



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA.

Estudio fitoquímico de *Agave tequilana* Weber

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

ARMANDO JIMÉNEZ MIRANDA



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

MEXICO, D. F.

2004



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

FACULTAD DE QUÍMICA.

Estudio fitoquímico de *Agave tequilana* Weber

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

Armando Jiménez Miranda.

MEXICO, D.F

2004

Jurado Asignado:

Presidente Silvia Mendoza Arellano.

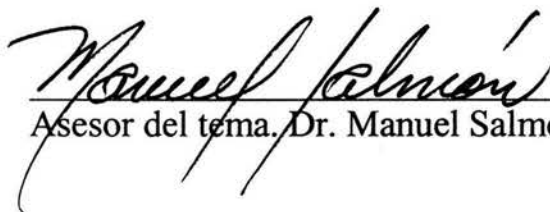
Vocal Ricardo Jorge Cárdenas Pérez.


Secretario Manuel de Jesús Salmón Salazar.


1er Suplente Blanca Estela Rivero Cruz.

2o Suplente Carlos Damían Zea.

Instituto de Química, UNAM, Laboratorio 2-8


Asesor del tema. Dr. Manuel Salmón Salazar.


Supervisor técnico del tema. M. en C. Rosa Estrada Reyes.


Sustentante. Armando Jiménez Miranda.

*El hombre sabio, para serlo
recorrió primero la oscuridad;
porque la oscuridad es el camino a la luz,
y la luz al camino de la sabiduría.
Dios creó la luz en la oscuridad:
Todo viaje a la luz parte de las sombras.*

**Speculum aeternum (fragmento)
Siglo IX**

Dedicatorias

A Dios:

Por crear la naturaleza y el universo tal como son.

A mis Padres:

María Juaquína Miranda Pérez y Juan Jiménez Plata. Con mis más profundo amor, admiración y respeto. No sólo me dieron la vida y sino que me han dado la suya, me han dado lo mejor. Gracias por todo. Nunca podré pagarles todo lo que han hecho y todo lo que han sido para mí. ¡Que Dios los bendiga siempre, hasta el final del tiempo!

A mis Hermanos:

Juan Ernesto Jiménez Miranda y Luis Iván Jiménez Miranda. Gracias por estar con migo, por su cariño y respeto. Mis disculpas si de vez en vez soy duro con ustedes, pero esta es mi forma de ser. No soy el mejor de los hermanos, pero me esfuerzo para serlo. Los amo y respeto.

A mi Madrina:

La Sra. Celia Sota Peña. Gracias por estar siempre pendiente de mi y mis hermanos, gracias por sus consejos, cariño y apoyo incondicional. Pero sobre todo gracias por su ¡calidad humana! Siempre ocupara un lugar muy especial dentro de mí!

A mis amigos y hermanos del alma:

Guillermo Alejandro Lastra García y Edith Pérez González, Javier Horacio Monroy Rosales y Martha Beatríz González Ruíz. Nadie me conoce mejor que ustedes, han demostrado ser los mejores amigos. Con ustedes he crecido y lo seguiremos haciendo. Las palabras sobran para describir mi afecto hacía ustedes y hacía sus familias. Siempre han sido sinceros con migo.

A todas las personas que ya no están físicamente con nosotros y que me brindaron su apoyo.

A las familias Lastra García, Monroy Rosales y González Ruíz :

Gracias por su apoyo y por abrirme la puerta de sus hogares.

A la mejor Maestra que he tenido:

La M. en C. Carmén Márquez Alonzo. Con cariño y respeto. Gracias por su apoyo, confianza, paciencia y comprensión, pero sobre todo por su calidad humana.

Agradecimientos.

Al Dr. Manuel Salmón Salazar, al M. en C. Jorge Cárdenas Pérez y al M. en C. Antonio Morales Serna por su ayuda incondicional, sus enseñanzas, su confianza y su amistad, durante la realización de este trabajo.

Al M. en C. Carlos Damían Zea por brindarme su apoyo y amistad.

A la M. en C. Rosa Estrada Reyes por su colaboración en el presente trabajo.

A la empresa Allied Domeqc por el consentimiento y la beca otorgada para la realización de este proyecto.

A la Q. Silvia Mendoza Arellano por sus consejos y contribuciones en este trabajo.

A mis amigos de la facultad de Química y otras escuelas: Sandra, Magel, Angél (Islas), Marco, Manuel (Maloch), Raquel, Janett, Cecilia, Verónica, Saúl, Israel, Ricardo, Zahid, , Itzel, Angél (Eslava), Yerson, Francisco, José Juan, Josué, Angél (Cortéz), Carlos (Lugo), Carlos (Hendrix), Jaqui (del HH) Maribel (de Odontología), y todos aquellos que aunque sus nombres no aparezcan, me regalaron parte de su tiempo y me brindaron momentos agradables durante toda mi estancia en la facultad.

A mis amigos y compañeros del L 2-8 y del L-Cromatografía: Erén, Miguel, Toño, Charal, Ricardo, Luis, Violeta, Aline, Rene, Erica, Jorge, Alejandro, Marx. Gracias por su amistad, consejos y por ser como una familia, ojalá eso nunca cambie. A Guadalupe y Angélica, gracias por su amistad y solidaridad.

A Metatásis: Julius, Gabo, Toño, Marco y Aldo, por permitirme hacer ruido con ustedes, por su amistad y su comprensión (dado que mis atributos musicales no son muy buenos).

A Metallica y Nirvana: Que gracias a su música me permiten tomar con criterio mis depresiones y locuras, así como solventar y canalizar en forma adecuada mis ratos de soledad y obscuridad.

*Welcome to where time stands still
No one leaves and no one will
Moon is full, never seems to change
Just labeled mentally deranged
Dream the same every night
I see our freedom in my sight
No locked doors, no windows barred
No things to make my brain seem scarred
Sleep my friend and you will see
That dream is my reality
They keep me locked in this cage
Can't they see it's why my brain says rage
Sanitarium, leave me be
Just leave alone*

(Metallica, 1984).

*I'm not like them, but I can pretend
The sun is gone, but I have a light
The day is done, but I'm having fun
I think I'm dumb, or maybe just happy.
My heart is broke, but I have some glue
Help me inhale, and mend it with you
We'll float around and hang out the clouds.
Then we'll come down and have a hangover.
Skin the sun, fall asleep
Wish away the soul is cheap
Lesson learned, wish me luck
Soothe the burn wake me up
I think I'm Dumb
Or maybe just happy*

(Kurt Cobain, 1994).

CRUDA

Compre una ilusión que no puedo pegar en la pared
La ansiedad invade mis pensamientos
La corrupción invade mis terrenos
La sociedad provoca mis temores
La hipocresía altera mis sentimientos

Buscamos respuestas que nunca aparecen
Reflexionamos ideas con apariencia de vacío
Juzgamos libros por su portada
sin conocer en realidad su contenido
Culpamos nuestra honestidad actuando con mediocridad

Mis ideas fluyen en ausencia de luz
La soledad invade mi alma
La oscuridad encierra mi ser
La impunidad alimenta mi incertidumbre
La injusticia nutre mi odio

Mientras el mundo se desvanece en un hoyo sin fondo
Mi país destierra sus raíces
La mentira arrebató mi conciencia
La miseria sostiene mi tristeza
La falsedad enriquece mi frustración
Soñar encierra mi felicidad

No hay manera de curar la soledad
Cuando no se encuentra aliento a felicidad
Cuando se vive la vida sin vivirla,
Sufriéndola sin quemaduras.

P.D. Para darle la vuelta al mundo necesitamos volvernos locos.

Armando Jiménez (Roots).

Acrónimos.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

IR: Infrarrojo.

CLAE: Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.

CG/MS: Cromatografía de Gases acoplada a Masas.

ccf: Cromatografía en capa fina.

DBO: Demanda biológica de oxígeno.

NOM: Norma Oficial Mexicana.

VIH: Virus de Insuficiencia Humana.

v.o: Vía oral.

DPPH: 1-1-Difenil-2-picril-hidrazilo.

λ_{abs} : Longitud de onda de absorción.

UV: Ultravioleta.

TMS: Trimetilsilano

u.m.a.: Unidades de masa atómica.

M^+ : Ión molecular.

$CDCl_3$: Cloroformo deuterado.

ppm: Partes por millón.

Indice.

Abreviaturas.

I. Introducción	1
II. Objetivos	3
III. Justificación	4
IV. Antecedentes	5
4.1 Generalidades y taxonomía sobre el género <i>Agave</i>	6
4.2 Generalidades sobre <i>Agave tequilana</i> Weber y el tequila	7
4.2.1 Descripción física de <i>Agave tequilana</i> Weber	7
4.2.2 Origen de la palabra tequila	7
4.2.3 Origen de la bebida	8
4.2.4 <i>Agave tequilana</i> Weber en el México prehispánico	8
4.2.5 Los agaves en Tequila Jalisco	9
4.2.6 Elaboración de la bebida	10
4.2.7 Subproductos del proceso de obtención del tequila	12
4.2.8 Situación actual de la industria del tequila	14
4.2.9 Causas y consecuencias de la crisis de la industria del tequila	14
4.2.10 Uso de las hojas de <i>Agave tequilana</i> Weber	15
4.2.11 Generación de compuestos de Maillard de inulina	16
4.2.12 Compuestos químicos del tequila	17
4.3 Flavonoides y compuestos afines	18
4.4 Estudios fitoquímicos realizados en otras especies de la familia Agavaceae	22
4.4.1 Sapogeninas esféricas en hojas de algunas especies de agave	22
4.4.2 <i>Agave intermixta</i> Trel: actividad antiinflamatoria	23
4.4.3 <i>Agave sp.</i> (amole)	23
4.4.4 <i>Agave cantala</i>	23
4.4.5 Agamanona: Una flavona de <i>Agave americana</i>	25
4.4.6 <i>Agave sisalana</i>	26
4.4.7 Derivados de flavonoides de <i>Dracaena loureri</i> (Agavaceae).	26
4.4.8 Contribuciones bioquímicas a la definición de Agavaceae	26
4.4.9 Glicósidos de Clorogenina y kaemferol de las hojas de <i>Agave americana</i>	27
4.4.10 Potenciales quimioprotectores de homoisoflavonoides y chalconas de <i>Dracaena cinnabari</i>	27
4.4.11 Sangre de dragón de <i>Dracaena Draco</i> , estructuras de nuevos homoisoflavonoides	28

V. Parte experimental	29
5.1 Material y equipos utilizados	29
5.2 Metodología experimental y resultados	32
5.2.1 Estudio fitoquímico del bagazo de <i>Agave tequilana</i> Weber	32
5.2.2 Estudio fitoquímico de las hojas de <i>Agave tequilana</i> Weber	35
5.2.3 Características espectroscópicas de los productos aislados y caracterizados.	40
VI. Discusión de resultados	42
6.1 Estudio fitoquímico del bagazo de <i>Agave tequilana</i> Weber	42
6.1.1 Extracto hexánico	42
6.1.2 Extracto de Acetato de Etilo	43
6.2 Estudio fitoquímico de las hojas de <i>Agave tequilana</i> Weber	43
6.2.1 Extracto hexánico	51
6.2.2 Extracto acetónico	51
6.2.3 Extracto metanólico	62
VII. Conclusiones	64
VIII. Bibliografía	65
XI. Apéndice	70
9.1 Espectros	71
9.2 Cromatogramas	85

Introducción.

Desde tiempos inmemorables, las plantas han acompañado al hombre y desde entonces este ha hecho uso de ellas para cubrir sus necesidades alimenticias y de habitación, para aliviar sus padecimientos, así como también le han sido de gran utilidad en la agricultura e industria alimenticia.

Nuestro país es uno de los más ricos en el mundo en cuanto a reino vegetal se refiere, sin embargo la población desconoce los amplios beneficios que nos ofrece la variedad de plantas, por lo que es necesario difundir los conocimientos, utilidad y cuidados de las plantas para beneficio del hombre.

Actualmente el estudio químico de las diversas especies de plantas existentes en el territorio mexicano ha tenido gran auge. Cabe mencionar que en el Instituto de Química de la UNAM se han venido realizando estudios químicos de plantas mexicanas desde hace varias décadas, lo cual ha sido importante para su conocimiento a nivel nacional e internacional.

Hoy en día gracias a los avances tecnológicos que ha tenido la ciencia, los problemas que implican la determinación de estructuras moleculares de los diferentes componentes químicos de una planta, se han resuelto de una manera extraordinaria. Esto se ha hecho posible gracias a la ayuda de los modernos equipos de Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear, Espectrometría de masas, Espectroscopia de Infrarojo y

Difracción de rayos X. Del mismo modo el aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios existentes en las plantas se ha venido facilitando mediante el empleo de diferentes técnicas cromatográficas, tales como: Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE), Cromatografía de Gases acoplada a masas (CG/MS), Cromatografía en Columna Abierta, Cromatografía Flash o Rápida y Cromatografía en Capa Fina (ccf).

El presente trabajo tiene por objeto el estudio fitoquímico de las hojas y el bagazo de *Agave tequilana* Weber. Dichos componentes son subproductos del proceso de producción del tequila, que pueden ser aprovechados de diversas maneras y una de ellas puede ser la utilización de sus metabolitos secundarios con actividades biológicas importantes. Tal es el caso de las sapogeninas, generalmente utilizadas como precursores para la producción de esteroides, tales como la progesterona, diuréticos esteroidales o vitamina D. Se debe recordar que dichos metabolitos secundarios han sido aislados y estudiados ampliamente de la familia Agavaceae. De los estudios fitoquímicos relacionados con plantas de esta familia, la mayor parte, alrededor del 85 al 90 % se refiere al aislamiento de sapogeninas.

Este trabajo va enfocado al aislamiento y determinación estructural de metabolitos secundarios de tipo flavonoide, que también han sido aislados y descritos previamente dentro de la familia Agavaceae, pero en menor proporción. Estos metabolitos podrían tener un valor agregado importante, debido a que han demostrado tener diversas actividades biológicas, como: antioxidantes, antiinflamatorios, anticarcinogénicos y antivirales (anti VIH-I).

Es importante destacar que en la literatura no se ha descrito ningún tipo de estudio fitoquímico con respecto a las hojas y el bagazo de *Agave tequilana* Weber, por lo tanto el presente trabajo nos otorga la oportunidad de contribuir al conocimiento de la fitoquímica de la planta y a dar un potencial a sus metabolitos secundarios.

Por otra parte, mediante el empleo de CG/MS se realizó el análisis compuestos no polares presentes en el bagazo y hojas de *Agave tequilana* Weber, debido ha que se ha descrito en la literatura que sustancias como ácidos grasos y sus correspondientes ésteres en bebidas alcohólicas obtenidas a partir de agave, contribuyen de manera significativa con el sabor y olor del tequila que se elabora^{3, 34-36}.

Finalmente, por medio de CLAE se analizaron e identificaron los carbohidratos presentes en las hojas de *Agave tequilana* Weber con posibles fines industriales, que no se detallaran en el presente trabajo debido a la exitencia de un contrato de secrecia con la empresa Allied Domecq.

Objetivos.

- Aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios tipo flavonoide presentes en las hojas y el bagazo de *Agave tequilana* Weber.
- Identificación de compuestos no polares presentes en el bagazo y hojas de *Agave tequilana* Weber por medio de Cromatografía de gases-Masas.
- Identificación de carbohidratos presentes en las hojas de *Agave tequilana* Weber mediante el empleo de CLAE.

Justificación.

Las plantas han proporcionado muchos de los fármacos empleados actualmente y muchas moléculas base para sintetizar otros tantos, proporcionando una gran diversidad de estructuras químicas activas, y ofreciendo alternativas viables para la obtención de principios activos contra diversas enfermedades, con novedosos mecanismos de acción y con alternativas para la toxicidad y efectos adversos que muchos de los actuales fármacos y medicamentos generan.

Los antecedentes fitoquímicos realizados con plantas pertenecientes a la familia Agavaceae nos indican que se han aislado metabolitos secundarios de tipo flavonoide, sin embargo, no existen reportes acerca de estos metabolitos en *Agave tequilana* Weber. Por lo que este trabajo nos otorga la oportunidad de contribuir desde el punto de vista Fitoquímico y dar un valor agregado importante a los metabolitos secundarios encontrados.

Además, la identificación de compuestos no polares por CG/MS (en el bagazo y hojas de *Agave tequilana* Weber) y la identificación de carbohidratos (en las hojas de *Agave tequilana* Weber) nos permiten contribuir desde el punto de vista bibliográfico para la realización de futuros trabajos con otros propósitos de interés.

Antecedentes.

“Generalidades y taxonomía sobre el género *Agave*”.

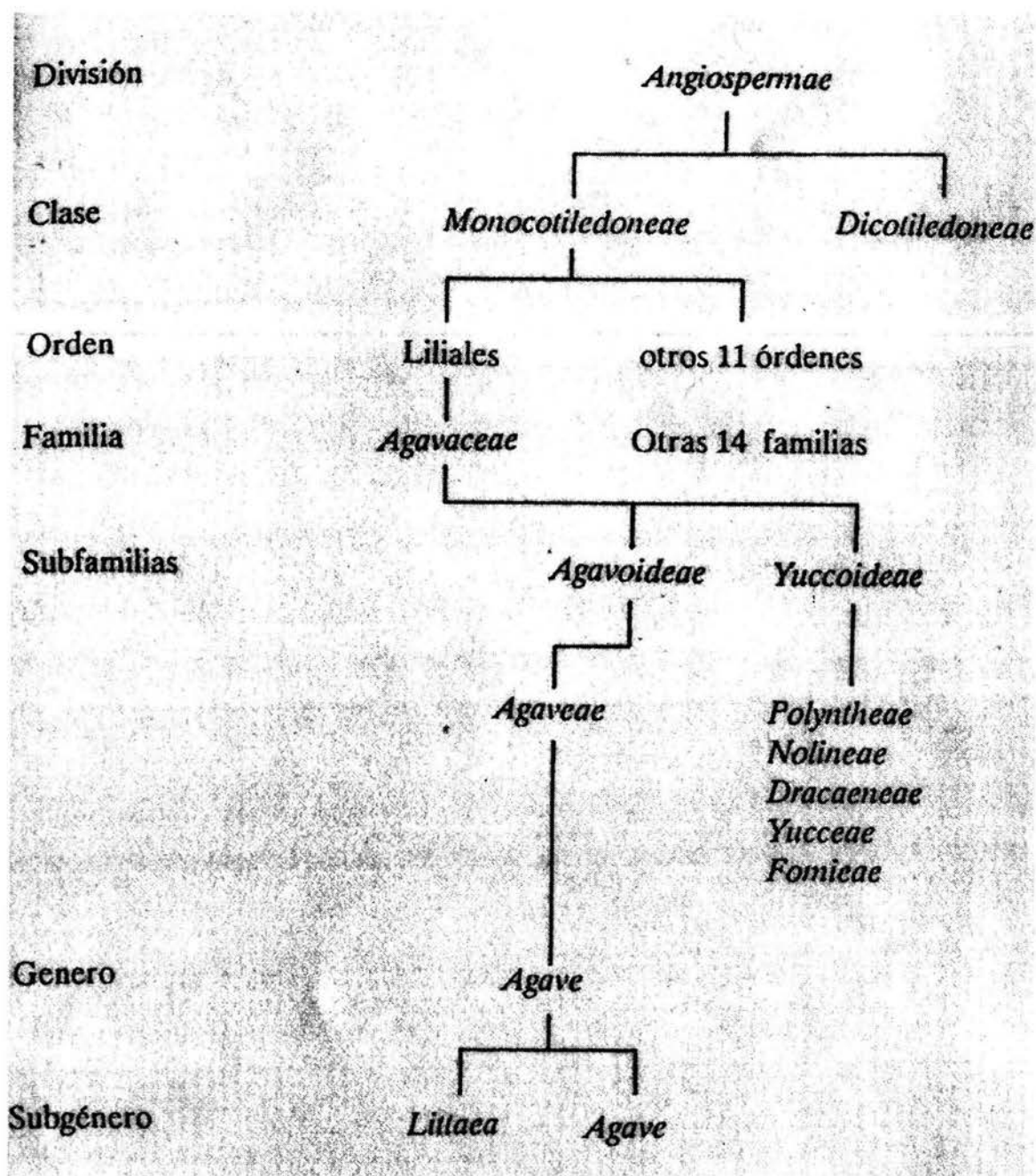
Mesoamérica y Aridoamérica (como los antropólogos han dividido a México) es escenario del origen y evolución del maguey (*Agave sp*). En ambas regiones esta planta ha sido utilizada, desde los primeros pobladores hasta la actualidad, para satisfacer y complementar una serie de necesidades básicas: alimento, forraje, medicamentos y construcción.

Taxonómicamente el género *Agave* se ubica en la familia Agavaceae. En el continente Americano se describen aproximadamente 310 especies, de las cuales en México existen 272, por ello se considera a este país como centro de origen del género.

Las Agavaceas son plantas adaptadas a condiciones de aridez. Tienen raíces someras y ramificadas, cutícula gruesa, succulencia, estomas hundidos y metabolismo fotosintético, estos son algunos de los atributos que les permiten establecerse en zonas carentes de agua.

Linneo identificó en 1753 cuatro especies cuando describió el género *Agave*. Uno de los principales problemas en cuanto a taxonomía del género *Agave* es situarlo en la familia a la que pertenece, ya que, aun cuando se clasifica dentro de Agavaceae, existen referencias bibliográficas que lo incluyen en otras familias¹⁵.

A continuación se presenta un diagrama con las relaciones taxonómicas dentro de las angiospermas (realizada por el Botánico Cronquist en 1981), y la cual coincide por la realizada por otros botánicos¹⁵.



“Generalidades sobre *Agave tequilana* Weber y el tequila”.

Descripción física de *Agave tequilana* Weber.

