



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ENSAYOS DE ACTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ANTIINFLAMATORIO DE LA CORTEZA MEDICINAL  
DE *Alnus acuminata ssp arguta* (Betulaceae)**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

QFB. ILEANA CECILIA ÁVILA VALDÉS



TUTOR: Dra. Ma. Isabel Aguilar Laurents

AÑO: 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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

|            |                                      |
|------------|--------------------------------------|
| Presidente | Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo       |
| Vocal      | Dr. Manuel Jiménez Estrada           |
| Vocal      | Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas |
| Vocal      | Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda  |
| Secretario | Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez      |

Lugar donde se llevó a cabo el trabajo:

Laboratorio 125, Departamento de Farmacia, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.

Los resultados más importantes forman parte de la siguiente publicación:

Aguilar, Ml., Roveló, R., Verjan, JG., Illescas, O., Baeza, AE., De La Fuente, M., Ávila, I. y Navarrete, A. Anti-inflammatory activities triterpenoids and diarylheptanoids of *Alnus acuminata* ssp. *arguta*, *Pharmaceutical Biology*, **49**, 1052-1057 (2011)

Presentación en los siguientes congresos:

1. "Diarilheptanoides de *Alnus Acuminata* subsp. *arguta*". María Isabel Aguilar, Alejandrina Acosta Huerta e Ileana C. Ávila. 7ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales "Dr. Pedro Joseph-Nathan", del 18 al 20 de mayo de 2011. Morelia, Mich.
2. "Triterpenoids and diarylheptanoids of *Alnus acuminata* ssp. *arguta*". 52<sup>nd</sup> Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. M. I. Aguilar, M. De La Fuente, A. Navarrete, A. Acosta, I. Avila. San Diego, California, del 30 de julio al 3 de agosto de 2011.

*Dedicada a mis padres:*

*Sr. José Jorge Ávila Ramírez, quien me cuida desde el cielo y Sra. Martha Valdés Rodríguez, quien no ha dejado de apoyarme y darme su amor. Los amo.*

## Agradecimientos

Un agradecimiento sincero a:

- La Universidad Nacional Autónoma de México porque en ella me formé profesionalmente y conocí a personas muy valiosas en mi vida.
- El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para mis estudios de Maestría (235625).
- A la DGAPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM), Proyecto IN223411.
- Mi tutora, Dra. María Isabel Aguilar Laurents, por su compromiso con mi proyecto de investigación que ayudó a culminarlo satisfactoriamente. Por su paciencia, sus pláticas y sus consejos.
- Los miembros de mi jurado de examen de grado, Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo, Dr. Manuel Jiménez Estrada, Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas, Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda y Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez por el tiempo invertido en la revisión de la tesis y por sus correcciones y sugerencias para mejorarla.
- Posgrado en Ciencias Químicas.
- Dr. Andrés Navarrete Castro por la donación del material vegetal, indispensable para llevar a cabo este proyecto.
- Dr. Fausto Rivero Cruz por la ayuda con el ensayo antimicrobiano.
- El personal técnico de la USAI por el registro de los espectros de masas, IR y RMN: Q. Alejandrina Acosta, Dra. Nuria Esturau, Q. Georgina Duarte, Q. Marisela Gutiérrez, QFB Margarita Guzmán y M. en C. Rosa Isela del Villar.
- Los profesores del Posgrado en Ciencias Químicas.
- Mi familia, principalmente a mis hermanos: Mónica, Martha, Jorge, Sandra, Miguel y Viviana por todo su amor, apoyo y confianza.
- Mis amigos, colegas, casi hermanos; nombraré a algunos: Magaly Mares, Verónica Rojo, Jorge Chávez, Belén Avelar, Montserrat Mendoza, Edder Flores, Daniel Ruiz, Tania Lozano, Bertha Zárate, Ricardo López, Narenthzy Díaz, Sergio Caballero, Erandi Loredo, Jovani Valdovinos, Verónica Jasso, Saúl Nava, José Osorio, Marco Aguilar, José Luis Rodríguez, Gabriela Soria, Sofía del Castillo, Hernán Cortés, Jessica Hernández, Luis Trejo, Joel Badillo, Miguel Maynez, Silvia García, Belem Tamayo, Giselle Loaiza; porque si no los menciono me reclaman, porque me han hecho reír en algún momento, porque me han acompañado en momentos importantes de mi vida y porque siguen ahí a pesar del paso del tiempo.
- Mis compañeros del Laboratorio 125, Marisol Hernández, Ana Rosa García, Marco Águila, Marcela de la Fuente.
- Todos los que alguna vez fueron compañeros míos.

| <b>ÍNDICE</b>                                   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| LISTA DE ESQUEMAS                               | IV          |
| LISTA DE CUADROS                                | V           |
| LISTA DE FIGURAS                                | VI          |
| LISTA DE ABREVIATURAS                           | VIII        |
| RESUMEN   | IX          |
| ABSTRACT  | X           |
| 1. INTRODUCCIÓN                                 | 1           |
| 2. ANTECEDENTES                                 | 2           |
| 2.1 Familia Betulaceae                          | 2           |
| 2.2 Género <i>Alnus</i>                         | 2           |
| 2.3 Composición química del género <i>Alnus</i> | 3           |
| 2.4 Actividad biológica del género <i>Alnus</i> | 7           |
| 2.5 <i>Alnus acuminata</i>                      | 10          |
| 2.5.1 Características de la especie             | 10          |
| 2.5.2 Nombres comunes                           | 10          |
| 2.5.3 Sinónimos                                 | 10          |
| 2.5.4 Usos                                      | 11          |
| 2.5.5 Descripción                               | 11          |
| 2.5.6 Hábitat                                   | 12          |
| 2.5.7 Distribución geográfica                   | 13          |
| 2.6 Diarilheptanoides                           | 13          |
| 2.6.1 Biogénesis de diarilheptanoides           | 13          |
| 3. OBJETIVOS                                    | 15          |
| 3.1 Objetivo general                            | 15          |
| 3.2 Objetivos particulares                      | 15          |
| 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL                      | 16          |
| 4.1 Material, equipo y reactivos                | 16          |
| 4.2 Procedimientos generales                    | 18          |
| 4.2.1 Reacción general de acetilación           | 18          |
| 4.2.2 Reacción de hidrólisis ácida              | 18          |

## ÍNDICE

---

|   |    |
|---|----|
| 4.2.3 Determinación del contenido de fenoles totales  | 18 |
| 4.3 Recolección e identificación del material vegetal   | 19 |
| 4.4 Obtención de los metabolitos secundarios con actividad antiinflamatoria de <i>Alnus acuminata</i> ssp. <i>arguta</i>  | 19 |
| 4.4.1 Obtención de extractos  | 19 |
| 4.4.2 Fraccionamiento del extracto <i>n</i> -butanólico   | 20 |
| 4.4.3 Fraccionamiento terciario y aislamiento de oregonina (5- <i>O</i> - $\beta$ -D-xilopiranosido de hirsutanonol) (1) hirsutenona (2) e hirsutanonol (3)               | 21 |
| 4.4.3.1 Fraccionamiento en CPP  | 21 |
| 4.4.3.2 Fraccionamiento en columna  | 22 |
| 4.4.4 Fraccionamiento de F-II y aislamiento de (4 <i>E</i> )-1,7-bis-(4-acetoxifenil)-4-hepten-3-ona (platifilenona) (4) y 3,4',4''-tri- <i>O</i> -acetil-centrolobol (5) | 23 |
| 4.5 Desarrollo del método por cromatografía de líquidos de alta eficiencia  | 23 |
| 4.5.1 Preparación del extracto <i>n</i> -butanólico en pequeña escala   | 23 |
| 4.5.2 Preparación de los estándares de referencia   | 23 |
| 4.5.3 Obtención del cromatograma  | 23 |
| 4.6 Determinación de actividad antimicrobiana contra bacterias cariogénicas.  | 24 |
| 4.6.1 Preparación de controles  | 24 |
| 4.6.2 Preparación de muestras   | 25 |
| 4.6.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria  | 25 |
| 4.6.4 Procedimiento general del ensayo  | 26 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN   | 28 |
| 5.1 Cuantificación de fenoles totales   | 28 |
| 5.2 Estudio fitoquímico del extracto <i>n</i> -butanólico de <i>Alnus acuminata</i> spp. <i>Arguta</i>  | 29 |
| 5.2.1 Aislamiento y elucidación estructural de Oregonina (5- <i>O</i> - $\beta$ -D-xilopiranosido de hirsutanonol) (1) hirsutenona (2) e hirsutanonol (3)                 | 29 |
| 5.2.1.1 Obtención de Oregonina (5- <i>O</i> - $\beta$ -D-xilopiranosido de hirsutanonol)(1)   | 29 |

## ÍNDICE

---

|  |    |
|--|----|
| 5.2.1.1a Obtención del 3',4',3'',4''-tetra-O-acetil-5-O-β-D-peracetilxilopiranosido de hirsutanonol ( <b>1a</b> ) (peracetato de oregonina) por acetilación del compuesto <b>1</b> | 36 |
| 5.2.1.2 Obtención de hirsutenona ( <b>2</b> ) e hirsutanonol ( <b>3</b> )  | 40 |
| 5.2.1.2a.- Hirsutenona ( <b>2</b> )  | 40 |
| 5.2.2.2b- Hirsutanonol ( <b>3</b> )  | 44 |
| 5.2.2.3 Aislamiento y elucidación estructural de (4 <i>E</i> )-1,7-bis-(4-acetoxifenil)-hept-4-en-3-ona ( <b>4</b> ) y 3,4',4''-tri-O-acetil-centrolabol ( <b>5</b> )              | 47 |
| 5.2.2.3a Identificación de (4 <i>E</i> )-1,7-bis-(4-acetoxifenil)-hept-4-en-3-ona ( <b>4</b> )   |    |
| 5.2.2.3b Identificación de 3,4',4''-tri-O-acetil-centrolabol ( <b>5</b> )  | 51 |
| 5.3. Análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia   | 55 |
| 5.4 Determinación de actividad antimicrobiana contra bacterias cariogénicas.   | 60 |
| 6. CONCLUSIONES  | 61 |
| 7. Bibliografía  | 62 |
| 8. ANEXOS  | 67 |



**LISTA DE ESQUEMAS**

|   |    |
|---|----|
| Esquema 1. Vías de biosíntesis de curcumina   | 14 |
| Esquema 2. Procesamiento de la corteza de <i>Alnus acuminata</i> ssp. <i>arguta</i>                     | 20 |
| Esquema 3. Procesamiento del extracto <i>n</i> -butanólico de <i>Alnus acuminata</i> ssp. <i>arguta</i> | 21 |

**LISTA DE CUADROS**

|   |    |
|---|----|
| Cuadro 1. Compuestos que se han encontrado en especies de <i>Alnus</i>  | 3  |
| Cuadro 2. Fraccionamiento de $FV_2$ por CCA   | 22 |
| Cuadro 3. Condiciones cromatográficas para la separación de los componentes del extracto <i>n</i> -butanólico | 24 |
| Cuadro 4. Controles empleados.  | 24 |
| Cuadro 5. Condiciones empleadas para cada muestra   | 55 |
| Cuadro 6. Parámetros cromatográficos (TR y ABC)   | 58 |
| Cuadro 7. Parámetros cromatográficos del extracto   | 59 |
| Cuadro 8. Resultados del ensayo biológico   | 60 |

**LISTA DE FIGURAS**

|  |     |
|--|-----|
| Figura 1. <i>Alnus acuminata</i>   | 12  |
| Figura 2. Distribución de los canales en la placa de 96 pozos                          | 26  |
| Figura 3. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ del compuesto <b>1</b>                       | 31  |
| Figura 4. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ del compuesto <b>1</b>                    | 32. |
| Figura 5. Espectro HSQC del compuesto <b>1</b>   | 32  |
| Figura 6. Estructura parcial del compuesto <b>1</b>                                    | 33  |
| Figura 7. Espectro HMBC del compuesto <b>1</b>   | 34  |
| Figura 8. Estructura parcial del compuesto <b>1</b>                                    | 34  |
| Figura 9. Estructura parcial del compuesto <b>1</b>                                    | 35  |
| Figura 10. Estructura de oregonina ( <b>1</b> )  | 35  |
| Figura 11. Estructura de la aglicona obtenida por IE                                   | 37  |
| Figura 12. Espectro de masas del compuesto 1a (FAB)                                    | 37  |
| Figura 13. Espectro de masas del compuesto 1a (IE)                                     | 37  |
| Figura 14. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>1a</b>                             | 39  |
| Figura 15. Desplazamiento de las señales por la acetilación                            | 39  |
| Figura 16. Estructura de la oregonina peracetilada ( <b>1a</b> )                       | 40  |
| Figura 17. Espectro de masas de 3',4',3'',4''-tetra-O-acetilhirsutenona ( <b>2</b> )   | 40  |
| Figura 18. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ del compuesto <b>2</b>                      | 41  |
| Figura 19. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ del compuesto <b>2</b>                   | 42  |
| Figura 20. Espectro de HMBC del compuesto <b>2</b>                                     | 43  |
| Figura 21 Estructura del compuesto <b>2</b>  | 44  |
| Figura 22. Comparación de los compuestos <b>1</b> y <b>3</b> . Glicósido y su aglicona | 45  |
| Figura 23. Espectro COSY del compuesto <b>3</b>  | 45  |
| Figura 24. Estructura del compuesto <b>3</b> , hirsutanonol                            | 46  |
| Figura 25. Espectro HMBC del compuesto <b>3</b>  | 46  |
| Figura 26. Espectro de HSQC del compuesto <b>3</b>                                     | 47  |
| Figura 27. Compuestos <b>2</b> y <b>4</b>  | 48  |
| Figura 28. Espectro de HMBC del compuesto <b>4</b>                                     | 49  |
| Figura 29. Estructura del compuesto <b>4</b>   | 49  |
| Figura 30. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ del compuesto <b>4</b>                   | 50  |

## LISTA DE FIGURAS

---

|   |    |
|---|----|
| Figura 31. Espectro HSQC del compuesto <b>4</b>   | 50 |
| Figura 32. Estructura del ion molecular de <b>5</b>   | 51 |
| Figura 33. Espectro de masas del compuesto <b>5</b>   | 51 |
| Figura 34. Espectro COSY del compuesto <b>5</b>   | 52 |
| Figura 35. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ del compuesto <b>5</b>                          | 53 |
| Figura 36. Espectro HSQC del compuesto <b>5</b>   | 54 |
| Figura 37. Espectro HMBC del compuesto <b>5</b> .   | 54 |
| Figura 38. Estructura del compuesto <b>5</b> (3,4',4''-tri-O-acetil-centrololol) ( <b>5</b> ) | 55 |
| Figura 39. Cromatograma del extracto n-butanólico   | 56 |
| Figura 40. Cromatograma de oregonina ( <b>1</b> )   | 56 |
| Figura 41. Cromatograma de Hirsutanonol ( <b>3</b> )  | 57 |
| Figura 42. Cromatograma de oregonina ( <b>1</b> ) + extracto (1 mg/mL)                        | 57 |
| Figura 43. Cromatograma de Hirsutanonol ( <b>3</b> ) + extracto (1 mg/mL)                     | 58 |
| Figura 44. Cromatograma del extracto sin hidrolizar   | 59 |
| Figura 45. Cromatograma del extracto hidrolizado  | 59 |
| Figura 46. Espectro COSY del compuesto <b>1</b>   | 67 |
| Figura 47. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ del compuesto <b>1a</b> .                          | 67 |
| Figura 48. Espectro COSY del compuesto <b>1a</b>  | 68 |
| Figura 49. Espectro HMBC del compuesto <b>1a</b>  | 68 |
| Figura 50. Espectro HSQC del compuesto <b>1a</b>  | 69 |
| Figura 51. Espectro COSY del compuesto <b>2</b>   | 69 |
| Figura 52. Espectro HSQC del compuesto <b>2</b>   | 70 |
| Figura 53. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ del compuesto <b>3</b>                             | 70 |
| Figura 54. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ del compuesto <b>3</b>                          | 71 |
| Figura 55. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ del compuesto <b>4</b>                             | 71 |
| Figura 56. Espectro COSY del compuesto <b>4</b>   | 72 |
| Figura 57. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ del compuesto <b>5</b>                             | 72 |
| Figura 58. Curva patrón de ácido gálico   | 73 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

### LISTA DE ABREVIATURAS

|                        |   |
|------------------------|---|
| $\delta$               | Desplazamiento químico en RMN   |
| BHI                    | Agar de cerebro y corazón   |
| ccf                    | Cromatografía en capa fina  |
| CCA                    | Cromatografía en columna abierta  |
| $\text{CDCl}_3$        | Cloroformo deuterado  |
| $\text{CHCl}_3$        | Cloroformo  |
| CLAE                   | Cromatografía de líquidos de alta resolución  |
| COSY                   | Espectroscopía Bidimensional de Correlación Homonuclear                                   |
| CPP                    | Cromatografía en placa preparativa  |
| DMSO                   | Dimetilsulfóxido  |
| EAG                    | Equivalentes de ácido gálico  |
| FAB                    | Bombardeo de átomos rápidos   |
| $F_r$                  | Factor de Retención   |
| HMBC                   | Espectroscopía Bidimensional de Correlación Heteronuclear de múltiples ligaduras.         |
| HSQC                   | Espectroscopía Bidimensional de Correlación Heteronuclear de correlación simple cuántica. |
| IE                     | Impacto electrónico   |
| IR                     | Infrarrojo  |
| m                      | multiplete  |
| $M^+$                  | Ión molecular   |
| M,/Z                   | relación masa-carga   |
| PBS                    | Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos   |
| Ppm                    | partes por millón   |
| QP                     | Químicamente puro   |
| RA                     | Reactivo analítico  |
| RMN de $^{13}\text{C}$ | Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13  |
| RMN de $^1\text{H}$    | Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno   |
| UFC                    | Unidades Formadoras de colonias   |
| UV                     | Ultravioleta  |

**RESUMEN**

El trabajo de tesis describe la metodología que se empleó para el establecimiento de algunos parámetros de identidad, composición y eficacia de la droga cruda derivada de la corteza de *Alnus acuminata* ssp. *arguta* (Schlecht.) Furlow (Betulaceae).

A través de un estudio fitoquímico se estableció la composición química del extracto *n*-butanólico de la corteza de *A. acuminata*, la cual fue extraída con cloroformo/metanol (1:1) y el extracto total resultante se sometió a partición acuosa-orgánica, independientemente con hexano, cloroformo y *n*-butanol. Este último extracto presentó importante actividad antiinflamatoria en estudios anteriores, por lo que se sometió a sucesivos fraccionamientos cromatográficos en columnas abiertas con Sephadex lipofílico (LH-20) y sobre gel de sílice y los compuestos aislados se purificaron por cromatografía planar preparativa en capa fina. Mediante este procedimiento se lograron aislar 5 diarilheptanoides (**1-5**) cuyas estructuras químicas fueron caracterizadas por métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos: IR, RMN, con el apoyo de diferentes experimentos (COSY, HSQC, HMBC,), espectrometría de masas y polarimetría. Los compuestos aislados fueron oregonina (5-*O*- $\beta$ -D-xilopiranosido de hirsutanonol) (**1**), hirsutenona (1,7-bis-(3',4'-dihidroxifenil)-4-hepten-3-ona) (**2**), hirsutanonol (**3**), 1,7-bis-(4-hidroxifenil)-4-hepten-3-ona (platifilenona) (**4**), y centrolobol (**5**).

También se estableció el potencial antimicrobiano contra *Streptococcus mutans* por parte de los compuestos 5-*O*- $\beta$ -D-xilopiranosido (oregonina, **1**) de hirsutenona y su derivado acetilado (1,7-(3',4'-dihidroxifenil)-4-hepten-3-ona) (**2**). Se cuantificó la actividad inhibidora de crecimiento a diferentes diluciones seriadas, iniciando con 2.0 a 2.5 mg/mL, resultando concentraciones mínimas inhibitorias de 625 (**1**), 275 (**2**) y 187  $\mu$ g/mL (**2** acetilado).

Por último, se llevaron a cabo ensayos preliminares para el establecimiento del perfil cromatográfico (CLAE y ccf) para las pruebas de identidad de la droga cruda. La información científica generada en el presente trabajo servirá como base para el desarrollo de pruebas de composición (cuantificación de principios activos)

## RESUMEN

---

dentro del control de calidad de la droga cruda. Lo anterior será de utilidad para integrarse eventualmente con otras pruebas ya existentes de control de calidad para conformar la monografía de la droga cruda *Alnus acuminata arguta* (Schlecht.) Furlow.

Los resultados del análisis fitoquímico fueron integrados a la publicación correspondiente a la evaluación de la actividad antiinflamatoria de *A. acuminata arguta* (Aguilar, et al., 2011).

**ABSTRACT**

This work describes the research directed to generate information about some parameters of composition and efficacy of the crude drug of *Alnus acuminata* ssp. *arguta* (Schlecht.) Furlow (Betulaceae), to assess the anti-inflammatory activity of the stem bark *n*-butanol extract. Following a phytochemical procedure, the chemical contents of the *n*-butanol extract, were established.

The vegetal material was first extracted with chloroform/methanol (1:1) and the total extract obtained was partitioned between water and several organic solvents as hexane, chloroform and *n*-butanol. Previous *in vivo* assays indicated that *n*-butanol extract of *A. acuminata* possesses anti-inflammatory activity, so in this work, this extract was submitted to successive chromatographic fractionations using different stationary phases such as (LH-20) Lipophilic Sephadex and silica gel, the isolated compounds were purified by planar preparative chromatography. These procedures allowed us to isolate five compounds with diarylheptanoid skeleton (**1-5**) whose chemical structures were characterized by means of chemical, spectroscopic and spectrometric methods; IR, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, with additional experiments (COSY, HSQC, HMBC), mass spectrometry, polarimetry and with the synthesis of some derivatives. The isolated compounds were: Oregonine (**1**), Hirsutenone (**2**), Hirsutanonol (**3**) Platiphyllene (**4**) and Centrolol (**5**).

Isolated compounds **1-3** were evaluated for their antimicrobial activity against the oral pathogen *Streptococcus mutans*, associated with dental caries. Compounds **1**, **2** and acetylated **2** inhibited the growth of *S. mutans* with concentration ranging from 187 to 625 µg/mL.

Preliminary assays were performed to establish the chromatographic profiles (HPLC and TLC) of the crude drug.

Some results of this work were published as the chemical characterization of compounds present in anti-inflammatory *n*-butanol extract of *A. acuminata* ssp. *arguta* (Aguilar, et al., 2011).



### 1. INTRODUCCIÓN

La inflamación es un proceso inmunológico que aqueja a la población mundial y está presente en una gran diversidad de padecimientos. El género *Alnus* se ha utilizado para el tratamiento de la inflamación y contiene especies representativas localizadas en muchos países del mundo. Particularmente en nuestro país, la corteza de Aile (*Alnus acuminata* ssp. *arguta*), representa una materia prima de origen vegetal que ha sido empleada como recurso terapéutico tradicional para tratar la inflamación. A la fecha, estudios de actividad antiinflamatoria en ratas han demostrado el potencial farmacológico de esta planta, por lo que el objetivo principal de este trabajo fue caracterizar el contenido químico de los extractos de la corteza y así contribuir al uso racional de los eventuales productos herbolarios de esta especie. Los resultados obtenidos constituirán parte de las pruebas de composición que se podrán integrar a otras ya existentes como las de identidad, pureza, eficacia terapéutica y toxicidad para elaborar la monografía científica de esta planta medicinal, la cual eventualmente, se podrá incorporar a la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Familia Betulaceae

En esta familia se incluyen alrededor de 150 especies de árboles y arbustos monoicos, dicotiledonios y caducifolios con hojas alternadas y simples, de las cuales, la mayoría se localizan en países templados y fríos del hemisferio norte. El mismo árbol tiene tanto flores femeninas, que se presentan en agregados de dos a tres flores ubicadas en las axilas, como masculinas, que se presentan en forma de péndulos; ambas están separadas y son pequeñas y poco vistosas. El fruto es seco y no se abre en la madurez; puede tener forma de nuez o presentar proyecciones membranosas aladas que ayudan a su dispersión por el viento (<http://alergomurcia.com/pdf/01BETULA.pdf>).

Los géneros pertenecientes a la familia Betulaceae son:

- *Alnus*
- *Betula*
- *Carpinus*
- *Corylus*
- *Ostrya*
- *Ostryopsis*
- *Palaeocarpinus*

(Font Quer, 1962).

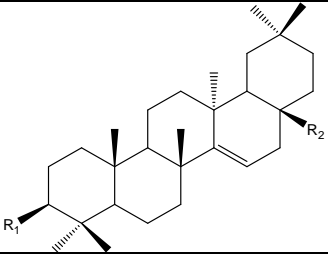
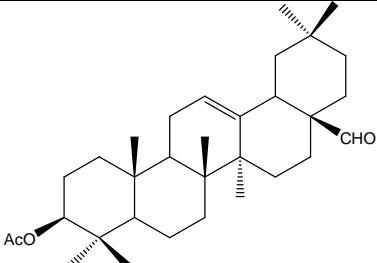
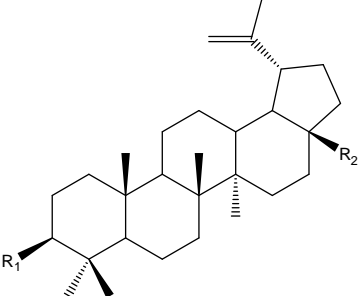
### 2.2 Género *Alnus*

Comprende alrededor de 30 especies de árboles o arbustos comúnmente conocidos como Aliso, entre las que se incluyen las siguientes: *A. hirsuta*, var *sibirica*, *A. rubra*, *A. glutinosa*, *A. maximowiczii*, *A. hirsuta*, *A. incana*, *A. oregona*, *A. formosana*, *A. japonica*, *A. viridus* y *A. acuminata arguta*. (Tori, et al., 1995; Chen, et al., 2000; Kuroyanagi, et al., 2005; Jin, et al., 2007; Park, et al., 2010; Tung, et al., 2010; Lai, et al., 2011).

### 2.3 Composición química del género *Alnus*

El género *Alnus* contiene compuestos químicos de interés medicinal, entre los que se encuentra una gran variedad de diarilheptanoides, entre otros (Cuadro 1). Por ejemplo, la corteza de algunas de sus especies presenta una cantidad apreciable de alquitrán y en las hojas se encuentran aceites esenciales constituidos principalmente por monoterpenoides, los más conocidos son el  $\alpha$ - y el  $\beta$ -betulenol. El género *Alnus* biosintetiza también, saponinas, triterpenoides como el ácido betulínico y betulina (Mañez y Ríos, 1997; Duke, 1992), de las hojas se extrae un flavonoide (acacetina), la corteza también es fuente de resina y compuestos con estructura fenólica (rhododendrina, miricetina, delfinidina y ácido elágico). Estos compuestos son los más comunes dentro del género *Alnus* y son usados como una herramienta quimiotaxonómica para la clasificación de distintas especies (Evans, 1985); otras especies poseen además esteroides como  $\beta$ -sitosterol y dammaranos (Tyler, 1979).

Cuadro 1. Compuestos que se han encontrado en especies de *Alnus*.

| COMPUESTO   | NOMBRE   | REFERENCIA                                  |
|---|--|---|
|  | $R_1 = \beta\text{-OCOCH}_3$ $R_2 = \text{CH}_3$<br>Acetóxido de taraxerilo<br>$R_1 = \beta\text{-OH}$ $R_2 = \text{CH}_3$<br>Taraxerol<br>$R_1 = \text{C=O}$ $R_2 = \text{CH}_3$<br>Taraxerona  | Jin, et al., 2007<br>Aguilar, et al., 2011  |
|  | $3\beta\text{-O-acetil-olean-12-en-28-al}$   | Aguilar, et al., 2011                       |
|  | $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$ $R_2 = \text{CH}_3$<br>Betulina<br>$R_1 = \text{COOH}$ $R_2 = \text{CH}_3$<br>ácido betulínico<br>$R_1 = \beta\text{-OH}$ $R_2 = \text{CH}_3$<br>$3\beta\text{-hidroxi-lup-20(29)-eno}$<br>$R_1 = \beta\text{-OH}$ $R_2 = \text{COH}$<br>$3\beta\text{-hidroxi-lup-20(29)-en-28-al}$<br>$R_1 = \beta\text{-OH}$ $R_2 = \text{COH}$<br>$3\beta,28\text{-dihidroxi-lup-20(29)-eno}$ | Aguilar, et al., 2011<br>Jin, et al., 2007a |

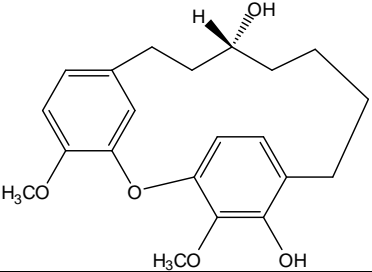
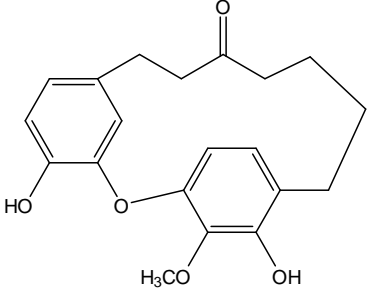
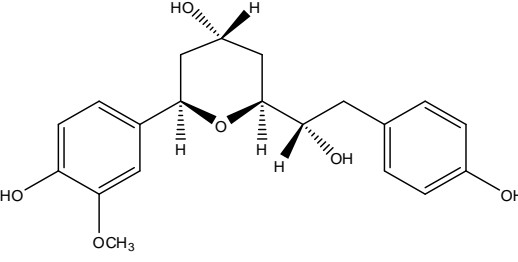
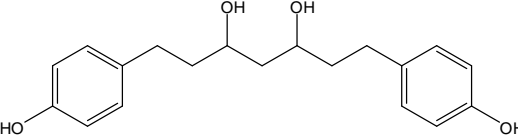
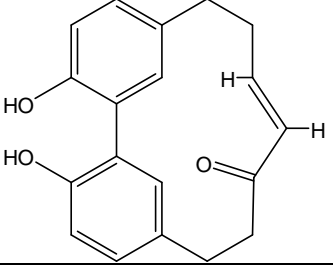
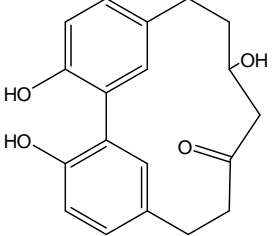
## ANTECEDENTES

Cuadro 1. Compuestos que se han encontrado en especies de *Alnus* (cont.)

