



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**"ESTUDIO QUÍMICO Y BIOLÓGICO DE  
*Aristolochia elegans*"**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

**MÓNICA ADELINA LUNA MOLINA**



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

<b>PRESIDENTE:</b>	Profesor:	María Isabel Aguilar Laurents
<b>VOCAL:</b>	Profesor:	Rachel Mata Essayag
<b>SECRETARIO:</b>	Profesor:	Ma. Adelina Jiménez Arellanes
<b>1er. SUPLENTE:</b>	Profesor:	José Fausto Rivero Cruz
<b>2º SUPLENTE:</b>	Profesor:	Isabel del Carmen Rivero Cruz

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales/ Hospital de Pediatría IMSS/ Centro Médico Nacional Siglo XXI

**ASESOR DEL TEMA:** Dra. Ma. Adelina Jiménez Arellanes

**SUPERVISOR TÉCNICO:** M. en C. Rosalba León Díaz

**SUSTENTANTE:** Mónica Adelina Luna Molina

## **AGRADECIMIENTOS**

- ☞ A la jefa de la UIM-FPN, Dra. Mariana Meckes Fisher, por permitirme llevar a cabo la realización experimental del presente trabajo en la unidad de investigación
- ☞ A la Dra. María Adelina Jiménez Arellanes por todo el apoyo brindado, los consejos, el asesoramiento, las revisiones y el tiempo dedicado a este trabajo de tesis, así como por permitirme formar parte de su grupo de trabajo
- ☞ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca parcial otorgada (Nº IdAP 12015) para realizar el trabajo de Licenciatura mediante el proyecto 48339-M
- ☞ Al Fondo de Fomento e Investigación del IMSS (FOFOI-IMSS 2006/IA)/I/053) y al CONACYT (proyecto 48339-M) por el financiamiento otorgado a los proyectos
- ☞ A la M. en C. Rosalba León Díaz y al M. en C. Jorge Cornejo Garrido, por la asesoría en la determinación de estudios toxicológicos
- ☞ A mis compañeros y amigos de laboratorio: Arlene, Claudia, David, Edgar, Ileana, Jorge, Jovani, Martita, Nayeli, Omar, Rosalba, Tere, por todas las experiencias agradables compartidas
- ☞ A los miembros del jurado:
  - Dra. María Isabel Aguilar Laurents
  - Dra. Rachel Mata Essayag
  - M. en C. José Fausto Rivero Cruz
  - M. en C. Isabel del Carmen Rivero Cruz

Ya que con sus observaciones, comentarios, sugerencias y tiempo dedicado a la revisión de este trabajo permitieron el enriquecimiento del mismo

- ☞ A la Universidad Nacional Autónoma de México, la Facultad de Química y a mis profesores quienes me han forjado como una profesional en mis estudios de licenciatura

## **DEDICATORIAS**

### **A DIOS**

Por ser el pilar fundamental de mi vida, gracias por darme la VIDA y la CAPACIDAD para lograr una de mis más grandes metas, gracias por llenar mi vida de AMOR a través de mis seres queridos, gracias por darme la FE y la FORTALEZA en los momentos más difíciles, gracias por ayudarme a enfrentar mis miedos con VALOR y DECISIÓN, gracias por llenarme de PACIENCIA en los momentos de desesperanza... te debo TODO, que sencillamente no hay palabras que logren expresar mi inmenso agradecimiento y amor.

### **A mis padres**

Como un testimonio de mi amor y eterno agradecimiento por su apoyo, guía, amor y comprensión invaluable que me han brindado a lo largo de mi vida. GRACIAS por todo mamá y papá, por la lucha, esfuerzo, constancia, determinación, entrega, humildad que siempre me han enseñado a tener frente a la vida.

Los quiero con todo mi corazón y este trabajo que me exigió tanto esfuerzo es para ustedes, por ser la más chica de sus hijas aquí esta lo que ustedes me brindaron, solamente les estoy devolviendo en pequeña medida lo que ustedes me han dado durante toda su vida. Para ustedes con profundo cariño, respeto y admiración.

### **A mi hermana Tere**

Porque tu presencia en mi vida representa una verdadera alegría y bendición en todo momento, eres un gran ejemplo para mí, GRACIAS por cuidarme, por apoyarme, por comprenderme, por aconsejarme, por enseñarme a sonreírle a la vida, en fin, por todas las hermosas e insustituibles experiencias de vida que juntas hemos compartido y porque ahora puedo disfrutar contigo la inmensa alegría de tu nueva familia (Adán y Mario). Mi niña hermosa, recuerda siempre que puedes contar conmigo.

### **A Mario**

Le doy gracias a DIOS por ponerte en mi camino, muchas gracias por estos dos años compartidos, en los cuales hemos vivido tantas cosas hermosas, hemos pasado tantas adversidades que nos han hecho crecer y mejorar, GRACIAS por compartir conmigo la belleza de tu alma, por enseñarme diferentes maneras de ver y disfrutar la vida, por caminar a mi lado y demostrarme tu amor, apoyo, comprensión, alegría y tantas

cosas más. Me siento muy feliz de poder compartir contigo este gran momento, recuerda siempre lo importante que eres para mí.

### **A mi familia y amigos**

Muchas gracias por estar conmigo en todo este tiempo donde he vivido momentos felices y tristes; gracias a mi familia por sus sabios consejos y palabras de aliento que me hicieron crecer como persona, a todos mis amigos por brindarme su amistad fiel y sincera, por formar y compartir conmigo una parte muy importante de mi vida y permitirme formar parte de la suya, a todos ustedes, gracias por todos los momentos inolvidables y recuerden que siempre los llevaré en mi corazón.

*Aunque pase por el más oscuro de los valles,  
no temeré peligro alguno,  
porque tú, Señor, estás conmigo;  
tu vara y tu bastón me inspiran  
confianza.  
Salmo 23; 4*

# ÍNDICE

☞ <b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>7</b>
☞ <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
☞ <b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>11</b>
I. TUBERCULOSIS A NIVEL MUNDIAL.....	11
II. EL PROBLEMA DE LA TUBERCULOSIS MULTIFARMACORRESISTENTE Y EXTREMADAMENTE FARMACORRESISTENTE .....	13
III. ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS .....	19
IV. BÚSQUDA DE NUEVOS FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS.....	22
V. LAS PLANTAS MEDICINALES COMO FUENTE DE COMPUESTOS ANTITUBERCULOSOS.....	29
VI. ANTECEDENTES BOTÁNICOS DEL GÉNERO ARISTOLOCHIA.....	36
VII. USOS DENTRO DE LA MEDICINA TRADICIONAL Y ANTECEDENTES QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DE <i>A. ELEGANS</i> .....	36
☞ <b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>40</b>
☞ <b>OBJETIVOS GENERALES</b> .....	<b>41</b>
☞ <b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>41</b>
☞ <b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>42</b>
I. MATERIAL VEGETAL .....	42
II. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO .....	42
III. FRACCIONAMIENTO QUÍMICO .....	42
<i>III.1 FRACCIONAMIENTO PRIMARIO DEL EXTRACTO CRUDO</i> .....	42
<i>III.2 FRACCIONAMIENTO SECUNDARIO DE LA FRACCIÓN AE14</i> .....	44
IV. PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO 9-7H .....	45
V. PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO 9-7I .....	48
VI. ENRIQUECIMIENTO DEL COMPUESTO 9-7I .....	51
VII. OBTENCIÓN DEL ESTIGMASTAN-3,5-DIENO Y EUPOMATENOIDE 1.....	52
VIII. DETERMINACIONES QUÍMICAS .....	53
IX. ENSAYO BIOLÓGICO .....	54
X. TOXICIDAD SUBAGUDA DE (±)-LICARINA A .....	55
☞ <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>57</b>
I. FRACCIONAMIENTO PRIMARIO DEL EXTRACTO CRUDO .....	58
II. OBTENCIÓN DEL ESTIGMASTAN-3,5-DIENO Y EUPOMATENOIDE 1.....	59
III. FRACCIONAMIENTO SECUNDARIO DE LA FRACCIÓN AE14 .....	62
IV. OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS 9-7H Y 9-7I.....	63
V. TOXICIDAD SUBAGUDA DE (±)-LICARINA A .....	77
☞ <b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>84</b>
☞ <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>85</b>
☞ <b>ANEXO</b> .....	<b>97</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\delta$	Delta
°C	Grados centígrados
$\lambda$	Longitud de onda
%	Porcentaje
AcOEt	Acetato de etilo
ANOVA	Análisis de varianza
antiTB	Antituberculoso
BAN	Bandas
BAS	Basófilos
BH	Biometría hemática
ccf	Cromatografía en capa fina
CC-FN	Cromatografía en columna de fase normal
CDC	Centro de Control y Prevención de Enfermedades
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
CHCM	Concentración de hemoglobina corpuscular media
CICUAL	Comité Internacional para el Cuidado y Uso de Animales Laboratorio
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMN	Centro Médico Nacional
DC	Dicroísmo circular
DOTS	Directly Observed Treatment Short-course
E	Etambutol
E.S.M	Error estándar de la media
EM-IE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
EOS	Eosinófilos
ERI	Eritrocitos
EtOH	Etanol
EU	Estados Unidos
FDA	Food and Drug Administration
FR	Farmacorresistente
g	Gramos
h	Hora
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HB	Hemoglobina
Hex	Hexano
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HTO	Hematocrito
I	Isoniazida
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
KBr	Bromuro de potasio

---

kg	Kilogramo
LEU	Leucocitos
LIN	Linfocitos
M	Media
m/z	masa/carga
MABA	Micrométodo colorimétrico de alamar azul
MeOH	Metanol
MFR	Multifarmacorresistente
mg	Miligramo
mg/kg	Miligramo por kilogramo
MHz	Mega hertz
min	Minuto
mL	Mililitro
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µg/mL	Microgramo por mililitro
MON	Monocitos
NCI	Instituto Nacional del Cáncer
NOM	Norma Oficial Mexicana
ODS	Octadecil silano
OMS	Organización Mundial de la Salud
p	Probabilidad
p.f.	Punto de fusión
PLA	Plaquetas
PM	Peso molecular
R	Rifampicina
RA	Resistencia adquirida
Rf	Factor de retención
RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear protónica
RO	Rotación óptica
RP	Resistencia primaria
RS	Resistencia secundaria
S	Streptomycin
SEG	Segmentados
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TAES	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
TB	Tuberculosis
TB-MFR	Tuberculosis Multifarmacorresistente
TB-XFR	Tuberculosis extremadamente farmacorresistente
TR	Tiempo de retención
UFC/mL	Unidades formadoras de colonia por mililitro
UV	Ultravioleta
VCM	Volumen corpuscular medio
Veh	Vehículo
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
XFR	Extremadamente farmacorresistente
Z	Pirazinamida

**ÍNDICE DE TABLAS**

- Tabla 1.** *Fármacos antituberculosos en evaluaciones clínicas*
- Tabla 2.** *Fraccionamiento primario del extracto hexánico de A. elegans*
- Tabla 3.** *Fraccionamiento secundario de la fracción Ae14*
- Tabla 4.** *Fraccionamiento terciario de la fracción Ae14·9*
- Tabla 5.** *Fraccionamiento químico de la mezcla AM-7*
- Tabla 6.** *Fraccionamiento terciario de la fracción Ae7/8*
- Tabla 7.** *Purificación del compuesto 9-7I mediante CC-FN*
- Tabla 8.** *Condiciones analíticas y semipreparativas en HPLC para purificación del compuesto 9-7I*
- Tabla 9.** *Condiciones analíticas y semipreparativas en HPLC para purificación del compuesto 9-7H*
- Tabla 10.** *Resultados del fraccionamiento primario del extracto hexánico de A. elegans*
- Tabla 11.** *Resultados del fraccionamiento secundario de la fracción Ae14*
- Tabla 12.** *Actividad antimicobacteriana in vitro de las fracciones secundarias Ae14·7- Ae14·9*
- Tabla 13.** *Peso corporal promedio de animales en estudio de toxicidad subaguda de (±)-licarina A*
- Tabla 14.** *Pesos de órganos de los ratones en el estudio de toxicidad subaguda de (±)-licarina A*
- Tabla 15.** *Valores hematológicos del estudio de toxicidad subaguda de (±)-licarina A*

## ÍNDICE DE DIAGRAMAS

**Diagrama 1.** *Proceso de recristalización del compuesto 9-7H presente en la fracción secundaria Ae14·9-7*

**Diagrama 2.** *Purificación y enriquecimiento del compuesto 9-7I*

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** *Incidencia de tuberculosis a nivel mundial*

**Figura 2.** *Distribución mundial de TB-MFR primaria (A) y secundaria (B)*

**Figura 3.** *Países con casos de TB-XFR a nivel mundial*

**Figura 4.** *Compuestos aislados del extracto hexánico de A.elegans*

**Figura 5.** *Compuestos aislados de la fracción primaria Ae7 del extracto hexánico de A. elegans*

**Figura 6.**  *$\beta$ -sitosterol detectado en las fracciones primarias Ae11-Ae13 del extracto hexánico de A. elegans*

**Figura 7.** *Cromatogramas de los compuestos 9-7I y 9-7H a 280 y 220 nm en HPLC (a) analítica y (b) semipreparativa*

**Figura 8.** *Compuestos aislados de diferentes especies de Aristolochia*

**Figura 9.** *Patrón de fragmentación de la (-)- cubebina (compuesto 9-7H)*

**Figura 10.** *Isómeros de la cubebina (10), aislados de A. lagesiana y A. pubescens*

**Figura 11.** *ccf y HPLC de la cubebina pura y del recuperado del análisis de RMN-<sup>1</sup>H*

**Figura 12.** Lignanos aislados de *Horsfieldia iryagedhi*, *Piper sarmentosum*, *Stauranthus perforatus*, *Aristolochia malmeana*, *Magnolia fargesii*, *Pararistolochia flos-avis*

**Figura 13.** Patrón de fragmentación de la fargesina (compuesto 9-7I)

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

**Gráfica 1.** Peso corporal de animales en estudio de toxicidad subaguda de

(±)-licarina A

**Gráfica 2.** Pesos de órganos de los ratones en el estudio de toxicidad subaguda de

(±)-licarina A

**Gráficas 3 y 4.** Valores hematológicos del estudio de toxicidad subaguda de

(±)-licarina A

## ANEXO

**Espectro 1.** Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  del estigmastan-3,5-dieno

**Espectro 2.** Espectro de Masas por Impacto Electrónico del estigmastan-3,5-dieno

**Espectro 3.** Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  del eupomatenoide 1

**Espectro 4.** Espectro de Masas por Impacto Electrónico del eupomatenoide 1

**Espectro 5.** Espectro de Infrarrojo de la (-)-cubebina

**Espectro 6.** Espectro de UV de la (-)-cubebina

**Espectro 7.** Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  de la (-)-cubebina

**Espectro 8.** Espectro COSY de la (-)-cubebina

**Espectro 9.** Resonancia Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  de la (-)-cubebina

**Espectro 10.** Espectro de Masas por Impacto Electrónico de la (-)-cubebina

**Espectro 11.** Dicroísmo Circular de la (-)-cubebina

**Espectro 12.** Espectro de Infrarrojo de la fargesina

**Espectro 13.** Espectro de UV de la fargesina

**Espectro 14.** Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  de la fargesina

**Espectro 15.** Espectro COSY de la fargesina

**Espectro 16.** Resonancia Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  de la fargesina

**Espectro 17.** Espectro de Masas por Impacto Electrónico de la fargesina

**Espectro 18.** Dicroísmo Circular de la fargesina

## JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas, la tuberculosis (TB) ha constituido un problema emergente de salud pública a nivel mundial, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha implementado diversas estrategias y programas para su control y erradicación; sin embargo, el número de casos de TB se ha incrementado considerablemente, debido a diversos factores como: 1) surgimiento de cepas multifarmacorresistentes (MFR) y con farmacorresistencia extendida (XFR) de *M. tuberculosis*, 2) diagnóstico y tratamientos inadecuados, 3) enfermedades que comprometen el sistema inmunológico (SIDA, cáncer, diabetes, lupus, artritis reumatoide, entre otras), 4) condiciones socioeconómicas bajas (pobreza, desnutrición, hacinamiento, etc). Los fármacos de primera y segunda línea utilizados actualmente son poco eficaces, ya que deben ser administrados por largos periodos de tiempo, derivando así en tratamientos prolongados, de elevado costo, tóxicos y con severos efectos secundarios, por lo que es necesario encontrar nuevos compuestos o estructuras moleculares prototipo, activos contra el bacilo.

Las plantas medicinales constituyen una fuente natural, aún poco explorada en este tema, que pueden proveer de nuevas estructuras y/o extractos activos que coadyuven al tratamiento de la enfermedad por lo que actualmente y debido al problema que representa la TB, diversas instituciones de investigación se han enfocado al desarrollo de proyectos encaminados a la exploración de las plantas medicinales como posible fuente de metabolitos secundarios con actividad antimicobacteriana.

El presente trabajo describe la obtención e identificación de compuestos presentes en la especie medicinal *Aristolochia elegans* y su

actividad antimicobacteriana *in vitro*, así como la evaluación toxicológica subaguda de la (±)-licarina A (compuesto previamente aislado del extracto hexánico de *A. taliscana*) como parte de una línea de investigación enfocada a la obtención de compuestos anti-TB.

## INTRODUCCIÓN

La TB es una enfermedad infecto-contagiosa provocada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* y en la actualidad constituye un problema de salud pública, principalmente en países en vías de desarrollo. Datos estimados por la OMS indican que una tercera parte de la población mundial está infectada; en el 2004, se detectaron 8.9 millones de casos nuevos y la mortalidad anual fue de 3 millones, a pesar de ser una enfermedad prevenible y curable. Con la finalidad de controlar y tratar la enfermedad, la OMS implementó el programa Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES) y TAES-plus; sin embargo, a la fecha no se han logrado los objetivos propuestos debido a que muchos casos de TB son causados por cepas farmacorresistentes que no responden al tratamiento establecido. Otros factores como el Virus de Inmunodeficiencia Humana/Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (VIH/SIDA) y enfermedades que comprometen el sistema inmunológico, contribuyen en forma significativa a la reemergencia y persistencia de la enfermedad impidiendo su control y erradicación. Por otro lado, el desarrollo de nuevos agentes antituberculosos fue escaso por más de tres décadas; sin embargo, hoy en día existe un renovado interés en desarrollar nuevos fármacos que mejoren, acorten y/o coadyuven el tratamiento, por lo que numerosos grupos de trabajo se encuentran enfocados a la búsqueda de compuestos con efecto antimicobacteriano en diversas fuentes, entre ellas las plantas medicinales. En este contexto, en estudios realizados sobre plantas medicinales de México, se ha encontrado que algunas de ellas constituyen una alternativa importante para la obtención de compuestos anti-TB, entre ellas está *Aristolochia elegans* cuyos extractos hexánico y metanólico inhibieron en un 99.8 y 90.1 % respectivamente, el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv a la

concentración de 100 µg/mL. El fraccionamiento químico biodirigido del extracto hexánico condujo a la obtención del *ent*-kaureno (CMI no determinada), el eupomatenoides 7 (CMI= 6.25 µg/mL) y la licarina A (CMI= 25 µg/mL), compuestos previamente aislados del extracto hexánico y metanólico de *A. taliscana*.

En el presente trabajo se describe el aislamiento de cuatro compuestos adicionales: estigmastan-3,5-dieno, eupomatenoides 1, (-)-cubebina y fargesina a partir del extracto hexánico del rizoma de *A. elegans* y su evaluación como agentes antimicrobianos *in vitro* por el micrométodo colorimétrico de alamar azul. Adicionalmente se realizó el estudio de toxicidad subaguda de la (±)-licarina A usando como vehículo aceite de olivo y administrando el compuesto cada tercer día por vía subcutánea.

## ANTECEDENTES

### I. TUBERCULOSIS A NIVEL MUNDIAL

La TB es una de las principales causas de muerte por un solo agente infeccioso. Anualmente se registran alrededor de nueve millones de casos nuevos y tres millones de muertes a nivel mundial (**Zager y Mc Nerney, 2008; Tomioka, 2006; Dye, 2006; Rivero et al., 2005**). Las limitaciones en los existentes programas de prevención, diagnóstico y tratamiento, aunado al incremento de la susceptibilidad para desarrollar la enfermedad en pacientes con el sistema inmunológico comprometido (VIH/SIDA, artritis reumatoide, diabetes mellitus, lupus, entre otros), así como el surgimiento de cepas farmacorresistentes (FR) han propiciado que la carga mundial de TB siga en aumento (**Maartens y Wilkinson, 2007; Rivero et al., 2005**).

Estimaciones globales recientes indican que aproximadamente una tercera parte de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis*, y una tercera parte de los 40 millones de pacientes con VIH/SIDA también están infectados con el bacilo (**Mohamed et al., 2006**).

El incremento global de la enfermedad se atribuye a la notable proliferación de casos en países de Europa del Este, principalmente en la ex Unión Soviética y en África sub-Sahariana. La región Africana tiene la mayor incidencia (356 casos por 100 000 habitantes por año), pero en los países más poblados de Asia, Bangladesh, China, India, Indonesia y Pakistán, se encuentra el mayor número de casos que conjuntamente representan la mitad (48%) del total que surgen cada año. En la Figura 1 se muestra la incidencia de TB alrededor del mundo, como se puede observar en países africanos, asiáticos y europeos se registran la mayor cantidad de casos (**Zager y Mc Nerney, 2008; Dye, 2006**).

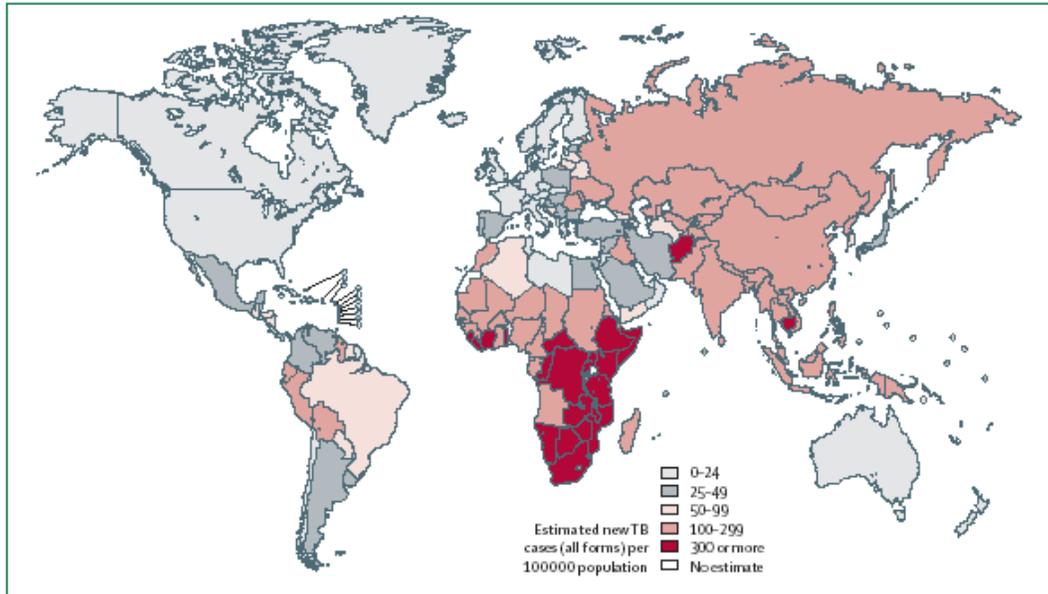


Figure 1: Worldwide incidence of tuberculosis  
TB=tuberculosis. Source:WHO.<sup>2</sup>

**Figura 1. Incidencia de tuberculosis a nivel mundial (Tomado de Maartens y Wilkinson, 2007)**

La transmisión de la TB esta incrementando, pero se ha observado que la tasa de incidencia es particularmente elevada entre adultos jóvenes en su mayoría por infección reciente ó reactivación de la infección latente (**Dye, 2006; O'Brien et al., 2006**). La TB afecta principalmente a pacientes de sexo masculino, en el 2004 varios países reportaron 1.4 millones de casos con baciloscopia positiva en hombres y sólo 775 000 en mujeres. Esto se debe a que las mujeres tienen muy limitado el acceso a los sistemas de salud, pero este patrón es también un signo de la diferencia epidemiológica real entre sexos, tanto a la exposición de la infección, como a la susceptibilidad para desarrollar la enfermedad activa.

El incremento de la carga de TB se debe principalmente a la propagación del VIH. El 13% de adultos con diagnóstico reciente de TB padecen VIH a nivel mundial, con una gran variación entre regiones, el 34% de pacientes son de África (para el 2004 excedió el 50% en

Botswana, Sudáfrica, Zambia, Zimbabwe, entre otros países), el 1.4% se detectó en la región del Pacífico Occidental y aproximadamente el 1% en Bangladesh, China, Indonesia y Pakistán (**Dye, 2006**).

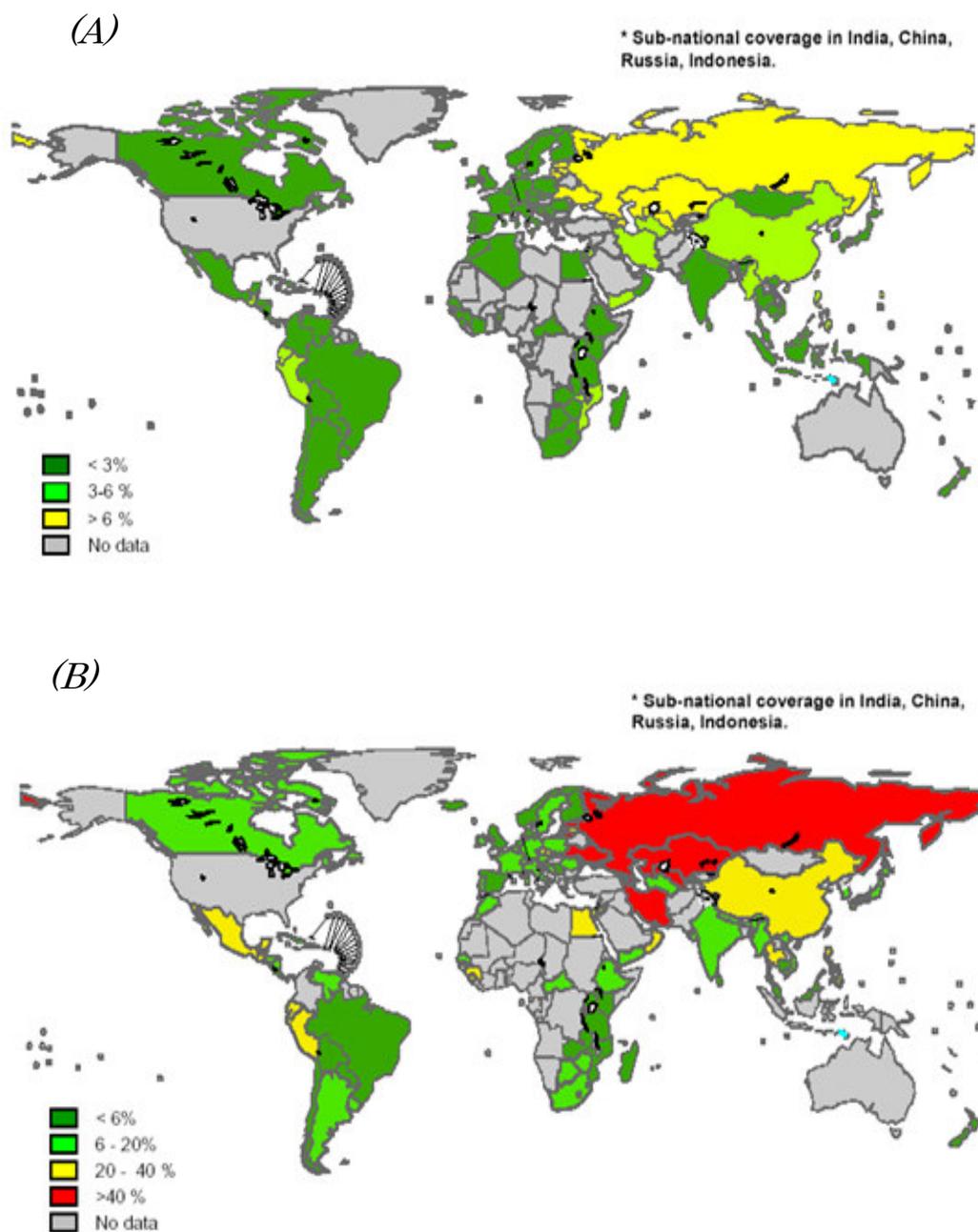
El riesgo de adquirir y/o desarrollar TB aumenta al doble poco después de la seroconversión del VIH en el primer año de la enfermedad. La incidencia anual de la TB es alrededor del 10% en pacientes con VIH en países desarrollados y en vías de desarrollo; con tasas anuales del 7.6 casos/100 personas en E.U. y de 10.4 casos/100 personas en Sudáfrica (**Maartens y Wilkinson, 2007; WHO 2007; Mohamed et al., 2006**).

Cabe mencionar, que la infección por VIH ha tenido un efecto claramente profundo en la epidemiología de la TB, otros factores de riesgo potencialmente importantes que contribuyen al desarrollo de la enfermedad son condiciones socioeconómicas bajas (pobreza, desnutrición, hacinamiento, ventilación e iluminación de la vivienda deficientes, migración, abuso de alcohol, tabaco y de otras drogas, embarazo, tratamiento prolongado con corticoesteroides, falta de acceso a los servicios de salud, falta de adherencia al tratamiento y enfermedades crónicas tales como la diabetes mellitus, cáncer, artritis reumatoide, lupus, entre otros (**Hassmiller, 2006; Dye, 2006**).

## II. EL PROBLEMA DE LA TUBERCULOSIS MULTIFARMACORRESISTENTE Y EXTREMADAMENTE FARMACORRESISTENTE

Los casos MFR son resistentes a Rifampicina (R) e Isoniacida (I) y el tratamiento para estos es prolongado (hasta 24 meses), complejo, más costoso y pobremente tolerado debido a los efectos adversos severos, lo cual conllevan a un escaso apego al tratamiento. La MFR puede ser primaria o adquirida; siendo la primaria cuando el paciente desarrolla TB sin haber recibido tratamiento alguno (caso nuevo) y la

enfermedad es causada por una cepa de *M tuberculosis* MFR. La MFR secundaria o adquirida es aquella en donde el paciente ha sido tratado o multitratado y los bacilos desarrollan resistencia a uno ó más fármacos anti-TB durante el tratamiento, presentándose recaídas por abandono del mismo ó aparece durante éste como consecuencia de la irregularidad o mala adherencia y dosis inadecuadas (error médico); además, es un indicador epidemiológico sobre la deficiencia en el Programa de Control de la TB (**Sharma y Mohan, 2006; Said-Fernández et al., 2005**). La aparición de MFR surge debido a la inapropiada adherencia y/ó inadecuado tratamiento; aunado al uso poco responsable e irracional de medicamentos de segunda línea en casos donde los fármacos de primera línea están fallando (**Raviglione y Smith, 2007; Blower y Supervie, 2007**). En la Figura 2 se muestra la prevalencia de TB-MFR primaria y secundaria a nivel mundial.



**Figura 2.** Distribución mundial de TB-MFR primaria (A) y secundaria (B). Tomado de WHO, 2008.

Se calcula que aproximadamente del 1 al 3% de todos los casos de TB en el mundo son MFR, ya que más del 40% de éstos habían

recibido tratamiento. Las regiones del mundo con alta carga de TB-MFR son Europa Oriental, el Sureste de Asia y la región del Pacífico Occidental. En Europa del Este existe la mayor prevalencia, encontrándose alrededor del 10% en casos nuevos y del 40% en casos previamente tratados (**Jain y Mondal, 2008; Zignol et al., 2006**).

Reportes del Proyecto Global de la OMS, sobre vigilancia de la resistencia a fármacos anti-TB, indican que en Sudáfrica y algunas provincias de China e India presentan cifras de 424000 casos MFR, representando el 4.3% de todos los casos (nuevos y previamente tratados) a nivel mundial (**Zager y Mc Nerney, 2008; Mohamed et al., 2006**).

Datos recientes describen que en Casablanca (Marruecos), Provincia de Guangdon y Provincia de Zhejian (China), Guinea, Israel, Honduras, Tomsk Oblast (Federación Rusa), República de Corea, Nepal, Nicaragua, Irán, Tailandia, Uganda y Sierra Leona se tiene una incidencia estimada de entre uno y tres nuevos casos MFR por cada 100000 habitantes, mientras que Kazakhanstan tiene 22 casos por cada 100000 habitantes, siendo la más alta proporción en nuevos casos (**Zager y Mc Nerney, 2008**).

Por otro lado y recientemente se han descrito los casos de TB-XFR, definida como casos que presentan resistencia a R e I, además a cualquier fluoroquinolona y al menos a un fármaco inyectable de segunda línea -capreomicina, amikacina, kanamicina- (**Yew y Leung, 2008**). Estos casos se detectaron a principios del 2005 en un hospital rural en KwaZulu-Natal, (provincia de Sudáfrica), al presentarse una elevada tasa de muertes en pacientes coinfectados con VIH/TB. El estudio realizado reveló la presencia de casos MFR y XFR en 221 pacientes, 53 de ellos presentaban TB-XFR, 55% afirmaron que nunca habían recibido tratamiento (adquirieron TB por infección primaria con *M. tuberculosis* XFR). Todos los pacientes excepto uno, murieron a los

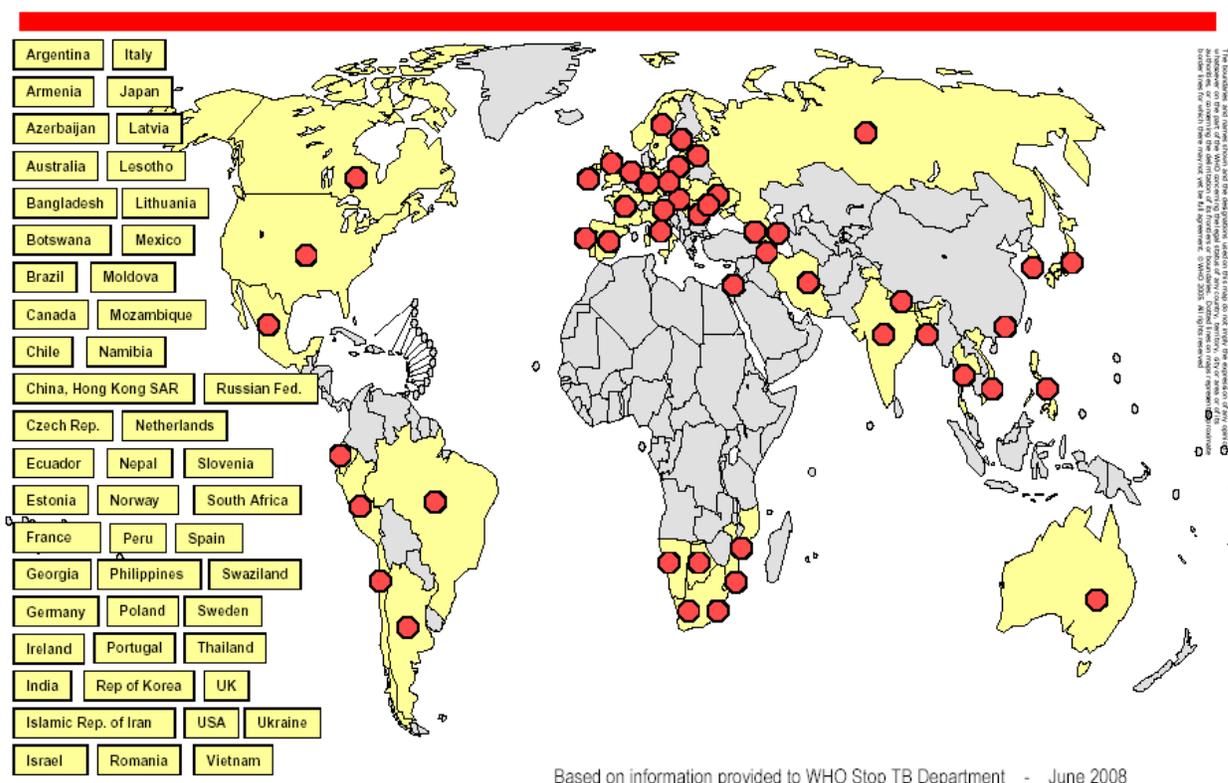
16 días después de haber tomado la primera muestra de esputo. La genotipificación del bacilo reveló que el 85% de los aislados pertenecían a la familia KwaZulu-Natal (KZN), cepa de micobacteria, que había sido detectada en la provincia una década antes. Este brote enfatizaba la necesidad de contar con nuevos fármacos antimicobacterianos con mecanismos de acción diferentes a los existentes, ya que para estos casos no se cuenta con alternativas de tratamiento, a pesar de contar con fármacos de primera y segunda línea. Además es necesario un aumento en la vigilancia y precaución en los hospitales en donde se sospecha la presencia de pacientes con TB-MFR (**Maartens y Wilkinson 2007; Raviglione y Smith, 2007**).

Un reporte de marzo del 2006, del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) documentó la presencia de TB-XFR por lo menos en 17 países. Los resultados mostraron que el 10% de cepas TB-MFR son XFR. Otros datos de los E.U., la República de Corea y Latvia pusieron de manifiesto que el 4%, 15% y 19%, respectivamente, de aislados de TB-MFR fueron cepas XFR (**Raviglione y Smith, 2007; Raviglione, 2006**).

Estimaciones epidemiológicas realizadas mediante modelos teóricos advierten que sí los índices de detección y tratamiento en casos MFR aumentan en un 70% sin incremento simultáneo de las tasas de curación de los mismos, entonces la TB-XFR podría incrementar exponencialmente (**Blower y Supervie, 2007**).

Algunos autores mencionan que a nivel mundial, la prevalencia de casos XFR es de alrededor de 6.6% del total de casos MFR y reportan que en países industrializados (E.U., Reino Unido, Irlanda, Alemania, Francia, Bélgica, España, Japón y Australia) la prevalencia es del 6.5%, mientras que en Rusia y Europa oriental (República de Georgia, República Checa, Armenia y Azerbaiyán) es de alrededor de 13.6%. La

prevalencia de TB-XFR en la región asiática (Bangladesh, Indonesia, Tailandia, Nueva Guinea y Timor Oriental), África y el Oriente Medio no pudo definirse debido al pequeño número de casos reportados en el estudio. Sin embargo, se estima que la prevalencia es de 1.5% en Asia y sólo el 0.6% en África y el Oriente Medio. La República de Corea ha reportado el 15.4% de casos XFR (**Jain y Mondal, 2008; Shah et al., 2007**). En la Figura 3 se muestra los países que presentan casos XFR a nivel mundial, como se puede observar, la distribución de estos casos es alarmante y para México ya se tiene la presencia de TB-XFR.