La planta de *Agave tequilana* Weber tiene hojas color azul-verdoso o glaucas, delgadas y casi planas, de 1.25 m de largo y de 8-10 cm de ancho; la espina terminal es de color rojo oscuro, cónica de 2 cm, los dientes son rojizos triangulares, de 3-4 mm y separados por una distancia de 1-1.5 cm, el margen que los une es ligeramente blanquecino. *Agave tequilana* Weber es la especie que se utiliza en mayor escala en la región debido a que posee características importantes para la producción del tequila. El tiempo que tarda en llegar a su estado de madurez industrial es de 6 a 7 años en las condiciones climáticas del valle del Tequila y de 7 a 9 años en el de Atotonilco, aunado a esto, su contenido de azúcares es alto¹⁵.

Origen de la palabra tequila:

La primera versión menciona la existencia de una tribu indígena que recibía el nombre de “Tecuilas”, los cuales elaboraban rudintariamente el producto que acabó recibiendo el nombre de tequila.

La segunda versión menciona que la palabra tequila viene del vocablo nahuatl “tequitlam”, traducido como “lugar donde son abundantes los tributos” o a su vez este vocablo, dividido en “teqitl” con significado “trabajo” o “empleo” y “tlan” con significado “lugar”; por lo tanto el significado de la palabra “Tequila” puede ser también interpretado como “lugar donde la labor o trabajo se realiza”¹⁶⁻¹⁸.

Origen de la bebida.

El origen de la bebida tiene un relato con connotación mágica: Un rayo cayó sobre algunos agaves, los cuales con la descarga dejaron descubierto el corazón del maguey, que por efecto del calor generado estos estuvieron ardiendo unos momentos; los indígenas que observaron dicho acontecimiento, descubrieron que había un líquido cristalino de buen sabor, motivo por el cual trataron de imitar aquel proceso accidental originado al caer un rayo¹⁷.

Agave tequilana Weber en el México prehispánico.

La información más significativa que hace referencia al *Agave tequilana* Weber está en los siguientes documentos: códice “Tonauhatl Nahuatl” o “Tonalmatlnahuatl” conocido también como “Cara de la peregrinación Azteca”. En dicho documento se narra con jeroglíficos, la historia de la nación Mexica que inicia en el año 1116 de nuestra era en su éxodo a Aztlán (con significado lugar de garzas), localizado en la isla de Mexcaltitan (con significado entre mezcales), en la confederación de Chimahuacán, que ha su vez era integrada por los estados de Colima, Tonallan, Xalisco y Aztlán, siendo los dos últimos donde se ubicaba el principal asiento del reino, y desde luego, en Xalisco donde se localizaba el volcán o cerro de Tequila.

En el mismo Códice se narra también sobre una de las ocho tribus Nahuatlacas (la de los Aztecas), que por orden del Dios Huichilopochtli debió separarse y cambiar su nombre para llamarse “Mexicas”, que significa “los que se alimentan de Mexcalli”, en honor de su Dios “Mextli” que a su vez quiere decir “ombligo de agave”, para ir en

busca del águila posada encima de un nopal devorando una serpiente, que sería el signo de los dioses para tomar asiento definitivo y la cual encontraron hasta 1325 fundando la gran ciudad de México-Tenochtitlan, palabra esta última que en sentido figurado significa “En la casa de Tenoch”, que significa “donde mora el Dios de los Agaves”. También se señala que los Mexicas, tuvieron que aprender a cocinar los agaves en hornos bajo tierra y así obtener el Mexalli (agave cocido) que era considerado alimento por la reserva de agua y nutrientes que son acumulados por la planta para resistir en un terreno semidesértico; también se señala que el agave cocido remojado en agua podía fermentar; a dicha bebida alcohólica se le denominó *Iztaccocli* que significa vino blanco¹⁶⁻²¹.

Los agaves en Tequila, Jalisco.

Entre el siglo XVIII y el XIX, el mezcal producido en un pequeño pueblo, al noreste del estado de Guadalajara, empezó a adquirir gran fama por su extraordinaria calidad. En la pequeña comunidad llamada Tequila, las condiciones climatológicas y de la tierra eran ideales para el cultivo de cierta variedad de maguey: el agave azul (*Agave tequilana* Weber).

Poco a poco, la calidad del mezcal hecho con agave azul (al que empezó llamarse tequila) fue más reconocida y los avances del país y la tecnología fueron determinando que el tequila se hiciera más popular, no sólo en México, sino en todo el mundo, a partir del siglo XIX.

Elaboración de la bebida.

Un agave tarda aproximadamente ocho años en llegar a su estado óptimo de maduración. Entonces son cortadas sus hojas por los "jimadores", quienes después separan el centro de la planta, al que llaman piña.

Las piñas partidas son transportadas a las destilerías e introducidas en hornos, donde son cocidas a vapor. Se realiza en horno Tequila Cuervo, con paredes de ladrillo y tiempo de estancia de las piñas de 36-48 horas, o en horno Tequila Sauza, con paredes de autoclaves por lo que el tiempo es menor de 8 horas. La finalidad de la cocción es hidrolizar azúcares complejos como el almidón y la inulina (polisacárido de fructosa con una unidad de glucosa) en monosacáridos o disacáridos como la fructosa y la sacarosa, moléculas más simples.

Posteriormente, para extraer las mieles del agave cocido se aplica agua a presión al bagazo y luego exprime en bandas transportadoras. Entre 55-60 Kg de bagazo son desechados en la producción de un litro de tequila. Posteriormente se realiza la fermentación.

La fermentación es el proceso en el cual se transforman los azúcares en alcohol etílico, y otros productos en menores proporciones. Los depósitos de fermentación son grandes tinas de acero inoxidable que se llenan las mieles, también llamados **mostos**. A estos se les agrega agua, levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y nutrientes para la fermentación.

Los productos de la fermentación son alcohol, agua, bióxido de carbono y energía que se desprende en forma de calor. El mosto en plena fermentación es efervescente y el movimiento cesa cuando las levaduras han terminado su trabajo. En este momento finaliza el proceso y se acostumbra decir que el mosto está muerto. Entonces la siguiente etapa es la destilación.

En la primera destilación se obtiene alcohol de baja graduación debido al contenido de impurezas y de otros componentes como aldehídos y cetonas. También quedan algunos productos de desecho denominados vinazas o lodos de fermentación, y están compuestos por lodos y levaduras.

La segunda destilación se efectúa para eliminar las impurezas. El proceso se realiza en alambiques de madera de encino americano, el tiempo de añejamiento varía de acuerdo al tipo de tequila.

Después de ser filtrado y reducido el porcentaje de alcohol, este tequila puede ser embotellada para su venta, aunque también puede añejarse por varios años para lograr un producto de máxima calidad¹⁵.

Subproductos del proceso de obtención del tequila.

La industria del tequila genera tres principales subproductos, los cuales son empleados como materia prima en la elaboración de productos secundarios.

- Bagazo. Material linocelulósico, es la fibra residual que queda después de haber cocido, despedazado y exprimido (extracción de mieles) las piñas del agave, del cual se obtiene 1200 g de bagazo/litro de tequila (base húmeda) y representa al 40% (base húmeda), del total de agave exprimido.
- Vinazas. Que consiste en desperdicios acuosos provenientes de la destilación, en las cuales se obtiene de 8-10 litros de vinazas/litro de tequila. Las vinazas se caracterizan por sus altas concentraciones de materiales orgánicos e inorgánicos disueltos, su alta temperatura (durante la descarga) y bajo pH. Las vinazas tienen altas concentraciones de potasio, cloruro de calcio, iones de sulfato; su DBO causa problemas significativos para su desecho. El impacto de las vinazas ha venido causando un problema por varios años, y no existían lineamientos regulatorios para su descarga al ambiente, hasta 1994 (NOM-064-ECOL, 1994). Dicho establecimiento de límites permisibles ha estimulado interés en emplear y procesar las vinazas del tequila para resolver problemas de contaminación, entre otros.
- Sólidos de fermentación. Este material se obtiene mediante la centrifugación del mosto muerto y las vinazas obtenidas.

Tabla 1. Productos obtenidos a partir de subproductos generados durante la producción de tequila²⁷.

Subproducto de la obtención del tequila.	Productos que se pueden generar a partir del subproducto.
Bagazo.	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ladrillos (adobe). ➤ Material de empaque y de relleno. ➤ Aisladores de sonido. ➤ Aisladores térmicos. ➤ Paredes y techos prefabricados. ➤ Sorbentes y geotextiles. ➤ Papel y pulpa. ➤ Aditivo para formulación de forrajes para animales⁽¹⁾. ➤ Abono para cultivo.
Vinazas.	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Recirculación del 5-10% para la formulación de nuevos mostos de fermentación. ➤ Sólidos de fermentación.
Sólidos de fermentación.	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Aditivos en la formulación de forrajes para animales (ovejas).

Situación actual de la industria del tequila.

La industria del tequila presentó del año de 1995 a 1999 un crecimiento el cual se le denominó el “Boom” del Tequila; para el año 1999 a la fecha, se le considera un período “Post-Boom”, cuyos problemas principales es la crisis del agave y del tequila. Durante el “Boom” del tequila, la industria creció un 82% produciendo de 104.3 a 190.6 millones de litros (40% de alcohol en volumen, para el año 1999); las exportaciones crecieron de 64.5 millones de litros a 98.8 millones de litros; de los cuales el destino final era EUA en un 80% de los casos, dando la industria del tequila para el año 1999, empleo a 36688 personas²²⁻²⁶.

Causas y consecuencias de la crisis de la Industria del tequila.

De manera general las principales causas que llevaron a la industria del tequila a una crisis se mencionan a continuación:

- Sobreproducción del *Agave tequilana* Weber, seguido a una escasez del misma; aunado al éxito comercial del producto por las preferencias del consumidor (sobre tequila manufacturado con 100% de agave), se volvió crítica la poca o nula planeación del abasto de materia prima.
- Desvinculación entre la industria del tequila y el campo mexicano.
- Fluctuación en el precio del agave.
- Ausencia de organismos reguladores entre el campo y la industria.
- Prácticas industriales desleales y monopólicas entre los industriales.
- Adulteración de la bebida.

- Carga fiscal e impuestos.
- Incremento acelerado del precio del tequila.
- Problemas fitosanitarios que afectaron el cultivo del *Agave tequilana* Weber.
- Poco desarrollo y mejora tecnológica para ser aplicada en diversas áreas que integran la industria del tequila²²⁻²⁶.

Utilización de productos de la industria tequilera con valor potencial: hojas de *Agave tequilana* Weber.

Las hojas del agave son desechadas una vez que son cosechadas las piñas para la producción del tequila. Del peso total húmedo del agave, el 54% corresponde a la piña, 32% a materiales que podrían ser usados para producción de azúcares y fibra, y un 14% corresponde a las hojas sin una aparente utilidad. La mayor cantidad de carbohidratos (16-28%) se encuentra en la cabeza del agave, la cual es usada para la producción del tequila. El papel producido con las hojas de *Agave tequilana* Weber var. Azul, tiene una resistencia comparable a la del papel hecho tanto de pino como de eucalipto (dos fuentes comunes para la fabricación de papel), pero su índice de desgarre es mayor al papel de las otras fuentes. Debido al % de celulosa contenida en las hojas de *Agave tequilana* Weber, el proceso de elaboración de papel no es viable².

Generación de compuestos de Maillard de inulina durante el proceso térmico en la producción de tequila con *Agave tequilana* Weber.

Durante la cocción de *Agave tequilana* Weber, junto a la hidrólisis de inulina y la generación de azúcares fermentables, son producidos muchos compuestos volátiles, principalmente compuestos de Maillard, que tienen un impacto significativo sobre el sabor del tequila. Existen antecedentes referentes a las mieles de agave de cierta compañía tequilera que fueron recolectados periódicamente, la concentración de fructosa y de los azúcares reductores en general fueron determinados cuando tiene lugar la hidrólisis de la inulina. Los compuestos de Maillard se extrajeron con CH_2Cl_2 y se analizaron por la técnica CG-MS.

Incrementos de color y de azúcares reductores fueron observados en función del tiempo, pero también un decremento en la concentración de fructosa. Muchos compuestos de Maillard fueron identificados en las mieles, incluyéndose entre ellos furanos, piranos, aldehídos, compuestos nitrogenados y sulfurados. Además fueron encontrados una serie de cadenas cortas y largas de ácidos grasos, así como fueron encontrados un gran número de compuestos volátiles encontrados en el tequila analizado, muchos de los cuales han sido reportados como poderosos odorantes, responsables del sabor único del tequila³.

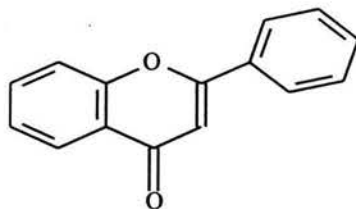
Compuestos químicos del tequila.

El tequila contiene seis principales tipos de compuestos químicos: alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, compuestos azufrados y ácidos orgánicos. En esta área del estudio del tequila, se ha estado investigando sobre técnicas instrumentales apropiadas para identificar los compuestos químicos que caracterizan a esta bebida tanto en sabor como en olor, y así asociar materias primas y operaciones unitarias que influyen en dicha composición química.

Se ha descrito un estudio realizado sobre tequilas, en el cual se describe un análisis cualitativo de diferentes ésteres mediante cromatografía de gases. Los ésteres identificados fueron los siguientes: Octanoato de etilo, decanoato de etilo y pentadecanoato de etilo, entre otros³⁴⁻³⁶.

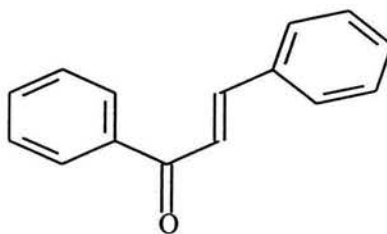
“Flavonoides y compuestos afines”.

Los flavonoides son pigmentos vegetales que poseen un esqueleto carbonado $C_6-C_3-C_6$, que constituyen el núcleo base: La 2-fenil-4-benzopirona.



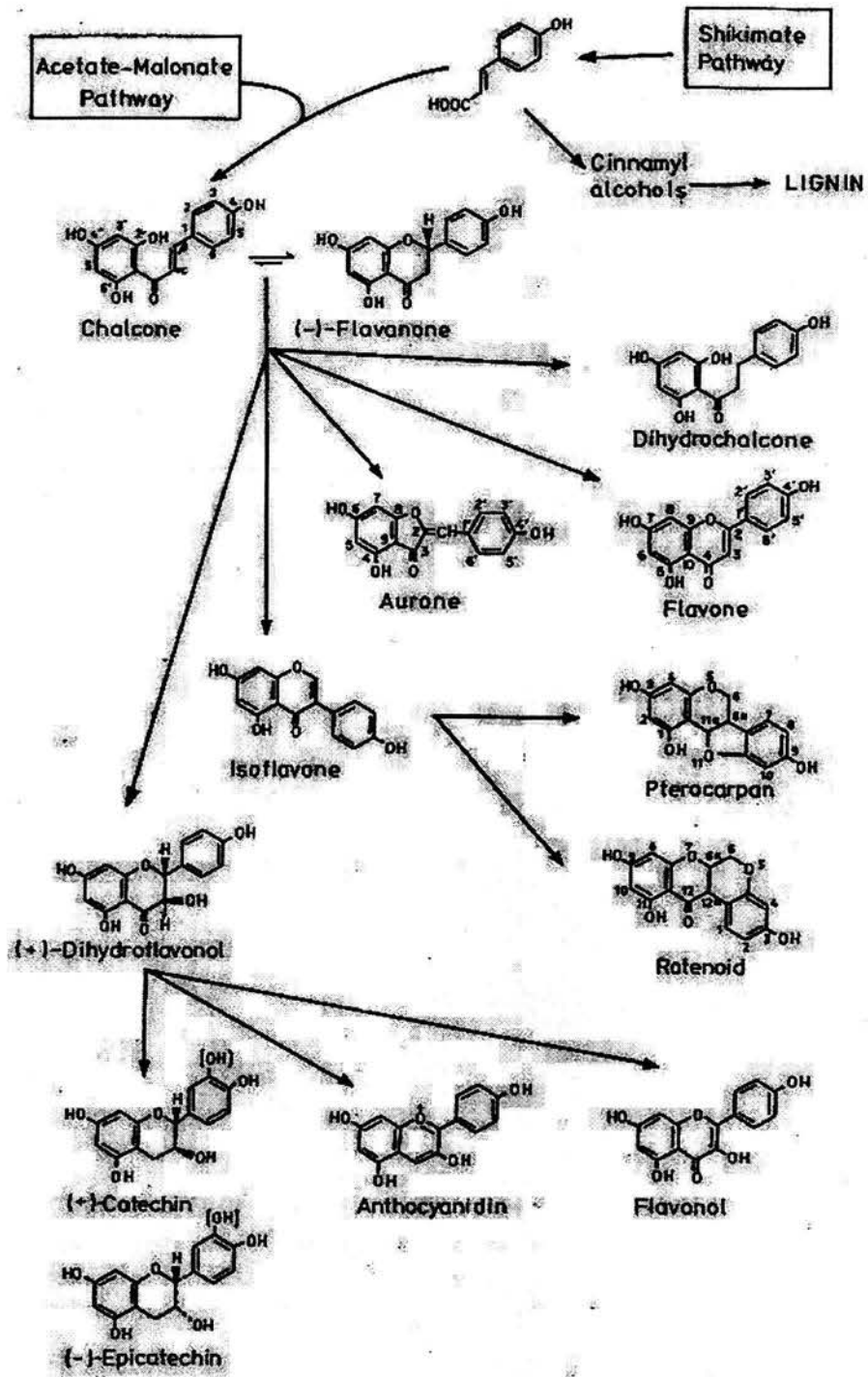
En general los flavonoides se clasifican en: flavonas (2-fenil-benzopironas), flavononas (2,3-dihidroflavonas), flavonoles (3-hidroxi-flavonas) e isoflavonas (3-fenil-benzopironas), principalmente.

Todos los flavonoides están relacionados por una ruta biosintética común, la cual incorpora los precursores de las vías del ácido shikímico y del acetato-malonato, de esta manera al unirse las dos vías se forma los precursores de los flavonoides: las chalconas, todos los demás derivan de esta última por una variedad de rutas¹⁴.



Chalcona

A continuación se presenta una figura con las correlaciones existentes entre los diferentes tipos de flavonoides.



Se conocen unos 2000 flavonoides naturales que se encuentran extensamente distribuidos entre las plantas, tanto libres o en forma de glicósidos, estos últimos contribuyen a darle color a las flores, frutos y hojas.

Los flavonoides son biosintetizados por numerosos grupos de plantas y con excepción de algunas flavonas localizadas en las alas de las mariposas, posiblemente por ingestión, entonces se puede decir que no se les encuentra en animales.

Por otra parte, los flavonoides han venido teniendo relevancia debido a que se ha encontrado que estos compuestos tienen una variedad de actividades biológicas útiles para el hombre. Dentro de las actividades más importantes de estos compuestos están:

- Antioxidantes.
- Antiinflamatorios.
- Antitumorales.
- Anti VIH.

Las actividades biológicas son atribuidas a los flavonoides debido a que estos compuestos han demostrado ser muy buenos inhibidores de enzimas necesarias para la activación de células carcinogénicas, así como la inflamación y respuestas alérgicas. Entre estas enzimas se incluyen: La proteína cinasa C, lipoxigenasas, fosfatasa A2, fosfolipasas, cicloxigenasas, topoisomerasas, NADH oxidasa y otras.

Además se ha observado, que los flavonoides tienen efectos importantes sobre la adhesión de células, así como en la expresión de genes de células activadas, esta actividad contribuye a su capacidad de remover especies reactivas de oxígeno. A este respecto se ha comprobado que los flavonoides hidrofóbicos se enlazan a lipoproteínas de baja densidad, mientras que los flavonoides anfipáticos en el fluido acuoso pueden ser poderoso antioxidantes *in vivo*. Además experimentos con dietas ricas en flavonoides han demostrado incrementar los niveles de actividad antioxidante *in vivo*.

Por otra parte con respecto a sus actividades antitumorales y anti-VIH, algunos flavonoides han mostrado su capacidad para estimular numerosos tipos de células inmunológicas, que juegan un papel importante en los trastornos mencionados. Entre los tipos de células que estimulan los flavonoides se encuentran: Basófilos, neutrófilos, eósinófilos, linfocitos T y linfocitos B, macrófagos, plaquetas y hepatocitos. La estimulación de este tipo de células se debe a que algunos flavonoides pueden inducir la expresión de ciertos genes importantes para la respuesta inmune, tales como IL-6, IL-8, ciclooxigenasa 2, TNF, IL-1, INF- γ . Que también contribuye a la respuesta antiinflamatoria.

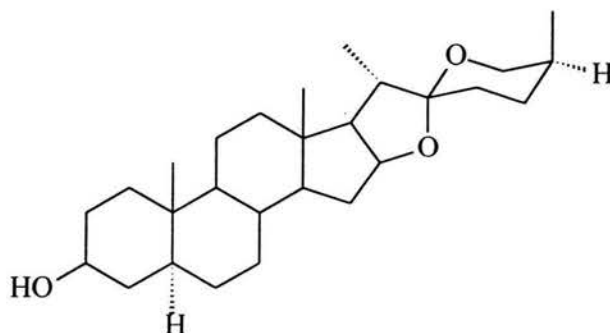
Finalmente, algunos de estos flavonoides han mostrado que podrían contribuir al control del virus del VIH debido a que ciertos estudios han demostrado que pueden inhibir enzimas como la VIH-1 transcriptasa reversa, proteasas e integrasas, enzimas fundamentales en el ciclo de reproducción del VIH³².

“Estudios fitoquímicos realizados en otras especies de Agavaceae”.

Sapogeninas esteroidales en hojas de algunas especies de agave.

