



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

Compuestos antimicrobianos de  
*Arracacia toluensis* (H.B.K.) var. *multifida*  
Hemsley (S. Wats.) Mathias & Constance  
(*Umbelliferae*)

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A:  
MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR



MÉXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**Jurado asignado:**

<b>Presidente</b>	<b>Dr. Rafael Castillo Bocanegra</b>
<b>Vocal</b>	<b>Dra. Rachel Mata Essayag</b>
<b>Secretario</b>	<b>Dr. Francisco Hernández Luis</b>
<b>1er. Suplente</b>	<b>Dr. Andrés Navarrete Castro</b>
<b>2do. Suplente</b>	<b>M. en C. Blanca Estela Rivero Cruz</b>

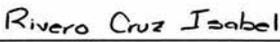
**Sitio en donde se desarrolló el tema:**

**Laboratorio 124, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.**

**Asesor**

  
Dra. Rachel Mata Essayag

**Supervisor técnico**

  
M. en C. Isabel del Carmen Rivero Cruz

**Sustentante**

  
Mario Alberto Figueroa Saldívar

## AGRADECIMIENTOS

La presente investigación se realizó con el apoyo económico del proyecto “Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America” financiado por el NIH (National Institute of Health) de los Estados Unidos de Norteamérica.

A la Facultad de Química de la UNAM, por el apoyo brindado a través del subprograma 127 “Formación Básica para la Investigación”.

A los miembros del jurado designado para la revisión del manuscrito de tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones, que sin duda enriquecieron la versión final de esta tesis.

Al Dr. Robert Bye del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM, por proporcionar e identificar el material vegetal utilizado en el presente estudio.

Al Dr. Scott Franzblau del Instituto de Investigación sobre la Tuberculosis de la Universidad de Illinois, Chicago, por las evaluaciones contra *Mycobacterium tuberculosis*.

A la QFB Maricela Gutiérrez, por el registro de los espectros en el IR y de las Rotaciones Ópticas, a la Q Georgina Duarte Lisci, por la determinación de los espectros de Masas y a la QFB Rosa Isela del Villar, por el registro de los espectros de RMN. Todos ellos integrantes de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM.

A la M en C Isabel Rivero por la supervisión técnica brindada, así como por sus consejos y agradable compañía durante la realización de la presente tesis.

A todos los compañeros del laboratorio 124, por su grata compañía. De manera especial a la M en C Blanca Rivero, a Francisco y Verónica, por su valiosa ayuda y amistad.

Finalmente, deseo expresar mi agradecimiento y admiración a la Dra. Rachel Mata Essayag, por su paciencia, dedicación y apoyo brindado para la realización del presente proyecto de investigación. Por ser un ejemplo a seguir, gracias.

## DEDICATORIAS

### ***A Dios.***

*Gracias por darme la oportunidad de poder abrir los ojos día a día y no dejar de admirar lo maravillosa que es tu creación, la vida.*

### ***A mis padres.***

*Por entregar su vida por nosotros. Por brindarme todo su amor, amistad y apoyo incondicional durante todos estos años. Sin ustedes este esfuerzo no hubiera podido culminarse. Mil gracias, los amo.*

### ***A mis hermanas (Jacqueline, Michelle y Abril).***

*Por estar siempre presentes cuando más las he necesitado en los buenos y malos momentos. Por ese gran ejemplo y cariño que sin falta me han dado. Son únicas.*

### ***A Jorgito.***

*Por ser la lucecita que alumbra siempre las noches cansadas y las conviertes en alegría. Te quiero mucho.*

### ***A Alicia.***

*Por tu apoyo, paciencia y amor sincero, que han hecho estos últimos años de mi vida los mejores. Espero seguir compartiendo muchos más éxitos contigo. Te amo.*

### ***A mi Familia.***

*Por su apoyo y presencia en todos los momentos buenos y malos de mi vida. En especial a César, por que sin tus valiosos consejos y ayuda siempre oportunos hubiese sido más difícil todo. Gracias.*

### ***A todos mis amigos de la Facultad.***

*Por su valiosa amistad y compañía durante toda la carrera. Gracias Vic por ser más que un amigo.*

***Al señor Terrazas y familia.***

*Por su gran amistad, cariño y apoyo.*

***A todos mis amigos del básquetbol.***

*Por compartir conmigo uno de los mejores vicios que he tenido. Grandes triunfos y victorias no hubiesen valido la pena sin ustedes al lado.*

***A mis compañeros de laboratorio.***

*Por su compañía agradable y apoyo en todo momento. En especial a la Maestra Isabel y a la Maestra Blanca, por su sincera amistad y enseñanzas durante mi estancia en el laboratorio. Sin su ayuda no hubiera podido finalizar esta tesis. Muchas gracias.*

***A la Dra. Rachel Mata.***

*De manera muy especial, le agradezco que me haya brindado la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo. Gracias por darme su experiencia, conocimientos y confianza para realizar adecuadamente este trabajo de la mejor manera.*

***Finalmente a la UNAM.***

*Por hacer posible la formación de miles de jóvenes y guiarlos hacia el mejor camino. Tu conocimiento y sabiduría son invaluableles. Mi orgullo más grande es ser fielmente PUMA.*

	PÁGINA
<b>LISTA DE CUADROS</b>	iv
<b>LISTA DE ESQUEMAS</b>	iv
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	v
<b>LISTA DE TABLAS</b>	vi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	vii
<b>I. ANTECEDENTES</b>	1
1.1 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA TUBERCULOSIS	1
1.2 ANTECEDENTES BOTÁNICOS Y ETNOBOTÁNICOS DE <i>Arracacia toluensis</i> (H.B.K.) var. <i>multifida</i> Hemsley (S. Wats.) Mathias & Constance ( <i>Umbelliferae</i> )	6
1.3 ESTUDIOS QUÍMICOS SOBRE EL GÉNERO <i>Arracacia</i>	7
<b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	10
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL</b>	11
3.1 MATERIAL VEGETAL	11
3.2 ENSAYOS BIOLÓGICOS	11
3.2.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICOBACTERIANA	11
3.3 PROCEDIMIENTOS GENERALES	12
3.3.1 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS	12
3.3.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS NATURALES Y SUS DERIVADOS	13
3.3.1.2 EQUIPOS UTILIZADOS	13
3.4 ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LAS PARTES AÉREAS DE <i>A. toluensis</i>	13
3.4.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO PRELIMINAR	13
3.4.2 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LA ISOIMPERATORINA (19) A PARTIR DE LA FRACCIÓN PRIMARIA F <sub>4</sub>	14
3.4.3 AISLAMIENTO DE LA SUBEROSINA (20) Y EL OSTOL (21) A PARTIR DE LA FRACCIÓN PRIMARIA ACTIVA F <sub>5</sub>	15
3.4.4 AISLAMIENTO DE LA ISOIMPERATORINA (19), EL 8-METOXISORALENO (22), LA HERNIARINA (23) Y LA ESCOPARONA (24) A PARTIR DE LA FRACCIÓN PRIMARIA ACTIVA F <sub>6</sub>	16

---



---

**ÍNDICE (continuación)**

	<b>PÁGINA</b>
3.4.5 AISLAMIENTO DEL 8-METOXISORALENO (22), EL OSTOL (21) Y EL $\beta$ -SITOSTEROL (25) A PARTIR DE LA FRACCIÓN PRIMARIA ACTIVA F <sub>7</sub>	17
3.4.6 AISLAMIENTO DE LA UMBELIFERONA (26) Y LA DIHIDROOXIPEUCEDANINA (27) A PARTIR DE LA FRACCIÓN PRIMARIA INACTIVA F <sub>8</sub>	18
3.4.7 OBTENCIÓN DEL DERIVADO METILADO DE LA UMBELIFERONA (26)	18
3.4.8 OBTENCIÓN DEL DERIVADO ACETILADO DE LA DIHIDROOXIPEUCEDANINA (27)	19
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>20</b>
4.1 SELECCIÓN PRIMARIA DE LA ESPECIE <i>A. tolucensis</i> COMO UNA FUENTE DE PRINCIPIOS ANTIMICOBACTERIANOS	21
4.2 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS A PARTIR DE LA ESPECIE <i>A. tolucensis</i>	21
4.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS AISLADOS	26
4.3.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS CUMARINAS SIMPLES AISLADAS DE LA ESPECIE <i>A. tolucensis</i>	28
4.3.1.1 CARACTERIZACIÓN DE LA HERNIARINA (23) Y LA UMBELIFERONA (26)	28
4.3.1.2 CARACTERIZACIÓN DE LA SUBEROSINA (20), LA ESCOPARONA (24) Y EL OSTOL (21)	33
4.3.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS FURANOCUMARINAS AISLADAS DE LA ESPECIE <i>A. tolucensis</i>	35
4.3.2.1 CARACTERIZACIÓN DE LA ISOIMPERATORINA (19), EL 8-METOXISORALENO (22) Y LA DIHIDROOXIPEUCEDANINA (27)	35
4.4 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICOBACTERIANO DE LOS METABOLITOS AISLADOS	44

## ÍNDICE (continuación)

	PÁGINA
V. RESUMEN Y CONCLUSIONES	46
VI. BIBLIOGRAFÍA	47
VII. ANEXO	52
Espectro 1. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la herniarina (23) [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ].	52
Espectro 2. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de la herniarina (23) [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ].	53
Espectro 3. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la umbeliferona (26) [300 MHz, CD <sub>3</sub> OD].	54
Espectro 4. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la suberosina (20) [400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ].	55
Espectro 5. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de la suberosina (20) [400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ].	56
Espectro 6. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la escoparona (24) [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ].	57
Espectro 7. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de la escoparona (24) [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ].	58
Espectro 8. Espectro de RMN <sup>1</sup> H del ostol (21) [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ].	59
Espectro 9. Espectro de RMN <sup>13</sup> C del ostol (21) [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ].	60
Espectro 10. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la dihidrooxipeucedanina (27) [400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ].	61
Espectro 11. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de la dihidrooxipeucedanina (27) [400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ].	62
Espectro 12. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la isoimperatorina (19) [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ].	63
Espectro 13. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de la isoimperatorina (19) [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ].	64
Espectro 14. Espectro de RMN <sup>1</sup> H del 8-metoxisoraleno (22) [400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ].	65
Espectro 15. Espectro de RMN <sup>13</sup> C del 8-metoxisoraleno (22) [400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ].	66

## LISTA DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1.	Metabolitos secundarios aislados a partir del género <i>Arracacia</i> .	7
2.	Fraccionamiento preliminar por cromatografía en columna abierta del extracto total de <i>A. toluensis</i> .	15
3.	Actividad antimicobacteriana de las fracciones primarias de <i>A. toluensis</i> .	22
4.	Actividad sobre el crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> de las fracciones secundarias obtenidas a partir de la fracción primaria activa F <sub>5</sub> .	23
5.	Actividad sobre el crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> de las fracciones secundarias obtenidas a partir de la fracción primaria activa F <sub>6</sub> .	24
6.	Actividad sobre el crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> de las fracciones secundarias obtenidas a partir de la fracción primaria activa F <sub>7</sub> .	25
7.	Metabolitos secundarios aislados a partir de las partes aéreas de <i>A. toluensis</i> .	26

## LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA		PÁGINA
1.	Estrategia metodológica empleada en el presente estudio.	20

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	1
2.	Representación esquemática de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i> .	2
3.	Fármacos de primera y segunda línea para el tratamiento de la tuberculosis.	3
4.	Productos naturales selectos.	5
5.	<i>Arracacia toluensis</i> (H.B.K.) var. <i>multifida</i> Hemsley (S. Wats.) Mathias & Constante ( <i>Umbelliferae</i> ).	6
6.	Proceso de extracción de las partes aéreas de <i>A. toluensis</i> .	14
7.	Cromatograma de la fracción secundaria activa F <sub>6-v</sub> . Condiciones de análisis: Detector UV, 270 nm. Sistema de elución CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (99:1). Flujo de 8.3 mL/min. Concentración 2.5 mg/50 µL. Pico: <b>a</b> t <sub>R</sub> 18.76 min; <b>b</b> t <sub>R</sub> 20.48 min y <b>c</b> t <sub>R</sub> 21.94 min.	17
8.	Cromatograma de las fracciones secundarias activas obtenidas a partir de la fracción F <sub>5</sub> .	23
9.	Cromatograma de las fracciones secundarias activas obtenidas a partir de la fracción F <sub>7</sub> .	25
10.	Espectro RMN <sup>1</sup> H-NOESY de la suberosina (20).	34
11.	Correlaciones observadas en el espectro RMN <sup>1</sup> H-NOESY del compuesto (20).	34
12.	Espectro RMN <sup>1</sup> H-NOESY del ostol (21).	36
13.	Correlaciones observadas en el espectro RMN <sup>1</sup> H-NOESY del compuesto (21).	36
14.	Espectro RMN <sup>1</sup> H-NOESY de la dihidrooxipeucedanica (27).	42
15.	Correlaciones observadas en el espectro RMN <sup>1</sup> H-NOESY del compuesto 27.	42
16.	Espectro RMN <sup>1</sup> H-NOESY del 8-metoxisoraleno (22).	43
17.	Correlaciones observadas en el espectro RMN <sup>1</sup> H-NOESY del compuesto 22.	43

## LISTA DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1.	Constantes físicas de la suberosina (20), ostol (21), herniarina (23), escoparona (24) y umbeliferona (26).	29
2.	Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de las cumarinas suberosina (20), ostol (21), herniarina (23), escoparona (24) y umbeliferona (26).	30
3.	Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN <sup>13</sup> C (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de las cumarinas suberosina (20), ostol (21), herniarina (23), escoparona (24) y umbeliferona (26).	31
4.	Constantes físicas de la isoimperatorina (19), 8-metoxisoraleno (22) y dihidrooxipeucedanina (27).	37
5.	Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de las furanocumarinas isoimperatorina (19), 8-metoxisoraleno (22) y dihidrooxipeucedanina (27).	38
6.	Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN <sup>13</sup> C (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de las furanocumarinas isoimperatorina (19), 8-metoxisoraleno (22) y dihidrooxipeucedanina (27).	39
7.	Actividad antimicrobacteriana de los productos naturales aislados a partir de la especie <i>A. tolucensis</i> .	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AcOEt	acetato de etilo
HCl	ácido clorhídrico
D <sub>2</sub> O	agua deuterada
Å	Amstrong
NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonato de sodio
KBr	bromuro de potasio
<i>J</i>	constante de acoplamiento
cm	centímetro
CDCl <sub>3</sub>	cloroformo deuterado
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
CCFP	Cromatografía en Capa Fina Preparativa
CCA	Cromatografía en Columna Abierta
δ	desplazamiento químico
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	diclorometano
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	dimetilsulfóxido deuterado
dd	doble de doble
d	doblete
eV	electron Volts
EMIE	Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico
RMN2D-HETCOR	Espectroscopía bidimensional de Correlación Heteronuclear ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)
RMN <sup>1</sup> H-NOESY	Espectroscopía bidimensional por Efecto Nuclear Overhauser ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H)
ν <sub>máx</sub>	frecuencia máxima
°C	grado Celsius
g	gramo
Hz	Hertz
Hex	hexano
KOH	hidróxido de potasio
h	hora

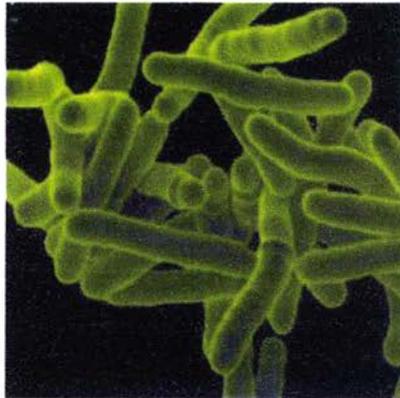
## LISTA DE ABREVIATURAS (continuación)

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
IR	Infrarrojo
int. rel.	intensidad relativa
[M <sup>+</sup> ]	ión molecular
Kg	kilogramo
L	litro
$\lambda$	longitud de onda
<i>m/z</i>	masa/carga
MeOH	metanol
OCH <sub>3</sub>	metoxilo
$\mu\text{m}$	micra
$\mu\text{g}$	microgramo
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{M}$	micromolar
mg	miligramo
mL	mililitro
mm	milímetro
min	minuto
nm	nanómetro
ppm	partes por millón
pf	punto de fusión
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMH <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
s	singlete
TMS	tetrametilsilano
<i>t<sub>R</sub></i>	tiempo de retención
t	triplete
UV	Ultravioleta
uma	unidades de masa atómica

## I. ANTECEDENTES

### I.1 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA TUBERCULOSIS

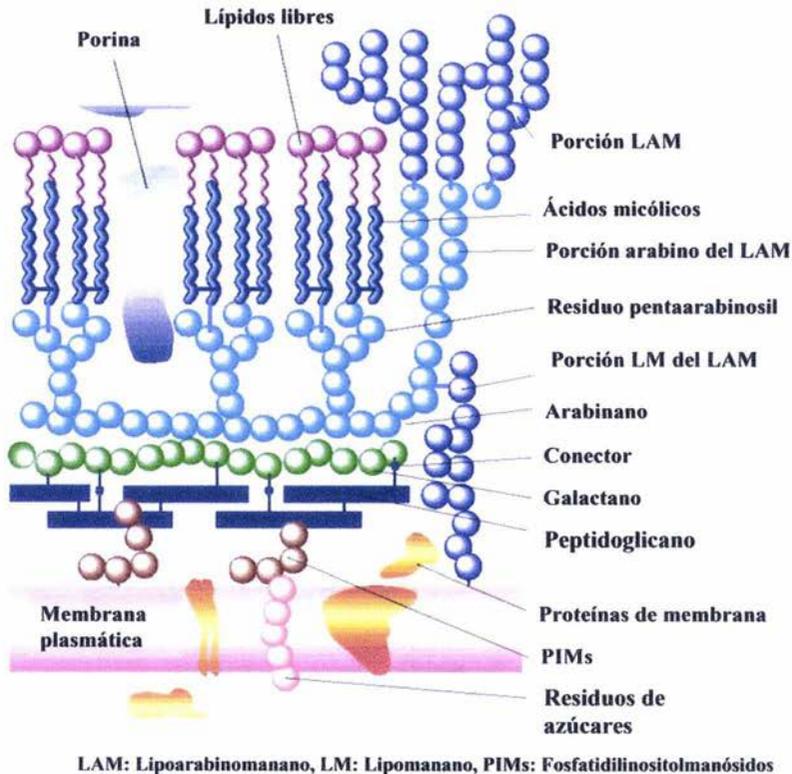
La tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas de la humanidad. Fue descrita por Hipócrates quien la denominó “Tisis”, debido a su carácter devastador (Iseman, 1994; Sepkowitz *et al.*, 1995). El agente causal de esta enfermedad, *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacteriaceae*) (**Figura 1**), es una bacteria aerobia, no flagelada, gram positiva, en forma de bacilo delgado, recto o ligeramente curvo y con extremos redondeados que mide entre 0.2 y 0.7  $\mu\text{m}$  de ancho, y de 1 a 10  $\mu\text{m}$  de longitud. La bacteria carece de cápsula pero posee una pared celular compleja formada por la membrana plasmática asociada a residuos de peptidoglicano (PG), arabinogalactano (AG) y ácidos micólicos unidos covalentemente (Maureen, 1999).



**Figura 1.** *Mycobacterium tuberculosis*.

La extraordinaria complejidad de la pared celular de esta bacteria le confiere un alto grado de resistencia. El PG está formado por residuos de aminoazúcares (*N*-acetil glucosamina y ácido murámico unidos por enlaces  $\beta$  1  $\rightarrow$  4) y aminoácidos (L-alanina, D-isoglutamina, ácido meso diaminopimélico, D-alanina). El AG es un polisacárido formado por unidades de D-furanoarabinosa y D-furanogalactosa. Finalmente, los ácidos micólicos son ácidos grasos  $\alpha$ -ramificados y  $\beta$ -hidroxilados de elevado peso

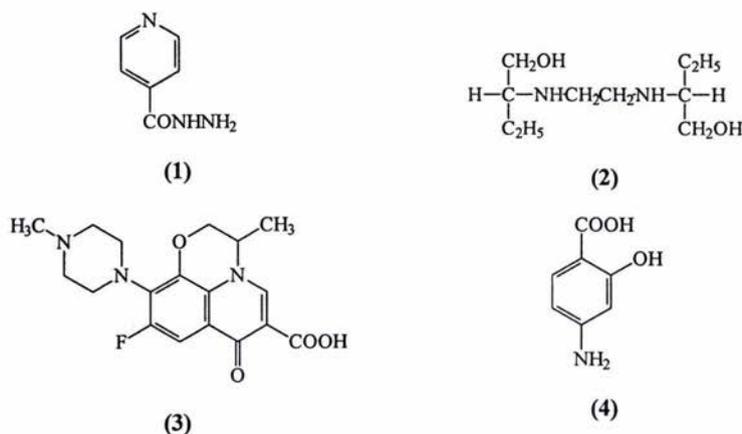
molecular (C<sub>70</sub>-C<sub>90</sub>). Generalmente estos ácidos se encuentran asociados con moléculas de superficie, como los glicolípidos, formando una bicapa (Maureen, 1999) (Figura 2).



**Figura 2.** Representación esquemática de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*.

La tuberculosis se transmite por tres vías: (i) a través de núcleos de gotitas que contienen la bacteria al toser, estornudar o hablar, (ii) por ingestión de material contaminado (usualmente leche), y (iii) por inoculación directa, la cual generalmente ocurre en hospitales (Sepkowitz *et al.*, 1995). La enfermedad es crónica y puede presentarse también en animales. Se caracteriza por causar lesiones granulomatosas de evolución lenta, que provocan la destrucción de tejidos principalmente en los pulmones, aunque puede afectar otros órganos como el hígado, meninges, próstata, laringe y articulaciones (Goodman y Gilman, 1996).