|  |   |  |
|--|---|--|
|  | <p style="text-align: center;">R = H<br/>Rhododendrol<br/>R = Glc<br/>Rhododendrina</p>   | <p style="text-align: center;">Santamour y<br/>Lundgren, 1997</p>  |
|  | <p>R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = H Platifilonol<br/> R<sub>1</sub>= xilosa, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = OH<br/> Alnúcido A<br/> R<sub>1</sub> = xilosa, R<sub>2</sub> = OH, R<sub>3</sub> = H<br/> Alnúcido B<br/> R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub>= OH R<sub>3</sub> = OH<br/> hirsutanonol<br/> R<sub>1</sub> = xil R<sub>2</sub>= OH R<sub>3</sub> = OH Oregonina<br/> R<sub>1</sub> = Glc R<sub>2</sub>= OH R<sub>3</sub> = OH<br/> 5-O-β-D-glucopiranosido de<br/> hirsutanonol<br/> R<sub>1</sub> = Glc R<sub>2</sub>= H R<sub>3</sub> = H Platifilósido<br/> R<sub>1</sub> = xil R<sub>2</sub>= H R<sub>3</sub> = H<br/> 5-O-β-D-xilopiránosido de platifilonol<br/> R<sub>1</sub> = xil<sup>2</sup>-COCH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH<br/> Alnúcido C<br/> R<sub>1</sub> = xil<sup>2</sup> cumaroil R<sub>2</sub> = OH R<sub>3</sub> = OH<br/> Oregonoil A<br/> R<sub>1</sub> = xil<sup>2</sup> feruloil R<sub>2</sub> = OH R<sub>3</sub> = OH<br/> Oregonoil B</p> | <p style="text-align: center;">Chen, et al., 2000<br/> Kuroyanagi, et al.,<br/> 2005<br/> Tung, et al., 2010</p> |
|  | <p>R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OH<br/> Hirsutenona<br/> R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = H<br/> platifilenona<br/> R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = -OCH<sub>3</sub><br/> 1-(4-Hidroxifenil)-7-(4-hidroxi-3-<br/> metoxifenil)-4-hepten-3-ona</p>   | <p style="text-align: center;">Tung, et al., 2010<br/> Lee, et al., 2002,<br/> Jin, et al., 2007b</p>            |
|  | <p>R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = gluc (Rubranósido A)<br/> R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub>= xil (Rubranósido B)<br/> R<sub>1</sub> = OH R<sub>2</sub>= xil(3-1)gluc<br/> (Rubranósido C)<br/> R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub>= glucosa (Acerósido VII)<br/> R<sub>1</sub> = H y R<sub>2</sub>= xil(3-1)glc<br/> (3-O-β-D-glucopiranosil(1-3)- β-D-<br/> xilopiranosido de (3R)-1,7-bis-(4-<br/> dihidroxifenil)-3-heptanol)</p>   | <p style="text-align: center;">Park, et al., 2010</p>  |
|  | <p>R<sub>1</sub> = Rha R<sub>2</sub> = H<br/> Afzelina<br/> R<sub>1</sub> = rha R<sub>2</sub> = OH<br/> Quercitrina<br/> R<sub>1</sub> = gal R<sub>2</sub> = H<br/> isohiperósido</p>   | <p style="text-align: center;">Kuroyanagi, et al.,<br/> 2005</p>   |

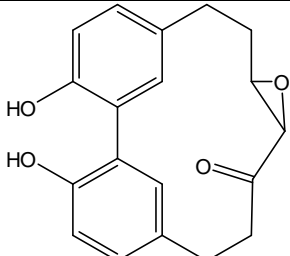
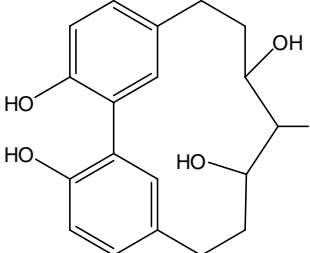
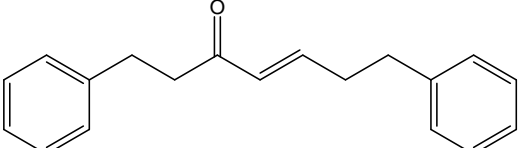
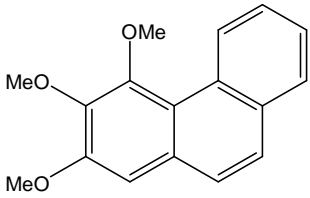
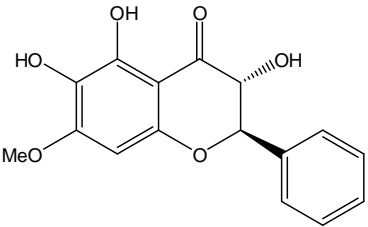
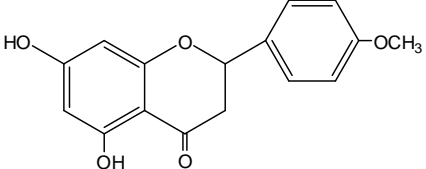
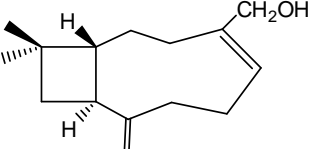
## ANTECEDENTES

Cuadro. Compuestos que se han encontrado en especies de *Alnus* (cont.)

|   |  |   |
|---|--|---|
|    | <p style="text-align: center;">2-Oxatriciclo[13.2.2.13,7]eicosa-3,5,7(20),15,17,18-hexaen-10-16-diol</p> | <p style="text-align: right;">Jin, et al., 2007b<br/>Jiang, et al., 2001</p>    |
|    | <p style="text-align: center;">2-Oxatriciclo[13.2.2.13,7]eicosa-3,5,7(20),15,17,18-hexaen-10-one</p>     | <p style="text-align: right;">Jin, et al., 2007b<br/>Moriyama, et al., 1997</p> |
|   | <p style="text-align: center;">Rhoiptelol B.</p>   | <p style="text-align: right;">Jiang, et al., 1996.<br/>Jin, et al., 2007b</p>   |
|  | <p style="text-align: center;">Hanoquinol</p>  | <p style="text-align: right;">Nomura, et al., 1981</p>                          |
|  | <p style="text-align: center;">Alnusona</p>  | <p style="text-align: right;">Nomura, et al., 1981</p>                          |
|  | <p style="text-align: center;">Alnusonol</p>   | <p style="text-align: right;">Nomura, et al., 1981</p>                          |

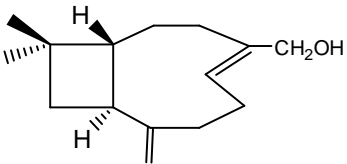
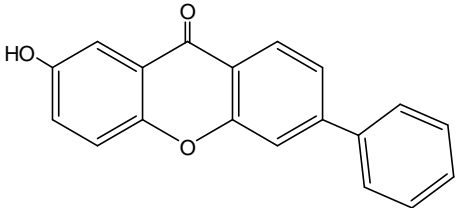
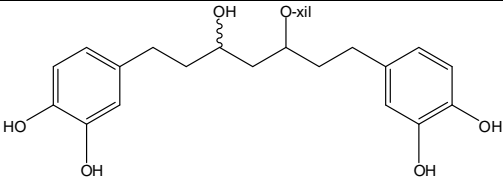
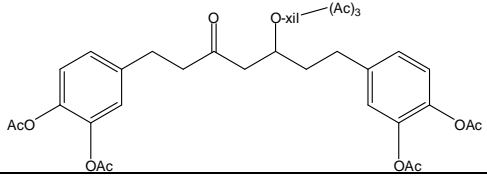
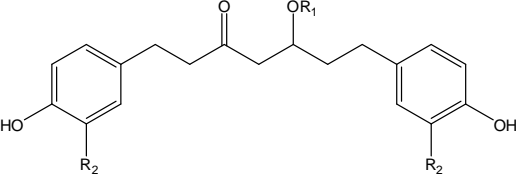
## ANTECEDENTES

Cuadro. Compuestos que se han encontrado en especies de *Alnus* (cont.)

|   |                           |  |
|---|---------------------------|--|
|    | Alnusóxido                | Nomura, et al.,<br>1981  |
|    | Alnusdiol                 | Nomura, et al.,<br>1981  |
|    | Deshidroyashabushiketol   | Tori, et al., 1995   |
|   | 2,3,4-trimetoxifenantreno | Tori, et al., 1995   |
|  | Alnustinol                | Duke, 1992   |
|  | Acacetina                 | Harbone, 1991<br>Evans, 1985<br>Keinänen y<br>Julkunen-Tiitto,<br>1998 |
|  | $\alpha$ -betulenol       | Demirci y Can-<br>Baser, 2000<br>Evans, 1985                           |

## ANTECEDENTES

Cuadro 1. Compuestos que se han encontrado en especies de *Alnus* (cont.)

|   |   |  |
|---|---|--|
|    | $\beta$ -betulenol  | Demirci y Can-Baser, 2000<br>Evans, 1985 |
|    | Glutaxona   | Demirci y Can-Baser, 2000<br>Evans, 1985 |
|    | Mezcla de epímeros de oregonina<br>(semisintético)  | Kuroyanagi, et al.,<br>2005              |
|   | Derivado acetilado de oregonina   | Kuroyanagi, et al.,<br>2005              |
|  | $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{OH}$ Artefacto de hirsutanonol.<br>$R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3, R_2 = \text{OH}$ (semisintético por tratamiento con etanol ácido) | Kuroyanagi, et al.,<br>2005              |

### 2.4 Actividad biológica del género *Alnus*

Casi todas las especies de este género poseen propiedades medicinales, entre las que se encuentran las siguientes:

#### *Alnus hirsuta* var. *sibirica*:

Especie asiática que se distribuye en China y Corea, ha sido utilizada en la medicina tradicional de esos países en el tratamiento de cáncer de seno. Se ha descubierto que los compuestos aislados de la corteza son potentes antiinflamatorios, inhibiendo la ciclooxygenasa-2 (Min, et al., 2000).

### *Alnus rubra:*

Especie nativa de la región noroccidental del pacífico (Columbia Británica, Canadá), donde se ha utilizado como antifúngica. Estudios de laboratorio han demostrado su actividad antimicrobiana contra distintos tipos de bacterias como *P. aeruginosa* y *S. aureus*, en años recientes se ha demostrado que es eficaz contra el cáncer de piel (McCutcheon, et al., 1992; Chen, et al., 2000).

### *Alnus oregona:*

Especie nativa del sur de EE.UU, ha sido utilizada por los indígenas de ese país para el tratamiento de algunos tipos de tumores cancerosos, de la cual se ha aislado la oregonina (1); esta sustancia es la responsable de la actividad antitumoral, en estudios de laboratorio (Bianchi, et al., 1973).

### *Alnus incana:*

Especie del sur de Canadá; los nativos de esa región la han utilizado para el tratamiento de la leucemia y cáncer de útero y piel; en decocciones y en forma de ungüento, la corteza y las hojas son utilizadas para tratamiento de parasitosis e infecciones dérmicas (Ritch-Krc, et al., 1996).

### *Alnus hirsuta:*

Especie geográficamente distribuida en Corea, Japón, Norte de China y Rusia. En la medicina tradicional china y coreana se ha usado como remedio para la fiebre, diarrea y contra el alcoholismo. En estudios recientes se comprobó que un extracto de la planta inhibe la síntesis de óxido nítrico in vitro, en modelos murinos de inflamación (Jin, et al., 2007b; Min, et al., 2000).

### *Alnus maximowiczii:*

Especie que predomina en China y en el norte de India, ha sido utilizada para combatir infecciones por parásitos intestinales e infecciones dérmicas por hongos (Tori, et al., 1995).



## ANTECEDENTES

---

### *Alnus glutinosa:*

Especie que predomina en Canadá, posee propiedades antiinflamatorias, antisépticas, inmunosupresoras y antitumorales (Duke, 1992).

### *Alnus serrulata:*

Existe en la parte este de Norteamérica desde Texas en los Estados Unidos hasta Nueva Escocia en Canadá (<http://plants.usda.gov>), utilizada para el tratamiento de diarrea, tos, dolor de muelas, dolor en la boca y el dolor de parto.

### *Alnus formosana:*

Esta especie se localiza en Taiwán y de sus partes aéreas se han aislado diarilheptanoides con actividad antiinflamatoria (Lai, et al., 2011)

### *Alnus japonica:*

Planta muy común de las regiones montañosas de Japón, con usos terapéuticos tradicionales como antioxidante, tratamiento de fiebre, hemorragias, diarrea, alcoholismo, cáncer, problemas cardiovasculares y antiinfluenza (Kuroyanagi, et al., 2005; Tung, et al., 2010)

### *Alnus acuminata ssp. arguta:*

Esta especie es utilizada en la medicina tradicional mexicana del sureste del país. Se le atribuyen actividades antiescrofulosa, astringente y antiinflamatoria en afecciones cutáneas. También se le considera útil para el tratamiento de la sífilis e infecciones bacterianas (Martínez, 1984).

## 2.5 *Alnus acuminata*

### 2.5.1 Características de la especie

Generalidades de *Alnus acuminata* ssp. *arguta* (Schlecht) Furlow

Clasificación botánica

Reino: Plantae  
 Filo: Magnoliophyta  
 Clase: Magnoliopsida  
 Orden: Fagales  
 Familia: Betulaceae  
 Género: *Alnus*  
 Especie: *Alnus acuminata*

### 2.5.2 Nombres comunes

Se le conoce con los nombres populares: “Ilite”, en Chiapas, “Aile”, en Yucatán; en Veracruz, “Aliso y Abedul” y en Tabasco, “Palo de Águila” y está descrita en el Códice de la Cruz - Badiano (De la Cruz, 1962; Martínez, 1984).

### 2.5.3 Sinónimos

Esta especie también es conocida con los siguientes nombres científicos (<http://www.conafor.gob.mx>, <http://www.conabio.gob.mx>, <http://herbaria.plants.ox.ac.uk>):

|   |   |
|---|---|
| <i>Alnus acuminata</i>  | <i>Alnus spachii</i> Callier                    |
| <i>Alnus arguta</i> (Schlecht) Spach                                    | <i>Alnus acuminata</i> var <i>spachii</i> Regel |
| <i>Alnus arguta</i> var. <i>cuprea</i> Bartlett                         | <i>Alnus pringlei</i> Fernald                   |
| <i>Alnus arguta</i> var. <i>subserica</i> Bartlett                      | <i>Alnus ovalifolia</i> Bartlett                |
| <i>Alnus ferruginea</i> HBK   | <i>Alnus mirbelii</i> Spach                     |
| <i>Alnus jorullensis</i> HBK  | <i>Alnus arguta</i> Schlecht                    |
| <i>Alnus guatemalensis</i> Gandoger                                     |   |
| <i>Alnus jorullensis</i> var. <i>acuminata</i> (Kunth) Kuntze           |   |
| <i>Alnus ferruginea</i> var. <i>aliso</i> Lorentz & Hieron. Ex Winckler |   |

### 2.5.4 Usos

Medicinalmente *A. acuminata* ssp. *arguta* ha sido utilizada desde tiempos ancestrales. Es una especie que se encuentra referida en el Códice de la Cruz - Badiano, y de acuerdo a la descripción de Martínez (1989), la infusión de la corteza se usa contra las escrófulas y enfermedades venéreas y el cocimiento de los frutos en gárgaras contra la inflamación de la garganta. Existe una patente y varias “invenciones de preparados farmacéuticos” a base de *A. acuminata* para tratamientos de vitiligo, psoriasis y diabetes (PA/2/2004/007567).

Por otra parte, la madera de esta especie se emplea como material de construcción en pilotes y puentes, en mueblería y para la fabricación de artesanías. Las podas se usan como leña o para composta y la corteza es astringente y rica en taninos, por lo cual ha sido utilizada para curtir pieles. *A. acuminata* y algunas otras especies, son muy importantes en el área agrícola, ya que son árboles que dan sombra a los cultivos además de que abonan el suelo a su alrededor al tener una buena fijación de nitrógeno. Por su efecto restaurador del suelo, *A. acuminata* ha sido utilizada en programas de reforestación junto con otras especies del mismo género (<http://herbaria.plants.ox.ac.uk>). El polen de sus flores es útil para la apicultura, especialmente en invierno cuando escasean otras fuentes de alimento.

### 2.5.5 Descripción

La especie *A. acuminata* ssp. *arguta* está representada por árboles y arbustos monoicos de entre 10 y 30 metros de altura, de tronco color grisáceo y ramas lisas de color café rojizo. Pierde sus hojas normalmente de noviembre a mayo y florece de mayo a junio. Tiene hojas simples, alternas, oblongadas, grabadas en el haz y de bordes aserrados, de entre 7 y 13 centímetros de longitud y entre 3 y 9 centímetros de ancho. La inflorescencia es unisexual por lo que las flores masculinas y femeninas se presentan por separado y contienen frutos samaroides con una extensión membranosa en forma de ala. (Figura 1).



Figura 1. *Alnus acuminata*

### 2.5.6 Hábitat

*A. acuminata* ssp. *arguta* se desarrolla en climas templados y con alturas desde los 600 hasta los 3000 metros sobre el nivel del mar, en suelos arenosos o arcillosos con pH entre 4 y 6, a temperaturas entre 4 y 28 °C y precipitaciones entre 1500 y 3000 milímetros. Puede encontrarse en bosques con poblaciones dominantes o codominantes. Las poblaciones de *Alnus* tienen dos principales afinidades ecológicas; se encuentran a la orilla de arroyos o pequeños ríos o bien, forman comunidades sucesorias que surgen como consecuencia de la destrucción de algún otro bosque (<http://www.conafor.gob.mx>, y <http://www.arboles.org>).

### 2.5.7 Distribución geográfica

*A. acuminata* ssp. *arguta* existe en gran parte de América Latina. En nuestro país se encuentra en los estados de Sonora, Sinaloa, Durango, Nayarit, Jalisco, San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Michoacán, Puebla, Querétaro, Oaxaca, Chiapas y el Distrito Federal. También se le localiza desde Guatemala hasta Argentina, habiéndose introducido con éxito en el sur de Chile y Nueva Zelanda (<http://www.conafor.gob.mx>, y <http://www.herbaria.plants.ox.ac.uk>).

### 2.6 Diarilheptanoides

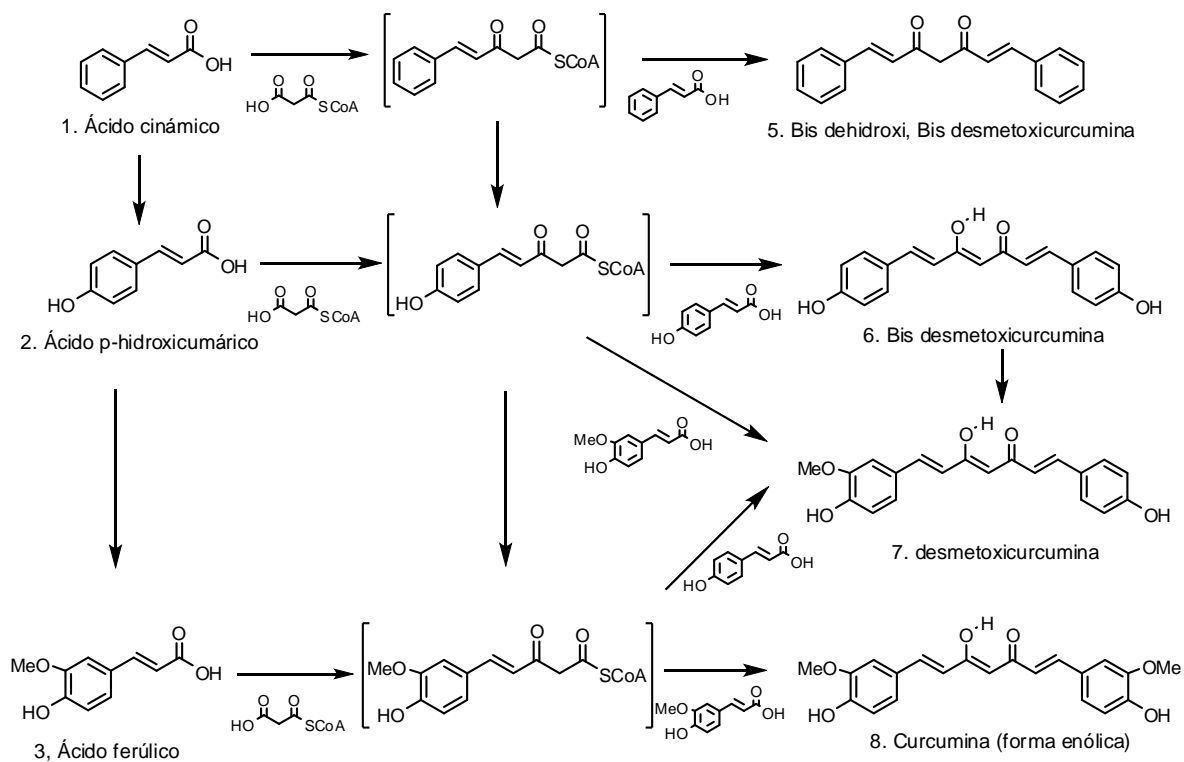
Los diarilheptanoides han sido encontrados en plantas de las familias Betulaceae (Nomura, et al., 1981; Ohta, et al., 1984), Zingiberaceae (Ravindranath y Satyanarayana, 1980), Myricaceae (Malterud y Anthonsen, 1980), Leguminosae (Aragão Craveiro, et al., 1970), Aceraceae (Inoue, et al., 1978), Discoreaceae (Inoue, et al., 1987) y Bruceraceae (Mishra, et al., 1985). Son compuestos químicos que pertenecen a una clase de productos naturales basada en el esqueleto del 1,7-difenilheptano (C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub>-C<sub>6</sub>). Sus estructuras están clasificadas en dos tipos: lineal y cíclico; este último dividido en los tipos bifenilo ([7.0]-metaciclofanos) y éter difenílico (14-oxa-[7.1]-metaparaciclofanos). Cada tipo cíclico puede ser formado por los correspondientes tipos lineales mediante acoplamiento oxidativo fenólico (Ishida, et al., 2002). Un compuesto muy representativo de los diarilheptanoides es la curcumina, aislada de *Curcuma longa*. (Esquema 1).

#### 2.6.1 Biogénesis de diarilheptanoides

Ha sido demostrado, mediante experimentos trazados con marcaje isotópico, que la biogénesis de diarilheptanoides procede a través de la condensación de dos unidades de cinamato y una de malonato (Roughley y Whiting, 1973; Kita, et al., 2008). A su vez, las unidades de cinamato tienen como precursores biogénicos

## ANTECEDENTES

a los aminoácidos L-fenilalanina y L-tirosina en plantas y microorganismos (estos compuestos no son sintetizados en animales por esta vía). Estos aminoácidos aromáticos se generan por la ruta biosintética del ácido siquímico. A manera de ejemplo, en el Esquema 1 se muestra la ruta biosintética de la Curcumina.



Esquema 1. Vías de biosíntesis de curcumina.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general:

Caracterizar el contenido químico del extracto *n*-butanólico con actividad antiinflamatoria de *Alnus acuminata* ssp. *arguta* mediante métodos fitoquímicos convencionales.

#### 3.2 Objetivos particulares:

- Obtener el extracto total de la corteza de *Alnus acuminata* ssp. *arguta* por un proceso de percolación.
- Obtener el extracto *n*-butanólico por partición líquido-líquido del extracto total.
- Cuantificar el contenido de fenoles totales en el extracto *n*-butanólico.
- Realizar el fraccionamiento cromatográfico del extracto *n*-butanólico.
- Aislar e identificar los metabolitos secundarios contenidos en el extracto *n*-butanólico mediante métodos físicos, químicos, espectroscópicos y espectrométricos.
- Desarrollar preliminarmente un método por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para el establecimiento del perfil cromatográfico del extracto *n*-butanólico.

Determinar el potencial antimicrobiano cariogénico de los extractos total, clorofórmico y *n*-butanólico, así como de los compuestos aislados sobre *S. mutans*.

### 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

#### 4.1 Material, equipo y reactivos

Para la obtención de los metabolitos secundarios descritos en este trabajo, así como para la purificación de estos y sus productos de reacción se utilizó cromatografía en CCA sobre sephadex lipofílico (LH20 100-50g) sigma (25-100  $\mu\text{m}$ ), gel de sílice (0.063-0.200 mesh) de Merck<sup>®</sup>, y ccf utilizando cromatoplasmas de vidrio preparativas con 1 mm de sílica gel 60 con indicador fluorescente UV<sub>254</sub> Merck<sup>®</sup>, 20 x 20 cm.

Los extractos, fracciones y metabolitos obtenidos, fueron concentrados a presión reducida utilizando un Rotaevaporador BÜCHI Waterbath modelo B-480, hasta sequedad. El proceso de fraccionamiento fue monitoreado por ccf, utilizando cromatoplasmas de aluminio (0.20 mm de sílica gel 60 con indicador UV<sub>254</sub> fluorescente) MN<sup>®</sup>, Macherey-Nagel con observación directa por exposición a la luz UV de longitud de onda de 254 y 365 nm, utilizando una lámpara de luz UV Spectroline, y por revelado con una solución de sulfato cérico amoniacal  $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_2\text{H}_2\text{O}]$  al 1% con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N. Los disolventes utilizados (hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol) tanto en las columnas cromatográficas como en las cámaras de elución fueron grados QP previamente destilados, en las técnicas de fraccionamiento y grado RA, para la purificación.

La reacción de acetilación se realizó en matraces bola y se utilizó piridina anhidra y anhídrido acético J.T. Baker.

Los ángulos de rotación óptica se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer 241 utilizando celdas de 1.0 dm de longitud.

La identificación molecular de los metabolitos se llevó a cabo utilizando diferentes técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

Los espectros de Infrarrojo (IR) fueron realizados en un espectrofotómetro FTIR-Modelo Spectrum RX-I Perkin Elmer.

Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Los equipos utilizados fueron espectrómetros VARIAN INOVA 300 y 400MR;VNMRs. Las frecuencias utilizadas



fueron de 300 y 400 MHz para  $^1\text{H}$ , 75 y 100.5 MHz para  $^{13}\text{C}$  utilizando disolventes deuterados ( $\text{CDCl}_3$  y  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) y como referencia tetrametilsilano (TMS).

Cromatografía de gases/Espectrometría de masas. Utilizó los siguientes equipos: Thermo electrón corporation. Trace GC Ultra. High Resolution Magnetic Sector M3DFS; Leco Pagasos III. Agilent Technologies 689DN Network GC System.

Para el análisis de espectros de RMN se utilizó el Software MestReNova.

Para el desarrollo del método por cromatografía de líquidos de alta resolución, se utilizaron los siguientes materiales:

- Filtro GHP 0.45  $\mu\text{m}$  Pall Corporation.
- Sonicador Sonicator modelo SC200TH.
- Controlador Automated Gradient Controller WATERS-MILLIPORE.
- Bombas WATERS modelo 515.
- Termostato modelo TCM WATERS MILLIPORE.
- Horno BECSA modelo 403099.
- Inyector Jasco AS-2055 Plus.
- Columna Symmetry C18 250 x 4.6 mm WATERS.
- Detector WATERS modelo 2487 Dual absorbance.
- Balanza analítica modelo Sartorius analítica.
- Equipo de cómputo con el software Millenium.
- Acetonitrilo grado HPLC.
- Agua desionizada.
- Metanol grado HPLC.
- Solución de ácido acético al 0.1 %

### 4.2 Procedimientos generales

#### 4.2.1 Reacción general de acetilación

A 100 mg de compuesto o fracción se adicionaron 1 mL de anhídrido acético y 0.3 mL de piridina a temperatura ambiente, en condiciones anhidras y con agitación durante 72 h. Transcurrido el tiempo de reacción se añadieron 5 g de agua/hielo y se aciduló con una solución de HCl al 10 %. Posteriormente, se extrajo con 3 porciones de 15 mL de acetato de etilo. La fase orgánica se extrajo con 3 porciones de 15 mL de solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y se lavó 3 veces con porciones de 15 mL de agua destilada; finalmente, el extracto orgánico se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y por evaporación del disolvente se obtuvieron los productos acetilados.

#### 4.2.2 Reacción general de hidrólisis ácida

Se colocaron 100 mg de compuesto glicosidado en un tubo con tapón de rosca y se le adicionaron 5 mL de HCl 10 % (v/v). Se calentó en un baño de agua a 80 °C durante 2 h. Después de transcurrido el tiempo, se dejó enfriar la mezcla de reacción y se neutralizó con solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ . Para la extracción de la aglicona se utilizaron 5 porciones de 2 mL de acetato de etilo. La fracción orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró a vacío.

#### 4.2.3 Determinación del contenido de fenoles totales

Se disolvieron 2 mg del extracto *n*-butanólico en 2 mL de metanol, 0.1 mL de la solución del extracto se transfirieron a un tubo de ensayo. Enseguida se adicionaron 0.8 mL de agua destilada, 0.1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, transcurridos 8 minutos, se agregaron 0.05 mL de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20 %. Esta mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente y protegida de la luz durante 1 h. Al término de este tiempo, se determinó la absorbancia a 760 nm utilizando metanol como blanco. El contenido de fenoles totales se expresa como  $\mu\text{g}$  por mL de equivalentes de ácido gálico (EAG) y se obtienen a partir de una curva patrón de ácido gálico.

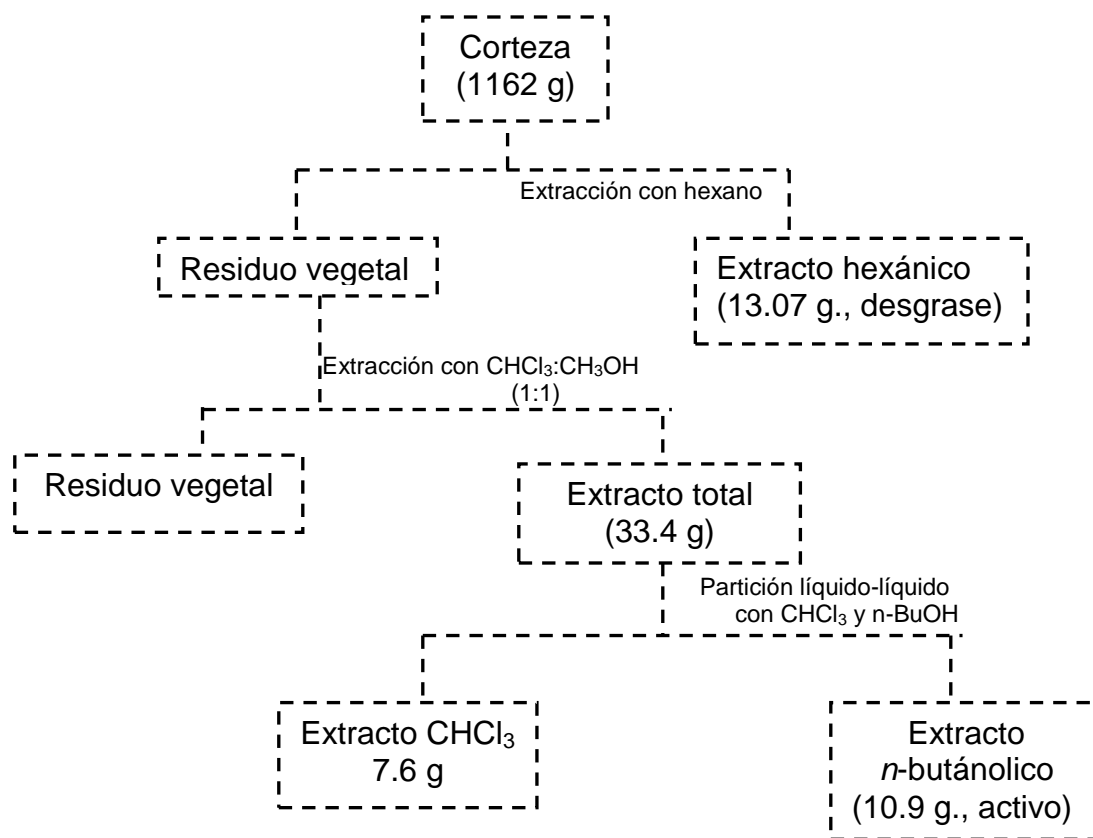
### **4.3 Recolección e identificación del material vegetal**

El material vegetal empleado en este estudio consistió en la corteza medicinal de *Alnus acuminata* ssp. *arguta*, la cual fue recolectada en el municipio de Huistán, Chiapas y fue identificada botánicamente por el Dr. M. Ishiki Ishihara del Herbario de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Chiapas. El material botánico seco se fragmentó en un molino de cuchillas modelo Thomas Willey 4, con un tamiz de malla de 5 mm de diámetro.

### **4.4 Obtención de los metabolitos secundarios con actividad antiinflamatoria**

#### **4.4.1 Obtención de extractos.**

El material vegetal fragmentado se pesó en una balanza gravimétrica OHAUS modelo Scout™ Pro. (1162 g) y se colocó en una columna de vidrio de 15 cm de diámetro y 110 cm de largo. Se utilizaron disolventes grado QP previamente destilados (hexano, cloroformo y metanol) para obtener los respectivos extractos por la técnica de percolación. Se realizaron particiones con agua en embudos de separación utilizando como fase orgánica hexano y cloroformo grado QP y *n*-butanol grado RA. El procedimiento referido se muestra en el Esquema 2.