Se han aislado y caracterizado sapogeninas de las hojas de *A. aurea*, *A. cerulata*, *A. cerulata sp. Subcerulata*, *A. cocui*, *A. goldmaniana* y *A. Shawii* (colectadas en México y Venezuela). Siendo la hecogenina y tigogenina las principales sapogeninas obtenidas. La “Gitogenina” fue encontrada en los extractos de todas las muestras de hojas, excepto en *Agave shawii*, la manogenina y la 9-dihidromanogenina fueron encontradas en todas menos en *Agave cocui*. La Clorogenina fue aislada de *A. cocui*, pero no fue detectada en las demás especies estudiadas.

Las sapogeninas esteroidales presentes en el polvo de las hojas secas de las especies de Agave estudiadas fueron hidrolizadas con ácido y las sapogeninas liberadas fueron extraídas y examinadas mediante ccf contra referencias disponibles antes del aislamiento y la ccf preparativa. Dichas sapogeninas fueron caracterizadas mediante el empleo de puntos de fusión, IR, RMN, MS y en algunos casos el espectro de UV⁴.



Hecogenina

Agave intermixta Trel: actividad antiinflamatoria.

Esta, es una planta originaria de la República Dominicana. El extracto acuoso de esta planta es comúnmente utilizado en la medicina tradicional de ese país. Se ha evaluado sistemáticamente la toxicidad y actividad antiinflamatoria de esta planta. Efectos no letales fueron producidos después de la administración oral de los extractos. La dosis letal media después de la administración intraperitoneal fue bastante alta. Los extractos secos de la decocción de las hojas de *A. intermixta* fueron administrados en dosis de 300 y 500 mg/Kg en ratas (v.o.) y 5 mg/ratón. En el ensayo antiinflamatorio general evaluado, *Agave intermixta* presenta un efecto antiinflamatorio ¹³.

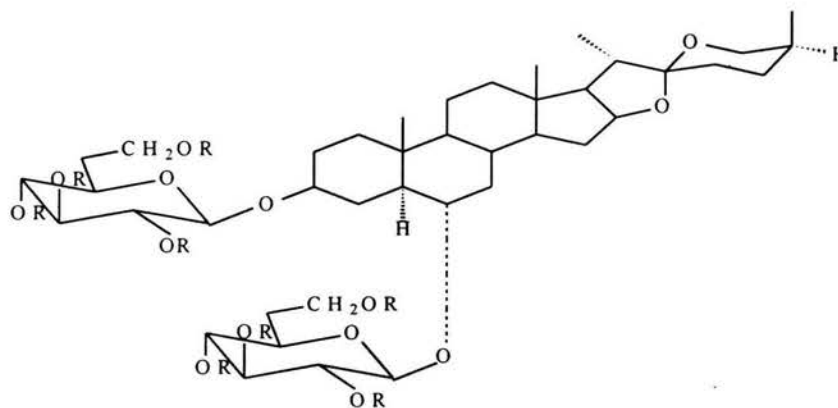
Agave sp. (amole).

Agave sp. es una planta mexicana, cuyo tallo es usado en medicina alternativa y que ha demostrado tener efectos antifibrogénicos en cirrosis experimental. Se ha demostrado su efecto antioxidante mediante su capacidad de inhibir la autoxidación del ácido linoleico y neutralizar radicales libres como el 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH)⁷.

Agave cantala.

Esta planta crece en su forma silvestre en Himachal Pradesh (India) y sus especies exhiben propiedades diuréticas, antisifilicas y anticancerígenas. Dentro de los compuestos que han sido caracterizados se encuentran diversas sapogeninas como una hongguaanggenina, y otras sapogeninas esteroideas tales como la gitogenina. Otros

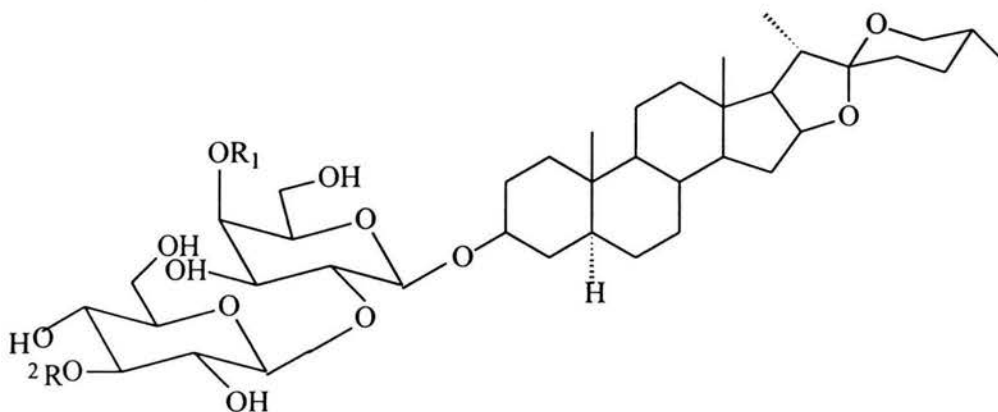
compuestos que han sido descrito en la literatura son: un espirostanol glucosídico aislado de las raíces de esta planta⁹⁻¹².



1 R=H; 2 R=CH₃

Espirostanol glicosídico

Además se han encontrado 2 hecogeninas glicosídicas (cantalasapogeninas 1 y 2), que fueron aisladas del extracto metanólico de las raíces de *A. cantala* y fueron caracterizadas. El primer glicósido ha demostrado ser letal contra *Biompalaria glabrata*, a una concentración de 7 ppm.



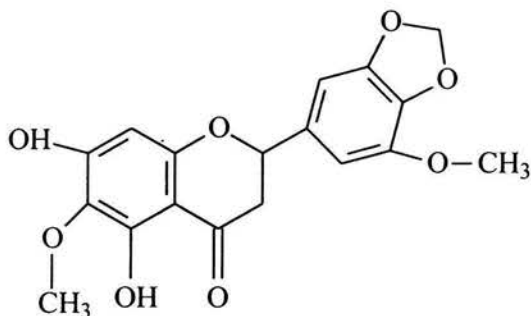
R₁ = D-XIL; R₂ = D-GLU

Cantalasaponina

De forma similar, dos glicósidos esteroidales, agavesida A y B fueron aisladas a partir de los frutos de *Agave cantala*. Las estructuras fueron elucidadas por combinación de espectroscopia NMR-C¹³, degradación química y espectrometría de masas⁹⁻¹².

Agamanona: una flavona de *Agave americana*.

La planta *Agave americana* es una planta regional de la India usualmente usada en la medicina tradicional de ese país. Se le han descrito funciones de diurético, antisifilitico y laxante. Las primeras investigaciones fitoquímicas sobre esta especie han revelado la presencia de glicósidos de espirostanol, saponinas, saponinas esteroidales y derivados de tetrariancontanol. Además se ha descrito el aislamiento y la elucidación estructural de una nueva flavona, la agamanona⁵. Dentro de las saponinas descritas están la hecogenina, la agavesaponina E y la Agavesaponina H⁶.



Agamanona

Agave Sisalana.

Esta planta es una fuente muy importante de fibra dura y material esteroidal, la cual ha sido cultivada en el sur de China. Varias sapogeninas han sido aisladas y caracterizadas de esta planta, de las cuales, la donnosida E, D y C han sido descritas en la literatura⁸.

Plantas utilizadas en la medicina tradicional de Tailandia. Derivados de flavonoides de *Dracaena loureri* (Agavaceae).

A partir de de la planta *Dracaena loureri* se han aislado y caracterizado Quince derivados de flavonoides, mediante el empleo de NMR en una y dos dimensiones. Dos nuevas estructuras de productos naturales, las dracaenonas y las lourerinas, fueron aisladas, además de otros flavonoides genéticamente relacionados²⁸.

Contribuciones bioquímicas a la definición de Agavaceae.

Algunos Flavonoides (flavanoles, proantocianidinas y C-glicoflavonas) fueron examinados en 14 especies de Agavaceae, y en las familias relacionadas como Amarillidaceae (7 especies) y Liliaceae (7 especies). Proantocianidinas fueron encontradas sólo en Agavaceae. La quercetina, el kaemferol y la isorhamnetina fueron los principales flavonoides en las tres familias. Las C-glicoflavonas estuvieron ausentes en Amarillidaceae. Los datos son discutidos en relación a la definición taxonómica de Agavaceae²⁹.

Glicósidos de Clorogenina y kaemferol de las flores de *Agave americana*.

Una sapogenina, la clorogenina fue aislada en un 0.5 % de las flores frescas de *Agave americana*. También se obtuvieron glicósidos de flavonol, los cuales fueron identificados como kaemferol 3-glucósido y kaemferol 3-rutinosida³⁰.

Potenciales quimioprotectores de homoisflavonoides y chalconas de *Dracaena cinnabari*: modulación de enzimas de fármacos metabolizados y actividad antioxidante.

Una serie de homoisflavonoides y chalconas, aisladas de la planta endémica *dracaena cinnabari* Balf (Agavaceae), fueron probados por su potencial para inhibir las enzimas del citocromo P4501A (CYP1A) y el Fe-refuerzo de la peroxidación de lípidos microsomales *in vitro* en hígado de ratón. Los efectos de los compuestos polifenólicos fueron comparados con algunos de estos flavonoides prototipo moduladores del CYP1A y el bien conocido antioxidante, hidroxitolueno butilado. El primer monitoreo de flavonoides y chalconas de *Dracaena cinnabari* para actividad antioxidante fueron hechos en un ensayo *in vitro* de peroxidación microsomal. Mientras que las chalconas mostraron ser pobres antioxidantes, Por otro lado, el 7,8-metilendioxy-3(4-hidroxibencil) cromanona, uno de los homoisflavonoides probados, exhibió una fuerte actividad antioxidante comparable a la quercetina, un flavonol considerado como un fuerte antioxidante³¹.

Sangre de dragón de *Dracaena Draco*, estructuras de nuevos homoisoflavonoides.

Dos nuevas homoisoflavonas, 4',7-dihidroxi- y la 4',7-dihidroxi-8-metoxi-, fueron aisladas de la resina "sangre de dragón" (Agavaceae). En la misma resina fueron también identificados la 4',7-dihidroxi-7-metoxi- así como la 5,7-trihidroxi-6-metilhomoisoflavavonas junto con otros cinco flavonoides. Las estructuras fueron establecidas en base a su análisis por RMN- ^1H y síntesis³³.

Parte Experimental.

El aislamiento y purificación de los metabolitos se llevó a cabo mediante diversas técnicas cromatográficas tales como la cromatografía en columna al vacío, cromatografía relámpago o flash, cromatografía de gases acoplada a masas y cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), así como cromatografía en capa fina como criterio de pureza y una herramienta para el monitoreo de las diversas fracciones recolectadas.

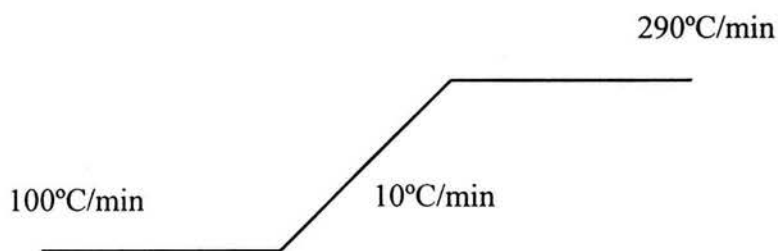
La elucidación de las estructuras de los compuestos de interés se realizó mediante el empleo de diversas técnicas, entre ellas: Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C , Espectroscopia de Infrarrojo, Espectroscopia de UV y Espectrometría de Masas. Además se emplearon otros equipos para la medición de ciertas propiedades físicas como Rotación óptica y punto de fusión.

Material y equipos utilizados.

Técnicas cromatográficas:

- Cromatografía en columna al vacío: se utilizó sílica-gel 60 GF₂₅₄ Merck, en una relación de 10:1 con respecto al peso del extracto o las muestras, así como columnas de vidrio de diverso diámetro según la cantidad de muestra a separar.
- Cromatografía Relámpago: Se utilizó sílica-gel 60 (malla 230:400) en una relación de 10:1 con respecto al peso de la muestra.

- Cromatografía de gases: Se realizó en un equipo *Agilent 6890* y se utilizó una columna capilar de 5% de fenilmetilsiloxano, de 30 m de largo, diámetro de 0.32 mm, espesor de película 0.25 mm . La temperatura inicial del horno fue de 100 °C y fue programada a 10°/min hasta 290 °C. La temperatura del inyector y del detector fueron de 290 °C. A continuación se esquematiza un rampa con el gradiente de temperatura utilizado.



- Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia: se realizó en un equipo *Varian star 9042* equipado con un detector de UV/VIS Varian. Los ensayos semipreparativos se realizaron en fase normal, por lo que se utilizó una columna semipreparativa microporasil Silica, 125 A, 10 µm, 19X300 mm.

Las longitudes de absorción de dichos productos se determinaron mediante el empleo de un espectrofotómetro Spectronic Genesis 5, usando como blanco la mezcla de elución para CLAE.

- Cromatografía en capa fina: Se utilizaron placas cromatográficas de aluminio Macherey-Nagel con silica gel 60 G/UV₂₅₄. Utilizando como revelador solución de sulfato cérico (Ce₂(SO₄)₃) al 1% en ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N.

Los puntos de fusión se determinaron en un equipo Fisher Johns y son valores no corregidos.

La rotación óptica se determinó mediante el empleo de un equipo Jasco DIP - 360.

Los espectros de IR se determinaron utilizando como técnicas de preparación películas y disoluciones de cloroformo (CHCl_3) en un espectrofotómetro Nicolet FT-IR 750. Se utilizaron celdas de NaCl de 0.5 mm de espesor.

Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro de resolución media Jeol modelo MS-SX505-A por la técnica de impacto electrónico.

Los espectros de RMN de ^1H y RMN de ^{13}C se obtuvieron en espectrómetros *Varian Gemini* de 200 MHz y *Varian Unity* de 300 MHz en CDCl_3 . Los desplazamientos químicos se reportan en ppm con respecto al tetrametilsilano (TMS) y las constantes de acoplamiento en Hz.

Metodología experimental y resultados.

La planta que se trabajó fue un ejemplar de *Agave tequilana* Weber que fue colectado e identificado por la empresa Allied Domeqc, productora del tequila Sauza.

La planta fue separada y trabajada en dos partes :

- 1) La piña (de la cual se obtuvo el bagazo).
- 2) Las hojas.

1) Estudio fitoquímico del bagazo de *Agave tequilana* Weber.

Extracto hexánico:

La piña del ejemplar de *Agave tequilana* Weber fue cortada en trozos y molida. Posteriormente se realizó una maceración con 20 L de agua y el bagazo resultante se dejó secar a temperatura ambiente.

Se maceraron 3.0 kg de bagazo de piña seca, obtenidos después de la extracción de la piña con agua. La maceración se realizó con 12 L de hexano durante 48 h (por triplicado), el extracto hexánico obtenido fue evaporado a presión reducida, obteniéndose 5 g (0.16 %) de extracto hexánico, del cual se separaron sus componentes mediante una columna de cromatografía al vacío, de 6 cm de altura y 4 cm de diámetro interno, como fase móvil se utilizó hexano, mezclas de hexano-acetato de etilo de polaridad creciente y

acetato de etilo, se colectaron 40 fracciones de 50 mL cada una y se reunieron las fracciones que presentaron el mismo perfil en cromatografía en capa fina.

De las fracciones eluidas con 100% de hexano se aislaron 2 g (0.066 %) de una mezcla de productos grasos, la cual fue analizada mediante CG/MS, la identificación de los productos se realizó mediante el análisis y comparación de los patrones de fragmentación, así como por el análisis de la base de datos del equipo. Identificándose de esta manera compuestos tales como el hexanal, ácido palmítico, 5 octadecino, entre otros.

Extracto de acetato de etilo

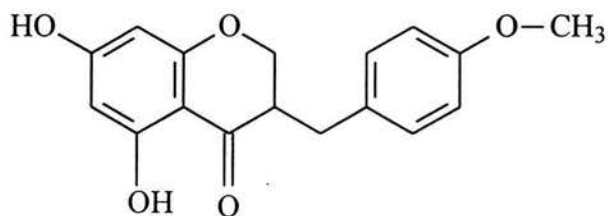
Después de la extracción con hexano, se secó el bagazo y se extrajo con 12 L de acetato de etilo durante 48 h (por triplicado), se concentró hasta sequedad a presión reducida, obteniendo 13.5 g (0.45 %) de extracto de acetato de etilo, que cuyos componentes se separaron siguiendo el procedimiento anteriormente descrito para el extracto hexánico, en esta separación se obtuvieron 100 fracciones de 50 mL cada una.

De las fracciones eluidas al 10 % de acetato de etilo-hexano, se obtuvieron 2 g (0.06%) de una mezcla de productos grasos. Se metilaron 100 mg de ésta mezcla, la reacción de metilación se realizó con dos mL de estearato trifluoruro de boro en agitación con un mL de metanol, la mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante 15 min, después de lo cual se dejó que la reacción alcanzara la temperatura ambiente y se analizó por cromatografía de gases. La muestra derivatizada se disolvió en metanol y los productos de reacción se identificaron por comparación de sus tiempos de retención, con los de

estándares. Se identificaron los siguientes compuestos: Palmítato de metilo, esterato de metilo y oleato de metilo.

Las fracciones eluidas con 10 % de acetato de etilo (500 mg) se purificaron en una columna relámpago, utilizando como fase móvil una mezcla de hexano-acetato de etilo al 10%, se obtuvieron 120 mg de un sólido blanco con punto de fusión de 138-142 °C. El espectro de masas muestra un M^+ a 300 uma. La rotación óptica específica fue de -39.5° .

Este compuesto fue denominado como Producto I. Por análisis de sus características espectroscópicas de RMN 1H y RMN ^{13}C este producto fue identificado como el 5, 7-dihidroxi-3-(4-metoxibencil)-4-cromanona.



Producto I

B) Estudio fitoquímico de las hojas de *Agave tequilana* Weber.

Se maceraron 640 g de hojas molidas y secas de *Agave tequilana* Weber con diferentes disolventes en orden creciente de polaridad: hexano, acetona y metanol. La maceración se realizó utilizando 12 L de cada disolvente durante 36 h (por triplicado). Cada extracto se concentró mediante destilación a presión reducida. Los pesos de cada uno de los extractos obtenidos, así como su equivalente en % con respecto al peso total de hojas utilizado se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 2. Extractos de las hojas de *Agave tequilana* Weber

Extracto	Peso (g)	% Peso
Hexánico	4.3	0.67
Acetónico	3.9	0.84
Metabólico	44.2	6.90

Extracto hexánico:

El fraccionamiento primario del extracto se realizó por una cromatografía en una columna al vacío de 6 cm de largo y un diámetro interno de 4 cm, se utilizó como fase móvil hexano, mezclas hexano-acetato de etilo y acetato de etilo, en orden creciente de polaridad. Se obtuvieron 54 fracciones de 100 mL.

De las fracciones eluidas con 100 % de hexano se obtuvo una mezcla no polar, que en ccf muestra un perfil cromatográfico igual al de la muestra obtenida del extracto hexánico del bagazo, ya anteriormente descrita.

De la fracciones 7-11, eluidas con 5% Acetato de etilo 95% hexano se aisló un mezcla de sitosterol/estigmasterol, que fueron identificados mediante ccf, mostrando un perfil cromatográfico igual al de un estándar.

Extracto acetónico:

Se realizó un fraccionamiento primario en columna a vacío bajo las mismas condiciones mencionadas para el extracto anterior. De la fracción 22 de dicho fraccionamiento, eluída con una mezcla hexano – acetato de etilo 50/50, se obtuvieron 8 mg de un sólido verde impuro (según su análisis en ccf), el cual se purificó mediante el empleo de CLAE en Fase Normal. Se asilaron 3 mg (0.00047 %) de un sólido blanco amorfo, que funde a 138-140 °C. El compuesto fue identificado y caracterizado como el 5, 7-dihidroxi-3-(4-metoxibencil)-4-cromanona, empleando técnicas, tales como: RMN ¹H, espectrometría de masas y espectroscopia de IR. Este compuesto es el mismo que se aisló y caracterizó del bagazo, y que se denominó producto I.

De la fracción 24-25 del extracto, eluído con una mezcla hexano - acetato de etilo 60/40, se obtuvieron 10 mg de un sólido amarillo, el cual, mediante ccf mostraba la presencia de dos productos polares con perfiles cromatográficos muy similares, los cuales destacaban por presentar una coloración rojiza después de ser revelados con Ce₂(SO₄)₃.

Para el aislamiento y purificación de los productos de interés se realizó un ensayo semipreparativo por CLAE en fase normal, aislándose un sólido blanco, el 7-Hidroxi-3-(4-hidroxibencil)-4-cromanona, que se denominó producto II (p.f 192-195 °C); y un sólido amarillo, el 5,7-dihidroxi-3-(4-hidroxibencil)-4-cromanona, que se denominó producto III (p.f 204-206 °C). Los tiempos de retención para estos compuestos fueron 4.0 y 6 min respectivamente. Ambos compuestos fueron caracterizados mediante RMN ^1H , espectroscopía de IR y espectrometría de masas. Las condiciones empleadas de λ y fase móvil para la purificación de los productos aislados por CLAE en el presente trabajo se muestran a continuación:

- Producto I:

- $\lambda_{(\text{abs UV})} = 270 \text{ nm}$.

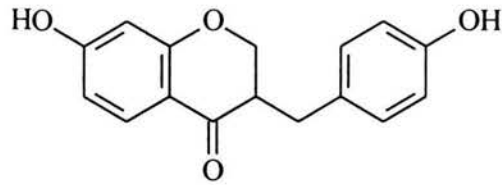
-Fase móvil: Se usó un gradiente con una mezcla n-hexano/AcOEt, empezando con una proporción de 70% hexano/30% AcOEt y después de 25 minutos con una relación de 30% hexano/70% AcOEt.