**Figura 3.** Países con casos de TB-XFR a nivel mundial hasta junio del 2008 (tomado de WHO Stop TB Department 2008).

Las causas del surgimiento de casos XFR son semejantes a las de MFR, es decir, inapropiada adherencia y/o inadecuado tratamiento,

acumulación de tratamientos previos usando medicamentos de segunda línea en casos donde los fármacos de primera línea están fallando provocando cepas XFR a partir de cepas MFR (**Raviglione y Smith, 2007; Blower y Supervie, 2007**). El control de TB-XFR constituye un urgente problema de salud pública y un desafío a nivel mundial, especialmente en los países en desarrollo y los que carecen de recursos, así como en los países con prevalencia cada vez mayor del VIH/SIDA (**Jain y Mondal, 2008**).

### III. ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS

La Alianza Mundial Alto a la TB emprendió el programa DOTS (Directly Observed Treatment Short-course) o TAES (Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado) que se implementó rápidamente en 250 países (**Stop TB Partnership. The global plan to stop tuberculosis. Geneva: WHO, 2001 WHO/CDS/TB/2001.16**) y consiste en cinco elementos:

- 1.- El compromiso del gobierno para el control de la TB.
- 2.- Diagnóstico basado en baciloscopía de muestras de esputo con la debida calidad y aseguramiento; sobre todo en los pacientes sintomáticos que se presenten ante los servicios de salud.
- 3.- Estandarización de la quimioterapia de primera línea para todos los casos y adecuada administración de fármacos.
- 4.- Suministro ininterrumpido de fármacos de calidad asegurada.
- 5.- Un registro estandarizado y un sistema de reporte que permita la creación de un programa de monitoreo para la evaluación de los resultados del tratamiento de todos los pacientes registrados (**Baltussen et al., 2005; Elzinga et al., 2004; Bastian y Portaels, 2000**).

En el 2004, la OMS notificó que el programa TAES fue exitoso para el control de la TB en varios países (Chile, Cuba, Uruguay, Perú y en regiones de China) donde se implementó al 100% y la prevalencia de la enfermedad se redujo en un 40% comparado con otras regiones en donde no se implementó adecuadamente.

Sin embargo, ésta estrategia ha sido insuficiente para prevenir la TB en personas en situación de alto riesgo y en países en vías de desarrollo, a pesar de la disponibilidad de medidas eficaces de prevención, debido a que el tratamiento necesita estar enfocado a personas infectadas con VIH/SIDA, con TB latente, con MFR y XFR. En países de África sub-Sahariana en donde se implementó el programa TAES, los casos de TB incrementaron en un 200% o más en los últimos 10 años (**Nelson, 2004**).

En el 2005, debido a los objetivos no alcanzados por el programa TAES y el surgimiento de casos MFR, la OMS implementó el programa TAES-plus enfocado para tratar principalmente TB-MFR (**Pablos-Méndez et al., 2002**), basado en los mismos principios, pero se incluye pruebas de drogo-susceptibilidad en muestras de esputo para establecer un adecuado tratamiento; además, de hacer uso de los fármacos de segunda línea con base en su perfil de drogo-susceptibilidad (**Garner et al., 2006; Baltussen et al., 2005**). La política principal es tratar por separado las categorías de los pacientes con TB (adultos, niños, casos nuevos, casos previamente tratados, muestras de esputo con baciloscopía positiva y negativa, TB pulmonar y/o extra pulmonar, pacientes con VIH/SIDA y TB) (**Maher et al., 2004**).

Además de los objetivos planteados en el programa TAES-plus, la OMS ha propuesto una nueva estrategia (Stop TB) para el periodo 2006-2015 donde se propone que (**Yew y Leung, 2008; Raviglione, 2007**):

- a) Los servicios de salud alcancen poblaciones marginadas y vulnerables, ya que se ha reconocido que la TB está íntimamente asociada con condiciones socioeconómicas bajas y deficiencia en los sistemas de salud, así como el pobre acceso a los sistemas de salud de estos grupos.
- b) Detectar y tratar los casos de TB/VIH, debido a que este binomio incide en la persistencia de la enfermedad, especialmente en África.
- c) Garantizar el suministro de medicamentos de segunda línea para los casos de TB-MFR, particularizando cada caso en función de su perfil de drogo-sensibilidad.
- d) Contar con mejores y rápidas técnicas de diagnóstico.
- e) Buscar nuevos fármacos que mejoren y/o acorten los tratamientos establecidos y que reduzcan la aparición de cepas de MFR.
- f) Mejorar la implementación, ejecución y seguimiento de los programas para prevenir el desarrollo de la resistencia

Por otro lado, en el 2006 se establecieron siete pasos prioritarios para el control de TB-MFR y TB-XFR dentro del plan urgente de la OMS (**Raviglione, 2006**)

- 1) El desarrollo nacional de planes de respuesta de emergencia para TB-MFR y TB-XFR y asegurar que las medidas del control básico de la enfermedad estén en vigor
- 2) Realizar encuestas rápidas de TB-MFR y TB-XFR usando un protocolo estandarizado para evaluar la distribución geográfica y temporal de TB-XFR en poblaciones vulnerables
- 3) Fortalecer y ampliar la capacidad de laboratorio nacional de TB, cubriendo todos los aspectos en los procedimientos de laboratorio y de gestión
- 4) Implementar y extremar precauciones en el control de la infección en los centros de salud, especialmente aquellos que

atienden pacientes en condiciones severamente inmunocomprometidas debido a la infección por VIH

- 5) Capacitar al personal de salud pública y clínica para diagnosticar y tratar adecuadamente los casos de TB-MFR y TB-XFR
- 6) Proporcionar terapia antirretroviral adecuada a los casos TB/VIH/ SIDA
- 7) Apoyar e intensificar la investigación y el desarrollo de fármacos anti-TB, así como de pruebas de diagnóstico rápido para TB-MFR y TB-XFR y el desarrollo de vacunas

#### IV. BÚSQUEDA DE NUEVOS FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS

La búsqueda de agentes anti-TB fue escasa por más de 3 décadas, pero hoy en día, hay un renovado interés en el desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento y la prevención de la TB. Esta búsqueda actual se enfoca en los siguientes puntos: (a) mejorar el tratamiento actual acortando la duración del mismo o mediante el establecimiento de espacios más amplios en la terapia intermitente; (b) optimizar el tratamiento de la TB-MFR, y (c) contar con tratamiento eficaz en casos de TB latente (**Gautam et al., 2007; Lenaerts et al., 2007; Tomioka, 2006; O'Brien et al., 2005**). Además es necesario encontrar fármacos alternos con mecanismos de acción diferente a los existentes.

Recientemente, el desarrollo de fármacos anti-TB ha mostrado un progreso acelerado y existen ya algunos compuestos que están en fase de evaluación preclínica. Dentro de este contexto, nuevos compuestos están ahora en estudio y al menos dos compuestos (rifapentina y

rifabutina) han sido aprobados por la FDA para el tratamiento de la TB. Otros ejemplos se señalan en la Tabla 1

**Tabla 1. Fármacos antituberculosos en evaluaciones clínicas**  
(Adaptado a partir de **Lenaerts et al., 2007**)

FÁRMACO	CLASE DE FÁRMACO	FUENTE /ORGANIZACIÓN
<b>Levofloxacin</b> <b>Moxifloxacin</b>	Fluoroquinolonas	NIH Bayer/ CDC
<b>Linezolid</b>	Oxazolidinona	TBRU/ NIH
<b>OPC-67683</b>	Dihidroimidazo-oxazole	Farmacéutica Otsuka
<b>PA-824</b>	Nitroimidazole	Alianza Global
<b>LL-3858</b>	Pirrol	Lupin Ltd.
<b>Rifapentina</b> <b>Rifabutina</b>	Derivados de la rifamicina (ya aprobados; parte de los nuevos regímenes diseñados)	Hoechst
<b>SQ-109</b>	Nueva generación de tipo etambutol	Sequella
<b>TMC207</b>	Diarylquinolona	Tibotec

NIH =National Institutes of Health ; CDC= Centers for Disease Control and Prevention; TBRU= Tuberculosis research unit

Por otro lado, diversos modelos animales se utilizaron para evaluar nuevos candidatos en el tratamiento de la TB, el más empleado es el modelo murino ya que nos permite predecir el potencial bactericida de nuevos compuestos, la efectividad de la combinación de fármacos, el éxito de la terapia intermitente y la duración de la terapia necesaria para prevenir recaídas. El modelo de TB en rata y/o conejo son empleados para realizar estudios de absorción, biodisponibilidad, distribución en tejido y eficacia de nuevos compuestos.

Para el caso de TB latente, el mejor modelo animal es el macaco "cynomolgus macaque", en donde los animales infectados con *M. tuberculosis* muestran una variedad de síntomas clínicos, y

aproximadamente la mitad desarrollan una forma de enfermedad latente **(Lenaerts et al., 2007)**.

En esta búsqueda de compuestos anti-TB se tienen ya algunos candidatos en fase avanzada de investigación que se describen a continuación:

#### Derivados de la rifamicina

La R es piedra angular en el tratamiento para TB, pero debe ser administrada tres veces por semana por al menos 6 meses, para una efectividad óptima; sin embargo, regímenes más espaciados son menos efectivos e inciden sobre la resistencia adquirida en pacientes con VIH. Algunos derivados de rifamicina con tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) mucho más largo en suero que la R han sido evaluados en regímenes intermitentes. Dentro de estos está la *rifabutina* empleada en casos de VIH/TB provocado por el complejo *M. avium* (MAC), es alrededor de 4 a 8 veces más activo que la R y posee una buena penetración tisular. *Rifabutina* fue aprobada por la FDA en 1992 y actualmente es usada como un sustituto de R en pacientes que no pueden usar este fármaco debido a las interacciones fármaco-fármaco **(Tomioka, 2006)**.

Otro derivado de rifamicina de acción prolongada es *rifalazil*, con  $t_{1/2}$  largo y potente actividad anti-TB ya que se ha comprobado que tiene actividad *in vitro* 100 veces mayor que R y 4 veces mayor que rifabutina. Sin embargo, presenta resistencia parcial cruzada con R **(Yew y Leung, 2008; Tomioka, 2006)**.

*Rifapentina* un ciclopentil sustituido de R con un  $t_{1/2}$  de 14-18 h en adultos normales y después de una dosis de 600 mg, se observan concentraciones mayores a la concentración mínima inhibitoria (CMI) en suero después de las 72 h, este dato sugiere que el fármaco puede ser útil en regímenes intermitentes ó en riesgo de recaídas, pero no es recomendable para pacientes quienes tienen TB avanzada o presentan coinfección por VIH. Rifapentina ha sido aprobada por la FDA y es una

alternativa de R desde 1998. Se ha demostrado que la mezcla de rifapentina e I por un periodo de 3 meses es efectiva en casos de TB latente en comparación a los 6 meses diarios de I ó los 2 meses diarios de R y Pirazinamida (Z). Los derivados de la rifamicina actúan inhibiendo la transcripción del DNA de la micobacteria (**O´Brien et al., 2005; Coll, 2003**).

#### Derivados de flouroquinolonas

Las quinolonas son potentes bactericidas que podrían acortar el régimen de tratamiento para TB activa, incluyendo MFR. Varios fluoroquinolonas (FQ) como fármacos de segunda línea para casos de MFR con mayor actividad *in vitro* contra *M. tuberculosis* ya están disponibles, como *moxifloxacina* y *gatifloxacina* (en uso actual para casos de MFR), cuyas CMI's son cuatro veces menores a levofloxacina. La *moxifloxacina* es mejor bactericida que I, ya que la eficacia del tratamiento de moxifloxacina con rifapentina administrado una vez por semana es mejor que la mezcla de rifapentina con I. Recientemente encontraron que la combinación de R, Z y moxifloxacina tiene una mayor actividad bactericida que el régimen estándar permitiendo acortar el tratamiento. Su mecanismo de acción se debe a la inhibición de dos enzimas, la DNA girasa y la topoisomerasa IV, involucradas en los procesos de transcripción, replicación y reparación del DNA de la bacteria.

#### Diarilquinolinas

Estos compuestos tienen potente actividad *in vitro* contra *M. tuberculosis*. El compuesto líder *TMC207* ó *R207910* es activo contra *M. tuberculosis* sensible (CMI= 0.03 µg/mL) y contra cepas MFR y XFR (CMI= 0.002-0.13 µg/mL), también tiene efecto similar en contra de otras micobacterias (*M. smegmatis*, *M. bovis*, *M. avium* y *M. fortuitum*). Su mecanismo de acción es sobre la bomba de protones ATP sintasa permitiendo así tener una selectiva actividad *in vitro* (**Tomioka, 2006**;

**O'Brien et al., 2005**). Presenta efecto bacteriostático en el modelo murino a 50 mg/kg administrado durante 8 días, este efecto es similar cuando se administra con rifapentina.

### Nitroimidazoles

Varios derivados han sido evaluados por su actividad *in vitro* e *in vivo* contra *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Estos compuestos tienen una potente actividad *in vitro* con CMI de 0.015-1.95 µg/mL (**Tomioka, 2006**). PA-824 un nuevo nitroimidazopirano demostró que en estudios *in vitro*, la CMI contra varios aislados de TB fármaco sensible fue ≤0.015-0.25 µg/mL, similar a I y resultó activo contra cepas MFR (CMI= 0.03-0.25 µg/mL). Este compuesto actúa inhibiendo la biosíntesis de proteínas y de lípidos de la pared celular de *M. tuberculosis* (**Olmo et al., 2005**), no ha demostrado mutagenicidad y estudios de toxicidad inicial indicaron que las dosis necesarias para la actividad terapéutica en modelos murinos y de cobayo están por debajo de la toxicidad aguda y crónica.

La genotoxicidad de PA-824 se examinó con estudios de aberración cromosomal, micronúcleos murinos y pruebas del linfoma de ratón, en donde los resultados indicaron que no provoca alteración alguna. La farmacocinética fue determinada en plasma, corazón, hígado, riñón, bazo, pulmón de ratas seguida de una única dosis oral de 100 mg/kg encontrando que el tiempo máximo para alcanzar las concentraciones de PA-824 en esos tejidos fue de 4 horas y de 6 horas en plasma. La exposición (área bajo la curva) en los tejidos fue aproximadamente de tres a ocho veces superior a la del plasma. Estos datos sugieren que, en el modelo de rata, la penetración de PA-824 en pulmón, bazo y otros tejidos es extensa. En estudios de dosis repetidas, no existen pruebas de acumulación en la rata o mono (**O'Brien et al., 2005**).

### Dihidroimidazo-oxazoles

OPC-67683 es un nuevo nitro-dihidroimidazo-oxazol que se encuentra actualmente en fase I de estudio. El compuesto tiene potente actividad *in vitro* contra *M. tuberculosis* H37Rv y aislados clínicos, con CMI de 0.006-0.024 µg/mL y no muestra resistencia cruzada con fármacos de primera línea. Además, las combinaciones de este compuesto con fármacos de primera línea presentan sinergismo *in vitro* e *in vivo*, por lo que el compuesto puede ser útil para reducir la duración de la terapia en TB activa y en el tratamiento de TB-MFR. OPC-67683 actúa inhibiendo la síntesis de ácidos micólicos de la micobacteria **(Rivers y Mancera, 2008)**.

### Derivados del Pirrol

El derivado BM 212 con potente actividad contra *M. tuberculosis* (CMI= 0.7-6.2 µg/mL) y *M. avium* (CMI= 0.4-3.1 µg/mL), ha mostrado actividad similar contra cepas MFR y recientemente se ha encontrado que la introducción de tiomorfilina en la molécula (derivado BM 212) mejora su actividad antimicobacteriana **(Tomioka, 2006)**.

El pirrol LL3858 esta en fase I de desarrollo para el tratamiento de la TB, presenta CMI submicromolar y resultó activo en el modelo murino de la TB. Presenta en poco tiempo actividad bactericida en pulmones y bazo de los animales infectados en comparación con la terapia convencional **(O'Brien et al., 2005)**.

### Piridona

ABT-255 es un nuevo compuesto antibacteriano que ha demostrado potente actividad *in vitro* y gran eficacia *in vivo* contra cepas sensibles y MFR, con CMI de 0.016-0.032 µg/mL. En el modelo murino de TB, presentó una excelente eficacia terapéutica (equivalente a I) en ratones infectados con cepas resistentes a R, por lo que puede

ser un candidato exitoso en el tratamiento de pacientes con TB-MFR, además de disminuir efectos adversos.

#### Dihidromicoplanecina A

La dihidromicoplanecina A es un péptido cíclico con fuerte actividad contra *M. tuberculosis* (CMI < 0.0125 µg/mL) y MAC (CMI = 1.56 µg/mL). Este compuesto muestra una mayor actividad que I y su eficacia terapéutica es particularmente incrementada cuando se combina con este.

#### Oxazolidinonas

Las oxazolidinonas representan una única familia de agentes antimicrobianos con varios atributos como son: (1) inhiben la síntesis de proteínas y no inducen resistencia cruzada con los agentes antimicrobianos, (2) amplio espectro de actividad, (3) amplia biodisponibilidad oral y parenteral, (4) e inducen poca resistencia. Entre éstas tenemos a *linezolida*, *eperezolida* y *PNU-100480* que no presentan toxicidad aguda y las dos primeras son muy activas (CMI de 0.5-2 µg/mL) contra aislados de *M. tuberculosis* sensibles y MFR, y la combinación de linezolida y R presentan un efecto sinérgico. En un modelo murino de TB, estas oxazolidinonas presentaron eficacia terapéutica en el siguiente orden PNU-100480 > linezolida > eperezolida y la actividad de PNU-100480 fue similar a I y/o R (**Tomioka, 2006**).

#### Derivados de etambutol

En el Instituto Nacional de Salud de E.U. (NIH) se sintetizaron 63238 derivados de etambutol y se encontró que 25 compuestos altamente lipofílicos resultaron mayor o igualmente activos que la referencia contra *M. tuberculosis*, en donde *SQ109* fue identificado como el compuesto más potente. Este compuesto derivado no simétrico de 1,2-etilendiamina, con rango de CMI de 0.16-0.63 µg/mL, presenta un 99% de inhibición bacilar y es activo contra cepas de TB-MFR. Actúa

inhibiendo la síntesis de la pared celular de la micobacteria (**Rivers y Mancera, 2008**). En estudios *in vitro* e *in vivo*, SQ109 mejora la actividad antimicobacteriana cuando se combina con R e I. El compuesto tiene rápida y amplia distribución dentro de varios tejidos alcanzando concentraciones efectivas en los sitios de infección bacteriana. (**O'Brien et al., 2005**).

#### V. LAS PLANTAS MEDICINALES COMO FUENTE DE COMPUESTOS ANTITUBERCULOSOS

Numerosas plantas han sido utilizadas como remedios naturales por miles de años; inicialmente estos eran tomados en forma de preparados de drogas crudas tales como tinturas, infusiones, cataplasmas, polvos y otras preparaciones herbolarias. El uso de plantas como medicinas está muy relacionado con el aislamiento de compuestos activos, este proceso inició con la obtención de la morfina proveniente del opio a principios del siglo XIX, y siguió con el aislamiento de otras sustancias (cocaína, codeína, digitoxina, quinina), algunas de las cuales son aun usadas ó sirvieron como moléculas base para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos de uso clínico actual (**Balunas y Kinghorn, 2005**).

De acuerdo con la OMS, alrededor del 80% de la población mundial tiene incorporado en su modalidad primaria al cuidado de su salud, el uso de plantas medicinales como una alternativa terapéutica para tratar diversos padecimientos, principalmente en países en vías de desarrollo debido al costo que implica el uso de la medicina alópata (**Mukinda y Syce, 2007**). El valor de las plantas medicinales usadas como fuente para la obtención de nuevos agentes terapéuticos ha derivado en el (1) aislamiento de compuestos bioactivos para uso directo como fármacos, (2) la obtención de prototipos estructurales para

la semisíntesis de derivados con mayor actividad y/o menor toxicidad, (3) y el uso de la planta o parte de ella como fitomedicamento **(Fabricant y Farnsworth, 2001)**.

A través del tiempo, diversas y novedosas metodologías químicas y ensayos biológicos han sido aplicadas para la obtención de principios activos a partir de fuentes naturales (plantas, bacterias, hongos y organismos marinos) y sintéticas (química sintética, química combinatorial y modelos moleculares) **(Chin et al., 2006)**.

Entre el 2001 y el 2002, aproximadamente un cuarto de los medicamentos de mayor venta en todo el mundo fueron productos naturales, o derivados de estos. Algunos ejemplos importantes de mencionar son:

Arteether (nombre comercial: Artemotil) fármaco antimalarico derivado de la artemisina obtenida de *Artemisia annua*. Galantamina (conocida como Reminyl), aislada de *Galanthus woronowii* empleada en el tratamiento del Alzheimer. Tiotropio (nombre comercial: Spiriva), fue lanzado recientemente en E.U para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), aislado de *Atropa belladonna*. Vinflunina derivado de la vinblastina, usado como anticancerígeno. Calanolida A (dipiranocumarina) aislada de *Calophyllum lanigerum var austrocoriaceum*, empleado como anti-VIH por ser inhibidor de la transcriptasa reversa (NNRTI) de VIH- tipo I y es efectivo contra cepas VIH-resistentes al fármaco antiviral retrovir (AZT) o zidovudina **(Balunas y Kinghorn 2005)**.

Por otro lado, de todos los fármacos anticancerígenos disponibles entre 1940 y 2002, 40% fueron productos naturales o derivados de estos, los cuales se clasifican en cuatro tipos: alcaloides, podofilotoxinas, taxanos y camptotecinas. Ejemplos importantes de ellos

son la vinblastina y vincristina aislados de *Catharanthus roseus*, que son inhibidores de la mitosis y han sido utilizados por más de 40 años; la camptotecina aislada de *Camptotheca acuminata*, es inhibidora de la topoisomerasa I empleada como agente antitumoral. Paclitaxel aislado de *Taxus brevifolia*, utilizado en el tratamiento de cáncer de mama y de ovarios, actúa promoviendo la polimerización de las tubulinas (**Chin et al., 2006; Balunas y Kinghorn 2005**).

A pesar del gran número de plantas superiores existentes en nuestro planeta (estimado en 250, 000), sólo el 6% ha sido investigado para conocer su actividad biológica y aproximadamente el 15% ha sido evaluado fitoquímicamente (**Molina-Salinas et al., 2006**). Por otro lado, las plantas medicinales ofrecen una gran ventaja porque se han utilizado desde mucho tiempo atrás, lo que constituyen una esperanza de que cualquier compuesto obtenido de esta fuente muestren baja o nula toxicidad; además, de que la diversidad química de los metabolitos secundarios presentes en una especie vegetal puede ser igual o superior que la encontrada en las bibliotecas de química sintética combinatoria (**Fabricant y Farnsworth, 2001**).

Dado el problema de salud que representa la TB en el mundo, en las últimas dos décadas se han publicado numerosas revisiones que describen diversos compuestos con actividad antimicobacteriana obtenidos de plantas y otras fuentes naturales (bacterias, hongos y organismos marinos). Los compuestos activos son de diferentes clases tales como alcaloides, terpenoides, flavonas, cumarinas, chalconas, entre otros (**Copp y Pearce, 2007; Pauli et al., 2005; Okunade et al., 2004; Cantrell et al., 2001**). Algunos artículos publicados entre el 2005 y 2008, relacionados con la actividad antimicobacteriana de extractos y compuestos cuya CMI  $\leq 30$   $\mu\text{g/mL}$  se describen a continuación:

El extracto hexánico de *Flourensia cernua* DC inhibió el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv (cepa sensible a los cinco fármacos de primera línea) con una CMI de 50 µg/mL y resultó más activa contra la cepa MFR (CIBIN/UMF: 15:99, resistente a todos los fármacos de primera línea) con una CMI de 25 µg/mL (**Molina-Salinas et al., 2006**).

El estudio químico biodirigido de los extractos CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (1:1) de tallos y hojas de *Piper sanctum* condujo a la identificación de 14 nuevos compuestos y 10 ya conocidos, en donde los que presentaron mayor actividad fueron: el 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)tetradecano (CMI= 6.25 µg/mL), 2-oxo-16-(3',4'-metilendi-oxifenil)hexadecano (CMI= 6.25 µg/mL), 5,6-dehidro-7,8-dihidrometisticina (CMI= 4 µg/mL), cefaranona B (CMI= 12 µg/mL) y piperolactama A (CMI= 8 µg/mL) (**Mata et al., 2004**).

En el extracto metanólico del tallo de *Microtropis japonica* se encontraron 24 compuestos que presentaron actividad contra *M. tuberculosis* H37Rv *in vitro*, siendo los más activos la 15-acetoxiorbiculina G (CMI= 39.6 µM), celahina C (CMI= 31.3 µM), y salasol A (CMI= 28.2 µM) (**Chen et al., 2008**). Estudios adicionales sobre el extracto metanólico de la raíz describen que salasol A y celahina C mostraron la mayor actividad (CMI= 15 µg/mL) contra *M. tuberculosis* H37Rv (**Chou et al., 2008**).

Otro estudio describe que de la fracción soluble de EtOAc de las raíces de *M. fokiensis* fueron aislados 14 compuestos, en donde el 2α-acetoxi-1α-hidroxi-6β,9β,15-tribenzoiloxi-β-dihidroagarfurano y la orbiculina G resultaron los más activos contra *M. tuberculosis* 90-V221387 con CMIs de 15.8 µg/mL y 14.6 µg/mL, le siguen el 1α-acetoxi-2α-hidroxi-6β,9β,15-tribenzoiloxi-β-dihidroagarfurano y la triptogelina G-2 con CMIs de 19.5 µg/mL y 26 µg/mL, respectivamente (**Chen et al., 2007b**). En el extracto metanólico de los tallos se aisló la

8-acetoximutangina con importante actividad *in vitro* contra *M. tuberculosis* 90-221387 (CMI= 10 µg/mL) (**Chou et al., 2007**).

A partir del extracto metanólico de las hojas de *Beilschmiedia tsangii* fueron aislados 13 compuestos, en donde la beilschmina A y B resultaron los más activos contra *M. tuberculosis* 90-V221387 con una CMI de 2.5 y 7.5 µg/mL, respectivamente, le siguen el escualeno y el rel-(7S,8S,7'R,8'R)-3,3',4,4',5,5'-hexametoxilignano cuyas CMIs fueron de 28 y 25 µg/mL (**Chen et al., 2007a**).

El extracto metanólico de *Zanthoxylum wutaiense* presentó actividad contra *M. tuberculosis* H37Rv (CMI= 21.2 µg/mL) y por fraccionamiento químico se aislaron 11 compuestos, en donde los más activos fueron: metil 7-metoxianodendroate (CMI= 35 µg/mL), 7-metoxiwutaifuranal (CMI= 35 µg/mL), wutaiensal (CMI= 30 µg/mL), dictamnina (CMI= 30 µg/mL) y γ-fagarina (CMI= 30 µg/mL) contra *M. tuberculosis* H37Rv (**Huang et al., 2008**).

El triterpeno ester 2,3-dimetílico del ácido 2,3-seco-taraxer-14-ene-2,3,28-trioico aislado del extracto etanólico de las hojas de *Elateriospermum tapos* mostró una CMI de 3.13 µg/mL contra *M. tuberculosis* H37Ra (**Pattamadilok y Suttisri, 2008**).

Del extracto hexánico de *Lantana hispida* se aislaron tres triterpenoides (ácido 3-acetoxi-22-[2'-metil-2Z-buteniloxi]-12-oleanen-28-oico, lantadeno A reducido y ácido oleanólico) mostrando una CMI de 50 µg/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv los dos primeros y el ácido oleanólico una CMI de 12.5 µg/mL (**Jiménez-Arellanes et al., 2007**).

A partir del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de *Camchaya calcarea* se aislaron 9 lactonas sesquiterpénicas que presentaron actividad contra *M. tuberculosis* H37Ra, en donde las más activas fueron isogoyzensolida (CMI= 1.5 µg/mL); goyzensolida, centraterina, isocentraterina, 5-epi-isogoyzensolida y 5-epi-isocentraterina (CMI= 3.5 µg/mL) y lichnoforalida B (CMI= 6.2 µg/mL) (**Vongvanich et al., 2006**).

La aegicerina obtenida del extracto etanólico de *Clavija procera* presentó actividad *in vitro* contra *M. tuberculosis* H37Rv (CMI= 3.12 µg/mL) y contra cepas de *M. tuberculosis* monoresistentes a I y MFR, cuyas CMI's fueron del rango de 1.6-3.12 µg/mL (**Rojas et al., 2006**).

Glabridina obtenida del extracto etanólico de las raíces de *Glycyrrhiza glabra* presentó actividad antimicobacteriana con una CMI de 29.16 µg/mL contra las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis* (**Gupta et al., 2008**).

De la fracción lipídica no saponificable del extracto metanólico de las flores de *Chrysanthemum morifolium* se obtuvieron 28 compuestos (todos 3-hidroxitriterpenoides) siendo los más activos contra *M. tuberculosis* H37Rv maniladiol, 3-epilupeol (CMI= 4 µg/mL), 4,5α-epoxihelianol (CMI= 6 µg/mL), faradiol y arnidiol (CMI= 16 µg/mL) (**Akihisa et al., 2005**).

En un estudio donde evaluaron la actividad antimicobacteriana de 9 plantas usadas en la medicina tradicional de México para el tratamiento de la tuberculosis y otras enfermedades respiratorias, encontraron que los extractos hexánicos de *Citrus aurantifolia*, *C. sinensis* y *Olea europea* mostraron la mejor actividad contra *M. tuberculosis* monoresistentes a I (CMI's = 25 µg/mL), el extracto hexánico de *C. aurantifolia* también mostró importante actividad contra una cepa monoresistente a E con una CMI= 25 µg/mL (**Camacho-Corona et al., 2008**).

Del extracto metanólico del látex de *Pedilanthus tithymaloides* se aislaron 6 nuevos diterpenos poli-acilados, siendo el 1α,13β,14α-trihidroxi-3β,7β-dibenzoil-9β,15β-diacetoxijatrofa-5,11E-dieno el más activo contra *M. tuberculosis* H37Ra con una CMI= 12.5 µg/mL (**Mongkolvisut y Sutthivaiyakit, 2007**).

Del extracto hexánico de las raíces de *Polyalthia cerasoides* fueron aislados bidebilina E y el ácido octadeca-9,11,13-trioico activos contra

*M. tuberculosis* H37Ra cuyas CMI's fueron de 6.25 µg/mL y el α-humuleno aislado del extracto EtOAc presentó también una CMI de 6.25 µg/mL (**Kanokmedhakul et al., 2007**).

Evaluaciones realizadas sobre los extractos hexánico y diclorometánico de la corteza de *Casearia grewiifolia* se encontró que estos inhibieron el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Ra (CMI= 25 µg/mL) y por fraccionamiento químico aislaron 4 nuevos diterpenos del tipo clerodano (caseargrewiina A-D) y dos conocidos: rel-(2S,5R,6R,8S,9S,10R,18S,19R)-18,19-diacetoxi-18,1-epoxi-6-metoxi-2-(2-metilbutanoiloxi)cleroda-3,13(16),14-trieno y rel-(2S,5R,6R,8S,9S,10R,18S,19R)-18,19-diacetoxi-18,19-epoxi-6-hidroxi-2-(2-metilbutanoiloxi)cleroda-3,13 (16),14-trieno, los cuales presentaron una CMI de 12.5 µg/mL mientras que la caseargrewiina C presentó una CMI de 25.0 µg/mL contra la misma micobacteria (**Kanokmedhakul et al., 2005**).

La evaluación de la 7-metiljuglona (aislada de las raíces de *Euclea natalensis*) sola y en combinación con fármacos anti-TB de primera línea, mostró que combinaciones de este compuesto con R o I dieron un efecto sinérgico, ya que redujeron de cuatro a seis veces la CMI de cada fármaco (**Bapela et al., 2006**). Por otro lado, la evaluación de algunos derivados sintéticos de la 7-metiljuglona permitió determinar que ninguno de estos fueron más activos que la 7-metiljuglona presentando una CMI= 0.5 µg/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv (**Mahapatra et al., 2007**).

Un estudio de compuestos sintéticos encontró que el geranilgeraniol (CMI= 1.56 µg/mL) y acetato de geranilgeraniol (CMI= 3.13 µg/mL) fueron los más activos y selectivos contra *M. tuberculosis* H37Rv (**Vik et al., 2007**).

## VI. ANTECEDENTES BOTÁNICOS DEL GÉNERO ARISTOLOCHIA

La familia *Aristolochiaceae* comprende unas 400 especies de plantas herbáceas o leñosas y muy a menudo trepadoras, con hojas simples, perennes, aromáticas que se disponen de manera alternada a lo largo del tallo y sin estípulas (ocasionalmente presentan pseudoestípulas), con peciolo y flores bisexuales (**Ortega-Ortiz y Ortega-Ortiz, 1997; Cano y Marroquín, 1994**).

El género *Aristolochia* comprende tres cuartas partes del total de la familia *Aristolochiaceae* (**Quer, 1962**) y se distribuye en regiones tropicales, semiáridas y templadas. En el continente Americano se encuentra distribuido desde la vertiente sur y oriental de los Estados Unidos a través de México, Antillas y América Central hasta Sudamérica (Argentina) (**Ortega-Ortiz y Ortega-Ortiz, 1997**). En México se han descrito 64 especies, algunas de las cuales se conocen como "flor de pato", "guaco", "gallinitas", "hierba del indio", "pipilo", "canastilla", "farolito", "tlacopatle", "cocoba", "bejuco amargo", "pehuane", "pata de elefante", "contrayerba", "curarina" y varios diversos nombres en lenguas autóctonas, según el lugar (**Cano y Marroquín, 1994**).

## VII. USOS DENTRO DE LA MEDICINA TRADICIONAL Y ANTECEDENTES QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DE *A. elegans*

En la medicina tradicional China se emplea como expectorante, antitusiva, analgésico, antihistamínico, antiasmático y detoxicante (**Shi et al., 2004**). Otras investigaciones reportan que *A. elegans* es utilizada como antídoto contra mordeduras de serpiente, insecticida, para el dolor de muelas, purgante, histerotónico, emenagogo, expectorante, y antiespasmódico. En México, esta planta se utiliza como antimicrobiano, antitumoral, antidiarreico, antipirético, contra el veneno de serpiente y escorpión y emenagogo (**Jiménez-Ferrer et al., 2005; Kumar et al., 2003**).

Para esta especie se ha descrito la presencia de lignanos, monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, tetralonas, isoquinolinas, bifenil éteres, porfirinas, dímeros de ácido aristolóquico y alcaloides obtenidos de los extractos de hojas, tallos y raíz (**Wu et al., 2000; 2002; Shi et al., 2004**). Otras investigaciones reportan el aislamiento de nuevos compuestos como son: aristolactamas (aristolactama E y aristolactama-AIIIa-6-O- $\beta$ -D-glucósido), seis nuevos difenil éteres (aristogina A-F), dos porfirinas (aristofilas A y B), una nueva isoquinolina (pericampilinona A), tres lignanos (aristelegina A-C), un nuevo dímero (aristolina), cuatro tetralonas (aristelogenas A-D), tres éteres de alcaloides benzoil benziltetrahidroisoquinolina N-óxido (aristoquinolina A-C) del extracto metanólico de hojas, tallos y raíces de *A. elegans* (**Wu et al., 2000; 2002; Shi et al., 2004**). Por otro lado, en el aceite de las raíces, hojas y tallos se reporta la presencia de sesquiterpenos como el  $\beta$ -cariofileno, isocariofileno, el bicilogermacreno y E-nerolidol (**Vila et al., 1997**). Entre los sesquiterpenos aislados de la planta se encuentran los siguientes: farnesol, (Z)-(R)-nerolidol, (E)-(R)-nerolidol,  $\alpha$ -bisabolano,  $\alpha$ -curcumeno,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -elemeno, germacrenos (B y D), hedicariol, mollislactona, bicilogermacreno,  $\alpha$ -humuleno, isocariofileno, óxido de cariofileno, cariofilenol I, calareno,  $\delta$  y  $\gamma$ -cadineno,  $\gamma$ -muuroleno, T-muurolol, *epi*-cubenol, T-cadinol,  $\alpha$ -cadinol, cubenol, calameneno,  $\alpha$ -calacoreno, guaiol, 6,9-guaiadieno, guaiazuleno, espatulenol, viridiflorol, globulol,  $\alpha$  y  $\beta$ -cubebeno,  $\alpha$ -himachaleno, longifoleno, isolongifoleno,  $\beta$ -bourboneno, bourbonol, aristololido.

Entre los monoterpenos aislados de *A. elegans* están: limoneno, 1,8-cineol, bornanol,  $\alpha$  y  $\beta$ -pineno. Algunos diterpenos aislados son: (E)-fitol, kauranol, ácido kauranoico y, 16 $\alpha$ ,17-epoxikaureno (**Wu et al., 2004**).

Dentro de las actividades biológicas se describe que el extracto hexánico y metanólico de *A. elegans* presentó moderada actividad contra el veneno del escorpión *Centruroides limpidus limpidus* y al combinarla con extractos de *Bouvardia ternifolia* mejora su efecto inhibitorio hasta en un 70% (**Jiménez-Ferrer et al., 2005**). Por otro lado, extractos alcohólicos mostraron actividad antimitótica y antiviral (**Shi et al., 2004; Wu et al., 2004**).

En otro estudio se reporta que los extractos hexánico y metanólico del rizoma de *A. elegans* inhibieron en un 99.87 y 90.10%, respectivamente, el crecimiento de *M. tuberculosis H37Rv*, al ser evaluados por el método radiorespirométrico Bactec 460 a la concentración de 100 µg/mL y mediante el fraccionamiento químico biodirigido del extracto hexánico se aislaron 3 compuestos caracterizados como licarina A (CMI= 25 µg/mL), eupomatenoide 7 (CMI= 6.25 µg/mL) y *ent*-kaureno (CMI no determinada), al ser evaluados por el mismo método (**León, 2005**).

Por otro lado, de la especie *A. taliscana* se aislaron tres compuestos activos contra *M. tuberculosis H37Rv*, siendo la licarina A (CMI= 25 µg/mL), licarina B y eupomatenoide 7 (CMI= 25 µg/mL) los más activos al ser evaluados por el método MABA. Además la licarina A resultó muy activa contra cuatro cepas monoresistentes de *M. tuberculosis H37Rv* presentando una CMI= 3.12 µg/mL contra la cepa resistente a I y S y una CMI= 6.25 µg/mL contra la cepa resistente a R y E. También presentó una CMI= 12.5 µg/mL contra cuatro aislados clínicos de *M. tuberculosis MFR* (**Calderón, 2008**). Recientemente se determinó inequívocamente la estructura resultando como la (-)- licarina A con base en el análisis de sus datos de RMN-<sup>1</sup>H, EM-IE, DC y RO. Así mismo, realizaron la evaluación de toxicidad subaguda (48 días) en

ratones Balb/C administrando el compuesto por vía subcutánea y empleando como vehículo aceite de olivo extravirgen (**Valdovinos, 2009**), encontrándose que los parámetros hematológicos y químicos, así como el análisis histológico de los animales tratados no mostraron daños significativos.

## **HIPÓTESIS**

Tomando en cuenta el efecto antimicobacteriano *in vitro* presentado por el extracto hexánico del rizoma de *A. elegans* se espera obtener e identificar el o los compuestos responsables de la actividad biológica.

Por otra parte, se espera que la administración a 25 días de la ( $\pm$ )-licarina A no provoque signos de toxicidad en un estudio subagudo.