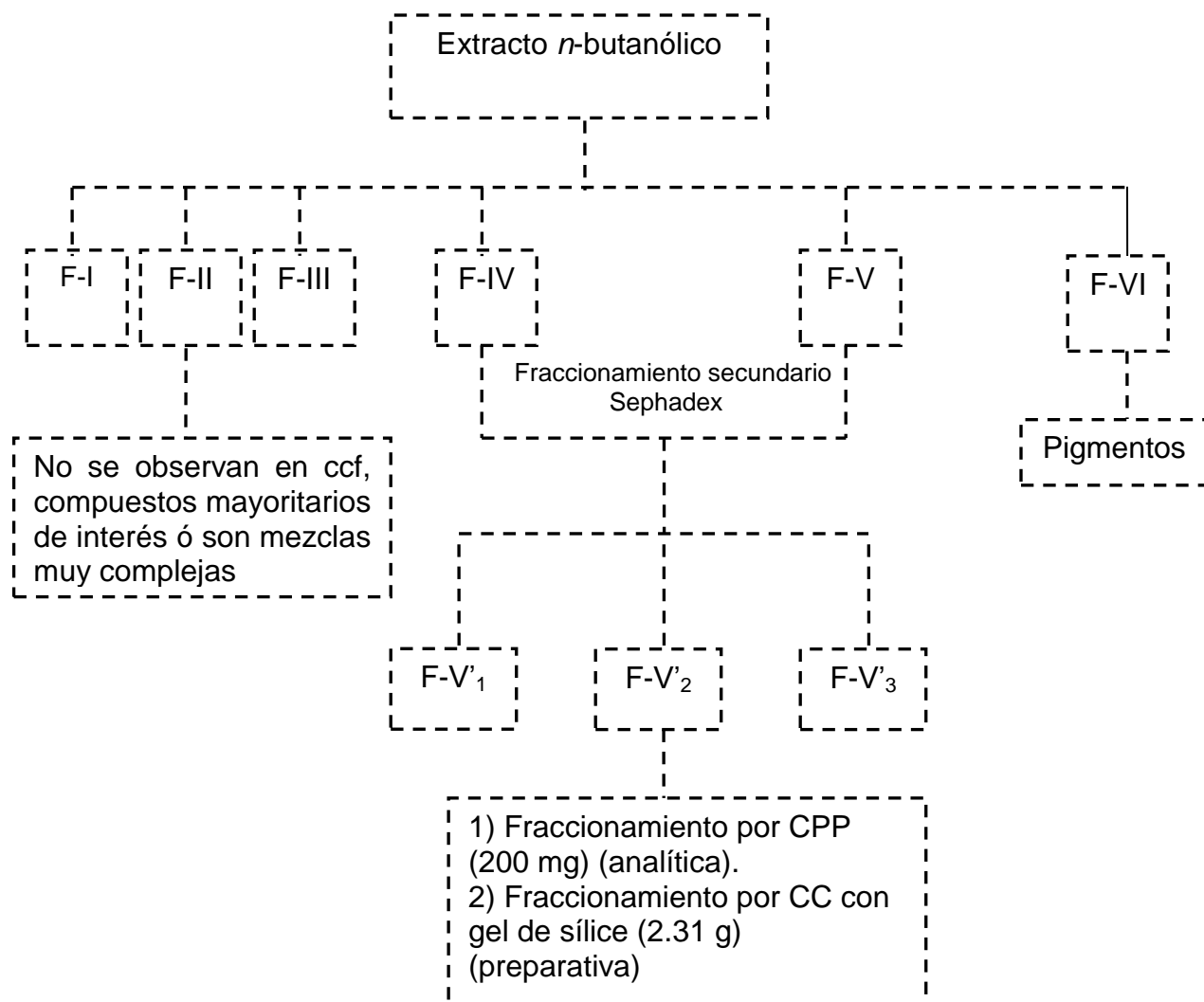


Esquema 2. Procesamiento de la corteza de *Alnus acuminata* ssp. *Arguta*

#### 4.4.2 Fraccionamiento del extracto *n*-butanólico

Un total de 10.9 g del extracto *n*-butanólico se disolvieron en la mínima cantidad de metanol y se aplicaron a 150 g de Sephadex lipofílico colocados en una columna de vidrio abierta. Se empleó metanol grado RA para la elución y se obtuvieron un total de 11 fracciones de 150 mL, las cuales se agruparon de acuerdo a las diferentes coloraciones que se desdoblaron en la columna cromatográfica, pasando del amarillo al rojo.

Tomando en cuenta su similitud cromatográfica, observada en cromatografía en capa fina, las fracciones fueron agrupadas en F-I, F-II, F-III, F-IV, F-V y F-VI. El Esquema 3 presenta el fraccionamiento del extracto *n*-butanólico.



Esquema 3. Procesamiento del extracto *n*-butanólico de *Alnus acuminata* ssp. *arguta*

#### 4.4.3 Fraccionamiento terciario y aislamiento de oregonina (5-O- $\beta$ -D-xilopiranosido de hirsutanonol) (1), hirsutenona (2) e hirsutanonol (3)

##### 4.4.3.1 Fraccionamiento en CPP

Se aplicaron 200 mg de la fracción F-V'<sub>2</sub> en cuatro placas preparativas las cuales se corrieron en una cámara de elución con un sistema de CH<sub>3</sub>Cl/MeOH, 85:15. Las cuatro manchas más destacadas (A, R<sub>f</sub> = 0.3; B, R<sub>f</sub> = 0.6; C, R<sub>f</sub> = 0.7; y D, R<sub>f</sub> = 0.75), se rasparon y extrajeron de la sílica gel, (acetona/metanol/cloroformo, 1:1:1) y se les realizaron análisis espectroscópicos preliminares.

#### 4.4.3.2 Fraccionamiento en columna

Se adsorbieron 2.32 g de la fracción F-V'<sub>2</sub> en 3.5 g de gel de sílice, posteriormente se aplicaron a 40 g de gel de sílice colocados en una columna de vidrio abierta. La elución se llevó a cabo empleando un sistema de disolventes de polaridad creciente. De un total de 76 fracciones obtenidas, agrupadas de acuerdo a su semejanza observada en ccf, resultaron ocho fracciones finales, nombradas respectivamente F-i, F-ii, F-iii, F-iv, F-v, F-vi, F-vii y F-viii. Este procedimiento se representa en la Cuadro 2.

Cuadro 2. Fraccionamiento de FV'<sub>2</sub> por CCA

| SISTEMA DE ELUCIÓN | RELACIÓN | ELUATOS (200 ML) | FRACCIONES REUNIDAS | CLAVE  |
|--------------------|----------|------------------|---------------------|--------|
| Cloroformo         | 100      | 1-5              | 1-9                 | F-i    |
| Cloroformo/metanol | 98:2     | 6-16             | 10-13               | F-ii   |
| Cloroformo/metanol | 95:5     | 17-23            | 14-16               | F-iii  |
| Cloroformo/metanol | 90:10    | 24-30            | 17-21               | F-iv   |
| Cloroformo/metanol | 85:15    | 31-46            | 22-29               | F-v    |
| Cloroformo/metanol | 70:30    | 47-64            | 30-32               | F-vi   |
| Cloroformo/metanol | 50:50    | 65-68            | 33-42               | F-vii  |
| Metanol            | 100      | 69-76            | 43-76               | F-viii |

La fracción F-vii (539 mg) contenía un compuesto mayoritario que correspondía con el mismo R<sub>f</sub> que la fracción A (aislada en 4.4.3.1), el cual fue purificado por ccf en placa preparativa e identificado como 5-O-β-D-xilopiranosido de hirsutanonol (**1**, oregonina), por espectroscopía de RMN de <sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C. Esta misma fracción fue sometida a una reacción de acetilación obteniéndose el derivado acetilado puro (**1a**), también identificado por espectroscopía de RMN de <sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C. Por otra parte, esta fracción (F-vii) fue sometida a una reacción de hidrólisis ácida de la que se obtuvieron 2 agliconas (**2** y **3**) que también fueron obtenidas, posteriormente, como productos naturales de las fracciones F-iii (194 mg) y F-iv (241 mg). Estos compuestos se purificaron independientemente por ccf en placa preparativa utilizando un sistema de elución de CHCl<sub>3</sub>/acetona 30:70 (F-iii) y CHCl<sub>3</sub>/acetona 70:30 (F-iv), eluyéndose 2 veces en este último caso. De esta manera, se obtuvieron los compuestos hirsutenona (**2**) e hirsutanonol (**3**).

#### **4.4.4 Fraccionamiento de F-ii y aislamiento de (4E)-1,7-bis-(4-acetoxifenil)-4-hepten-3-ona (4, Platifilenona) y 3,4',4''-tri-O-acetil-centrolobol (5)**

La fracción F-ii (179 mg) fue sometida a un proceso de acetilación y el producto de la reacción se sometió a separación por columna abierta de gel de sílice CHCl<sub>3</sub>/acetona, en mezclas de polaridad creciente, (hasta 95:5), obteniéndose cuatro subfracciones (SF-I, SF-II, SF-III, SF-IV). SF-I (CHCl<sub>3</sub> 100 %), fue aplicada a una placa preparativa de gel de sílice y se separaron los compuestos **4** y **5** (CHCl<sub>3</sub> 100 % x 3).

#### **4.5 Desarrollo del método por cromatografía de líquidos de alta eficiencia**

##### **4.5.1 Preparación del extracto *n*-butanólico en pequeña escala**

100 g de corteza fragmentada de *Alnus acuminata* spp. *arguta* fueron extraídos con hexano destilado (800 mL) por maceración (12 h) y posteriormente por sonicación (3 veces, 30 minutos) a temperatura ambiente. El residuo vegetal desgrasado y filtrado, se maceró con una mezcla de cloroformo/metanol 1:1 para obtener el extracto total, del cual, una vez concentrado, por partición con agua, se obtuvieron los extractos clorofórmico y *n*-butanólico.

##### **4.5.2 Preparación de los estándares de referencia**

Se prepararon soluciones independientes conteniendo 1 mg/mL del extracto *n*-butanólico y de los compuestos **1** y **3** disueltos en metanol grado HPLC.

##### **4.5.3 Obtención del cromatograma**

Para encontrar las condiciones óptimas de separación de los compuestos contenidos en el extracto *n*-butanólico, se realizaron diversos ensayos modificando las condiciones cromatográficas de líquidos, comprendiendo la fase móvil, la fase estacionaria y la velocidad de flujo.

Las condiciones cromatográficas para la separación de los componentes del extracto *n*-butanólico se encuentran en el Cuadro 3.

## DESARROLLO EXPERIMENTAL

Cuadro 3. Condiciones cromatográficas para la separación de los componentes del extracto *n*-butanólico

| VARIABLES                      | CONDICIONES                                |
|--------------------------------|--|
| Columna                        | Symmetry C18 250 X 4.6 mm                  |
| Longitud de onda ( $\lambda$ ) | 254 nm                                     |
| Modo de inyección              | Isocrático                                 |
| Fase móvil                     | Ácido acético al 0.1% : acetonitrilo 85:15 |
| Flujo                          | 0.5 mL/min                                 |
| Temperatura                    | Ambiente                                   |

Para identificar los compuestos **1** y **2** en el cromatograma, se colocó una alícuota de 100  $\mu$ L de cada una de las soluciones estándar, independientemente, en un frasco vial, se les agregaron 100  $\mu$ L de la solución del extracto *n*-butanólico y 10  $\mu$ L de cada uno de los estándares fueron inyectados al cromatógrafo de líquidos.

### 4.6 Determinación de actividad antimicrobiana contra bacterias cariogénicas

#### 4.6.1 Preparación de controles

Control positivo

Se preparó a partir de una solución al 30 % de gluconato de clorhexidina para obtener una concentración final de 0.12 % (CHX, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EU). En el Cuadro 4 se muestran los controles utilizados y las especificaciones.

Cuadro 4. Controles empleados

| CONTROLES     | COMPUESTO USADO                 | INÓCULO DE S.MUTANS |
|---------------|---------------------------------|---------------------|
| Positivo      | Gluconato de clorhexidina (CHX) | Sí                  |
| Negativo      | -                               | No                  |
| De disolvente | DMSO + agua estéril             | Sí                  |
| De Células    | -                               | Sí                  |



### 4.6.2 Preparación de muestras

Se pesaron entre 4 y 5 mg de la sustancia de prueba y se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de DMSO. A la solución anterior se agregaron 1800  $\mu\text{L}$  de agua estéril para obtener una concentración de entre 2.0 y 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Microorganismo de prueba

El microorganismo utilizado para la evaluación de la actividad antibacteriana de los compuestos aislados del extracto *n*-butanólico fue *Streptococcus mutans* (ATCC10499) que de acuerdo a la literatura es éste uno de los principales patógenos orales causantes de las caries dentales (Gamboa, et al., 2004). El crecimiento y desarrollo de la bacteria se llevó a cabo en caldo de infusión de cerebro-corazón (BHI; Difco) como medio de cultivo, el cual fue incubado en condiciones aerobias a 37 °C, durante 24 h, después se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos y se lavó 2 veces con una solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M (PBS, pH 6.8), y se resuspendió en la misma solución, ajustando a una turbidez correspondiente al estándar de MacFarland, utilizando un espectrofotómetro de la serie Cecil (Milton Roy).

### 4.6.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

La actividad antibacteriana, tanto de los extractos como de los compuestos se expresó en términos de concentración mínima inhibitoria y se realizó por el método de microdilución en placa estéril de 96 pozos (Sarstedt) (Figura 2). Utilizando la suspensión de células ajustada, cada pozo inicial contenía  $5 \times 10^5$  UFC/mL de *S. mutans*, además del medio de cultivo apropiado y el compuesto de prueba en diluciones seriadas.

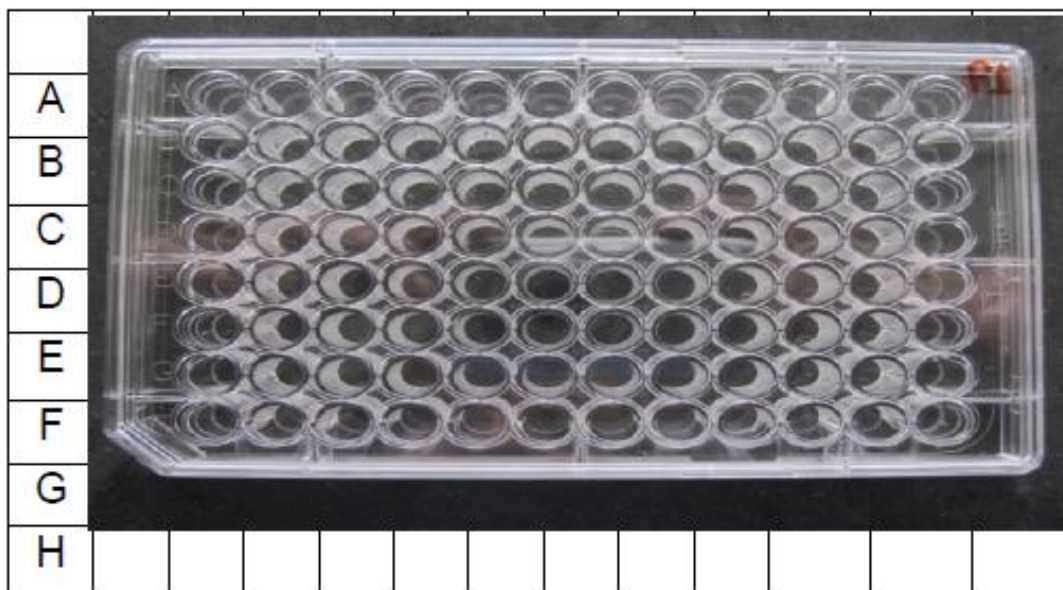


Figura 2. Distribución de los canales en la placa de 96 pozos

#### 4.6.4 Procedimiento general del ensayo

- A cada uno de los 96 pozos de la placa se adicionaron 100  $\mu$ L de medio BHI y adicionalmente:
- En el primer pozo del canal A se adicionaron 100  $\mu$ L de CHX (CMI = 3.7  $\mu$ g/mL)
- Canal B se adicionaron 100  $\mu$ L de una solución de DMSO.
- Canal C se adicionaron 100  $\mu$ L del medio BHI.
- Canal D se utilizó como control de células, por lo que sólo se inoculó con *S. mutans* a una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/mL.
- Canales E a H se adicionaron 100  $\mu$ L de la sustancias de prueba.
- Posteriormente se realizaron las diluciones seriadas de cada uno de los canales, tomando 100  $\mu$ L de los pozos 1 y transfiriéndolos al 2 y así sucesivamente hasta el 12, desechando los últimos 100  $\mu$ L.
- Se agregaron 80  $\mu$ L (1 % de sacarosa) en cada uno de los 96 pozos.
- Finalmente, se adicionaron 20  $\mu$ L de *S. mutans* a una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/mL en cada canal.

## DESARROLLO EXPERIMENTAL

---

Las placas se incubaron a 37 °C, en condiciones aerobias durante 24 h en una incubadora Labnet 211DS. Posteriormente se determinó el crecimiento microbiano espectrofotométricamente ( $A_{660}$  nm) a las 24 horas, utilizando un lector de placas (Biorad). El valor de CMI para *Streptococcus mutans* se definió concentración mínima del compuesto de prueba que inhibía el crecimiento hasta tener una turbidez no mayor a 0.05  $A_{660}$  nm. Este procedimiento se hizo por triplicado para los compuestos **1**, **2**, **3** y los derivados acetilados de **1** y **2** así como para los extractos total, clorofórmico y *n*-butanólico.

### 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La corteza de *Alnus acuminata arguta* ha sido utilizada en la medicina tradicional mexicana por cientos de años para el tratamiento de diversas enfermedades. A la fecha solamente habían sido realizados, en nuestro laboratorio, estudios farmacológicos sobre este material vegetal que han comprobado la actividad antiinflamatoria como la más importante reportada para esta planta y asimismo se habían aislado compuestos de tipo triterpenoide pentacíclicos de los extractos no polares. Adicionalmente a otras investigaciones (de carácter multidisciplinario) que determinan la eficacia terapéutica, la inocuidad y los parámetros de calidad, para un estudio integral de una materia prima medicinal, es necesario conocer el contenido metabólico ya que la mayoría de las pruebas para un control de calidad de la planta dependen del conocimiento químico de la misma. Por lo anterior, *Alnus acuminata arguta* como materia prima medicinal mexicana de amplio uso, fue seleccionada para realizar un estudio fitoquímico exhaustivo con el fin de determinar las sustancias responsables de su actividad biológica reportada (Aguilar, et al., 2011).

En este trabajo se estudió el contenido químico del extracto *n*-butanólico, eliminando previamente por medio de un fraccionamiento químico y de partición los componentes no polares mismos que ya habían sido identificados. El extracto *n*-butanólico contiene los metabolitos presentes en el extracto metanólico (como se visualizó por ccf), de interés en este estudio ya que éste presentó actividad antiinflamatoria muy importante que justifica la actividad principal para la que es recomendada esta especie vegetal (Aguilar, et al., 2011).

#### 5.1 Cuantificación de fenoles totales

Debido al carácter polar del extracto en estudio, en primera instancia se realizaron pruebas preliminares para la detección de fenoles por medio de la reacción del extracto con el reactivo de cloruro férrico, la cual resultó positiva (coloración azul). Posteriormente, se llevó a cabo la cuantificación de fenoles totales en el extracto *n*-butanólico por el método de Folin-Ciocalteu, el cual emplea una curva patrón construida a partir de diferentes concentraciones de ácido gálico, donde se

interpola la absorbancia obtenida de la muestra. La reacción resulta en la formación de un complejo colorido que absorbe a 765 nm, al someter a los fenoles presentes en una muestra con el reactivo de Folin-Ciocalteu y se basa en la transferencia de electrones en medio alcalino de compuestos fenólicos a complejos de los ácidos fosfomolibdico/fosfotúngstico. Este método proporciona una medida aproximada de la cantidad de compuestos fenólicos presentes en una muestra vegetal (Singleton, et al., 1974; Pourmorad, et al., 2006; Ainsworth y Gillespie, 2007). El resultado de la cuantificación fue que 200 µg/mL de extracto *n*-butanólico contienen 243.91 equivalentes de ácido gálico/mL, lo que indica la presencia de una gran cantidad de compuestos de tipo fenólico.

### **5.2 Estudio fitoquímico del extracto *n*-butanólico de *Alnus acuminata* spp. *arguta***

En el estudio fitoquímico de la corteza de *Alnus acuminata arguta* se aislaron cinco compuestos del tipo diarilheptanoide, tres de ellos se obtuvieron como sus derivados acetilados y sus estructuras fueron confirmadas por el análisis de sus constantes espectroscópicas como se refiere a continuación.

#### **5.2.1 Aislamiento y elucidación estructural de oregonina (5-O-β-D-xilopiranosido de hirsutanonol) (1), hirsutenona (1,7-bis-(3',4'-dihidroxifenil)-4-hepten-3-ona) (2) e hirsutanonol (3)**

##### **5.2.1.1 Obtención de Oregonina (5-O-β-D-xilopiranosido de hirsutanonol) (1)**

El extracto total seco (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) de *Alnus acuminata arguta* obtenido por percolación estaba conformado por una gran cantidad de sustancias polares por lo que fue sometido a diferentes procedimientos de fraccionamiento como se describe en la sección de Desarrollo Experimental. Así, la fracción FV'<sub>2</sub> fue aplicada en 4 placas preparativas utilizando un sistema de elución con CH<sub>3</sub>Cl:MeOH (85:15). En cada una de las placas se observaron varias bandas, las cuatro más intensas (A, B, C y D en orden de polaridad descendente) se rasparon de modo independiente y extrajeron del gel de sílice, obteniéndose fracciones resinosas.

De la fracción A, se aisló un compuesto de color café en muy pequeña cantidad que posteriormente se obtuvo en mayor proporción al fraccionar FV<sub>2</sub> por CCA. El espectro en el IR presentó bandas de absorción asociadas a gran cantidad de grupos hidroxilo (3337 cm<sup>-1</sup>), grupo carbonilo de cetona (1695 cm<sup>-1</sup>), dobles enlaces (1602, 1235, 1071 y 863 cm<sup>-1</sup>) y grupos metileno y metinos alifáticos (1514, 1445, 1364 cm<sup>-1</sup>).

Los espectros de RMN de este compuesto presentaron el perfil típico del glicósido de un diarilheptanoide sustituido en las posiciones 5, 3', 3'', 4' y 4'', por las siguientes evidencias: en el espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 3) se observaron grupos de señales en la zona de hidrógenos aromáticos, así como hidrógenos base de oxígenos e hidrógenos alifáticos. Las señales aromáticas en el espectro de RMN de <sup>1</sup>H estuvieron centradas en 6.68, 6.64 y 6.51 ppm, integrando para dos hidrógenos cada grupo de señales y correspondiendo a dos pares de sistemas ABX. Las señales centradas en 6.68 ppm consistieron en dos dobletes empalmados con constante de acoplamiento de 8 Hz, correspondiendo a H-5 de ambos anillos bencénicos, las señales en 6.64 ppm correspondieron a dos dobletes, también empalmados con constante de acoplamiento de 2.1 Hz asignados a H-2 de ambos anillos y por último las señales en 6.51 ppm se observaron como dos dobles de dobles con constantes de acoplamiento de 8 y 2.1 Hz siendo asignadas a H-6 de ambos anillos. Lo anterior corrobora la información de la literatura (Kuroyanagi, et al., 2005) para la oregonina (**1**).

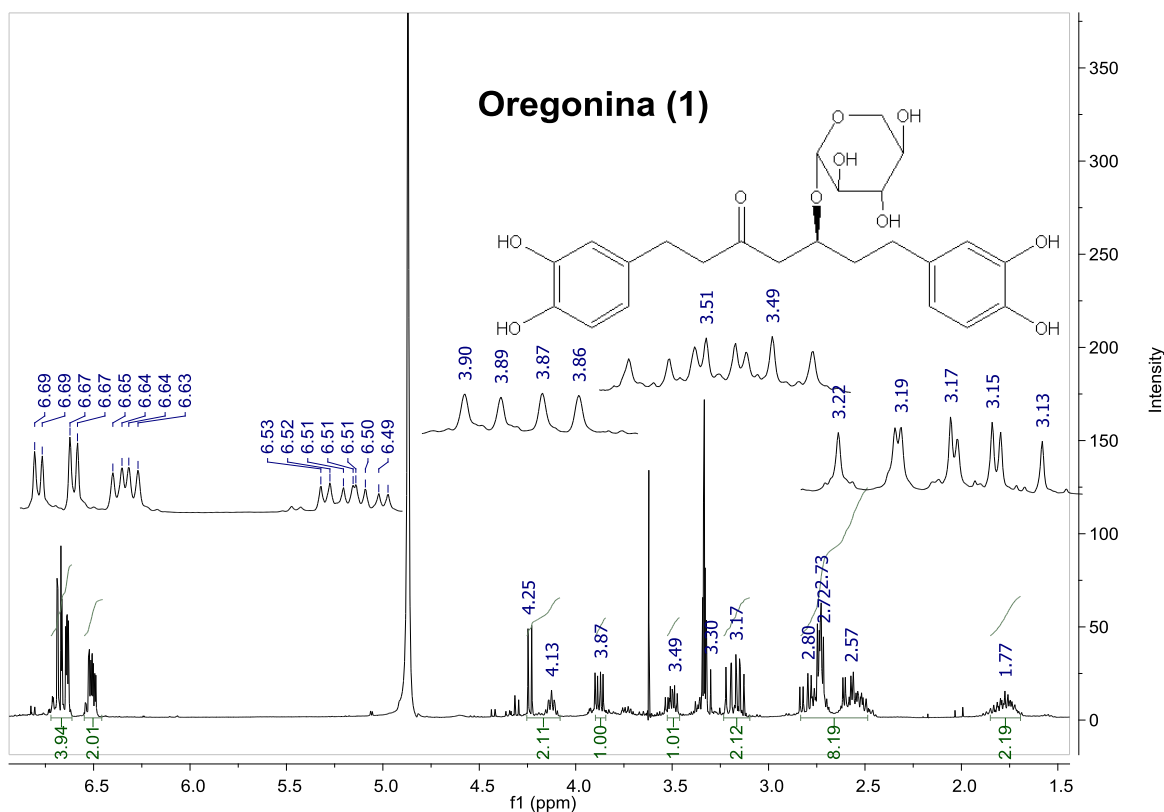


Figura 3. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto 1.

En el espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 4) se observaron un total de veintidós señales que corresponden a veinticuatro carbonos, doce de ellos de tipo aromático de los cuales, seis se encontraron unidos a hidrógeno obteniéndose su correspondencia con base en el espectro HSQC (Figura 5) en 116.2 ( $\delta_H$  6.67, d,  $J$  8.0 Hz, H-5''), 116.3 ( $\delta_H$  6.69, d,  $J$  8.0 Hz, H-5'), 116.5 ( $\delta_H$  6.63, d,  $J$  2.1 Hz, H-2''), 116.6 ( $\delta_H$  6.64, d,  $J$  2.1 Hz, H-2'), 120.5 ( $\delta_H$  6.50, dd,  $J$  8.0, 2.1 Hz, H-6') y 120.6 ( $\delta_H$  6.49, dd,  $J$  8.0, 2.1 Hz, H-6'') ppm. De las seis carbonos aromáticas restantes, cuatro correspondieron a carbonos cuaternarios unidos a oxígeno (144.1, 144.4, 146.0 y 146.1 ppm, para C-3', 3'', 4' y 4'') y dos unidos a grupos alquilo (134.0 y 135.1 ppm, para C-1' y 1'').

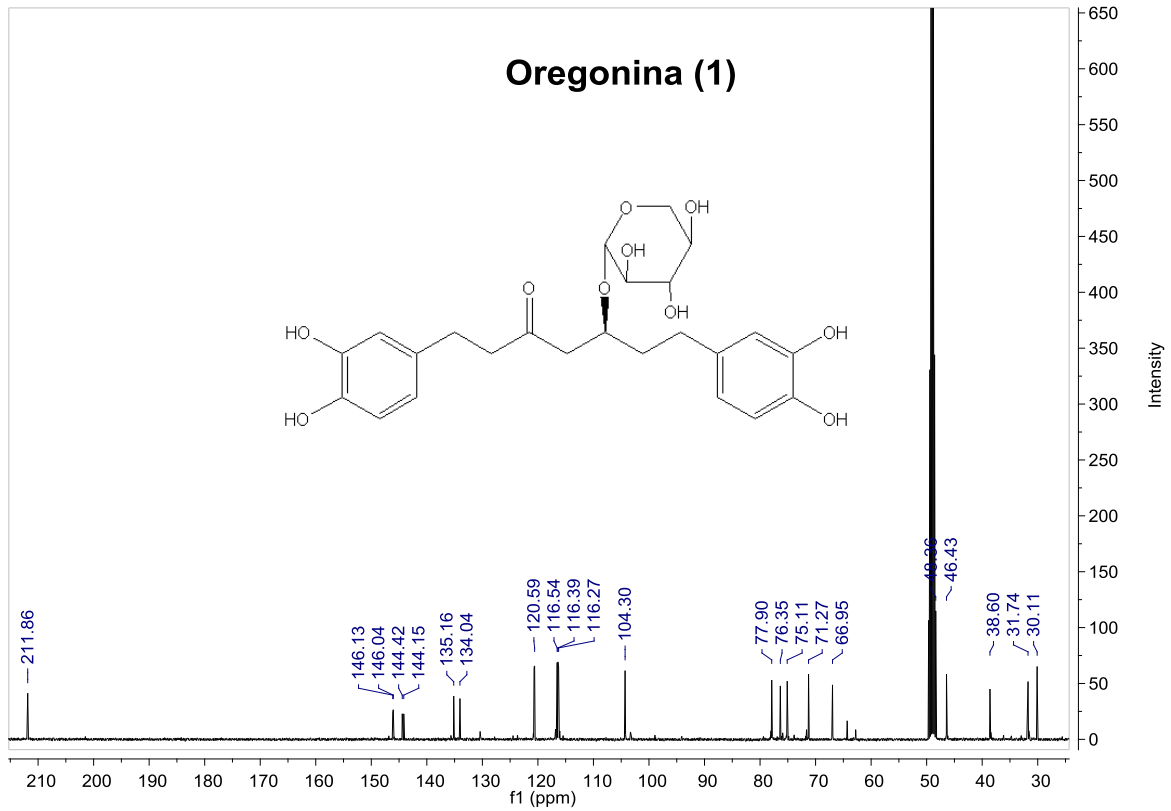


Figura 4. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C del compuesto 1.