- Productos II y III:

- $\lambda_{(\text{abs UV})} = 400 \text{ nm}$.

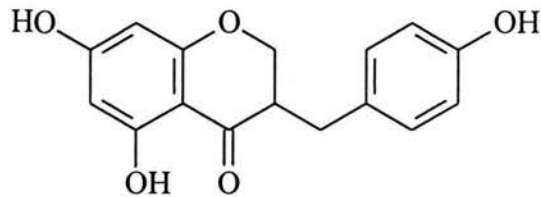
-Fase móvil: Se usó flujo isocrático 60% hexano/40% AcOEt

- 7-Hidroxi-3-(4-hidroxibencil)-4-cromanona (aislado anteriormente de *Dracaena draco*)³⁶:



Producto II

- 5,7-Hidroxi-3-(4-hidroxibenzil)-4-cromanona (aislado anteriormente de *Eucomis bicolor*):



Producto III

Extracto metanólico:

Acetilación del extracto metanólico:

Con la finalidad de facilitar el trabajo del extracto del extracto metanólico se realizó una reacción de acetilación que se realizó de la siguiente manera:

Se pesaron 44.2 g de acetato de sodio que se fundieron y disolvieron en anhídrido acético. Se pesaron 44.2 g de extracto metanólico que se disolvieron con anhídrido acético. Posteriormente el acetato de sodio disuelto se adicionó al extracto metanólico.

La reacción se llevó a reflujo durante 15 min, después de los cuales se adicionaron 20 g de hielo. La reacción se conservó en agitación durante 18 horas. El curso de la reacción se monitoreó por ccf.

Al término de la reacción se agregaron 10 mL de agua y se realizaron 3 extracciones con acetato de sodio. Las fracciones orgánicas se juntaron y lavaron con solución de NaHCO_3 y posteriormente con salmuera hasta pH 7. Las fracciones se secaron con NaSO_4 , se filtraron y concentraron a vacío.

El producto de reacción se separó mediante cromatografía en columna al vacío, como fase móvil se utilizó hexano, mezclas hexano-acetato de etilo y acetato de etilo, en orden creciente de polaridad. Se obtuvieron 54 fracciones de 250 mL. Se reunieron las fracciones que mostraron el mismo perfil por ccf. Las fracciones se analizaron por RMN ^1H , el análisis demuestra la presencia de mezclas de fructosa y glucosa acetiladas, así como la presencia de acetato de glicerina (fracciones 2-3, eluidas con una mezcla de hexano – acetato: 90:10).

Cabe mencionar que previo a la acetilación del extracto metanólico, se tomó una alícuota del extracto sin acetilar y se analizó por CLAE, identificándose con este análisis la presencia de fructuosa, sacarosa, glucosa e inulina, mediante la comparación de tiempos de

retención con estándares. Los detalles respecto al método analítico y las cantidades de cada carbohidrato identificado se reservan debido a la existencia de un contrato de secrecia con Allied – Domecq.

Características espectroscópicas de los productos aislados y caracterizados:

- 5, 7-dihidroxi-3-(4-metoxibencil)-4-cromanona (**Producto I**):

IR (v,cm⁻¹): 3384 (banda ancha), 2922, 2851, 1639, 1454.4, 1379.2,1270.9,1161 y 833.9.

Espectrometría de masas (uma): Por la técnica de IE, m/z (ión molecular): M⁺:300

RMN ¹H: (300 MHz, CDCl₃); δ (ppm) (J, multiplicidad, J (Hz), asignación): 12.1 (1H, s, OH-5), 7.14 y 6.86 (4H, sistema AA'BB', H-2' y H-6', H-3' y H-5'), 5.99 (1H, dd, 2.1, H-6), 5.93 (1H, d, 2.1, H-8), 4.28 (1H, dd, 11.7 y 3.9, H-2a), 4.11 (1H, dd, 11.7 y 6.6, H-2b), 3.8 (3H, s, O-CH₃), 3.17 (1H, dd, 13.2 y 3.6, H-7'a), 2.73 (1H, dd, 13.2 y 3.6, H-7'b), 2.81 (1 H, m, H-3).

- 7-Hidroxi-3-(4-hidroxibenzil)-4-cromanona (**Producto II**):

IR (v,cm⁻¹): 3415 (banda ancha), 2852.4, 1646.5, 1514.7, 1459.7, 1245, 1163.5 y 1019.1.

Espectrometría de masas (uma): Por la técnica de IE, m/z (ión molecular): M⁺:270

RMN ¹H: (300 MHz, CDCl₃); δ (ppm) (J, multiplicidad, J (Hz), asignación): 7.835 (1H, d, 8.7, H-5), 7.09 y 6.78 (4H, sistema AA'BB', H-2' y H-6', H-3' y H-5'), 6.52 (1H, dd, 8.7 y 2.4, H-6), 6.38 (1H, d, 2.4, H-8), 4.33 (1H, dd, 11.4 y 4.2, H-2a), 4.15 (1H, dd, 11.4 y 7.5, H-2b), 3.167 (1H, dd, 13.5 y 4.2, H-7'a), 2.654 (1H, dd, 13.5 y 10.8, H-7'b), 2.8 (1 H, m, H-3), 2.2 (banda ancha, OH's).

- 5,7-Hidroxi-3-(4-hidroxibenzil)-4-cromanona (**Producto III**):

IR (ν, cm^{-1}): 3384 (banda ancha), 2920.4, 2851.7, 1647.90, 1514.7, 1456.9, 1376.3, 1241.2, 1132.3, 850.6.

Espectrometría de masas (uma): Por la técnica de IE, m/z (ión molecular): M^+ :286

RMN ^1H : (300 MHz CDCl_3); δ (ppm) (J , multiplicidad, J (Hz), asignación): 12.1 (1H, s, OH-5), 7.1 y 5.99 (4H, sistema AA'BB', H-2' y H-6', H-3' y H-5'), 6.0 (1H, d, 2.4, H-6), 5.9, (1H, d, 2.4, H-8), 4.34 (1H, dd, 11.4 y 4.5, H-2a), 4.15 (1H, dd, 11.4 y 7.5, H-2b), 3.11 (1H, dd, 17.1 y 4.2, H-7'a), 2.8 (1H, m, 17,10.5 y 4.5, H-3), 2.65 (1H, dd, 17.1 y 10.5, H-7'b).

Discusión de Resultados.

a) Estudio fitoquímico del bagazo de *Agave tequilana* Weber.

Extracto hexánico.

De las fracciones eluídas con 100 % de hexano se aislaron 2 g de una mezcla de sólidos no polares, la cual se analizó por CG/MS, identificándose los componentes de la mezcla mediante el análisis y comparación de los patrones de fragmentación por medio de la base de datos del equipo. En la siguiente tabla se muestran los productos identificados, así como sus correspondientes tiempos de retención y % en áreas.

Tabla 3. Productos identificados por cromatografía de gases acoplada a masas.

Fracciones eluídas con 100 % de hexano.

T.R (minutos)	Fórmula Mínima	Compuesto propuesto	Área%
0.53	C ₆ H ₁₂ O	Hexanal	4.46
10.38	C ₁₀ H ₁₆ O	(E,E)-2,4-decadienal	0.98
18.45	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	Ester metílico del ácido 8-metil decanoico	0.89
19.46	C ₁₄ H ₁₂ O ₂	Fenilmetil ester del ácido benzoico	18.83
19.73	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	ácido palmítico	41.86
21.97	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Ácido (Z)-9-decenoico	18.36
22.24	C ₁₈ H ₃₄	5-octadecino	11.60

Extracto de acetato de etilo.

De las fracciones eluidas con 10 % de acetato de etilo-90% de hexano, se obtuvo una mezcla sólida de productos, que para facilitar su análisis por cromatografía de gases se metilo, el derivado fue disuelto en metanol y analizado por CG. Los productos de reacción se identificaron por comparación de sus tiempos de retención con los tiempos de retención de estándares. Los productos identificados, así como sus respectivos tiempos de retención y % en área se muestran en la tabla 3.

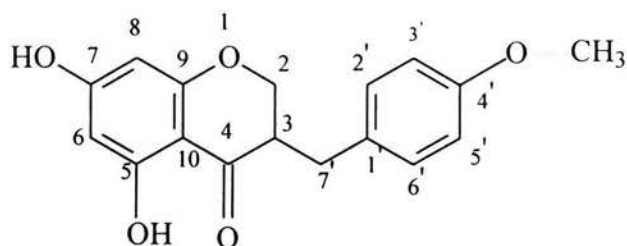
Tabla 4. Productos identificados por cromatografía de gases.

Producto	Tiempo de retención (min)	% de área
Palmítato de metilo	14.9985	43.069
Estearato de metilo	16.591	22.182
Oleato de metilo	16.836	34.749

Los productos reportados en las tablas 3 y 4, constituyen una contribución importante desde el punto de vista bibliográfico, pues como se menciono anteriormente y como se ha citado en otros trabajos, este tipo de compuestos contribuyen significativamente al olor y sabor característicos del tequila³⁴⁻³⁶. Por lo tanto esta información puede ser utilizada para posteriores trabajos relacionados con este propósito.

De las fracciones eluidas con 10% acetato de etilo - 90% de hexano por cromatografía Flash, se aislaron 120 mg de un sólido blanco con punto de fusión de 138-

142 °C y una rotación óptica específica de -39.5° (compuesto levogiratorio). Que se indentifico como producto I.



Producto I

El espectro de IR (espectro 1) de este compuesto obtenido de pastilla de KBr, presenta las siguientes señales características:

Tabla 5. Datos obtenidos por espectroscopía de IR del producto I.

Señales (cm^{-1})	Grupo Funcional
1161 y 1270.8	Éter (R-O-R').
1639.2	Carbonilo (C=O) de la γ -pirona.
1270.9 y 3384.3	Hidroxilo (OH).
758.4, 833.9, 1513.4 y 1713	Arilo (C_6H_6).
1379.2, 1454.4, 2851.17 y 2921.6	Metileno (CH_2).

En el espectro de masas obtenido por impacto electrónico se obtiene un ión molecular M^+ a 300 m/z, que corresponde a la fórmula $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_5$. (Espectro 2).

RMN-¹H:

En la siguiente tabla se resumen los datos obtenidos por RMN-¹H del producto I.

Posteriormente se realiza una justificación de los datos presentados.

Tabla 6. Datos obtenidos por RMN-¹H del producto I.

δ (ppm)	Integral \int	Multiplicidad	J (Hz)	Asignación
12.15	1	s	-	OH-5
7.14	2	AA'BB'	AA'BB'	H-2', H-6'
6.87	2	AA'BB'	AA'BB'	H-3', H-5'
5.99	1	d	2.1	H-6
5.92	1	d	2.1	H-8
4.27	1	dd	11.7, 3.9	H-2 ^a
4.11	1	dd	11.7, 6.6	H-2 ^b
3.8	3	s	-	OCH ₃ -4'
3.17	1	dd	13.2, 3.6	H-7'a
2.81	1	m	-	H-3
2.73	1	dd	13.2, 3.6	H-7'b

En el espectro de RMN-¹H (espectro 3) las señales a 7.14 y 6.86 ppm se identifican como un sistema de acoplamiento AA'BB', y se asignan a los protones H-2', H-6', H-3' y H-5' respectivamente; el sistema está constituido por un par de señales simétricas, donde cada una de ellas integra para dos hidrógenos y que corresponden al sistema aromático 1-4

disustituido. La presencia del grupo metoxilo sobre el C-4' ejerce un efecto de "protección" sobre los protones H-3' y H-5', lo que explica su desplazamiento a campo alto (6.86 ppm).

En 5.99 y 5.92 ppm se encuentra un sistema AB con constante de acoplamiento de 2.1 Hz que se asigna a H-6 y H-8, respectivamente.

Por otra parte hay tres señales: dos señales doble de dobles en 4.27 y 4.11, y una señal de multiplete en 2.81 ppm, respectivamente, que se encuentran acopladas entre sí. Este sistema de acoplamiento es conocido como ABX. La señal en 4.27 ppm es un doble de dobles con constantes de acoplamiento de 11.7 y 3.9, e integra para 1H. El desplazamiento químico de la señal es característico de un protón unido a un átomo de carbono que sostiene una función oxigenada (base de oxígeno). La señal en 4.11 es un doble de dobles que integra para 1H y con constantes de acoplamiento de 11.7 y 6.6. Ambas señales se asignan a los protones geminales H-2 y conformaran la parte AB del sistema de acoplamiento ABX

También se observan dos señales dobles de dobles en 3.16 y 2.73 ppm, que acoplados al multiplete ya mencionado en 2.81 ppm conforman otro sistema ABX (que será denominado como ABX-2). La señal en 3.167 ppm es un doble de dobles que integra para 1H y con constantes de acoplamiento de 13.2 y 3.6 Hz; mientras que la señal en 2.734 ppm es un doble de dobles que igualmente integra para 1H y tiene constantes de acoplamiento de 13.2 y 3.6 Hz. Ambas señales se asignan a los protones geminales H-7' y conformaran la parte AB del sistema ABX. El acoplamiento entre ambas señales se refleja por la $J = 13.2$ Hz, cuyo valor corresponde a una constante de acoplamiento entre dos protones geminales unidos a un sistema π . Por otro lado, con respecto a la señal multiplete en 2.81 ppm, se

distinguen constantes de acoplamiento de 3.6, 6.6 y 13.2, cuyos acoplamientos se asocian con los protones geminales H-2 y H-7', esta señal se asigna a H-3.

El acoplamiento de la señal en 4.111 ppm, es asignada a uno de los protones H-2 (**H-2b**) y la señal en 2.8135 ppm es asignada a H-3, cuyo carbono está unido a oxígeno, implica a la constante de acoplamiento $J = 6.6$ Hz, que es característica de un acoplamiento entre hidrógenos vecinos que se encuentran entre sí con una conformación *anti-periplanar* (con un ángulo diedro de aproximadamente 180°). De esta manera, se establece que ambos protones se encuentran en posiciones axiales. Del mismo modo el acoplamiento entre la señal a 4.272 ppm, asignada al otro protón H-2 (**H-2a**) y la señal a 2.8135 ppm asignada a H-3, que implica la constante de acoplamiento $J = 3.9$ Hz,. Lo cual indica que la conformación entre ambos protones es cercana a una conformación *synclinal* (con ángulo diedro de alrededor de 60°). Figura 1.

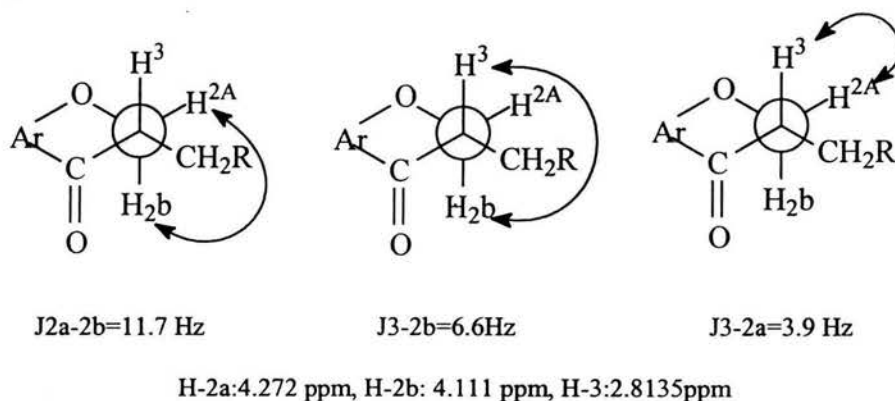


Figura 1. Constantes de acoplamiento del sistema ABX-1 del producto I.

El acoplamiento entre la señal a 2.734 ppm, asignada a uno de los protones H-7' (**H-7'b**) y la señal a 2.8135 ppm asignada a H-3, implica la constante de acoplamiento $J = 13.2$ Hz, que corresponde a un acoplamiento entre hidrógenos vecinos que se encuentran entre sí con una conformación *anti-periplanar* (con un ángulo diedro de aproximadamente 180°). Por lo que ambos protones se encuentran en posiciones axiales. En forma similar, el acoplamiento entre la señal a 3.167 ppm asignada al otro protón H-7' (**H-7'a**) y la señal a 2.8 ppm asignada a H-3, y una constante de acoplamiento de $J = 3.6$ Hz, indica que la conformación entre ambos protones es cercana a una conformación *Synclinal* (conformación con ángulo diedro de aproximadamente 60°). (figura 2).

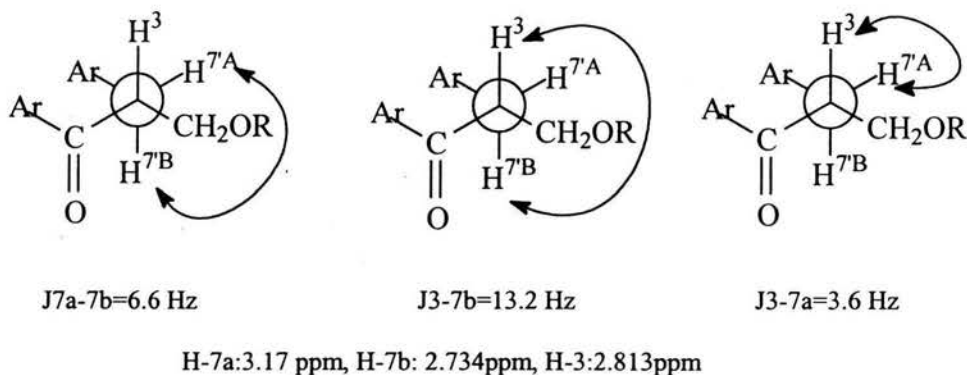


Figura 2. Constantes de acoplamiento del sistema ABX-2 del producto I.

Finalmente, en 3.8 ppm se observa una señal de singulete que integra para 3 y que se asigna a los protones del metoxilo en la posición 4' del sistema aromático 1-4 disustituido.

RMN-¹³C:

En la siguiente tabla se resumen los datos obtenidos por RMN-¹³C del producto I. Posteriormente se realiza una justificación de los datos presentados.

Tabla 7. Datos espectroscópicos de RMN-¹³C (300 MHz) del producto I.

δ (ppm)	Asignación	δ (ppm)	Asignación
197.88	C-4	102.563	C-10
164.57	C-4'	96.642	C-6
163.10	C-5	95.069	C-8
158.86	C-7	68.938	C-2
130.05	C-6' y C-2'	55.326	OCH ₃ en C-4'
129.74	C-1'	46.849	C-3
114.14	C-5' y C-3'	32.058	C-7'

En el espectro de RMN-¹³C (Espectro 4) se observan 14 señales. En la zona de campo bajo, a 197.887 ppm se tiene una señal que es característica de un carbono de carbonilo de cetona conjugada, asignada al C-4. Además se observan tres señales de carbono alifático (sp³); una a 69.938 ppm, característica de un átomo de carbono base de oxígeno, que se asigna al C-2, una a 55.326 que corresponde al carbono del metoxilo en C-4' y las otras dos señales a 46.849 y 32.058 ppm que se asignan a los C-3 y C-7' respectivamente.

Las señales restantes corresponden a los átomos de carbono aromáticos (sp^2) de los anillos A y B. Dentro de las señales se pueden distinguir tres grupos. Las señales de átomos de carbono aromáticos unidos a oxígeno: C-5 (163.104 ppm), C-7 (158.863 ppm) y C-4' (164.568 ppm), que por desplazamiento químico se encuentra a campo bajo debido a la desprotección que sufren por efecto inductivo al estar unidos a un átomo de oxígeno; las señales de los átomos de carbono sp^2 no protonados: C1' (129.04 ppm) y C10 (102.563 ppm), en donde C-10 se encuentra a campo alto por la protección de los átomos de oxígeno en posición *orto* (OH en 5 y OR en C-9) y en posición *para* (OH en C-7). Por último, a campo alto se tienen las señales de los átomos de carbono sp^2 unidos a hidrógeno: C-6 (96.642 ppm), C-8 (95.069 ppm) y los carbonos equivalentes: C-2' y C-6' (130.048 ppm) y C-3' y C-5' (114.142 ppm).

El análisis y la asignación de señales establece la estructura del producto I como el 5, 7-dihidroxi-3-(4-metoxibencil)-4-cromanona.

Cabe mencionar, que no se encontraron informes sobre el aislamiento de este compuesto en alguna otra planta. Por lo tanto se considera a este estudio como una contribución valiosa desde el punto de vista fitoquímico y posiblemente industrial ó médico, debido a que la literatura indica que compuestos estructuralmente similares al 5, 7-dihidroxi-3-(4-metoxibencil)-4-cromanona tienen actividad antitumoral y antiviral (anti-VIH)³². Lo cual, puede ser objeto de investigación para futuros trabajos con la finalidad de establecer la actividad biológica de este compuesto.

b) Estudio fitoquímico de las hojas de *Agave tequilana*. Weber.

Extracto hexánico.

De las fracciones eluidas con acetato de etilo 5% – hexano 95 % se aisló una mezcla no polar, identificada como una mezcla de estigmasterol y sitosterol. Esta mezcla fue identificada mediante comparación con un estándar en ccf, siendo los perfiles cromatográficos idénticos, utilizando como medio de elusión acetato de etilo – hexano 10:90.

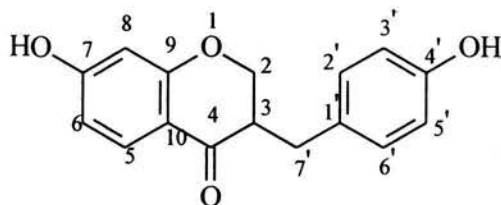
Extracto acetónico.