## **OBJETIVOS GENERALES**

- Obtener compuestos adicionales responsables de la actividad antimicobacteriana observada en el extracto hexánico de *A. elegans*
- Determinar la toxicidad subaguda de la (±)-licarina A administrada por vía subcutánea.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Obtener el extracto hexánico a partir del rizoma de *A. elegans*
- Realizar el fraccionamiento químico primario en cromatografía en columna de fase normal del extracto hexánico de *A. elegans*
- Aislar e identificar los principales compuestos activos y mayoritarios que sean responsables de la actividad antimicobacteriana presentes en las fracciones activas
- Purificar los compuestos mayoritarios mediante diversos métodos cromatográficos y por recristalización
- Evaluar la actividad antimicobacteriana *in vitro* del extracto, fracciones y compuestos puros contra cepas sensibles y MFR de *Mycobacterium tuberculosis* por el método MABA
- Determinar la toxicidad subaguda de (±)-licarina A administrada durante 25 días, por vía subcutánea, empleando aceite de olivo como vehículo

## **METODOLOGÍA**

### ***I. Material vegetal***

El rizoma de *A. elegans* fue colectado en el mercado de Miahuatlán, Oaxaca en Noviembre del 2005. La identificación botánica la realizó la M. en C. Abigail Aguilar, jefa del Herbario IMSS. Un ejemplar se depositó en el mismo herbario con la clave 15080.

### ***II. Preparación del extracto***

El extracto hexánico del rizoma de *A. elegans*, se preparó vía maceración a partir de 730 g de material vegetal seco y molido. La extracción se realizó en forma sucesiva y por cuatro ocasiones de 7 días cada uno. Posteriormente, el extracto se filtró y concentró a presión reducida a 40°C en un rotaevaporador (marca Buchi Water Bath) acoplado a una bomba de vacío (marca Buchi Vac-513), y a un recirculador ECO 20. Una vez obtenido el extracto libre de disolvente fue sometido a evaluación biológica

### ***III. Fraccionamiento químico***

#### ***III.1 Fraccionamiento primario del extracto crudo***

Este proceso se realizó por cromatografía en columna de fase normal (CC-FN), utilizando 1050 g de silica gel 60 (0.063-0.2 mm, Merck) como fase estacionaria, y disolventes (J.T. Baker) con grado creciente de polaridad (Hex, CHCl<sub>3</sub>, MeOH y mezcla de ellos) como fase móvil. En la columna se sembraron 35 g del extracto hexánico de *A. elegans*. Mediante este proceso se recolectaron 171 fracciones que fueron reunidas en 15 grupos (Ae1-Ae15) de acuerdo al perfil cromatográfico observado en cromatografía en capa fina (ccf).

Los eluyentes empleados, las fracciones recolectadas y reunidas, pesos, rendimientos, así como sus respectivas claves se describen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Fraccionamiento primario del extracto hexánico de *A. elegans*

Sistema de elución	Fracciones		Peso (g)	Rendimiento (%)	Clave final
	Colectadas	Reunidas			
Hex 100%	1-41	1-10	0.069	0.199	Ae1
		11-19	0.010	0.028	Ae2
		20-42	0.018	0.052	Ae3
Hex:CHCl <sub>3</sub> 98:2	42-51	43-54	0.092	0.263	Ae4
Hex:CHCl <sub>3</sub> 95:5	52-55				
Hex:CHCl <sub>3</sub> 90:10	56-83	55-62	0.069	0.196	Ae5
		63-70	0.149	0.427	Ae6
		71-79	0.115	0.329	Ae7
Hex:CHCl <sub>3</sub> 85:15	84-94	80-88	0.434	1.241	Ae8
		89-94	0.258	0.737	Ae9
Hex:CHCl <sub>3</sub> 80:20	95-105	95-107	0.322	0.920	Ae10
Hex:CHCl <sub>3</sub> 70:30	106-119	108-127	1.816	5.187	Ae11
Hex:CHCl <sub>3</sub> 60:40	120-141				
Hex:CHCl <sub>3</sub> 50:50	142-153				
Hex:CHCl <sub>3</sub> 30:70	154-160	143-160	0.669	1.912	Ae13
CHCl <sub>3</sub> 100%	161-165	161-166	14.1098	40.314	Ae14*
CHCl <sub>3</sub> :MeOH 50:50	166-169	167-171	5.8704	16.773	Ae15
MeOH 100%	170-171				

\*Muestra sometida a fraccionamiento secundario y evaluación biológica

Durante este proceso se realizaron ccf comparativas con referencias de licarina B, eupomatenoides 7 y (-)-licarina A, previamente obtenidos del extracto hexánico de *A. taliscana* (**Valdovinos, 2009; Calderón, 2008; León, 2005; Luna, 2005;**) de cada una de las fracciones, para determinar la presencia de éstos. En la fracción Ae14 se detectó la presencia de 2 compuestos diferentes a las referencias empleadas, por lo que fue sometida a evaluación antimicrobiana.

### III.2 Fraccionamiento secundario de la fracción Ae14

Dada la actividad antimicrobacteriana *in vitro* de la fracción primaria Ae14, 13 gramos fueron sometidos a una CC-FN, empacada con 390 g de silica gel y eluida con mezclas de disolventes con grado creciente de polaridad (Hex:CHCl<sub>3</sub> y CHCl<sub>3</sub>:MeOH 100→0), obteniéndose 95 fracciones de 450 mL cada una, que fueron reunidas en 13 grupos con base en su perfil cromatográfico observado en ccf, ver Tabla 3.

**Tabla 3.** Fraccionamiento secundario de la fracción Ae14

Sistema de elución	Fracciones		Peso (g)	Rendimiento (%)	Clave final
	Colectadas	Reunidas			
CHCl <sub>3</sub> :Hex 60:40	1-27	1	0.0092	0.071	Ae 14·1
		2	0.0112	0.086	Ae 14·2
		3-5	0.0696	0.535	Ae 14·3
		6-7	0.0105	0.081	Ae 14·4
		8-13	0.0304	0.234	Ae 14·5
		14-19	0.8193	6.302	Ae 14·6
CHCl <sub>3</sub> :Hex 70:30	28-35	20-33	1.3519	10.399	Ae 14·7*
CHCl <sub>3</sub> :Hex 80:20	36-46	34-46	0.7491	5.762	Ae 14·8*
CHCl <sub>3</sub> :Hex 90:10	47-59	47-64	3.2391	25.811	Ae 14·9*
CHCl <sub>3</sub> 100%	60-68	65-68	0.3841	2.955	Ae 14·10
CHCl <sub>3</sub> :MeOH 90:10	69-79	69-70	2.5997	19.998	Ae 14·11
		71-83	1.4897	11.459	Ae 14·12
CHCl <sub>3</sub> :MeOH 75:25 →0:100	80-87	84-95	2.0296	15.612	Ae 14·13
	88-93				
	94-95				

\*Fracciones sometidas a fraccionamiento terciario y evaluación biológica

Durante el proceso de fraccionamiento se realizaron ccf comparativas con compuestos de referencia [(-)-licarina A, licarina B y eupomatenoide 7]; sin embargo, en las fracciones secundarias Ae14·7-Ae14·9 se detectaron compuestos con Rf diferentes.

En las fracciones secundarias Ae14·7 y Ae14·8 se observó la presencia de un compuesto mayoritario denominado 9-7I y en la

fracción Ae14·9 se observó la mezcla de los compuestos 9-7H y 9-7I. Estas fracciones fueron sometidas a evaluación biológica y a proceso de purificación.

#### **IV. Purificación del compuesto 9-7H**

La mezcla de compuestos (9-7H y 9-7I) presentes en la fracción Ae14·9 fue sometida a un proceso de purificación mediante CC-FN, empacada con 120 g de sílica gel como fase estacionaria y mezclas de disolventes con grado creciente de polaridad como fase móvil (Hex:CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> y CHCl<sub>3</sub>:MeOH). En la columna se sembraron 3 g de muestra, los sistemas de elución empleados, las fracciones recolectadas y reunidas de acuerdo a su perfil cromatográfico, clave final, pesos y rendimientos se encuentran registrados en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Fraccionamiento terciario de la fracción Ae14·9

Sistema de elución	Fracciones		Peso (g)	Rendimiento (%)	Clave final
	Colectadas	Reunidas			
CHCl <sub>3</sub> :Hex 50:50	1-26	1-6	0.0179	0.596	Ae14·9-1
		7-12	0.0052	0.173	Ae14·9-2
		13-20	0.0148	0.493	Ae14·9-3
CHCl <sub>3</sub> :Hex 55:45	27-53	21-32	0.0095	0.316	Ae14·9-4
		33-41	0.0708	2.360	Ae14·9-5
		42-54	0.1842	6.140	Ae14·9-6
CHCl <sub>3</sub> 100%	54-56	55-56	1.0801	36.003	Ae14·9-7*
CHCl <sub>3</sub> :MeOH 75:25 → 50:50	57	57-58	0.234	7.800	Ae14·9-8
	58				

\*Fracción sometida a recristalización por par de disolventes y evaluación biológica

En la fracción terciaria Ae14·9-7 (1 g) se concentró el compuesto 9-7H en forma impura, por lo que se sometió a un proceso de recristalización por par de disolventes para purificar el compuesto. Se realizaron lavados consecutivos con hexano bidestilado (3 x 3 mL); éstos lavados fueron retirados como aguas madres (solución que

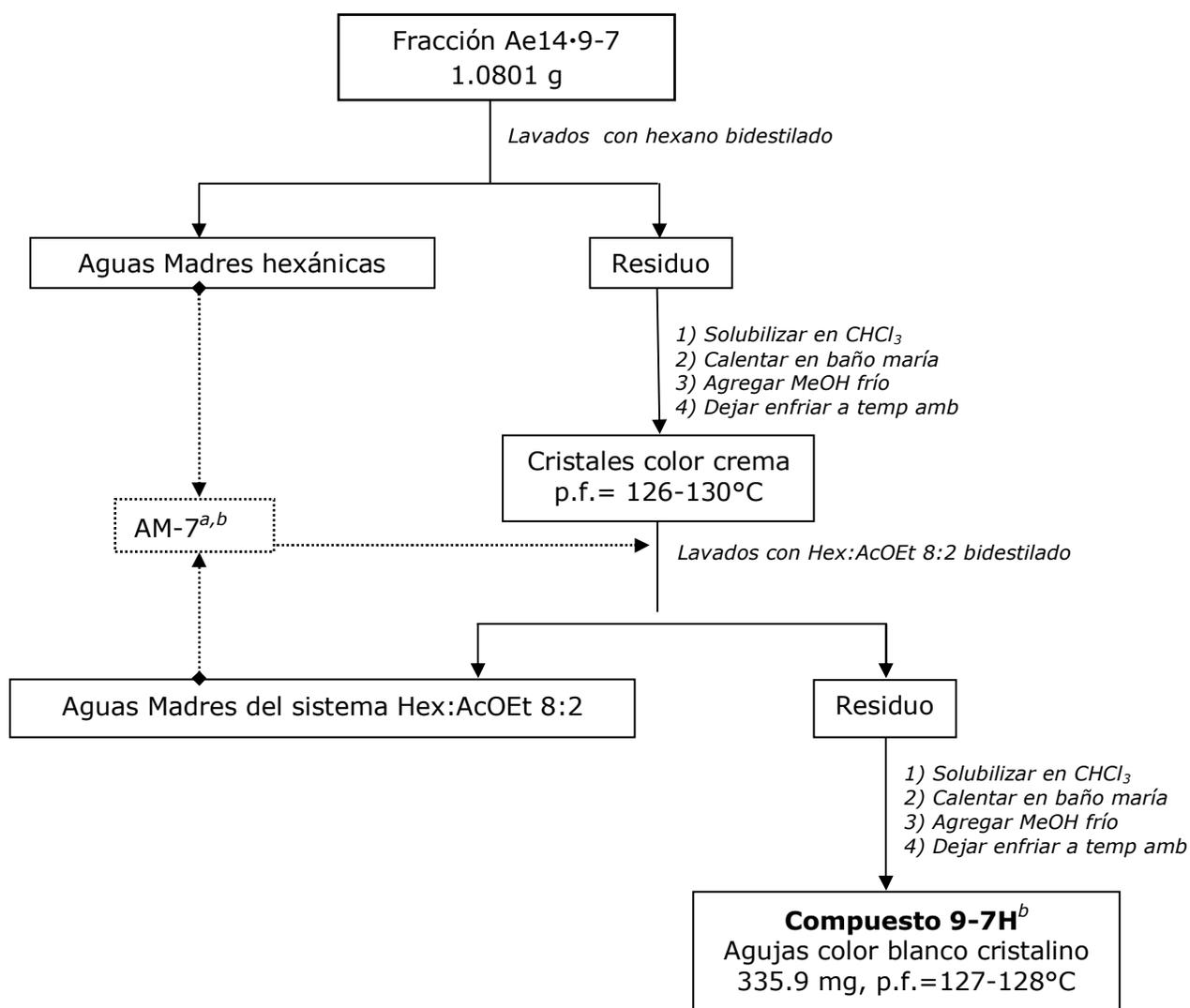
contiene impurezas y trazas del compuesto 9-7I), el residuo se solubilizó en 2.0 mL de  $\text{CHCl}_3$  bidestilado y se calentó unos minutos en baño maría; posteriormente, se adicionaron 2.0 mL de metanol frío y finalmente se dejó enfriar a temperatura ambiente, obteniendo así cristales de color crema con p.f. de 126-130°C (Diagrama 1).

Al realizar un análisis en ccf, se observó que los cristales estaban impuros por lo que fueron sometidos a una serie de lavados con el sistema Hex:AcOEt 8:2 bidestilado (3 x 3 mL); los lavados fueron retirados como aguas madres (solución que contiene impurezas y trazas del compuesto 9-7I). El residuo resultante se solubilizó nuevamente en 2.0 mL de  $\text{CHCl}_3$  bidestilado y se calentó unos minutos en baño maría para posteriormente adicionar 2.0 mL de metanol frío dejándose enfriar a temperatura ambiente, obteniéndose 335.9 mg de compuesto puro en forma de agujas de color blanco cristalinos con p.f. de 127-128°C (Diagrama 1).

Las aguas madres resultantes de los lavados con Hex y con Hex:AcOEt fueron sometidas a un análisis en ccf, observándose similitud por lo que fueron reunidas (AM-7). Posteriormente, esta muestra fue tratada en forma similar para recuperar las trazas del compuesto 9-7H (Diagrama 1). El compuesto puro y aguas madres fueron sometidas a evaluación antimicobacteriana. Cabe mencionar que en AM-7 (810 mg) estaba presente el compuesto 9-7I, por lo que fue sometida a un fraccionamiento secundario en columna con la finalidad de purificarlo. Mediante este proceso se obtuvieron 7 grupos de fracciones terciarias con grado creciente de polaridad (Tabla 5). En la fracción terciaria A9-7-4 se observó la presencia del compuesto 9-7I, al realizar ccf. Mediante análisis en HPLC y recromatografía en columna de fase normal se logró obtener 90.8 mg del compuesto en forma impura.

**Tabla 5.** Fraccionamiento químico de la mezcla AM-7.

Sistema de elución	Fracciones		Peso (g)	Rendimiento (%)	Clave final
	Colectadas	Reunidas			
Hex: CHCl <sub>3</sub> 50:50	1-57	1-4	0.0023	0.284	A9-7-1
		5-7	0.0233	2.877	A9-7-2
		8-20	0.0049	0.605	A9-7-3
		21-38	0.0908	11.210	A9-7-4
		39-50	0.1013	12.506	A9-7-5
CHCl <sub>3</sub> : Hex 60:40	58-70	51-66	0.1813	22.383	A9-7-6
CHCl <sub>3</sub> : Hex 80:20	71-74	67-77	0.1596	19.704	A9-7-7

**Diagrama 1.** Proceso de recristalización del compuesto 9-7H presente en la fracción terciaria Ae14-9-7

(<sup>a</sup>) Fraccionamiento químico para obtener el compuesto 9-7I

(<sup>b</sup>) Sometidas a evaluación biológica

### V. Purificación del compuesto 9-7I

Las fracciones Ae14·7 y Ae14·8 que presentaban el compuesto mayoritario 9-7I fueron sujetas a un análisis mediante ccf y presentaron un perfil cromatográfico similar por lo que fueron reunidas en una fracción denominada Ae7/8

La fracción Ae7/8 (2 g) fue sometida a una CC-FN, (empacada con 80 g de sílica gel y eluida con mezclas de disolventes con grado creciente de polaridad), obteniéndose 81 fracciones de 165 mL c/u, que se reunieron en 10 grupos con base en su perfil cromatográfico, ver Tabla 6.

**Tabla 6.** Fraccionamiento terciario de la fracción Ae7/8

Sistema de elución	Fracciones		Peso (g)	Rendimiento (%)	Clave final
	Colectadas	Reunidas			
Hex:CHCl <sub>3</sub> 70:30	1-16	1-9	0.0103	0.515	Ae7/8-1
		10-21	0.0120	0.600	Ae7/8-2
Hex:CHCl <sub>3</sub> 60:40	17-47	22-26	0.0377	1.885	Ae7/8-3
		27	0.0101	0.505	Ae7/8-4
		28-33	0.5040	25.20	Ae7/8-5
		34-43	0.1922	9.510	Ae7/8-6
		44-56	0.1038	5.190	Ae7/8-7
Hex:CHCl <sub>3</sub> 50:50	48-63	57-61	0.1042	5.210	Ae7/8-8
CHCl <sub>3</sub> :Hex 60:40	64-68	62-71	0.8493	42.465	Ae7/8-9*
CHCl <sub>3</sub> 100%	69-78	72-81	0.2907	14.535	Ae7/8-10
CHCl <sub>3</sub> :EtOH 90:10	79-81				

\*Fracción sometida a procesos de purificación

El compuesto mayoritario se concentró en la fracción Ae7/8-9 (0.8 g) y fue sometido nuevamente a un proceso de purificación mediante

CC-FN, utilizando 26 g de silica gel como fase estacionaria y mezclas de Hex:AcOEt 100→0 como fase móvil.

Los sistemas de elución empleados, las fracciones recolectadas y reunidas de acuerdo a su perfil cromatográfico, clave final, pesos y rendimientos se encuentran registrados en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Purificación del compuesto 9-7I mediante CC-FN

Sistema de elución	Fracciones		Peso (g)	Rendimiento (%)	Clave final
	Colectadas	Reunidas			
Hex:AcOEt 90:10	1-67	1-7	0.0122	1.436	Ae7/8-9-1
		8-24	0.0836	9.843	Ae7/8-9-2
		25-29	0.0149	1.750	Ae7/8-9-3 <sup>b</sup>
		30-49	0.6807	80.15	Ae7/8-9-4*
Hex:AcOEt 80:20	68-77	50-90	0.0574	6.760	Ae7/8-9-5 <sup>b</sup>
Hex:AcOEt 50:50	78-85				
AcOEt 100%	86-90				

\* Fracción purificada por HPLC y lavados con hexano bidestilado para obtención de 9-7I

<sup>b</sup> Fracciones reunidas para obtención del compuesto 9-7I

En la fracción Ae7/8-9-4 se detectó el compuesto 9-7I (680.7 mg) en forma impura por lo que parte de la fracción (30 mg) fue purificada por HPLC y otra parte mediante una serie de lavados consecutivos con hexano bidestilado (3 x 3 mL); los lavados fueron retirados como aguas madres (solución que contiene impurezas y trazas del compuesto 9-7I) y el residuo fue sometido a ccf bidimensional eluída con el sistema Hex:AcOEt 50:50 y revelada con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%, observándose el compuesto 9-7I puro con R<sub>f</sub> de 0.56 (Diagrama 2). Mediante estos procesos se obtuvieron 17.7 mg (por HPLC) y 590 mg (por lavados con hexano) del compuesto puro en forma de polvo blanco, con p.f. 69-70 °C.

El análisis por HPLC del compuesto 9-7H y 9-7I se realizó empleando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC, marca

Waters) utilizando un controlador Waters 600 acoplado a un detector de arreglo de diodos Waters 960 y un desgasificador Degasit 6324. Para el manejo del equipo se empleo el programa Millenium 32. La muestra fue solubilizada en MeOH ó acetonitrilo a una concentración de 1 mg/mL y 10 mg/mL (compuesto 9-7I) y a una concentración de 120 µg/mL y 2 mg/mL (compuesto 9-7H), para la columna analítica y semipreparativa, respectivamente. Las condiciones para cada caso se describen en las Tablas 8 y 9.

**Tabla 8.** Condiciones analíticas y semipreparativas en HPLC para purificación del compuesto 9-7I

<b>COMPUESTO 9-7I</b>	<b>CONDICIONES ANALÍTICAS</b>	<b>CONDICIONES SEMIPREPARATIVAS</b>
Fase estacionaria	Columna Spherisorb Analítica ® S100DS2 4.6X250, 10 µm	Columna C18 semipreparativa RP Spherisorb S10 ODS 210X250 mm (Waters)
Fase móvil	Sistema isocrático MeOH 100% (grado HPLC)	Sistema isocrático MeOH 100% (grado HPLC)
Flujo (mL/min)	0.3	1
Vol. inyección (µL)	25	50
Concentración (mg/mL)	1	10
Tiempo de corrida (min)	30	20
λ (nm)	280	220

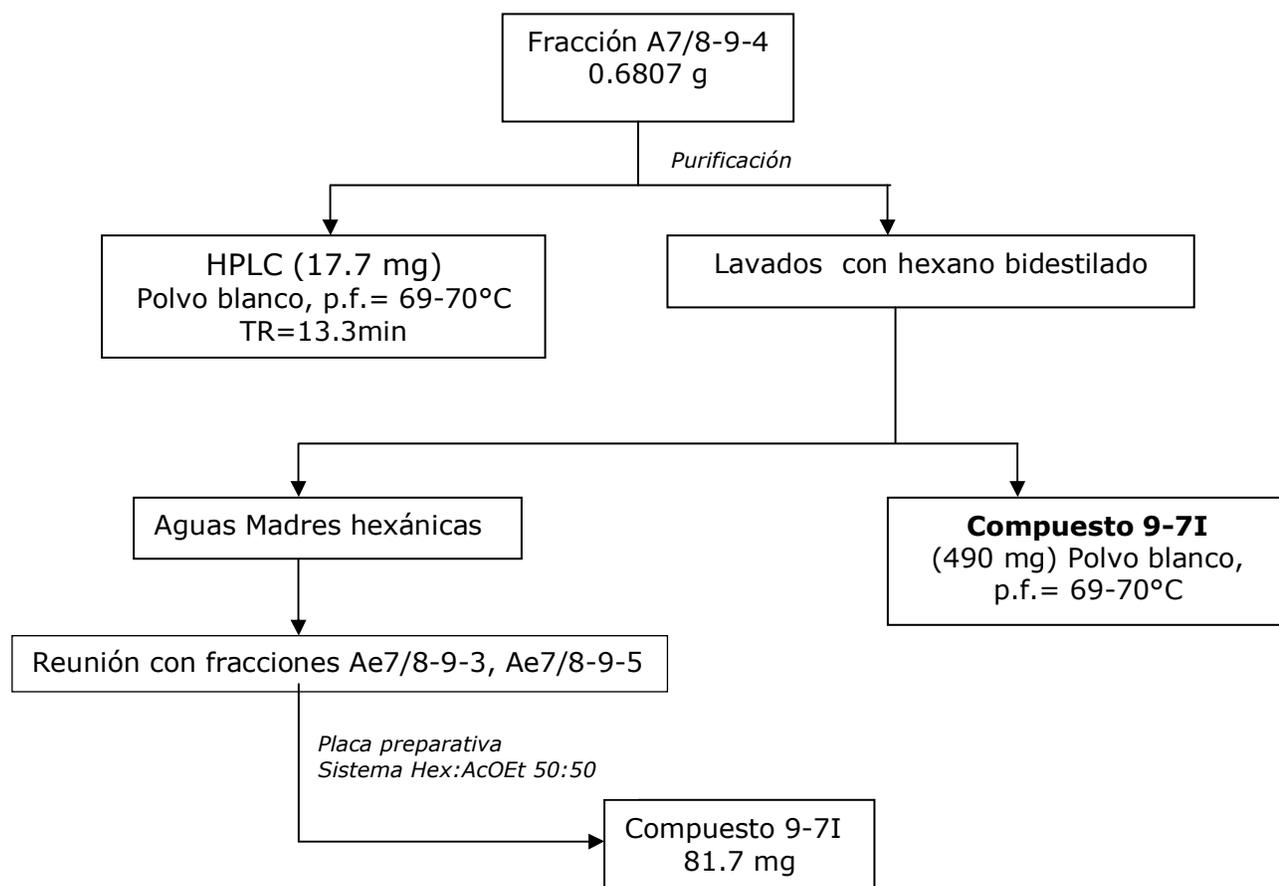
**Tabla 9.** Condiciones analíticas y semipreparativas en HPLC para purificación del compuesto 9-7H

<b>COMPUESTO 9-7H</b>	<b>CONDICIONES ANALÍTICAS</b>	<b>CONDICIONES SEMIPREPARATIVAS</b>
Fase estacionaria	Columna Spherisorb Analítica ® S100DS2 4.6X250, 10 µm	Columna C18 semipreparativa RP Spherisorb S10 ODS 210X250 mm (Waters)
Fase móvil	Sistema isocrático MeOH 100% (grado HPLC)	Sistema isocrático MeOH 100% (grado HPLC)
Flujo (mL/min)	0.3	1
Vol. inyección (µL)	20	100
Concentración	120 µg/mL	2 mg/mL
Tiempo de corrida (min)	30	60
λ (nm)	280	220

En el caso del compuesto 9-7I se realizó la colecta del pico con TR de 13.3 min, el disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo obtenido fue pesado y sometido a ccf bidimensional eluída con el sistema Hex:AcOEt 50:50 y revelada con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% (en donde se observó la presencia de una sola mancha). Además, se realizó una ccf comparativa (con el compuesto 9-7I obtenido anteriormente mediante lavados con hexano) mostrando gran similitud por lo que fueron reunidas. Los compuestos puros 9-7I y 9-7H se identificaron mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos.

#### **VI. Enriquecimiento del compuesto 9-7I**

Con la finalidad de obtener cantidad adicional del compuesto 9-7I, se realizó una reunión con base en su perfil cromatográfico de las fracciones Ae7/8-9-3, Ae7/8-9-5 (Tabla 7) y las aguas madres de la fracción Ae7/8-9-4 (Diagrama 2). Esta muestra fue sujeta a placas preparativas de silica gel (20x20 cm de vidrio recubierta de silica gel 60 F254; Merck), utilizando como sistema de elución Hex:AcOEt 50:50. Una vez eluídas las placas, se observaron al UV a 220 nm y se procedió a desadsorber con CHCl<sub>3</sub> tridestilado el producto con un R<sub>f</sub>= 0.56. La pureza del compuesto 9-7I se verificó en ccf utilizando como sistema Hex:AcOEt 50:50, empleando como agente revelador H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%, observándose que el producto final presentaba un R<sub>f</sub>= 0.56. Mediante este procedimiento se obtuvieron 81.7 mg adicionales del compuesto 9-7I.

**Diagrama 2.** Purificación y enriquecimiento del compuesto 9-7I

### VII. Obtención del estigmastan-3,5-dieno y eupomatenoido 1

De manera adicional, en la fracciones primarias Ae6-Ae7 (Tabla 1) se detectó la presencia de dos compuestos de baja polaridad, los cuales fueron comparados con las referencias de estigmastan-3,5-dieno y eupomatenoido 1, previamente aisladas de la especie *A. taliscana* (Calderón, 2008) y con la finalidad de purificarlos, parte de la fracción Ae7 (38.2 mg) fue sometida a cromatografía de tipo preparativa. Para ello se emplearon placas de silica gel de 20x20 cm y como sistema de elución Hex:CHCl<sub>3</sub> 70:30; mediante éste proceso se obtuvieron 17.7 mg de estigmastan-3,5-dieno y 17.4 mg de eupomatenoido 1, los cuales presentaron un R<sub>f</sub> de 0.50 y 0.13, respectivamente. La pureza de los

compuestos se verificó en ccf utilizando como sistema Hex:CHCl<sub>3</sub> 70:30 y revelando con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%. La identificación química de los compuestos se realizó por análisis de sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H y EM-IE.

### **VIII. Determinaciones químicas**

A los compuestos puros se les determinó la apariencia, solubilidad y su punto de fusión utilizando el equipo Fisher-Johns y un equipo digital (Buchi® B-450), y se reportan sin corregir. El R<sub>f</sub> de cada compuesto se determinó en ccf empleando el sistema CHCl<sub>3</sub> para 9-7H y el sistema Hex:AcOEt 50:50 para el 9-7I. La identificación química de los compuestos se realizó mediante el análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear protónica de 300 MHz (RMN-<sup>1</sup>H), resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN-<sup>13</sup>C), infrarrojo (IR), ultravioleta (UV), dicroísmo circular (DC), rotación óptica (RO) y espectrometría de masas por impacto electrónico (EM-IE), respectivamente. Los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C se determinaron en un espectrómetro Bruker-Avance de 300 MHz, empleando tetrametilsilano como referencia interna y el compuesto se solubilizó en cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>). Los espectros de masas por IE se determinaron en un espectrómetro Jeol AX505HA y los espectros de IR se determinaron en un espectrómetro Bruker Mod Tensor 27, en pastilla de KBr. La RO se determinó en un polarímetro Perkin-Elmer 343 a 25°C y el compuesto se solubilizó en CHCl<sub>3</sub>. El análisis de DC se realizó en un espectropolarímetro JASCO J720 a 25°C en MeOH y el análisis de UV en un Shimadzu U160.

La pureza de los compuestos se determinó empleando cromatoplasmas de sílica gel 60 con indicador de fluorescencia F<sub>254</sub>, (marca Merck). La cromatografía en columna de fase normal se realizó sobre Kiesel Gel 60 (0.063-0.200 mm, malla 70-230 ASTM, marca

Merck). Los disolventes orgánicos empleados fueron marca J.T. Baker grado R.A. destilados y bidestilados

### **IX. Ensayo biológico**

Para evaluar la actividad antimicobacteriana se emplearon dos cepas de micobacterias: (1) *M. tuberculosis* H37Rv cepa sensible a los cinco fármacos de primera línea (I, R, E, S y Z), (2) *M. tuberculosis* CIBIN UMF/15:99 cepa MFR, resistente a fármacos de primera línea.

La evaluación de la actividad antimicobacteriana de las muestras (extracto, fracciones, aguas madres, compuestos puros) se determinó mediante el micrométodo colorimétrico de alamar azul (MABA). Este método se emplea para determinar la susceptibilidad o resistencia de *M. tuberculosis* y otras micobacterias a sustancias con actividad antimicobacteriana de origen natural y /o sintético (**Jiménez-Arellanes et al., 2003; Collins y Franzblau, 1997**). Las ventajas que posee esta prueba son: alta sensibilidad, rápida, sencilla, reproducible y de bajo costo (**Acosta et al., 2004; Caviedes et al., 2002; Yajko et al., 1995**).

El ensayo biológico se llevó a cabo en microplacas estériles de 96 pozos con tapa y de fondo plano. A los pozos de la orilla se les adicionó 100 µL de agua bidestilada, con la finalidad de mantener la humedad de la placa durante el proceso de incubación. Los 60 pozos restantes de la placa (10 hileras de 6 pozos cada una) sirven para evaluar seis concentraciones seriadas de los compuestos (de 100 a 3.13 µg/ml) y los controles. En cada caso se incluyeron tres controles [uno de microorganismo, uno de disolvente y un control positivo (R)]. En cada pozo se colocaron 100 µL de medio Middlebrook 7H9, 100 µL de la muestra a evaluar (extracto, fracción ó compuesto), a partir de este pozo se realizan las diluciones seriadas, por último se agregan 100 µL

de la suspensión bacteriana ( $6 \times 10^6$  UFC/mL). Una vez inoculadas las placas, se taparon, sellaron e incubaron a 37 °C durante cinco días, después de este tiempo se adicionó 20 µL de tween 80 y 20 µL de alamar azul (indicador redox) al control sin compuesto, prolongando la incubación durante 24 h más. Si el crecimiento de la micobacteria es óptimo en este control, se observa un cambio de color, de azul (estado oxidado) a rosa (estado reducido). Al observar este cambio de coloración, se agregó el alamar azul (20 µL) y el tween 80 (20 µL) al resto de los pozos, incluyendo el resto de los controles, nuevamente las placas fueron reincubadas a 37 °C durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se determina la CMI con base en el cambio de coloración del indicador redox. Se consideran compuestos activos aquellos cuya CMI sea  $<50$  µg/mL.

#### **X. Toxicidad subaguda de (±)-licarina A**

Para este ensayo biológico se utilizaron ratones Balb/C ( $20 \pm 2$  g) que fueron seleccionados en forma aleatoria para formar 3 grupos de 5 animales c/u; el grupo I fue el testigo, el grupo II el control del vehículo (aceite de olivo extravirgen, marca Sigma) y al grupo III se le administró (±)-licarina A (concentración de 5 veces la CMI *in vitro*) por vía subcutánea durante 25 días, cada tercer día, solubilizada en aceite de olivo extravirgen.

Los animales fueron pesados y marcados al inicio del experimento y semanalmente; además, durante el periodo de tratamiento se mantuvieron en observación. Cada grupo de animales, se colocó en cajas independientes y se mantuvieron en el Bioterio del CMN Siglo XXI, a una temperatura de 27°C con un ciclo de 12 h de luz/oscuridad y con acceso libre al alimento y agua. El manejo de los animales de experimentación fue apegado a los estatutos del Comité Internacional

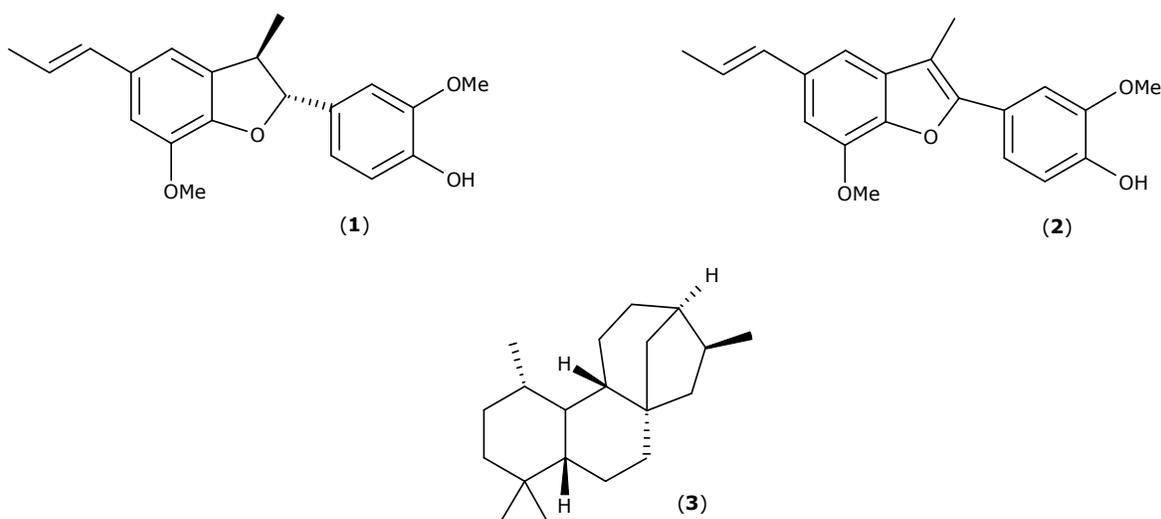
para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) y a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) revisada en 2001. Al finalizar el estudio, los animales se pesaron y se anestesiaron vía intramuscular con clorhidrato de ketamina (50 mg/kg de peso) y clorhidrato de xilazina (5 mg/kg) administrado en una sola dosis, para posteriormente tomar una muestra de sangre (1 mL) que se colocó en un tubo con heparina (Microvette 500 LH, Sarstedt) para realizar análisis de biometría hemática (BH).

En el análisis hematológico se determinaron los siguientes parámetros: ERI=eritrocitos, Hb=hemoglobina, Hto=hematocrito, VCM=volumen corpuscular medio, CHCM= concentración de hemoglobina corpuscular media, PLA=plaquetas, LEU=leucocitos, LIN=linfocitos, SEG=segmentados, EOS= eosinófilos, MON=monocitos, BAN=bandas y BAS=basófilos

*Análisis estadístico.* Los resultados de la BH fueron analizados utilizando el programa Sigma Stat 3.5 y se reportan como media (M)  $\pm$  error estándar de la media (E.S.M) y la significancia estadística se determinó por ANOVA con una  $p < 0.05$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En un estudio preliminar se evaluaron los extractos hexánico y metanólico de las hojas/tallos, rizoma y semilla de *A. elegans*, encontrándose que ambos extractos inhibieron el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv, en un 99.87 y 90.10 % respectivamente, al ser evaluados por el método radiorespirométrico Bactec 460 a la concentración de 100 µg/mL (**León, 2005**). El extracto más activo se sometió a un fraccionamiento químico biodirigido permitiendo obtener licarina A (**1**) (CMI= 25 µg/mL), eupomatenoide 7 (**2**) (CMI= 6.25 µg/mL) y *ent*-kaureno (**3**) (CMI no determinada) [Figura 4], evaluados por el mismo método. Los dos primeros compuestos también fueron aislados de *A. taliscana* (**Calderón, 2008; León, 2005; Luna, 2005**).



**Figura 4.** Compuestos aislados del extracto hexánico de *A. elegans* (**León, 2005**)

Con la finalidad de continuar con el estudio químico biológico del extracto hexánico del rizoma de *A. elegans* se desarrolló el presente trabajo para obtener los compuestos responsables de la actividad antimicobacteriana. Como primer paso, se obtuvo el extracto hexánico a partir del rizoma de *A. elegans* (35 g de extracto crudo, rendimiento del

4.8%) colectado en el estado de Oaxaca; el resultado de la evaluación antimicobacteriana *in vitro* del extracto por el método MABA demostró que éste no inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv (CMI >100 µg/mL) y presenta una moderada actividad contra una cepa MFR (*M. tuberculosis* CIBIN-UMF/15:99, resistente a los cuatro fármacos de primera línea), cuya CMI= 50 µg/mL. Posterior a la evaluación del extracto, se procedió a realizar un fraccionamiento químico con la finalidad de obtener los compuestos responsables del efecto biológico.

### **I. Fraccionamiento primario del extracto crudo**

Mediante este proceso se obtuvieron 15 grupos de fracciones primarias con grado creciente de polaridad, las cuales fueron reunidas de acuerdo a su perfil cromatográfico en ccf. En la Tabla 10 se describen la clave de las fracciones, así como los compuestos detectados. Cabe mencionar, que algunos compuestos fueron identificados por comparación de su R<sub>f</sub> en ccf, con muestras previamente aisladas del extracto hexánico y metanólico de *A. taliscana* (**Calderón, 2008; León, 2005; Luna, 2005**).