Los agentes terapéuticos de mayor uso para el tratamiento de la tuberculosis incluyen un grupo numeroso de compuestos tanto de origen natural como sintético, y se dividen en dos categorías principales: los fármacos de primera y segunda línea. El primer grupo comprende productos con un buen nivel de eficacia y una toxicidad aceptable. Este grupo está bien representado por la isoniazida (1), inhibidor específico de las enzimas enoil-ACP-reductasa (InhA) y la  $\beta$ -cetoacil-ACP-sintetasa, involucradas en la síntesis de los ácidos micólicos, y el etambutol (2), inhibidor de la enzima arabinosil-transferasa (embAB), responsable de la incorporación de los residuos de arabinosa en la estructura del arabinogalactano. Los fármacos de segunda línea incluyen compuestos como la ofloxacina (3), que actúa como un inhibidor específico de la enzima ADN girasa en el proceso de transcripción del ADN bacteriano, y el ácido aminosalicílico (4), análogo estructural del ácido *p*-aminobenzoico (PABA), inhibidor de la enzima dihidropteroato sintetasa (folP) involucrada en la síntesis del ácido fólico, por tan sólo mencionar los más importantes (Maureen, 1999; McKinney, 2000) (Figura 3).



**Figura 3.** Fármacos de primera y segunda línea para el tratamiento de la tuberculosis.

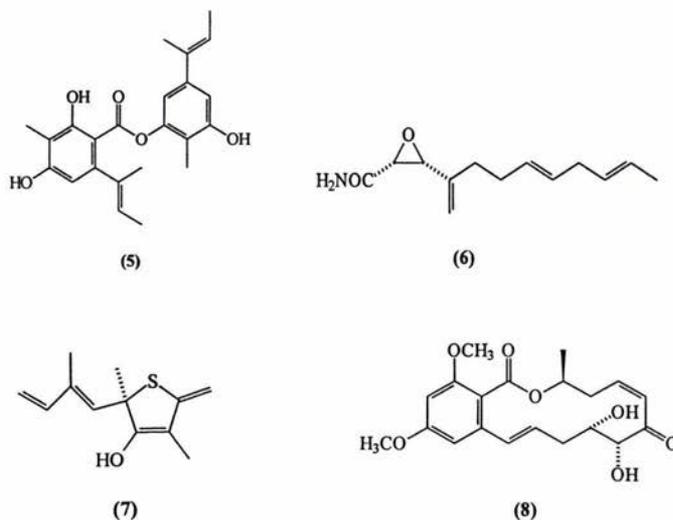
Los grandes índices de morbilidad y mortalidad provocados por la tuberculosis han ocasionado que esta se considere un gran problema de salud a nivel mundial. Datos epidemiológicos indican que aproximadamente la tercera parte de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* y se estima que anualmente ocho

millones de individuos son víctimas de la tuberculosis, y alrededor de tres millones mueren a causa de ella (Maureen, 1999; WHO, 2003). Evidentemente muchos factores han contribuido al resurgimiento de esta enfermedad. Entre los más importantes destacan: (a) la pandemia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), (b) el lento crecimiento del microorganismo que ocasiona una infección crónica, (c) la pared celular compleja y (d) la prevalencia de cepas resistentes, siendo este último, el que ha tomado mayor interés en la actualidad (Ghannoum y Rice, 1999; Maureen, 1999). Cabe señalar, que en pacientes inmunocomprometidos, la prevalencia de la infección, aún después de recibir el tratamiento con los agentes antimicobacterianos adecuados, se ve incrementada debido a la interacción de estos compuestos con los fármacos de elección para el tratamiento del SIDA (Okunade *et al.*, 2004). Epidemiológicamente, la resistencia de la micobacteria a los fármacos antituberculosos se puede manifestar en pacientes infectados con una cepa resistente a los medicamentos o en pacientes que inicialmente se tratan con fármacos eficaces, pero que dejan de serlo, debido a mutaciones de la bacteria o al incumplimiento del régimen de dosificación (Sepkowitz *et al.*, 1995; Long, 2000).

En el marco de referencia recién descrito, se han establecido nuevos programas de carácter multidisciplinario con la finalidad de descubrir nuevos agentes antimicobacterianos de utilidad terapéutica, tanto de origen natural como sintético, y con mecanismos de acción novedosos que involucren la inhibición de: (a) la expresión de los factores de virulencia de la micobacteria, y (b) los procesos involucrados en la evasión de la respuesta inmune temprana del hospedero, entre otros (McKinney, 2000). La búsqueda de principios activos a partir de fuentes naturales para el desarrollo de agentes terapéuticos, es un hecho bien documentado (Mitscher *et al.*, 1972; Tomesi *et al.*, 1986; Eloff, 1998; Ghannoum y Rice, 1999; Tegoś *et al.*, 2002; Matu y van Staden, 2003; Coelho de Souza *et al.*, 2004; Ram *et al.*, 2004; *inter alia*) y las diversas investigaciones realizadas a nivel mundial han permitido el descubrimiento de numerosos productos naturales con propiedades antimicobacterianas.

Recientemente se han publicado varias revisiones que sintetizan la información más relevante acerca de productos naturales con propiedades antimicobacterianas (Newton *et al.*, 2000; Copp, 2003; Okunade *et al.*, 2004). Estos productos pertenecen a las más diversas categorías estructurales y fuentes naturales. Así, se han descubierto numerosos alcanos, alquenos, alquinos, fenoles, polifenoles, alcaloides, cumarinas, flavonoides, péptidos y terpenoides, entre otros. Así mismo, las fuentes naturales de

esos principios activos incluyen organismos terrestres (vegetales, hongos y actinomicetos) y marinos (algas, esponjas, hongos y actinomicetos). En esas investigaciones, los organismos de prueba incluyen a las especies *M. tuberculosis*, *M. aurum*, *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. intracellulareae*, *M. phlei* y *M. smegmatis*. Los métodos empleados para determinar la actividad anti-TBC son principalmente dos: el radiorespirométrico (BACTEC) y el de azul de alamar (MABA) (Copp, 2003; Okunade *et al.*, 2004). Entre los metabolitos naturales con propiedades antimicobacterianas merecen una mención especial por su potencia y mecanismo de acción el dépsido agonodépsido A (5), compuesto novedoso obtenido a partir del hongo filamentoso F7524 aislado de las hojas secas de la especie *Derris thyriflora*; este producto inhibe la enzima InhA ( $CI_{50}$  28  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) enoil reductasa esencial para la biosíntesis de los ácidos micólicos en la bacteria *M. tuberculosis* (Cao *et al.*, 2002; Copp *et al.*, 2003); la cerulenina (6) y la tiolactomicina (7), derivados de ácidos grasos lineales aislados de *Cephalosporium caerulens* y *Nocardia sp*, respectivamente; ambos compuestos actúan como inhibidores de las ACP (proteínas acarreadoras de grupos acilo) indispensables para la biosíntesis de los ácidos micólicos (Slayden *et al.*, 1996; Parrish *et al.*, 1999); por último, el 5Z-7-oxozeaenol (8) aislado por primera vez de una cepa de *Streptomyces*; este metabolito es un potente inhibidor de las enzimas proteína cinasas involucradas en la biosíntesis de los ácidos micólicos (Waters *et al.*, 2002; Ninomiya-Tsuji *et al.*, 2003) (Figura 4).



**Figura 4.** Productos naturales selectos.

## 1.2 ANTECEDENTES BOTÁNICOS Y ETNOBOTÁNICOS DE *Arracacia toluensis* (H.B.K.) var. *multifida* Hemsley (S. Wats.) Mathias & Constance (*Umbelliferae*)

El género *Arracacia* Bancroft pertenece a la familia *Umbelliferae* y comprende alrededor de 30 especies y cuatro variedades las cuales se encuentran principalmente distribuidas en México centro y sur América (Bolivia, Perú, Ecuador, Venezuela y Colombia) (Knudsen *et al.*, 2001). Desde el punto de vista filogenético, este género se encuentra estrechamente relacionado con el género *Neonelsonia* Benth. (Mathias y Constance, 1976).

*Arracacia toluensis* (H.B.K.) var. *multifida* Hemsley (S. Wats.) Mathias & Constance (*Umbelliferae*) es una planta perenne que mide aproximadamente tres metros de altura. La especie es endémica de México donde se distribuye desde Durango hasta Oaxaca, habita en praderas y matorrales, o bosques de roble o enebro. Sus hojas son trenado-pinnadas con segmentos angostos y aromáticas. Las inflorescencias son amarillas y en forma de umbela terminal. Sus frutos son secos y contienen semillas (Figura 5).



**Figura 5.** *Arracacia toluensis* (H.B.K.) var. *multifida* Hemsley (S. Wats.) Mathias & Constance (*Umbelliferae*).

*A. toluensis* se conoce popularmente con los nombres de “perejil”, “neldo”, “hierba del venado” y “cominos rústicos”, entre otros. Los frutos y las partes aéreas de la especie son utilizados en las prácticas médicas alternativas para el tratamiento de

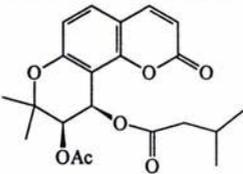
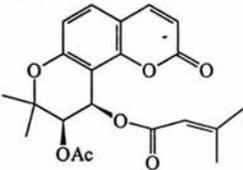
diversos padecimientos, destacando sus usos para el tratamiento de la tos y la bronquitis. También, se ha descrito el empleo de la planta como un condimento y agente tranquilizante (Bye, 2004).

### 1.3 ESTUDIOS QUÍMICOS SOBRE EL GÉNERO *Arracacia*

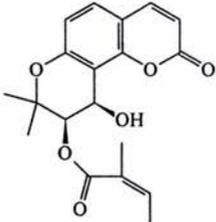
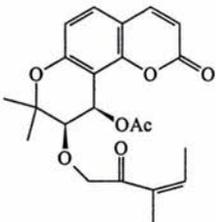
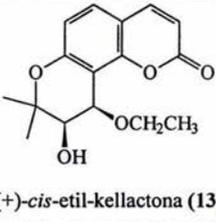
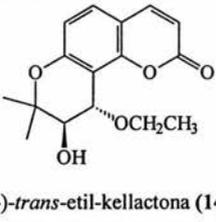
Las especies *A. vaginata* y *A. nelsonii* han sido investigadas desde el punto de vista químico. Los metabolitos secundarios aislados y caracterizados en estos estudios pertenecen a las categorías de las piranocumarinas, los monoterpenoides y los fenilpropanoides (Calderón y Ríos, 1975; Delgado y Garduño, 1987).

En el Cuadro 1 se ilustran las estructuras de los compuestos aislados de los distintos taxones investigados.

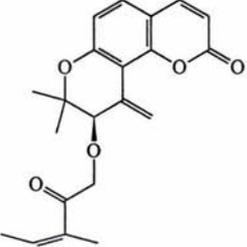
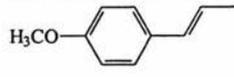
**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios aislados a partir del género *Arracacia*.