Producto I

De la fracción 22 del fraccionamiento primario por cromatografía en columna, eluída con acetato de etilo – hexano 40:60 , se obtuvo en primera instancia un sólido verde, cuyo perfil cromatográfico en ccf mostraba la presencia de impurezas, la fracción se purificó mediante el empleo de CLAE en Fase Normal. Obteniéndose un producto blanco amorfo, con punto de fusión de 138-140 °C, y con las mismas características espectroscópicas (RMN ¹H, espectroscopia de IR) y espectrometría de masas a las del compuesto identificado como I, descrito previamente en este trabajo y aislado del estudio del bagazo de *Agave tequilana* Weber. Dicho compuesto fue identificado como el 5, 7-dihidroxi-3-(4-metoxibencil)-4-cromanona.

Productos II y III.

De la fracciones 24 y 25 del fraccionamiento primario por cromatografía en columna, eluidas con acetato de etilo – hexano 40:60, se aisló una mezcla de dos productos con perfiles cromatográficos en ccf muy similares, usando como medio de elusión un sistema acetato de etilo – hexano 50:50. Debido a ello la separación y purificación de los productos se realizó mediante un ensayo semipreparativo por CLAE en fase normal. Con un tiempo de retención de 4.0 min se obtuvo un sólido blanco, con punto de fusión 192-195 °C, el cual se identificó como producto II.



Producto II

El espectro de IR (Espectro 6) de este compuesto obtenido en película de CHCl_3 , presenta las siguientes señales características:

Tabla 8. Datos obtenidos por espectroscopía de IR del producto II.

Señales (cm^{-1})	Grupo Funcional
1019.1, 1163.5 y 1244.5	Éter (R-O-R').
1646.6	Carbonilo (C=O) de la γ -pirona.
3415.2	Hidroxilo (OH).
1514.7	Ariilo (C_6H_6).
1459.7, 2852.4	Metileno (CH_2).

En el espectro de masas obtenido por impacto electrónico se obtiene un ión molecular M^+ a 270 m/z, que corresponde a una fórmula $C_{16}H_{14}O_4$. (Espectro 5).

En la siguiente tabla se resumen los datos obtenidos por RMN- 1H del producto II. Posteriormente se describe la justificación de los datos presentados.

Tabla 9. Datos obtenidos por RMN- 1H del producto II

δ (ppm)	Integral \int	Multiplicidad	J (Hz)	Asignación
7.83	1	d	8.7	H-5
7.09	2	AA'BB'	AA'BB'	H-2', H-6'
6.78	2	AA'BB'	AA'BB'	H-3', H-5'
6.52	1	dd	8.7, 2.4	H-6
6.38	1	d	2.4	H-8
4.33	1	dd	11.4, 4.2	H-2a
4.15	1	dd	11.4, 7.5	H-2b
3.17	1	dd	13.5, 4.2	H-7'a
2.8	-	m	-	H-3
2.65	1	dd	13.5, 10.8	H-7'b

En el espectro de RMN- 1H (espectro 7) las señales a 7.09 y 6.78 ppm se identifican como un sistema de acoplamiento AA'BB', y se asignan los protones H-2', H-6' y H-3' y H-5' respectivamente; el sistema está constituido por un par de señales simétricas, donde cada una de ellas integra para dos hidrógenos y corresponde al sistema aromático 1-4

disustituido. La presencia del grupo hidroxilo sobre el C-4' ejerce un efecto de "protección" sobre los protones H-3' y H-5', que explica su desplazamiento a campo alto a 6.780 ppm.

Por otra parte, en 7.83 se encuentra una señal doble que integra para 1 hidrógeno con una constante de acoplamiento de 8.7 Hz, asignada a H-5, pues la constante de acoplamiento corresponde a un acoplamiento en orto con H-6.

En 6.52 ppm se encuentra una señal doble de dobles con constantes de 8.4 y 2.4 Hz, que integra para 1H. Esta señal se asigna a H-6, debido a que la constante de 8.4 es característica de un acoplamiento en orto (con H-5), así como la constante de 2.4 corresponde a un acoplamiento en meta (con H-8).

En 6.38 se observa una señal doble que integra para 1H y una constante de acoplamiento de 2.1 Hz, la cual, y como se menciona es característica de protones acoplados en meta por lo que esta señal se asigna a H-8 (acoplamiento con H-6).

Por otra parte se hay tres señales, dos doble de dobles en 4.335 y 4.150 ppm, y un multiplete en 2.8 ppm, respectivamente, que se encuentran acopladas entre sí. Este sistema de acoplamiento es conocido como ABX. La señal en 4.33 ppm es un doble de dobles con constantes de acoplamiento de 11.4 y 4.2, e integra para 1H. El desplazamiento químico de la señal es característico de un protón unido a un átomo de carbono que sostiene una función oxigenada (base de oxígeno). La señal en 4.15 es un doble de dobles que integra para 1H con constantes de acoplamiento de 11.4 y 7.5. Ambas señales se asignan a los protones geminales H-2 y conformarán la parte AB del sistema de acoplamiento ABX.

También se observan dos señales dobles de dobles en 3.17 y 2.65 ppm, que acoplados a la señal multiplete ya mencionado en 2.8 ppm forman otro sistema ABX (sistema ABX-2). La señal en 3.17 ppm es un doble de dobles que integra para 1H y con constantes de acoplamiento de 13.5 y 4.2 Hz; mientras que la señal en 2.65 ppm es un doble de dobles que igualmente integra para 1H con constantes de acoplamiento de 13.5 y 10.8 Hz. Ambas señales se asignan a los protones geminales H-7' y formaran la parte AB del sistema ABX. El acoplamiento entre ambas señales se refleja por la $J = 13.5$ Hz, cuyo valor corresponde a una constante de acoplamiento entre dos protones geminales unidos a un sistema pi. Por otro lado, se observa multiplete en 2.8 ppm, el cual se asigna a H-3.

El acoplamiento entre la señal a 4.15 ppm asignada a uno de los protones H-2 (**H-2b**) y la señal a 2.8 ppm asignada a H-3, tiene una constante de acoplamiento $J = 7.5$ Hz, característica de un acoplamiento entre hidrógenos vecinos que se encuentran entre sí con una conformación *anti-periplanar* (con un ángulo dihedral de aproximadamente 180°). De esta manera, se establece que ambos protones se encuentran en posiciones axiales. Del mismo modo el acoplamiento entre la señal a 4.335 ppm, asignada al otro protón H-2 (**H-2a**) y la señal a 2.8 ppm asignada a H-3, con constante de acoplamiento $J = 4.2$ Hz, indica que la conformación entre ambos protones es cercana a una conformación *synclinal* (conformación *gauche*, con ángulo diedro de aproximadamente 60°). (figura 3).

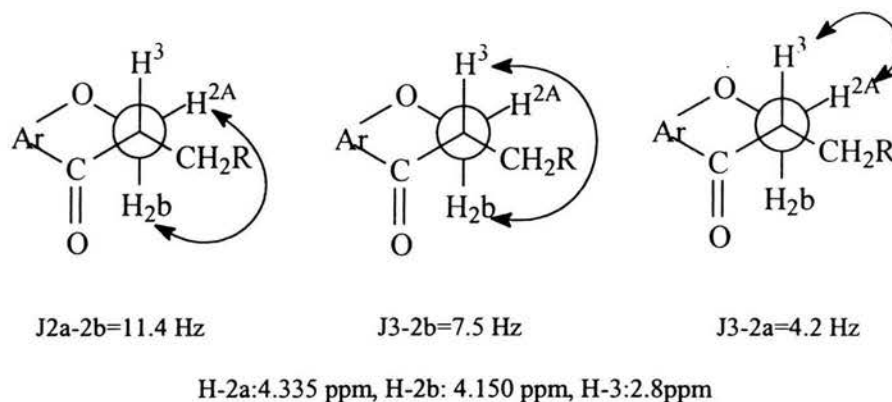


Figura 3. Constantes de acoplamiento del sistema ABX-1 del producto II.

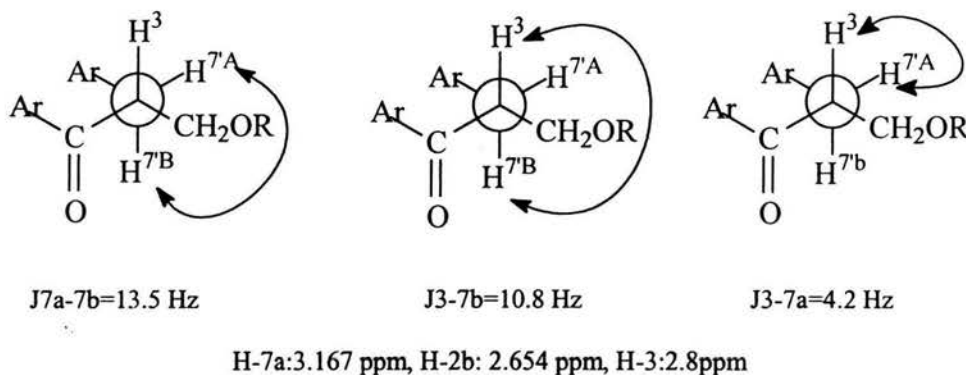


Figura 4. Constantes de acoplamiento del sistema ABX-2 del producto II.

El acoplamiento entre la señal a 2.654 ppm, asignada a uno de los protones H-7' (H-7'b) y la señal a 2.8 ppm asignada a H-3, implica la constante de acoplamiento $J = 10.8 \text{ Hz}$, que corresponde a un acoplamiento entre hidrógenos vecinos que se encuentran entre sí con una conformación *anti-periplanar* (con un ángulo diedro de aproximadamente 180°). De forma similar el acoplamiento entre la señal a 3.167 ppm asignada al otro protón H-7' (H-7'a) y la señal a 2.8 ppm asignada a H-3, que implica la constante de acoplamiento de $J =$

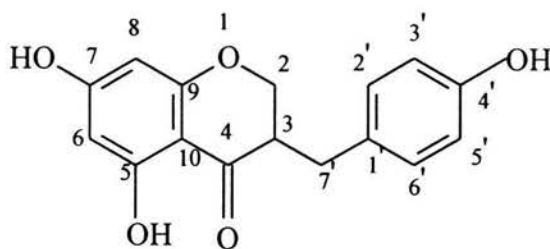
4.2 Hz, indica que la conformación entre ambos protones es cercana a una conformación *synclinal* (conformación con ángulo diedro de aproximadamente 60 °. (figura 4).

Con el anterior análisis el producto II fue caracterizado como el 7-hidroxi-3-(4-hidroxibencil)-4-cromanona.

Cabe mencionar que este compuesto ya fue aislado y caracterizado con anterioridad de la especie *Dracaena draco* (*Liliaceae*)³², que pertenece al mismo orden taxonómico del cual proviene *Agave tequilana* Weber. Por lo que no puede considerarse extraño el aislamiento de este tipo de compuestos en las hojas de *Agave tequilana* Weber.

Es importante señalar que los resultados obtenidos por las diversas técnicas espectroscópicas de este homoisoflavonoide (producto II) correspondientes a la espectroscopia de IR y espectrometría de masas son iguales a lo reportado por Camarda-Merlini-Nausini³². Y son muy similares con respecto a los resultados obtenidos en RMN-¹H, debido a que que los autores Camarda-Merlini-Nausini³² emplearon un equipo de 60 Mhz (menor dispersión de campo con respecto al usado para este trabajo), además de que utilizaron acetona deuterada como disolvente, por lo que los desplazamientos químicos mostrados varían un poco con respecto a los reportados en este trabajo. Finalmente el punto de fusión reportado por los autores es igual al determinado en el presente trabajo.

Del mismo ensayo preparativo por CLAE del cual se obtuvo el producto II, con un tiempo de retención de 6.0 min se obtuvo un sólido amarillo, el cual se identificó como producto III.



Producto III.

En el espectro de masas obtenido por impacto electrónico se obtiene un ión molecular M^+ a 286 m/z, que corresponde a una fórmula $C_{16}H_{14}O_5$. (Espectro 8).

El espectro de IR (espectro 9) de este compuesto obtenido en película de $CHCl_3$, presenta las siguientes señales características:

Tabla 10. Datos obtenidos por espectroscopía de IR del producto I.

Señales (cm^{-1})	Grupo Funcional
1132.3 y 1241.2	Éter (R-O-R').
1647.9	Carbonilo (C=O) de la γ -pirona.
3383.60	Hidroxilo (OH).
798, 850.6, 1514.7 y 1605	Arilo (C_6H_6).
1376.3, 1456.9, 2851.7 y 2920.4	Metileno (CH_2).

En la siguiente tabla se resumen los datos obtenidos por RMN-¹H del producto III.

Posteriormente se hace una justificación de los datos presentados.

Tabla 11. Datos obtenidos por RMN-¹H del producto III.

δ (ppm)	Integral ∫	Multiplicidad	J (Hz)	Asignación
12.1	1	s	-	OH-5
7.33	2	AA'BB'	AA'BB'	H-2', H-6'
6.88	2	AA'BB'	AA'BB'	H-3', H-5'
6.002	1	d	2.4	H-6
5.987	1	d	2.4	H-8
4.337	1	dd	11.4, 4.5	H-2a
4.149	1	dd	11.4, 7.5	H-2b
3.108	1	dd	17.1, 4.2	H-7'a
2.8	-	m	-	H-3
2.654	1	dd	17.1, 10.5	H-7'b

En el espectro de RMN-¹H del producto III (espectro 10), a diferencia de lo observado en el espectro de RMN-¹H del producto II, se distingue una señal de singulete a 12.1 ppm que integra para un hidrógeno y se asigna al protón del OH unido a C-5, éste protón se encuentra "quelatado" (formando un puente de hidrógeno), es decir, interacciona electrostáticamente con el oxígeno del grupo carbonilo, lo que provoca un efecto de desprotección sobre el protón, dando lugar a que el desplazamiento químico de la señal se encuentre a campo muy bajo.

En el espectro las señales a 7.33 y 6.88 ppm se identifican como un sistema de acoplamiento AA'BB', y se asignan los protones H-2', H-6' y H-3' y H-5' respectivamente; el sistema está constituido por un par de señales simétricas, donde cada una de ellas integra para dos hidrógenos y corresponde a la sustitución aromática del anillo B. La presencia del grupo hidroxilo sobre el C-4' ejerce un efecto de "protección" sobre los protones H-3' y H-5', razón por la que se encuentran desplazados a campo alto (6.88 ppm).

En 6.0 y 5.99ppm se observa un sistema AB con una constantes de acoplamiento de 2.4 Hz, y que se asigna a H-6 y H-8, respectivamente.

Por otra parte se observan tres señales, dos doble de dobles en 4.337 y 4.149, y un multiplete en 2.8 ppm acopladas entre sí. Lo cual constituye un sistema ABX, similar al del producto II. (Figura 5).

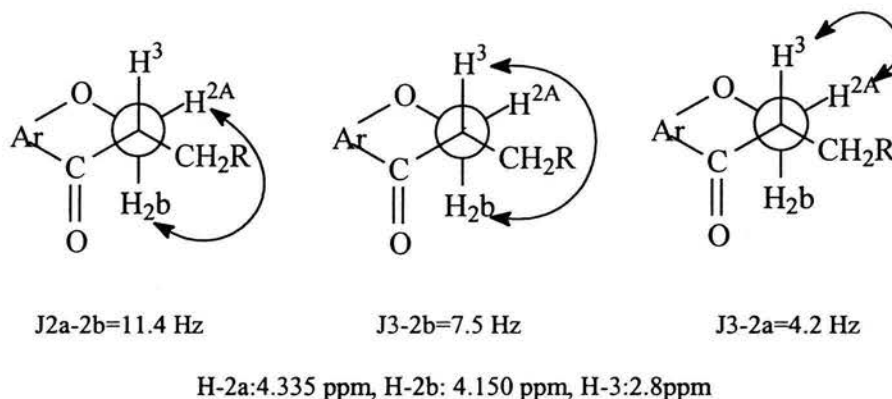


Figura 5. Constantes de acoplamiento del sistema ABX-1 del producto III

También se observan dos dobles de dobles en 3.11 y 2.65 ppm, que acoplados al multiplete en 2.8 ppm conforman otro sistema ABX. La señal en 3.17 ppm es un doble de dobles que integra para 1H con constantes de acoplamiento de 17.1 y 4.2 Hz, mientras que la señal en 2.65 ppm es un doble de dobles que igualmente integra para 1H y que tiene constantes de acoplamiento de 17.1 y 10.5 Hz. Ambas señales se asignan a los protones geminales H-7' y conformaran la parte AB del sistema ABX. El acoplamiento entre ambas señales se refleja por la $J = 17$ Hz, cuyo valor corresponde a una constante de acoplamiento entre dos protones geminales unidos a un sistema π . La señal de multiplete en 2.8 ppm se asigna a H-3.

Por otro lado, el acoplamiento entre la señal a 2.654 ppm, asignada a uno de los protones H-7' (**H-7'b**) y la señal a 2.8 ppm asignada a H-3, implica la constante de acoplamiento $J = 10.5$ Hz, que corresponde a un acoplamiento entre hidrógenos vecinos que se encuentran entre sí con una conformación *anti-periplanar* (con un ángulo diedro de aproximadamente 180°). De forma similar el acoplamiento entre la señal a 3.108 ppm asignada al otro protón H-7' (**H-7'a**) y la señal a 2.8 ppm asignada a H-3, con constante de acoplamiento de $J = 4.2$ Hz, indica que la conformación entre ambos protones es cercana a una conformación *synclinal* (conformación con ángulo diedro de aproximadamente 60°). (figura 6).

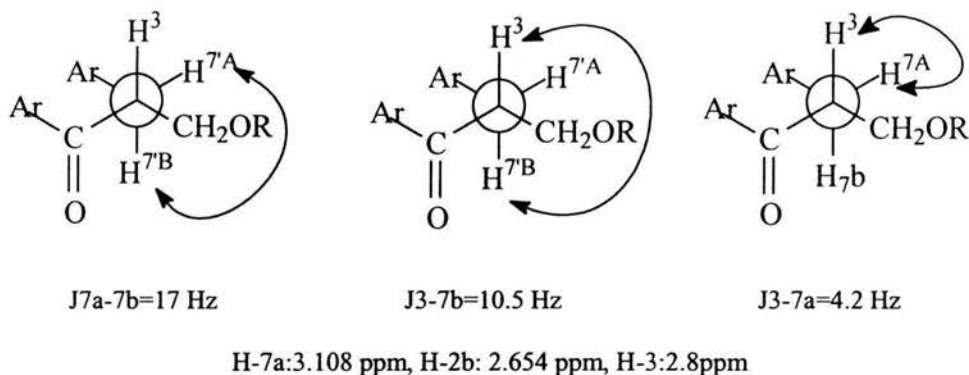


Figura 6 . Constantes de acoplamiento del sistema ABX-2 del producto III.

Extracto Metanólico.

Una vez que se obtuvo el extracto metanólico se realizó una ccfc con este, la cual mostró un perfil cromatográfico con compuestos muy polares, los cuales se corrieron junto a estándares de carbohidratos (glucosa, sacarosa y fructosa). La cromatoplaqueta del extracto mostró un perfil cromatográfico idéntico al de los estándares, por lo que, tal como se esperaba había una mezcla de carbohidratos presentes en el extracto metanólico.

Para corroborar lo anterior, se llevó a cabo el correspondiente análisis por CLAE con una alícuota del extracto metanólico, utilizando como referencia estándares de glucosa, sacarosa, fructosa e inulina, este último un polímero de fructosa y una unidad de glucosa, y el cual tiene relevancia industrial. En el apéndice se muestra el cromatograma de los carbohidratos identificados (cromatograma 1).

Después de que se identificó la presencia de carbohidratos en el extracto metanólico, se acetilo con la finalidad de facilitar la separación de sus componentes por columna abierta.

Se obtuvieron 54 fracciones de 250 mL cada una, de las cuales la mayor parte mostró el mismo perfil cromatográfico por cc. Las que se analizaron por cc utilizando como referencia mezclas de carbohidratos acetilados plenamente identificados, mostrando perfiles cromatográficos iguales. Además se obtuvieron los espectros de RMN- ^1H que se compararon con los obtenidos de los carbohidratos utilizados como referencia; identificándose de esta forma la presencia de mezclas de glucosa y fructosa acetiladas.

Así, esta información constituye una importante contribución para futuros trabajos a realizar, con una aplicación industrial referente al uso de las hojas de *Agave tequilana* **Weber** como fuente de carbohidratos para la producción de alcohol, y así darle un uso práctico a esta parte de la planta, que se produce en gran cantidad como subproducto del proceso del tequila y que generalmente es desechada.

Conclusiones.

- Se realizó el estudio fitoquímico de las hojas y el bagazo *Agave tequilana Weber*, del cual se aislaron y caracterizaron compuestos tipo flavonoide, que de acuerdo a la literatura pueden ser objeto de estudio para otros trabajos con el propósito de establecer su actividad biológica.
- Se aislaron y caracterizaron los siguientes homoisoflavonoides: el 5, 7-dihidroxi-3-(4-metoxibencil)-4-cromanona, el 7-Hidroxi-3-(4-hidroxibencil)-4-cromanona y el 5,7-dihidroxi-3-(4-hidroxibenzil)-4-cromanona .
- La caracterización de dichos productos se realizó mediante el empleo de diferentes técnicas, tales como: RMN (^1H y ^{13}C), espectroscopia de IR y espectrometría de masas. Así como la purificación de los productos se facilito mediante el empleo de CLAE.
- Se aisló y caracterizó un compuesto nuevo. Este compuesto es el 5, 7-dihidroxi-3-(4-metoxibencil)-4-cromanona, lo cual constituye una contribución al conocimiento de la Fitoquímica de la planta.
- Por medio de la técnica de CG/MS se identificaron productos tipo estéres y ácidos grasos, los cuales podrían tener relevancia con respecto al sabor y olor del tequila, que constituye una contribución bibliográfica para futuros trabajos a realizar con este enfoque.
- Mediante el empleo de CLAE se identifico la presencia de carbohidratos en las hojas de *Agave tequilana Weber*, los cuales son importantes en el proceso de elaboración de bebidas alcohólicas.