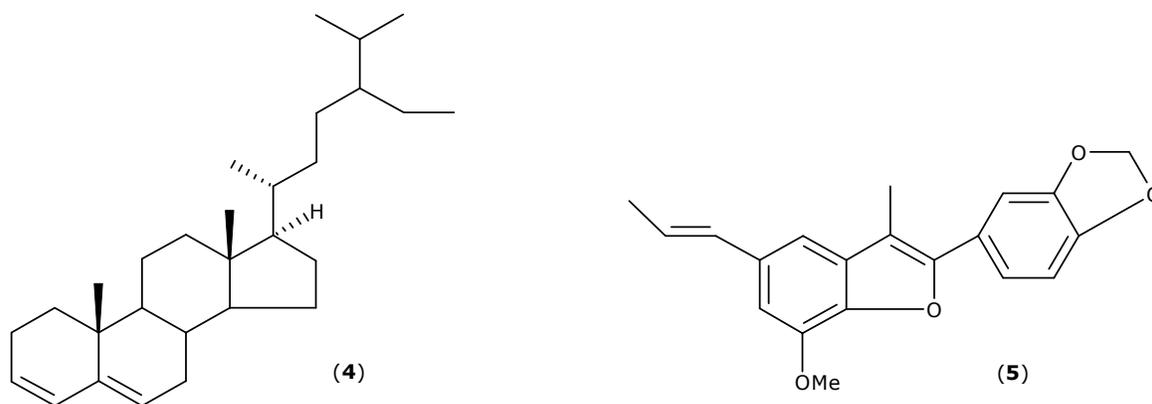
**Tabla 10.** Resultados del fraccionamiento primario del extracto hexánico de *A. elegans*

Fracción	Peso (g)	Rendimiento (%)	Compuestos aislados (numero)
Ae1	0.069	0.199	ceras
Ae2	0.010	0.028	
Ae3	0.018	0.052	
Ae4	0.092	0.263	
Ae5	0.069	0.196	Estigmastan-3,5-dieno ( <b>4</b> )
Ae6	0.149	0.427	Estigmastan-3,5-dieno ( <b>4</b> ) y eupomatenoide 1 ( <b>5</b> )
Ae7	0.115	0.329	
Ae8	0.434	1.241	eupomatenoide 1 ( <b>5</b> )
Ae9	0.258	0.737	
Ae10	0.322	0.920	
Ae11	1.816	5.187	β-sitosterol ( <b>6</b> )
Ae12	1.218	3.479	

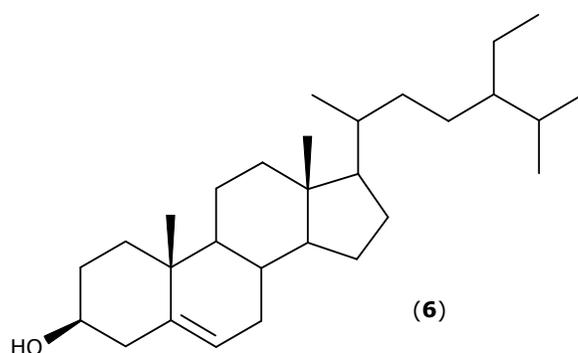
Ae13	0.669	1.912	
Ae14	14.1098	40.314	Comp 9-7H y 9-7I ( <b>7 y 8</b> )
Ae15	5.8704	16.773	-----

## II. Obtención del estigmastan-3,5-dieno y eupomatenoide 1

Como se muestra en la Tabla 10 en las fracciones de baja y mediana polaridad se detectó principalmente estigmastan-3,5-dieno (**4**), eupomatenoide 1 (**5**) y  $\beta$ -sitosterol (**6**) [Figuras 5 y 6]. A partir de la fracción primaria Ae7 se obtuvieron 17.7 mg de estigmastan-3,5-dieno (**4**) y 17.4 mg de eupomatenoide 1 (**5**); ambos compuestos fueron identificados por comparación de su Rf y de sus espectros de RMN-<sup>1</sup>H y EM-IE con referencias previamente obtenidas (**Calderón, 2008**). El espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Espectro 1) del estigmastan-3,5-dieno (**4**) presenta señales para metilos y metinos de doble ligadura y en el espectro de masas (Espectro 2) se observa el ión molecular en una relación masa carga (m/z) de 396 uma (C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>). Por otro lado, el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del eupomatenoide 1 (Espectro 3) es similar al del eupomatenoide 7 (**2**) aislado de *A. taliscana* (**León, 2005; Calderón 2008**). En el caso del eupomatenoide 1 (**5**) se observa un singulete para metoxilo en  $\delta$  4.03 en lugar de las dos señales en  $\delta$  4.04 y 3.99 que presenta el espectro del eupomatenoide 7 (**2**); además, se observa un singulete en  $\delta$  6.00 que fue asignado a un grupo metilendioxi, esta señal está ausente en el espectro del eupomatenoide 7; el resto de las señales son iguales a las observadas en el espectro del eupomatenoide 7. Respecto al peso molecular, el eupomatenoide 1 (Espectro 4) presenta dos unidades de masa menos que el eupomatenoide 7, siendo el peso molecular para el primero de 322 y para el segundo 324, esta diferencia en el peso molecular confirma la estructura propuesta



**Figura 5.** Compuestos aislados de la fracción primaria Ae7 del extracto hexánico de *A. elegans*



**Figura 6.**  $\beta$ -sitosterol detectado en las fracciones primarias Ae11-Ae13 del extracto hexánico de *A. elegans*

Respecto a la actividad antimicrobacteriana, el eupomatenoide 1 (**5**) y estigmastan-3,5-dieno (**4**) resultaron inactivos (CMI > 100  $\mu\text{g/mL}$ ) contra la cepa de referencia (*M. tuberculosis* H37Rv), estos datos concuerdan con lo previamente descrito para estos dos compuestos aislados del rizoma de *A. taliscana* (**Calderón, 2008**). Por otro lado, ambos compuestos presentaron actividad marginal contra la cepa de *M. tuberculosis* MFR (CIBIN-UMF/15:99) cuya CMI fue de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Es importante resaltar que en la actualidad la búsqueda de compuestos que sean activos contra *M. tuberculosis* MFR es de gran relevancia, debido a que muchas cepas no responden a los tratamientos establecidos; además, se requieren compuestos con mecanismo de acción diferente a

los existentes. Otras actividades biológicas que se han explorado para estos compuestos son, en el caso del eupomatenoides 1 se evaluó su actividad tripanocida resultando inactivo con una CMI > 1000 µg/mL (**Abe et al., 2002**) y en el caso del estigmastan-3,5-dieno no existen reportes que describan otra actividad biológica.

Es importante resaltar que a la fecha no se ha descrito en la literatura la presencia de eupomatenoides 1 (**5**) y estigmastan-3,5-dieno (**4**) en *A. elegans*, ni su actividad antimicrobiana contra cepas MFR, por lo que este trabajo constituye un importante avance en la investigación desde el punto de vista químico de la planta; además se contribuye en la búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana en especies vegetales de México.

La presencia del β-sitosterol (**6**) en las fracciones primaria Ae11-Ae13 se detectó por comparación del Rf en ccf con una referencia, este compuesto es ubicuo, frecuentemente aislado de las plantas y posee diversas actividades biológicas: antifúngica, antimicrobiana, analgésica, antiinflamatoria, antiulcerogénica, hipoglucémica, hipocolesterolemizante (**Singh y Singh, 2003; Aboutabl et al., 2002; Mitaine-Offer et al., 2002; Ovesná et al., 2004**), actividad citotóxica contra las líneas HT-29 (cáncer de colon), LNCaP (cáncer de próstata) y MCA-102 (fibrosarcoma murino) (**Moon et al., 2007; Ovesná et al., 2004**). Otros autores describen que el β-sitosterol muestra moderada actividad antiplaquetaria (**Jin et al., 2004**) y actividad marginal (CMI= 128 µg/ml) contra *M. tuberculosis* H37Rv (**Tan et al., 2008**).

### III. Fraccionamiento secundario de la fracción Ae14

En la fracción primaria Ae14 se detectó la presencia de dos compuestos mayoritarios diferentes a las referencias empleadas denominados como 9-7H y 9-7I, por lo que la fracción fue sometida a evaluación contra *M. tuberculosis* H37Rv y *M. tuberculosis* CIBIN-UMF/15:99, obteniéndose una CMI >100 y 50 µg/mL, respectivamente. Los resultados contra la cepa de referencia y contra la cepa MFR fueron semejantes al observado para el extracto.

Con la finalidad de aislar los compuestos mayoritarios presentes en esta fracción, 13 gramos de la misma fueron sometidos a CC-FN, proceso por el cual se obtuvieron 13 grupos de fracciones secundarias (Tabla 11).

**Tabla 11.** Resultados del fraccionamiento secundario de la fracción Ae·14

Fracción	Peso (g)	Rendimiento (%)	Compuestos detectados
Ae14·1	0.0092	0.071	-----
Ae14·2	0.0112	0.086	-----
Ae14·3	0.0696	0.535	-----
Ae14·4	0.0105	0.081	-----
Ae14·5	0.0304	0.234	-----
Ae14·6	0.8193	6.302	-----
Ae14·7	1.3519	10.399	Compuesto mayoritario 9-7I
Ae14·8	0.7491	5.762	
Ae14·9	3.2391	25.811	Mezcla de 9-7I y 9-7H
Ae14·10	0.3841	2.955	-----
Ae14·11	2.5927	19.998	-----
Ae14·12	1.4897	11.459	-----
Ae14·13	2.0296	15.612	-----

Los compuestos mayoritarios se concentraron en las fracciones secundarias Ae14·7-Ae14·9, por lo que éstas fueron sometidas a evaluación, encontrándose que únicamente Ae14·9 inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. tuberculosis* CIBIN-UMF/15:99. Las CMIs

fueron de 100 y 50  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Las otras dos fracciones (Ae14.7 y Ae14.8) inhibieron moderadamente la cepa de *M. tuberculosis* MFR (Tabla 12).

**Tabla 12.** Actividad antimicobacteriana in vitro de las fracciones secundarias Ae14.7- Ae14.9

Fracción	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. tuberculosis</i> * CIBIN-UMF/15:99
Ae14.7	>100	100
Ae14.8	>100	100
Ae14.9	100	50

#### **IV. Obtención de los compuestos 9-7H y 9-7I**

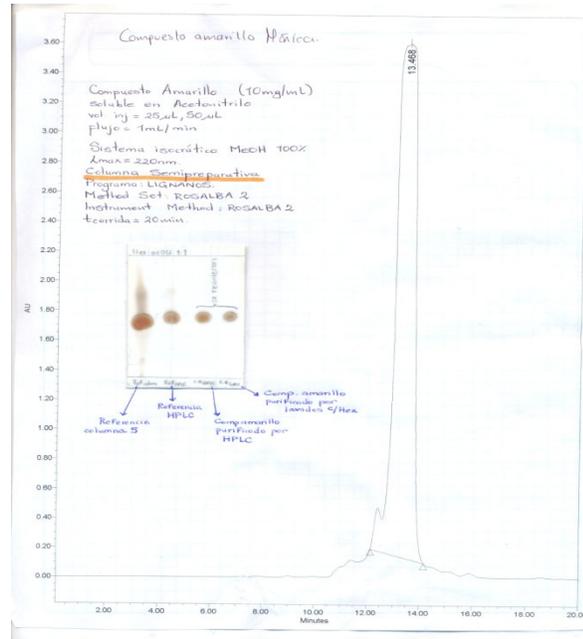
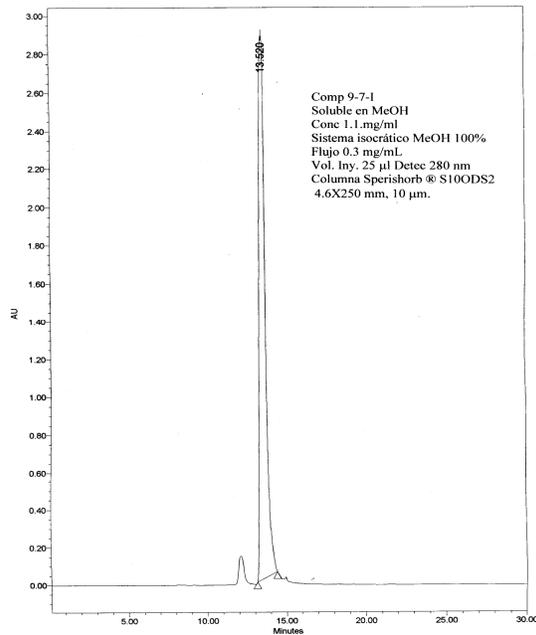
La fracción Ae14.9 presentaba la mezcla de 9-7H y 9-7I, por lo que 3 g de esta fueron sometidos a recromatografía en CC-FN y a proceso de recristalización (ver inciso IV y Diagrama 1, Metodología). Estos procesos permitieron obtener 335.9 mg del compuesto 9-7H puro en forma de agujas color blanco cristalinas, solubles en cloroformo y con un punto de fusión de 127-128 °C. El compuesto 9-7I se obtuvo después de utilizar diversos métodos cromatográficos que incluyeron CC-FN, de tipo preparativa, lavados sucesivos con hexano bidestilado y análisis en HPLC (ver inciso V y Diagrama 2, Metodología); mediante estos procesos se obtuvieron 507.7 mg de compuesto puro, como polvo blanco, soluble en cloroformo y con un punto de fusión de 69-70 °C. Este compuesto presenta un TR de 13.52 (columna analítica) y 13.46 min (columna semipreparativa) [Figura 7] y se detecta a 220 y 280 nm y en ccf presenta un Rf de 0.56 en el sistema Hex:AcOEt 50:50. Por otro lado, el compuesto 9-7H al analizarlo en HPLC, presenta dos picos con TR de 14.03 y 14.85 min [Figura 7], siendo mayoritario el segundo. El

cromatograma se obtuvo a 280 nm; en ccf se observa una sola mancha que presenta un Rf de 0.37 en el sistema CHCl<sub>3</sub> (eluído 3 veces).

(a) Condiciones analíticas

(b) Condiciones semipreparativas

Compuesto 9-7I



Compuesto 9-7H

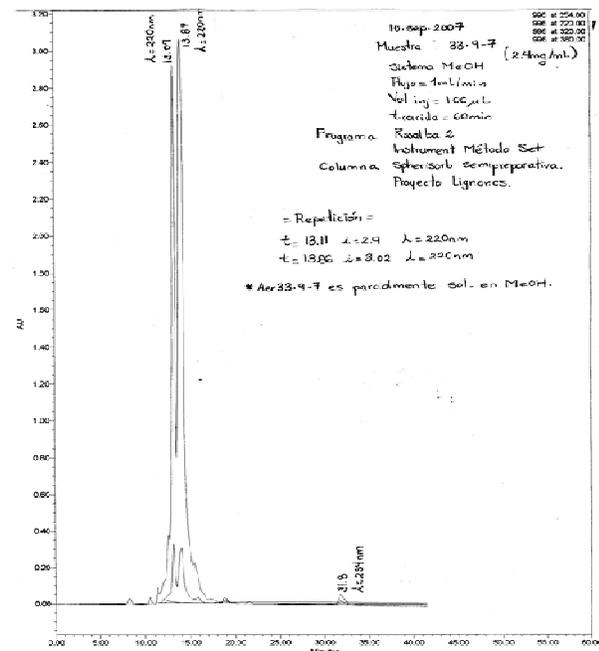
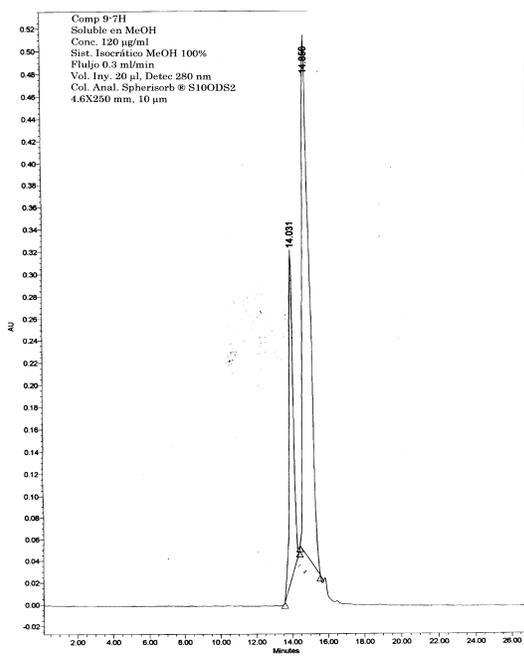
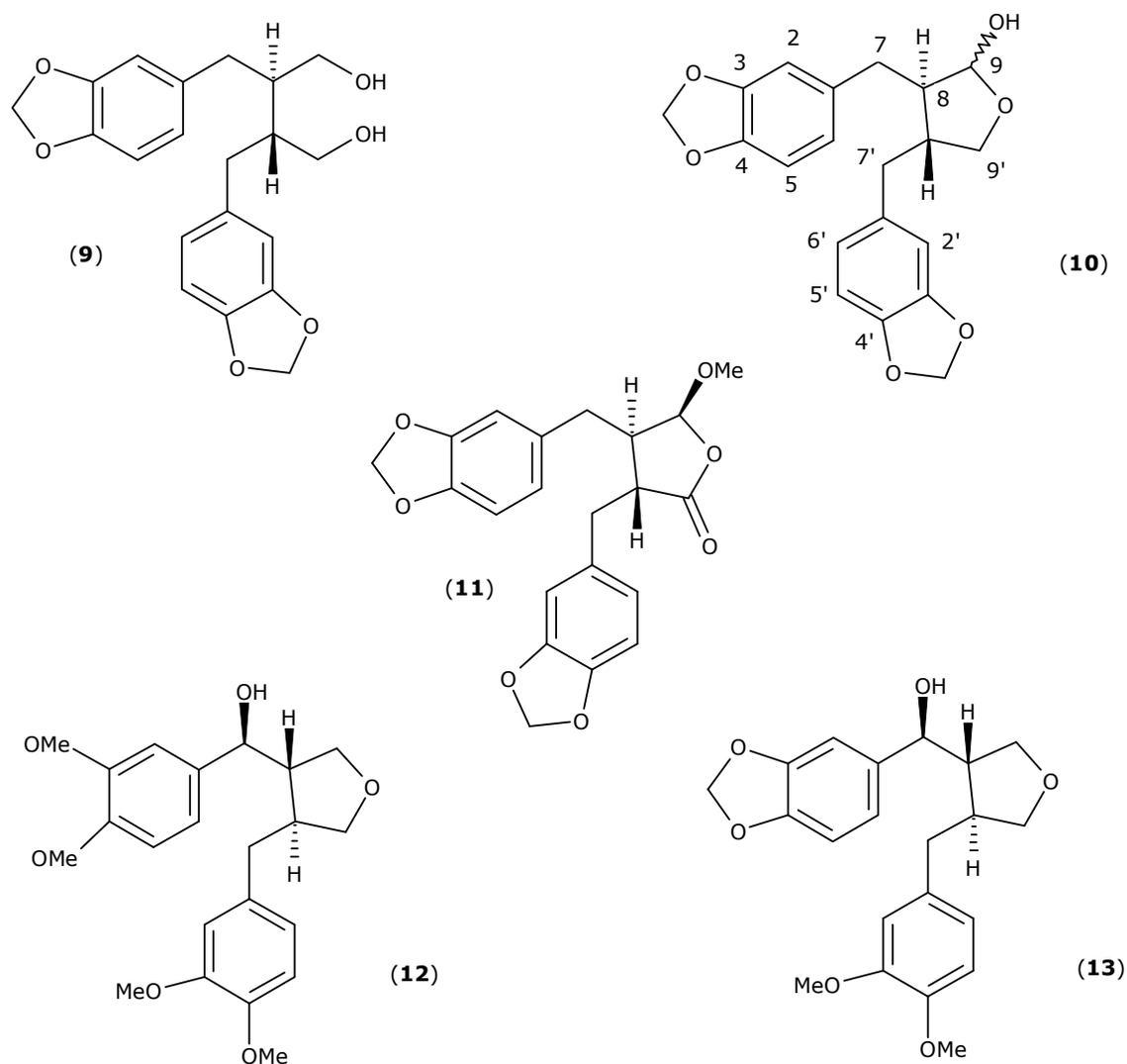


Figura 7. Cromatogramas de los compuestos 9-7I y 9-7H a 280 y 220 nm en HPLC (a) analítica y (b) semipreparativa

La identificación química de los compuestos (9-7H y 9-7I), se realizó mediante el análisis de sus espectros de IR, RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y EM-IE.

En el Infrarrojo ó IR, el producto 9-7H (Espectro 5) presenta bandas en 3365 y 1037.7 cm<sup>-1</sup> que corresponden a su grupo OH, en 2896, 1611, 1492 y 1441.7 cm<sup>-1</sup> se aprecian bandas de estiramiento C-H tanto de tipo aromático como alifático y para C=C aromático y en 1243.8 cm<sup>-1</sup> se observa una banda para C-O de tipo éter. En el espectro de UV se observa que el compuesto absorbe a las longitudes de onda ( $\lambda$ )<sub>MeOH</sub> de 287, 234 y 206 nm (Espectro 6). El espectro de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C (Espectros 7 y 9) presenta señales muy similares a la (-)-hinokina (**9**) y (-)-cubebina (**10**) [Figura 8] obtenida de *A. constricta*, *A. lagesiana*, *A. pubescens* y *A. malmeana* (**Zhang et al., 2008; Messiano et al., 2008; de Pascoli et al., 2006; Wu et al., 2002**) y a la aristelegina A, B y C (**11, 12 y 13**) [Figura 8] obtenidas del rizoma de *A. elegans* (**Wu et al., 2002**). A continuación se describe en forma detallada el análisis de los espectros, los cuales permitieron la identificación química de cada compuesto.



**Figura 8.** Compuestos aislados de diferentes especies de *Aristolochia*

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Espectro 7) se observan las siguientes señales:

- en la zona que comprende de  $\delta$  6.49-6.73 se observan señales que corresponden a los protones aromáticos de los carbonos 2, 5, 6, 2', 5' y 6'.
- en  $\delta$  5.92 y 5.91 se observan dos singuletes, cada uno integra para dos protones, los cuales corresponden a dos metilenos de los grupos metilendioxi que tiene la molécula ubicados en los C-3, C-4,

C-3' y C-4' de la molécula. El desplazamiento de estas señales es idéntico al reportado para la (-)-hinokina (**9**) y (-)-cubebina (**10**).

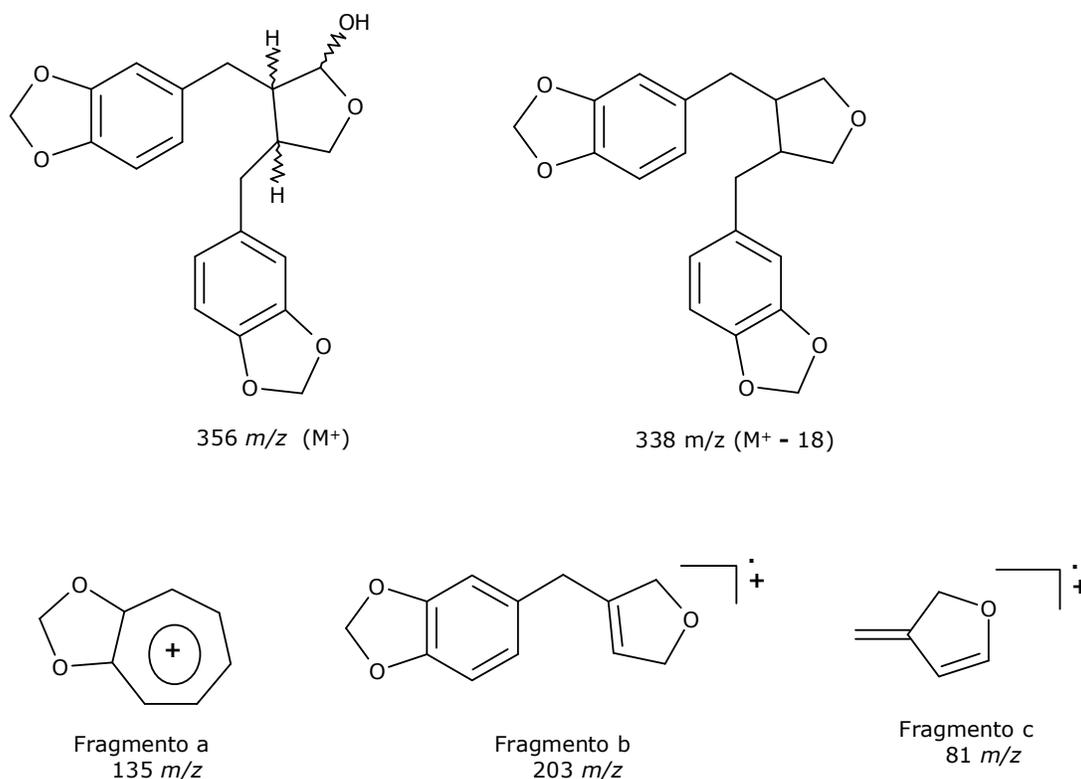
c) Las señales para los protones de los metilenos (H-7, H-7' y H-9') y metinos alifáticos (H-8, H-8' y H-9) se describen a continuación. En  $\delta$  4.09 en forma de doblete dobleteado (dd) con una constante de acoplamiento ( $J$ ) = 8.7 y 6.9, esta una señal asignada al protón  $\alpha$  ubicado en el C-9'. En el espectro COSY, ésta señal muestra correlación con el dd ubicado en  $\delta$  3.78 ( $J$ = 8.7 y 7.2 Hz) (Espectro 9) que corresponde al H- $\beta$  del C-9'. Ambas señales ( $\delta$  4.09 y 3.78) muestran correlación en el espectro COSY con la señal que aparece en  $\delta$  2.14 en forma de multiplete y que fue asignado a H-8'. Los protones 7' $\alpha$  y 7' $\beta$  aparecen en  $\delta$  2.43 y 2.60, ambas señales muestran correlación entre sí en el espectro COSY (Espectro 8) y con la señal asignada al protón H-8' ( $\delta$  2.14). Los protones 7 $\alpha$  y 7 $\beta$  aparecen en  $\delta$  2.43 y 2.75 ambas señales muestran correlación entre sí en el espectro COSY y con la señal asignada al protón H-8 ( $\delta$  2.14). Por último, el H del metino en C-9 aparece en  $\delta$  5.22 como d con  $J$ = 1.5 Hz el desplazamiento químico de esta señal al igual que la  $J$  nos indica que este protón es base de un OH, señal que se observa claramente en el espectro de IR. La señal ( $\delta$  5.22) muestra correlación con la señal del metino en C-8 ( $\delta$  2.14). La señal para el grupo OH se observa sobrepuesta en  $\delta$  2.14. Todas las evidencias recién descritas concuerdan con los datos de RMN-<sup>1</sup>H descritos para la (-)-cubebina (**10**) (**de Pascoli et al., 2006**).

En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Espectro 9) se observaron señales para 20 carbonos presentes en la molécula propuesta, seis de estas correspondieron a carbonos cuaternarios de tipo aromático, seis señales para metinos aromáticos, tres para metinos alifáticos y cinco para metilenos alifáticos (dos de estas últimas señales

correspondieron para los grupos metilendioxi) presentes en la molécula. A continuación se describen en forma detallada el desplazamiento de las señales.

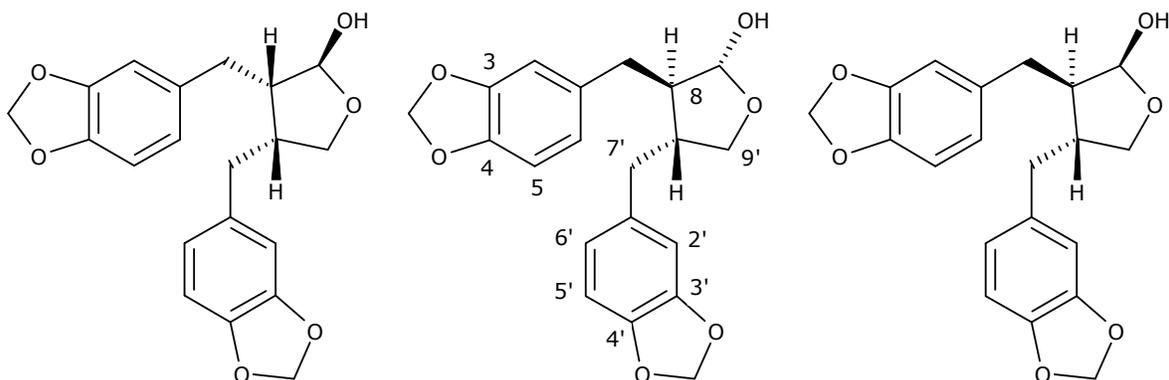
Las señales para los carbonos de los grupos metilendioxi se observan en  $\delta$  100.83 y 100.79, estos desplazamientos concuerdan con los datos reportados para (-)-hinokinina (**9**), (-)-cubebina (**10**) y aristelegina A (**11**), las cuales presentan dos grupos metilendioxi en su estructura. Las señales en  $\delta$  133.2 y 134.1 fueron asignados a los carbonos cuaternarios C-1 y C-1'; en  $\delta$  108.0 y 108.1 se observan las señales para los carbonos base de metinos aromáticos: C-2 y C-2'; en 109.15 y 109.30 se observan las señales para los C5 y 5' y las señales para los C-6 y C-6' se observaron en  $\delta$  121.7 y 121.3. Las señales para los carbonos base del grupo metilendioxi (C-3, C-3', C-4 y C-4') se observan en  $\delta$  147.6 y 147.5, para los dos primeros y en  $\delta$  145.8 y 145.7 para los C-4 y C-4' respectivamente. Con el desplazamiento químico de estas señales se confirma la presencia de dos grupos metilendioxi en la molécula. Los carbonos del anillo furano se observaron en  $\delta$  38.4 (C-7),  $\delta$  39.1 (C-7'),  $\delta$  52.2 (C-8),  $\delta$  45.8 (C-8'),  $\delta$  103.3 (C-9) y  $\delta$  72.6 (C-9').

En el EM-IE (Espectro 10) se observa un fragmento de masa carga (m/z) en 356 (30) que corresponde al ión molecular esperado (C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>); además, hay un fragmento de m/z en 338 (30) debido a la pérdida de H<sub>2</sub>O en la molécula [Figura 9], el pico base se observa en 135 que corresponde al fragmento a y el otro fragmento (b) se observa en 203 [Figura 9]. El fragmento con m/z de 81 una se debe al fragmento c (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>O). Los datos espectroscópicos y espectrométricos, nos permitieron determinar que la estructura del compuesto 9-7H corresponde a la (-)-cubebina (**10**). La presencia del compuesto no ha sido reportada para *A. elegans*.



**Figura 9.** Patrón de fragmentación de la (-)-cubebina (compuesto 9-7H)

Es importante resaltar que en la literatura se describen tres isómeros para la cubebina [Figura 10] aislados del extracto etanólico del rizoma de *A. legasiana* y *A. pubescens* (**de Pascoli et al., 2006**) cuyo signo de RO es negativo para los tres isómeros. Además, es muy probable que existan los tres isómeros, ya que al realizarle ccf de tipo comparativo al compuesto puro y al recuperado de RMN- $^1H$  [Figura 11], se observa que el primero es una sola mancha con  $R_f = 0.37$  y el recuperado presenta tres manchas con  $R_f = 0.18, 0.48$  y  $0.64$ , al revelar las placas con  $H_2SO_4$  al 10%. Falta por separar los tres compuestos del recuperado de RMN- $^1H$  y realizarles sus respectivos análisis espectroscópicos y espectrométricos. Al analizar la muestras por HPLC [Figura 11] se observan dos picos con TR de 14.03 y 14.85 min y dos minoritarios, por lo que es posible que el compuesto 9-7H sea la mezcla de isómeros de la cubebina.



(8S,8'R,9S)-cubebina

(8R, 8'R, 9R)-cubebina  
o  $\alpha$ -cubebina

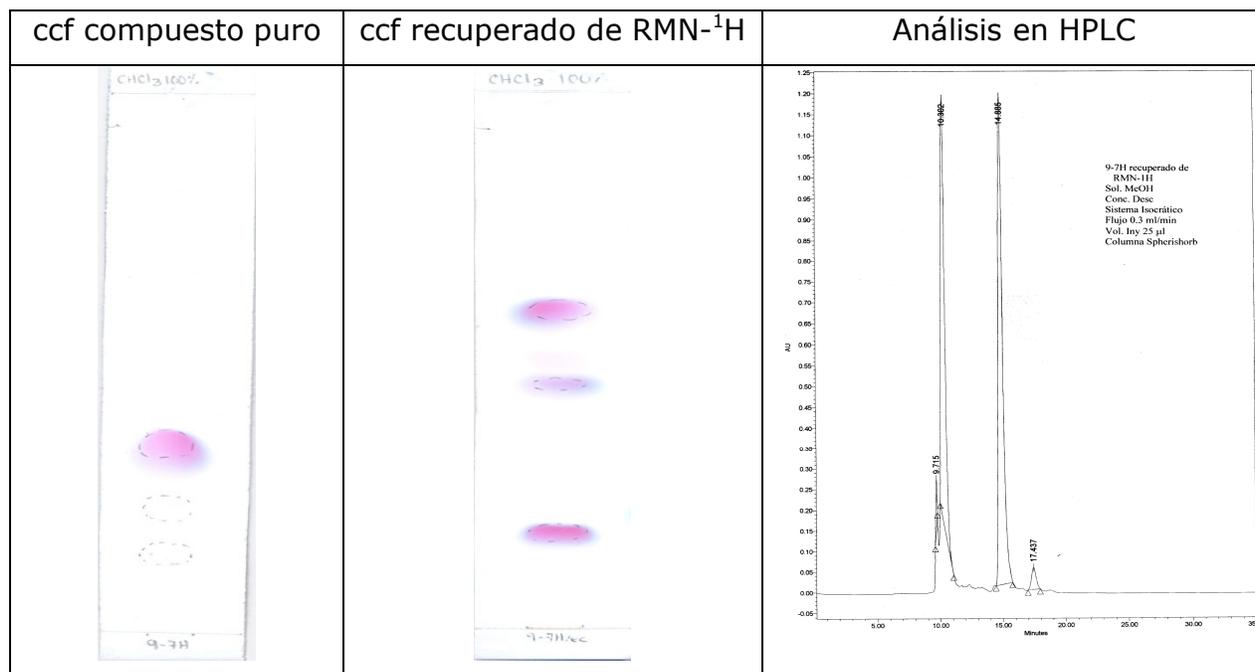
(8R,8'R,9S)-cubebina  
o  $\beta$ -cubebina

$[\alpha]_D^{26} = -102.3$  (c 0.64,  $\text{CHCl}_3$ ).

$[\alpha]_D^{26} = -53.8$  (c 2.58,  $\text{CHCl}_3$ ).

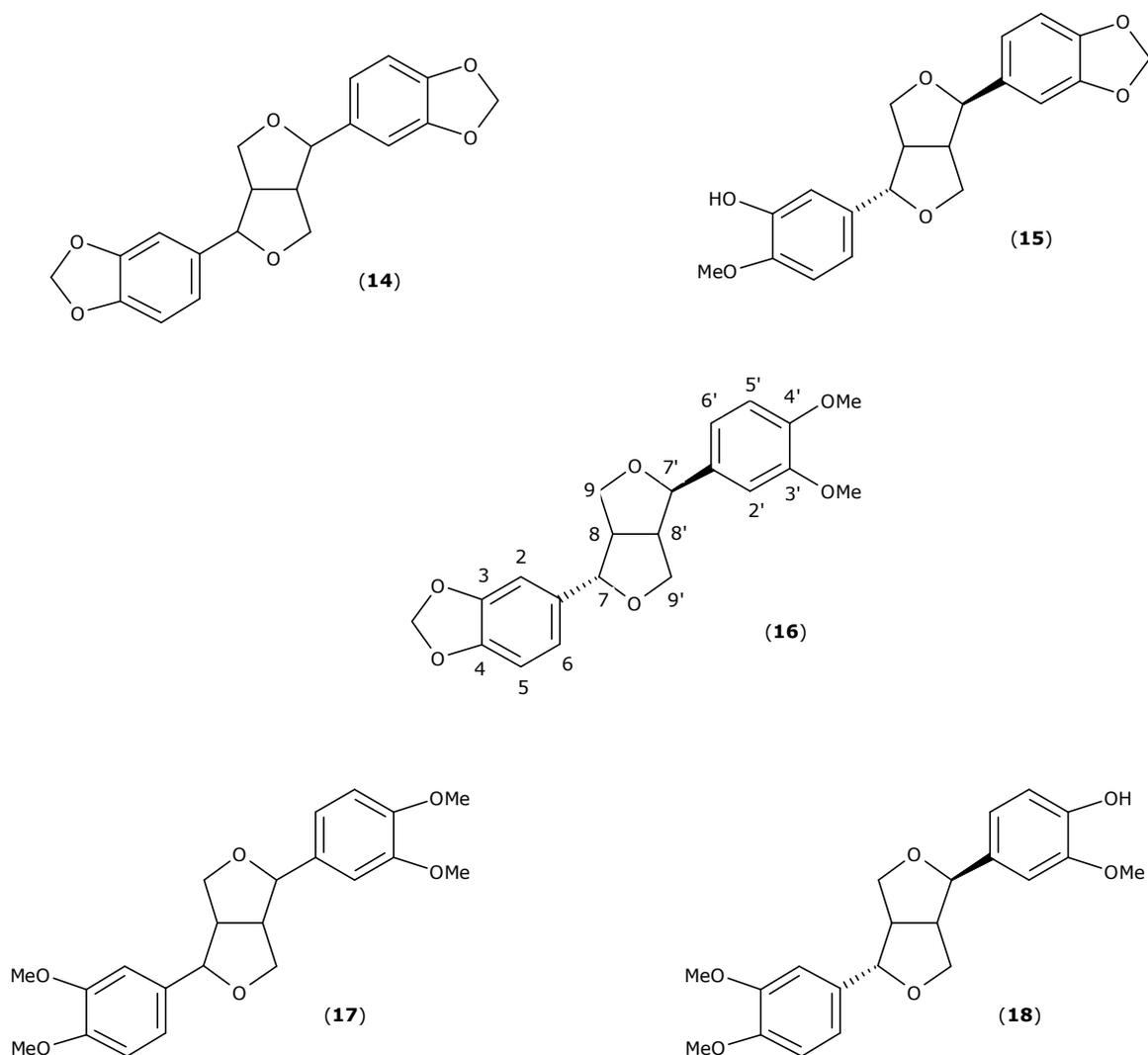
$[\alpha]_D^{26} = -102.3$  (c 0.64,  $\text{CHCl}_3$ ).