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>A. nelsonii</i>	 <p>(+)-suksdorfina (9)</p>	Delgado y Garduño, 1987
<i>A. nelsonii</i>	 <p>(-)-isosamidina (10)</p>	Delgado y Garduño, 1987

**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios aislados a partir del género *Arracacia* (continuación).

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>A. nelsonii</i>	 <p>(-)-3'-angeloil-<i>cis</i>-kellactona (11)</p>	Delgado y Garduño, 1987
<i>A. nelsonii</i>	 <p>(+)-isopterixina (12)</p>	Delgado y Garduño, 1987
<i>A. nelsonii</i>	 <p>(+)-<i>cis</i>-etil-kellactona (13)</p>	Delgado y Garduño, 1987
<i>A. nelsonii</i>	 <p>(-)-<i>trans</i>-etil-kellactona (14)</p>	Delgado y Garduño, 1987

**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios aislados a partir del género *Arracacia* (continuación).

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>A. nelsonii</i>	 <p>(3<i>S</i>)-3'-angeloil-4'-oxo-kellactona (15)</p>	Delgado y Garduño, 1987
<i>A. vaginata</i>	 <p>esdragol (16)</p>	Calderón y Ríos, 1975
<i>A. vaginata</i>	 <p><i>trans</i>-anetol (17)</p>	Calderón y Ríos, 1975
<i>A. vaginata</i>	 <p>(+)-<math>\alpha</math>-pineno (18)</p>	Calderón y Ríos, 1975

## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La gran diversidad vegetal de México ofrece buenas posibilidades para el descubrimiento de nuevos principios antimicobacterianos. Es por ello que, la Facultad de Química de la UNAM, en conjunto con la Universidad de Arizona de los Estados Unidos de Norte América, participan en un programa multidisciplinario destinado a explorar el potencial terapéutico de especies selectas de la flora medicinal mexicana con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

En este marco de referencia surgió el presente proyecto de investigación, el cual describe el aislamiento y caracterización de compuestos con actividad antifúngica de la especie *Arracacia toluensis* (H.B.K.) var. *multifida* Hemsley (S. Wats.) Mathias & Constance (*Umbelliferae*). Para evaluar el potencial antimicobacteriano de la especie se preparó el extracto orgánico a partir del material vegetal desecado, estas evaluaciones se realizaron en el Instituto de Investigaciones sobre la Tuberculosis de la Universidad de Illinois en Chicago, EUA, utilizando un ensayo de tipo fluorimétrico (MABA) (Collins y Franzblau, 1997; Cantrell *et al.*, 1998). Los resultados de estas evaluaciones permitieron seleccionar a la especie *A. toluensis* como una fuente potencial de principios activos de interés terapéutico. En consecuencia, el objetivo general del presente trabajo es el aislamiento y caracterización de los principios activos responsables de la actividad antifúngica demostrada por el extracto total obtenido a partir de las partes aéreas de *A. toluensis* mediante la realización de un estudio fitoquímico biodirigido. Para el cumplimiento de éste objetivo, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- a) Preparar a mediana escala el extracto orgánico de las partes aéreas de la especie mediante un proceso de maceración.
- b) Realizar el fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico.
- c) Separar los principios activos a partir de las fracciones activas, empleando para ello, métodos cromatográficos convencionales.
- d) Identificar y caracterizar los componentes activos mediante la aplicación de métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos.
- e) Evaluar el potencial antimicobacteriano de los productos naturales aislados.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL

Las partes aéreas de *Arracacia toluensis* (H.B.K.) var. *multifida* Hemsley (S. Wats.) Mathias & Constance (*Umbelliferae*) utilizadas en el presente estudio fueron recolectadas en el Sur del Valle de México, Distrito Federal, el 27 de Septiembre de 1999. La clasificación botánica de la especie estuvo a cargo del Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, UNAM). Un ejemplar de referencia (Voucher: Bye & Morales 27040) se depositó en la Colección Etnobotánica del Herbario Nacional (MEXU), Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM.

El proceso de desecación del material vegetal se realizó a temperatura ambiente y la fragmentación del mismo se llevó a cabo en un molino Willey Modelo 4.

#### 3.2 ENSAYOS BIOLÓGICOS

##### 3.2.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICOBACTERIANA

El potencial antimicobacteriano del extracto, fracciones y/o compuestos puros se determinó de acuerdo a los procedimientos establecidos en el Instituto de Investigación sobre la Tuberculosis de la Universidad de Illinois, Chicago, Illinois, EUA (Collins y Franzblau, 1997; Cantrell *et al.*, 1998). Para ello se aplicó el bioensayo de tipo fluorimétrico MABA (Microplate Alamar Blue Assay) contra *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>RV ATCC 27294 (American Type Culture Collection, Rockville, MD). En el caso de los compuestos puros, los resultados se expresan como Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). La rifampina se utilizó como control positivo.

### 3.3 PROCEDIMIENTOS GENERALES

#### 3.3.1 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS

La Cromatografía en Columna Abierta (CCA) se realizó en columnas de vidrio de diferentes capacidades empacadas con gel de sílice (Kieselgel 60 Merck, tamaño de partícula 0.063-0.200 nm, malla de 70-230  $\mu\text{m}$  ASTM).

Los análisis Cromatográficos Cualitativos en Capa Fina (CCFP) se realizaron sobre placas de aluminio de 0.25 mm de grosor recubiertas con gel de sílice (60 F<sub>254</sub> Merck, malla de 3.5-7.0  $\mu\text{m}$  ASTM) de diferentes dimensiones, de acuerdo a las técnicas convencionales y empleando diversos sistemas de elución. Como agente revelador se empleó una solución de sulfato cérico amoniacal (Lowery *et al.*, 1993).

La separación y purificación de los productos naturales se realizó sobre placas de vidrio (20 x 20 cm) recubiertas con gel de sílice (60 F<sub>254</sub> Merck) de 0.25 mm ó 1.0 mm de grosor.

La Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, EUA) equipado con un detector de UV Dual 2487. El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa de software Millennium 2000 (Waters). Los análisis se realizaron a temperatura ambiente. La purificación de los compuestos se realizó empleando una columna de gel de sílice (Waters,  $\mu\text{porasil}$  60 Å, tamaño de partícula de 10  $\mu\text{m}$ ) de 19 mm de diámetro interno y 300 mm de longitud. La elución se realizó en un sistema isocrático con una mezcla binaria constituida por CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (99:1). Las longitudes de onda utilizadas para la detección de los compuestos fueron 270 y 285 nm.

### 3.3.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS NATURALES Y SUS DERIVADOS

De manera general la caracterización de los productos naturales aislados o sus derivados se realizó mediante la aplicación de métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos.

#### 3.3.2.1 EQUIPOS UTILIZADOS

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns, y no se reportan corregidos.

La rotación óptica se midió en un polarímetro digital JASCO DIP 360. Los espectros en el IR se midieron en un espectrofotómetro modelo 599-B de rejilla Perkin Elmer, utilizando las técnicas de pastilla de KBr o película.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN<sup>1</sup>H) y de Carbono 13 (RMN<sup>13</sup>C) se registraron en un aparato Varian VXR-300S a 300 (<sup>1</sup>H)/75 (<sup>13</sup>C) MHz o Varian Unity Inova a 400 (<sup>1</sup>H)/100 (<sup>13</sup>C) MHz, empleando CDCl<sub>3</sub> y DMSO-*d*<sub>6</sub> como disolventes y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm.

Los espectros de Masas por la técnica de Impacto Electrónico (EMIE) se obtuvieron mediante un espectrómetro de masas HP 5890 (serie II) por introducción directa a 70 eV y un barrido de 33 a 700 unidades de masa carga (*m/z*) por segundo.

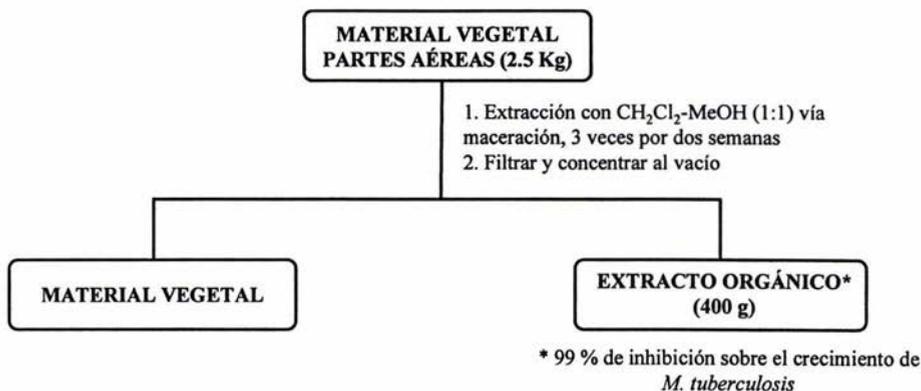
El registro de todos los espectros se efectuó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM.

### 3.4 ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LAS PARTES AÉREAS DE *A. toluensis*

#### 3.4.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO PRELIMINAR

El material vegetal seco y molido de las partes aéreas de *A. toluensis* (2.5 Kg) se extrajo mediante un proceso de maceración utilizando una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1)

(14 L) a temperatura ambiente. El extracto resultante se filtró y concentró a presión reducida, de acuerdo al procedimiento que se indica en la **Figura 6**.



**Figura 6.** Proceso de extracción de las partes aéreas de *A. tolucensis*.

El extracto orgánico activo de las partes aéreas de *A. tolucensis* (400 g) se fraccionó de manera preliminar mediante CCA, utilizando como adsorbente 1.25 Kg de gel de sílice y como fase móvil un gradiente de polaridad Hex-AcOEt-MeOH. Este proceso generó un total de once conjuntos de fracciones primarias (**F<sub>1</sub>-F<sub>11</sub>**). La evaluación de las mismas sobre la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* mediante el bioensayo fluorimétrico, permitió evidenciar que la actividad biológica se concentraba en las fracciones primarias **F<sub>5</sub>-F<sub>7</sub>** y **F<sub>9</sub>**.

En el **Cuadro 2** se resume el proceso cromatográfico correspondiente al fraccionamiento preliminar del extracto total de *A. tolucensis*.

### 3.4.2 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LA ISOIMPERATORINA (19) A PARTIR DE LA FRACCIÓN PRIMARIA F<sub>4</sub>

De la fracción primaria **F<sub>4</sub>**, cristalizaron de manera espontánea 700 mg de un sólido blanco cristalino, con un punto de fusión de 104-106 °C, identificado como la isoimperatorina (**19**).

**Cuadro 2.** Fraccionamiento preliminar por cromatografía en columna abierta del extracto total de *A. toluensis*.

FASE MÓVIL	PROPORCIÓN	ELUATOS	FRACCIONES REUNIDAS	CLAVE
Hex		1-5	1-6	F <sub>1</sub>
Hex-AcOEt	9:1	6-27	7-9	F <sub>2</sub>
	8:2	28-49	10-16	F <sub>3</sub>
	7:3	50-76	17-26	F <sub>4</sub>
	6:4	77-78	27-32	F <sub>5</sub> *
	1:1	79-82	33-41	F <sub>6</sub> *
	4:6	83-90	42-47	F <sub>7</sub> *
	3:7	91-94	48-62	F <sub>8</sub>
	1:9	95-100	63-88	F <sub>9</sub> *
	AcOEt		101-104	89-102
AcOEt-MeOH	8:2	105-108	103-110	F <sub>11</sub>
	1:1	109		

\* Fracciones bioactivas

### 3.4.3 AISLAMIENTO DE LA SUBEROSINA (20) Y EL OSTOL (21) A PARTIR DE LA FRACCIÓN PRIMARIA ACTIVA F<sub>5</sub>

Con la finalidad de separar los compuestos presentes en la fracción primaria activa F<sub>5</sub> (2.7 g, Cuadro 2) se realizó una CCA (108 g de gel de sílice) utilizando como fase móvil gradiente de Hex-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:0) → (0:1) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:0) → (0:1). El proceso cromatográfico anterior permitió obtener diez grupos de fracciones secundarias F<sub>5-I</sub>-F<sub>5-X</sub>. La evaluación biológica de las fracciones secundarias contra *M. tuberculosis* permitió comprobar que la actividad se concentraba en las fracciones F<sub>5-III</sub>-F<sub>5-X</sub>.