Bibliografía.

1. G. Iñiguez-Covarrubias. "Utilization of by products from the tequila industry: part 1: Agave bagasse as a raw material for animal feeding and fiberboard production". *Bioresource Technology*, vol. 77, pp:25-32, año 2001.
2. G. Iñiguez-Covarrubias. "Utilization of by products from the tequila industry: part 2: potential value o Agave tequilana Weber azul leaves". *Bioresource Technology*, vol. 77. pp:101-108, Año 2001.
3. Mancilla N.A. "Mallard Compounds generated during thermal process of Agave tequilana Weber var. azul". *Biotechnología e Ingeniería Genética de plantas*, Cinvestav-IPN Irapuato, Guanajuato; reporte annual al IFT. 1999.
4. G. Blunden, A. Carabot and K. Jewers. "Steroidal Sapogenins from leaves of some species of *Agave* and *Furcraea*". *Phytochemistry*, Pergamon Press Ltd., vol. 19,pp. 2489-2490. 1980.
5. V.S. Parmar, H.N. Jha, A.K. Gupta and A.K. Prasad. "Agamanone, a flavanone from *Agave americana*". *Phytochemistry*, Vol. 31, No. 7, pp. 2567-2568, 1992.
6. B. Wilkomiriski, V. A. Bobeyko and P. K. Kintia. "New steroidal saponins of *Agave americana*". *Phytochemistry*, Vol. 14, pp. 2567-2559, 1975.

7. H. Rodríguez, A. P. Cerda, J.A. Burciaga-Nava. M.A. Reyes-Romero. "Antifibrogenetic effect of amole tuber (*Agave sp.*) in experimental cirrhosis and its antioxidant and scavenging properties". Instituto Mexicano del Seguro Social, Durango, Dgo, México.
8. Yi Ding, Yan-Yong Chen, De-Zu Wang and Chong-Ren Yang. "Steroidal saponins from a cultivated form of *Agave sisalana*". *Phytochemistry*, Vol. 28, No. 10, pp. 2787-2791, 1992.
9. G.C. Uniyal, P.K. Agrawal, R.S. Thakur and O.P. Sati. "Steroidal glycosides from *Agave Cantala*". *Phytochemistry*, Vol. 29, No. 3, pp. 937-940, 1990.
10. G. Pant, O.P. Sati, K. Miyahara and T. Kawasaki. "Spirostanol glycosides from *Agave Cantala*". *Phytochemistry*, Vol. 25, No. 6, pp. 1491-1492, 1986.
11. S.C. Sharma and O.P. Sati. "A spirostanol glycoside from *Agave Cantala*". *Phytochemistry*, Vol. 21, No. 7, pp. 1820-1821, 1982.
12. D.C.Jain. "Gitogenin-3-O- -D-Laminarebioside from the aerial part of *Agave Cantala*". *Phytochemistry*, Vol. 26, No. 6, pp. 1789-1790, 1987.
13. M.D. García, A.M. Quílez, M.T. Sáenz, M.E. Martínez, R. de la Puerta. "Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. And *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional medicine". *Journal of Ethnopharmacology* vol. 71, pp: 395-400, 2000.

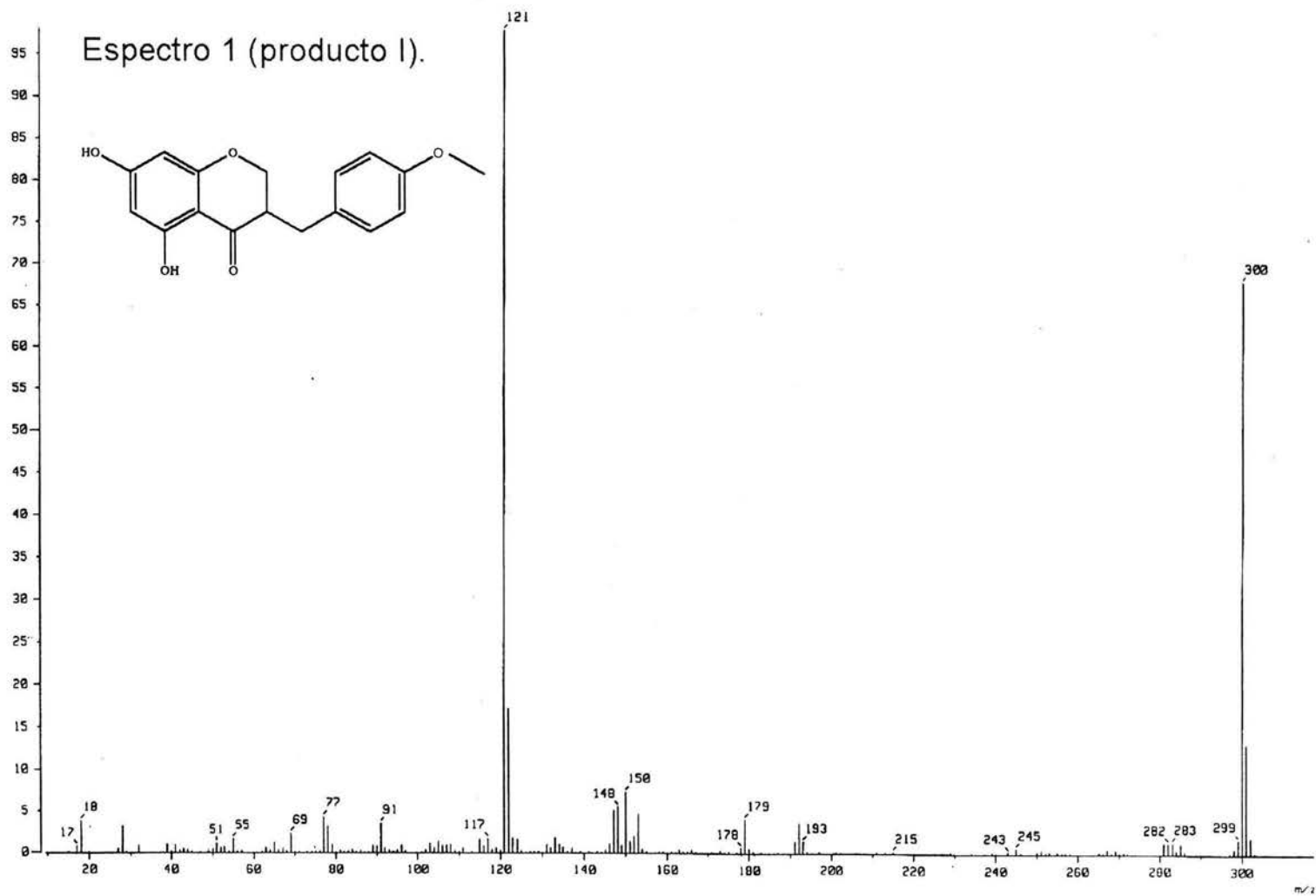
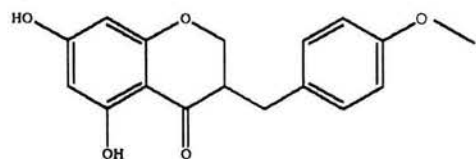
14. Harborne, J.B., Mabry, T.J. "The flavonoids". Chapman and Hall, London, 1975.
15. D. Granados, "Los agaves en México". Imprenta universitaria de la Universidad autonoma de Chapingo, pp. 1-41, 99-114, 1999.
16. Rico, B. "La Historia del Tequila se entrelaza con la historia de México". Bebidas Mexicanas; vol 5, No. 1; pp:4-6, Feb-Mar 1996.
17. Enciclopedia de México. Compañía Editora de enciclopedias de México S.A. de C.V. SEP. Tomo XIII, pp:7656-7660.
18. Garduño, A. "Proceso de la elaboración del tequila".vol 5, No.1; pp:10-13, Feb-Mar 1996.
19. Garduño,A. "Defensa de la denominación de Origen del Tequila"vol. 5, No 1; pp:7-9; Feb-Mar 1996.
20. Rico, B.F., "El tequila, una bebida Mexicana de fama internacional". Bebidas mexicanas. Vol. 4, No. 1; pp:14, Dic 1995.
21. Cedeño, C. M; "Tequila Production". Critical reviews in Biotechnology, vol. 15, No. 1; pp:1-11, 1995.
22. Rico Tavera G. "¿Otra copita?". Revista Expansión: septiembre 1, No 773; pp 13, 1999.

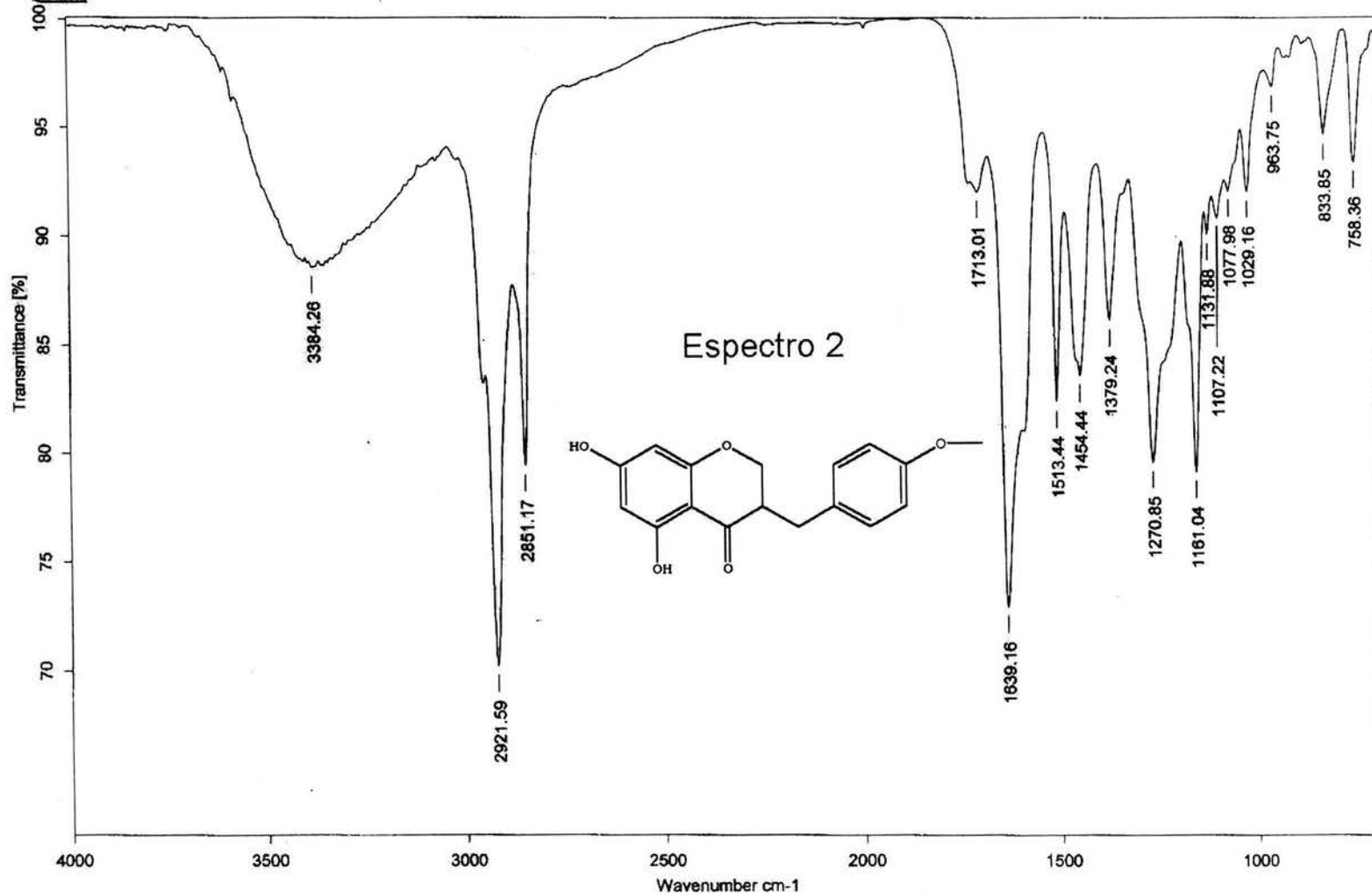
23. Rico Tavera G. "El tequila no es moda pasajera". Revista Expansión, No. 773, pp-33, 1999.
24. Rico Tavera G. "Otra de tequila ". Revista Expansión, No 777, pp-37, septiembre 1999.
25. Rico Tavera G. "Tequila sobre rieles ". Revista Expansión, No 777, pp:158-159, septiembre 1999.
26. Pérez Alejo V. "El tequila, bebida tradicional". Revista Época, pp 66-71, , noviembre 16, 1998.
27. G. Idarraga. "Pulpa and paper from blue Blue Agave Waste from Tequila production". Journal of Agricultural Food Chemistry. Vol 47, pp:4450-4455. 1999.
28. Meksuriyen, Cordell. "Flavonoid derivates from *Dracaena loureri* (Agavaceae)". Journal of the Science Society of Thailand. Vol. 14. pp:3-24.1988.
29. P. Berthet. "Biochemical contrutions to de definition of the Agavaceae". Lettres botaniques. Vol. 307. pp: 4-5. 1985.
30. Subramanian, S. Sankara. "Chorogenin and kaempferol glycosides from flowers of *Agave americana*". Phitochemistry Vol. 9. pp: 12. 1970.

31. Horavova P, Machala M. " Chemoprotective potenciales of homoisoflavonoids and chalcones of *Dracaena cinnabari*: modulations of drug-metabolizing enzymes and antioxidant activity". *Phytotherapy research*. Vol. 15. pp: 114-118. 2001.
32. Manthey, A: "Advances in experimental medicine and Biology. Vol. 439. Flavonoids in the living system".2002.
33. Camarda, L., Marlini L, Nansini G: "Dragon's Blood from *Dracaena Draco*, structure of novel homoisoflavonoids". *Heterocycles*, Vol. 20, No. 1, 1983.
34. Santillan, V., "Caracterización del Tequila por Cromatografía de Gases". Tesis de Maestría, UNAM. Facultad de Química, 1998.
35. Franco, S. M., "Desarrollo del Perfil de sabor del Tequila". Tesis de licenciatura, UNAM. Facultad de Química. UNAM.
36. Covarrubias, M.A., "Identificación y cuantificación de ésteres etílicos de tequila por Cromatografía de Gases Capilar. Tesis de Licenciatura, UNAM. Facultad de Química. UNAM. 2000.

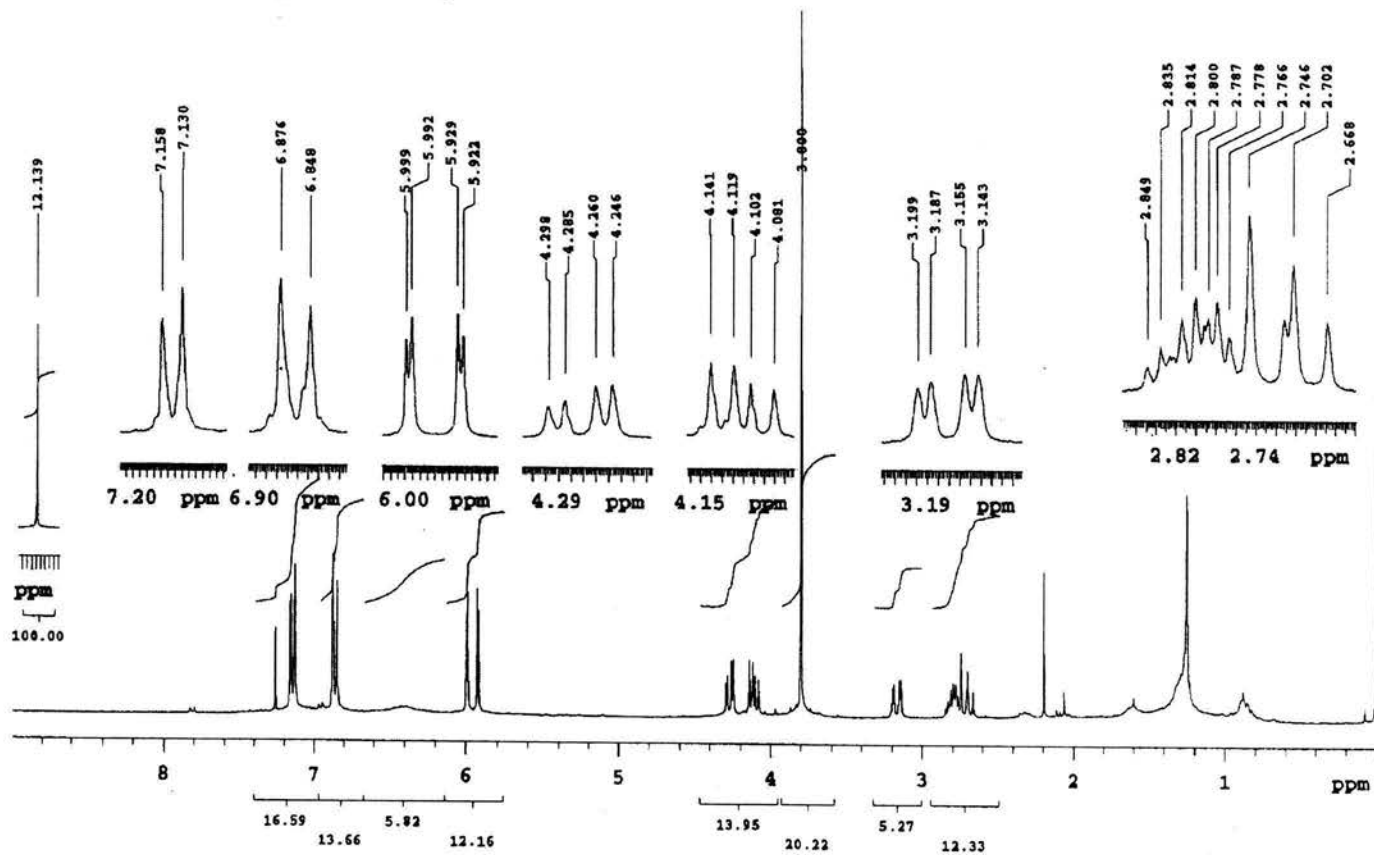
APÉNDICE

Espectro 1 (producto I).

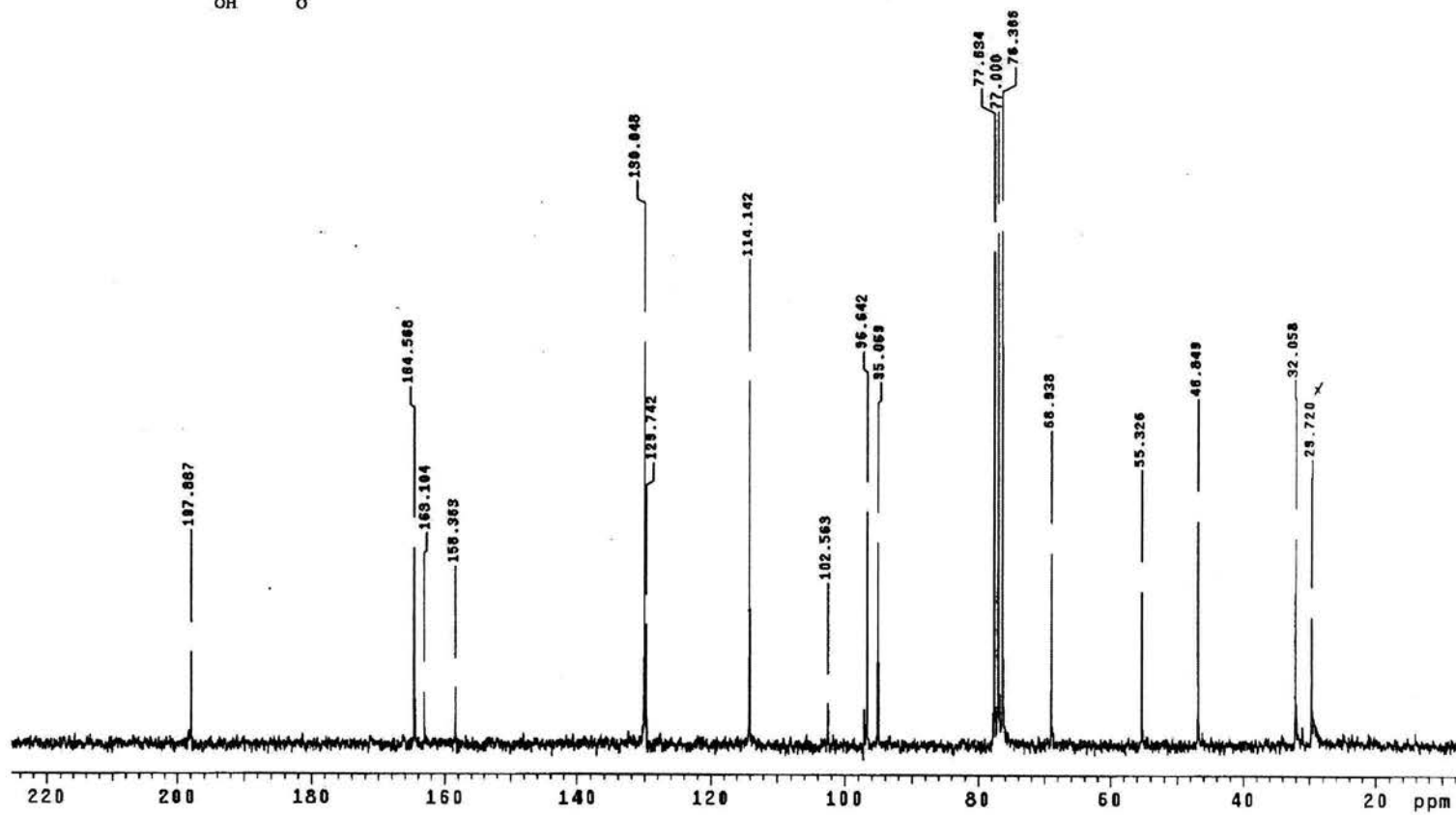
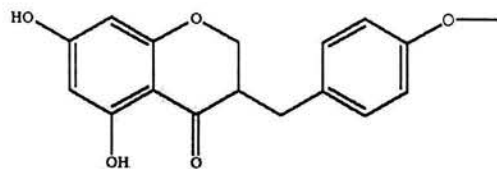