**Figura 10.** Isómeros de la cubebina (**10**), aislados de *A. lagesiana* y *A. pubescens* (de Pascoli et al., 2006)



**Figura 11.** ccf y HPLC de la cubebina pura y del recuperado del análisis de RMN-<sup>1</sup>H

La identificación del compuesto 9-7I se realizó con base en el análisis de sus espectros de UV, EM-IE, RMN-<sup>1</sup>H y por comparación con los descritos en la literatura. En el espectro de IR del compuesto 9-7I (Espectro 12) no se observa la banda para el grupo OH como en el caso de la cubebina, pero muestra bandas en 2960, 2870, 2841.4, 1606, 1592, 1512 y 1492.8 cm<sup>-1</sup> que corresponden a C-H de tipo aromático y alifático y para C=C aromático y en 1239.8 cm<sup>-1</sup> se observa una banda para C-O de tipo éter. En el espectro de UV se observa que el compuesto absorbe a las longitudes de onda ( $\lambda$ )<sub>MeOH</sub> de 284, 233 y 207 nm (Espectro 13). Tanto los datos de IR y UV, así como el espectro de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C presentan señales muy similares a la (-)-sesamina, horsfieldina y fargesina (**14**, **15**, **16**) [Figura 12] (**Sun et al., 1987; Tuntiwachwuttikul et al., 2006**).



**Figura 12.** Lignanos aislados de *Horsfieldia iryaghedhi*, *Piper sarmentosum*, *Stauranthus perforatus*, *Aristolochia malmeana*, *Magnolia fargesii*, *Pararistolochia flos-avis*

A continuación se describen las señales de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C que permitieron su identificación.

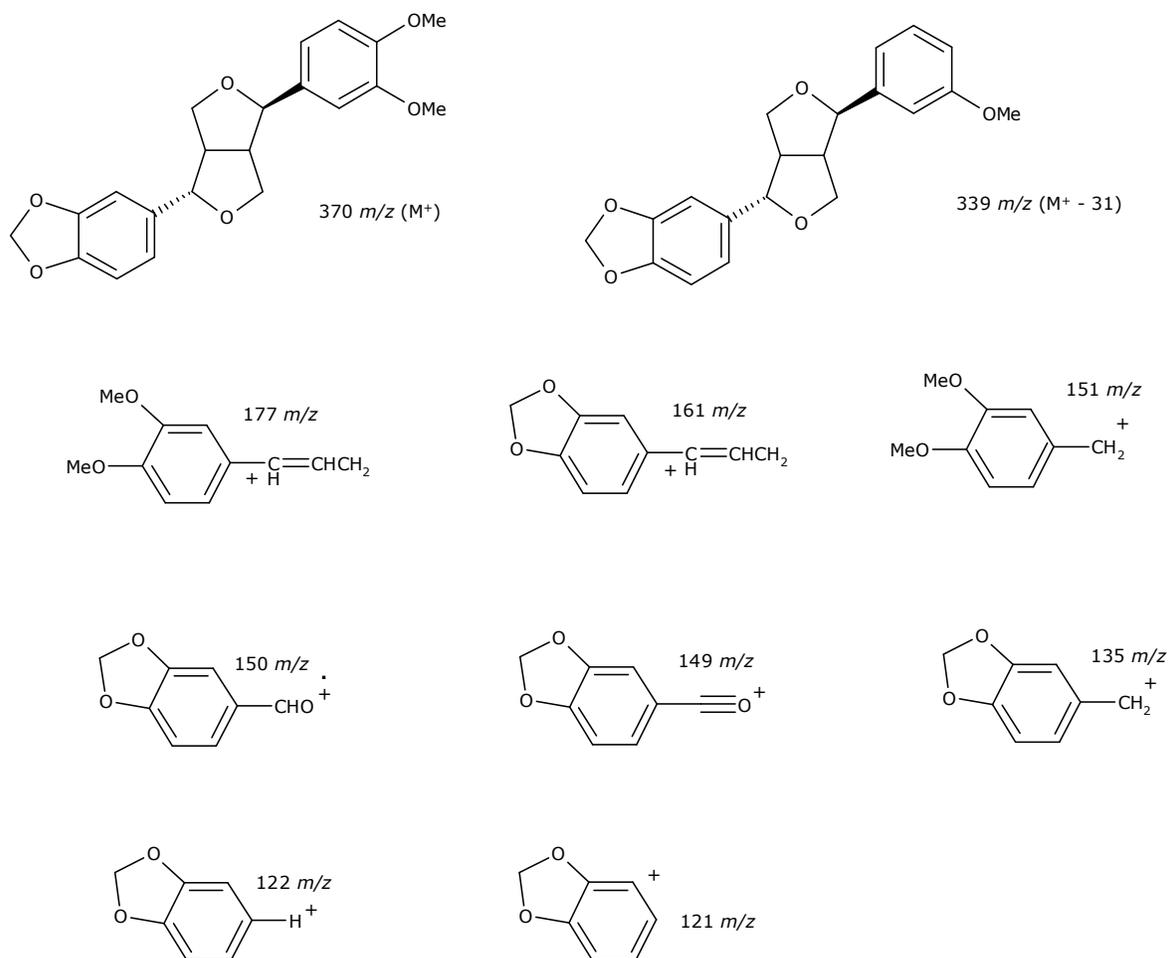
En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Espectro 14) se observa una señal para un grupo metilendioxi en  $\delta$  5.95, en lugar de las dos señales observadas para la (-)-sesamina (**14**). Además, se observan dos señales simples para metoxilo en  $\delta$  3.89 y  $\delta$  3.86 en forma de singuletes; el desplazamiento químico de estas señales es similar al observado para la

(-)-eudesmina y (-)-filigenina (**17**) y (**18**) [Figura 12] (**Sun et al., 1987**). En  $\delta$  4.73 se observa una señal en forma de triplete con  $J = 4$  Hz que integra para dos protones y fue asignada a los protones 7 y 7'. En  $\delta$  4.25 y en  $\delta$  3.86 se observan dos multipletes y cada uno integra para dos protones, estas señales fueron asignadas a los protones  $9\alpha$ ,  $9\beta$ ,  $9\alpha'$  y  $9\beta'$ , ambas señales muestran correlación en el espectro COSY (Espectro 15). Por otro lado, en  $\delta$  3.08 aparece un multiplete que integra para dos protones y fue asignado a los protones H-8 y H-8'. Esta señal muestra correlación en el espectro COSY (Espectro 15) con las señales ubicadas en  $\delta$  4.73 (H-7 y H-7') y con las señales en  $\delta$  4.25 ( $9\alpha$ ,  $9\beta$ ) y en  $\delta$  3.86 ( $9\alpha'$  y  $9\beta'$ ). Cabe aclarar que la señal en  $\delta$  3.86 sale sobrepuesta con los singuletes de los dos metoxilos presentes en la molécula. Las señales para los protones aromáticos 2,5,6,2',5' y 6' de la molécula se observan entre  $\delta$  6.76 y 6.90 que integran para 6H. En el espectro COSY se observa la correlación de los metoxilos con los protones aromáticos. Estas señales nos permiten proponer que el compuesto 9-7I corresponde a la fargesina (**16**).

En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Espectro 16) se observan señales para 21 carbonos presentes en la molécula propuesta, cuatro de estas correspondieron a carbonos cuaternarios de tipo aromático, seis señales para metinos aromáticos, cuatro para metinos alifáticos, tres señales para metilenos alifáticos (uno corresponde al grupo metilendioxi) y dos señales para metoxilos. A continuación se describen en forma detallada el desplazamiento de las señales. En  $\delta$  54.34 y  $\delta$  54.17 aparecen las señales para los C-8 y C-8', los carbonos de los grupos MeO aparecen en  $\delta$  55.96 y  $\delta$  55.93 y para el metilendioxi aparece en  $\delta$  101.05. La señal para los C-9 y C-9' aparecen en  $\delta$  71.74 y  $\delta$  71.69; para los C-7 y C-7' aparecen en  $\delta$  85.28 y  $\delta$  85.75. Las señales para los carbonos aromáticos aparecen en  $\delta$  133.58 (C-1),  $\delta$  135.14 (C-1'),  $\delta$  106.48 (C-2),

$\delta$  108.17 (C-2'), 109.31 (C-5),  $\delta$  111.14 (C-5'),  $\delta$  118.25 (C-6),  $\delta$  119.32 (C-6'),  $\delta$  147.10 (C-3),  $\delta$  147.98 (C-3'),  $\delta$  148.70 (C-4) y  $\delta$  149.25 (C-4'). El desplazamiento químico de estas señales son muy parecidas a las descritas para la horsfieldina (**Tuntiwachwuttikul et al., 2006; Leslie Gunatilaka et al., 1982**), con la única diferencia que en el espectro de IR de nuestro compuesto (9-7I) no se observa señal para el grupo OH y en los espectros de RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$  se observa un metoxilo mas que en la horsfieldina. El espectro de masas por IE (Espectro 17) presenta el ión molecular en 370 (100%), el cual concuerda con el peso molecular esperado ( $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_6$ ); además se observa un fragmento en 339 que se debe a la pérdida de 31 uma debido a la pérdida de un grupo metoxilo. Otros fragmentos importantes que se observan se describen en la Figura 13.

El espectro de DC (Espectro 18) se observa un efecto Cotton positivo a 226 (+3.65), 243 (+ 1.77) y 285 (+2.22) nm. La RO nos da un valor de  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +0.444$  (c 6.9,  $\text{CHCl}_3$ ), y su punto de fusión fue de 69-70°C que se reporta sin corregir (reportado 137-139 °C y 133-134 °C; **Leslie Gunatilaka et al., 1982; Kakisawa et al., 1972**, respectivamente). El análisis de los datos y la comparación con lo descrito en la literatura, nos permitieron identificar al compuesto 9-7I como la fargesina (**16**). Este compuesto fue aislado de *Horsfieldia iryaghedhi* (*Myristica horsfieldia*), *Piper sarmentosum* (**Leslie Gunatilaka et al., 1982; Kakisawa et al., 1972**); *Stauranthus perforatus* (**Anaya et al., 2005**) de otras especies vegetales.



**Figura 13.** Patrón de fragmentación de la fargesina (compuesto 9-7I)

Los resultados de la evaluación antimicobacteriana por el método MABA mostraron que la (-)-cubebina inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. tuberculosis* CIBIN-UMF/15:99, mostrando una CMI= 50 µg/ml, mientras que la fargesina (**16**) resultó inactiva contra las dos especies de micobacterias (H37Rv y MFR) cuya CMI fue >100 µg/ml. Es importante resaltar, que la actividad antimicobacteriana observada en el extracto, en la fracción primaria Ae14 y en la fracción secundaria Ae14-9 contra la cepa MFR de *M. tuberculosis* se debe principalmente a la presencia de la (-)-cubebina y que evaluar los

compuestos contra la cepa de referencia (H37Rv) en algunas ocasiones no es indicativo del potencial antimicobacteriano de una especie vegetal, ya que en este trabajo se observa que el extracto y algunas fracciones estudiadas así como la (-)-cubebina resultaron más activas contra la cepa MFR que contra la cepa de referencia (*M. tuberculosis* H37Rv). A la fecha, no se ha descrito el efecto antimicobacteriano para la (-)-cubebina y la fargesina, por lo que este trabajo contribuyó a explorar el potencial biológico de los compuestos y de la especie *A. elegans*. Otras actividades biológicas que se describen en la literatura para la (-)-cubebina son: antiinflamatoria, inhibidor de la liberación de histamina, inhibidor del complejo I mitocondrial, estimulante de melanogénesis en melanoma B16 murino, analgésica, antiespasmódica, actividad bacteriostática contra *Streptococcus mitis* y *Enterococcus faecalis* y tripanocida (**Zhang et al., 2008; Hirata et al., 2007, 2008; Saraiva et al., 2008; de Pascoli et al., 2006; da Silva et al., 2005; Silva et al., 2007; Bastos et al., 1999; Bastos et al., 2001**). Y para la fargesina se describen actividad antiinflamatoria (por inhibición de la expresión de iNOS disminuyendo la producción de óxido nítrico mediante la vía ERK), antialérgica, moderada actividad herbicida contra *Amaranthus hypocondriacus* y *Echinochloa cruz-galli* (**Baek et al., 2009; Shen et al., 2008; Messiano et al., 2008; Anaya et al., 2005**). Contra *Artemia salina* fue inactivo presentando CL<sub>50</sub>= 315.49 ppm (**Sánchez, 1996**). Cabe mencionar que compuestos similares a la fargesina como la (+)-sesamina y horsfieldina resultaron inactivos contra *M. tuberculosis* H37Ra (CMI > 200 µg/ml) (**Tuntiwachwuttikul et al., 2006**).

## V. Toxicidad subaguda de la ( $\pm$ )-licarina A

La búsqueda de compuestos antituberculosos es necesaria debido a que en la actualidad existen graves problemas de farmacoresistencia y los fármacos de uso clínico o terapéutico actual ya no son eficaces en muchos casos. Por otro lado, en la literatura se describen innumerables metabolitos secundarios con importante actividad antimicobacteriana *in vitro* pero se desconoce su potencial terapéutico (**Bapela, 2006; Copp, 2007; Okunade, 2004; Pauli, 2005**). Dentro de esta búsqueda, las plantas medicinales de México también han sido exploradas de dónde se han obtenido triterpenos y neolignanós con importante actividad antimicobacteriana *in vitro* (**Calderón, 2008; Jimenez-Arellanes et al., 2007; León, 2005**) dada la actividad antimicobacteriana mostrada por uno de los neolignanós [( $\pm$ )-licarina A] aislados del rizoma de *A. taliscana* y con la finalidad de continuar explorando su posible potencial antituberculoso en un modelo *in vivo*, en este trabajo se evaluó su efecto tóxico subagudo a 25 días. A la par de esta experimento, también se realizó un estudio de toxicidad del mismo compuesto en un periodo de 48 días, los resultados de este experimento constituyeron parte de otro trabajo de tesis (**Valdovinos, 2009**).

La ( $\pm$ )-licarina A se administró durante 25 días por vía subcutánea en ratones Balb/C, cada tercer día, el compuesto se solubilizó en aceite de olivo extra virgen (sigma) y la dosis evaluada fue de 5 mg/kg (corresponde a 5 veces la CMI *in vitro*). Las observaciones macroscópicas diarias realizadas durante el periodo de tratamiento (25 días) indicaron que los animales no presentaron signos de toxicidad aparente, ninguno de los animales murió durante el periodo de tratamiento, no se observaron cambios en el comportamiento, ni alteraciones macroscópicas en piel, pelo, ojos y mucosas. Durante el

tratamiento la consistencia de las heces fue igual en todos los grupos, así como la ingesta de alimento y agua fue similar en los tres grupos.

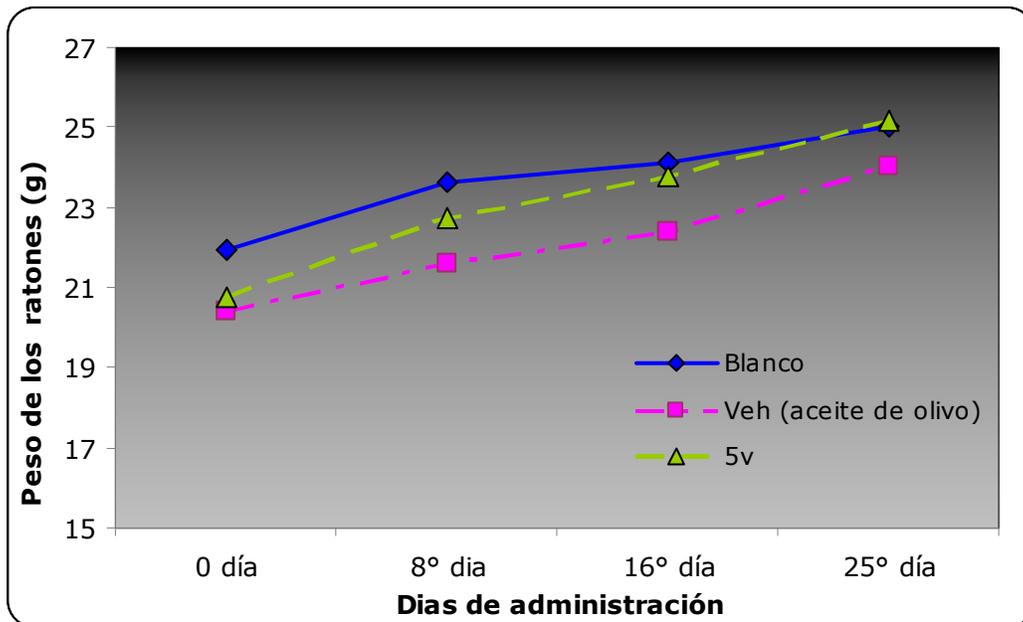
Los animales se pesaron semanalmente, hasta finalizar el periodo de tratamiento y mediante el análisis estadístico se observó que la ( $\pm$ )-licarina A administrada por vía subcutánea no provoca variación en el peso, ya que no se observa diferencia significativa entre los grupos (Tabla 13 y Gráfica 1).

**Tabla 13.** Peso corporal promedio de animales en estudio de toxicidad subaguda de ( $\pm$ )-licarina A

Grupo	Peso del animal (g)			
	0 día	8° día	16° día	25° día
Blanco	21.9 $\pm$ 0.51	23.62 $\pm$ 0.51	24.1 $\pm$ 0.57	25 $\pm$ 0.42
Vehículo	20.4 $\pm$ 0.50	21.6 $\pm$ 0.48	22.38 $\pm$ 0.34	24.02 $\pm$ 0.33
5v	20.8 $\pm$ 0.49	22.76 $\pm$ 0.61	23.76 $\pm$ 0.78	25.16 $\pm$ 0.90

Los valores están expresados como la media  $\pm$  E.S.M., n=5, p<0.05

Blanco: grupo que no recibió ningún tratamiento; vehículo: tratado con aceite de oliva extra virgen; 5v: grupo tratado con ( $\pm$ )-licarina A (5 veces la CMI in vitro).



Blanco: grupo que no recibió ningún tratamiento; vehículo: tratado con aceite de oliva extra virgen; 5v: tratado con ( $\pm$ )-licarina A (5 mg/kg).

**Gráfica 1.** Peso corporal de animales en estudio de toxicidad subaguda de ( $\pm$ )-licarina A

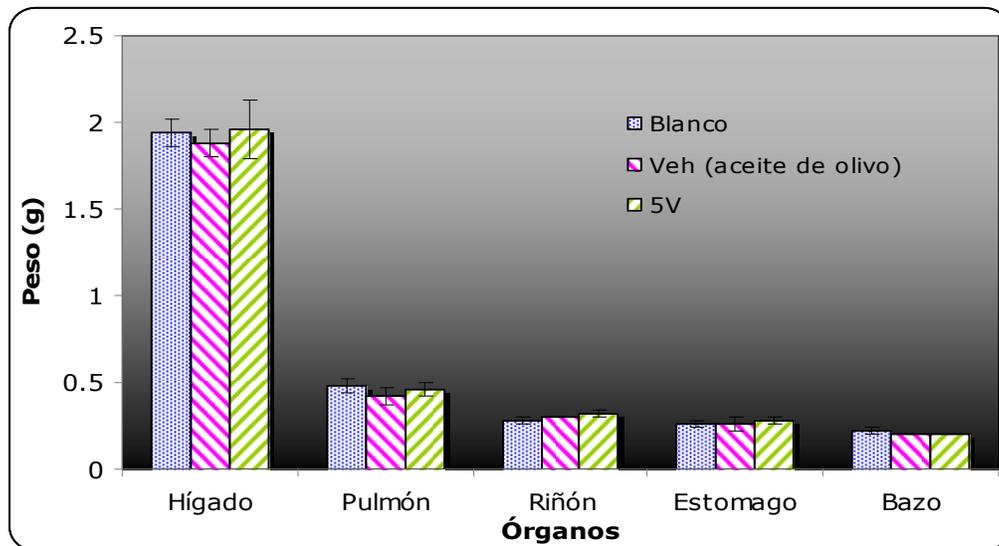
Transcurridos los 25 días de tratamiento se procedió a la obtención de muestra sanguínea, previo ayuno de 12 hr, para análisis de biometría hemática; además se obtuvieron y pesaron los órganos (hígado, riñón, bazo, estomago, pulmón). En la Tabla 14 y Gráfica 2 se describen los pesos de los órganos y al realizar el análisis estadístico no se observó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el grupo tratado con ( $\pm$ )-licarina A con respecto al grupo control.

**Tabla 14.** Pesos de órganos de los ratones en el estudio de toxicidad subaguda de ( $\pm$ )-licarina A

	Peso de los órganos (g)		
	Blanco	Vehículo	5v
Hígado	1.94 $\pm$ 0.08	1.88 $\pm$ 0.08	1.96 $\pm$ 0.17
Pulmón	0.48 $\pm$ 0.04	0.42 $\pm$ 0.05	0.46 $\pm$ 0.04
Riñón	0.28 $\pm$ 0.02	0.3 $\pm$ 0	0.32 $\pm$ 0.02
Estomago	0.26 $\pm$ 0.02	0.26 $\pm$ 0.04	0.28 $\pm$ 0.02
Bazo	0.22 $\pm$ 0.02	0.2 $\pm$ 0	0.2 $\pm$ 0

Los valores están expresados como la media  $\pm$  E.S.M.,  $n=5$ ,  $P < 0.05$

Blanco: grupo que no recibió ningún tratamiento; vehículo: tratado con aceite de oliva extra virgen; 5v: grupo tratado con ( $\pm$ )-licarina A (5 veces la CMI in vitro)



Blanco: grupo que no recibió ningún tratamiento; vehículo: tratado con aceite de oliva extra virgen; 5v: tratado con ( $\pm$ )-licarina A (5 mg/kg)

**Gráfica 2.** Pesos de órganos de los ratones en el estudio de toxicidad subaguda de ( $\pm$ )-licarina A

En la siguiente tabla (15) y en las gráficas 3 y 4 se muestran los datos de BH; el análisis estadístico de estos datos indicó que no existe diferencia significativa entre los grupos de estudio.

Con respecto a la serie roja y sus parámetros (Eri, HB, Hto, VCM, CHCM) no muestran alteración lo que indica "a priori" que el compuesto no induce alteración en la producción y/o lisis de glóbulos rojos. En caso de que el compuesto provocara daño a este nivel, algunos de los parámetros antes mencionados estarían alterados; por ejemplo, en caso de anemia se reducirían los niveles de Hb y de acuerdo a la variación de los valores de VCM y CHCM se puede presentar: anemia hipocrómica, anemia normocrómica, anemia macrocítica.

Por otro lado, en caso que la ( $\pm$ )-licarina A provocara lisis de los glóbulos rojos también se observaría disminución de Hto pero incrementaría el valor de Hb circulante. En caso que el compuesto natural provocara daño a nivel de hígado se observaría aumento de Hb, el cuál es un indicador de daño en los animales de laboratorio.

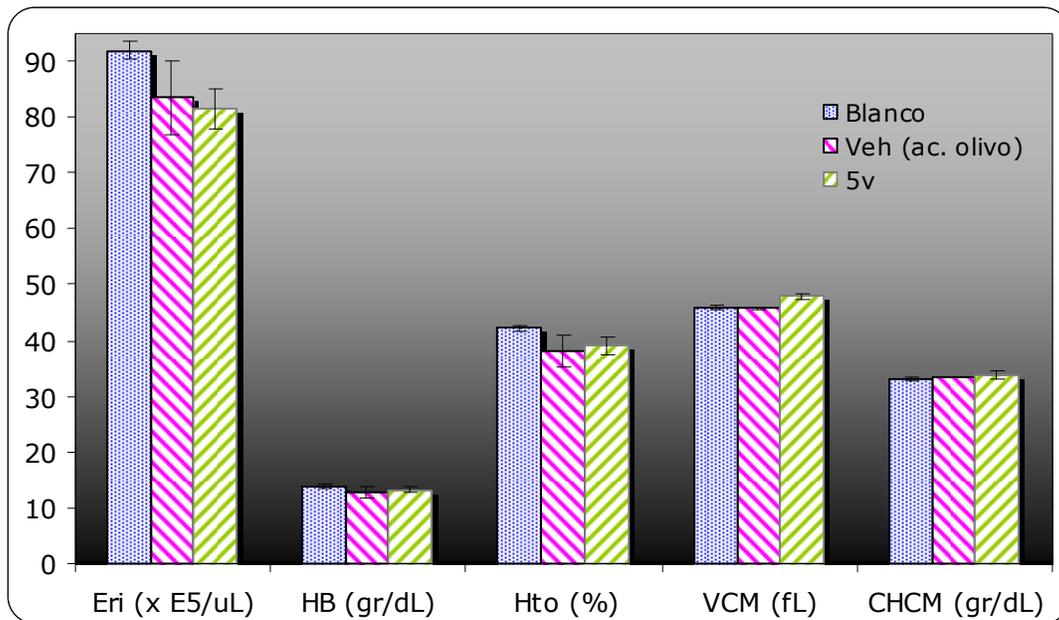
Respecto a la serie blanca (Leu, Seg, Linf, Pla) ninguno de ellos fue alterado al finalizar el periodo de tratamiento; a pesar de que la administración de la ( $\pm$ )-licarina A no se realizó en condiciones de esterilidad óptima ya que la preparación de la dosis administrada se realizó a temperatura ambiente y bajo condiciones normales de laboratorio. Por otro lado, es importante señalar que en caso de inflamación o infección algunos de éstos parámetros se verían alterados, ya que en un proceso infeccioso aumentarían los valores de leucocitos, (neutrófilos segmentados y linfocitos), mientras que en un proceso inflamatorio se elevarían los valores de leucocitos en los grupos tratados con respecto al control (**Mukinda y Syce, 2007; Thanabhorn et al., 2006; Rasekh et al., 2008**).

**Tabla 15.** Valores hematológicos del estudio de toxicidad subaguda de ( $\pm$ )-licarina A

	Valores de Biometría Hemática		
	Blanco	Vehículo	5v
Eri ( $\times 10^5/\mu\text{L}$ )	91.96 $\pm$ 1.76	83.48 $\pm$ 6.52	81.48 $\pm$ 3.45
HB (gr/dL)	13.94 $\pm$ 0.28	12.82 $\pm$ 0.93	13.26 $\pm$ 0.57
Hto (%)	42.24 $\pm$ 0.59	38.16 $\pm$ 2.86	39 $\pm$ 1.60
VCM (fL)	45.98 $\pm$ 0.41	45.78 $\pm$ 0.20	47.9 $\pm$ 0.46
CHCM (gr/dL)	33.06 $\pm$ 0.23	33.42 $\pm$ 0.11	33.96 $\pm$ 0.70
Leu ( $\times 10^2/\mu\text{L}$ )	50.6 $\pm$ 2.93	33.6 $\pm$ 5.48	44.2 $\pm$ 5.44
Seg (%)	17 $\pm$ 4.30	13.6 $\pm$ 2.64	15.8 $\pm$ 4.20
Linf (%)	82.8 $\pm$ 4.35	86 $\pm$ 2.97	84 $\pm$ 4.14
Plaq ( $\times 10^7/\mu\text{L}$ )	30.32 $\pm$ 3.52	32.68 $\pm$ 5.53	42.54 $\pm$ 4.63

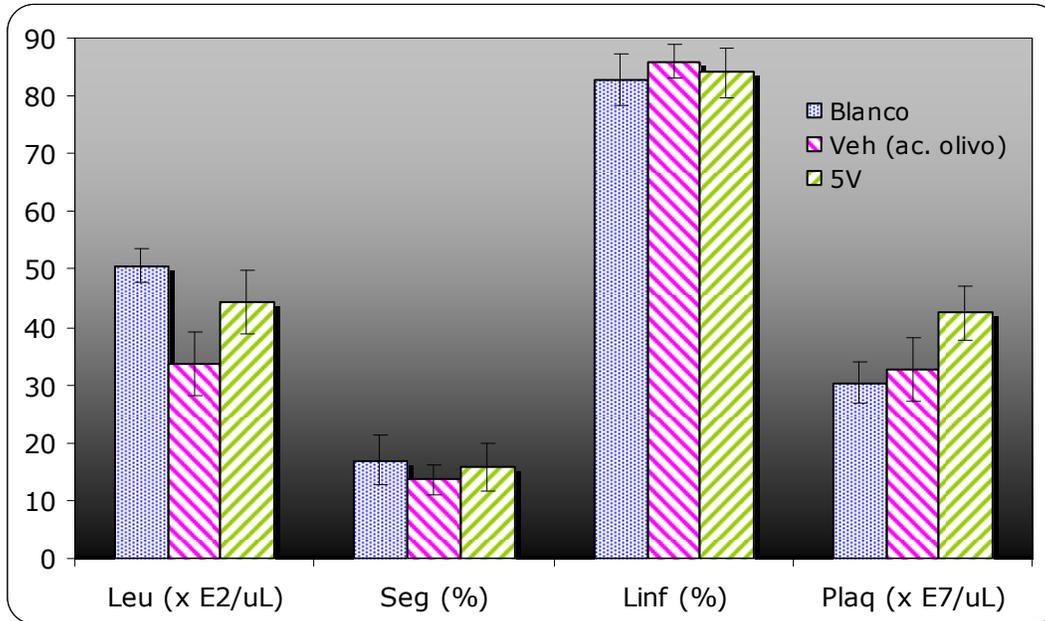
Los valores están expresados como la media  $\pm$  E.S.M.,  $n=5$ ,  $P<0.05$

Blanco: grupo que no recibió tratamiento; vehículo: administrado con aceite de oliva extra virgen; 5v: tratado con ( $\pm$ )-licarina A (5 veces la CMI in vitro)



Blanco: grupo que no recibió tratamiento; vehículo: administrado con aceite de oliva extra virgen; 5v: tratado con ( $\pm$ )-licarina A (5 mg/kg)

**Gráfica 3.** Valores hematológicos del estudio de toxicidad subaguda de ( $\pm$ )-licarina A



Blanco: grupo que no recibió tratamiento; vehículo: administrado con aceite de olivo extra virgen; 5v: tratado con (±)-licarina A (5 mg/kg)

**Gráfica 4.** Valores hematológicos del estudio de toxicidad subaguda de (±)-licarina A

Los resultados obtenidos en este estudio de toxicidad subaguda (25 días) fueron muy similares a los obtenidos en un experimento realizado a la par (**Valdovinos, 2009**), con el mismo compuesto, a la misma dosis, la misma vía de administración y el mismo vehículo, pero con mayor tiempo de exposición (48 días). Cabe mencionar que en el experimento de 48 días se determinaron valores de química sanguínea y análisis histológico de los animales en tratamiento y no se encontró alteración significativa en los resultados obtenidos. Solo es de mencionar que a nivel de hígado se observó una ligera esteatosis (acumulación de ácidos grasos y triglicéridos en el citoplasma de hepatocitos) tanto en el grupo tratado con vehículo, así como el tratado con (±)-licarina A, ésta alteración muy probablemente se debe al tipo de vehículo utilizado (**Valdovinos, 2009**). Además, en la literatura se ha reportado que algunos fármacos como las tetraciclinas, metotrexato,

alcohol y alimentos ricos en grasas inducen esteatosis (**Robbins y Cotran, 1988**).

Por otro lado, el análisis histológico del bazo del grupo tratado con ( $\pm$ )-licarina A se observa una ligera hiperplasia de la pulpa blanca; esta alteración se asocia a procesos inflamatorios y a la detección de antígenos que estimulan la producción de linfocitos T como respuesta a la presencia de cuerpos extraños (**Robbins y Cotran, 1988**). Sin embargo, en este estudio no se observó alteración en los parámetros de la serie blanca (**Valdovinos, 2009**). Cabe mencionar que a la fecha son escasos los trabajos enfocados a estudios de toxicidad subaguda de compuestos de origen natural y la gran mayoría se enfoca a explorar este efecto en extractos íntegros (**Mukinda y Syce, 2007; Thanabhorn et al., 2006; Rasekh et al., 2008; Costa-Silva et al., 2008**).

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

A partir del extracto hexánico del rizoma de *A. elegans* se obtuvieron cuatro compuestos mediante diversos métodos cromatográficos y su identificación química se realizó por el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos. Fueron identificados como estigmastan-3,5-dieno,  $\beta$ -sitosterol (esterol), eupomatenoide 1 (neolignano), (-)-cubebina (lignano) y fargesina (lignano). Ninguno de los compuestos aislados se habían reportado en la especie.

La evaluación antimicobacteriana *in vitro* del extracto, fracciones y de los compuestos puros, permitió determinar que éstos resultaron más activos contra la cepa MFR de *M. tuberculosis*, siendo la (-)-cubebina el compuesto más activo contra la cepa de referencia y la cepa MFR (CMI= 50  $\mu$ g/mL); el eupomatenoide 1 y el estigmastan-3,5-dieno contribuyen parcialmente a la actividad biológica mostrada por el extracto contra la cepa MFR.

Este trabajo contribuyó a explorar el potencial antimicobacteriano de *A. elegans*, especie medicinal de México. Cabe mencionar que en la actualidad la búsqueda de compuestos activos contra cepas de *M. tuberculosis* MFR es urgente debido a que muchas cepas no responden a los medicamentos actuales, además se requieren compuestos con mecanismos de acción diferentes a los existentes.

La evaluación de la toxicidad subaguda de la ( $\pm$ )-licarina A, por vía subcutánea durante 25 días no produjo alteraciones significativas en los parámetros de biometría hemática. Estos resultados concuerdan con lo previamente descrito para un estudio de toxicidad subaguda a 48 días.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abe**, F., Nagafuji, S., Yamauchi, T., Okabe, H., Maki, J., Higo, H., Akahane, H., Aguilar, A., Jiménez-Estrada, M., Reyes-Chilpa, R. *Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in Guaco, roots of Aristolochia taliscana*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin** 2002; 25: 1188-1191
- Aboutabl** E.A., Nassar M.I., Elsakhawy F.M., Maklad Y.A., Osman A.F., El-Khrisy E.A. *Phytochemical and pharmacological studies on Sideritis taurica Stephan ex Wild*. **Journal of Ethnopharmacology** 2002; 82:177-184
- Acosta** M., León C., Leal A. *Determinación de la concentración mínima inhibitoria en cepas de Mycobacterium tuberculosis mediante la técnica colorimétrica del alamar azul*. **Asociación Colombiana de Infectología** 2004; 8-3: 194-202
- Akihisa** T., Franzblau S.G., Ukiya M., Okuda H., Zhang F., Yasukawa K., Suzuki T., Kimura Y. *Antitubercular Activity of Triterpenoids from Asteraceae Flowers*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin** 2005; 28:158-160
- Anaya** A.L., Macías R.M., Cruz O.R., García S.C., Sánchez M.P., Hernández B.B., Mata R. *Allelochemicals from Stauranthus perforatus, a Rutaceous tree of the Yucatan Peninsula, Mexico*. **Phytochemistry** 2005; 66: 487-494
- Baek** J.A., Lee Y.D., Lee C.B., Go H.K., Kim J.P., Seo J.J., Rhee Y.K., Kim A.M., Na D.J. *Extracts of Magnoliae flos inhibit inducible nitric oxide synthase via ERK in human respiratory epithelial cells*. **Nitric Oxide** 2009; 20: 122-128
- Baltussen** R., Floyd K., Dye C. *Cost effectiveness analysis of strategies for tuberculosis control in developing countries*. **British Medical Journal** 2005; 331:1364
- Balunas** M.J., Kinghorn A.D. *Drug discovery from medicinal plants*. **Life Sciences** 2005; 78: 431-441
- Bapela** N.B., Lall N., Fourie P.B., Franzblau S.G., Van Rensburg C.E. *Activity of 7-methyljuglone in combination with antituberculous*

*drugs against Mycobacterium tuberculosis. Phytomedicine* 2006; 13: 630-635

**Bastos** I., Portaels F. *Resurgent and emerging infectious diseases "Multidrug-resistant Tuberculosis"*. Kluwer Academic Publishers, Boston 2000

**Bastos** J.K., Albuquerque S., Silva M.L. *Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of Zanthoxylum naranjillo. Planta Medica* 1999; 65: 541-544

**Bastos** J.K., Carvalho J.C., de Souza G.H., Pedrazzi A.H., Sarti S.J. *Anti-inflammatory activity of cubebin, a lignan from the leaves of Zanthoxylum naranjillo Griseb. Journal of Ethnopharmacology* 2001; 75: 279-282

**Blower** S., Supervie V. *Predicting the future of XDR tuberculosis. The Lancet* 2007; 7: 443

**Calderón** C.A. *Obtención y evaluación toxicológica de compuestos antimicobacterianos en especies del género Aristolochia*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM 2008

**Camacho-Corona** M.R., Ramírez-Cabrera M.A., González-Santiago O., Garza-González S., Palacios I., Luna-Herrera J. *Activity against drug resistant-tuberculosis strains of plants used in mexican traditional medicine to treat tuberculosis and other respiratory diseases. Phytotherapy Research* 2008; 22: 82-85

**Cano** C.G., Marroquín F. J. *Taxonomía de plantas superiores*. Editorial Trillas, México 1994, pp. 171-174

**Cantrell** C; Franzblau S, Fisher N. *Antimycobacterial Plant Terpenoids. Planta Medica* 2001; 67: 685-694

**Caviedes** L., Delgado J., Gilman R. *Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of Mycobacterium tuberculosis. Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40; 1873-1874

**Chen** J.J., Chou E.T., Peng C.F., Chen I.S., Yang S.Z., Huang H.Y. *Novel epoxyfuranoid lignans and antitubercular constituents from the leaves of Beilschmiedia tsangii. Planta Medica* 2007a; 73: 557-571

- Chen** J.J., Chou T.H., Peng C.F., Chen I.S., Yang S.Z. *Antitubercular dihydroagarofuranoid sesquiterpenes from the roots of *Microtropis fokienensis**. **Journal of Natural Products** 2007b; 70: 202-205
- Chen** J.J., Yang C.S., Peng C.F., Chen I.S., Miaw C.L. *Dihydroagarofuranoid sesquiterpenes, a lignin derivative, a benzenoid, and antitubercular constituents from the stem of *Microtropis japonica**. **Journal of Natural Products** 2008; 71: 1016-1021
- Chin** Y.W., Balunas M.J., Chai H.B., Kinghorn A.D. *Drug discovery from natural sources*. **The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal** 2006; 8: 239-252
- Chou** T.S., Chen I.S., Peng C.F., Sung P.J., Chen J.J. *A new dihydroagarofuranoid sesquiterpene and antituberculosis constituents from the root of *Microtropis japonica**. **Chemistry & Biodiversity** 2008; 5: 1412-1418
- Chou** T.S., Chen I.S., Sung P.J., Peng C.F., Shieh P.C., Chen J.J. *A new dihydroagarofuranoid sesquiterpene from *Microtropis fokienensis* with antituberculosis activity*. **Chemistry & Biodiversity** 2007; 4: 1594-1599
- Coll** P. *Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis**. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica** 2003; 21: 299-308.
- Collins** L., Franzblau S. *Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium**. **Antimicrobial Agents & Chemotherapy** 1997; 41: 1004-1009
- Copp** B.R., Pearce A. *Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis**. **Natural Product Reports** 2007; 24: 278-297
- Costa-Silva** J.H., Lima C.R., Silva E.J., Araújo A.V., Fraga M.C., Ribeiro E. Ribeiro A., Arruda A.C., Lafayette S.S., Wanderley A.G. *Acute and subacute toxicity of the *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) seed oil*. **Journal of Ethnopharmacology** 2008; 116: 495-500
- da Silva** R., de Souza G.H., da Silva A.A., de Souza V.A., Pereira A.C., Royo V., E Silva M.L., Donate P.M., de Matos A., Carvalho J.C.,