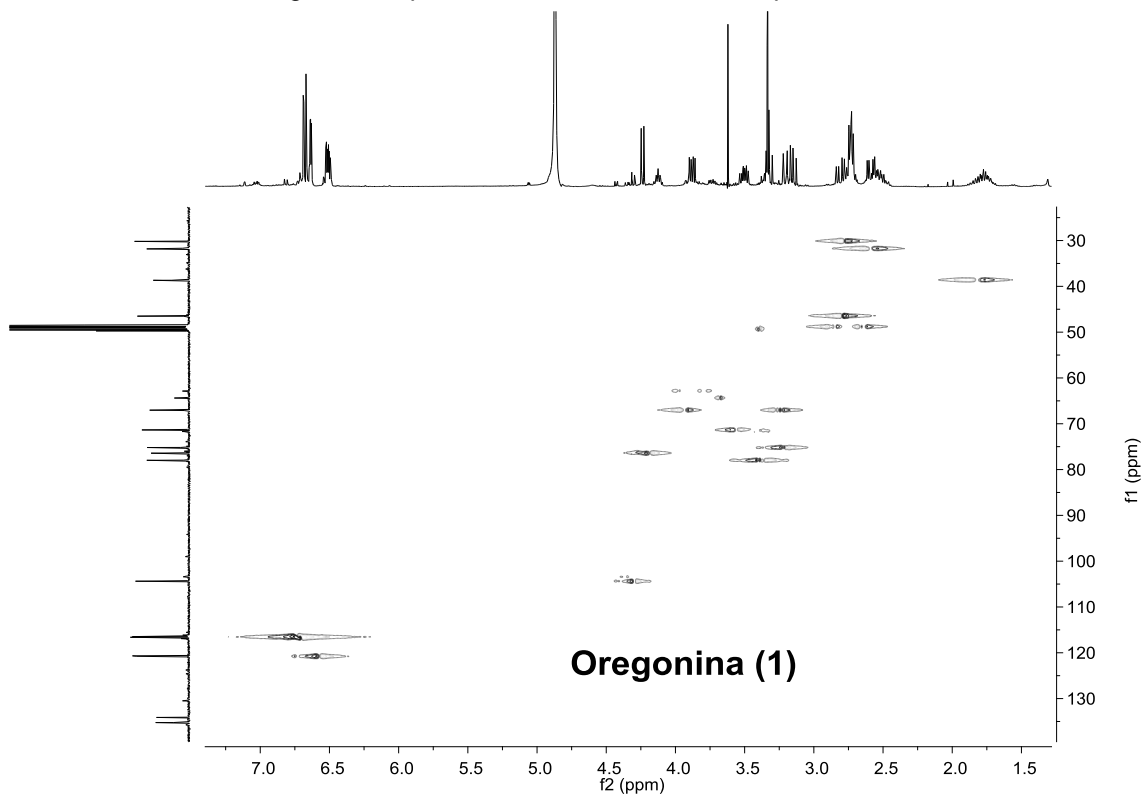


Figura 5. Espectro HSQC del compuesto 1.



Las características anteriores ponen de manifiesto 2 estructuras parciales como en la ilustrada en la Figura 6.

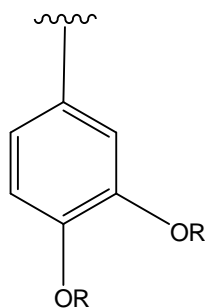


Figura 6. Estructura parcial del compuesto 1

La presencia de un residuo de pentosa se demostró al observarse un metileno y cuatro metinos base de oxígeno en la zona de 66.9 a 104.3 ppm. En 104.3 ppm se observó una señal de un carbono de tipo acetálico (1H, d,  $\delta_H$ . 4.24, d,  $J = 8$  Hz, xil-1) correspondiente a C-1 del azúcar unido a la aglicona, el resto de las señales de este residuo estuvieron en 66.95 ( $\delta_H$  3.19 1H, dd, 3.89 1H, dd,  $J = 11.5, 10.4$  y 5.3 Hz, xil-5), 71.27 (1H,  $\delta_H = 3.5$ , ddd,  $J = 10.33, 8.85$  y 5.3 Hz, xil-4), 75.11 (1H,  $\delta_H$  3.15, dd,  $J = 9.1$  y 7.6 Hz, xil-2) y 77.9 (1H,  $\delta_H$  3.3, m) ppm.

También, en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  se observaron siete señales de carbonos alifáticos localizadas entre 30.1 y 76.3 ppm. El sitio de unión del residuo hidrocarbonado del azúcar, se localizó en la señal múltiple en  $\delta_H$  4.13 ( $\delta_C$  76.3) con el carbono acetálico (104.3 ppm), de acuerdo a las correlaciones observadas en el espectro HSQC (Figura 5) y confirmadas con el espectro HMBC (Figura 7).

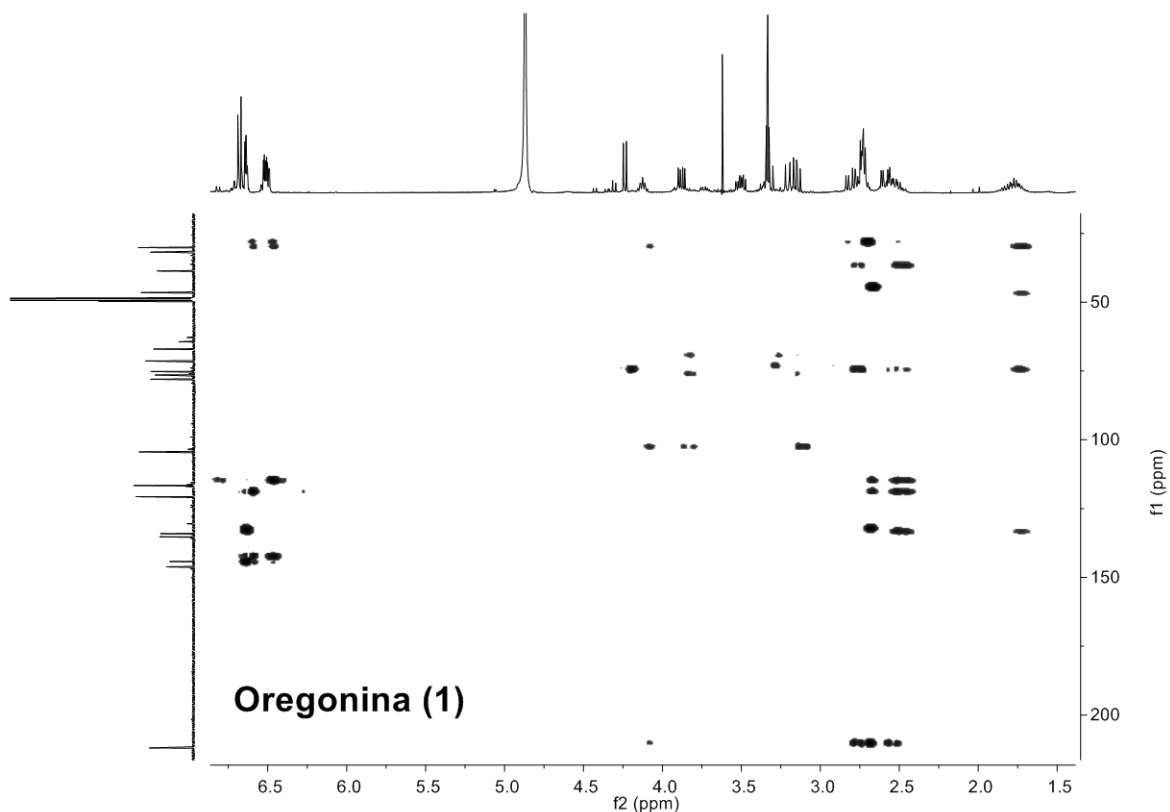


Figura 7. Espectro HMBC del compuesto 1.

Se localizó un sitio de unión en cada uno de los anillos bencénicos a un carbono de tipo metileno con desplazamientos en  $\delta_H$  2.73 (m), ( $\delta_C$  30.10) y  $\delta_H$  2.55 (m) ( $\delta_C$  31.74). Por otra parte, la señal en 30.10 ppm observó correlación a tres enlaces con los dos hidrógenos H-2' y H-6' de un sistema bencénico ABX, y a dos enlaces con un grupo metileno ( $\delta_H$  2.75) y los hidrógenos pertenecientes a la señal en 30.10 ( $\delta_H$  2.73) correlacionaron con un grupo carbonilo estableciendo la estructura parcial de la Figura 8

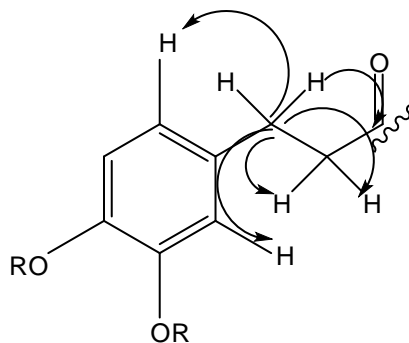


Figura 8. Estructura parcial del compuesto 1.

El grupo carbonilo en 211.7 ppm correlacionó también con las señales en 2.58, 2.81 y 4.24 ppm; éstas señales no experimentaron correlación con señales bencénicas y pertenecieron a un grupo metileno ( $\delta_H$  2.58 y 2.81  $J = 16, 8$  y 4 Hz) y a un metino base de oxígeno ( $\delta_H$  4.24), este último como se dijo anteriormente, con correlación a tres enlaces también con el carbono acetálico (104.3 ppm), lo que sugiere la estructura parcial de la Figura 9.

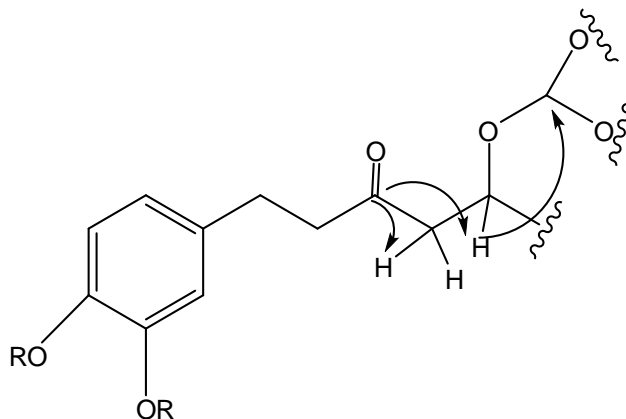


Figura 9. Estructura parcial del compuesto 1.

El otro metileno bencílico ( $\delta_H$  2.55, m;  $\delta_C$  31.7) tuvo correlaciones a dos enlaces con un grupo metileno observado en  $\delta_H$  1.77 ( $\delta_C$  38.6) así como a tres enlaces con el metino en  $\delta_H$  4.24 y, por otra parte, con uno de los carbonos cuaternarios bencénicos ( $\delta_C$  135.16) sugiriendo finalmente el esqueleto que se muestra en la Figura 10.

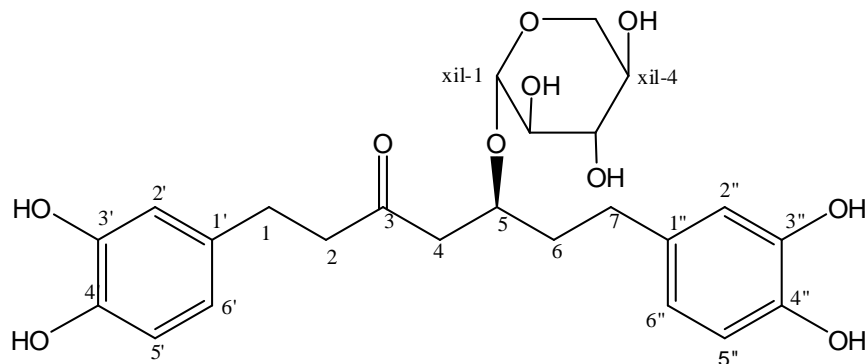


Figura 10. Estructura de oregonina (5-O- $\beta$ -D-xilopiranósido de hirsutanonol) (1)

No habiendo más señales que asignar, los oxígenos de los anillos bencénicos deben ser de tipo fenólico, tomando en consideración las señales para grupos hidroxilo observadas en el espectro IR.

Tanto la estereoquímica "S" en el carbono cinco como los datos espectroscópicos se confirmaron por comparación con lo reportado en la literatura (Park et al., 2010; Kuroyanagi et al., 2005).

### **5.2.1.1a Obtención del 3',4',3'',4''-tetra-O-acetil-5-O-β-D-peracetilxilopiranosido de hirsutanonol (1a) (peracetato de oregonina) por acetilación del compuesto 1**

El compuesto **1** fue sometido a una reacción de acetilación, obteniéndose un compuesto líquido viscoso de color amarillo que correspondió al 3',4',3'',4''-tetra-O-acetil-5-O-β-D-peracetilxilopiranosido de hirsutanonol. Su estructura fue confirmada con las técnicas espectrométricas y espectroscópicas y por comparación con los datos de la literatura (Kuroyanagi, et al., 2005).

En el espectro de IR se observa ausencia de señales para grupos hidroxilo y se presenta una señal ancha de alta intensidad en  $1759\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a grupos carbonilos de éster; en  $3024$  y  $2940\text{ cm}^{-1}$  se aprecian bandas asignadas a las vibraciones C-H aromáticos y alifáticos respectivamente, con bandas adicionales en  $1597$  y  $1427\text{ cm}^{-1}$ ; las bandas en  $1216$ ,  $1111$  y  $1044\text{ cm}^{-1}$  corresponden a vibraciones de grupos C-O.

En cuanto al análisis por espectrometría de masas, con la técnica de FAB<sup>+</sup> se obtuvo un espectro de masas con un ión molecular m/z de 773 (Figura 12) correspondiente a la fórmula molecular C<sub>38</sub>H<sub>44</sub>O<sub>17</sub> con un aumento de catorce átomos de carbono pertenecientes a los residuos de acetilo y por otra parte, el espectro de masas de ionización por impacto electrónico (Figura 13) no se observó el ión molecular ya que presentó un pico mayor de m/z 514 que corresponde a la masa molecular de la aglicona acetilada indicando la fragmentación y pérdida de la unidad de pentosa, como se indica en la Figura 11.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

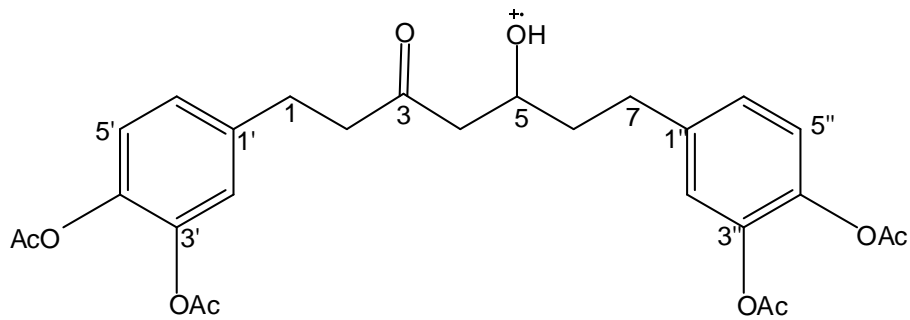


Figura 11. Estructura de la aglicona como fragmento obtenido por IE

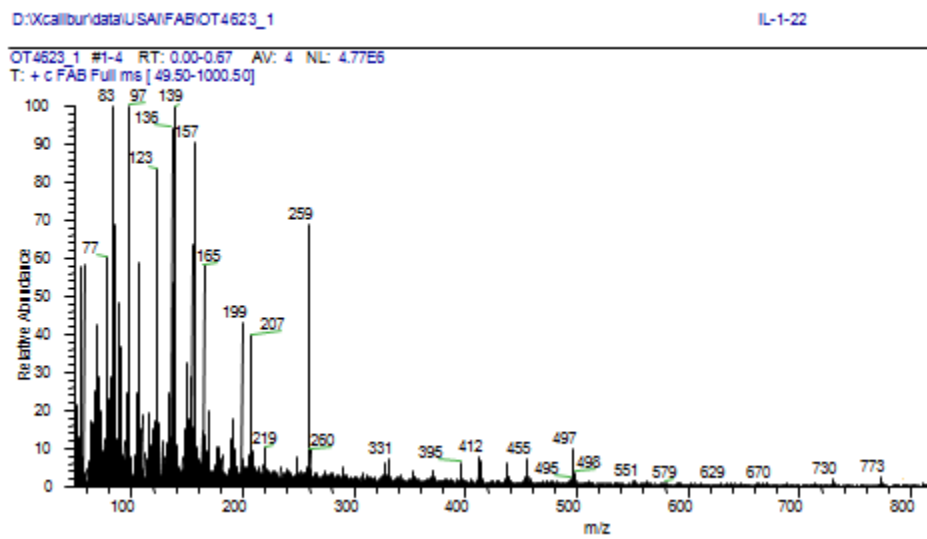


Figura 12. Espectro de masas del compuesto **1a**, obtenido por FAB<sup>+</sup>

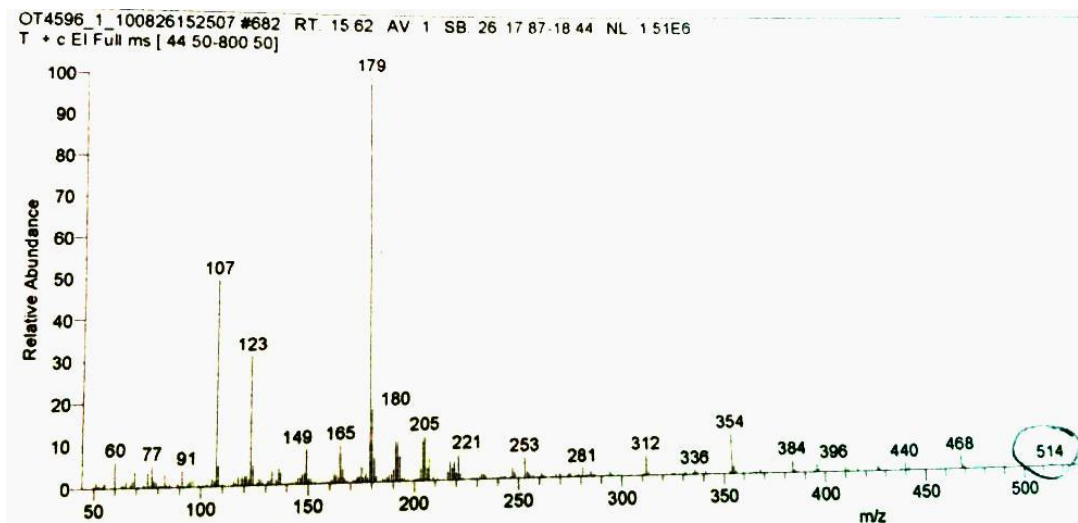


Figura 13. Espectro de masas del compuesto **1a**, (IE)

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  se observó un aumento de señales después de la acetilación, correspondientes a carbonilos de éster con desplazamientos entre 168.4 y 171.3 ppm; y metilos de los grupos acetilo en 20.76 y 20.85 ppm. (Figura 14).

En la RMN de  $^1\text{H}$  se observó que los hidrógenos aromáticos se desplazaron y centraron en  $\delta_{\text{H}}$  6.99, 7.01 y 7.05 desplazándose 0.3 ppm con respecto al compuesto en su forma natural. En  $\delta_{\text{H}}$  1.90 se observó un multiplete que integró para nueve hidrógenos, que correspondió a tres metilos de los grupos acetilo incorporados al azúcar, también se visualizó un singulete en  $\delta_{\text{H}}$  2.25 que integró para 12 hidrógenos, que se asignó a los metilos de los cuatro grupos acetilo unidos a los anillos aromáticos. Debido a la incorporación de grupos electronegativos por la acetilación de la molécula, los hidrógenos sobre carbonos base de oxígeno de la pentosa se desplazaron hacia campo bajo en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  en la zona entre  $\delta_{\text{H}}$  4.08 y 5.18, observándose en  $\delta_{\text{H}}$  4.88 una señal múltiple, que corresponde al hidrógeno unido al carbono base de oxígeno que soporta al azúcar, como se observa en la Figura 15.

El objetivo de la acetilación en primera instancia, fue facilitar la purificación del compuesto, pero también permitió discernir que el azúcar unido a la aglicona era una pentosa, tomando en consideración el total de grupos acetilo. La estructura de este compuesto se muestra en la Figura 16.

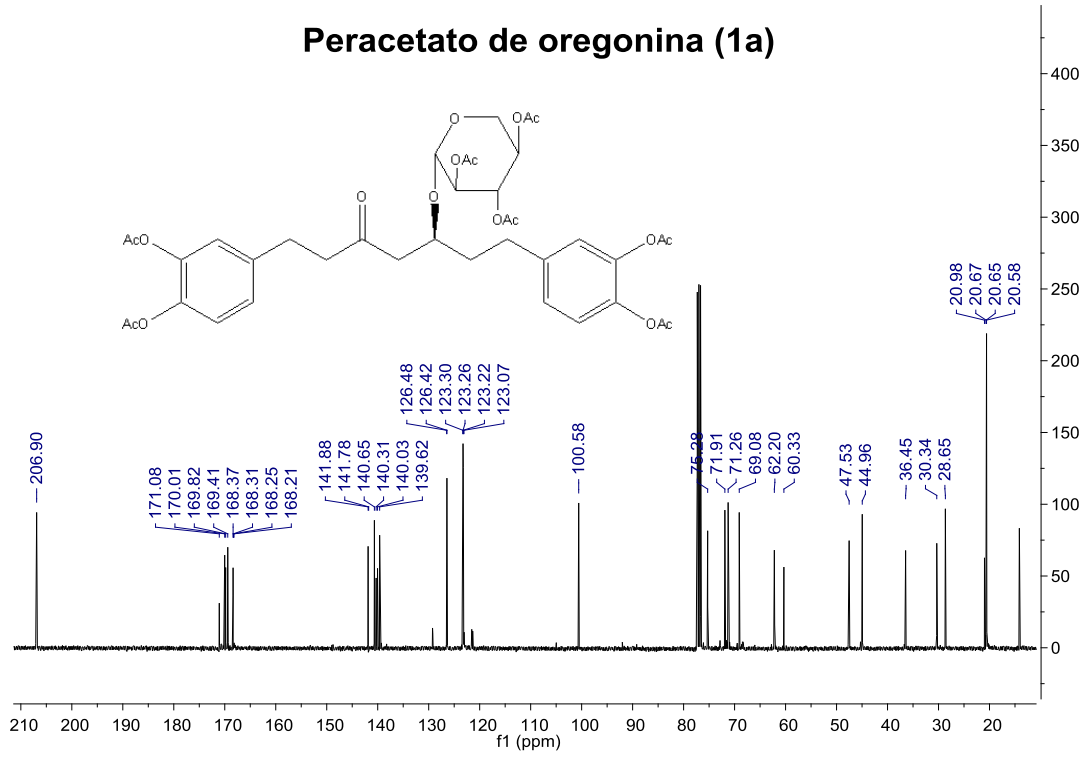


Figura 14. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **1a**.

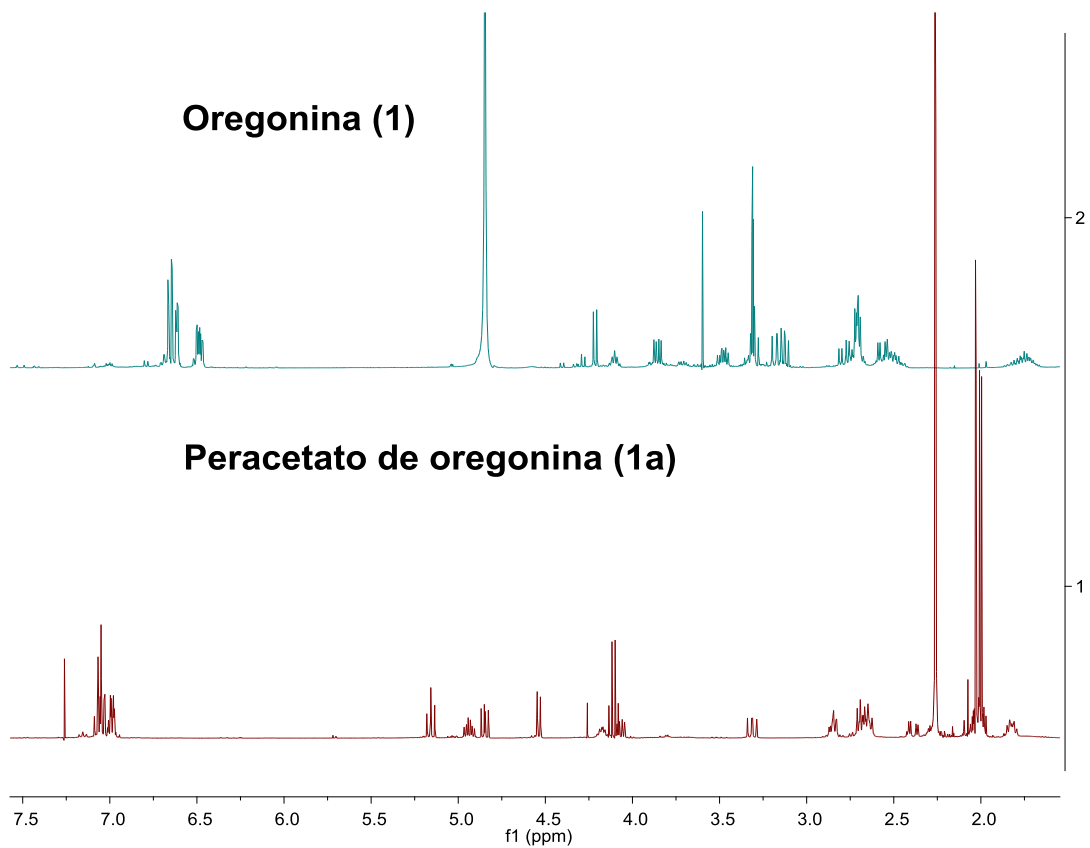


Figura 15. Desplazamiento de las señales por la acetilación.

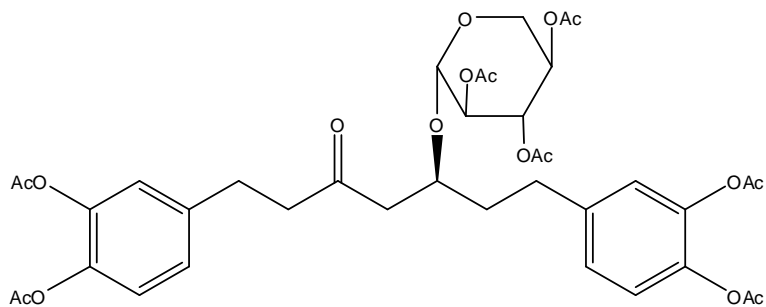


Figura 16. Estructura de la oregonina peracetilada (**1a**).

### 5.2.1.2 Obtención de hirsutenona (**2**) e hirsutanonol (**3**)

La hidrólisis ácida del compuesto **1** produjo dos agliconas que se observaron casi superpuestas en ccf y que fueron separadas después de realizar una reacción de acetilación, purificándose la hirsutenona (**2**) en su forma acetilada por placa preparativa. Tanto (**2**) como (**3**) se detectaron posteriormente, en las fracciones F-iii y F-iv (por CCF), de esta última fracción se purificó, por placa preparativa, el compuesto **3**. Ambos compuestos se identificaron por RMN de  $^1\text{H}$ .

#### 5.2.1.2a.- Hirsutenona (**2**)

El producto de menor polaridad en ccf (**2**) se presentó como un semisólido transparente y su estructura fue comprobada por análisis espectroscópicos y espectrométricos. El ión molecular en espectrometría de masas dio un peso de 496 umas, correspondiente a una fórmula molecular de  $\text{C}_{27}\text{O}_9\text{H}_{28}$  con índice de instauración de 14. (Figura 17).

D:\Xcalibur\data\USA\CG\OT4780\_1

10/1/2010 3:07:20 PM

IL-B-31

OT4780\_1 #737 RT: 15.50 AV: 1 SB: 29 16  
T: + c EI Full ms [ 44.50-600.50]

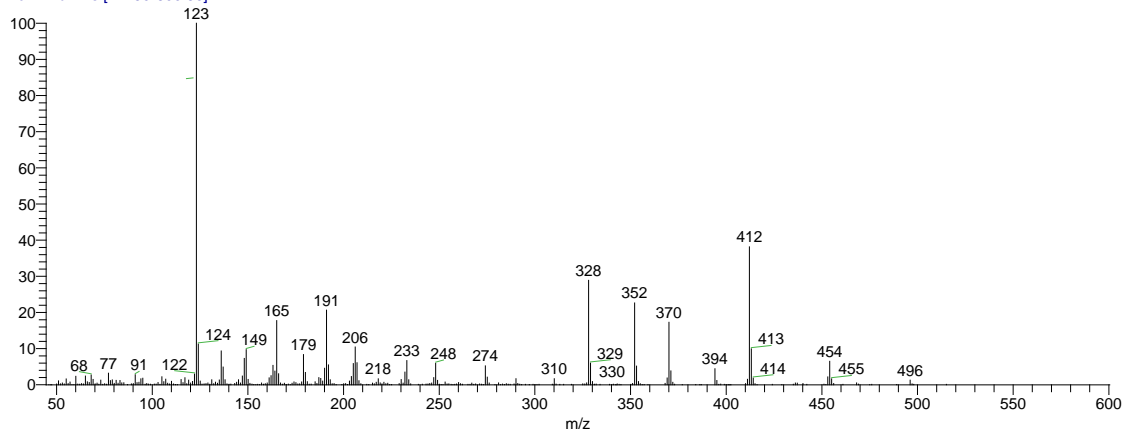


Figura 17. Espectro de masas de 3',4',3'',4''-tetra-O-acetilhirsutenona (**2**)



El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 18) presentó similitudes y diferencias con respecto al del compuesto **1**, como fueron la ausencia de señales de hidrógenos unidos a carbono base de oxígeno, de igual forma el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 19) comprobó la ausencia de carbonos alifáticos base de oxígeno.