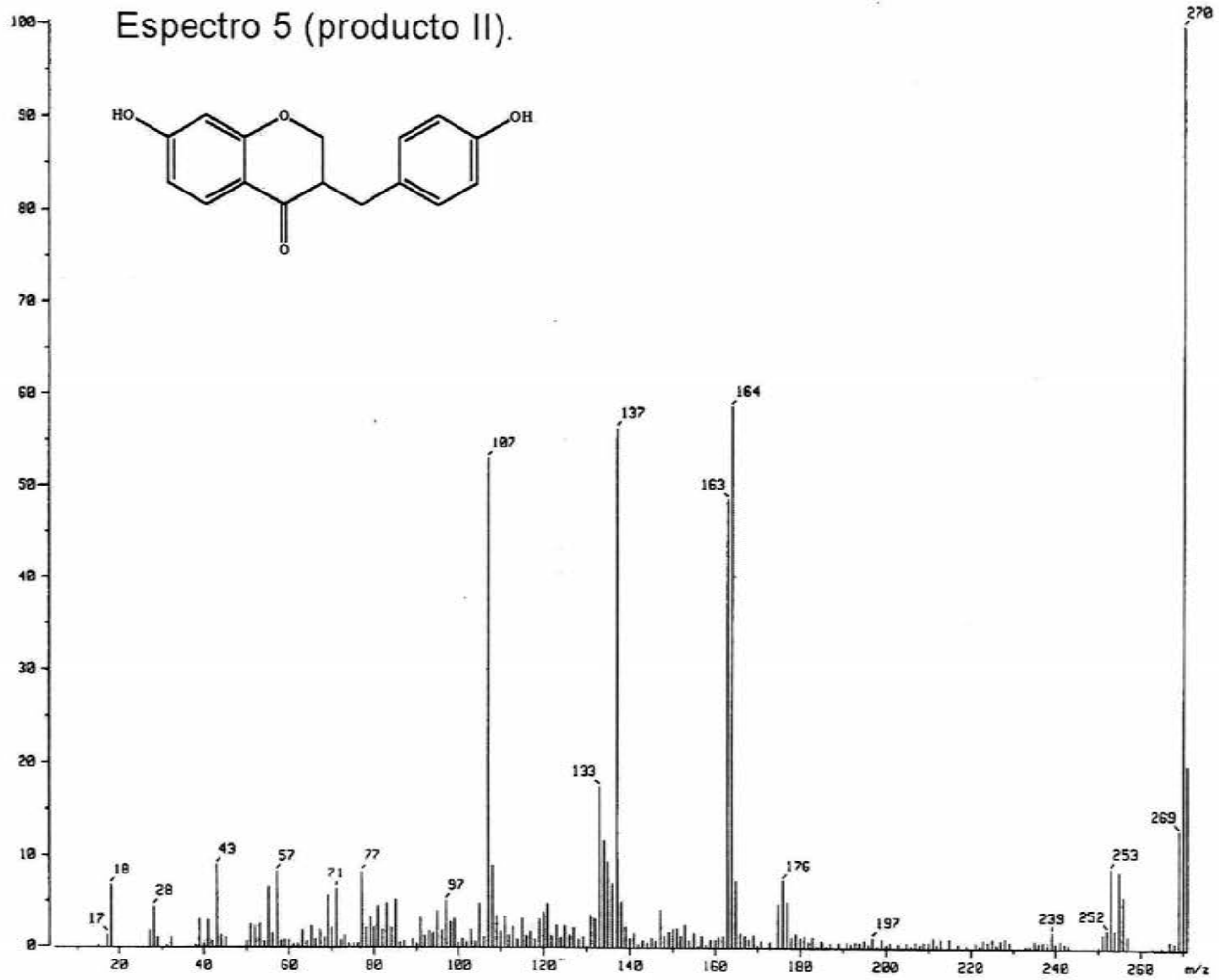
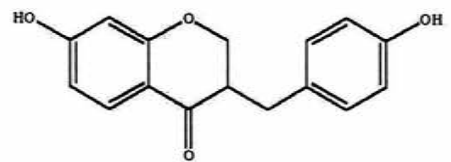
Espectro 3 (producto I).

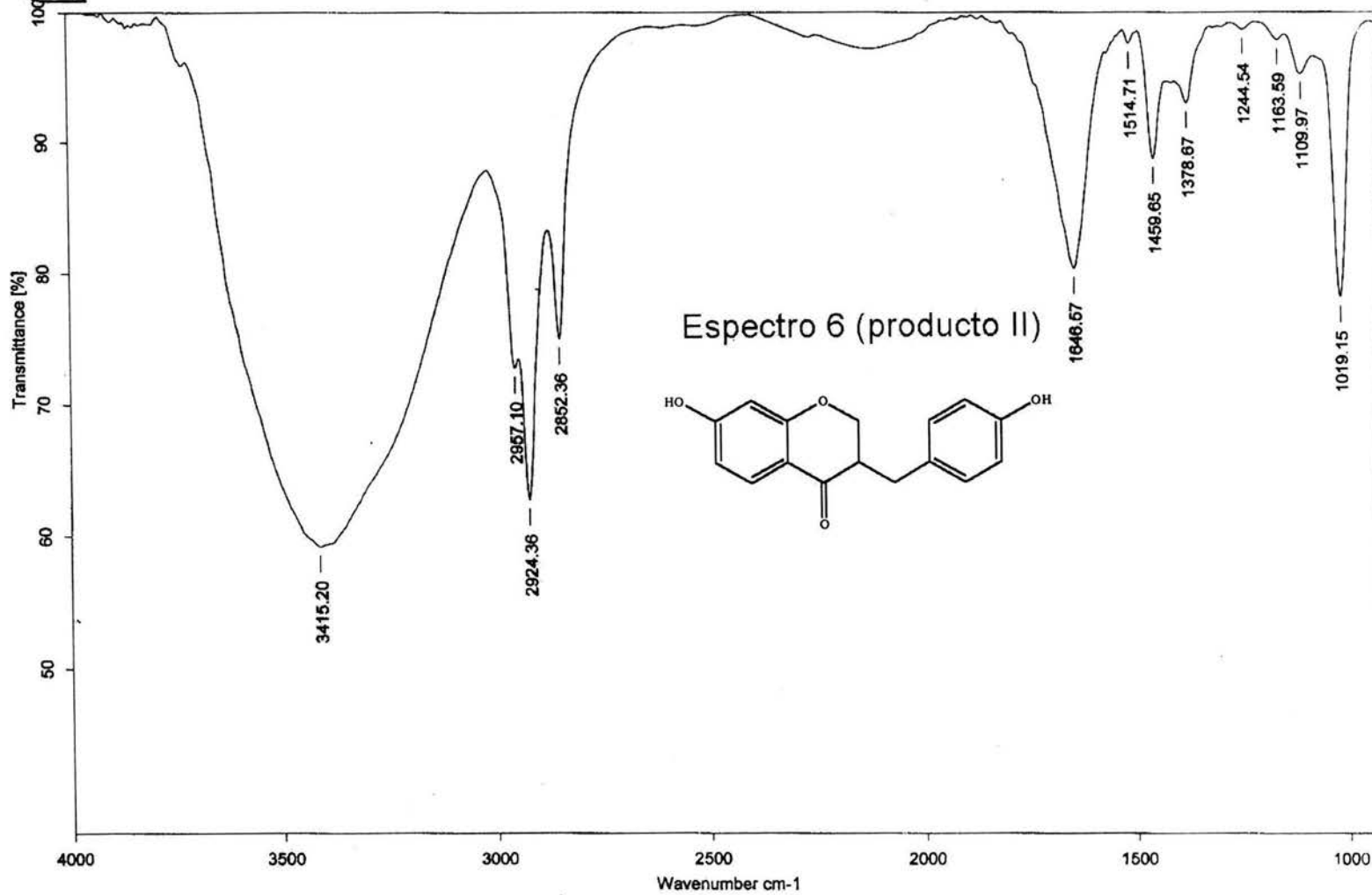


Espectro 4 (Producto I).

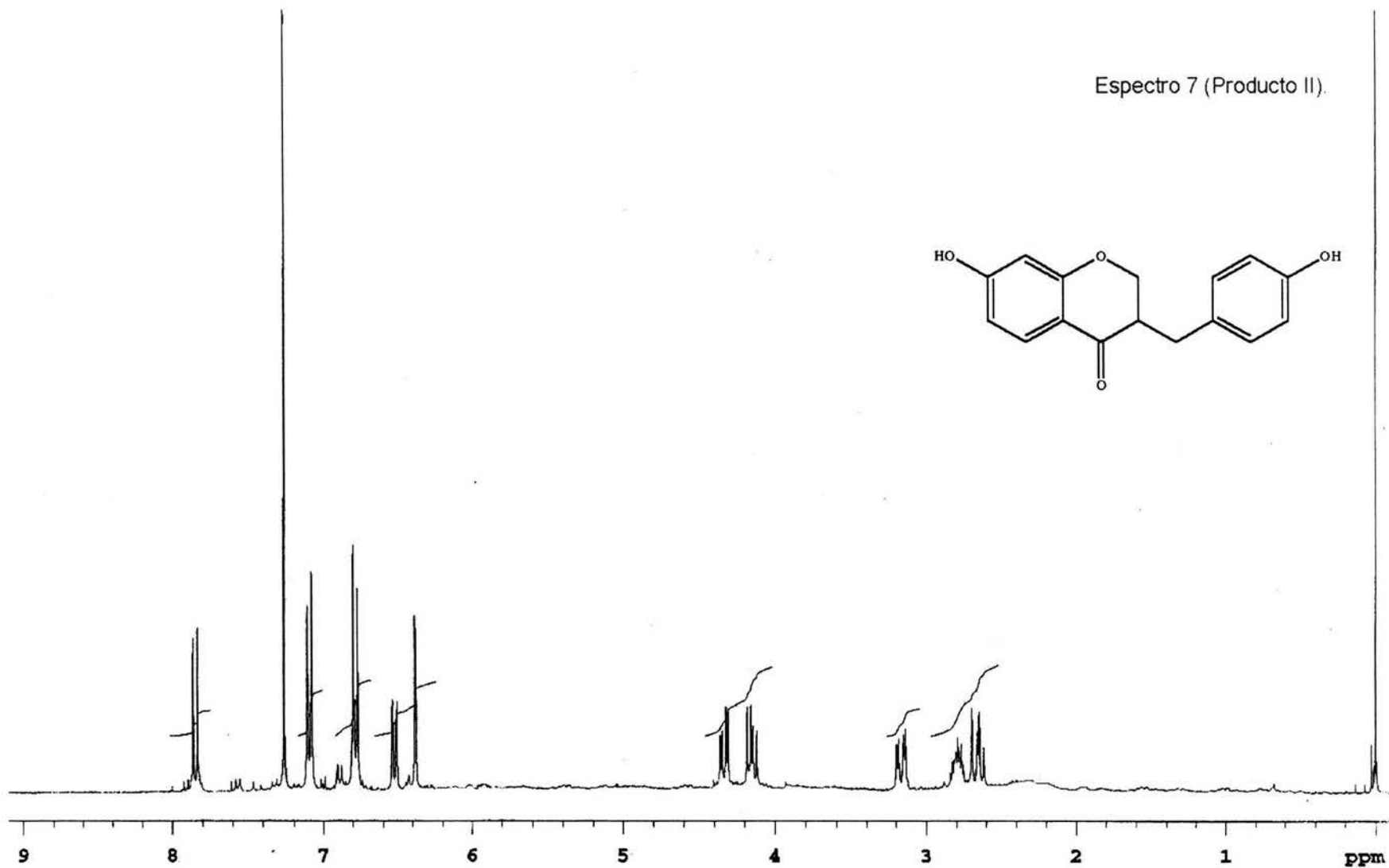
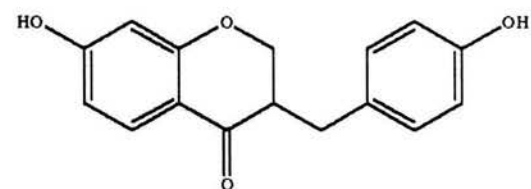


Espectro 5 (producto II).

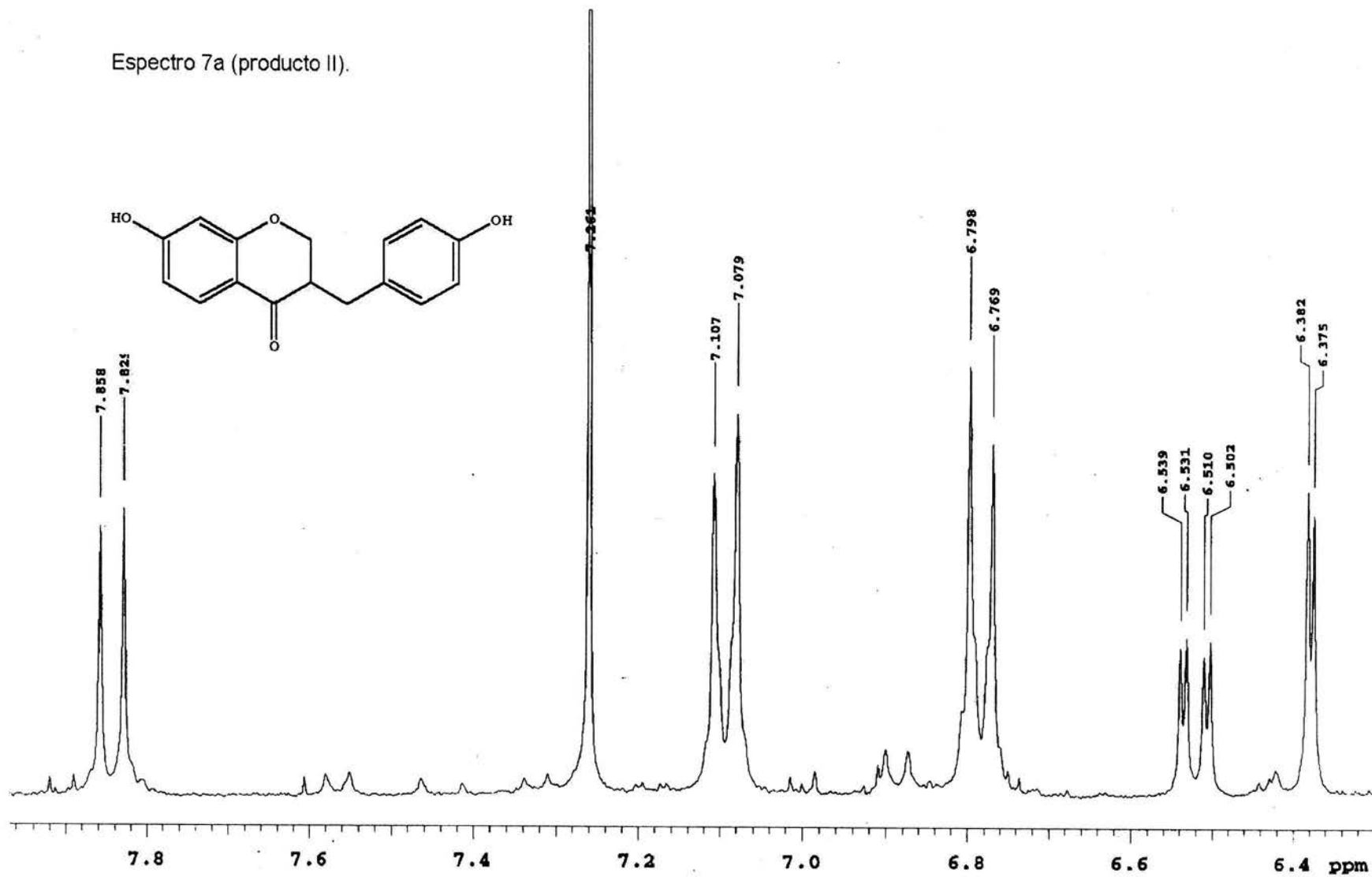
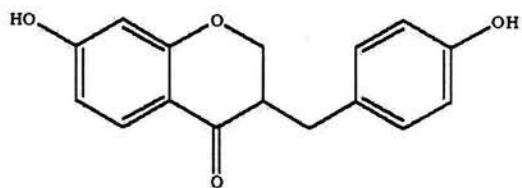


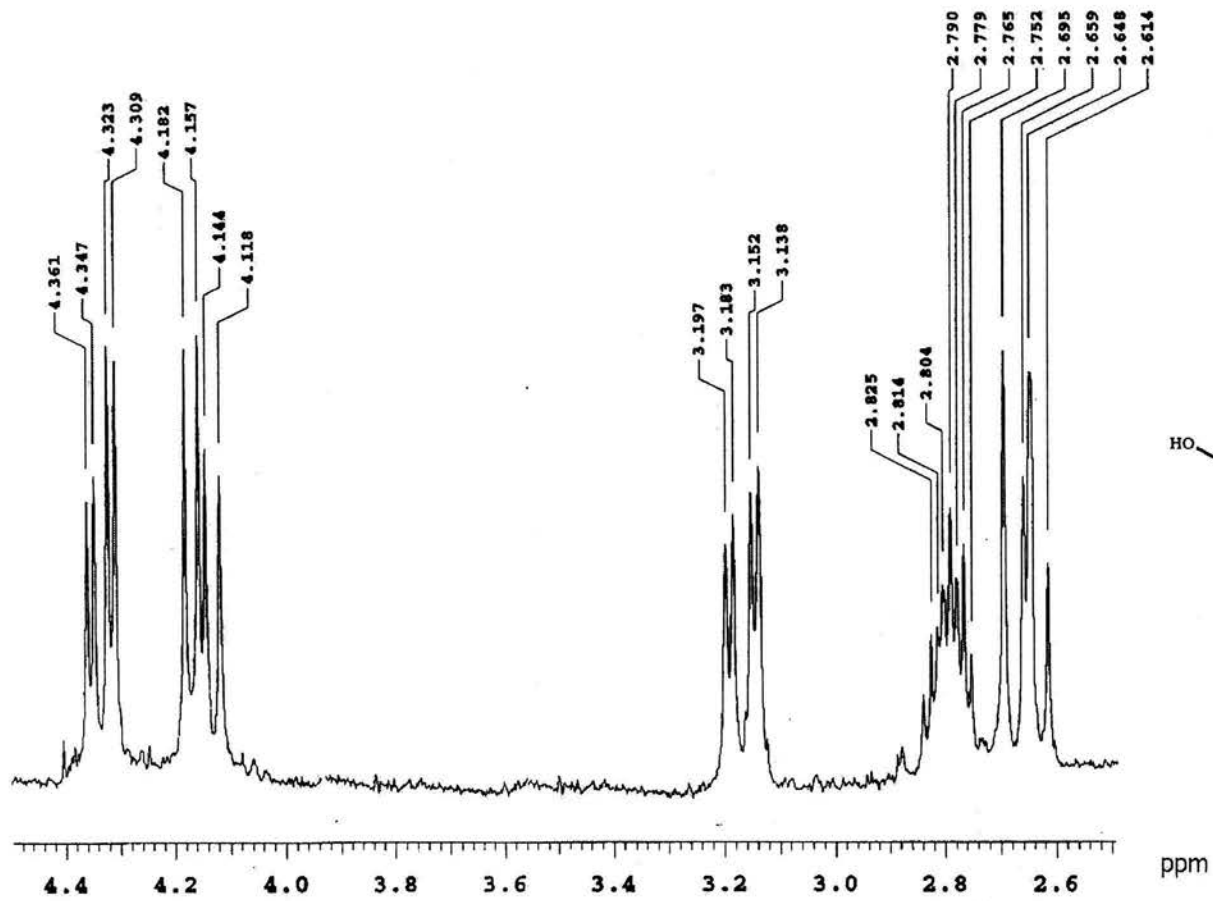


Espectro 7 (Producto II).

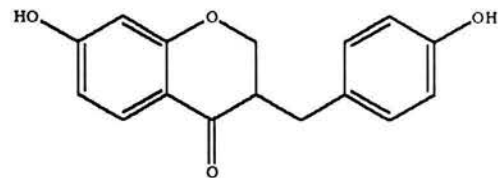


Espectro 7a (producto II).