- Bastos J.K. *Synthesis and biological activity evaluation of lignan lactones derived from (-)-cubebin*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 2005; 15: 1033-1037
- de Pascoli** I.C., Nascimento I.R., Lopes L.M. *Configurational analysis of cubebins and bicubebin from Aristolochia lagesiana and Aristolochia pubescens*. **Phytochemistry** 2006; 67: 735-742
- Dye** C. *Global epidemiology of tuberculosis*. **The Lancet** 2006; 367: 938-940
- Elzinga** G., Raviglione M.C., Maher D. *Scale up: meeting targets in global tuberculosis control*. **Lancet** 2004; 363: 814-819
- Fabricant** S.D., Farnsworth R.N. *The value of plants used in traditional medicine for drug discovery*. **Environmental Health Perspectives Supplements** 2001; 109: 69-75
- Garner** P., Alejandria M., Lansang M.A. *Is DOTS-Plus a feasible and cost-effective strategy?*. **PLoS Medicine** 2006; 3: 1467-1468
- Gautam** R., Saklani A., Jachak S.M. *Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents*. **Journal of Ethnopharmacology** 2007; 110: 200-234
- Gupta** V.K., Fatima A., Faridi U., Negi A.S., Shanker K., Kumar J.K., Rahuja N., Luqman S., Sisodia B.S., Saikia D., Darokar M.P., Khanuja S.P. *Antimicrobial potential of Glycyrrhiza glabra roots*. **Journal of Ethnopharmacology** 2008; 116: 377-380
- Hassmiller** K.M. *The association between smoking and tuberculosis*. **Salud Pública de México** 2006; 48: 201-216
- Hirata** N., Naruto S., Inaba K., Itoh K., Tokunaga M., Iinuma M., Matsuda H. *Histamine release inhibitory activity of Piper nigrum leaf*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin** 2008; 31: 1973-1976
- Hirata** N., Naruto S., Ohguchi K., Akao Y., Nozawa Y., Iinuma M., Matsuda H. *Mechanism of the melanogenesis stimulation activity of (-)-cubebin in murine B16 melanoma cells*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 2007; 15: 4897-4902

- Huang** H.Y., Ishikawa T., Peng C.F., Tsai I.L., Chen I.S. *Constituents of the root wood of *Zanthoxylum wutaiense* with antitubercular activity.* **Journal of Natural Products** 2008; 71: 1146-1151
- Jain** A., Mondal R. *Extensively drug-resistant tuberculosis: current challenges and threats.* **FEMS Immunology and Medical Microbiology** 2008; 53: 145-150
- Jiménez-Arellanes** A., Meckes M., Ramirez R., Torres J., Luna Herrera J. *Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in mexican plants used to treat respiratory diseases.* **Phytotherapy Research** 2003; 17: 903-908
- Jiménez-Arellanes** A., Meckes M., Torres J., Luna-Herrera J. *Antimycobacterial triterpenoids from *Lantana hispida* (Verbenaceae).* **Journal of Ethnopharmacology** 2007; 111: 202-205
- Jiménez-Ferrer** J.E., Pérez-Térán Y.Y., Román.Ramos R., Tortoriello J. *Antitoxin activity of plants used in Mexican traditional medicine against scorpion poisoning.* **Phytomedicine** 2005; 12: 1116-1122
- Jin** J.L., Lee S., Lee Y.Y., Kim J.M., Heo J.E., Yun-Choi H.S. *Platelet anti-aggregating triterpenoids from the leaves of *Acanthopanax senticosus* and the fruits of *A. sessiliflorus*.* **Planta Medica** 2004; 70: 564-566
- Kakisawa**, Chen Y. P., Hsü H. Y. *Lignans in flower buds of *Magnolia fargesii*.* **Phytochemistry** 1972; 11: 2289-2293
- Kanokmedhakul** S., Kanokmedhakul K., Kanarsa T., Buayairaksa M. *New bioactive clerodane diterpenoids from the bark of *Casearia grewiifolia*.* **Journal of Natural Products** 2005; 68:183-188
- Kanokmedhakul** S., Kanokmedhakul K., Lekphrom R. *Bioactive constituents of the roots of *Polyalthia cerasoides*.* **Journal of Natural Products** 2007; 70: 1536-1538
- Kumar** V., Poonam, Prasad A.K., Parmar V.S. *Naturally occurring aristolactams, aristolochic acids and dioxoaporphines and their biological activities.* **Natural Product Reports** 2003; 20: 565-583

- Lenaerts** A.J., De Groote M.A., Orme I.M. *Preclinical testing of new drugs for tuberculosis: current challenges*. **Trends in Microbiology** 2007; 16: 48-54
- León** D.R. Potencial antimicobacteriano de dos especies medicinales del género *Aristolochia*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, UNAM 2005
- Lopes** L.M., Yoshida M., Gottlieb O. *Dibenzilbutyrolactone lignans from *Virola sebifera**. **Phytochemistry** 1983; 22: 1516-1518
- Leslie Gunatilaka** A.A., De Silva A.M., Sotheeswaran S., Tillekeratne L.M. *Horsfieldin, a lignan and other constituents from *Horsfieldia iryagedhi**. **Phytochemistry** 1982; 21: 2719-2723
- Luna** M.G. Estudio químico de dos especies medicinales con actividad antimicobacteriana. Tesis de licenciatura. Campus Chapultepec, UVM 2005
- Mahapatra** A., Mativandlela S.P., Binneman B., Fourie P.B., Hamilton C.J., Meyer J.J., van der Kooy F., Houghton P., Lall N. *Activity of 7-methyljuglone derivatives against *Mycobacterium tuberculosis* and as subversive substrates for mycothiol disulfide reductase*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 2007; 15: 7638-7646
- Maher** D., Blanc L., Raviglione C.M. *WHO policies for tuberculosis control*. **Lancet** 2004; 363: 1911
- Martens** G., Wilkinson R.J. *Tuberculosis*. **Lancet** 2007; 370: 2030-2043
- Mata** R., Morales I., Pérez O., Rivero C.I., Acevedo L., Enriquez M.I., Bye R., Franzblau S., Timmermann B. *Antimycobacterial compounds from *Piper sanctum**. **Journal of Natural Products** 2004; 67: 1961-1968
- Messiano** GB, Vieira L, Machado MB, Lopes LM, de Bortoli SA, Zukerman-Schpector J. *Evaluation of insecticidal activity of diterpenes and lignans from *Aristolochia malmeana* against *Anticarsia gemmatalis**. **Journal of Agricultural & Food Chemistry** 2008; 56: 2655-2659

- Mitaine-Offer** A., Hornebeck W., Sauvain M., Zèches-Hanrot M. *Tryterpenes and phytosterols as human leucocyte elastase inhibitors*. **Planta Medica** 2002; 68:930-932
- Mohamed** A.A., Wright A., Laszlo A., Muynck A., Portaels F., Van Deun, A., Wells C., Nunn P., Blanc L., Raviglione M. *Epidemiology of antituberculosis drug resistance (the Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance): an updated analysis*. **The Lancet** 2006; 368: 2142-2154
- Molina-Salinas** G.M., Ramos-Guerra M.C., Vargas V.J., Mata-Cárdenas B.D., Becerril M.P., Said-Fernández.S. *Bactericidal activity of organic extracts from *Flourensia cernua* DC against strains of *Mycobacterium tuberculosis**. **Archives of Medicinal Research** 2006; 37: 45-49
- Mongkolvisut** W., Sutthivaiyakit S. *Antimalarial and antituberculous poly-O-acylated jatrophone diterpenoids from *Pedilanthus tithymaloides**. **Journal of Natural Products** 2007; 70: 1434-1438
- Mukinda** J.C., Syce J.A. *Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents*. **Journal of Ethnopharmacology** 2007; 112: 138-144
- Nelson** R. *WHO's tuberculosis control strategy said to be insufficient*. **The Lancet Infectious Diseases** 2004; 4: 653
- O'Brien** R.J., Spigelman M. *New drugs for tuberculosis: current status and future prospects*. **Clinics in Chest Medicine** 2005; 26: 327-340
- Okunade** A.L., Elvin-Lewis M.P., Lewis W. *Natural antimycobacterial metabolites: current status*. **Phytochemistry** 2004; 65: 1017-1032
- Olmo** F.E., López-Pérez J.L., Feliciano A., García A.E. *Desarrollo de nuevos agentes antituberculosos*. **Enfermedades Emergentes** 2005; 7: 22-33
- Ortega-Ortiz** J.F., Ortega-Ortiz, R.V. *Aristolochiaceae. Flora de Veracruz*. Instituto de Ecología 1997. A.C. Fascículo 99.
- Ovesná** Z, Vachálková A, Horváthová K. *Taraxasterol and beta-sitosterol: new naturally compounds with*

*chemoprotective/chemopreventive effects. Neoplasma* 2004; 51: 407-414

**Pablos-Méndez** A., Gowda D.K. , Frieden T.R. *Controlling multidrug-resistant tuberculosis and access to expensive drugs: a rational framework. Bulletin of the World Health Organization* 2002; 80: 489-500

**Pattamadilok** D., Suttisri R. *Seco-terpenoids and other constituents from *Elateriospermum tapos*. Journal of Natural Products* 2008; 71: 292-294

**Pauli** G.F., Case R., Inui T., Wang Y., Cho S., Fisher N.H., Franzblau S.G. *New perspectives on natural products in TB drug research. Life Sciences* 2005; 78: 485-494

**Quer** P.F. *Plantas Medicinales (El Dioscórides Renovado)*, Labor, España 1962, pp. 193-194

**Rasekh** H.R., Nazari P., Nejad M., Hosseinzadeh. *Acute and subchronic oral toxicity of *Galega officinalis* in rats. Journal of Ethnopharmacology* 2008; 116: 21-26

**Raviglione** C.M. *The new Stop TB Strategy and the Global Plan to Stop TB, 2006-2015. Bulletin of the World Health Organization* 2007; 85: 327

**Raviglione** C.M. *XDR-TB: entering the post-antibiotic era?. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2006; 10: 1185-1187

**Raviglione** C.M., Smith L.M. *XDR tuberculosis- implications for global public health. New England Journal of Medicine* 2007; 356: 656-659

**Rivero-Cruz** I., Acevedo L., Guerrero J.A., Martínez S., Bye R., Pereda-Miranda R., Franzblau S., Timmermann B.N., Mata R. *Antimycobacterial agents from selected mexican medicinal plants. Journal of Pharmacy & Pharmacology* 2005; 57: 1117-1126

**Rivers** C.E., Mancera R.L. *New anti-tuberculosis drugs in clinical trials with novel mechanisms of action. Drug Discovery Today* 2008; 23-24: 1090-1098

- Robbins** S.L. y Cotran R.S. *Patología Estructural y Funcional*. 3ra Edición. Editorial Interamericana. México, 1988
- Rojas** R., Caviedes L., Aponte J.C., Vaisberg A.J., Lewis W.H., Lamas G., Sarasara C., Gilman R.H., Hammond G.B. *Aegicerin, the first oleanane triterpene with wide-ranging antimycobacterial activity, isolated from Clavija procera*. **Journal of Natural Products** 2006; 69: 845-846
- Said-Fernández** S., Becerril-Montes P., Molina-Salinas G.M., Barrios-García H., Vargas-Villarreal J. *Tuberculosis causada por cepas de Mycobacterium tuberculosis drogorresistentes*. **Enfermedades emergentes** 2005; 7: 13-19
- Sánchez** M.P. Compuestos bioactivos de las raíces de *Stauranthus perforatus* Liebm. (Rutaceae). Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Facultad de Química, UNAM 1996
- Saraiva** J., Siqueira C.M., de Paula da Silva C.H., Barreto da Silva V., Tudella V.G., Silva R., Andrade E Silva M.L., Dorta D.J., Bastos J.K., Uyemura S.A., de Albuquerque S, Curti C. *Cubebin and derivatives as inhibitors of mitochondrial complex I. Proposed interaction with subunit B8*. **Journal of Enzyme Inhibition & Medicinal Chemistry** 2008; 1
- Shah** N., Wright A., Bai G., Barrera L., Boulahbal F., Martín-Casanoba N., Drobniowski F., Gilpin C., Havelková M., Lepe R., Lumb R., Metchock B., Portaels F., Rodrigues M., Rüsck-Gerdes S., Van Deun A., Vincent V., Laserson K., Wells C., Cegielski P. *Worldwide emergence of extensively drug-resistant tuberculosis*. **Emerging Infectious Diseases** 2007; 13: 380-387
- Sharma** S.K., Mohan A. *Multidrug-resistant tuberculosis: a menace that threatens to destabilize tuberculosis control*. **CHEST** 2006; 130: 261-272
- Shen** Y., Pang E.C., Xue C.C., Zhao Z.Z., Lin J.G., Li C.G. *Inhibitions of mast cell-derived histamine release by different Flos Magnoliae species in rat peritoneal mast cells*. **Phytomedicine** 2008; 15: 808-814
- Shi** L.S., Kuo P.C., Tsai Y.L., Damu A.G., Wu T.S. *The alkaloids and other constituents from the root and stem of Aristolochia elegans*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 2004; 12: 439-446

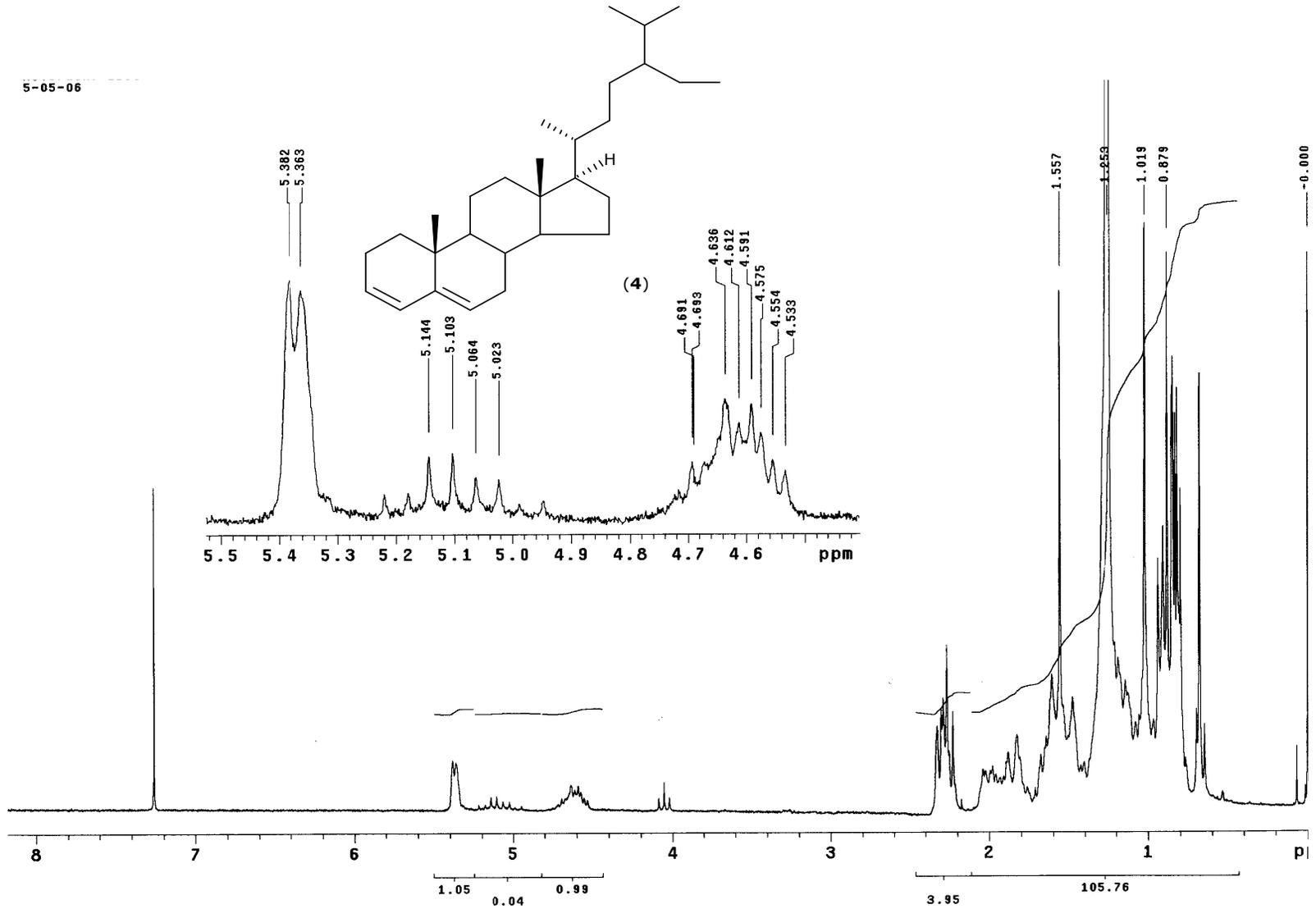
- Silva** M.L., Coimbra H.S., Pereira A.C., Almeida V.A., Lima T.C., Costa E.S., Vinhólis A.H., Royo V.A., Silva R., Filho A.A., Cunha W.R., Furtado N.A., Martins C.H., Carvalho T.C., Bastos J.K. *Evaluation of piper cubeba extract, (-)-cubebin and its semi-synthetic derivatives against oral pathogens.* **Phytotherapy Research** 2007; 21: 420-422
- Singh** B., Singh S. *Antimicrobial activity of terpenoids from *Trichodesma amplexicaule* roth.* **Phytotherapy Research** 2003; 17:814-816
- Stop** TB Partnership. *The global plan to stop tuberculosis.* Geneva: WHO, 2001 (WHO/CDS/TB/2001.16)
- Sun** N.J., Chang C.J., Cassady J.M. *A cytotoxic tetralone derivative from *Pararistolochia flos-avis*.* **Phytochemistry** 1987; 26: 3051-3053
- Tan** M.A., Takayama H., Aimi N., Kitajima M., Franzblau S.G., Nonato M.G. *Antitubercular triterpenes and phytosterols from *Pandanus tectorius* Soland. var. *laevis*.* **Nature Medicine** 2008; 62: 232-235
- Thanabhorn** S., Jaijoy K., Thamaree S., Ingkaninan K., Panthong A. *Acute and subacute toxicity study of the ethanol extract from *Lonicera japonica* Thunb.* **Journal of Ethnopharmacology** 2006; 107: 370-373
- Tomioka** H. *Current status of some antituberculosis drugs and the development of new antituberculous agents with special reference to their in vitro and in vivo antimicrobial activities.* **Current Pharmaceutical Design** 2006; 12: 4047-4070
- Tuntiwachwuttikul** P., Phansa P., Pootaeng-On Y., Taylor W.C. *Chemical constituents of the roots of *Piper sarmentosum*.* **Chemical & Pharmaceutical Bulletin** 2006; 54:149-151
- Valdovinos** M.L. *Evaluación toxicológica subaguda y efecto anti-TB preliminar de la licarina A.* Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM 2009
- Vik** A., James A., Gundersen L.L. *Screening of terpenes and derivatives for antimycobacterial activity; identification of geranylgeraniol and geranylgeranyl acetate as potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* in vitro.* **Planta Medica** 2007; 73: 1410-1412

- Vila** R., Mundina M., Muschietti L., Priestap H.P., Bandoni A.L., Adzet T., Cañigueral S. *Volatile constituents of leaves, roots and stems from *Aristolochia elegans**. **Phytochemistry** 1997; 46: 1127-1129
- Vongvanich** N., Kittakoop P., Charoenchai P., Intamas S., Sriklung K., Thebtaranonth Y. *Antiplasmodial, antimycobacterial, and cytotoxic principles from *Camchaya calcarea**. **Planta Medica** 2006; 72: 1427-1430
- WHO**. *Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Fourth Global Report*. Geneva, Switzerland 2008
- WHO**. *Stopping tuberculosis proves hard to do*. **Lancet** 2007; 369: 965
- Wu** T.S., Damu A.G., Su C.R., Kuo P.C. *Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities*. **Natural Product Reports** 2004; 21: 594-624
- Wu** T.S., Tsai Y.L., Damu A.G., Kuo P.C., Wu P.L. *Constituents from the root and stem of *Aristolochia elegans**. **Journal of Natural Products** 2002; 65: 1522-1525
- Wu** T.S., Tsai Y.L., Wu P.L., Lin F.W., Lin J.K. *Constituents from the leaves of *Aristolochia elegans**. **Journal of Natural Products** 2000; 63: 692-693
- Yajko** D., Madej J., Lancaster M., Sanders C., Cawthon V., Gee B., Babst A., Hadley W. *Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis**. **Journal of Clinical Microbiology** 1995; 33: 2324-2327
- Yew** W.W., Leung C.C. *Management of multidrug-resistant tuberculosis: update 2007*. **Respirology** 2008; 13: 21-46
- Zager** E.M., McNerney R. *Multidrug-resistant tuberculosis*. **BMC Infectious Diseases** 2008; 8:10
- Zhang** G., Shimokawa S., Mochizuki M., Kumamoto T., Nakanishi W., Watanabe T., Ishikawa T., Matsumoto K., Tashima K., Horie S., Higuchi Y., Dominguez O.P. *Chemical constituents of *Aristolochia constricta*: antispasmodic effects of its constituents in guinea-pig ileum and isolation of a diterpeno-lignan hybrid*. **Journal of Natural Products** 2008; 71: 1167-1172

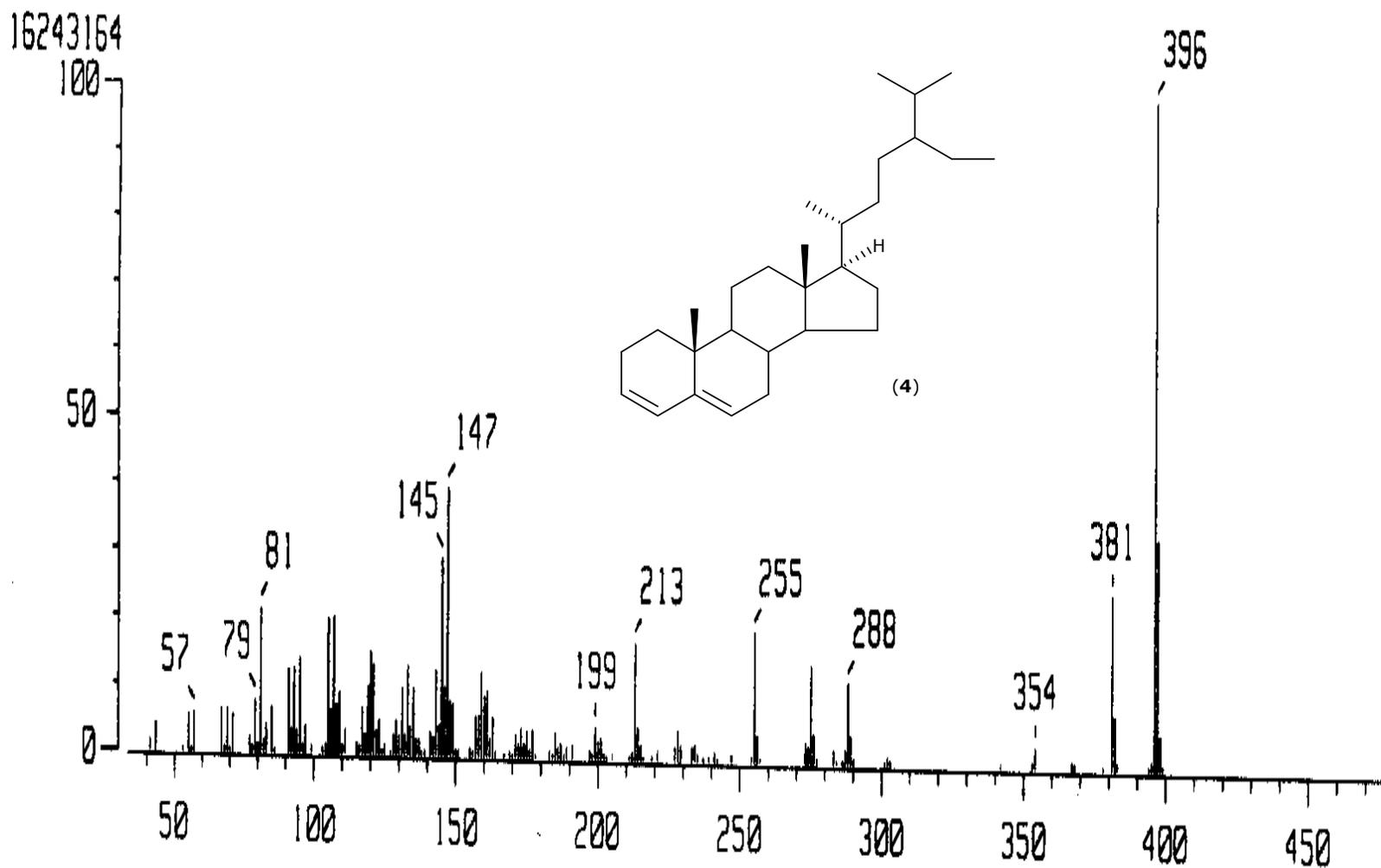
**Zignol** M., Hosseini M.S., Wright A., Weezenbeek C.L., Nunn P., Watt C.J., Williams B.G., Dye C. *Global incidence of multidrug-resistant tuberculosis. The Journal of Infectious Diseases* 2006; 194: 479-485

A N E X O

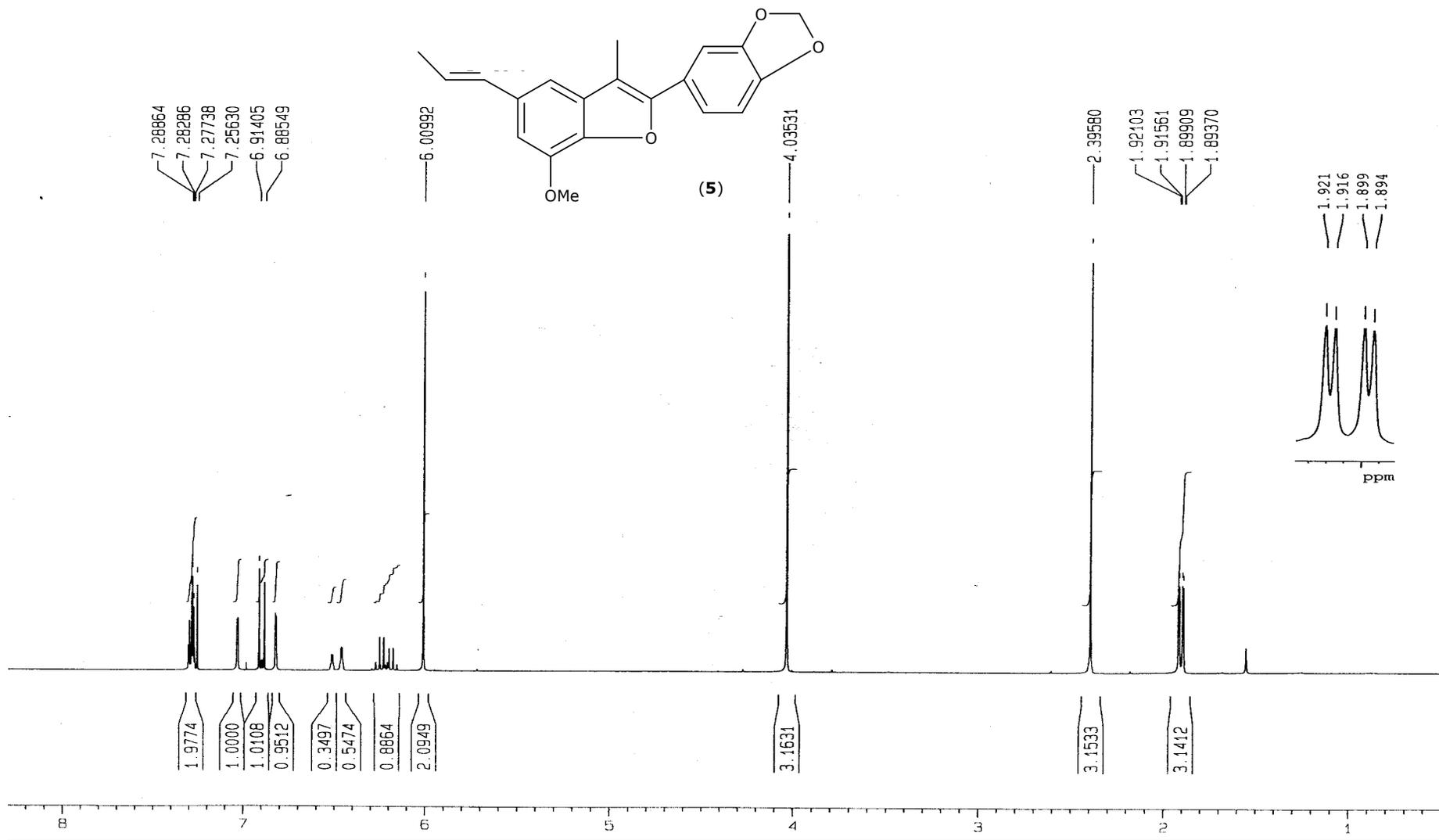
5-05-06



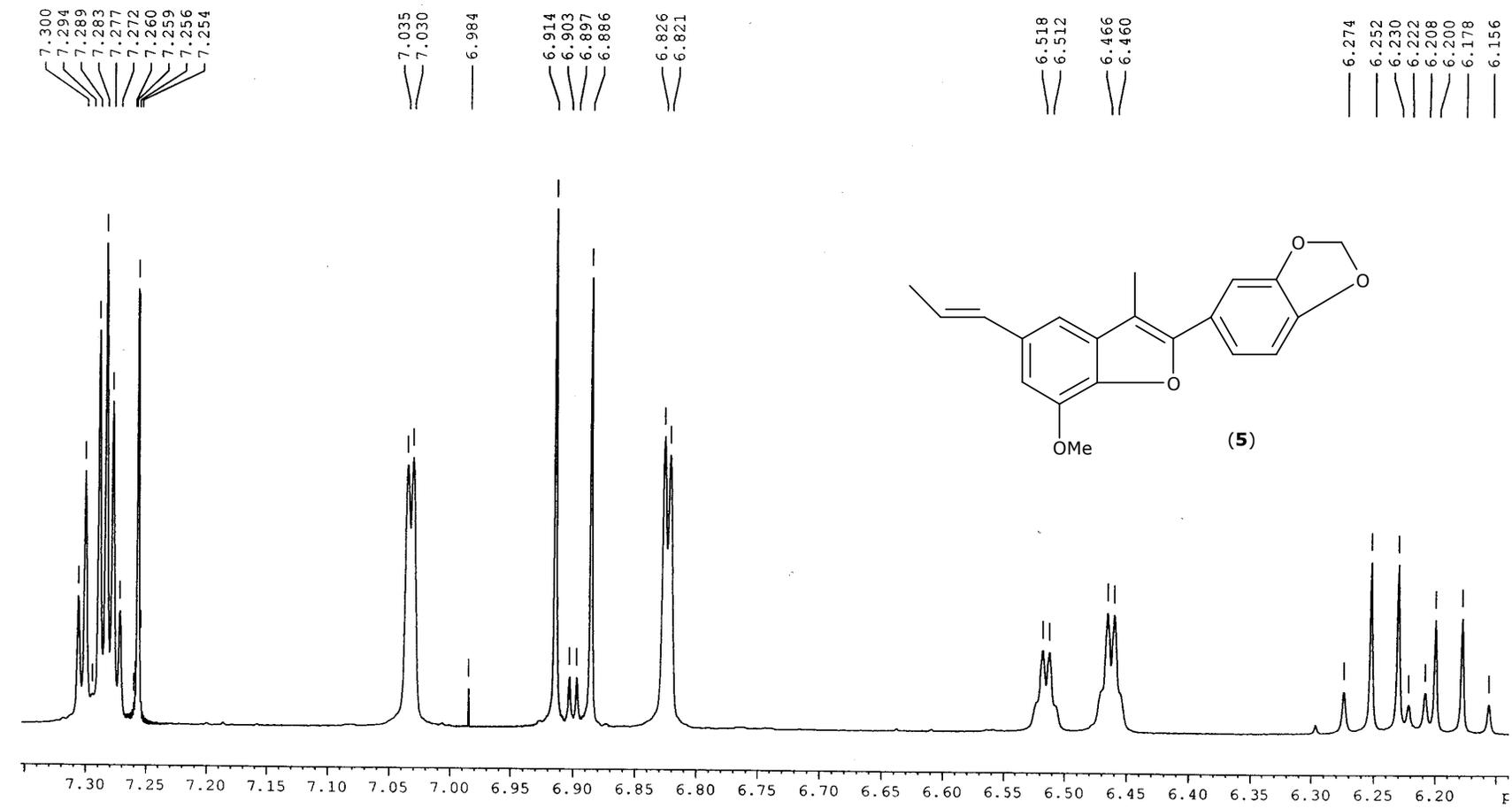
**Espectro 1.** Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H del estigmastan-3,5-dieno



**Espectro 2.** Espectro de Masas por Impacto Electrónico del estigmastan-3,5-dieno



**Espectro 3.** Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  del eupomatenoide 1

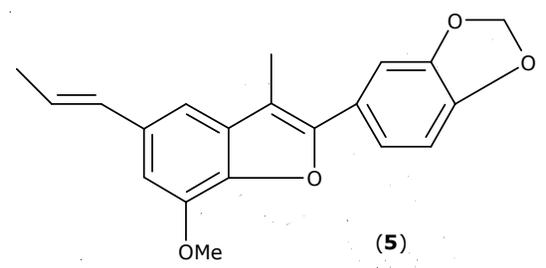
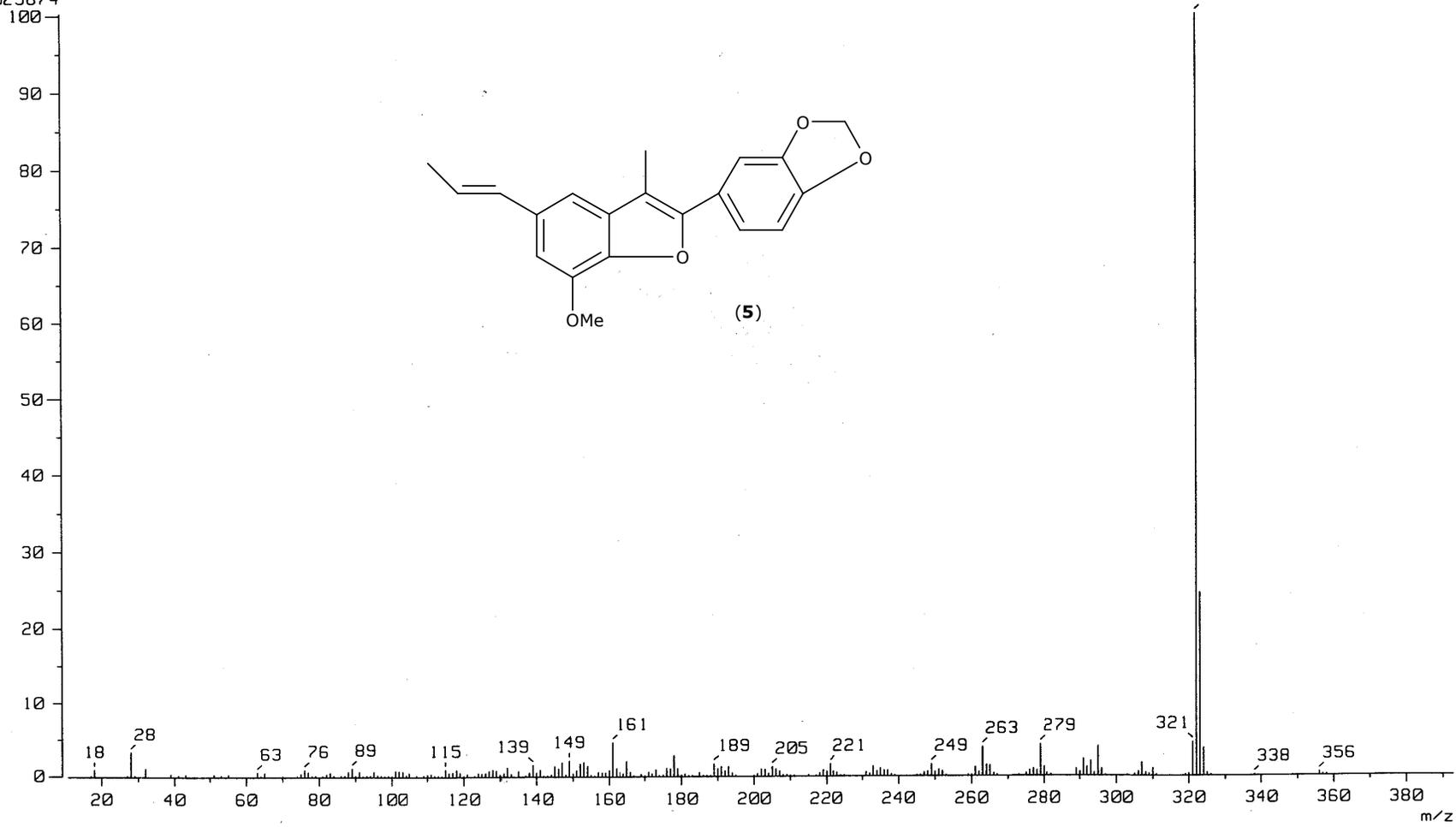


**Espectro 3.** Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H del eupomatenoide 1 (continuación)

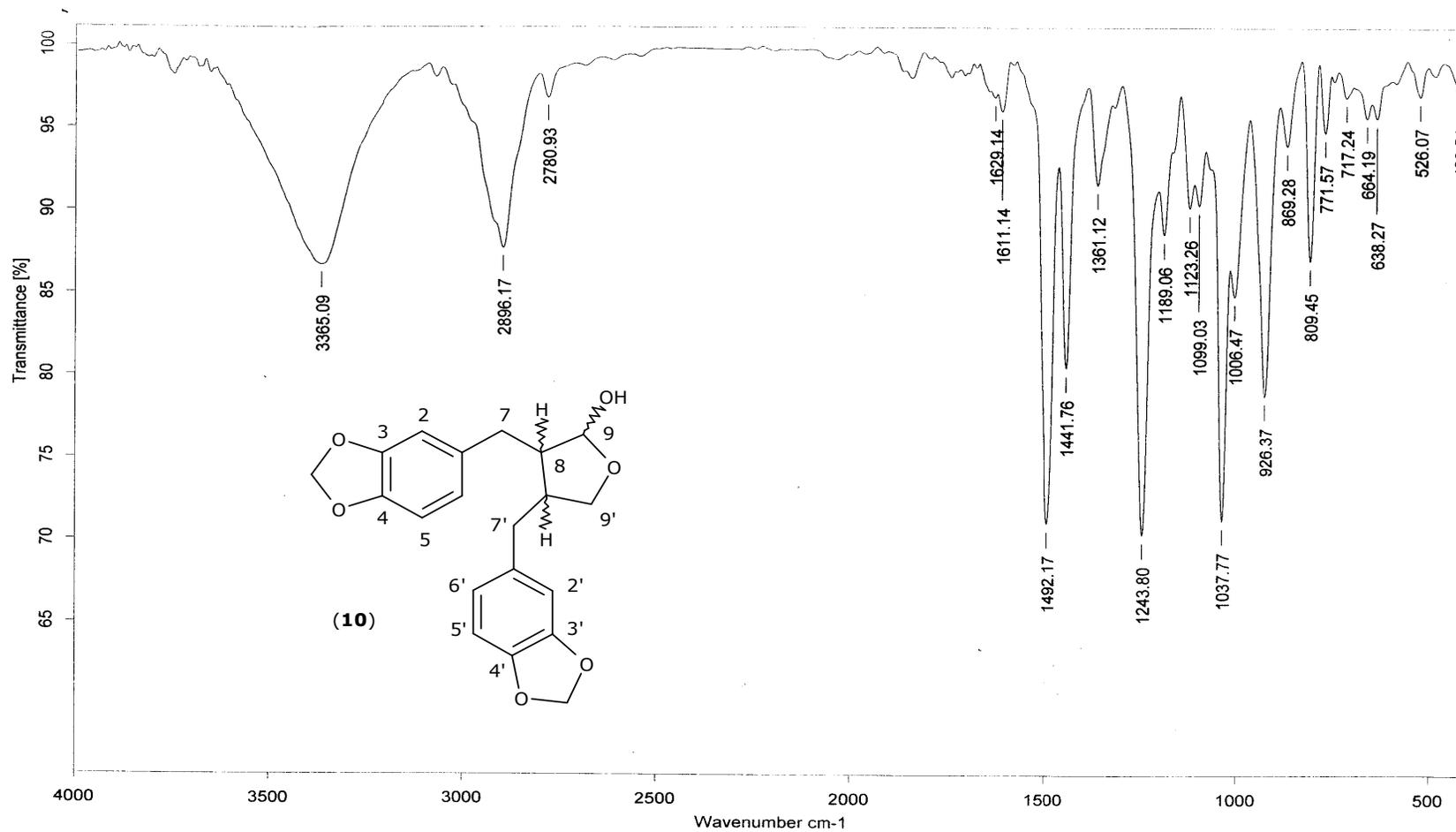
: 0.67 min Scan# : (13,20)  
: m/z 322.0000 Int. : 573.40  
Input m/z range : 10.6825 to 392.8783