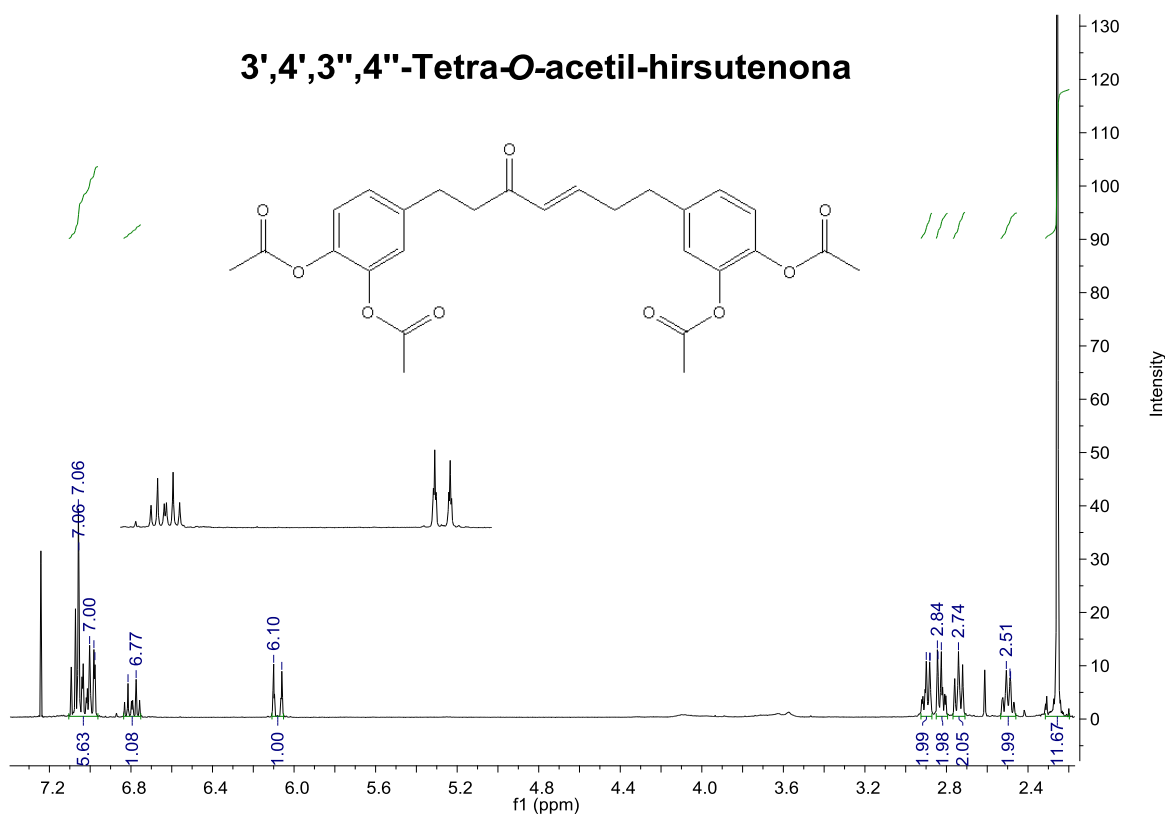


Figura 18. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **2**

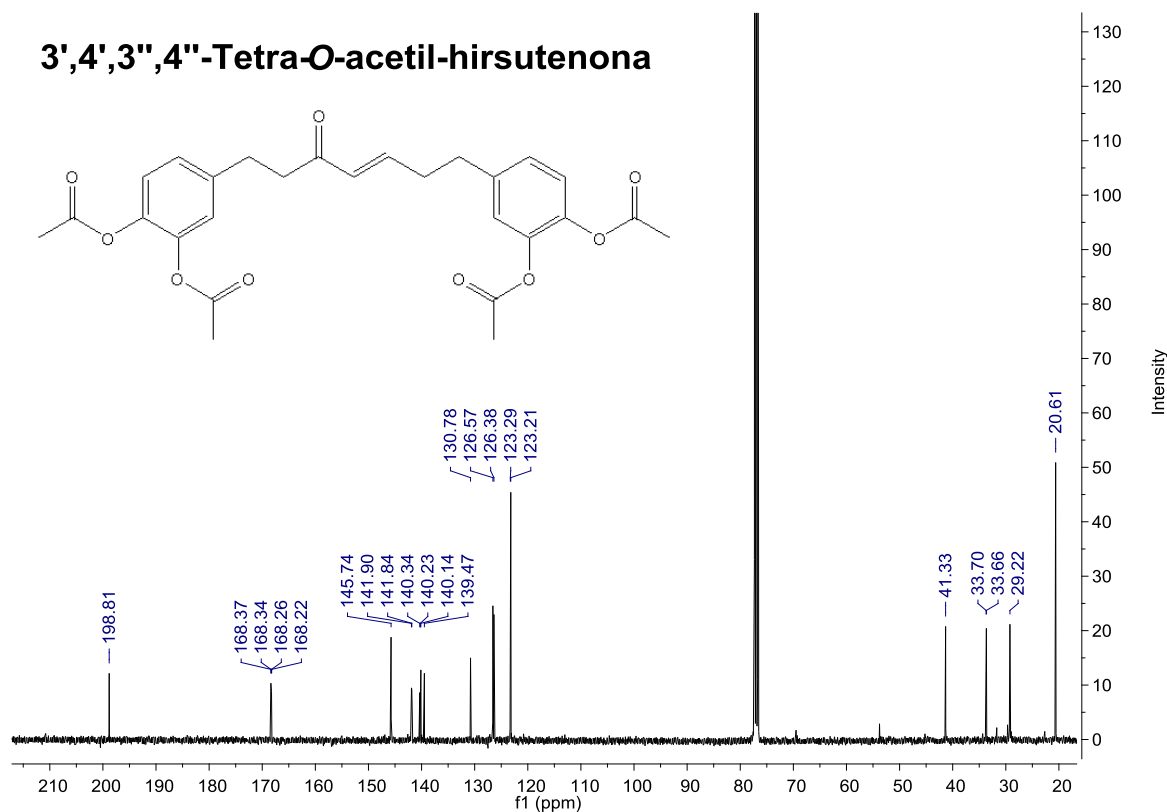


Figura 19. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto **2**

Asimismo, tanto en RMN de  $^1\text{H}$  como de  $^{13}\text{C}$  se observó un singlete intenso en  $\delta_{\text{H}}$  2.25 que integró para doce hidrógenos ( $^1\text{H}$ ) con su señal correspondiente en  $\delta_{\text{C}}$  20.8 y se asignó a grupos metilo de acetilos.

Las señales adicionales de la aglicona mostraron un grupo carbonilo de cetona en 198.9 ppm con correlaciones en el espectro HMBC (Figura 20) a dos y tres enlaces con dos grupos metileno, uno de ellos bencílico por sus correspondientes correlaciones con un grupo bencénico; adicionalmente, el carbonilo correlacionó con un grupo vinilo con estereoquímica *trans* de acuerdo a sus constantes de acoplamiento ( $\delta_{\text{H}}$  6.1, d,  $J$  16 Hz;  $\delta_{\text{C}}$  130.9 y  $\delta_{\text{H}}$  6.79, d,  $J$  16 Hz; 145.9). Por otra parte, la doble ligadura presentó correlaciones a dos y tres enlaces con un par de metilenos, uno en  $\delta_{\text{H}}$  2.83 como un multiplete que integró para dos hidrógenos ( $\delta_{\text{C}}$  29.4), y el otro bencílico en  $\delta_{\text{H}}$  2.88 el cual apareció como un multiplete ( $\delta_{\text{C}}$  33.8), con correlación a tres enlaces con un segundo grupo bencénico.

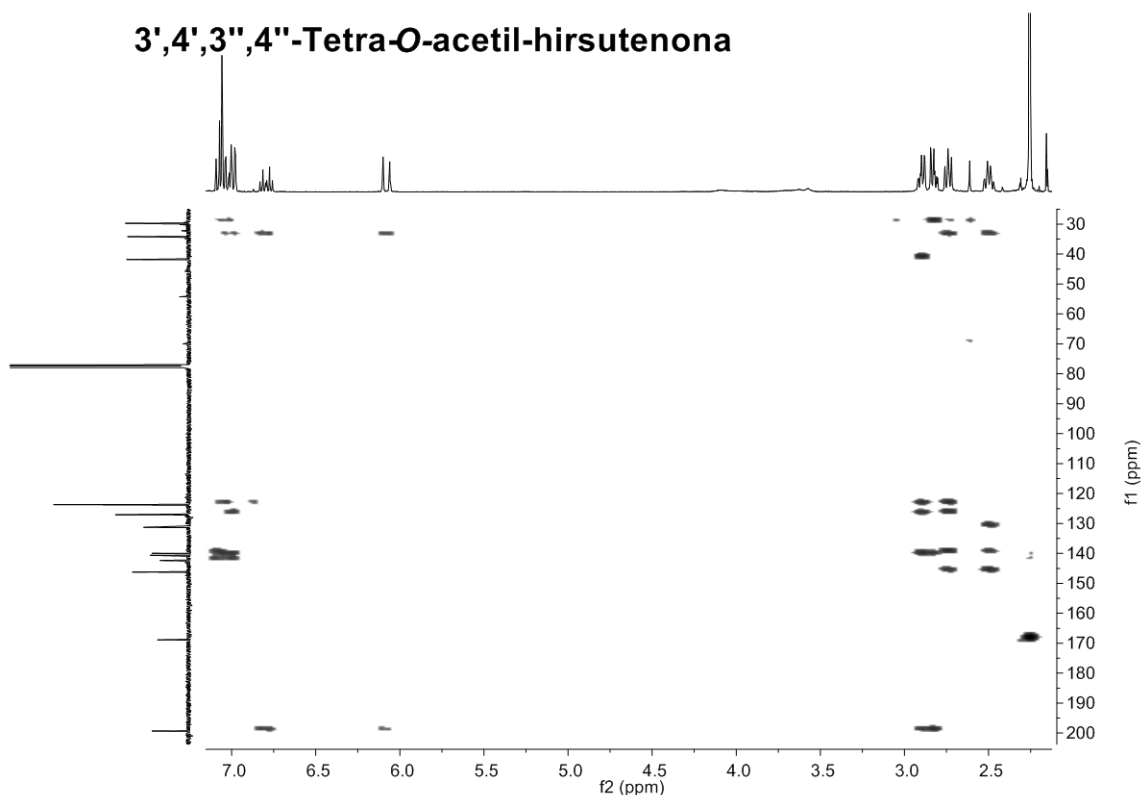


Figura 20. Espectro HMBC del compuesto **2**

Así, los dos anillos bencénicos se encuentran situados en los extremos de una cadena de siete átomos de carbono; esto último, se evidencia mediante el hecho de que los dos metilenos bencílicos tienen correlaciones cada uno con dos metinos aromáticos y con un carbono cuaternario aromático.

La presencia de grupos fenólicos se comprobó por el desplazamiento químico de cuatro carbonos en 168.4 ppm (x 2) y 168.5 ppm (x 2)

Los cuatro grupos acetilo se encuentran como sustituyentes de los oxígenos fenólicos de los dos anillos bencénicos los cuales resultaron estar trisustituidos por la presencia de dos sistemas ABX observados en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para los dos anillos. Las señales aromáticas se localizaron entre 6.98 y 7.06 ppm. Este compuesto (**2**) probablemente se forma por deshidratación del compuesto **3** también aislado de esta misma reacción a partir del compuesto **1** (por las condiciones ácidas de la hidrólisis). La estructura del compuesto **2** se muestra a continuación (Figura 21).

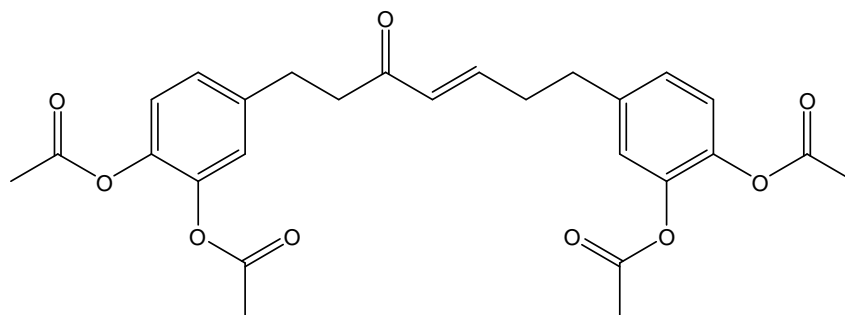


Figura 21 Estructura del compuesto 2

### 5.2.2.2b- Hirsutanonol (3)

El compuesto **3** de mayor polaridad se obtuvo también a partir de la hidrólisis del compuesto **1** y en su espectro de RMN-<sup>1</sup>H se observó que las señales del azúcar no estaban presentes, siendo ésta, la diferencia más importante con respecto al espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **1** (Figura 22). Asimismo, este compuesto fue obtenido de la fracción F-iv, siendo el compuesto mayoritario y purificado por ccf en placa preparativa, y su estructura fue comprobada al realizar análisis espectroscópicos de RMN. En el espectro de RMN de <sup>1</sup>H se observaron las señales de hidrógenos aromáticos ( $\delta$  6.51 a 6.69) mostrando un sistema ABX, también se observó la señal de hidrógeno unido a carbono base de oxígeno ( $\delta$  4.03), hidrógenos bencílicos ( $\delta$  2.73, 4H), dos pares de hidrógenos en metilenos alfa a un grupo carbonilo ( $\delta$  2.53, 2.71) y el hidrógeno unido al carbono alfa al carbinol en la posición seis ( $\delta$  1.68). Sus correlaciones fueron confirmadas por el experimento COSY (Figura 23).

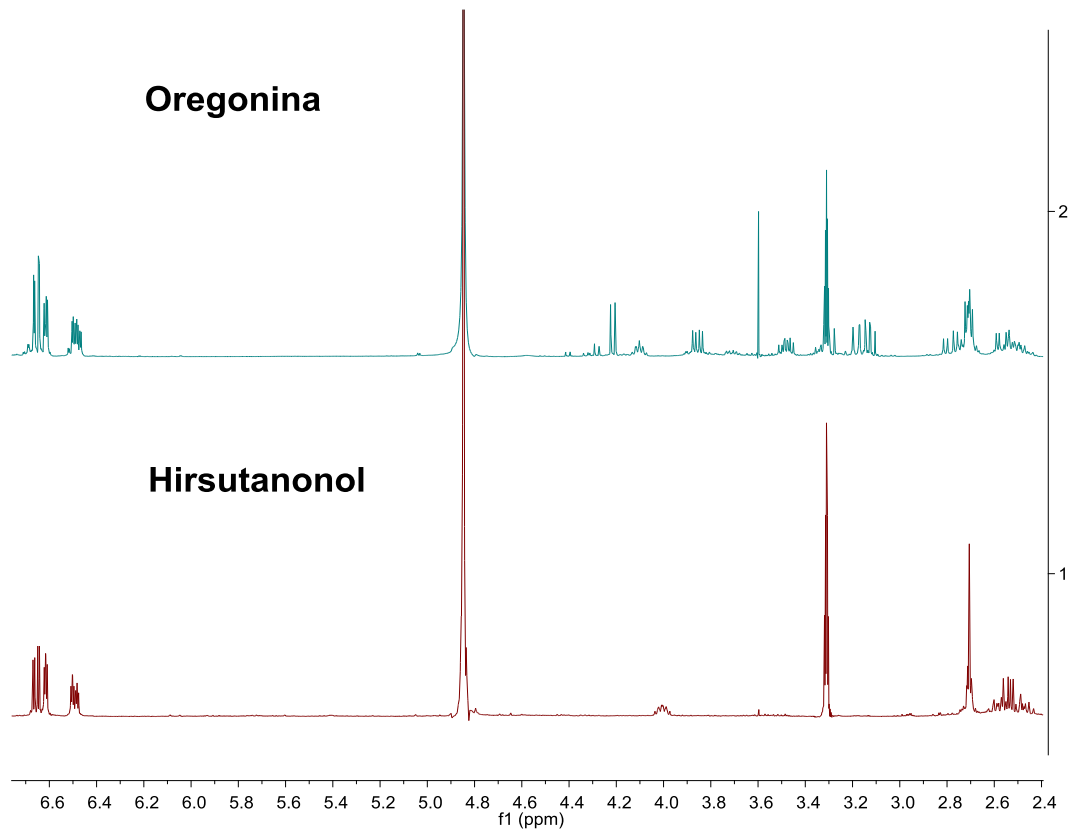


Figura 22. Comparación de los compuestos 1 y 3. Glicósido y su aglicona.

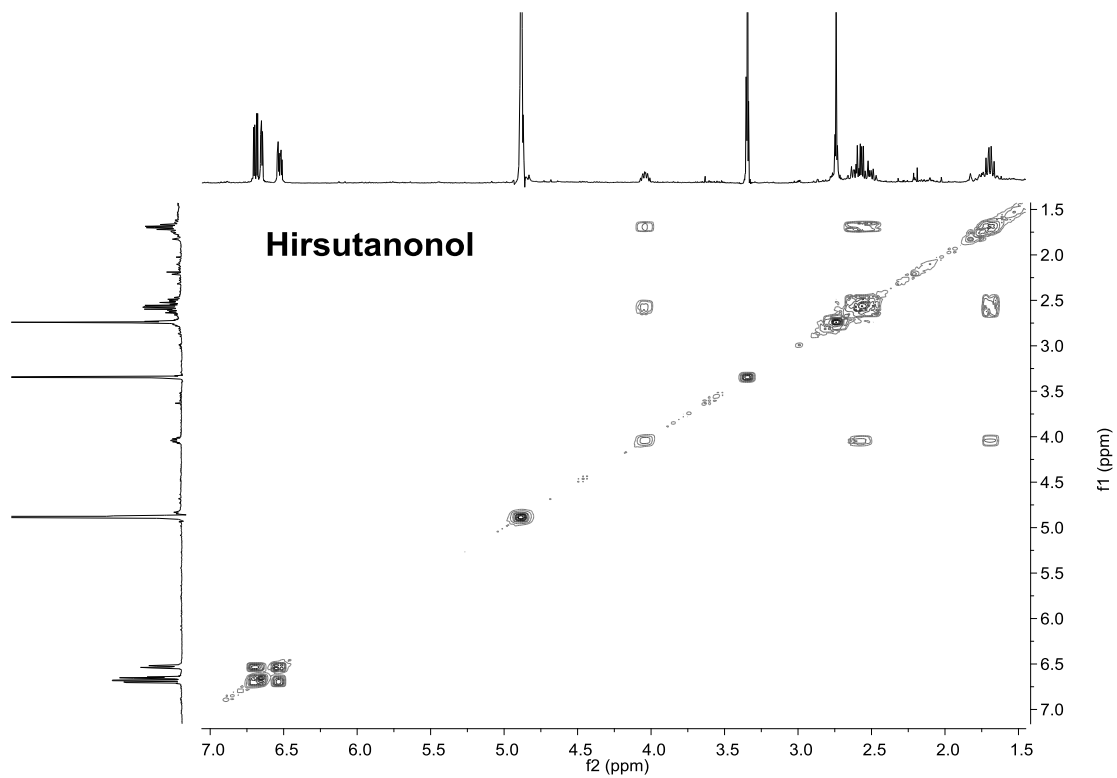


Figura 23. Espectro COSY del compuesto 3.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  se observaron diecinueve señales, siete de ellas correspondientes a carbonos de la cadena alifática teniendo un carbono de carbonilo ( $\delta = 210.6$ ), dos carbonos bencílicos ( $\delta = 28.6$  y  $30.7$ ), dos carbonos alfa a carbonilo ( $\delta = 44.9$  y  $49.8$ ) un carbono base de oxígeno ( $\delta = 68.3$ ) y el carbono alfa al carbinol ( $\delta = 39$ ), además de doce carbonos aromáticos ( $\delta$  114.9 a 144.7). Sus correlaciones con hidrógenos fueron comprobadas por experimentos HMBC y HSQC (Figuras 25 y 26).

En la Figura 24 se muestra la estructura del compuesto **3** que correspondió a la aglicona de la oregonina (**1**):

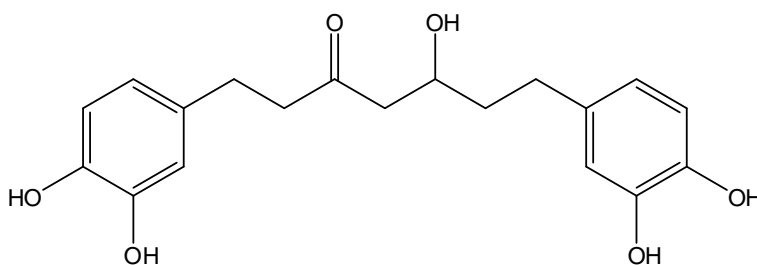


Figura 24. Estructura del compuesto **3**, hirsutanonol.

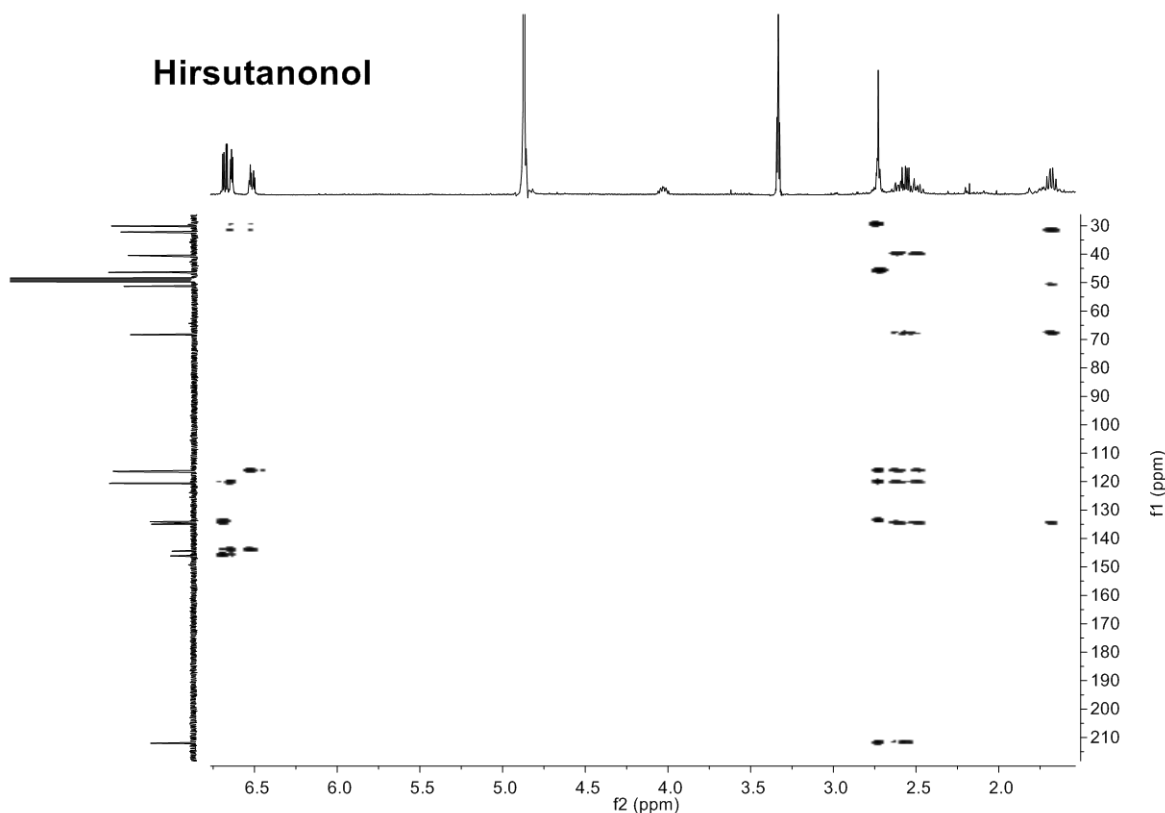


Figura 25. Espectro HMBC del compuesto **3**.

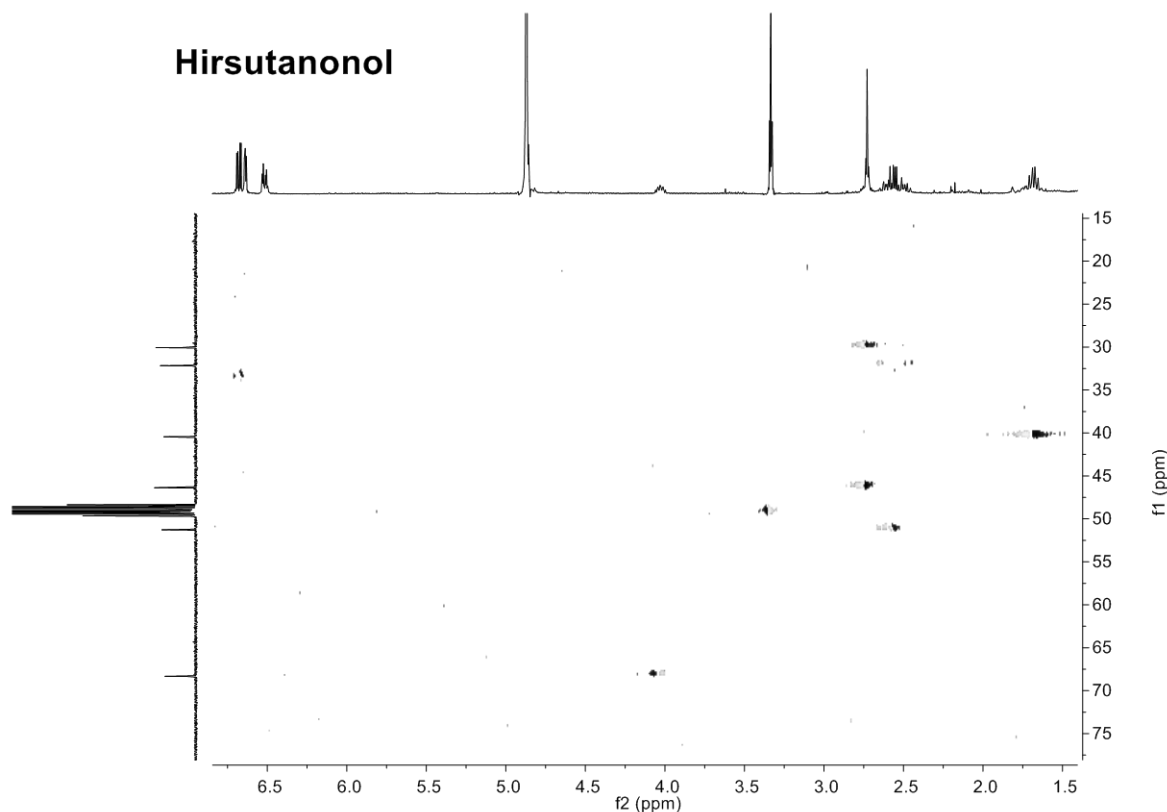


Figura 26. Espectro de HSQC del compuesto 3.

### 5.2.2.3 Aislamiento y elucidación estructural de (4E)-1,7-bis-(4-acetoxifenil)-hept-4-en-3-ona (platifilenona) (4) y 3,4',4''-tri-O-acetil-centrolobol (5)

Debido a su gran polaridad y complejidad metabólica, la fracción F-ii se sometió a un proceso de acetilación para separar a sus componentes principales; el producto de esta reacción se fraccionó por CCA. Los compuestos 4 y 5 aislados fueron purificados por ccf en placa preparativa a partir de la subfracción SF-i. Para su identificación se realizaron análisis espectroscópicos y espectrométricos.

#### 5.2.2.3a Identificación de (4E)-1,7-bis-(4-acetoxifenil)-hept-4-en-3-ona (platifilenona) (4) (D. Park, et al, 2010)

El compuesto 4 (más polar que 5) mostró un espectro de RMN de  $^1\text{H}$  muy similar al de la 3',4',3'',4''-tetra-O-acetilhirsutenona (2) (Figura 27), salvo que en la zona de aromáticos se observaron dos pares de dobletes que integraron cada uno para cuatro hidrógenos (4H) con constantes de acoplamiento de 8 Hz. El doblete

situado en  $\delta$  7.18 correspondió a los hidrógenos H-2' y 6' y el observado en  $\delta$  7.16, a H-2'' y 6'', mientras que el doblete en  $\delta$  7.00 perteneció a H-3', 6' y el localizado en  $\delta$  6.98 a H-3'', 6''; claramente se observó en estas señales un sistema  $A_2B_2$  lo que indicó que los anillos unidos a la cadena alifática se encontraban disustituídos en posición *para* y la asignación de sus señales se llevó a cabo con base en las correlaciones observadas en el espectro HMBC (Figura 28). También, se observaron señales correspondientes a grupos vinilo que se acoplaron entre sí ( $\delta$  = 6.11 dt,  $J$  = 16, 1.52 Hz y  $\delta$  6.82, dt,  $J$  = 16, 6 Hz). En la zona de hidrógenos alifáticos se observaron señales correspondientes a metilenos y metilos, los más desplazados a campo bajo ( $\delta$  = 2.77, 2.85 y 2.92) fueron los hidrógenos de dos metilenos bencílicos (H-1 y H-7) y un metileno alfa a un grupo carbonilo (H-2), observándose también hidrógenos alfa al grupo vinilo ( $\delta$  = 2.53, H-6). Los metilos se observaron como un singulete ( $\delta$  = 2.31, 6H) y correspondieron a los metilos de acetilo.

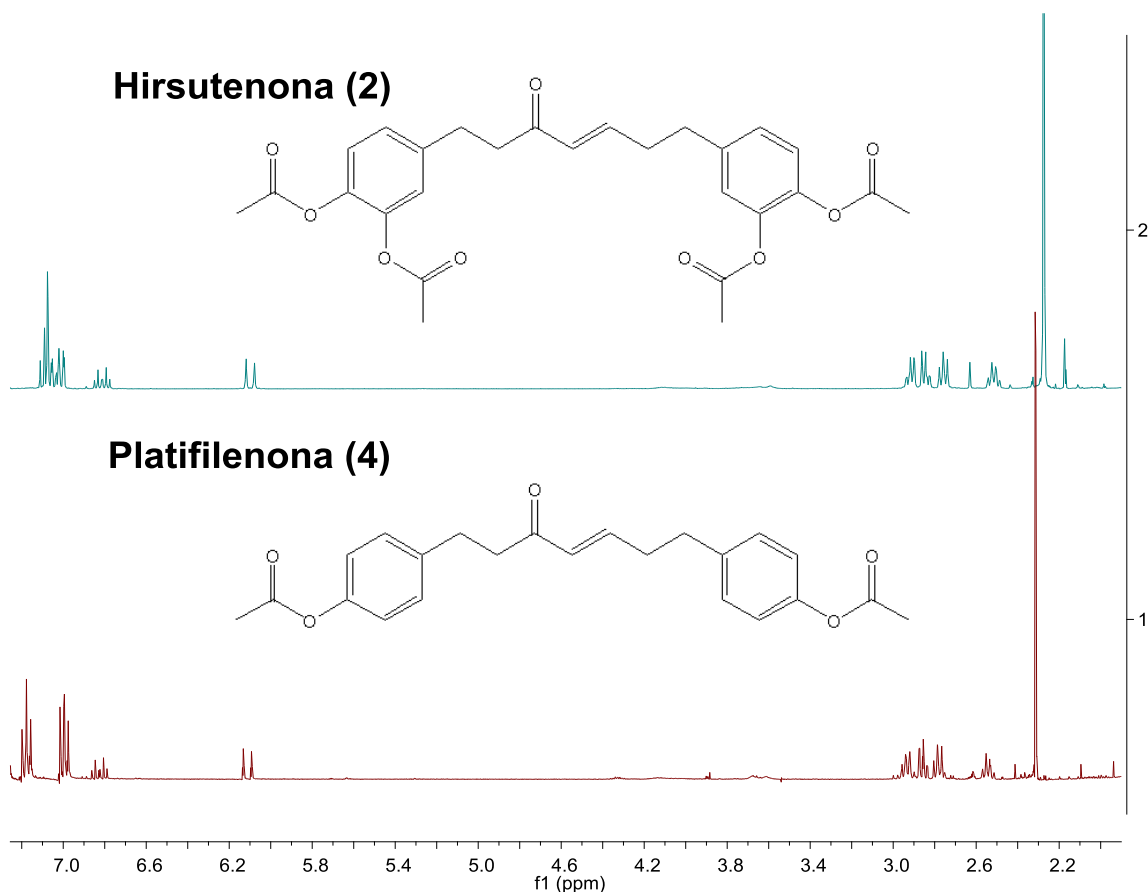


Figura 27. Compuestos 2 y 4.



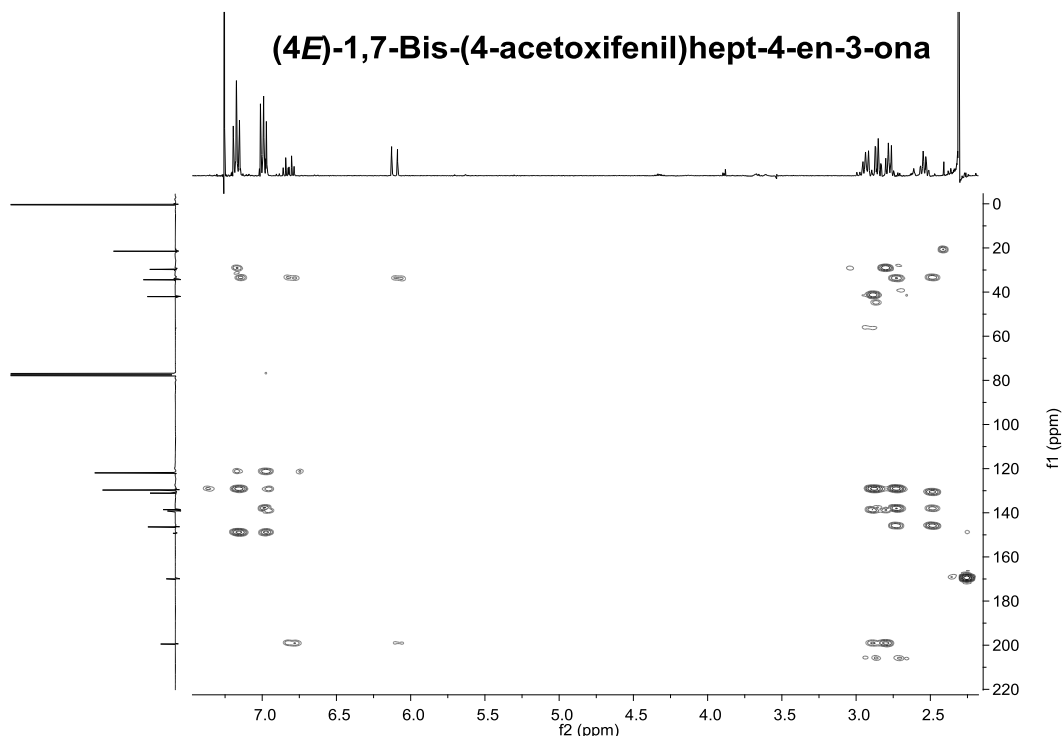


Figura 28. Espectro de HMBC del compuesto **4**.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 30), se observaron dieciocho señales correspondientes a: siete carbonos de la cadena alifática con un carbono de carbonilo ( $\delta = 199.48$ , C-3), dos carbonos bencílicos ( $\delta = 29.73$  y  $34.14$ , C-1 y C-7), un carbono alfa a carbonilo ( $\delta = 42.04$ , C-2) un carbono alfa a un grupo vinilo ( $\delta = 34.40$ , C-6) y dos carbonos de doble ligadura ( $\delta = 131.10$  y  $146.40$ , C-4 y C-5); diez señales con distinto desplazamiento en la zona de carbonos aromáticos ( $\delta = 121.85$  a  $149.42$ ) y además se observaron las señales de carbono correspondientes a los grupos metilo y carbonilo de los acetilos que sustituyen a los anillos aromáticos ( $\delta = 21.49$ ,  $\text{CH}_3$ 's,  $169.93$  y  $169.98$ ,  $\text{C}=\text{O}$ 's). Sus correlaciones con hidrógenos fueron comprobadas por experimentos HSQC (Figura 31). En la figura siguiente se muestra la estructura del compuesto **4**.

