. Ando, V. Sahachaisaree, P. Lumyong, S. Lumyong and K. Izumori (2007). Efficient conversion of allitol to d-psicose by *Bacillus pallidus* Y25. Journal of Bioscience and Bioengineering, 103, 282-285.
- Ren, H. L. Tian, Q. Gu and W. Zhu (2006). Secalonic acid D; A cytotoxic constituent from marine lichen-derived fungus *Gliocladium* sp. T31. Archives of Pharmacal Research, 29, 59-63.
- Shao-Hua, W., L. Xiao-Dong, M. Yun-Bao, L. Ji-Kai, W. Da-Gang, Z. Bing, L. Yang and Z. Qi-Tai (2000). Two novel secoergosterols from the

fungus *Tylopilus plumbeoviolaceus*. Journal of Natural Products, 63, 534-536.

- Takeshita, K., Y. Ishima, G. Takada and K. Izumori (2000). Direct production of allitol from d-fructose by a coupling reaction using d-tagatose 3epimerase, ribitol dehydrogenase and formate dehydogenase. Journal of Bioscience and Bioengineering, 90, 545-548.
- Toyoda, K., Y. Yaoita and M. Kikuchi (2005). Three new dimeric benzofuran derivatives from the roots of *Ligularia stenocephala* Matsum. et KOIDZ. Chemical Pharmaceutical Bulletin, 53, 1555-1558.
- Yang Kuo, L. M., K. Y. Chen, S. Y. Hwang, J. L. Chen, Y. Y. Liu, C. C. Liaw P. H. Ye, C. J. Chou, C. C. Shen and Y. H. Kuo (2005). DNA topoisomerase I inhibitor, ergosterol peroxide from *Penicillium* oxalicum. Planta Medica, 71, 77-79
- Yuan-Chi, S., W. Jyh-Jye, L. Tzu-Tsen and P. Tzu-Ming (2003). Production of the secondary metabolites γ-aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology., 30, 41-46.

Conclusiones generales

- A partir del extracto hexánico activo de la corteza de tallo de *Diospyros* anisandra se obtuvieron un nuevo compuesto natural, el epóxido de zeylanona, y 14 compuestos previamente descritos: plumbagina, maritinona, 3,3'-biplumbagina, chitranona, droserona, *cis*isoshinanolona, eliptinona, lupeol, betulina, aldehído de betulina, ácido betulínico, 4(15), 5E, 10(14)-germacratrien-1β-ol, teucdiol A y selin-4(15)-en-1β,11-diol. De este modo se contribuye con el conocimiento fitoquímico de la especie *D. anisandra* de la cual no existen reportes previos.
- De la evaluación de los compuestos obtenidos de *D. anisandra* sobre las cepas sensible (H37Rv) y resistente (CIBIN-UMF 15:99) de *M. tuberculosis* únicamente plumbagina, maritinona, 3,3'-biplumbagina, epóxido de zeylanona, chitranona y aldehído de betulina resultaron activos, lo cual confirma que estos compuestos son los responsables de la actividad anti-TB detectada inicialmente en el extracto hexánico de la corteza de tallo de *D. anisandra.*
- De la evaluación de los compuestos sobre células Vero y un cultivo primario de células adherentes humanas, los compuestos maritinona y 3,3'-biplumbagina resultaron inocuos sobre ambos tipos de células, confirmando el potencial de estos dos compuestos para en un futuro ser una alternativa para el tratamiento de personas infectadas con TB, incluso TB-MDR.
- Las fracciones de acetonitrilo de *Gliocladium* sp. presentaron una amplia variabilidad de actividad sobre la cepa sensible de *M. tuberculosis*. De las cuatro fracciones obtenidas únicamente una presentó importante actividad anti-TB, de la cual derivaron cuatro subfracciones activas, mismas que no pudieron ser purificadas por la escasa cantidad obtenida.
- El estudio químico de las fracciones de acetonitrilo de *Gliocladium* sp. conllevó al aislamiento de un nuevo compuesto natural, 2-isopropil-5-benzofuranol, un nuevo estereoisómero del 1,6-di-O-acetil-2,3,4,5 tetrahidroxihexano y los compuestos previamente descritos: alitol, ergosterol y endoperóxido de ergosterol. Los estudios químicos de hongos microscópicos y en particular del género *Gliocladium* son escasos, con los resultados obtenidos se contribuye en gran medida al conocimiento de compuestos producidos por especies de este género.

PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados biológicos obtenidos del estudio de *D. anisandra* queda en evidencia el potencial de las naftoquinonas diméricas maritinona y 3,3'-biplumbagina para su uso como modelos para el diseño de nuevos fármacos anti-TB. Estos dos compuestos presentaron un adecuado índice de seguridad sobre dos tipos de células, sin embargo, es necesario realizar ensayos anti-TB en un modelo *in vivo* para demostrar la completa eficacia de ambas moléculas. Adicionalmente, es de interés realizar modificaciones químicas a ambas moléculas con el fin de potenciar su actividad anti-TB.

Respecto al estudio químico-biológico del hongo *Gliocladium* sp. MR41, en el presente trabajo se describe la estrategia experimental para la obtención de los compuestos anti-TB de la fracción de acetonitrilo activa, sin embargo, es necesario estandarizar el cultivo de la cepa fúngica para establecer las condiciones óptimas para obtener fracciones activas sobre *M tuberculosis* y que además presenten cantidades adecuadas para su posterior purificación e identificación estructural.