Temp : 234.2 deg.C  
Cut Level : 0.00 %

5029874



**Espectro 4.** Espectro de Masas por Impacto Electrónico del eupomatenoide 1



C:\infrarrojo\AIR-2007\STE-1341.0 Dra.A.Jimenez 9-7H KBr/Pastilla RPM

26/10/2007

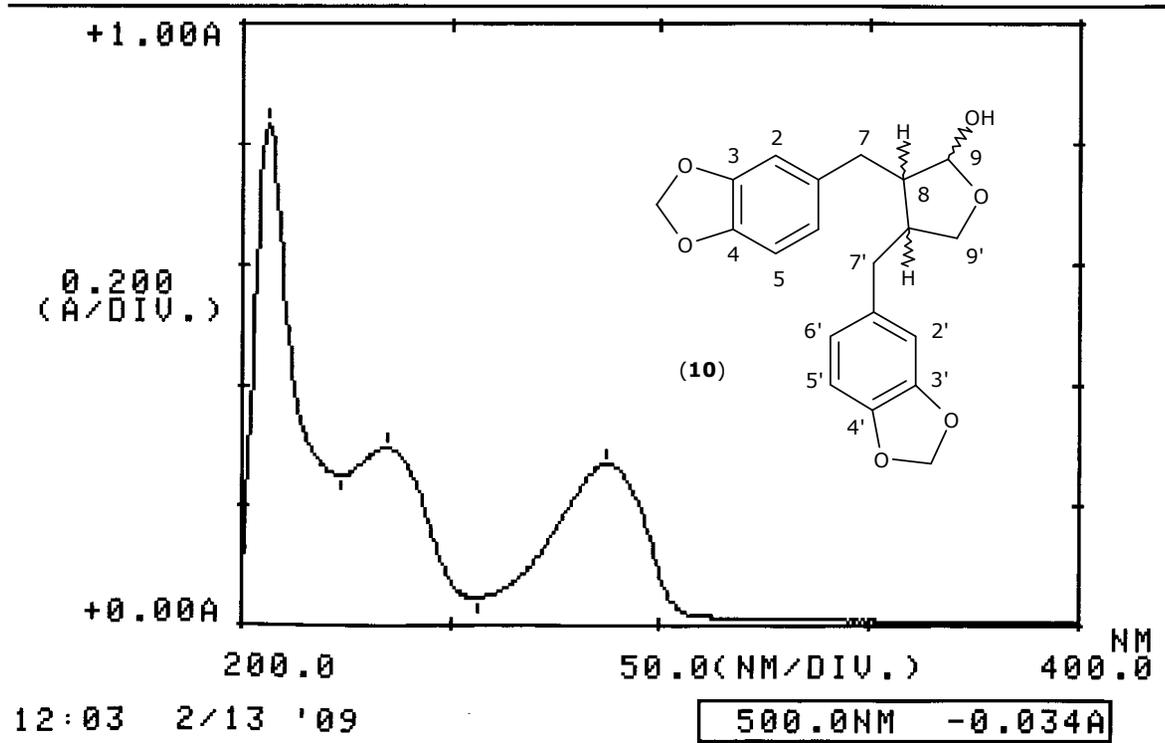
**Espectro 5.** Espectro de Infrarrojo de la (-)-cubebina

Dra. A. Jiménez A = 0.3mg/ml → 0.3ml/5ml

--- PEAK --- VALLEY ---  
λ ABS λ ABS

287.0	0.268	256.5	0.046
234.5	0.296	224.0	0.251
206.5	0.836		

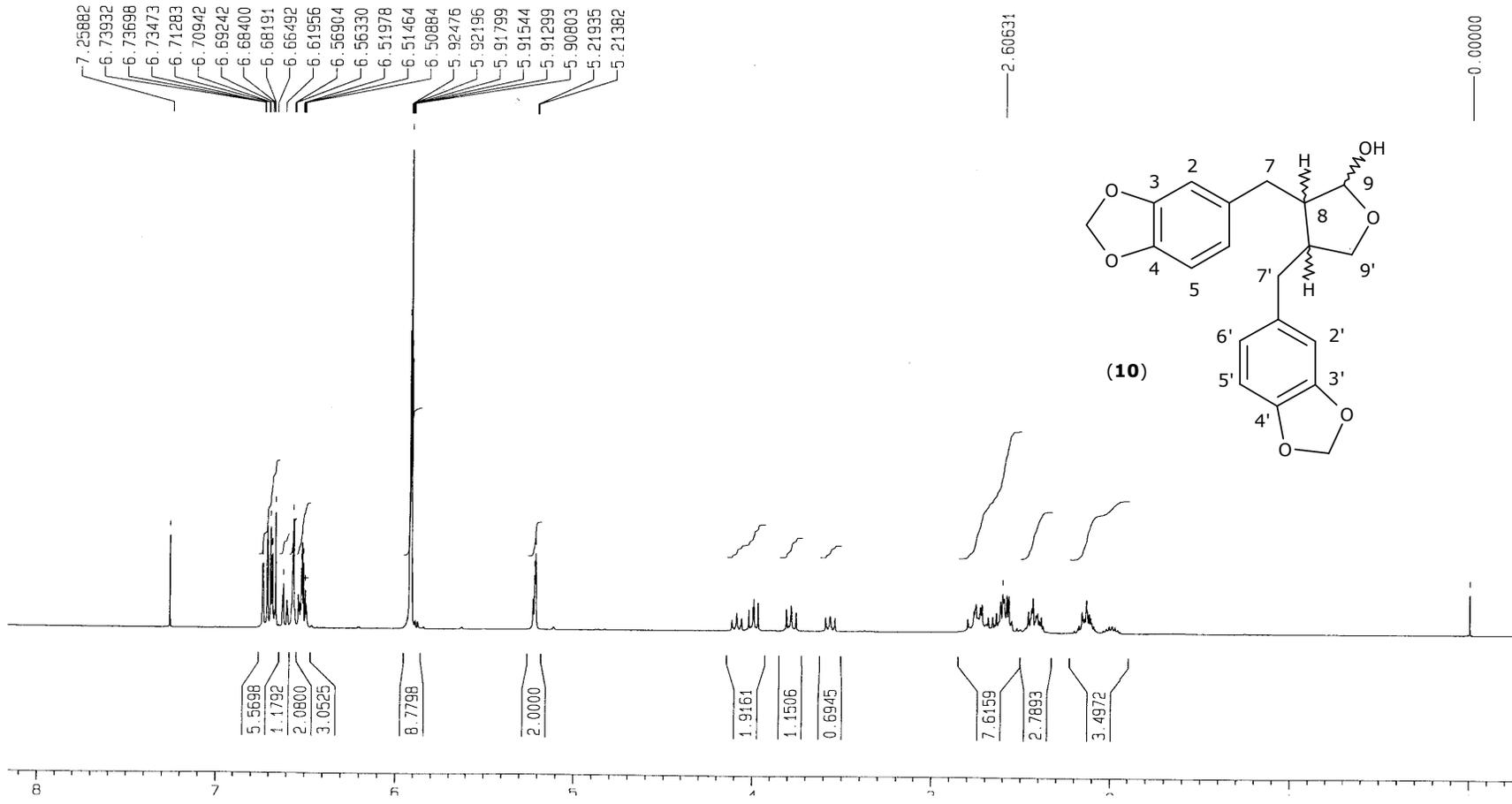
SAMP: 9-7 H1 REF: MeOH



No. STE1709

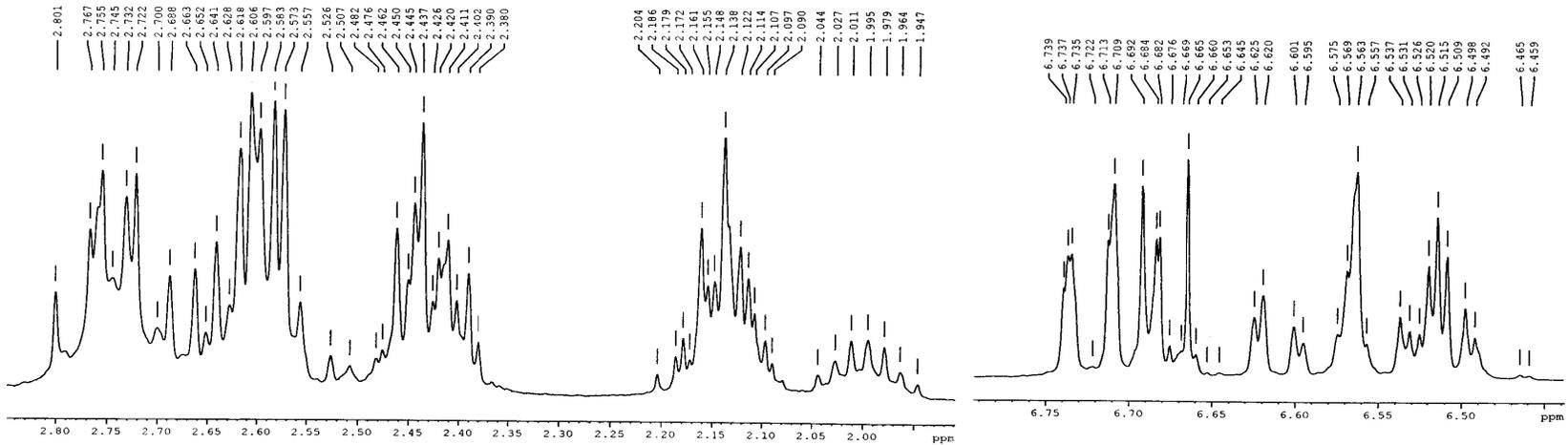
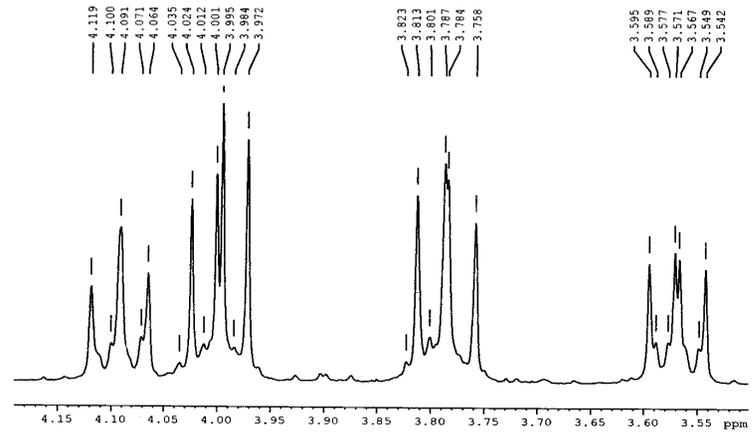
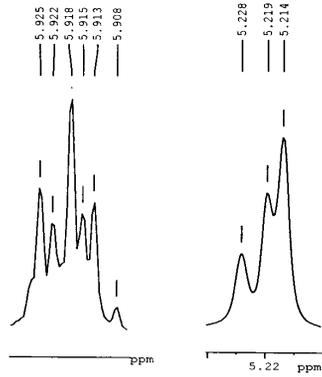
**Espectro 6.** Espectro de UV de la (-)-cubebina

Dra. Adelina Jimenez  
Clave: 9-7H  
CDC13  
Bruker-Avance 300MHz-F  
1H  
No. registro: STe-1387  
14-01-08



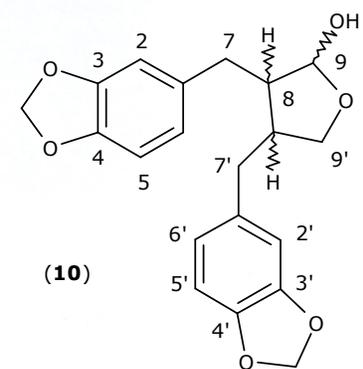
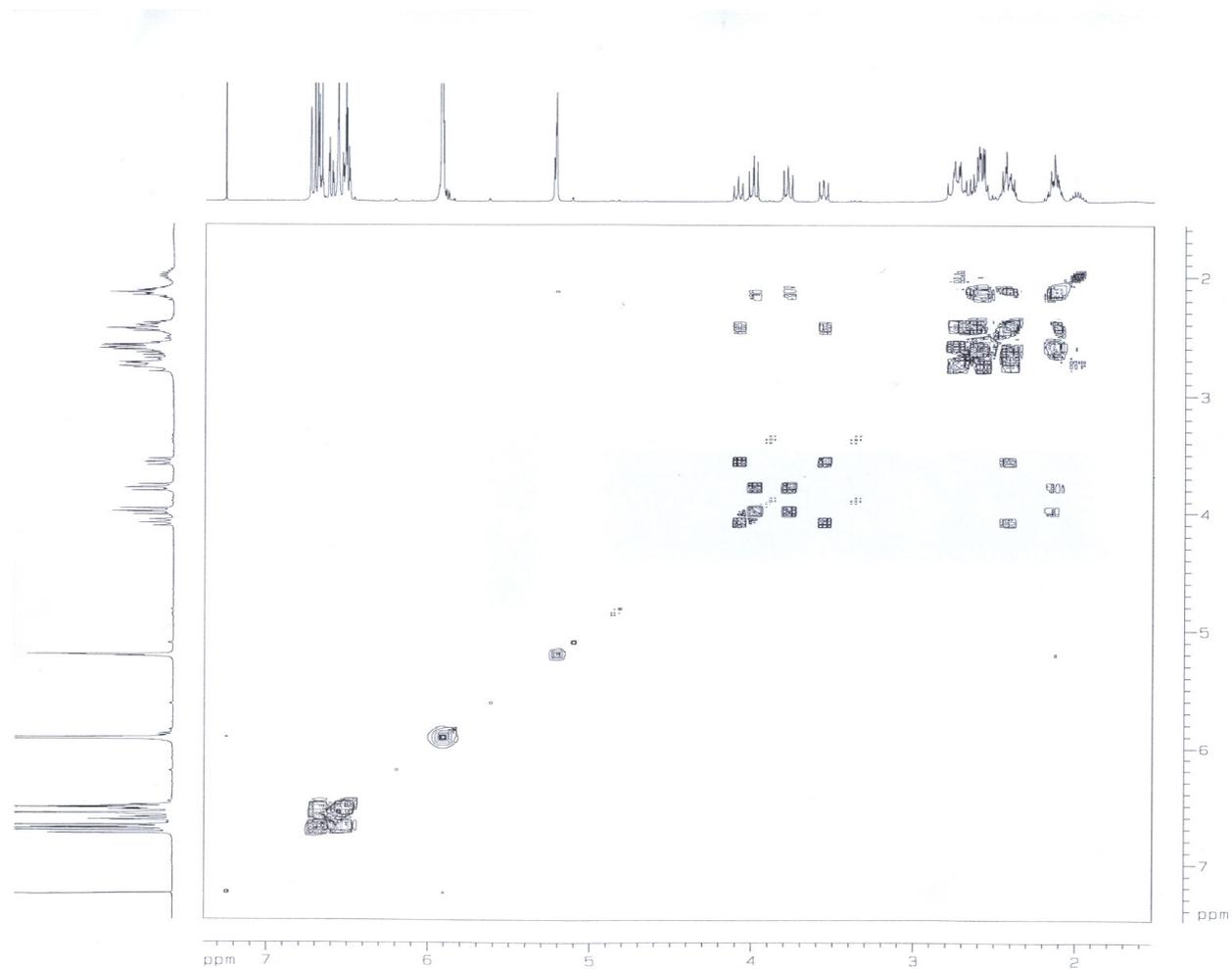
**Espectro 7.** Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H de la (-)-cubebina

Instituto de Química UNAM NZ  
 Dra. Adelina Jimenez  
 Clave: 9-7H  
 CDC13  
 Bruker-Avance 300MHz-F  
 1H  
 No. registro: STe-1387  
 14-01-08



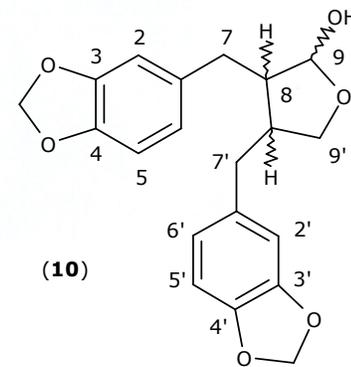
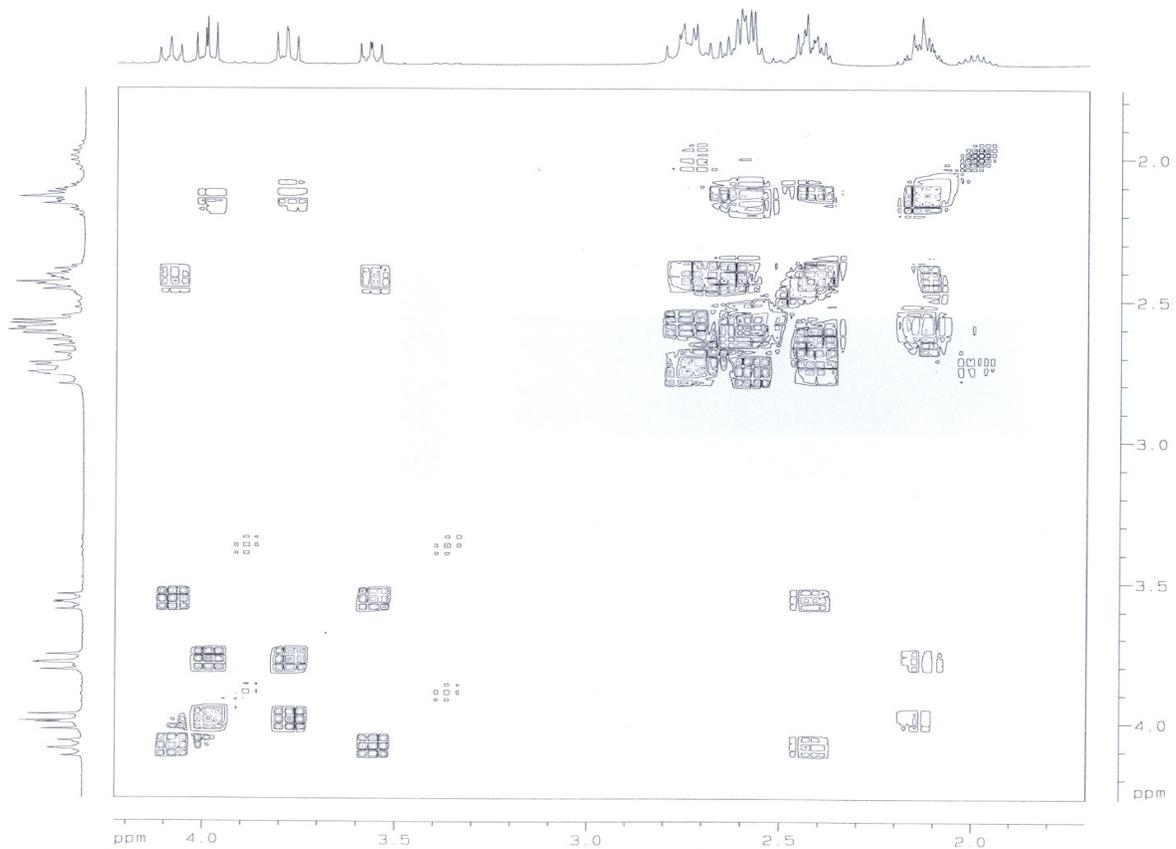
**Espectro 7.** Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  de la (-)-cubebina (continuación)

Instituto de Química UNAM NZ  
Dra. Adelina Jimenez  
Clave: 9-7H  
CDC13  
Bruker-Avance 300MHz-F  
Cosy  
No. registro: STe-1387  
14-01-08



**Espectro 8.** Espectro COSY de la (-)-cubebina

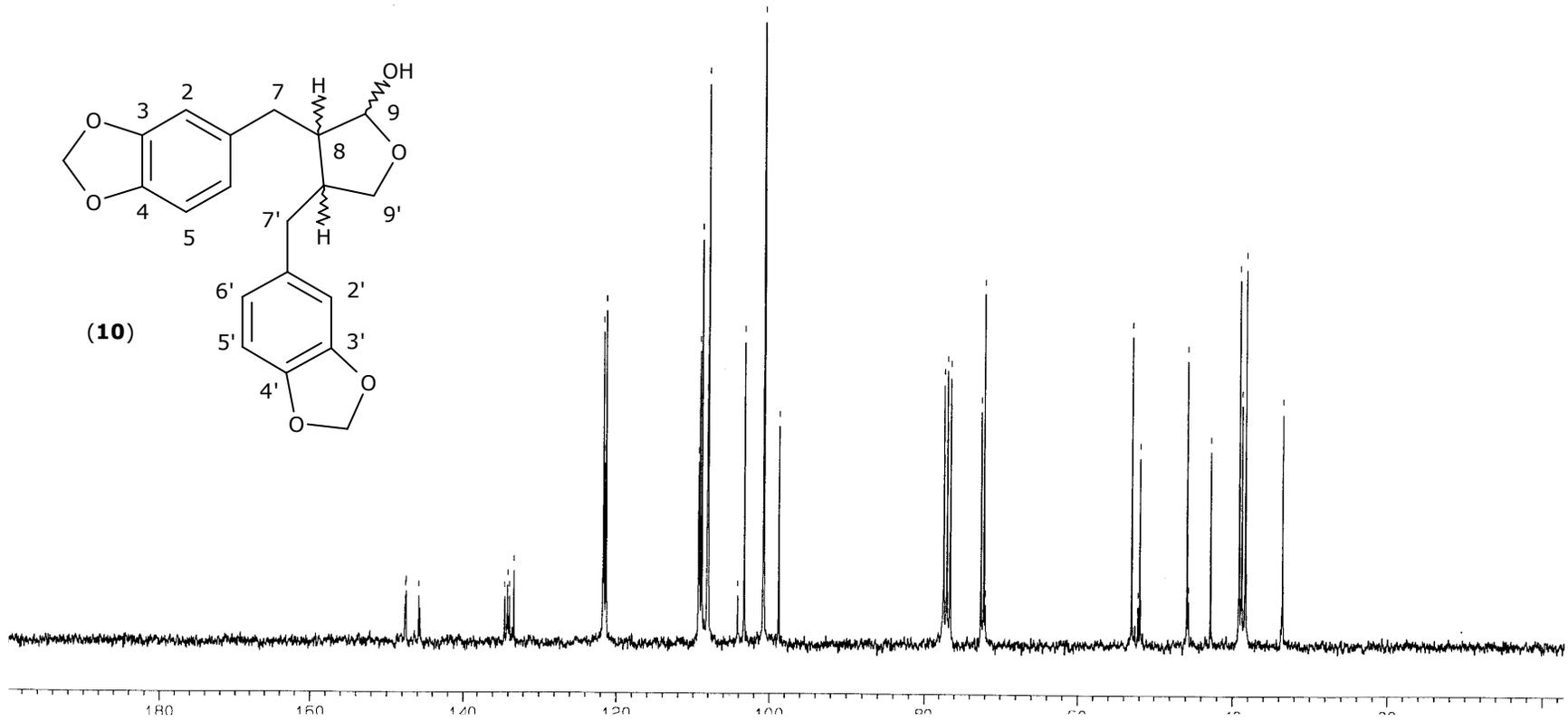
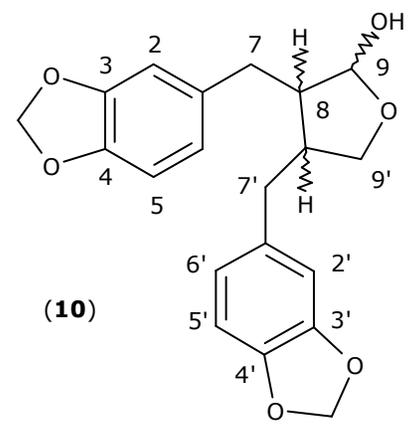
Instituto de Química UNAM NZ  
Dra. Adelina Jiménez  
Clave: 9-7H  
CDC13  
Bruker-Avance 300MHz-F  
Cosy  
No. registro: STe-1387  
14-01-08



**Espectro 8.** Espectro COSY de la (-)-cubebina (continuación)

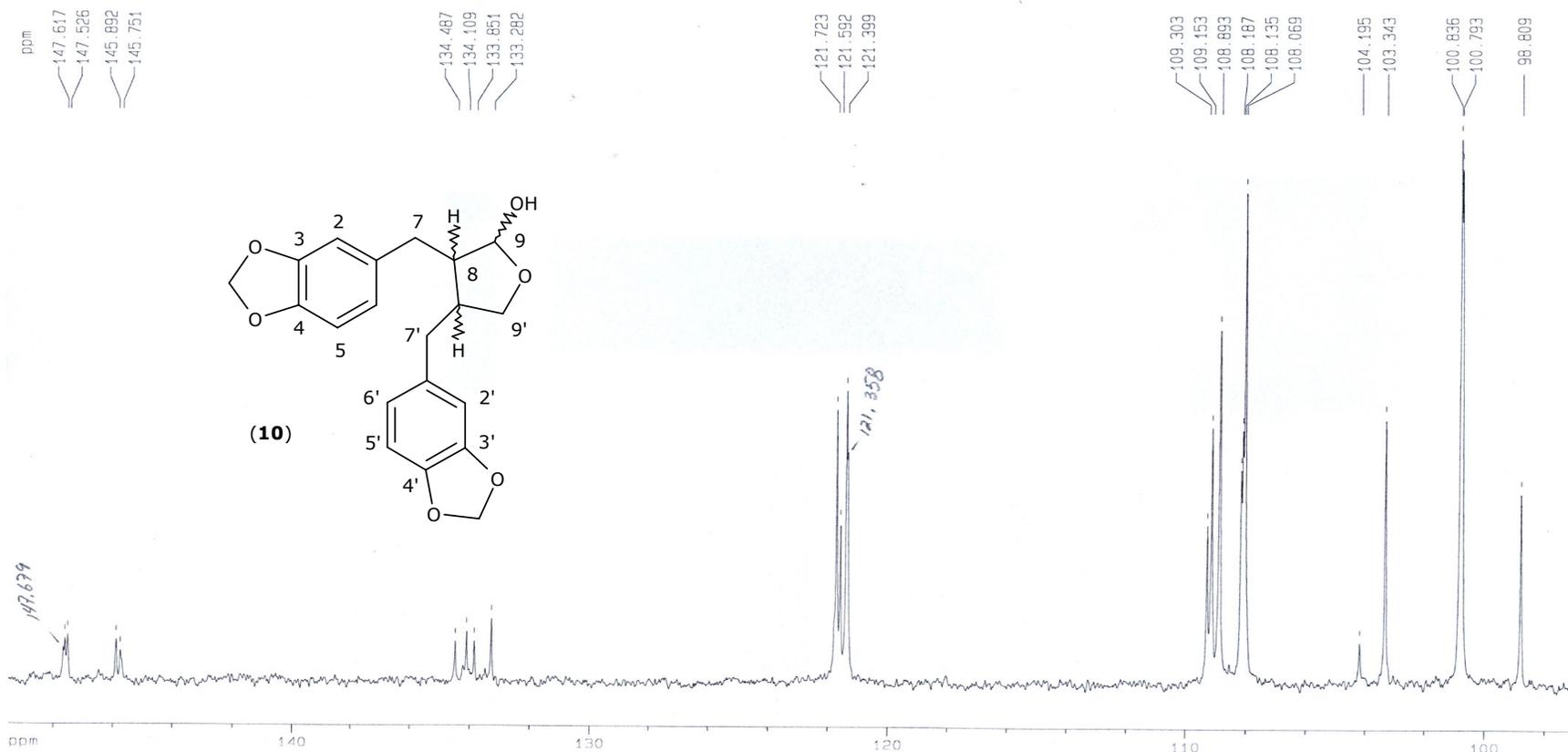
Dra. Adelina Jimenez  
 Clave: 9-7H  
 CDC13  
 Bruker-Avance 300MHz-F  
 13C  
 No. registro: STe-1387  
 14-01-08

147.617  
 147.526  
 145.892  
 134.487  
 134.109  
 133.851  
 133.282  
 121.723  
 121.592  
 121.399  
 109.303  
 109.153  
 108.893  
 108.187  
 108.135  
 108.069  
 104.195  
 103.343  
 100.836  
 100.793  
 98.809  
 77.432  
 77.008  
 76.584  
 72.594  
 72.203  
 72.030  
 53.053  
 52.249  
 52.011  
 45.867  
 45.678  
 42.867  
 39.196  
 38.874  
 38.406  
 33.599



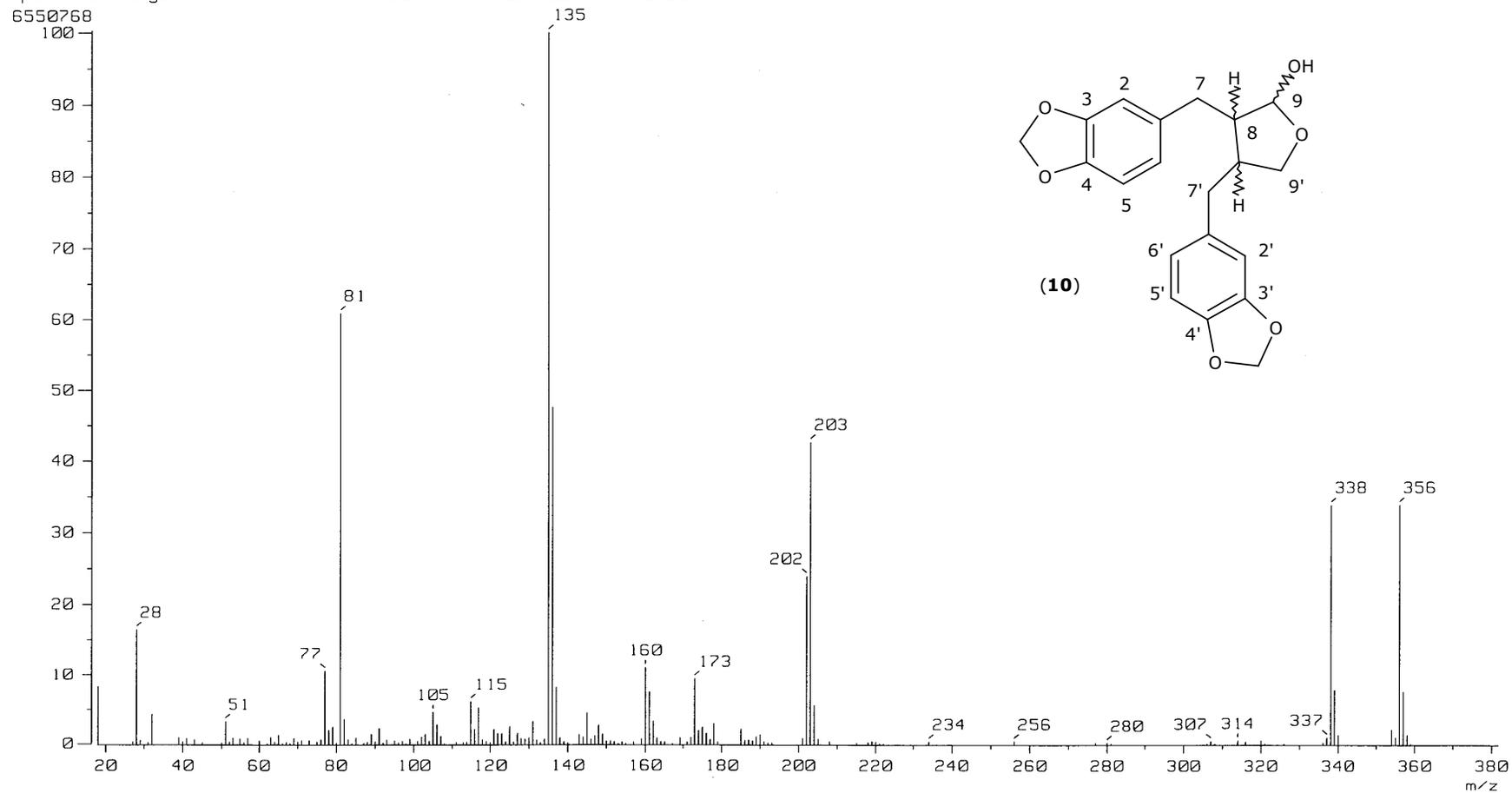
**Espectro 9.** Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup>C de la (-)-cubebina

Instituto de Química UNAM N2  
Dra. Adelina Jimenez  
Clave: 9-7H  
CDC13  
Bruker-Avance 300MHz-F  
13C  
No. registro: STe-1387  
14-01-08

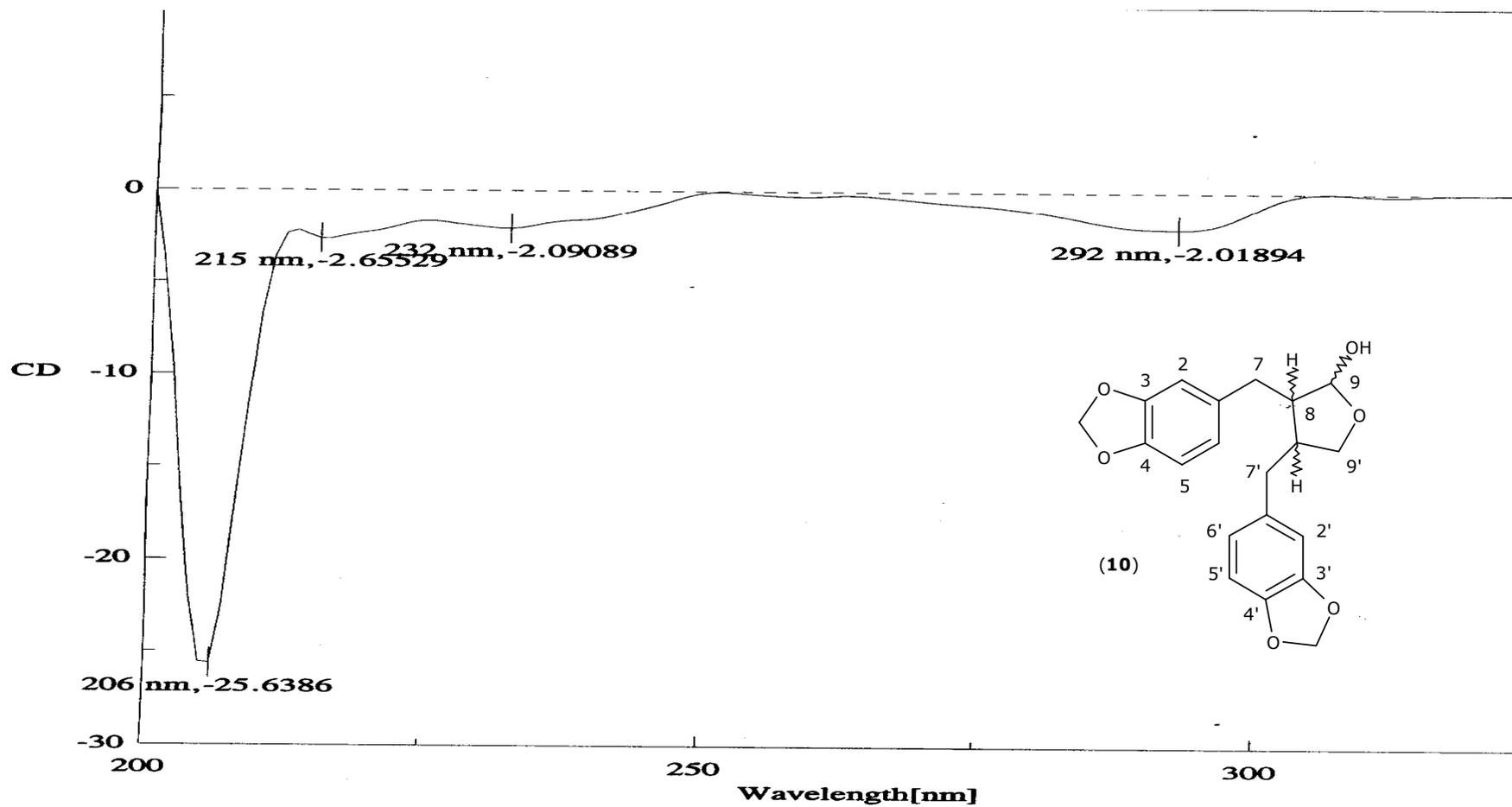


**Espectro 9.** Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup>C de la (-)-cubebina (continuación)

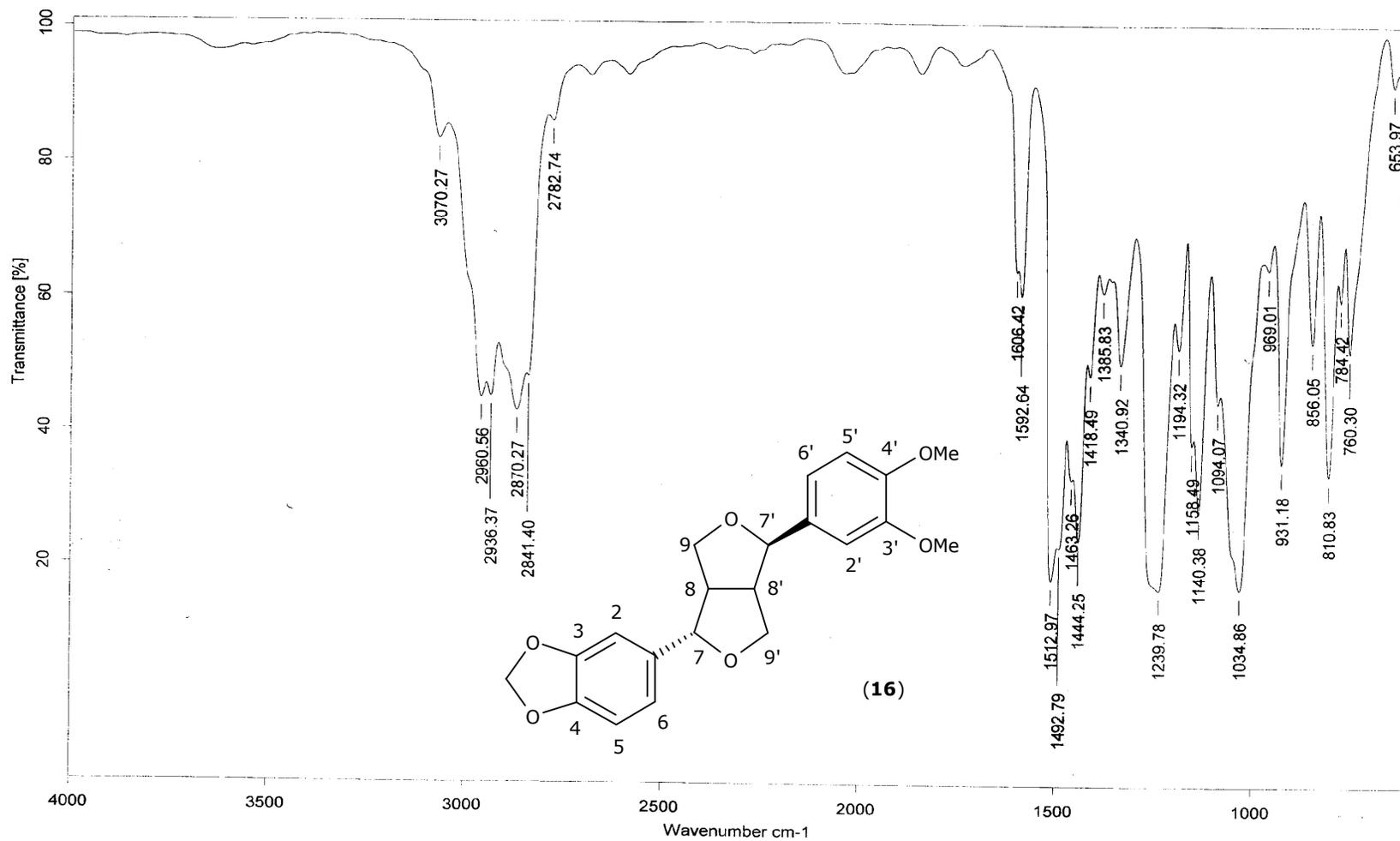
mple: 189 M220 9-7H JeolFX505HA  
 te : Javier-Perez  
 let : Direct Ion Mode : EI+  
 spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]  
 : 0.54 min Scan# : (13,16) Temp : 271.5 deg.C  
 : m/z 135.0000 Int. : 622.93  
 tput m/z range : 17.7804 to 381.7953 Cut Level : 0.00 %