El análisis cromatográfico cualitativo en capa fina de las fracciones secundarias activas utilizando como eluyente una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (95:5), permitió evidenciar la similitud cromatográfica entre ellas, por lo cual se decidió reunir las para su estudio.

Posteriormente, la purificación de la mezcla por CCFP [ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (9:1)] permitió el aislamiento de 52 mg de la suberosina (**20**) como un aceite amarillo claro y 152 mg de un sólido blanco con un punto de fusión de 83-84 °C identificado como el ostol (**21**).

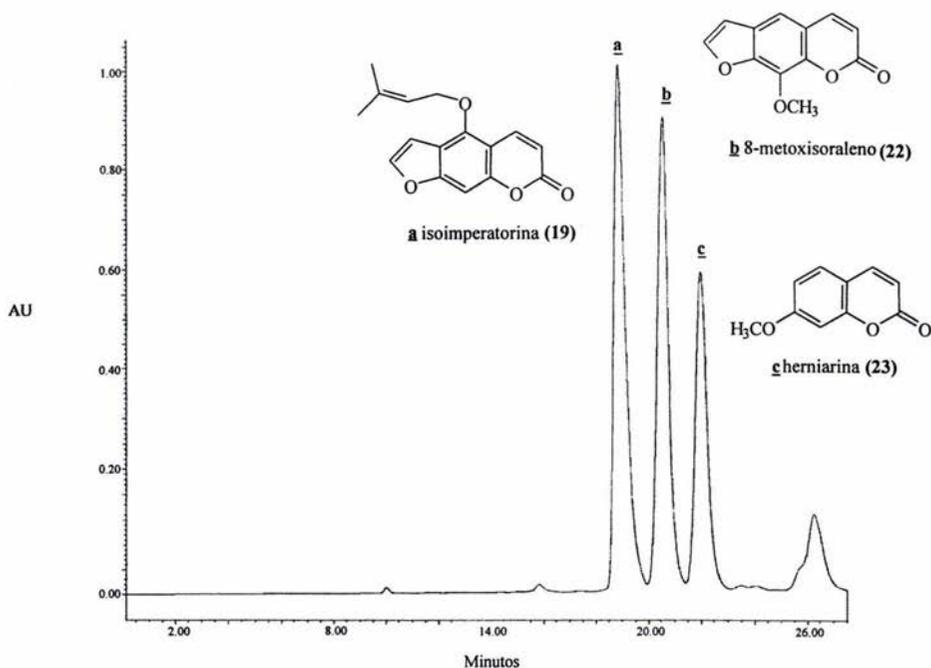
#### 3.4.4 AISLAMIENTO DE LA ISOIMPERATORINA (**19**), EL 8-METOXISORALENO (**22**), LA HERNIARINA (**23**) Y LA ESCOPARONA (**24**) A PARTIR DE LA FRACCIÓN PRIMARIA ACTIVA $F_6$

De la fracción primaria activa  $F_6$  cristalizaron de manera espontánea cantidades adicionales (205 mg) de la isoimperatorina (**19**) como un sólido cristalino blanco. De manera adicional, cristalizaron 506 mg de 8-metoxisoraleno (**22**), con un punto de fusión de 130-132 °C.

Con la finalidad de aislar los compuestos presentes en la fracción primaria activa  $F_6$  (2.6 g, **Cuadro 2**) se realizó una CCA sobre gel de sílice (152.0 g) utilizando como fase móvil un gradiente de polaridad  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH. Esta metodología generó un conjunto de siete fracciones secundarias. De nueva cuenta cada una de las fracciones secundarias se evaluó contra *M. tuberculosis* obteniéndose cuatro fracciones activas  $F_{6-II}$ ,  $F_{6-III}$ ,  $F_{6-V}$  y  $F_{6-VII}$ .

Las fracciones activas  $F_{6-II}$  y  $F_{6-III}$  contenían un producto mayoritario y se combinaron con base en su similitud cromatográfica. El producto se separó mediante CCFP, utilizando como sistema de elución  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (9:1). Esta técnica permitió obtener 20 mg de la escoparona (**24**) como un sólido blanco con un punto de fusión de 143-145 °C.

La separación de los constituyentes presentes en la fracción secundaria activa  $F_{6-V}$ , se realizó mediante CLAE. El cromatograma resultante se muestra en la **Figura 7**. La purificación de los residuos correspondientes a los picos mayoritarios (**a-c**) permitió el aislamiento de la isoimperatorina (50 mg, **19**) con un  $t_R$  de 18.76 min, el 8-metoxisoraleno (70 mg, **22**) con un  $t_R$  de 20.48 min y la herniarina (20 mg, **23**) con un  $t_R$  de 21.94 min.



**Figura 7.** Cromatograma de la fracción secundaria activa  $F_{6-v}$ . Condiciones de análisis: Detector UV, 270 nm. Sistema de elución  $CH_2Cl_2$ -MeOH (99:1). Flujo de 8.3 mL/min. Concentración 2.5 mg/50  $\mu$ L. Pico: a  $t_R$  18.76 min; b  $t_R$  20.48 min y c  $t_R$  21.94 min.

Por último, la resolución de la fracción secundaria activa  $F_{6-vII}$  mediante CCFP, [ $CH_2Cl_2$ -MeOH (95:5)], permitió el aislamiento y purificación de 25 mg adicionales del 8-metoxisoraleno (22) como un sólido cristalino blanco.

### 3.4.5 AISLAMIENTO DEL 8-METOXISORALENO (22), EL OSTOL (21) Y EL $\beta$ -SITOSTEROL (25) A PARTIR DE LA FRACCIÓN PRIMARIA ACTIVA $F_7$

El fraccionamiento secundario de la fracción activa  $F_7$  (1.7 g) mediante CCA [40 g de gel de sílice;  $CH_2Cl_2$  (1:0)  $\rightarrow$  MeOH (0:1)] condujo a la obtención de siete grupos de fracciones secundarias  $F_{7-I}$ - $F_{7-VII}$ . Las fracciones resultantes se evaluaron de manera

independiente mediante el bioensayo MABA sobre *M. tuberculosis*. El resultado de estas evaluaciones permitió determinar que la actividad biológica se concentraba en las fracciones **F<sub>7-II</sub>**, **F<sub>7-V</sub>** y **F<sub>7-VI</sub>**.

Las fracciones secundarias **F<sub>7-V</sub>** y **F<sub>7-VI</sub>** (98 mg) reunidas con base en su similitud cromatográfica fueron resueltas mediante CCFP utilizando como sistema de elución una mezcla binaria de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (97:3). Este proceso permitió el aislamiento de cantidades adicionales del 8-metoxisoraleno (30 mg, **22**) y ostol (30 mg, **21**).

El β-sitosterol (45 mg, **25**) fue aislado de la fracción secundaria **F<sub>7-II</sub>** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) como un sólido blanco cristalino, con un punto de fusión de 138-140 °C.

#### 3.4.6 AISLAMIENTO DE LA UMBELIFERONA (**26**) Y LA DIHIDROOXIPEUCEDANINA (**27**) A PARTIR DE LA FRACCIÓN PRIMARIA INACTIVA **F<sub>8</sub>**

La fracción primaria inactiva **F<sub>8</sub>** (13.0 g) se recromatografió en una columna abierta sobre gel de sílice (350 g). La elución se llevó a cabo con un gradiente de polaridad entre CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH. Este proceso generó un total de diez grupos de fracciones secundarias (**F<sub>8-I</sub>**-**F<sub>8-X</sub>**).

La resolución de la fracción secundaria **F<sub>8-VIII</sub>** mediante la aplicación de diversos procedimientos cromatográficos (CCA, CCFP), permitió el aislamiento y la purificación de 52 mg de la umbeliferona (**26**). Este producto se obtuvo como un sólido verdoso opaco con un punto de fusión de 230-232 °C.

El estudio de la fracción secundaria **F<sub>8-VII</sub>** mediante CCFP [sistema de elución: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (95:5)] permitió la obtención de 20 mg de un sólido amarillo con un punto de fusión de 134-135 °C. Este producto fue identificado como la dihidrooxipeucedanina (**27**).

#### 3.4.7 OBTENCIÓN DEL DERIVADO METILADO DE LA UMBELIFERONA (**26**)

A 10 mg de la umbeliferona (**26**) se adicionaron 10 mL de una solución etérea de diazometano preparada a partir de una solución de KOH (5.0 g en 8 mL de agua), 10 mL de

etanol y 5.0 g de *N*-metil-*N*-nitroso-*p*-toluensulfonamida (Diazald-Aldrich), en 45 mL de éter etílico. La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente durante 24 h. Como resultado de esta reacción se obtuvieron 13.1 mg del derivado metilado de la umbeliferona (26a).

#### 3.4.8 OBTENCIÓN DEL DERIVADO ACETILADO DE LA DIHIDROOXIPEUCEDANINA (27)

A una solución de 10 mg de la dihidrooxipeucedanina (27) en 0.1 mL de piridina anhidra se adicionaron 0.1 mL de anhídrido acético. La mezcla se dejó reaccionar durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se diluyó con 20 mL de agua y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A continuación la fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl 1N (3 x 20 mL), una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 x 20 mL) y por último, con agua desionizada (3 x 20 mL). Después de los lavados, la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío para generar 11.3 mg del derivado diacetilado de la dihidrooxipeucedanina (27a).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La obtención de los constituyentes activos a partir de la especie *A. toluensis* se realizó mediante un estudio fitoquímico biodirigido empleando como ensayo biológico de monitoreo el ensayo de azul de alamar. Este tipo de investigación es la más eficiente para la obtención de metabolitos secundarios bioactivos, tanto de interés medicinal como agroquímico (Eloff, 1998). Para el desarrollo de este estudio se diseñó la estrategia metodológica que se resume en el **Esquema 1**. Esta estrategia comprende las etapas que se enumeran a continuación:

1. Selección primaria de la especie *A. toluensis* mediante la evaluación biológica preliminar del extracto obtenido a partir de las partes aéreas de la planta.
2. Preparación del extracto orgánico en mediana escala.
3. Fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico.
4. Separación y purificación de los constituyentes presentes en las fracciones activas.
5. Elucidación estructural de los constituyentes bioactivos.
6. Evaluación del potencial antifímico de los compuestos puros.