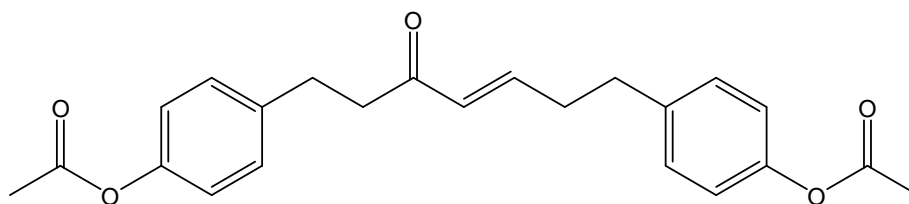


Figura 29. Estructura del compuesto **4**.

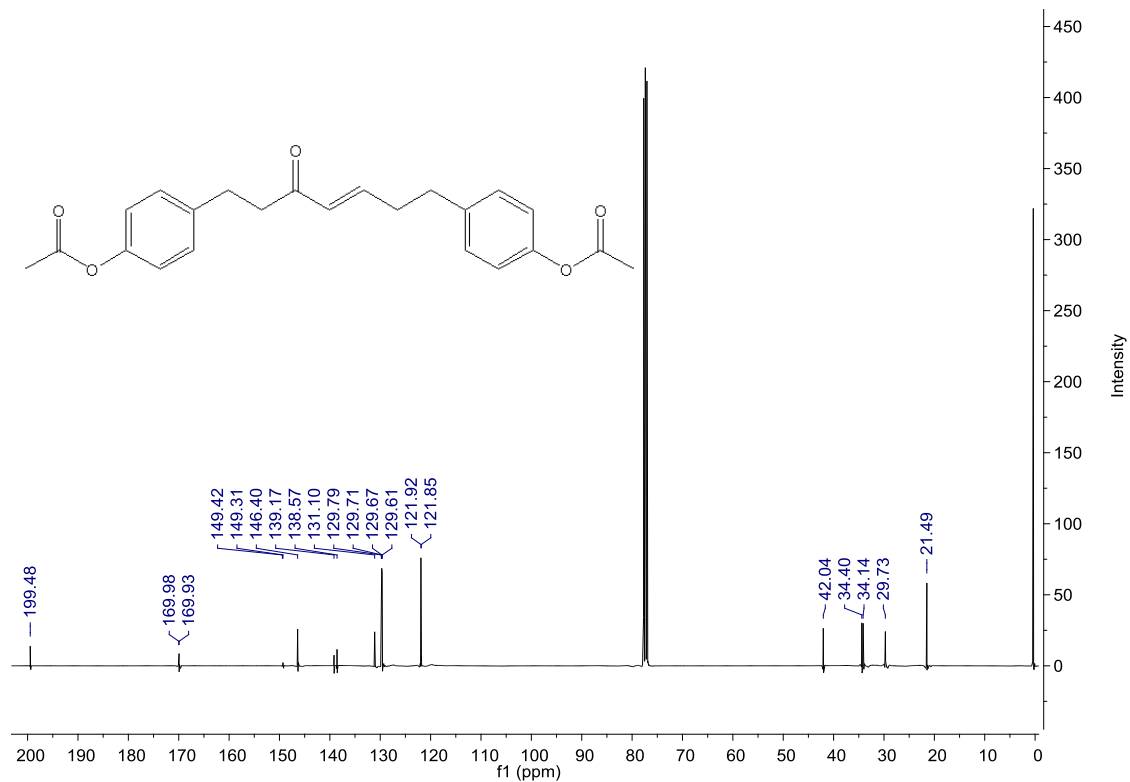


Figura 30. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto 4

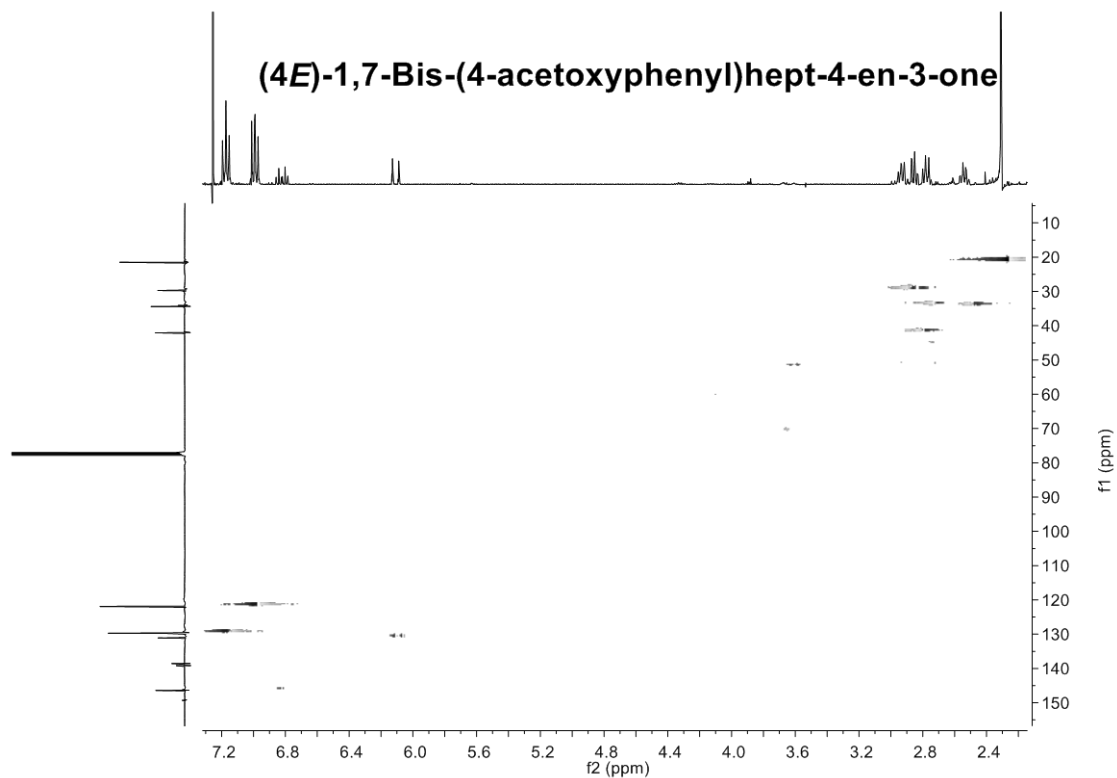


Figura 31. Espectro HSQC del compuesto 4.

### 5.2.2.3b Identificación de 3,4',4''-tri-*O*-acetil-centrolobol (5)

El compuesto de menor polaridad en la mezcla de acetilación en el análisis por espectrometría de masas (Figura 33) mostró un peso molecular de 366 (M-60), correspondiente a una fórmula molecular de  $C_{23}O_4H_{26}$  con IDH = 11 que correspondió a la siguiente molécula, por la pérdida de  $CH_3COOH$ .

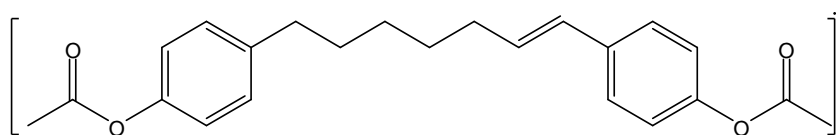


Figura 32. Estructura del ion molecular de 5.

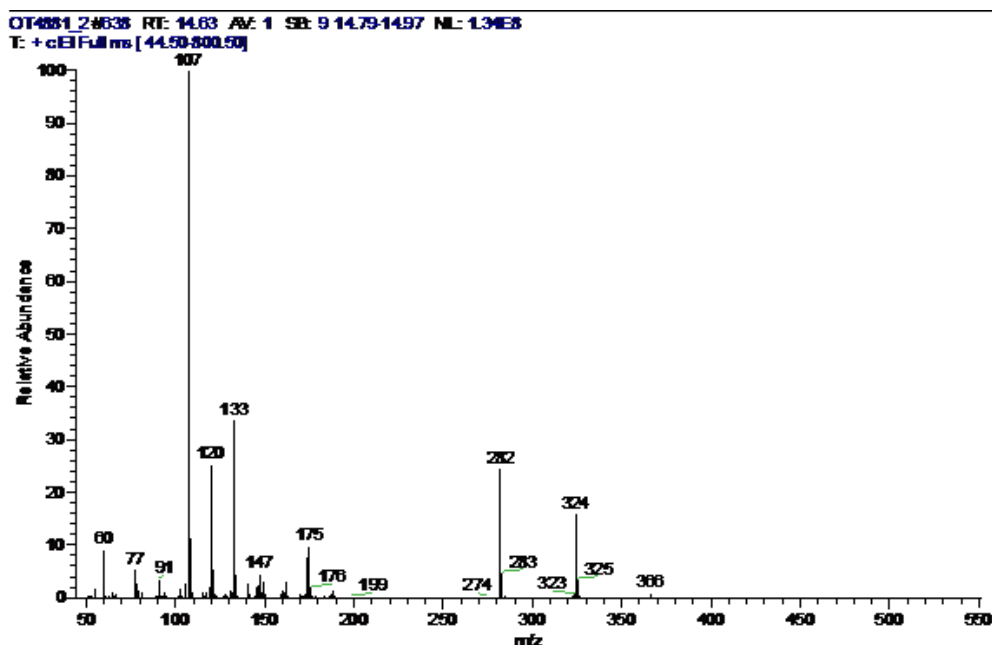


Figura 33. Espectro de masas del compuesto 5

Mediante el análisis por RMN fue posible determinar la estructura de (5) ya que mostró similitudes espectroscópicas con el compuesto 4. Se observaron dos pares de señales dobles que integraron cada una para cuatro hidrógenos ( $\delta$  7.17 y 6.99) que correspondieron a hidrógenos aromáticos en un sistema  $A_2B_2$  lo que indicó que los anillos unidos a la cadena alifática se encontraban disustituidos en posición *para*. En la zona de hidrógenos alifáticos se observaron señales correspondientes a metilenos y metilos, teniendo a los metilos de los acetilos como dos singletes con distinto desplazamiento ( $\delta$  2.02 y 2.29, 3H y 6H).

Los hidrógenos de la cadena alifática se asignaron de acuerdo a las correlaciones observadas en el experimento COSY (Figura 34), como sigue: se observaron cuatro multipletes, uno de ellos centrado en  $\delta$  1.60, que correspondió a H-1 y H-7, (4H) para los metilenos bencílicos; en  $\delta$  1.84 se encontró un hidrógeno alfa a un carbono base de oxígeno (H-2, 2H), la señal desplazada a campo más alto ( $\delta$  1.34, 2H) correspondió al hidrógeno cinco, el último multiplete se asignó a los hidrógenos dos y seis ( $\delta$  2.60, 4H) y finalmente el quinteto observado en  $\delta$  4.93 (1H, J 6 Hz) se asignó al metino en posición tres.

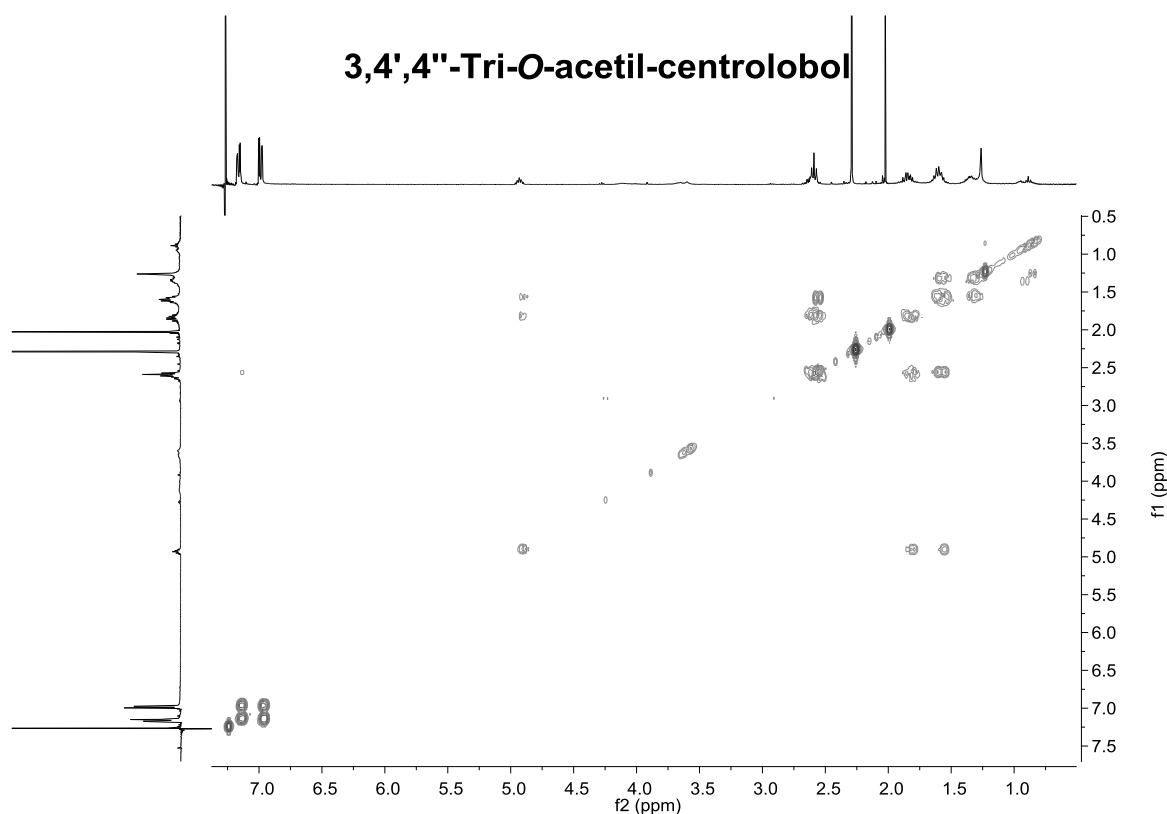


Figura 34. Espectro COSY del compuesto 5.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 35) se observaron veinte señales, que fueron asignadas de acuerdo a las correlaciones observadas en los experimentos HSQC y HMBC (Figuras 36 y 37) a los carbonos de la cadena alifática, corroborando dos carbonos bencílicos ( $\delta$  31.63 y 34.45, C-1 y C-7), un carbono base de oxígeno ( $\delta$  74.16, C-3 ) dos carbonos alfa al carbono base de oxígeno ( $\delta$

35.6 y 36.23, C-4 y C-2) y dos carbonos de metileno ( $\delta$  25.27 y 31.68, C-5 y C-6), así como a los carbonos aromáticos, contando estos últimos ocho señales, algunas superpuestas ( $\delta$  = 121.72 a 149.29) y además se observaron las señales de carbono correspondientes a los grupos metilo y carbonilo de los acetilos unidos a los anillos aromáticos y al carbono en la posición tres de la cadena heptanoide ( $\delta$  = 21.49 y 21.67 CH<sub>3</sub>, 170.09, 170.11 y 171.37, C=O).

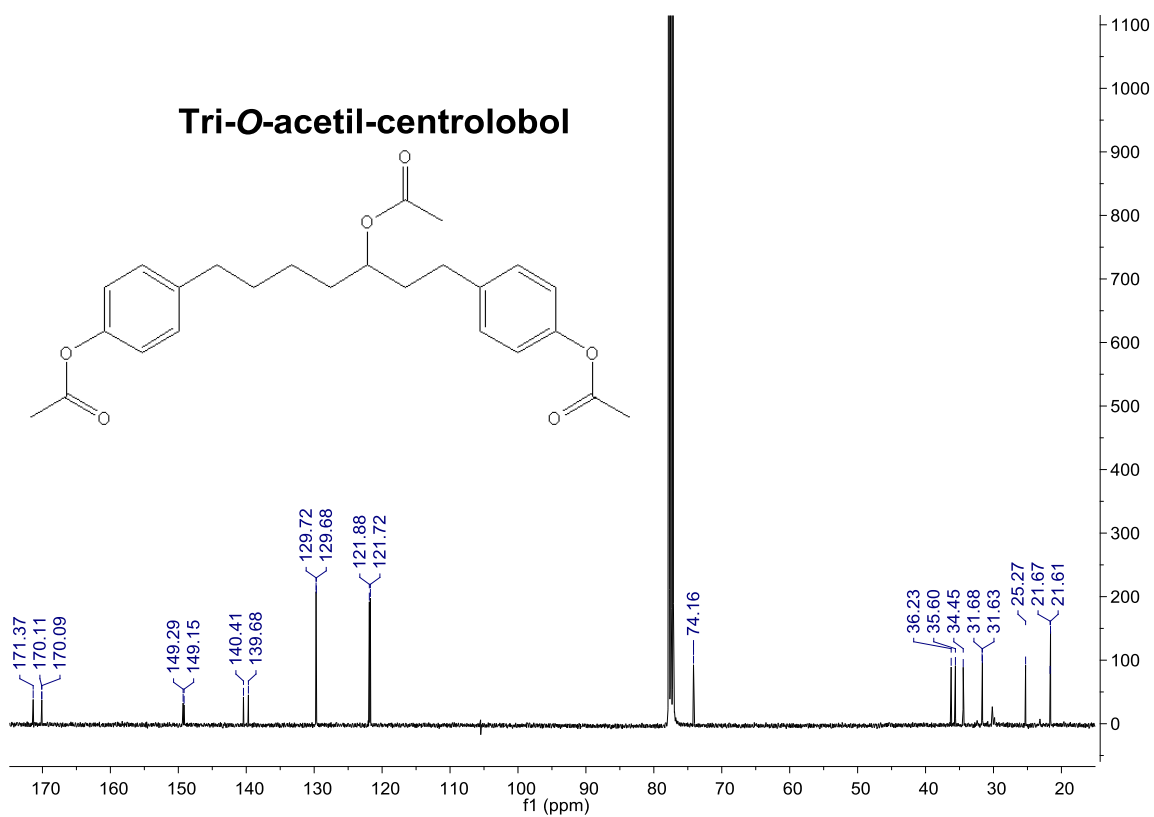


Figura 35. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C del compuesto 5.

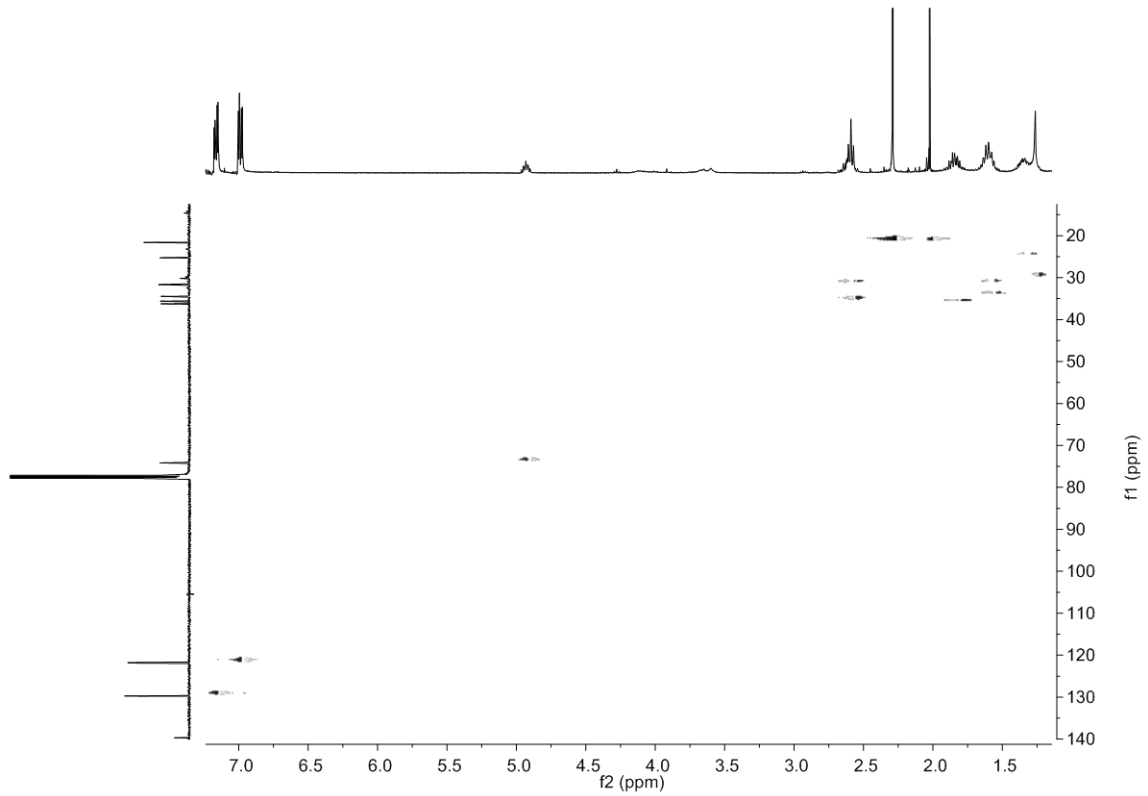


Figura 36. Espectro HSQC del compuesto **5**.

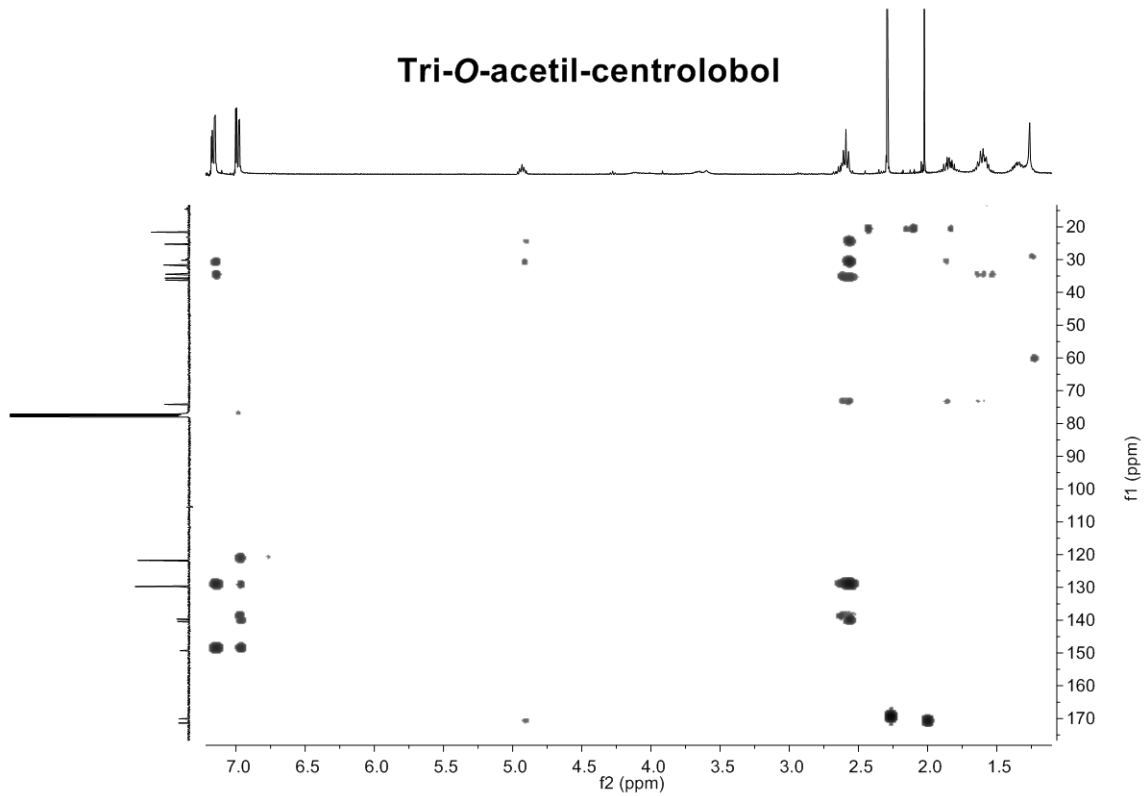


Figura 37. Espectro HMBC del compuesto **5**.

En la Figura 38 se muestra la estructura del compuesto **5**.

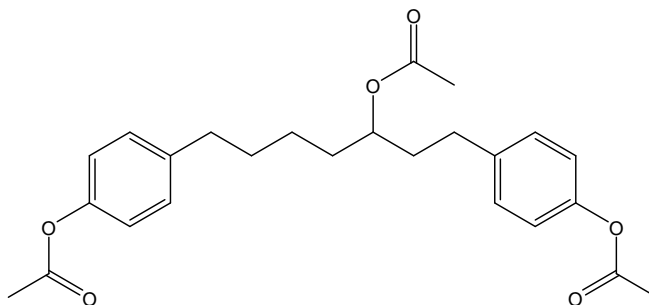


Figura 38. Estructura del compuesto **5** 3,4',4''-tri-O-acetil-centrololol (**5**).

Cabe mencionar que a la fecha es la primera ocasión en la que el centrololol es aislado del género *Alnus*; existen reportes de su presencia en *Centrolobium robustum* (Leguminosae), *Acer nikoense* Maxim (Aceraceae) y en *Betula platyphylla* var *japonica* (Betulaceae) (Nagai, et al., 1986; Inoue, et al., 1987; Akihisa, et al., 2006)

### 5.3. Análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia

Para determinar cuál de las señales observadas en el cromatograma de líquidos (Figura 39) representaba a los distintos compuestos aislados, (en su forma natural; **1**, **2** y **3**), del extracto *n*-butanólico de la corteza de *Alnus acuminata*, se inyectaron 10  $\mu$ L de una solución de 1 mg/mL de cada uno por separado, observándose que los compuestos **1** y **3** tuvieron el mismo TR (~10 min), como se observa en las Figuras 40 y 41, mientras que el compuesto **2** no fue detectado.

Tabla 5. Condiciones empleadas para cada muestra

|                  |  |
|------------------|--|
| COLUMNA          | SYMMETRY C18 250 X 4.6<br>MM                 |
| Longitud de onda | 254 nm                                       |
| Fase móvil       | Ácido acético al<br>0.1%:Acetonitrilo, 85:15 |

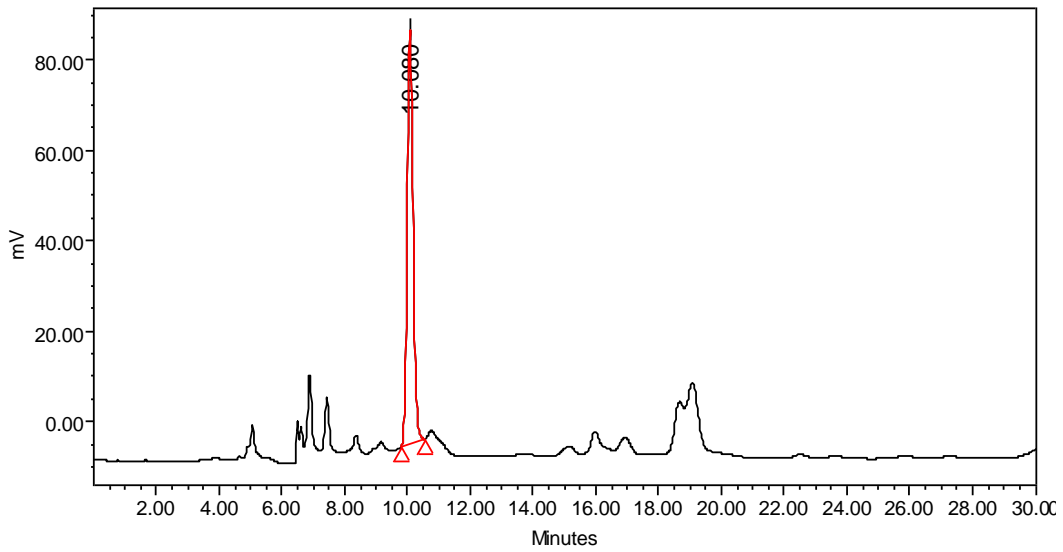


Figura 39. Cromatograma del extracto n-butanólico

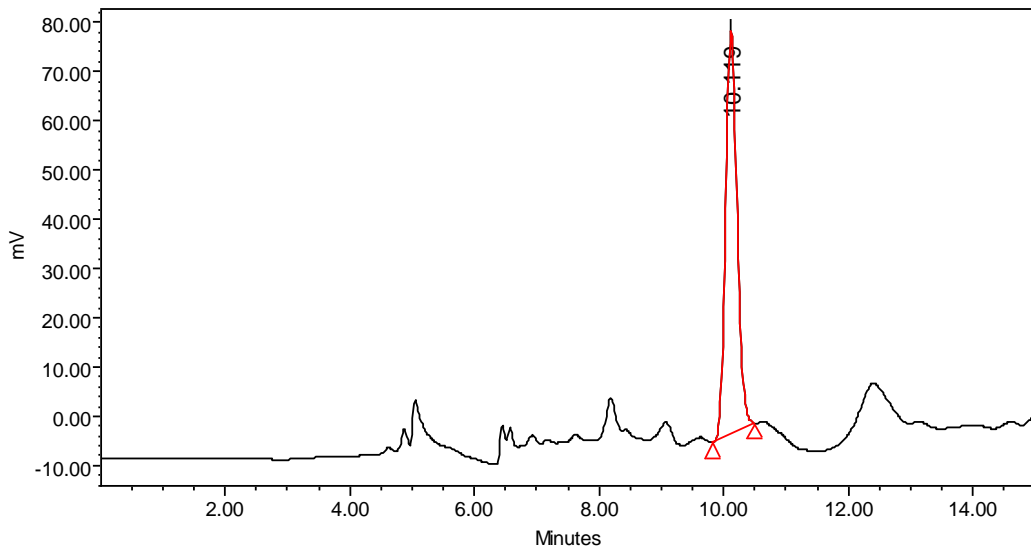


Figura 40. Cromatograma de oregonina (1)



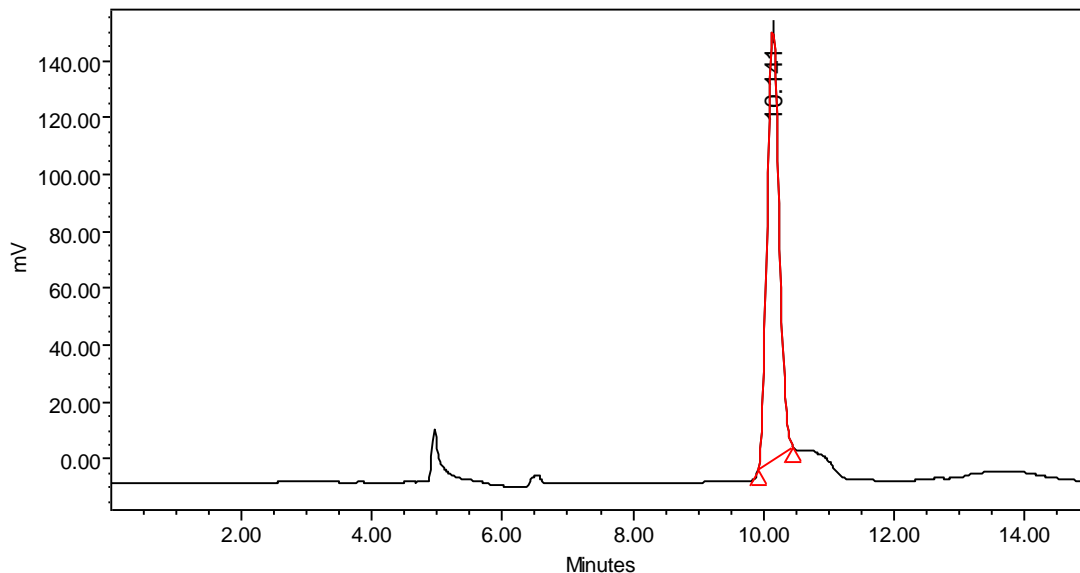


Figura 41. Cromatograma de Hirsutanonol (3)

Un glicósido y su aglicona no tienen el mismo TR, lo que nos lleva a pensar que el compuesto **1** (oregonina) se hidroliza a su aglicona, hirsutanonol (**2**) en las condiciones cromatográficas del método desarrollado.