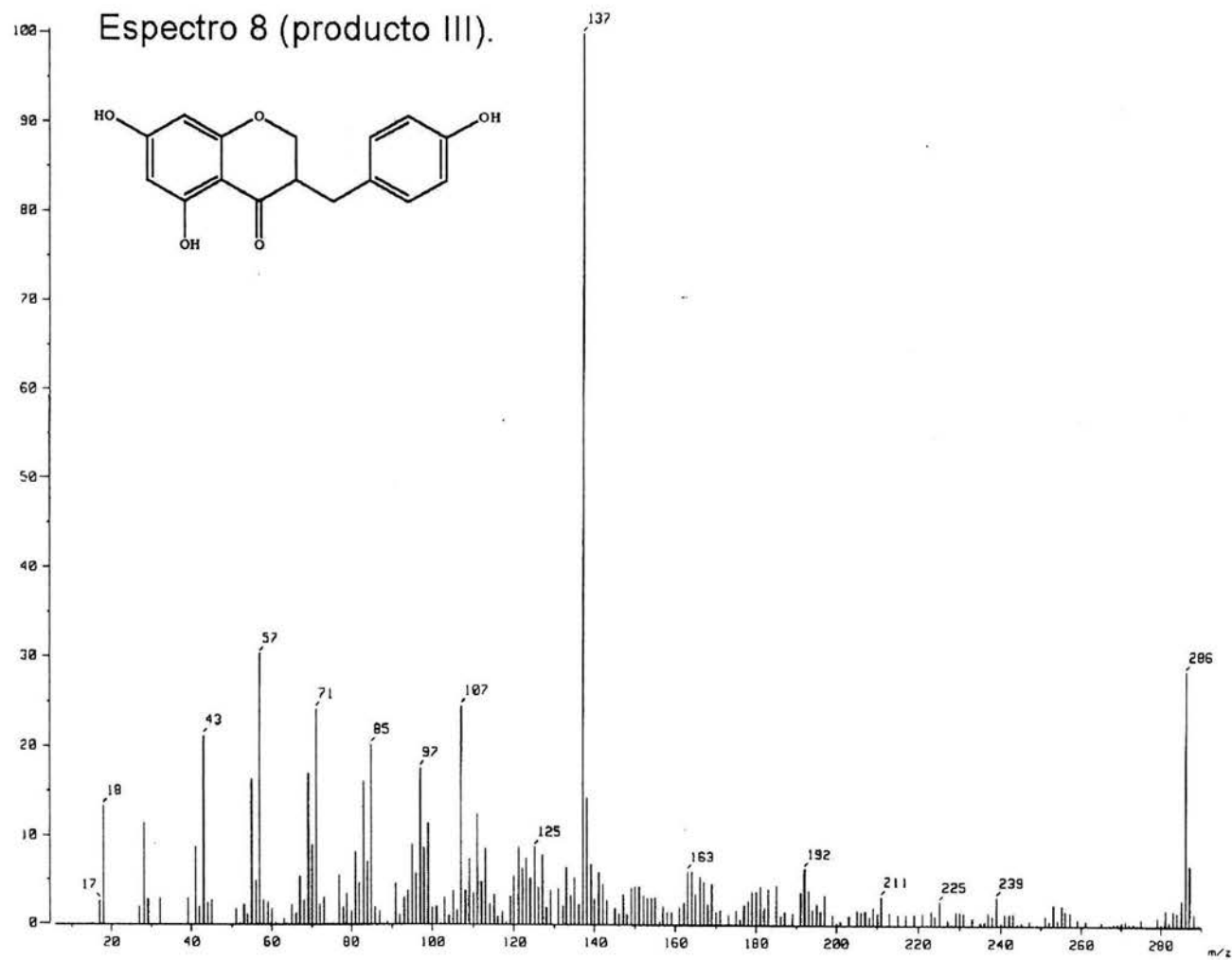
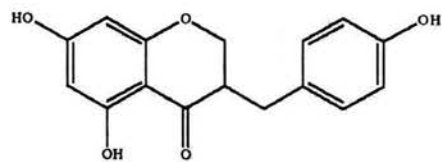


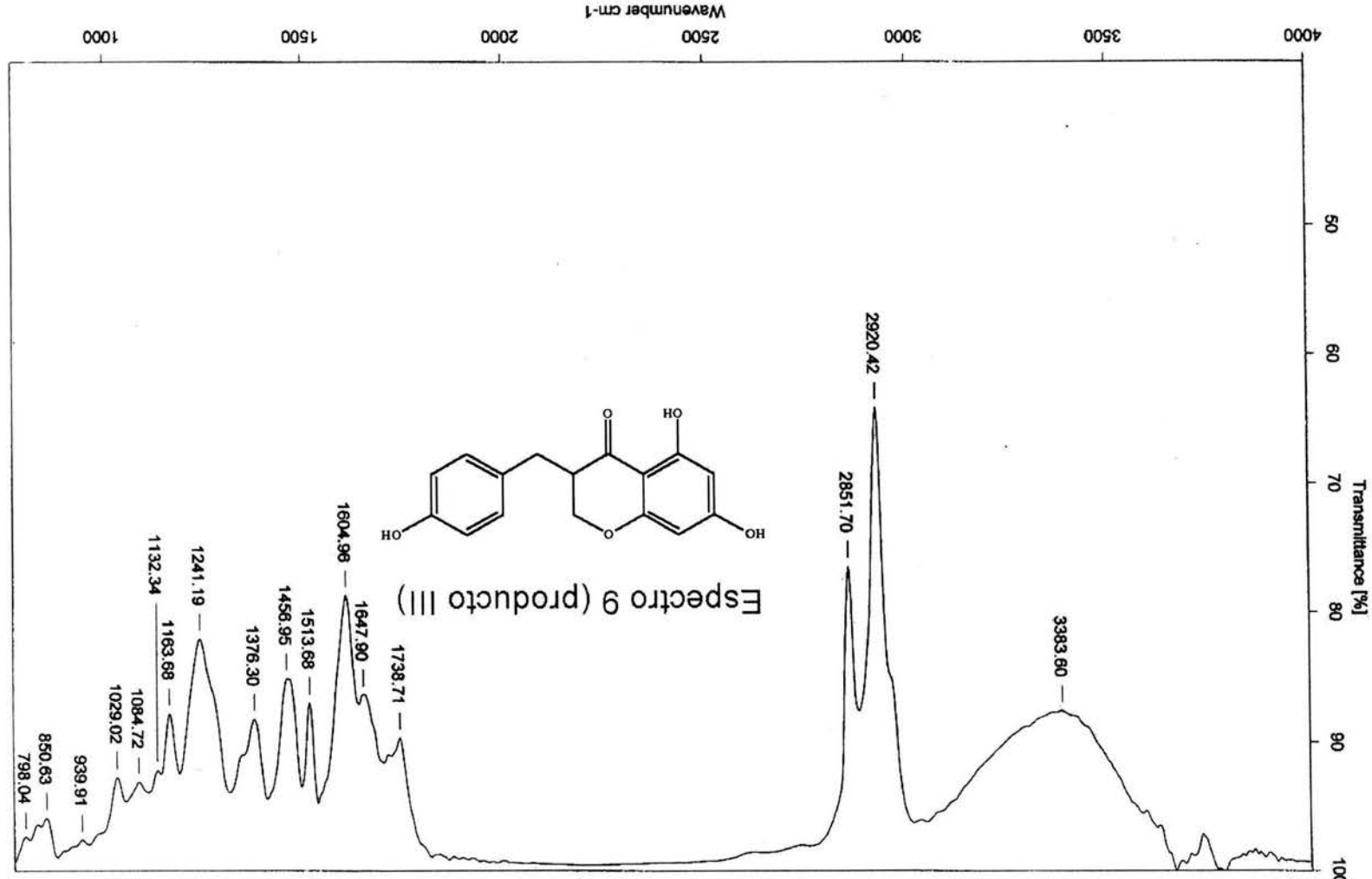


Espectro 7b (producto II).



Espectro 8 (producto III).



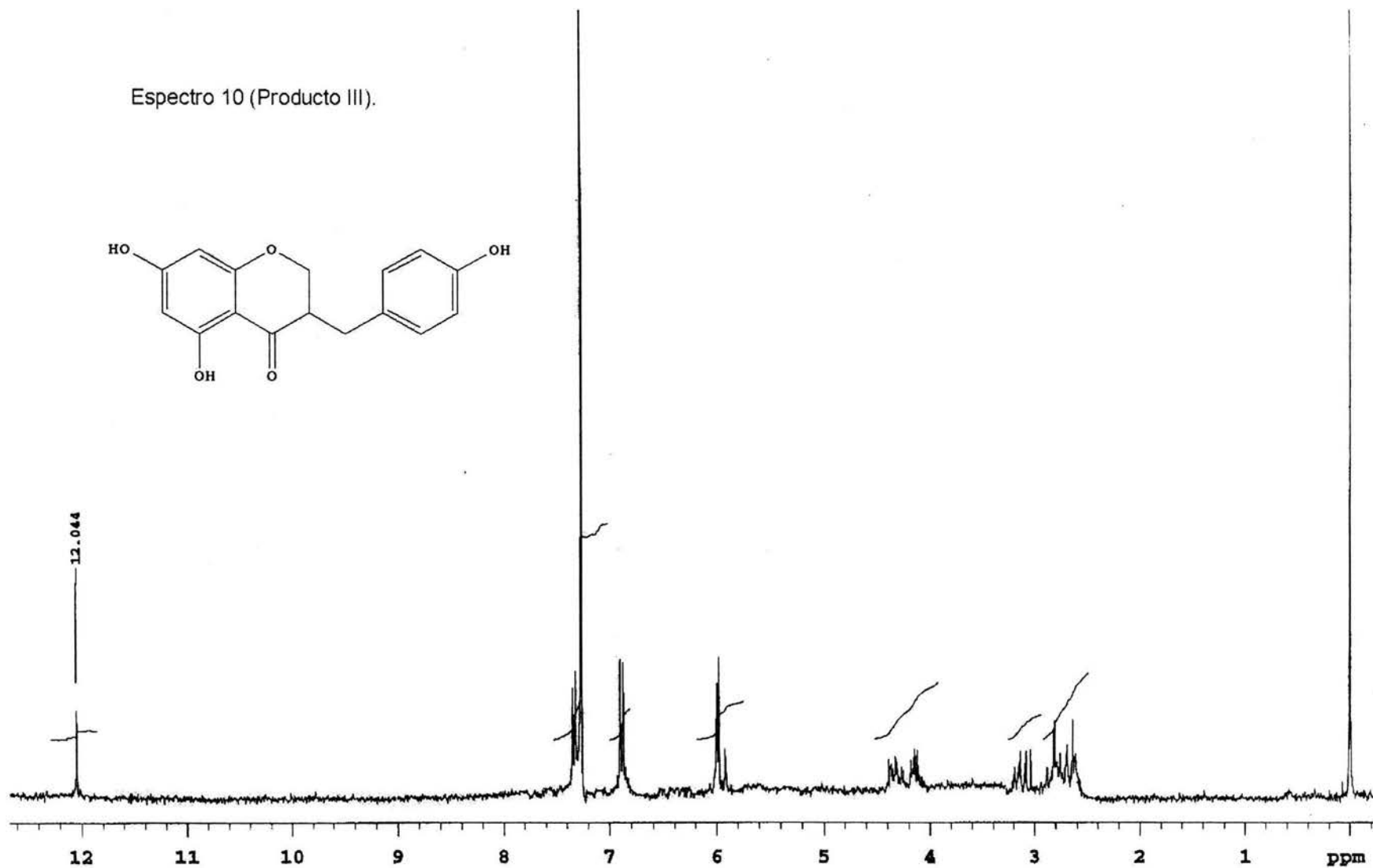
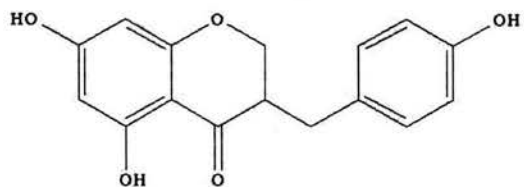


Laboratorio de Espectroscopia

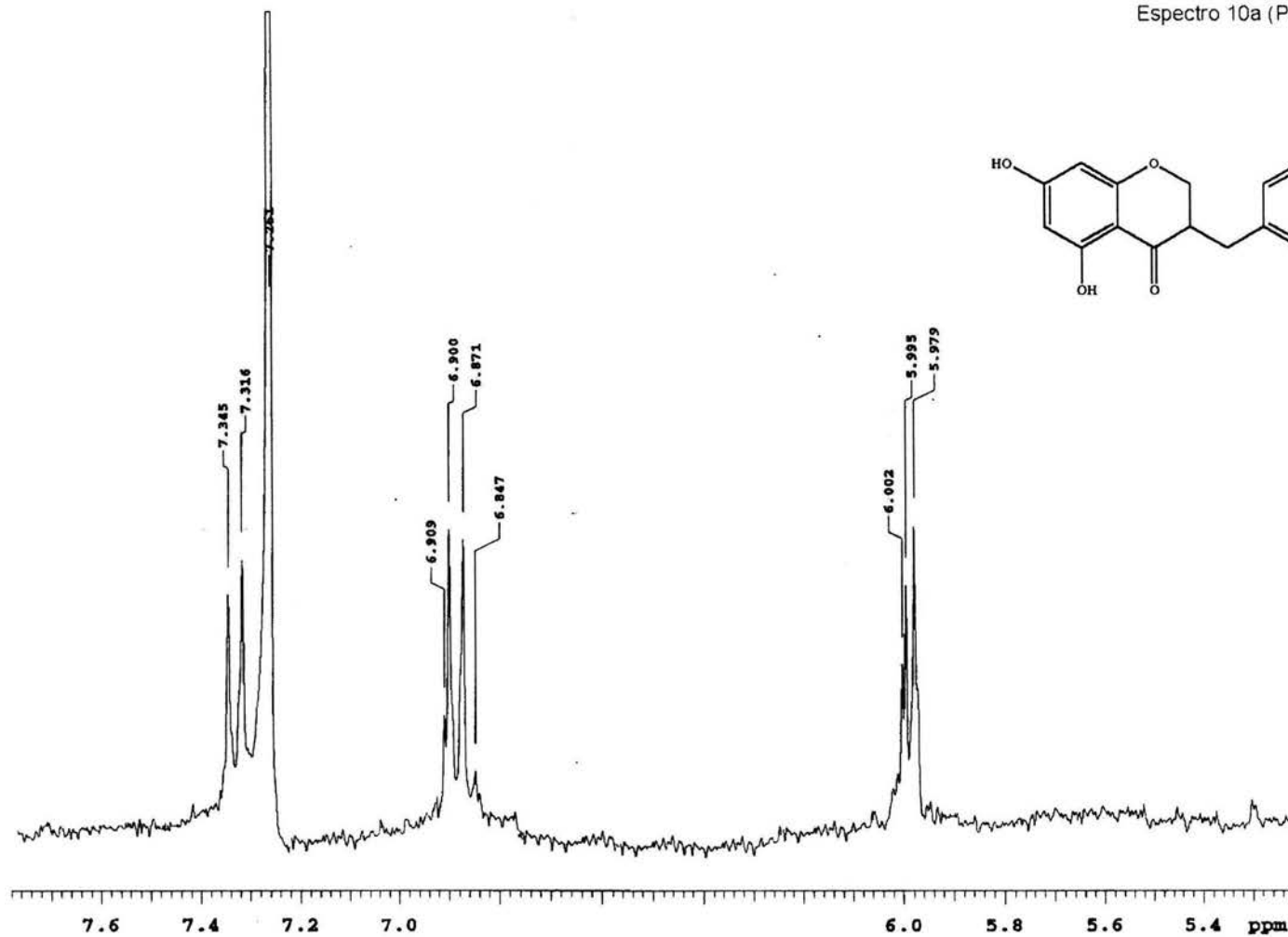
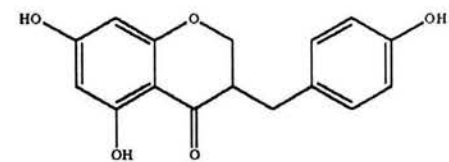
Instituto de Química, UNAM



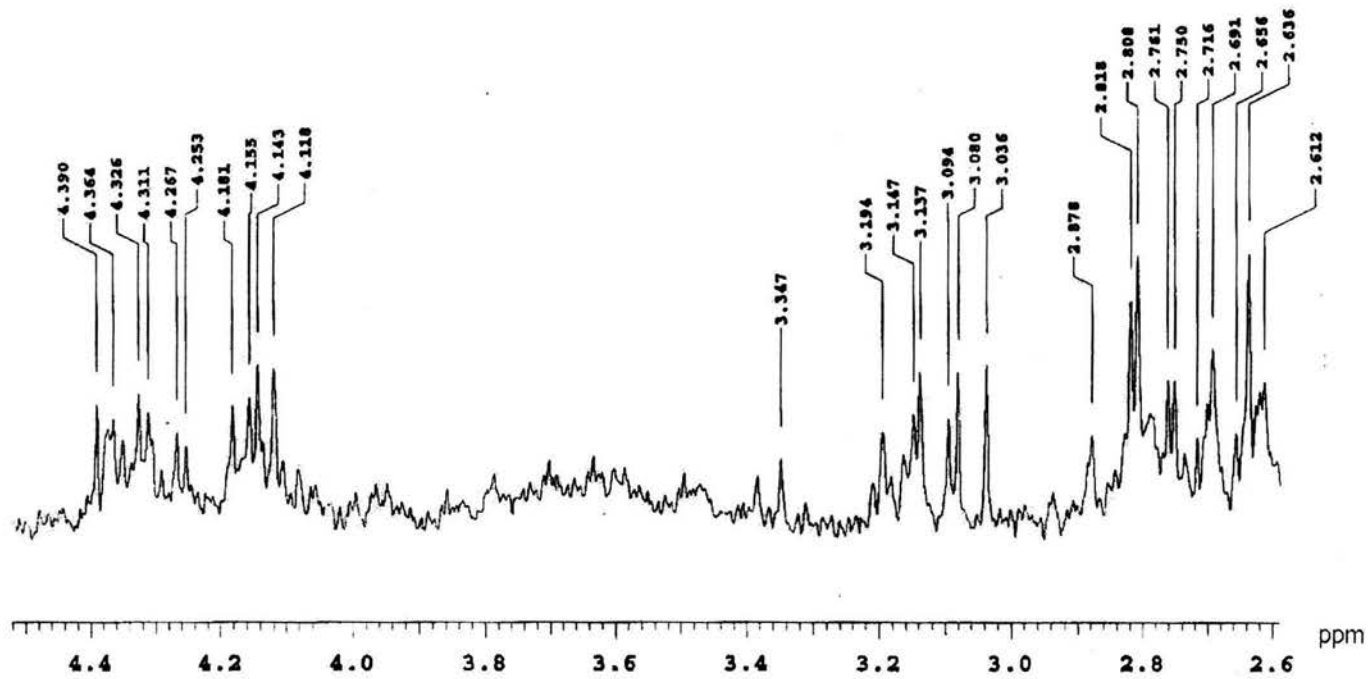
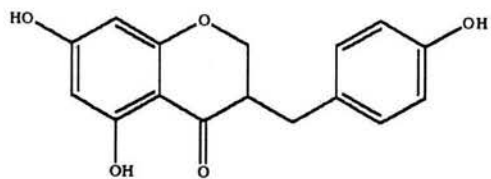
Espectro 10 (Producto III).



Espectro 10a (Producto III).

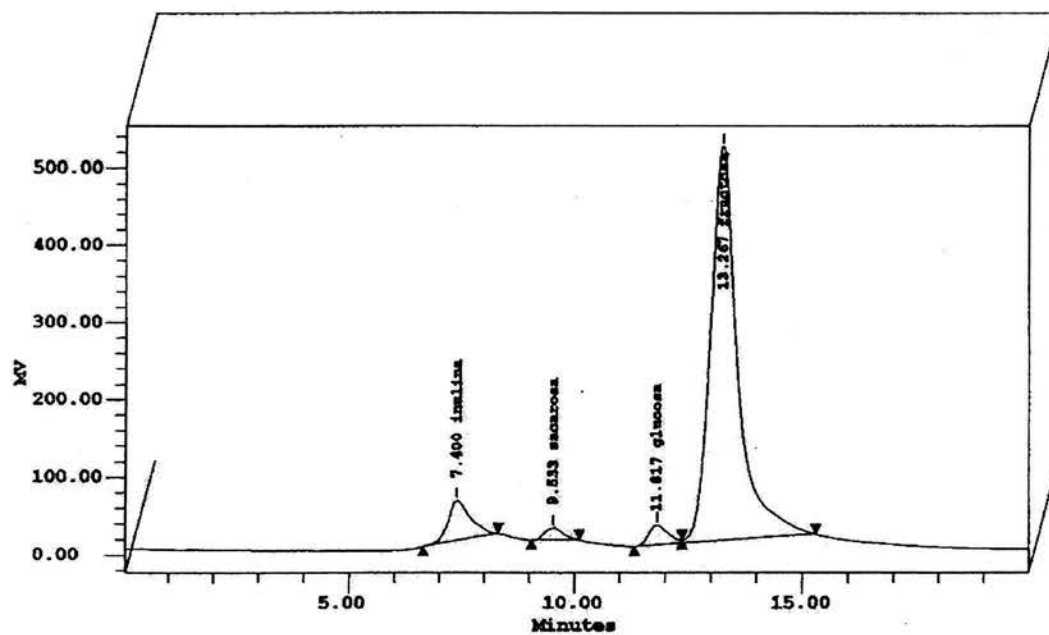


Espectro 10b (Producto III).



**Carbohidratos Identificados del extracto metabólico de las hojas de *Agave tequilana*
Weber mediante el empleo de CLAE**

CROMATOGRAMA 1.



Por alguien como tú.

Apocalipsis 3:20

*Por alguien como tú
Mis manos crearon el universo y los planetas,
La tierra que te alimenta,
El arcoiris sobre tu hogar.*

*Latías en mi corazón desde la eternidad
Aunque no había polvo de ti, ya te amaba
Soñando el momento en que pudiera contemplar
Y mecer en mis brazos a alguien como tú.*

*Hoy reinas sobre todo lo que mi amor te dio:
Pero el mundo está enfermo,
De hambre, miseria y maldad.
Los ríos se han secado, envenenados por el progreso
Y tu rostro endurecido nunca mira las estrellas.*

*Más a pesar del inmenso dolor que me causas,
Por alguien como tú
Fui capaz de dar a mi Hijo unigénito
Para redimir con sangre tus pecados,
Para darte vida eterna,
Y que a través de El puedas venir a mí.*

*Cada noche y cada día espero detrás de tú puerta
Y aquí afuera, entre la lluvia y el frío,
Mis lágrimas corren mientras tú me insultas,
Me niegas o me interpretas con religiones y filosofías
Veo cómo tu vida se deshace,
Y yo quisiera acercarme, tomarte en mis brazos,
Consolarte con mi ternura y salvarte.
Si tan sólo comprendieras, mi pequeño, y abrieras esa puerta
Descubrirías que todo lo que soy y todo lo que hago...
Lo hago por alguien como tú.*