**Esquema 1.** Estrategia metodológica empleada en el presente estudio.

#### 4.1 SELECCIÓN PRIMARIA DE LA ESPECIE *A. toluensis* COMO UNA FUENTE DE PRINCIPIOS ANTIMICOBACTERIANOS

La selección primaria de la especie *A. toluensis*, se realizó fundamentalmente con base en dos de las hipótesis más utilizadas para la detección de fuentes potenciales de principios bioactivos: la quimiotaxonómica y la etnomédica. La primera hipótesis se basa en los antecedentes de la familia *Umbelliferae*, como fuente valiosa de compuestos de tipo cumarinas, terpenoides y flavonoides con propiedades terapéuticas (Estévez-Braun y González, 1997; Trease y Evans, 2002). De las categorías de metabolitos antes mencionados cabe destacar que las cumarinas representan un grupo importante desde el punto de vista medicinal destacando sus propiedades antivirales (Craig *et al.*, 1999), antiinflamatorias (Ban *et al.*, 2003), analgésicas (Okuyama *et al.*, 2001), inhibidoras de la agregación plaquetaria (Jong *et al.*, 1992), anticancerígenas (Baba *et al.*, 2002), fotosensibilizadoras (Wayne, 1987) y antimicrobianas (Kwon *et al.*, 2002), entre otras.

La segunda hipótesis se fundamenta en el conocimiento del uso de las plantas en las prácticas médicas alternativas. Este conocimiento es de primordial importancia para el descubrimiento de fármacos de aplicación terapéutica.

Una vez realizado el proceso de selección primaria, se procedió a la recolección de la especie y a la preparación del extracto orgánico en pequeña escala. Posteriormente, el extracto resultante fue evaluado para determinar su potencial antifímico contra *M. tuberculosis*, empleando un ensayo de tipo fluorimétrico, específicamente el MABA indicado en el inciso 3.2.1 de la parte experimental. Los resultados obtenidos de la evaluación establecieron que el extracto preparado a partir de las partes aéreas de *A. toluensis* inhibe en un 99 % el crecimiento de *M. tuberculosis*.

#### 4.2 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS A PARTIR DE LA ESPECIE *A. toluensis*

La preparación del extracto vegetal en mediana escala destinado a la separación y purificación de los principios antimicobacterianos presentes en la especie *A. toluensis*, se realizó mediante un proceso de maceración con una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1) como

disolvente. Posteriormente, el extracto activo se fraccionó de manera preliminar mediante una cromatografía en columna abierta, usando gel de sílice como fase estacionaria. Este proceso generó un conjunto de once fracciones primarias (**F<sub>1</sub>-F<sub>11</sub>**). Cada una de las fracciones primarias se evaluó mediante el ensayo de tipo fluorimétrico (MABA) (Cantrell *et al.*, 1998) encontrándose que la actividad antifúngica se concentraba en las fracciones **F<sub>5-7</sub>** y **F<sub>9</sub>**. Los resultados de dicha evaluación se resumen en el **Cuadro 3**.

**Cuadro 3.** Actividad antimicobacteriana de las fracciones primarias de *A. toluensis*.

Muestra	Actividad antimicobacteriana (% de inhibición sobre el crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> )
Extracto íntegro	99
F <sub>5</sub>	100
F <sub>6</sub>	100
F <sub>7</sub>	100
F <sub>9</sub>	100
rifampina <sup>a</sup>	100

<sup>a</sup> Control positivo (0.1 µg/mL). El extracto y fracciones se evaluaron a 50 µg/mL.

El fraccionamiento secundario biodirigido de la fracción primaria activa **F<sub>5</sub>**, mediante una CCA sobre gel de sílice, permitió la obtención de diez fracciones secundarias. Cada una de las fracciones secundarias se evaluó mediante el ensayo de azul de alamar encontrándose que la actividad antimicobacteriana se concentraba en las fracciones secundarias **F<sub>5-III</sub>-F<sub>5-X</sub>** (**Cuadro 4**).

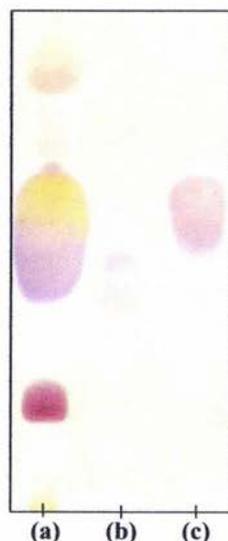
Las fracciones secundarias activas, reunidas con base en su similitud cromatográfica **F<sub>5-III</sub>-F<sub>5-X</sub>** (**Figura 8**), fueron sometidas a sucesivos fraccionamientos aplicando los métodos cromatográficos convencionales de tal forma de aislar los compuestos responsables de la actividad antifúngica. Así, fue posible aislar a las cumarinas suberosina (**20**) y ostol (**21**).

El fraccionamiento secundario de la fracción activa **F<sub>6</sub>**, a través de una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice, generó un conjunto de siete fracciones secundarias (**F<sub>6-I</sub>-F<sub>6-VII</sub>**). La evaluación de las fracciones resultantes para determinar su potencial antimicobacteriano permitió establecer que la actividad se concentraba en las fracciones secundarias **F<sub>6-II</sub>**, **F<sub>6-III</sub>**, **F<sub>6-V</sub>** y **F<sub>6-VII</sub>** (**Cuadro 5**). La resolución de estas

**Cuadro 4.** Actividad sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* de las fracciones secundarias obtenidas a partir de la fracción primaria activa F<sub>5</sub>.

Muestra	Actividad antimicobacteriana (% de inhibición sobre el crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> )
F <sub>5-I</sub>	97
F <sub>5-II</sub>	87
F <sub>5-III</sub>	100
F <sub>5-IV</sub>	100
F <sub>5-V</sub>	100
F <sub>5-VI</sub>	100
F <sub>5-VII</sub>	100
F <sub>5-VIII</sub>	100
F <sub>5-IX</sub>	100
F <sub>5-X</sub>	100
rifampina <sup>a</sup>	100

<sup>a</sup> Control positivo (0.1 µg/mL). El extracto y fracciones se evaluaron a 50 µg/mL.



Sistema de elución: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (95:5)  
 Agente revelador: sulfato cérico amoniacal  
**(a)** Fracciones secundarias F<sub>5-III</sub>-F<sub>5-X</sub>  
**(b)** Suberosina (20)  
**(c)** Ostol (21)

**Figura 8.** Cromatograma de las fracciones secundarias activas obtenidas a partir de la fracción F<sub>5</sub>.

**Cuadro 5.** Actividad sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* de las fracciones secundarias obtenidas a partir de la fracción primaria activa F<sub>6</sub>.

Muestra	Actividad antimicobacteriana (% de inhibición sobre el crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> )
F <sub>6-I</sub>	42
F <sub>6-II</sub>	99
F <sub>6-III</sub>	97
F <sub>6-IV</sub>	81
F <sub>6-V</sub>	98
F <sub>6-VI</sub>	0
F <sub>6-VII</sub>	99
rifampina <sup>a</sup>	100

<sup>a</sup> Control positivo (0.1 µg/mL). El extracto y fracciones se evaluaron a 50 µg/mL.

fracciones aplicando de nueva cuenta los mismos procedimientos cromatográficos (CLAE, CCFP) permitió el aislamiento de 8-metoxisoraleno (22), isoimperatorina (19), herniarina (23) y escoparona (24).

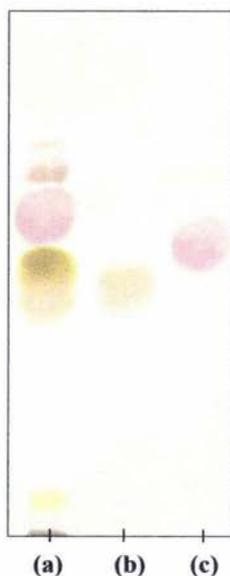
La resolución de la fracción secundaria activa F<sub>7</sub> mediante una CCA sobre gel de sílice, permitió la obtención de un conjunto de siete fracciones secundarias. La evaluación de las fracciones obtenidas sobre la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis*, permitió determinar que la actividad biológica se limitaba a las fracciones secundarias F<sub>7-II</sub>, F<sub>7-V</sub>-F<sub>7-VI</sub> (Cuadro 6). El análisis cromatográfico cualitativo de las fracciones activas permitió detectar la presencia de dos compuestos mayoritarios identificados como el 8-metoxisoraleno (22) y el ostol (21) (Figura 9). De la fracción secundaria F<sub>7-II</sub> se aisló el β-sitosterol (25).

Por último, el fraccionamiento cromatográfico secundario de la fracción primaria inactiva F<sub>8</sub>, condujo al aislamiento de la umbeliferona (26) y de la furanocumarina dihidrooxipeucedanina (27).

**Cuadro 6.** Actividad sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* de las fracciones secundarias obtenidas a partir de la fracción primaria activa F<sub>7</sub>.

Muestra	Actividad antimicobacteriana (% de inhibición sobre el crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> )
F <sub>7-I</sub>	33
F <sub>7-II</sub>	97
F <sub>7-III</sub>	48
F <sub>7-IV</sub>	67
F <sub>7-V</sub>	96
F <sub>7-VI</sub>	94
F <sub>7-VII</sub>	91
rifampina <sup>a</sup>	100

<sup>a</sup> Control positivo (0.1 µg/mL). El extracto y fracciones se evaluaron a 50 µg/mL.



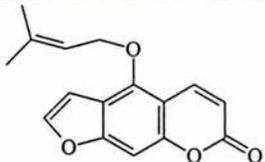
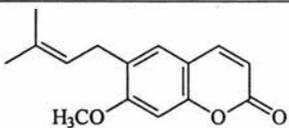
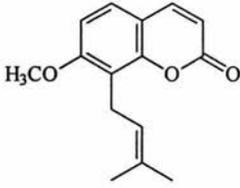
Sistema de elución: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (97:3)  
 Agente revelador: sulfato cérico amoniacal  
 (a) Fracciones secundarias F<sub>7-V-VI</sub>  
 (b) 8-Metoxisoraleno (22)  
 (c) Ostol (21)

**Figura 9.** Cromatograma de las fracciones secundarias activas obtenidas a partir de la fracción F<sub>7</sub>.

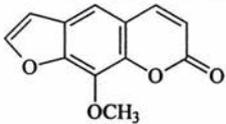
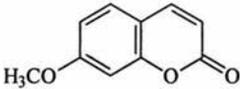
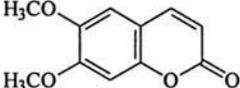
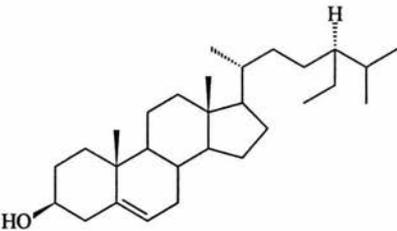
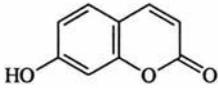
## 4.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS AISLADOS

La caracterización de los compuestos aislados en el presente estudio se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos y químicos. De los nueve compuestos obtenidos (**Cuadro 7**) a partir de las partes aéreas de *A. toluensis*, cinco pertenecen al grupo de las cumarinas simples (**20**, **21**, **23**, **24** y **26**) y tres al grupo de las furanocumarinas lineales (**19**, **22** y **27**).