La hidrólisis que ocurre en medio ácido de la oregonina (**1**) para dar el compuesto (**3**) (hirsutanonol) se comprobó al coeluir el extracto *n*-butanólico en las mismas condiciones cromatográficas, con las muestras de referencia correspondientes a (**1**) y (**3**) obtenidas en este trabajo (Figura tal, Cromatograma).

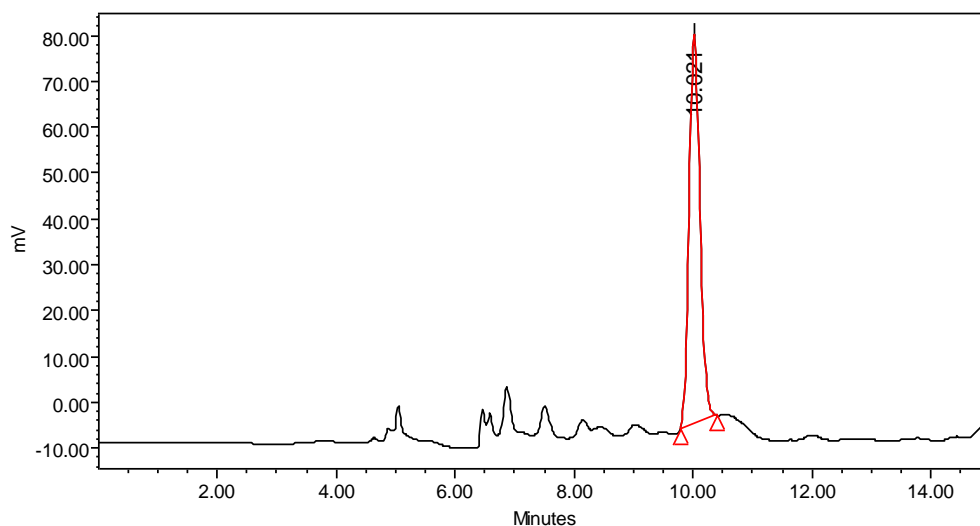


Figura42. Cromatograma de oregonina (1) + extracto (1 mg/mL)

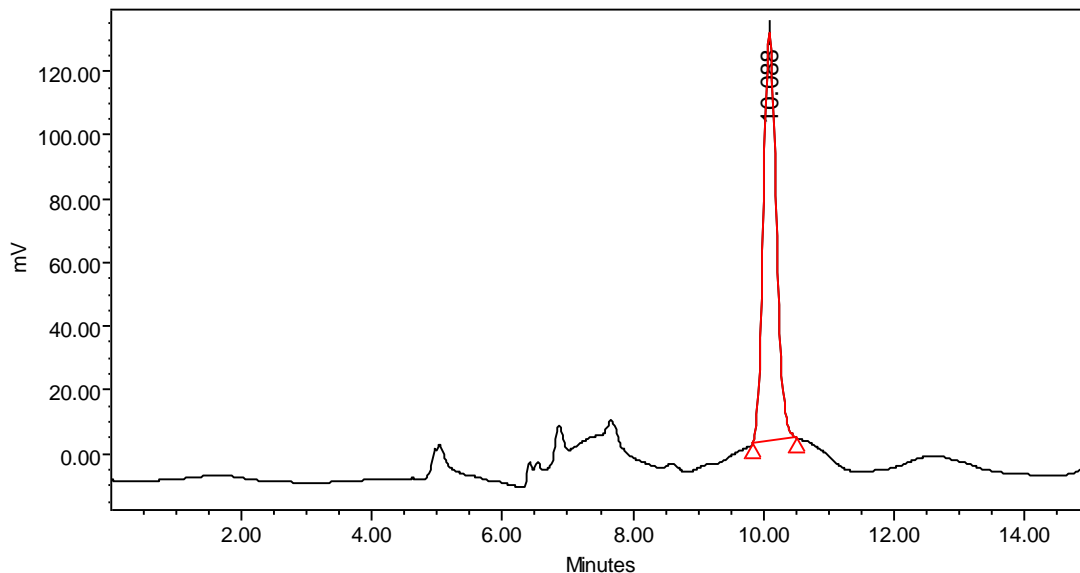


Figura 43. Cromatograma de Hirsutanonol (3) + extracto (1 mg/mL)

En todas las inyecciones se tuvieron TR similares, observándose un aumento en la intensidad del pico y del área, por la coelución con el extracto, en el caso del **3** (hirsutanonol), además de que éste fue el que mayor área e intensidad de pico presentó. Caso contrario con el glicósido (**1**, oregonina) ya que fue el que menor área e intensidad de pico tuvo y al coeluir el extracto con este compuesto, no se observó un aumento en el área.

| Nombre       | TR     | Área    |
|--------------|--------|---------|
| Extracto     | 10.080 | 1208519 |
| glicósido    | 10.119 | 1045896 |
| hirsutanonol | 10.141 | 1959533 |
| Extracto + G | 10.021 | 1075754 |
| Extracto + H | 10.088 | 1761967 |

Tabla 6. Parámetros cromatográficos (TR y ABC)

Esto se podría deber a que lo que estuviéramos detectando fuera el compuesto **3**, al hidrolizarse el compuesto **1** y perder la unidad de pentosa, se detectó una cantidad menor a 1 mg/mL del compuesto **3**, observándose un pico menor con menor área.

Para comprobar la hipótesis anterior, el extracto n-butanólico se sometió a hidrólisis ácida y se inyectó una muestra al cromatógrafo de líquidos (Figura X); la

misma cantidad de muestra del extracto sin hidrolizar se inyectó en las mismas condiciones cromatográficas (figura Y)

Condiciones: 9:1 Ác. Acético 0.05%:CH<sub>3</sub>CN, Flujo 0.6 mL/min

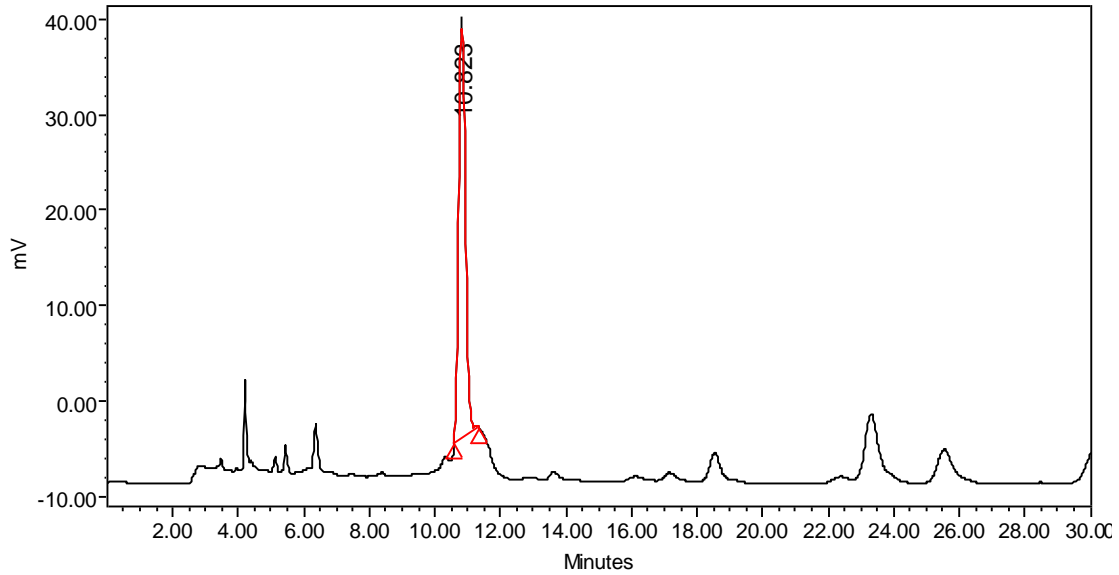


Figura 44. Cromatograma del extracto sin hidrolizar

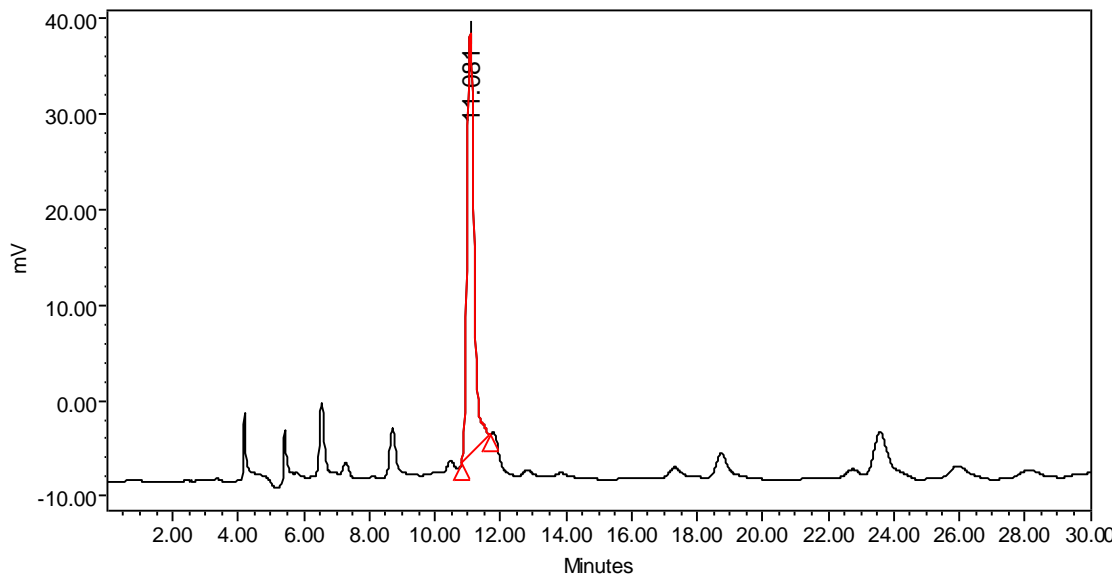


Figura 45. Cromatograma del extracto hidrolizado

Cuadro 7. Parámetros cromatográficos del extracto

| Nombre                                    | TR     | Área   |
|---|--------|--------|
| Extracto                                  | 10.823 | 634300 |
| Extracto<br>H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> | 11.081 | 660364 |

En ambos cromatogramas se observa el mismo compuesto mayoritario, con área bajo la curva similar y TR también, lo que indica que el extracto sufre una hidrólisis ácida al eluir en las condiciones del método desarrollado.

#### 5.4 Determinación de actividad antimicrobiana contra bacterias cariogénicas

En el ensayo biológico de actividad antimicrobiana, se empleó *Streptococcus mutans* como bacteria cariogénica. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 8. Resultados del ensayo biológico

| EXTRACTO O<br>COMPUESTO | CMI (mg/mL) |
|-------------------------|-------------|
| Total                   | >1000       |
| Clorofórmico            | >1000       |
| <i>n</i> -butanólico    | >1000       |
| <b>1</b>                | 625         |
| <b>1</b> (acetilado)    | >1000       |
| <b>2</b>                | 275         |
| <b>3</b>                | >1000       |
| <b>2</b> (acetilado)    | 187         |

En el cuadro anterior se observa que aunque los extractos fueron inactivos, los compuestos **1**, **2**, y el derivado acetilado del compuesto **2**, presentan actividad significativa, perdiendo actividad por acetilación, el compuesto **1**.

### 6. CONCLUSIONES

Del extracto de la corteza medicinal de *Alnus acuminata arguta*, se aislaron cinco metabolitos secundarios de naturaleza diarilheptanoide cuyas estructuras fueron identificadas por métodos químicos, espectroscópicos, espectrométricos y algunos por formación de derivados acetilados.

Los compuestos aislados en este trabajo fueron:

1. Oregonina
2. Hirsutenona
3. Hirsutanonol
4. Platifilenona
5. Centrolobol

De acuerdo a los antecedentes reportados en la literatura para los diarilheptanoides aislados en este trabajo, estos son los responsables de la actividad antiinflamatoria de *Alnus acuminata*, lo que justifica el uso tradicional como antiinflamatorio de esta especie vegetal.

Este trabajo constituye el primer informe de la presencia de centrolobol en especies de *Alnus*.

Se comprobó la actividad antimicrobiana sobre *S. mutans* por parte de la hirsutenona (2) lo que podría explicar el uso de la planta para el tratamientos de sangrado de encías.

De acuerdo a los rendimientos obtenidos, la oregonina (1) constituye el metabolito secundario mayoritario en el extracto *n*-butanólico.

El método de cromatografía de líquidos de alta eficiencia desarrollado no es adecuado para la cuantificación de oregonina (1), ya que de acuerdo a los resultados, ésta en el medio de elución ácido se hidroliza a hirsutanonol (3).

**BIBLIOGRAFÍA**

Aguilar, MI., Roveló, R., Verjan, JG., Illescas, O., Baeza, AE., De La Fuente, M., Ávila, I. y Navarrete, A. Anti-inflammatory activities triterpenoids and diarylheptanoids of *Alnus acuminata* ssp. *arguta*, *Pharmaceutical Biology*, **49**, 1052-1057 (2011)

Ainsworth, EA y Gillespie, KM, Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, **2**, 875-877 (2007).

Akihisa, T., Taguchi, Y., Yasukawa, K., Tokuda, H., Akazawa, H., Suzuki, T. y Kimura, Y. Acerogenin M, a cyclic diarylheptanoid, and other phenolic compounds from *Acer nikoense* and their anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **54**, 735-739 (2006).

Aragão Craveiro, A., Costa Prado, AD., Gottlieb, OR. y Welerson de Albuquerque, PC. Diarylheptanoids of *Centrolobium* species, *Phytochemistry*, **9**, 1869-1875 (1970).

Bianchi, KS., Wiedhopf, R. y Cole, JR. Antitumor agents from *Alnus oregona*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **62**, 139-140 (1973).

Chen, J., González-Laredo, RF., y Karchesy, JJ. Minor diarylheptanoid glycosides of *Alnus rubra* bark. *Phytochemistry*, **53**, 971-973 (2000).

De la Cruz, M. Libellus de Medicinalibus Indorum Herbus, *Fondo de Cultura Económica-Instituto Mexicano del Seguro Social 1991*, página 140 (1962).

Demirci, B. y Can-Baser, H. Betulenols from *Betula* species, *Planta Medica*, **66**, 490-493 (2000).

Duke, AJ. HandBook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants, *Boca Raton, Florida USA, CRC Press.*, 123-456 (1992).

Egil Malterud, K. y Anthonsen, T. 13-oxomyricanol, a new [7.0]-metacyclophane from *Myrica nagi*, *Phytochemistry*, **19**, 705-707 (1980).

Evans, T. Farmacognosia, *Interamericana-McGraw Hill*, Barcelona, España, 145-148 (1985).

Font Quer, P. Plantas medicinales, *Labor*. Barcelona, página 97 (1962).

Formulación farmacéutica herbolaria a base de extractos de *Phytolacca americana*, *Alnus acuminata* y alquitrán de hulla, para el tratamiento y cura de la psoriasis (PA/a/2004/007567).

Gamboa, F., Herazo, B. y Martínez, MC. Control microbiológico sobre *Streptococcus mutans* y su acción acidogénica, *Revista de la Facultad de Ciencias, Universidad Scientiaru*, **9**, 45-55 (2004).

Harborne, B. Dictionary of Organic Compounds, *Marcel Dekker*, New York, USA, **5**, 276-320 (1985).

Inoue, T., Ishidate, Y., Fujita, M., Kubo, M., Fukushima, M. y Nagai, M. Studies on the constituents of Aceraceae plants. I. Constituents in the leaves and the stem bark of *Acer nikoense* Maxim, *Yakugaku Zasshi*, **98**, 41-46 (1978)

Inoue, T., Kenmochi, N., Furukawa, N., y Fujita, M. Biosynthesis of Acerogenin A, a diarylheptanoid from *Acer nikoense*, *Phytochemistry*, **26**, 1409-1411 (1987).

Ishida, J., Kozuka, M., Tokuda, H., Nishino, H., Nagumo, S., Lee, KH. y Nagai, M. Chemopreventive potential of cyclic diarylheptanoids, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **10**, 3361-3365 (2002).

Jiang, ZH., Tanaka, T., Kirata, H., Fukuoka, R. y Kuono, I. Three diarylheptanoids from *Rhoiptelea chiliantha*, *Phytochemistry*, **43**, 1049-1054 (1996).

Jiang, GL., Tanaka, T., Inutsuka, C. y Kouno, I. Alkaloids, diarylheptanoid and naphthalene carboxylic acid ester from *Rhoiptelea chiliantha*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **49**, 737-740 (2001).

Jin, WY., Kai, XF., Na, M-K., Lee, JJ., y Bae, K-H. Triterpenoids and diarylheptanoids from *Alnus hirsuta* inhibit HIF-1 in AGS cells, *Archives of Pharmaceutical Research*, **30**, 412-418 (2007a).

- Jin, WY., Kai, XF., Na, M-K., Lee, JJ., y Bae, K-H. Diarylheptanoids from *Alnus hirsuta* inhibit the NF- $\kappa$ B activation and NO and TNF- $\alpha$  production, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **30**, 810-813 (2007b).
- Keinänen, M. y Julkunen-Tiitto, R. High-Performance Liquid Chromatographic determination of flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves. *Journal of Chromatography*, **793**, 370-377 (1998).
- Kim, SH., Park, JY., Kim, TB., Lee, HH., Lee, KY., Kim YC. y Sung, SH. Inhibition of antigen-induced degranulation by aryl compounds isolated from the bark of *Betula platiphylla* in RBL-2H3 cells, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **20**, 2824-2827 (2010).
- Kita, T., Imai, S., Sawada, H., Kumagai, H., y Seto H. The biosynthetic pathway of curcuminoid in turmeric (*Curcuma longa*) as revealed by  $^{13}\text{C}$ -labeled precursors, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **72**, 1789-1798 (2008).
- Kuroyanagi, M., Shimomae, M., Nagashima, Y., Muto, N., Okuda, T., Kawahara, N., Nakane, T. y Sano, T. New diarylheptanoid from *Alnus japonica* and their antioxidative activity, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **53**, 1519-1523 (2005).
- Lai, Y-C., Chen, C-K., Lin, W-W. y Lee, S-S. A comprehensive investigation of anti-inflammatory diarylheptanoids from de leaves of *Alnus formosana*, *Phytochemistry*, DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.02.008.
- Lee, K. S., Li, G., Lee, CS., Woo, MH., Lee, SH., Jhang, YD. y Son, JK. Cytotoxic diarylheptanoids from the roots of *Juglans mandshurica*, *Journal of Natural Products*, **65**, 1707-1708 (2002).
- Malterud, KE. y Anthonsen, T. 13-oxomyricanol, a new [7.0]-Metacyclophane from *Myrica nagi*, *Phytochemistry*, **19**, 705-707 (1980).
- Mañez, S., Recio MC. y Ríos JL. Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation, *European Journal of Pharmacology*, **334**, 103-105 (1997).
- Martínez, J. La flora de Veracruz, *El Ateneo*, Xalapa Veracruz, México, **20**, 128-136 (1984).



- Martínez, M. Las Plantas Medicinales de México. Ediciones Botas, México (1989)
- McCutcheon, AR., Ellis, SM., Hancock, REW. y Towers, GHN. Antibiotic screening of medicinal plants of the British Columbian native peoples, *Journal of Ethnopharmacology*, **37**, 213-223 (1992).
- Min, W-L., Jung, H-K., Dong, W-J., Kyoung, H-A., Sang, H-T. y Young, J-S. Inhibition of cyclooxygenase-2 expression by diarylheptanoids from the bark of *Alnus hirsuta* var. *sibirica*, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **23**, 517-518 (2000).
- Mishra, AK., Haribal, MM. y Sabata, BK. Garuganin III, a macrocyclic biphenyl ether from *Garuga pinnata*, *Phytochemistry*, **24**, 2463-2465 (1985).
- Morihara, M., Sakurai, N., Inoue, T., Kawai, K. y Nagai M. Two novel diarylheptanoid glucosides from *Myrica gale* var. *tomentosa* and absolute structure of plane-chiral galeon, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **45**, 820-823, (1997).
- Nagai, M., Kenmochi, N., Fujita, M., Furukawa, N. y Inoue, T. S Studies on the constituents of Aceraceae plants. VI revised stereochemistry of (-) centrolobol, and new glycosides from *Acer nikoense*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **34**, 1056-1060 (1986)
- Nomura, M., Tokoroyama, T. y Kubota, T. Biarylheptanoids and other constituents from wood of *Alnus japonica*, *Phytochemistry*, **20**, 1097-1104 (1981).
- Ohta, S., Aoki, T., Hirata T. y Suga, T. The structures of four diarylheptanoid glycosides from the female flowers of *Alnus serrulatoidea*, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1635-1642 (1984).
- Park, D., Kim, HJ., Jung, SY., Yook, C-S., Jing, C. y Lee y YS. A new diarylheptanoids glycosides from the stem bark of *Alnus hirsuta* and protective effect of diarylheptanoids derivatives in Human HepG2 Cells, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **58**, 238-241 (2010).
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, SJ. y Shahabimajb, N. Antioxidant activity of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, **5**, 1142-1145 (2006).

Ravindranath, V. y Satyanarayana, MN. An unsymmetrical diarylheptanoid from *Curcuma longa*. *Phytochemistry*, **19**, 2031-2032 (1980).

Ritch-Krc, EM., Turner, NJ. y Towers, GHN. Carrier Herbal Medicine: an evaluation of the antimicrobial and anticancer activity in some frequently used remedies, *Journal of Ethnopharmacology*, **52**, 151-156 (1996).

Roughley, PJ., y Whiting, DA. Experiments in the biosynthesis of curcumin. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 2379–2388 (1973).

Santamour, F. y Lundgren, L. Rhododendrin in *Betula*: a reappraisal, *Biochemical Systematics and Ecology*, **25**, 335-341 (1997).

Singleton, VL., Orthofer, R. y Lamuela-Raventós, RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods in Enzymology*, **299**, 152-178 (1999).

Tori, M., Kasushi, H. y Yoshinori, A. Diarylheptanoids, flavonoids, stilbenoids, sesquiterpenoids and phenanthrene from *Alnus maximowiczii*, *Phytochemistry*, **40**, 1263-1264 (1995).

Tung, NH., Kwon, H-J., Kim, J-H., Ra, J-C., Ding, Y., Kim, J-A., y Kim, Y-H. Anti-influenza diarylheptanoids from the bark of *Alnus japonica*, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **20**, 1000-1003 (2010).

Tyler, EV. Farmacognosia, *Librería el Ateneo*, Buenos Aires, Argentina, 406-415 (1979)

**Sitios electrónicos.**

<http://alergomurcia.com/pdf/01BETULA.pdf>

<http://www.arboles.org>

<http://www.conabio.gob.mx>

<http://www.conafor.gob.mx>

<http://herbaria.plants.ox.ac.uk>:

<http://plants.usda.gov>

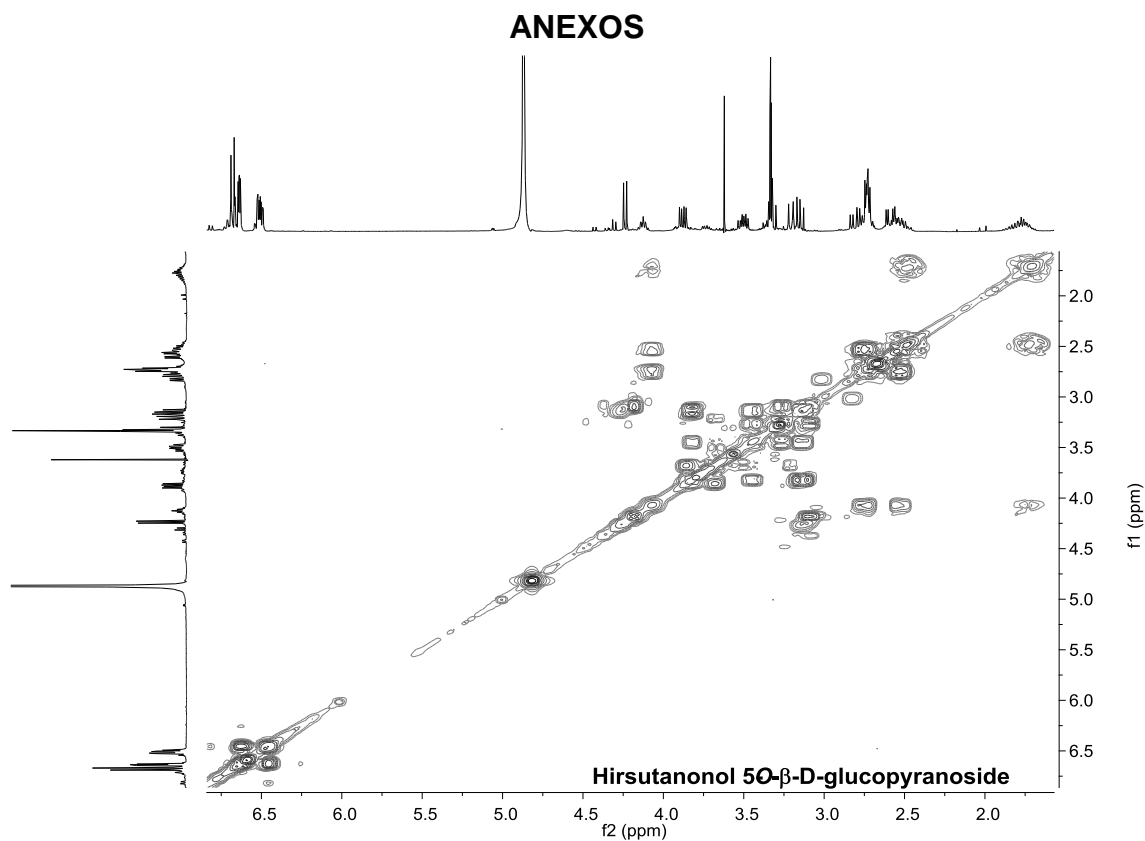
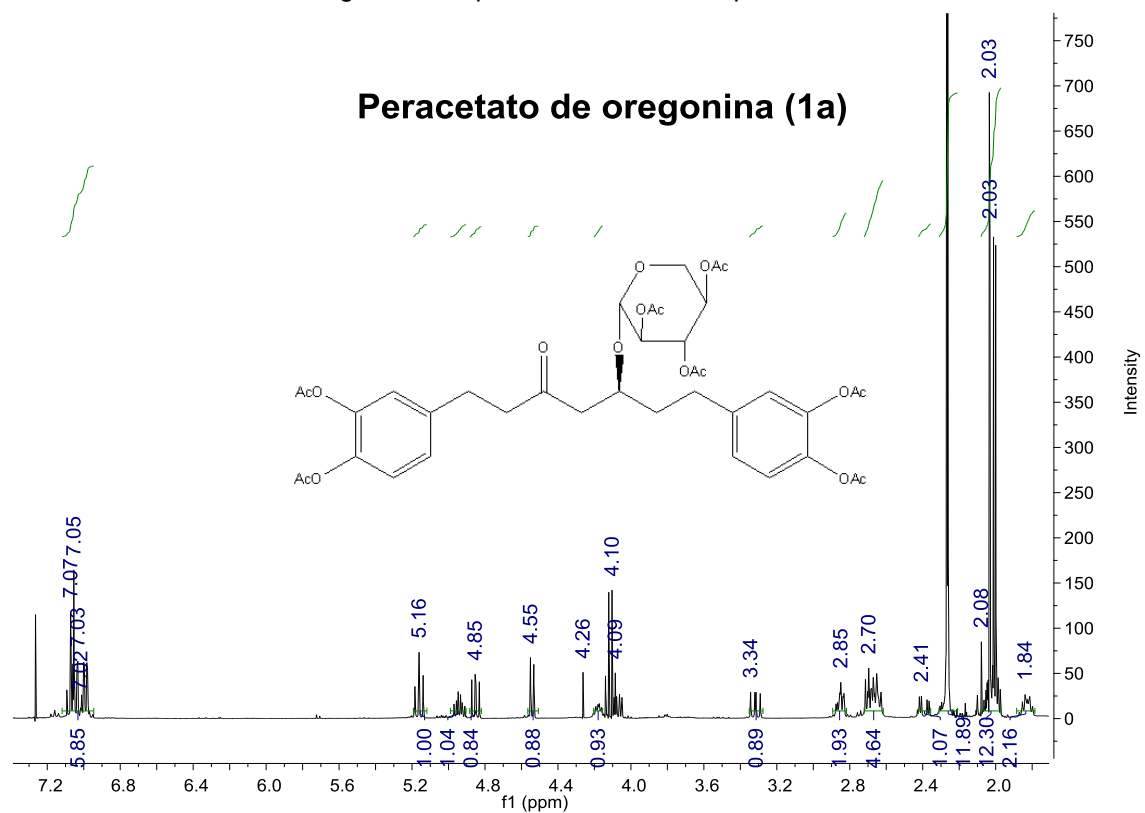


Figura 46. Espectro COSY del compuesto 1

Figura 47. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto 1a.

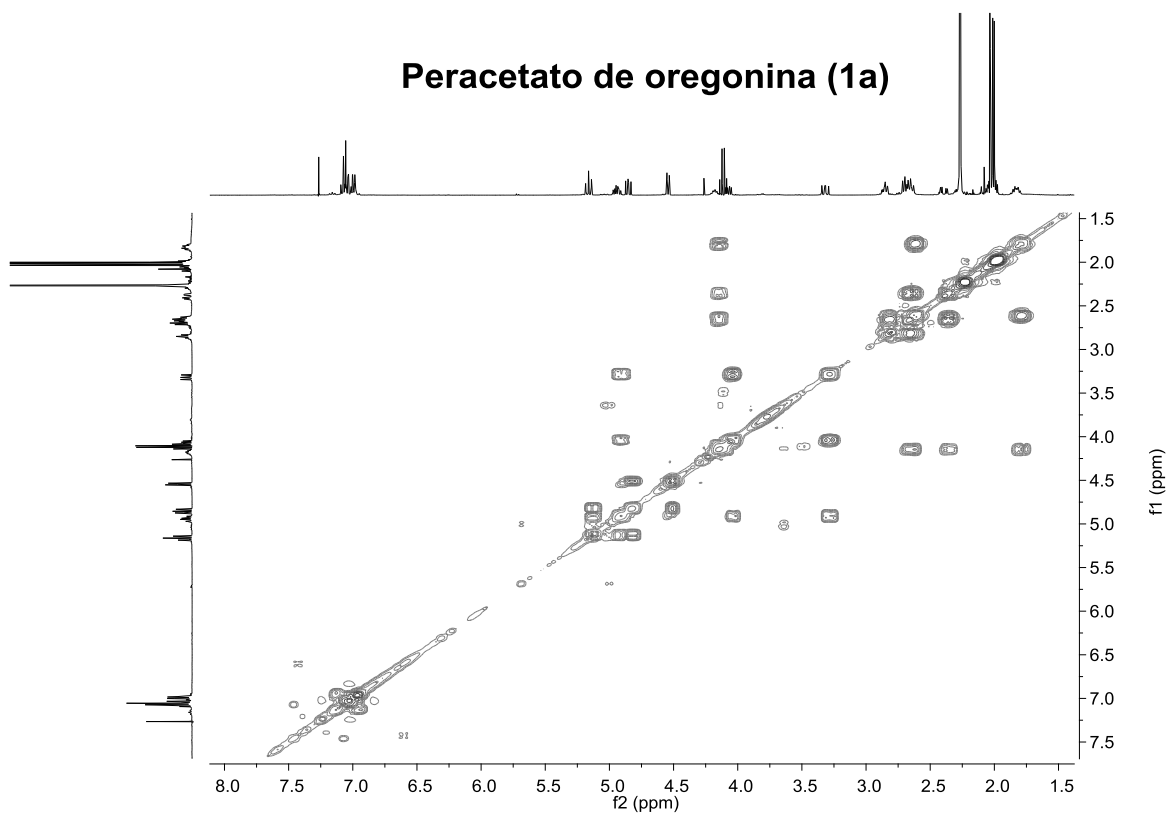


Figura 48. Espectro COSY del compuesto 1a.