**Espectro 10.** Espectro de Masas por Impacto Electrónico de la (-)-cubebina



**Espectro 11.** Dicroísmo Circular de la (-)-cubebina



**Espectro 12.** Espectro de Infrarrojo de la fargesina

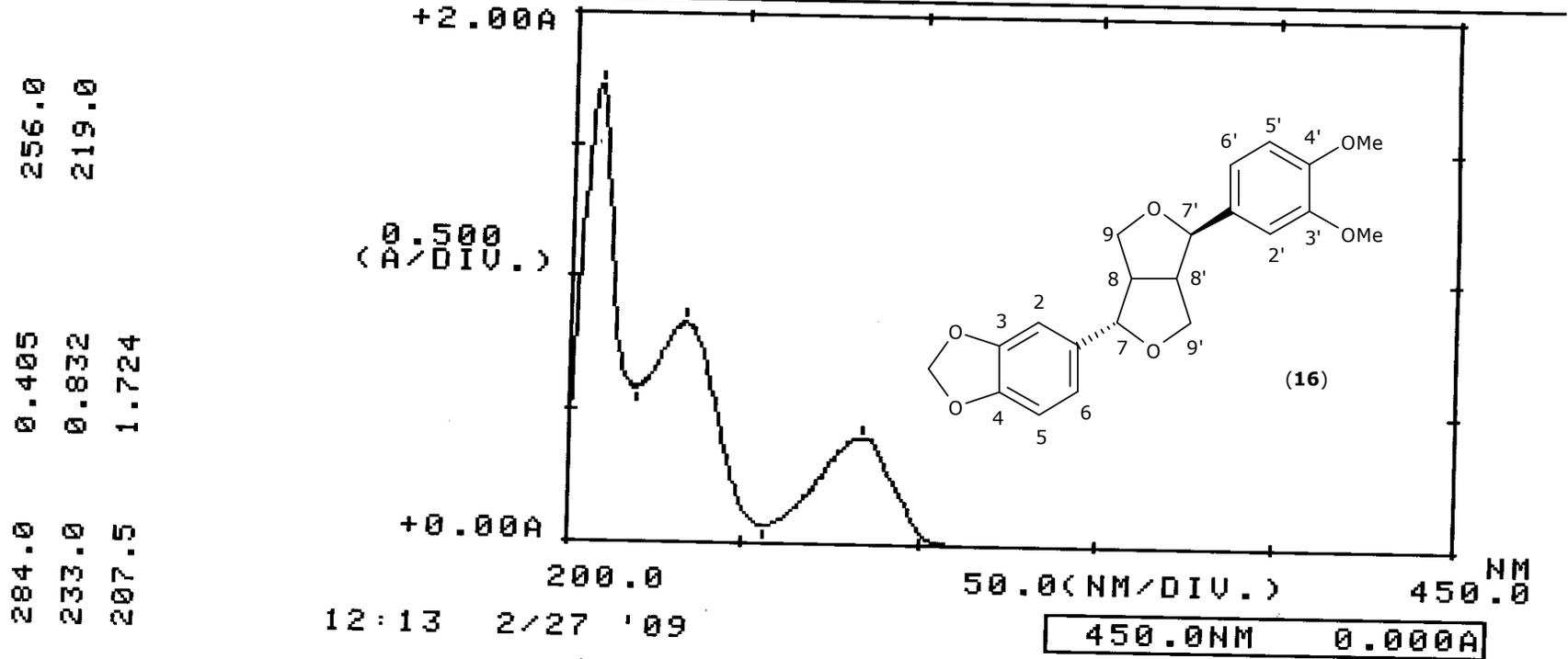
Dra. A. Jiménez

A = 0.5mg/ml → 0.2ml/5ml

0.070  
0.587

SAMP: 9-7I

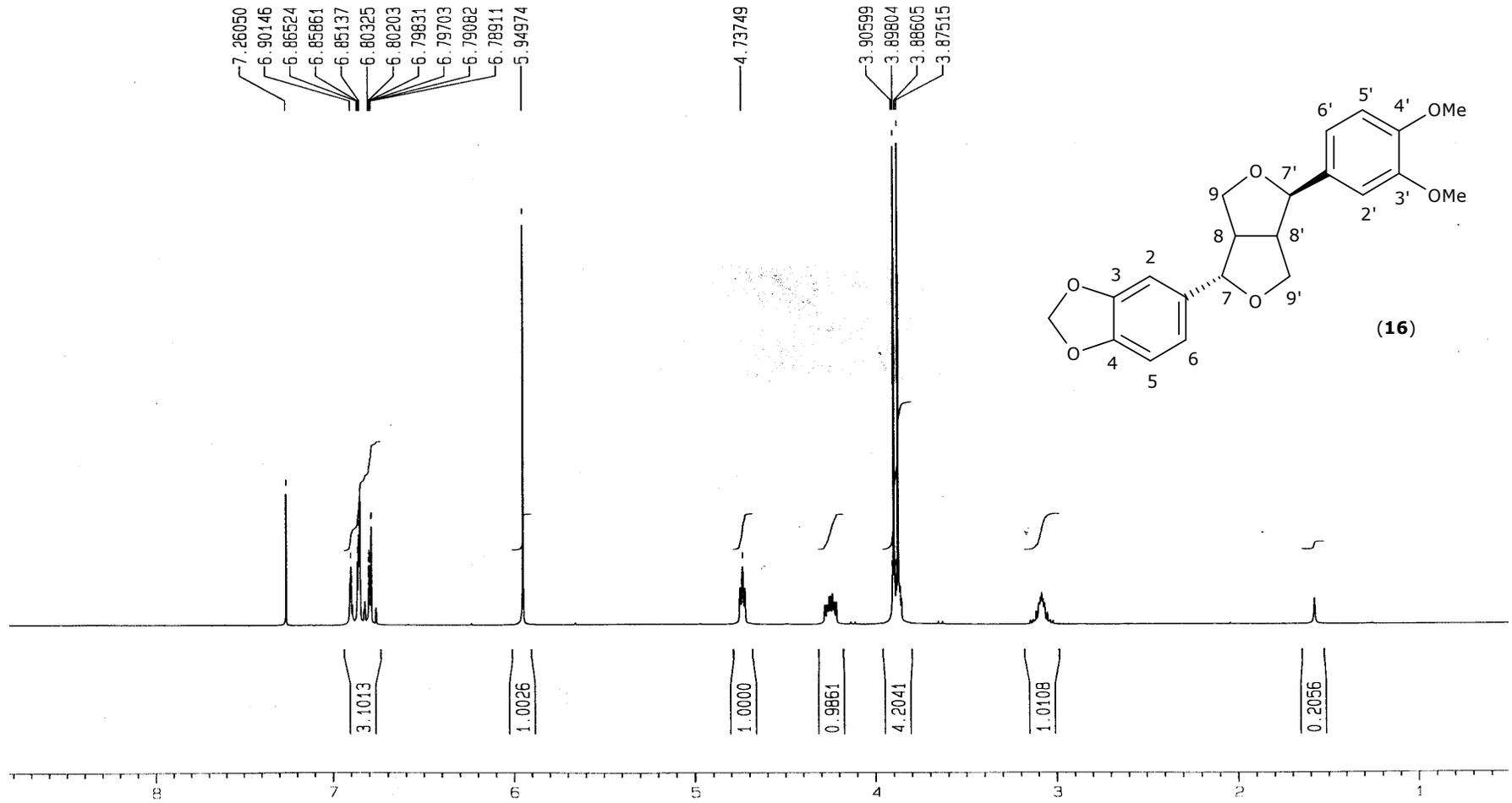
REF: MeOH



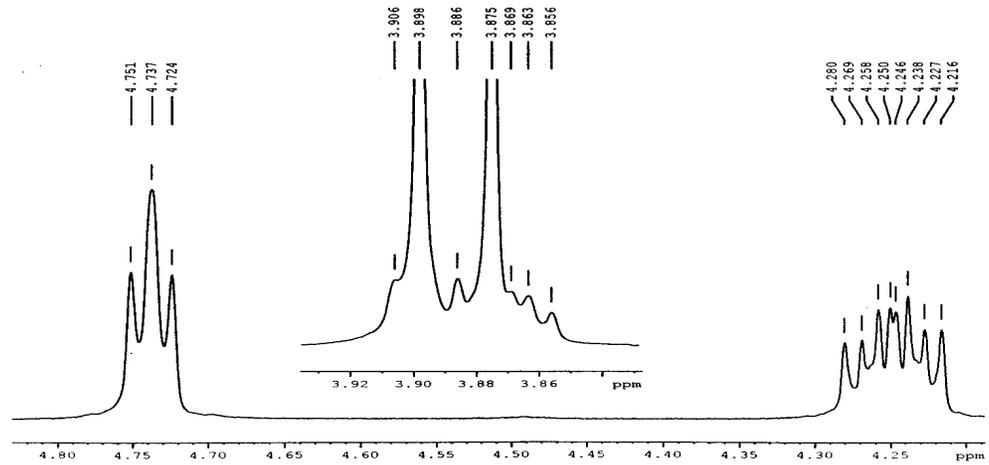
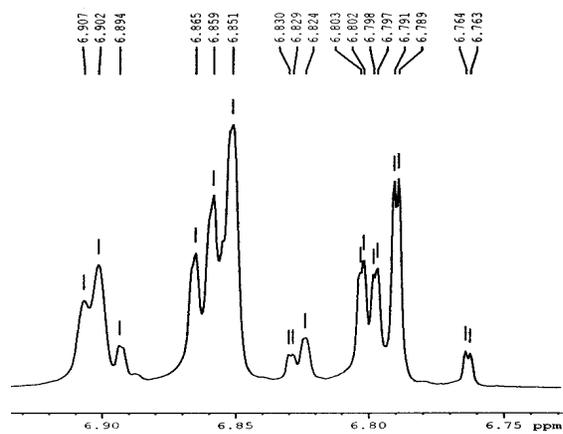
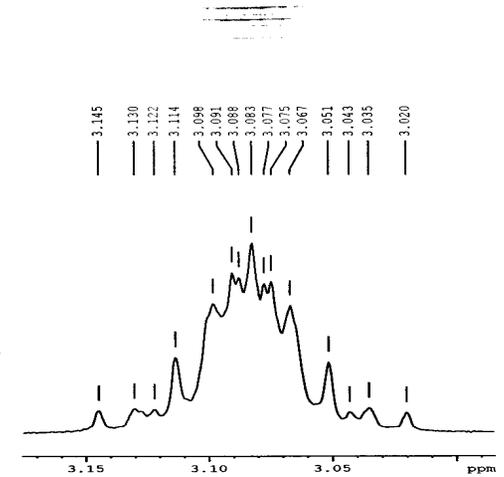
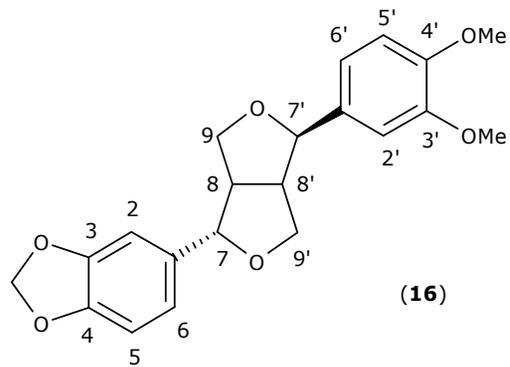
710, STE 1711

**Espectro 13.** Espectro de UV de la fargesina

LUC13  
Bruker-Avance 300MHz-F  
1H  
No. registro: STE-1699  
22-01-09

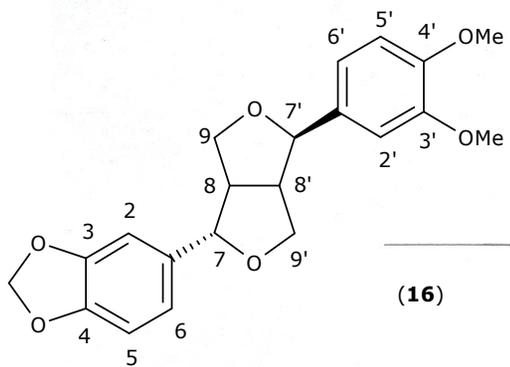


**Espectro 14.** Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H de la fargesina

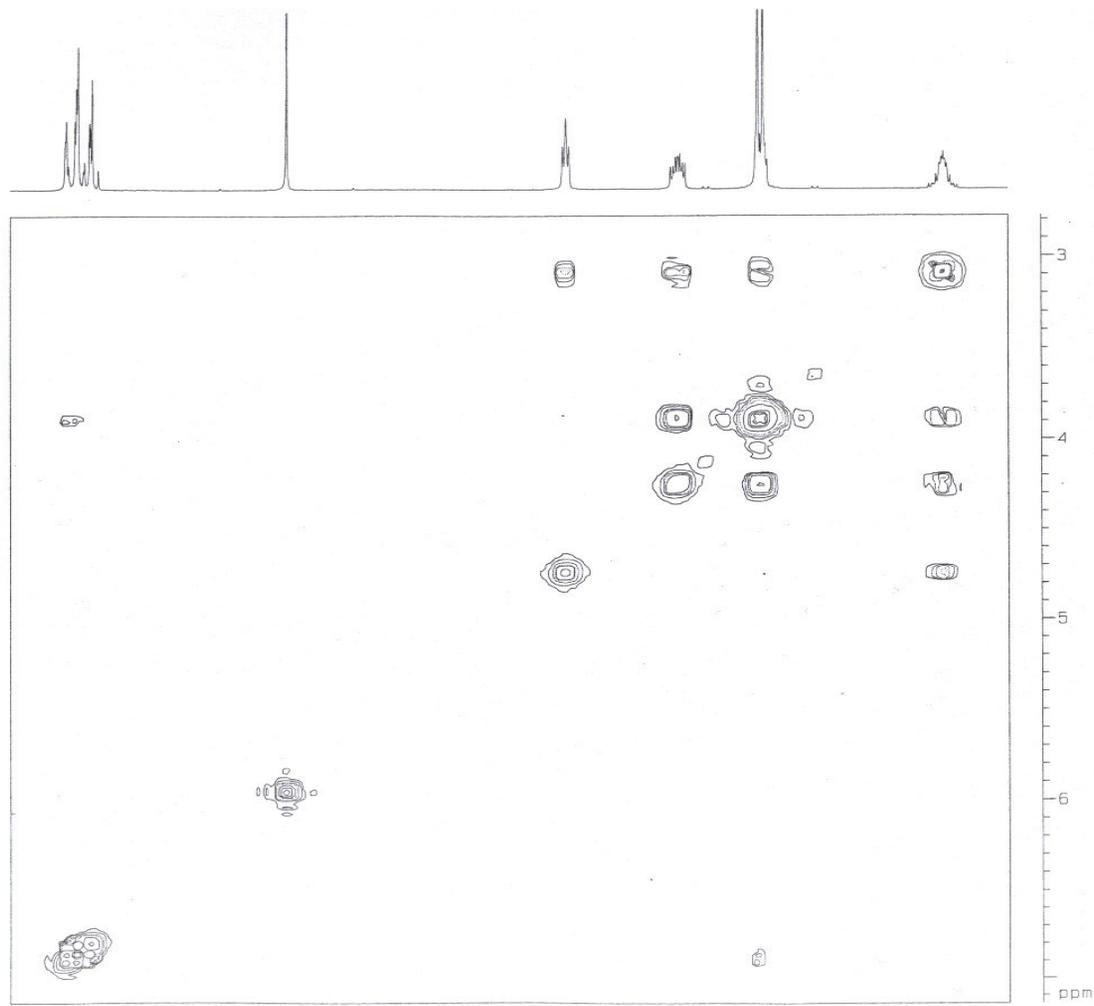


**Espectro 14.** Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  de la fargesina (continuación)

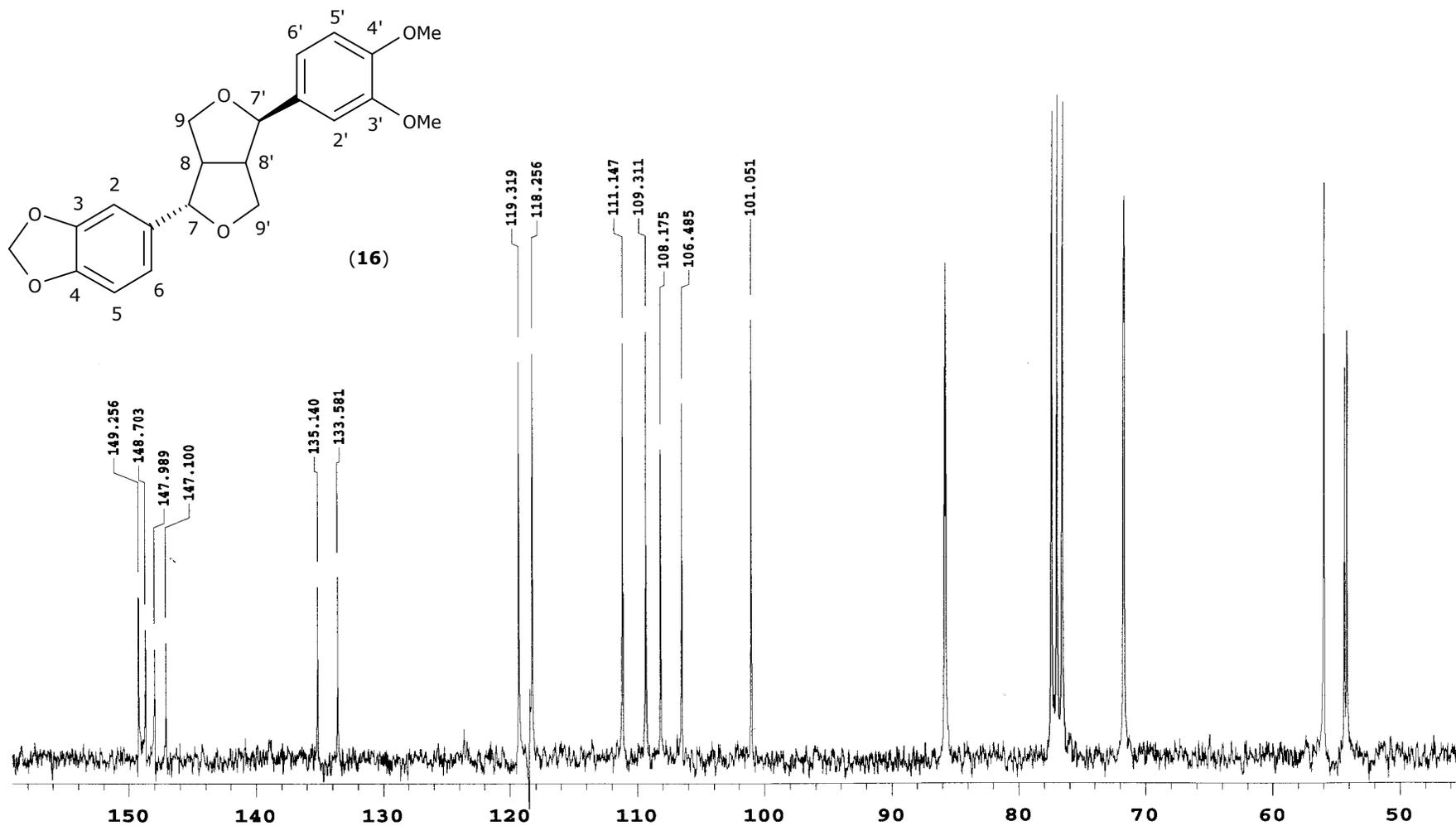
Instituto de Química UNAM (BGG)  
SEC. TÉCNICA / Adelina J.  
Clave: 9-7I  
No. de Registro: STE-1711  
Experimento: COSY  
Disolvente: CDCl<sub>3</sub>  
Bruker-Avance (F) 300 MHz  
25-Febrero-2009



(16)

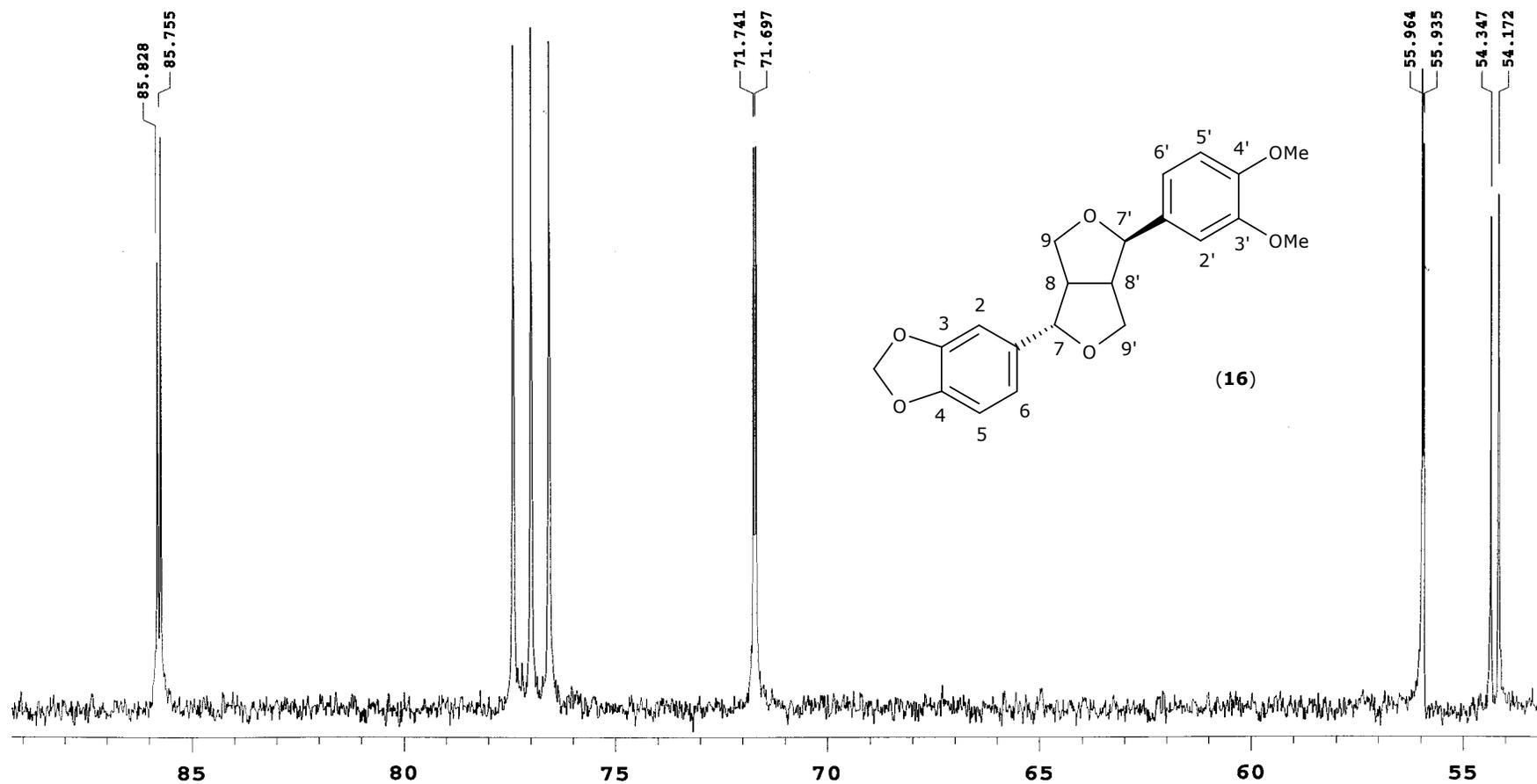


**Espectro 15.** Espectro COSY de la fargesina



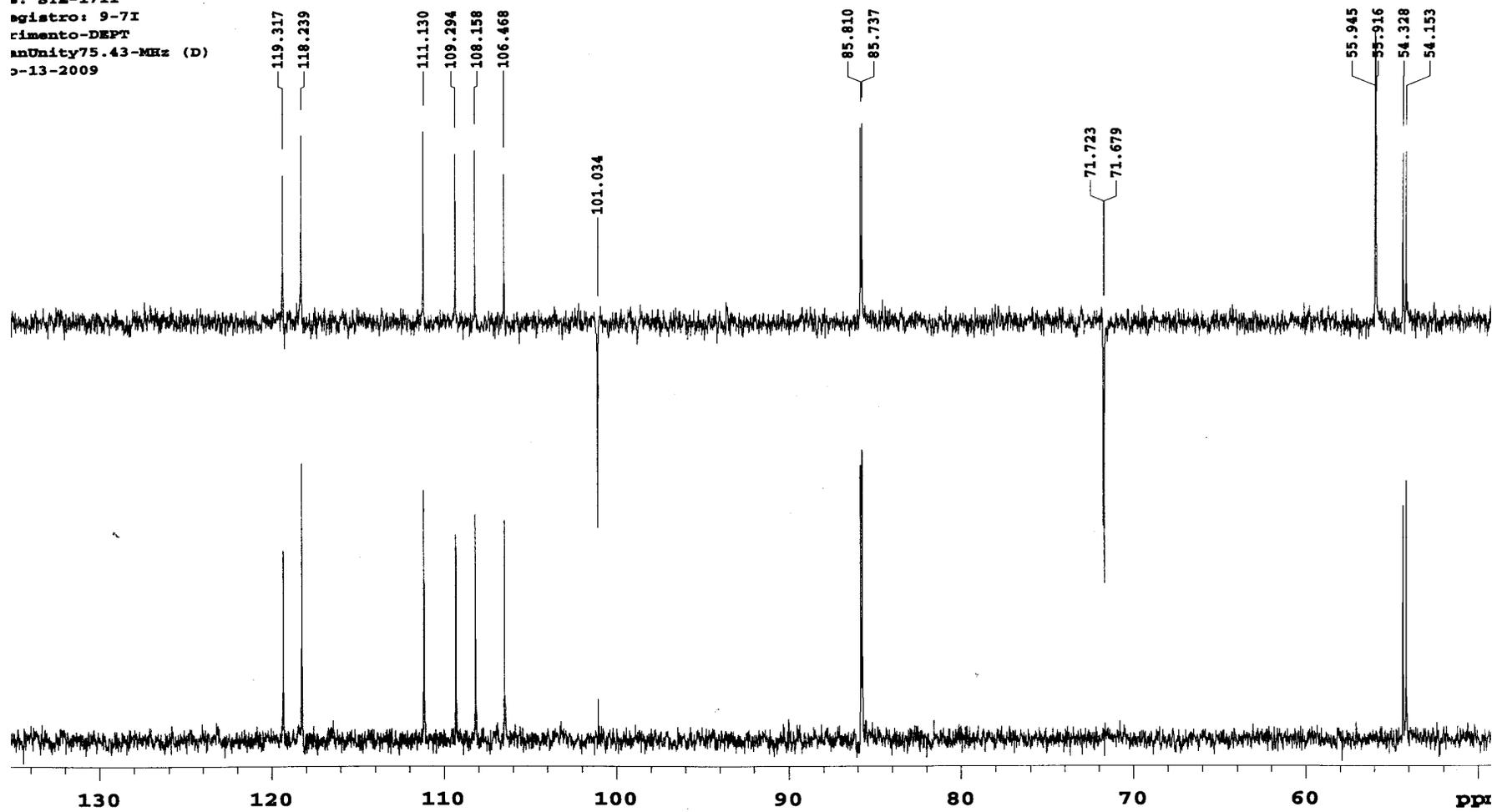
**Espectro 16.** Resonancia Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  de la fargesina

Experimento: C13  
Disolvente: CDCl3  
VarianUnity-75.4MHz (D)  
Marzo-13-2009



**Espectro 16.** Resonancia Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  de la fargesina (continuación)

TECNICA/Dra-Adelina-Jimenez  
s: STE-1711  
registro: 9-7I  
rimiento-DEPT  
anUnity75.43-MHz (D)  
3-13-2009

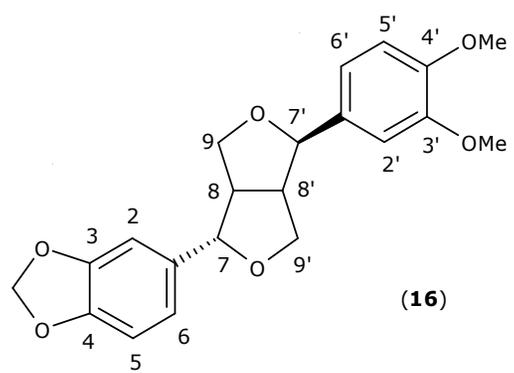
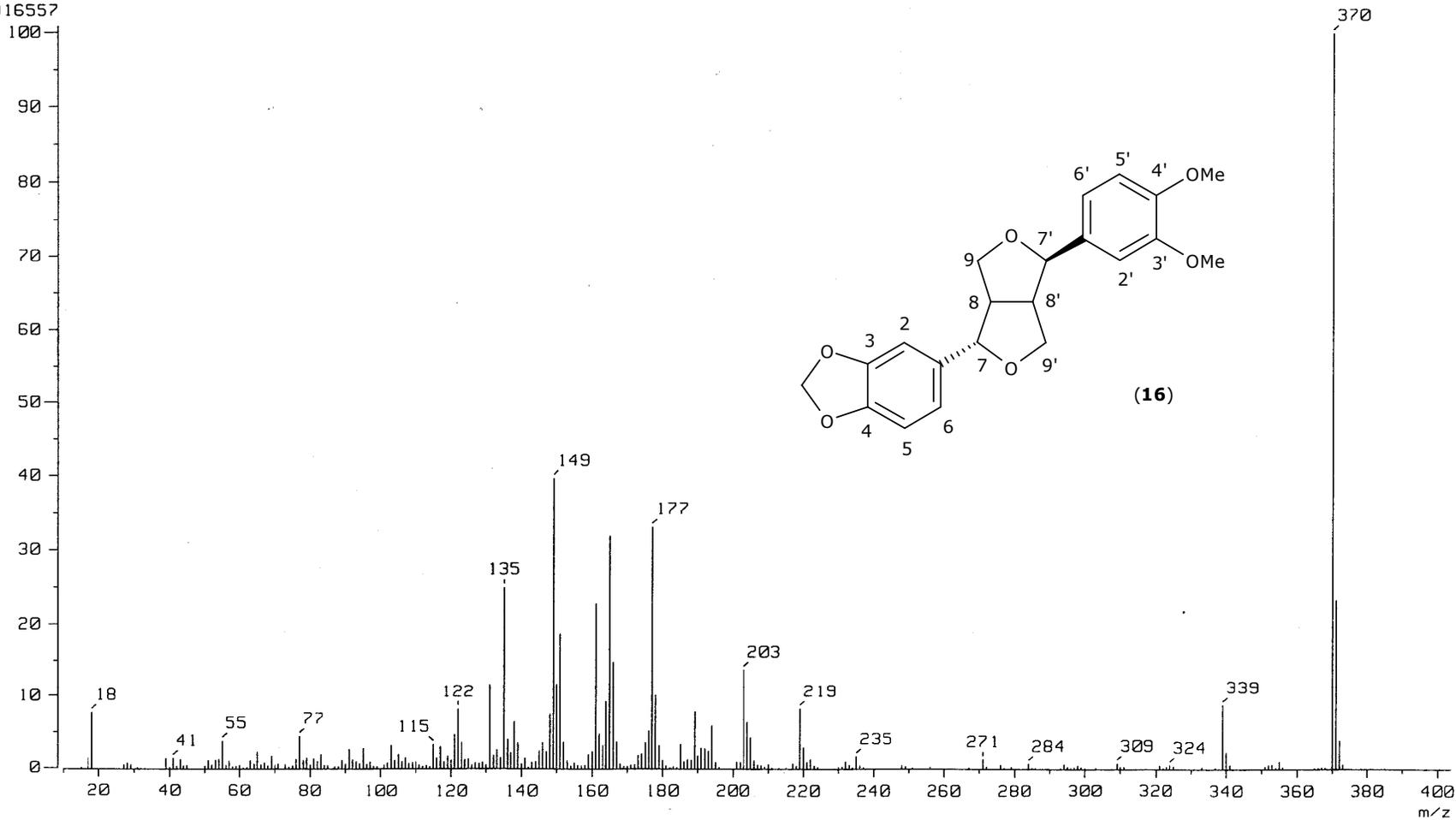


**Espectro 16.** Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup>C de la fargesina (continuación)

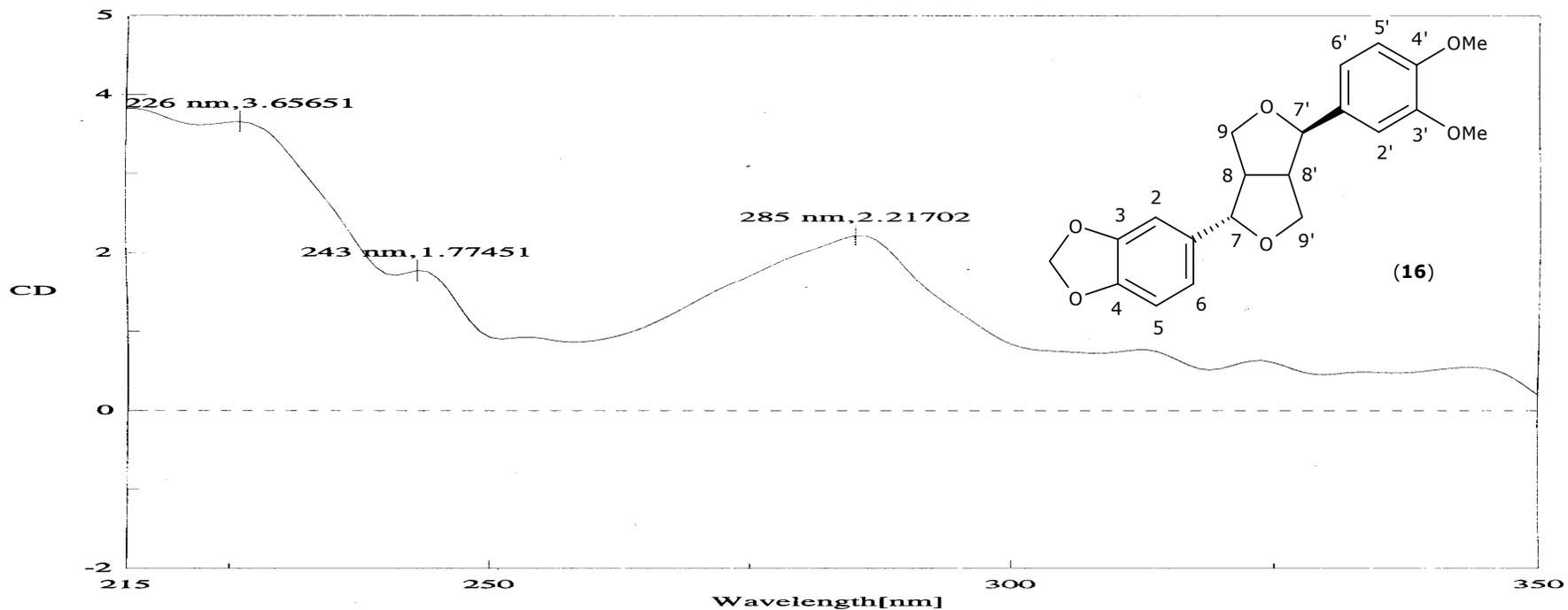
Scan : 119,207  
m/z 370.0000 Int. : 1126.68  
Output m/z range : 10.0000 to 403.8279  
11916557

Temp : 327.2 deg.C

Cut Level : 0.00 %



**Espectro 17.** Espectro de Masas por Impacto Electrónico de la fargesina



27-02-09 A = 0.5mg/ml --> 0.2ml/5ml

File Name : 203094.jws  
 Date : 03/03/109 1:04a.m. [03/03/109 0:35a.m.]  
 Sample : Dra.A.Jimenez 9-7I  
 Cell Length : 1 cm  
 Concentration : 0 M  
 Solvent : MeOH  
 Temperature : Room Temp.  
 Operator : Rocio Patiño  
 Organization : Instituto de Quimica, UNAM  
 Comment : 27-02-09 A = 0.5mg/ml --> 0.2ml/5ml

**Espectro 18.** Dicroismo Circular de la fargesina