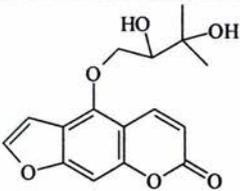
**Cuadro 7.** Metabolitos secundarios aislados a partir de las partes aéreas de *A. toluensis*.

COMPUESTO	RENDIMIENTO (%)
 <p>isoimperatorina (<b>19</b>)</p>	$3.82 \times 10^{-2}$
 <p>suberosina (<b>20</b>)</p>	$2.08 \times 10^{-3}$
 <p>ostol (<b>21</b>)</p>	$7.28 \times 10^{-3}$

**Cuadro 7.** Metabolitos secundarios aislados a partir de las partes aéreas de *A. toluensis* (continuación).

COMPUESTO	RENDIMIENTO (%)
 <p>8-metoxisoraleno (22)</p>	$2.52 \times 10^{-2}$
 <p>herniarina (23)</p>	$8.00 \times 10^{-4}$
 <p>escoparona (24)</p>	$8.00 \times 10^{-4}$
 <p><math>\beta</math>-sitosterol (25)</p>	$1.80 \times 10^{-3}$
 <p>umbeliferona (26)</p>	$2.08 \times 10^{-3}$

**Cuadro 7.** Metabolitos secundarios aislados a partir de las partes aéreas de *A. toluensis* (continuación).

COMPUESTO	RENDIMIENTO (%)
 <p>dihidrooxipeucedanina (27)</p>	$8.00 \times 10^{-4}$

#### 4.3.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS CUMARINAS SIMPLES AISLADAS DE LA ESPECIE *A. toluensis*

Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos aislados se resumen en las **Tablas 1-3**.

##### 4.3.1.1 CARACTERIZACIÓN DE LA HERNIARINA (23) Y LA UMBELIFERONA (26)

La herniarina (**23**) se obtuvo como un líquido aceitoso amarillo. El espectro en el IR presentó bandas de absorción características para grupos carbonilo de lactona ( $1721 \text{ cm}^{-1}$ ) y dobles enlaces ( $1559$ ,  $1089$  y  $827 \text{ cm}^{-1}$ ). El EMIE presentó un ión molecular (pico base) en una relación masa-carga ( $m/z$ ) de 206 uma. La fórmula molecular se estableció como  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3$  y permite siete grados de insaturación. La información proporcionada por los espectros de masas y el análisis de los espectros de RMN de **23** (**Espectros 1 y 2**), así como consideraciones de tipo quimiotaxonómico permitieron confirmar la presencia de un núcleo de tipo benzo- $\alpha$ -pirona en el producto natural (Estévez-Braun y González, 1997).

**Tabla 1.** Constantes físicas de la suberosina (20), ostol (21), herniarina (23), escoparona (24) y umbeliferona (26).

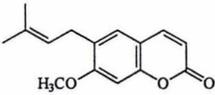
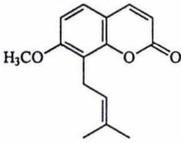
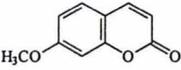
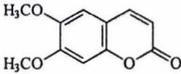
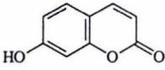
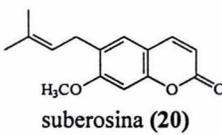
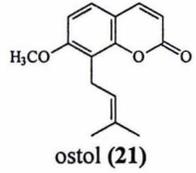
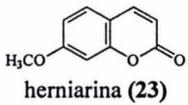
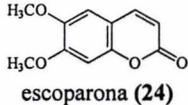
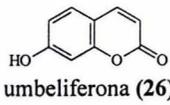
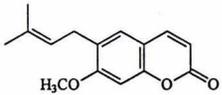
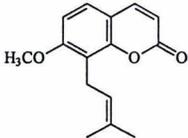
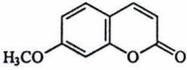
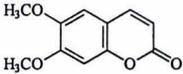
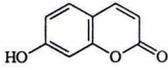
Compuesto					
	suberosina (20)	ostol (21)	herniarina (23)	escoparona (24)	umbeliferona (26)
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
<b>Punto de fusión</b>	87-88 °C	83-84 °C	-	143-145 °C	230-232 °C
<b>IR<sub>umáx</sub> (KBr) cm<sup>-1</sup></b>	2909, 1721, 1603, 1250, 1089, 827	2909, 1721, 1603, 1250, 1089, 827	2920, 1721, 1559, 1234, 1089, 827	2920, 1719, 1560, 1234, 827	3165, 2927, 1709, 1604, 1566, 1234, 1129, 836
<b>EIME <i>m/z</i> (int. rel.)</b>	244 [M <sup>+</sup> ](100), 229 [M-15](85), 201 (4), 189 (15)	244 [M <sup>+</sup> ](100), 229 [M-15](85), 201 (46), 189 (43)	176 [M <sup>+</sup> ](100), 148 [M-28](69), 133 (64)	206 [M <sup>+</sup> ](100), 191 (58), 163 (24), 135 (13)	162 [M <sup>+</sup> ](100), 134 [M-28](72), 105 (12), 78 (12)

Tabla 2. Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de las cumarinas suberosina (20), ostol (21), herniarina (23), escoparona (24) y umbeliferona (26).

Posición	 suberosina (20)	 ostol (21)	 herniarina (23)	 escoparona (24)	 umbeliferona (26)
	$\delta_H^*$	$\delta_H^*$	$\delta_H^*$	$\delta_H^*$	$\delta_H^*$
3	6.23 (d, $J = 9.6$ Hz)	6.23 (d, $J = 9.3$ Hz)	6.26 (d, $J = 9.6$ Hz)	6.29 (d, $J = 9.3$ Hz)	6.17 (d, $J = 9.6$ Hz)
4	7.62 (d, $J = 9.6$ Hz)	7.61 (d, $J = 9.6$ Hz)	7.64 (d, $J = 9.6$ Hz)	7.63 (d, $J = 9.5$ Hz)	7.83 (d, $J = 9.3$ Hz)
5	7.18 (s)	7.29 (d, $J = 8.7$ Hz)	7.38 (d, $J = 8.1$ Hz)	6.86 (s)	7.44 (d, $J = 8.4$ Hz)
6	-	6.83 (d, $J = 8.7$ Hz)	6.85 (dd, $J = 2.4$ y 8.4 Hz)	-	6.78 (dd, $J = 2.4$ y 8.6 Hz)
8	6.77 (s)	-	6.83 (d, $J = 2.4$ Hz)	6.85 (s)	6.69 (d, $J = 2.4$ Hz)
1'	3.31 (d, $J = 7.2$ Hz)	3.53 (d, $J = 7.2$ Hz)	-	-	-
2'	5.28 (d, $J = 7.4$ Hz)	5.22 (d, $J = 7.2$ Hz)	-	-	-
4'	1.77 (s)	1.84 (s)	-	-	-
5'	1.70 (s)	1.67 (s)	-	-	-
CH <sub>3</sub> O-6	-	-	-	3.93 (s)	-
CH <sub>3</sub> O-7	3.90 (s)	3.92 (s)	3.35 (s)	3.96 (s)	-

\* Los valores del desplazamiento químico se expresan en ppm. El estándar interno es TMS.

**Tabla 3.** Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de las cumarinas suberosina (**20**), ostol (**21**), herniarina (**23**), escoparona (**24**) y umbeliferona (**26**).

Posición					
	suberosina ( <b>20</b> )	ostol ( <b>21</b> )	herniarina ( <b>23</b> )	escoparona ( <b>24</b> )	umbeliferona ( <b>26</b> )
	$\delta_c^*$	$\delta_c^*$	$\delta_c^*$	$\delta_c^*$	$\delta_c^*$
<b>2</b>	161.52	161.36	162.83	161.38	160.70
<b>3</b>	112.67	112.92	113.12	113.57	111.50
<b>4</b>	143.62	143.73	143.38	143.26	144.30
<b>4a</b>	111.83	117.90	112.54	111.43	111.50
<b>5</b>	127.35	126.17	128.73	107.96	129.50
<b>6</b>	127.43	107.30	112.61	150.04	113.50
<b>7</b>	160.60	160.16	161.18	146.35	161.60
<b>8</b>	98.43	107.30	100.84	100.03	102.50
<b>8a</b>	154.41	152.76	155.93	152.86	155.70
<b>1'</b>	27.73	21.88	-	-	-
<b>2'</b>	121.27	121.10	-	-	-
<b>3'</b>	133.62	132.60	-	-	-
<b>4'</b>	17.72	17.90	-	-	-
<b>5'</b>	25.77	25.76	-	-	-
<b>CH<sub>3</sub>O-7</b>	55.81	56.00	55.78	56.36	-

\* Los valores del desplazamiento químico se expresan en ppm.

Las características más relevantes observadas en los espectros de RMN se indican a continuación:

- a) En  $\delta_H$  7.64 (d,  $J = 9.6$  Hz, H-4) y 6.26 (d,  $J = 9.6$  Hz, H-3) se observan dos señales dobles congruentes con la doble ligadura  $\Delta^{3,4}$  del núcleo cumarínico. De manera adicional, en la región aromática se observa la presencia de un sistema ABX [ $\delta_H$  7.38 (d,  $J = 8.1$  Hz, H-5), 6.85 (dd,  $J = 2.4$  y 8.4 Hz, H-6) y 6.83 (d,  $J = 2.4$  Hz, H-8)] característico de un anillo aromático trisustituido. Las señales del sistema ABX correlacionan en el espectro de Correlación Heteronuclear (HETCOR) con los metinos en  $\delta_C$  128.73, 112.61 y 100.84, respectivamente.
- b) En  $\delta_H$  3.9 se aprecia un singlete correspondiente a un grupo metoxilo unido a un anillo aromático. Esta señal correlaciona con el espectro HETCOR con la absorción en  $\delta_C$  55.78.

Las evidencias proporcionadas por los espectros de RMN claramente indicaban que el producto **23** contenía un núcleo cumarínico sustituido por un grupo metoxilo. Las constantes de acoplamiento obtenidas para los hidrógenos aromáticos, aunadas a consideraciones de tipo biogénico, permitieron establecer que el grupo metoxilo se encuentra en C-7.

Así, con base en las evidencias anteriores, la estructura del compuesto **23** se estableció como la de la herniarina.

Con respecto al producto **26**, los espectros de RMN resultaron muy similares a los del producto **23** difiriendo fundamentalmente, en la ausencia de las señales para el grupo metoxilo. Así, en el caso del espectro de  $RMN^1H$  (**Espectro 3**), en lugar de la señal del metoxilo, se observó un singlete ancho en  $\delta_H$  4.8, señal que desaparece al equilibrar el espectro con  $D_2O$ , por lo que se asignó a un grupo fenólico. Estas observaciones, aunadas a la diferencia de 14 unidades de masa en el EMIE, permitían inferir que el producto **26** era la umbeliferona. La metilación del producto **26** por tratamiento con diazometano confirmó químicamente la presencia de la función fenólica y permitió la correlación química entre los productos **23** y **26**.