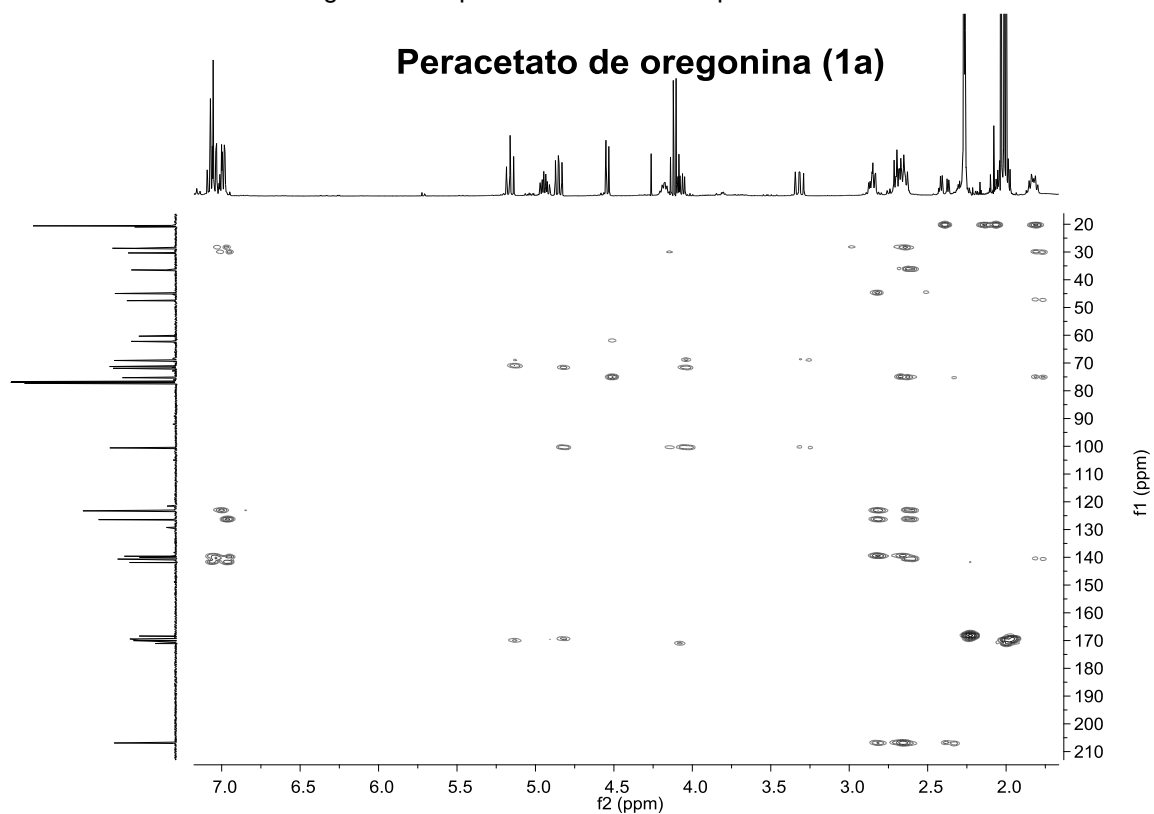


Figura 49. Espectro HMBC del compuesto 1a

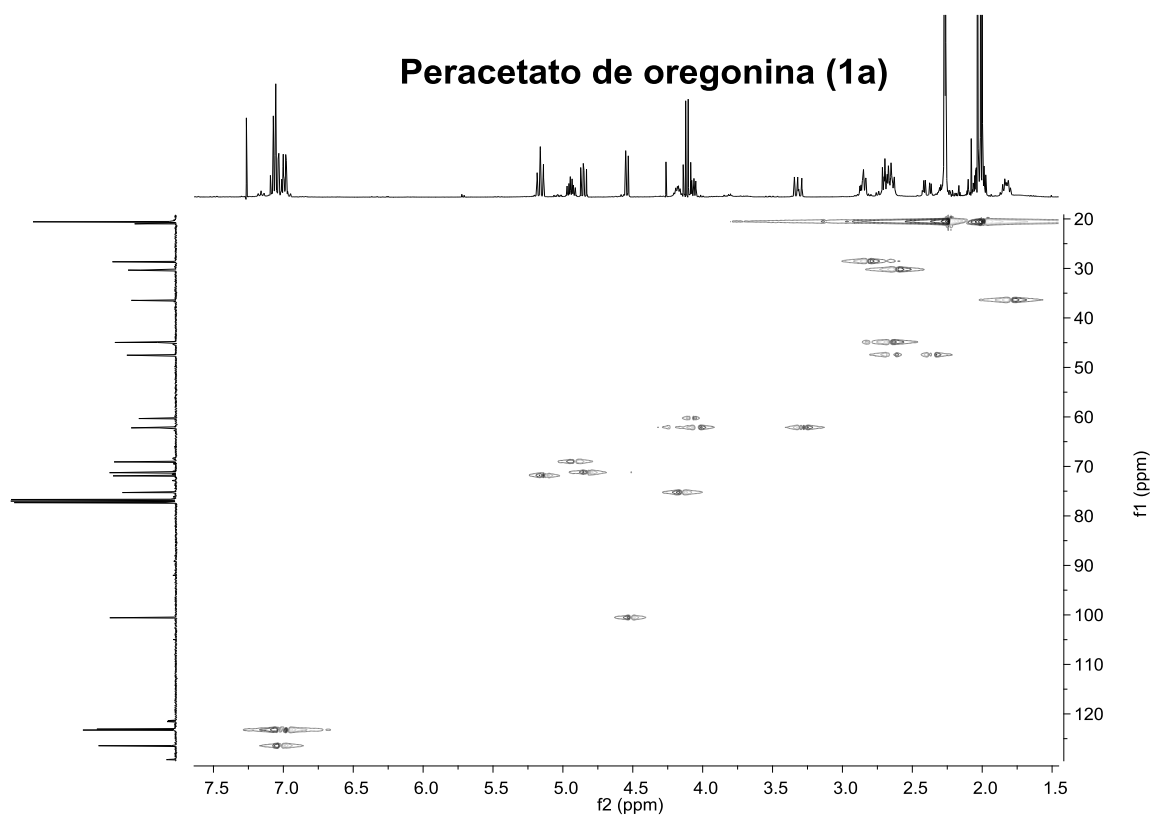


Figura 50. Espectro HSQC del compuesto 1a.

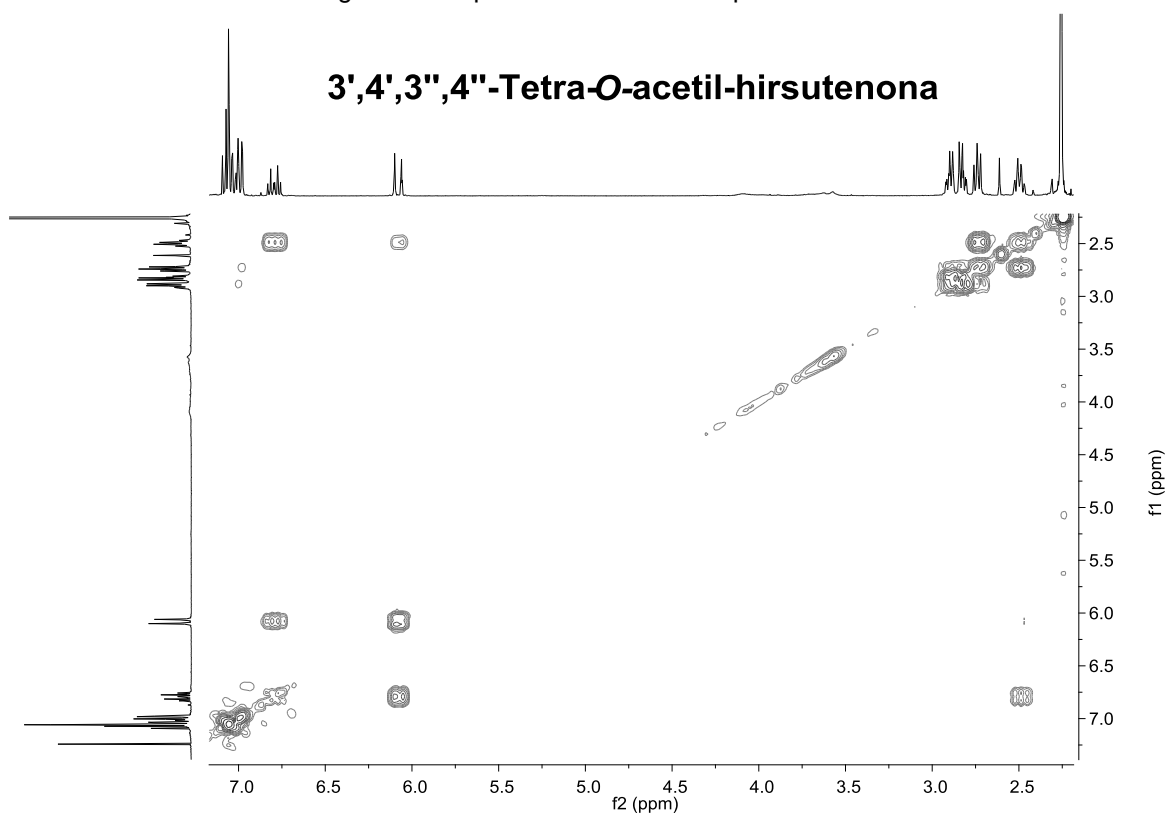


Figura 51. Espectro COSY del compuesto 2

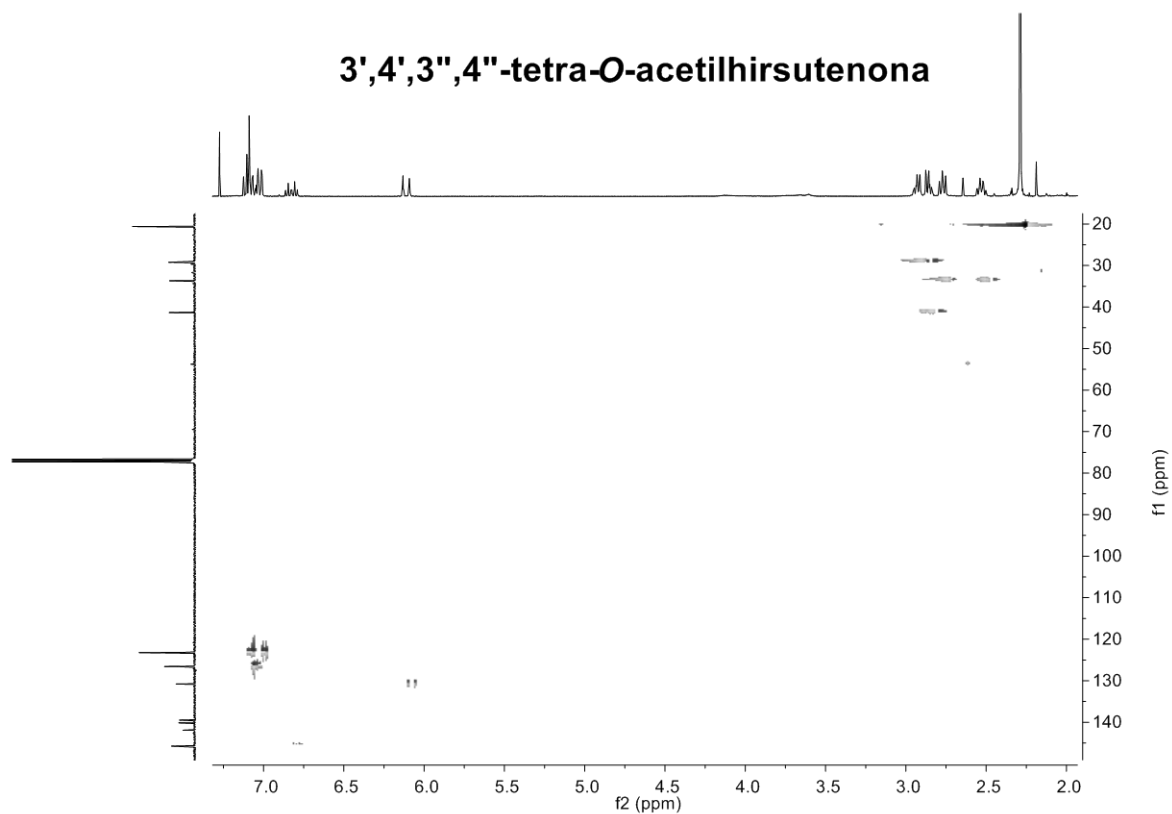
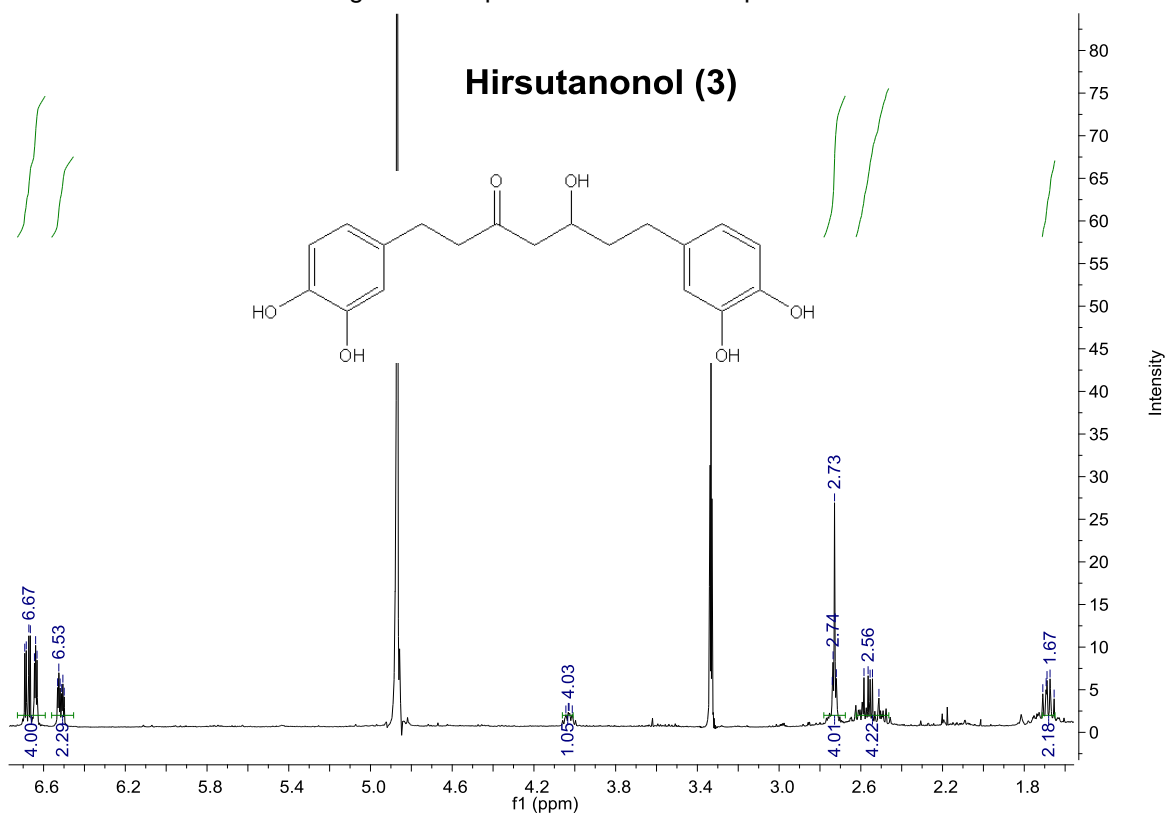
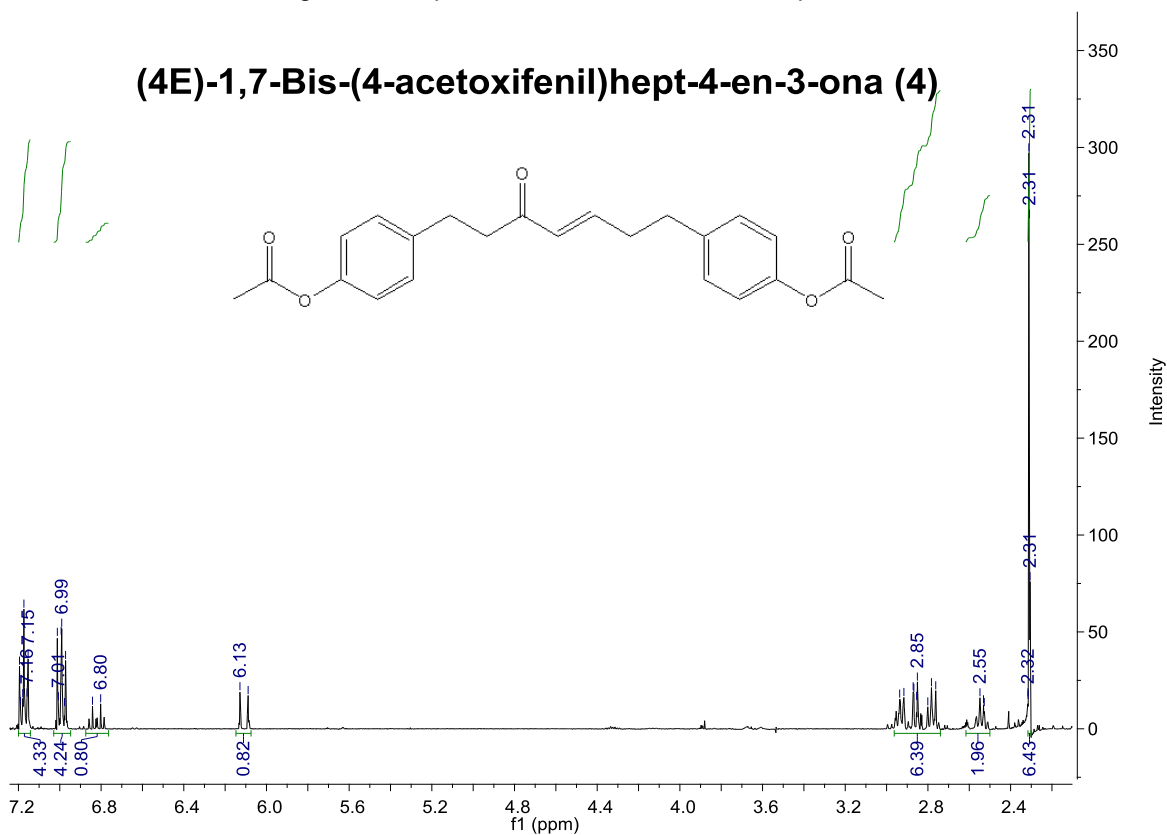
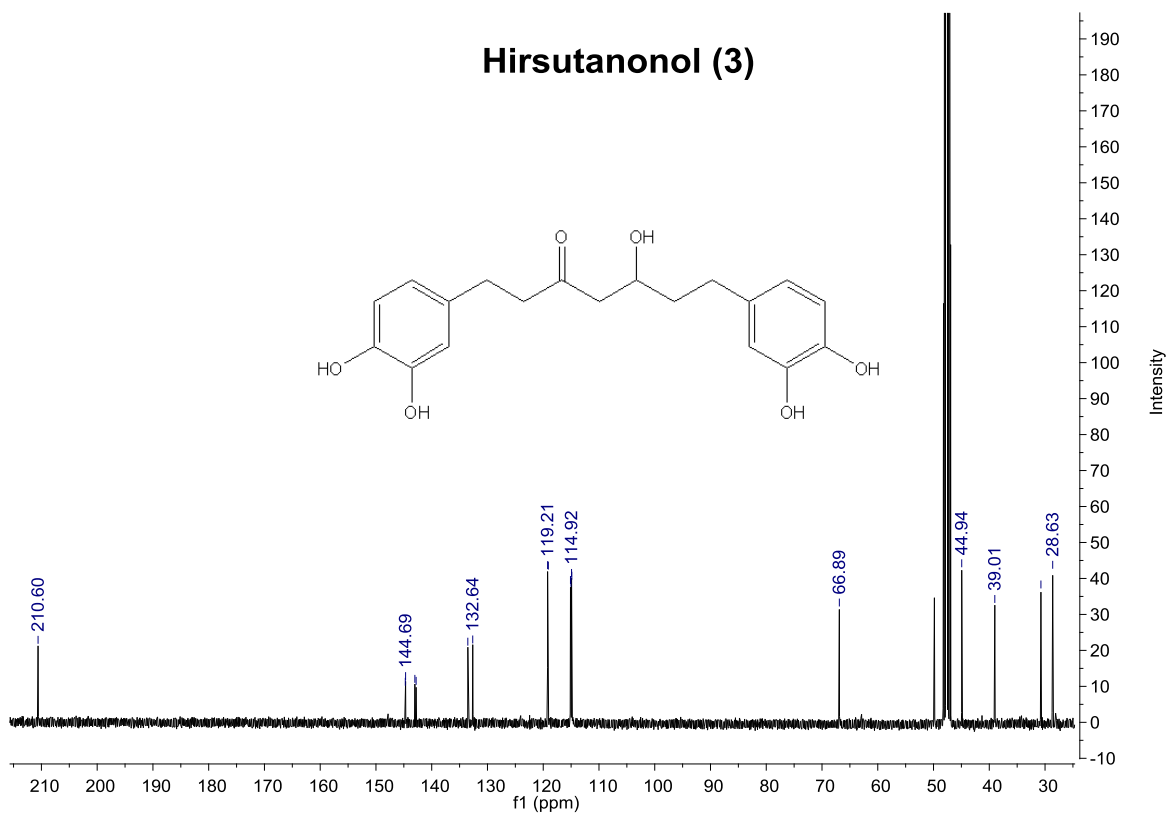


Figura 52. Espectro HSQC del compuesto 2

Figura 53. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto 3.



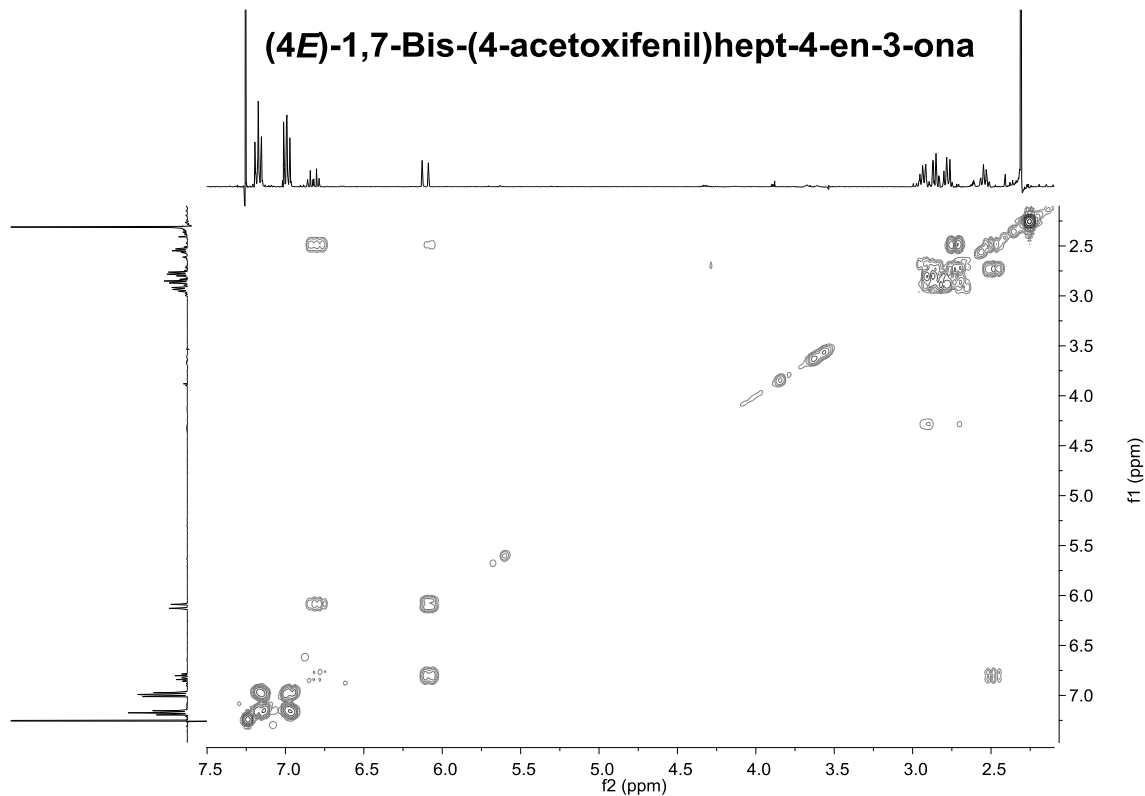
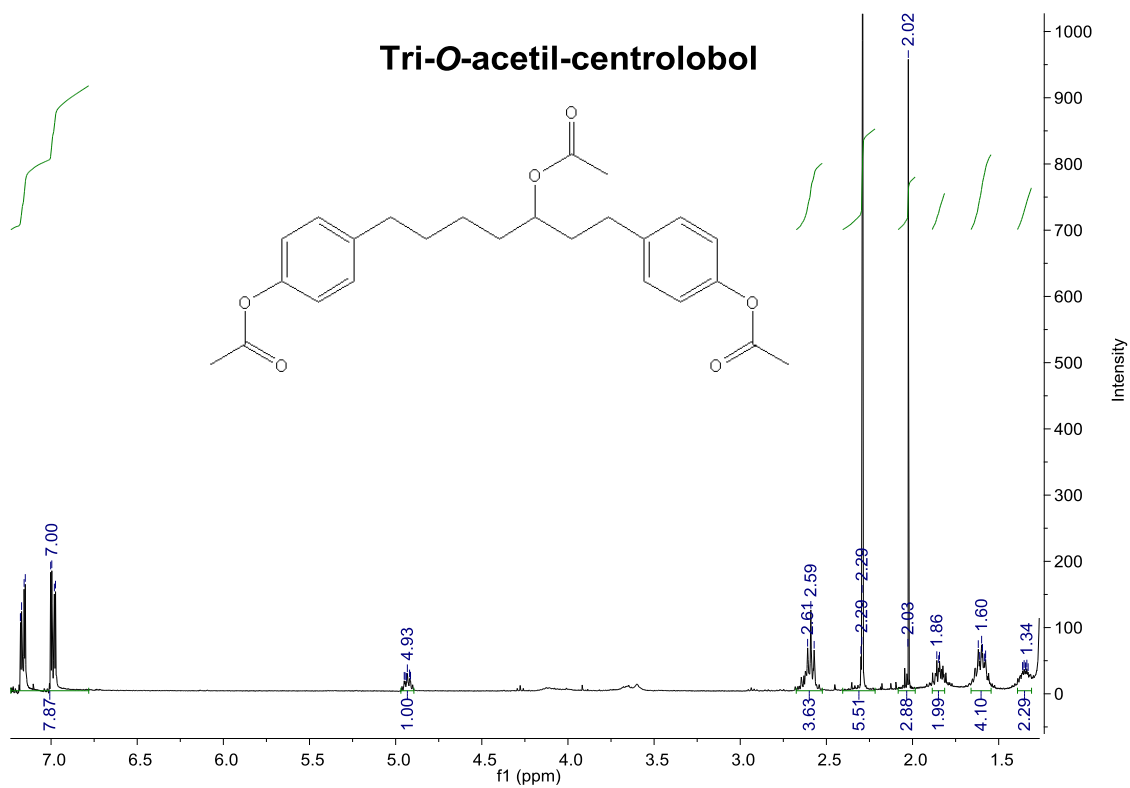


Figura 56. Espectro COSY del compuesto 4

Figura 57. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto 5



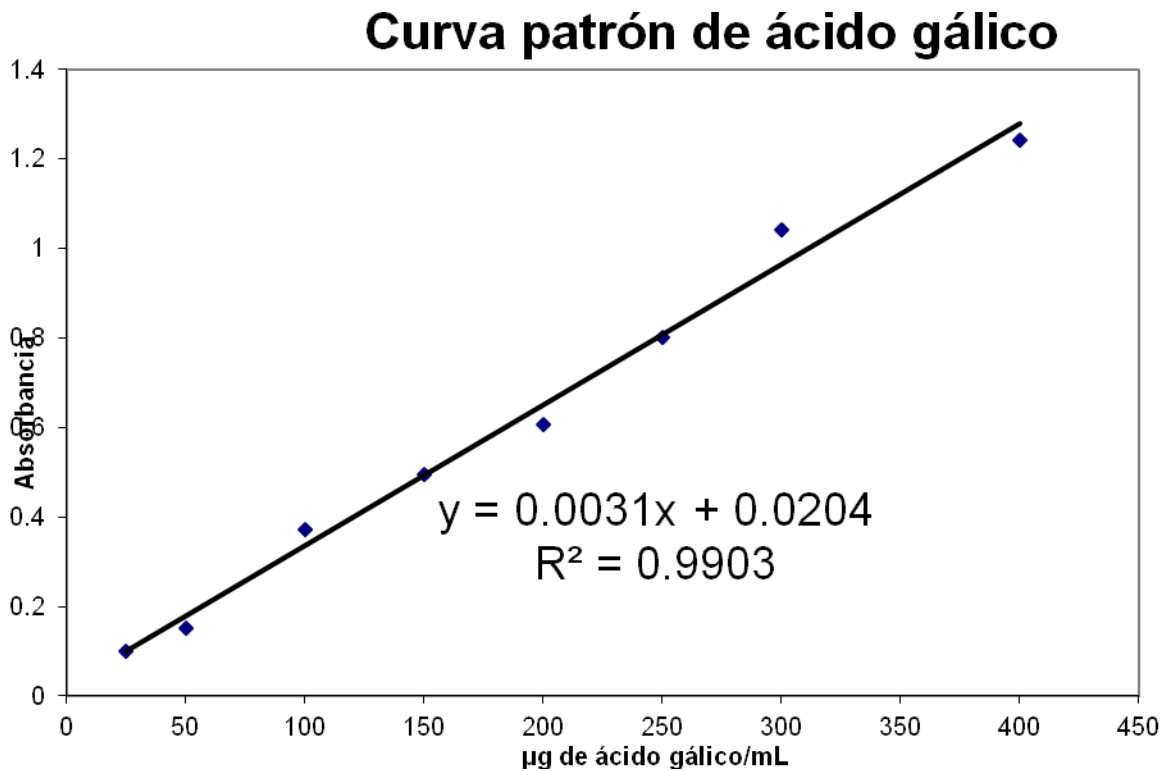


Figura 58. Curva patrón de ácido gálico