#### 4.3.1.2 CARACTERIZACIÓN DE LA SUBEROSINA (20), LA ESCOPARONA (24) Y EL OSTOL (21)

El espectro en el IR generado por el producto **20** presenta bandas de absorción asociadas a grupos carbonilo de lactona ( $1721\text{ cm}^{-1}$ ) y dobles enlaces ( $1603$ ,  $1250$ ,  $1089$  y  $827\text{ cm}^{-1}$ ). El EMIE presentó un ión molecular (pico base) en una relación de  $m/z$  de 244 uma. Este ión corresponde a la fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$  y permite calcular un índice de deficiencia de hidrógenos de ocho.

Los espectros de RMN (**Espectros 4 y 5**), presentaron una notable semejanza a los del producto **23**, sin embargo, en este caso se observaron señales asociadas a un residuo isopentenil [ $\delta_{\text{H}}$  5.28 (t,  $J = 7.4\text{ Hz}$ , H-2'), 3.31 (d,  $J = 7.2\text{ Hz}$ , H-1'), 1.77 (s, H-4') y 1.7 (s, H-5') en el espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$ ; en  $\delta_{\text{C}}$  27.73 (C-1'), 121.27 (C-2'), 133.62 (C-3'), 17.72 (C-4') y 25.77 (C-5') en el espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$ ] que debía encontrarse unido al anillo carbocíclico de la cumarina. Entonces, el producto **20** contenía un anillo cumarínico disustituido por un grupo metoxilo y un residuo isopentenilo. Estas observaciones, aunadas a los cuadros de conectividad observados en el espectro NOESY [H-5/H-4, H-1'/H-4', H-5' y H-8/OCH<sub>3</sub>], y al hecho de que los hidrógenos aromáticos se aprecian como singuletes (**Figuras 10 y 11**), permitieron evidenciar la estructura del producto **20** como la de la suberosina.

El producto **24** fue muy similar al **20** difiriendo únicamente en el sustituyente en C-6. En lugar de las absorciones diagnósticas para el residuo isopentenilo, los espectros de RMN (**Espectros 6 y 7**) presentaron las señales características para un grupo metoxilo en  $\delta_{\text{H}}$  3.93/ $\delta_{\text{C}}$  56.36. Con base en el análisis anterior, la estructura del compuesto **24** fue establecida como la de la escoparona.

Por último, el producto **21** se obtuvo como un sólido blanco. El EMIE permitió determinar su fórmula molecular como  $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$  y permite ocho grados de insaturación. El ión molecular observado en  $m/z$  de 244 uma (pico base), sugiere que este producto es un isómero estructural del producto **20**. Así, la diferencia entre los dos productos radica en el patrón de sustitución del anillo cumarínico. Estas evidencias en conjunto con las constantes de acoplamiento observadas para los hidrógenos aromáticos y las correlaciones observadas

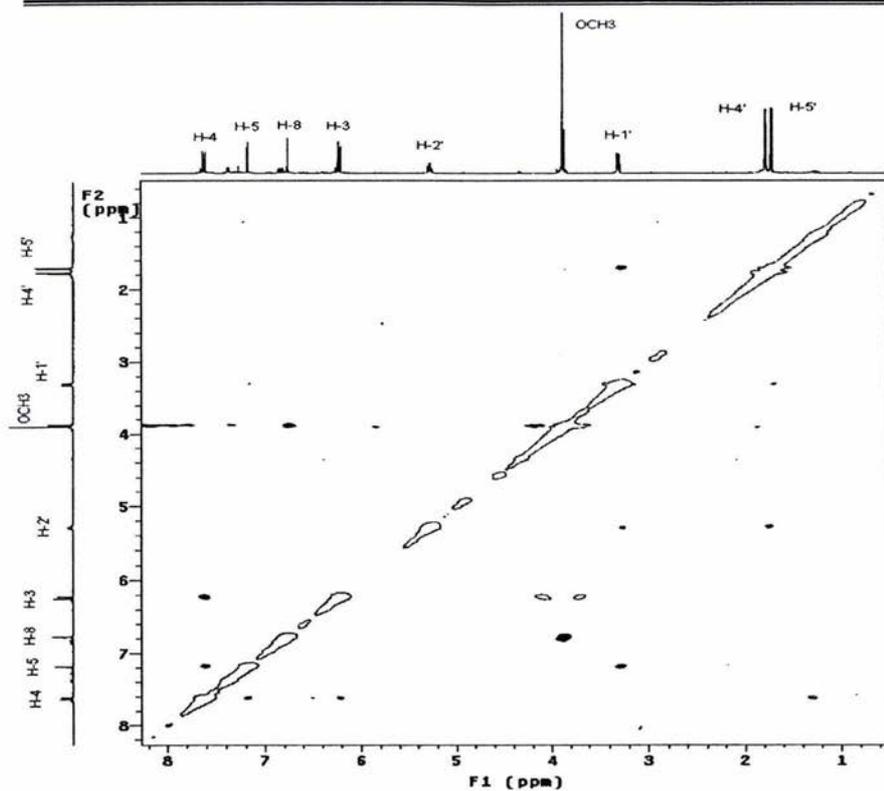
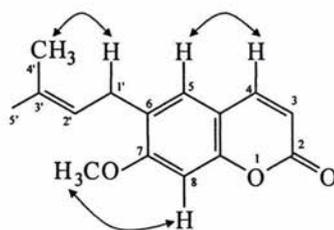


Figura 10. Espectro RMN<sup>1</sup>H-NOESY de la suberosina (20).



(20)

Figura 11. Correlaciones observadas en el espectro RMN<sup>1</sup>H-NOESY del compuesto (20).

en el espectro de NOESY (**Espectros 8 y 9, Figuras 12 y 13**) de este producto permitieron caracterizar al producto **21** como el ostol.

Cabe destacar que este es el primer reporte de la presencia de la suberosina (**20**), la escoparona (**24**) y el ostol (**21**) en una especie de *Arracacia*. Sin embargo, estos metabolitos se han aislado de otras umbelíferas pertenecientes a los géneros *Angelica*, *Peucedanum* y *Artemisia*, entre otros (Nayar y Bhan, 1972; Brown *et al.*, 1975; Estévez-Braun y González, 1997; Schinkovitz *et al.*, 2003).

La umbeliferona (**26**), es una fitoalexina utilizada como un colorante de contraste en numerosos protocolos experimentales. Por otra parte, este compuesto junto con la escoparona (**24**) y la suberosina (**20**) son importantes agentes antiproliferativos. Las propiedades antiproliferativas del producto **26** son atribuidas a su participación en los procesos de diferenciación celular y apoptosis, así como a la inhibición de la enzima topoisomerasa II (Kawaii *et al.*, 2001; Coert *et al.*, 2003). El ostol (**21**) posee propiedades hipotensoras, inhibitorias de la agregación plaquetaria y relajantes de la musculatura lisa. Esta última propiedad podría estar relacionada con la interferencia de este compuesto en el flujo de calcio intracelular (Hoult y Paya, 1996).

#### 4.3.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS FURANOCUMARINAS AISLADAS DE LA ESPECIE *A. toluensis*

Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos de tipo furanocumarina se resumen en las **Tablas 4-6**.

##### 4.3.2.1 CARACTERIZACIÓN DE LA ISOIMPERATORINA (**19**), EL 8-METOXISORALENO (**22**) Y LA DIHIDROOXIPEUCEDANINA (**27**)

El análisis detallado de los espectros de RMN permitió establecer que los productos naturales **19**, **22** y **27**, pertenecen al grupo de las furanocumarinas lineales (Ivie, 1978; Harkar *et al.*, 1984). Las evidencias más importantes que permitieron la identificación de estos productos se resumen en los párrafos siguientes; en primer lugar se analizarán las correspondientes al compuesto **27**, y a posteriori las de los compuestos **19** y **22**.

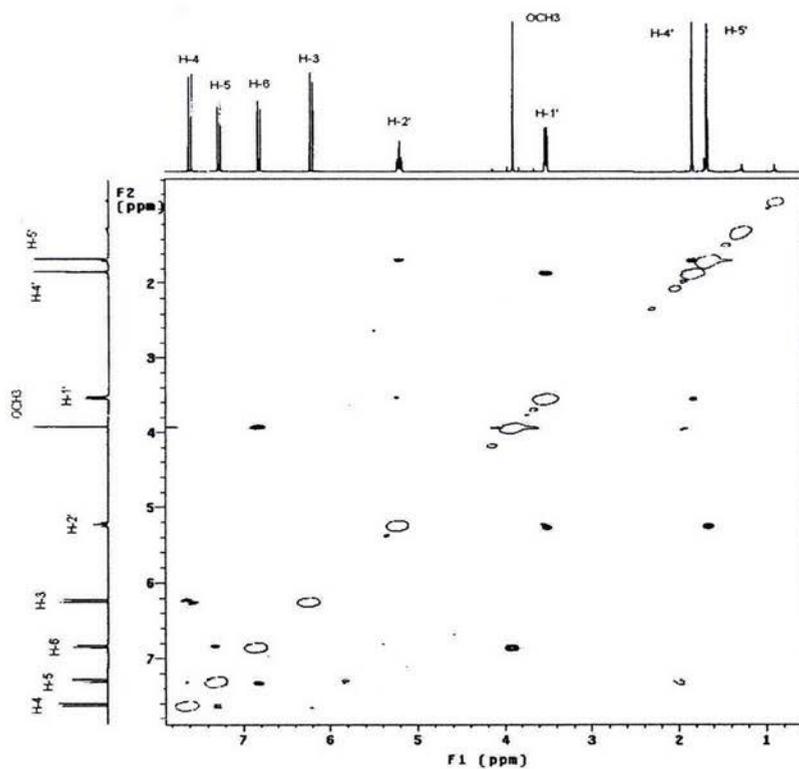


Figura 12. Espectro  $\text{RMN}^1\text{H}$ -NOESY del ostol (21).

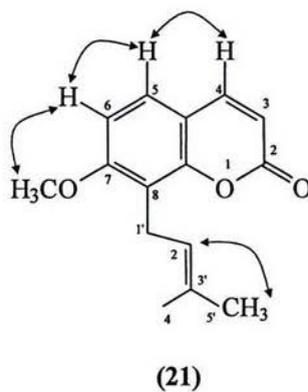


Figura 13. Correlaciones observadas en el espectro  $\text{RMN}^1\text{H}$ -NOESY del compuesto (21).

Tabla 4. Constantes físicas de la isoimperatorina (19), 8-metoxisoraleno (22) y dihidrooxipeucedanina (27).

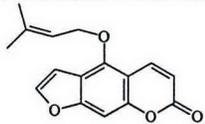
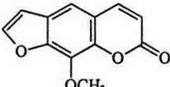
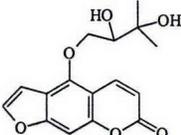
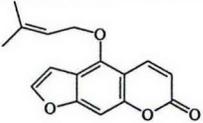
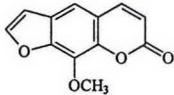
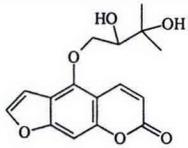
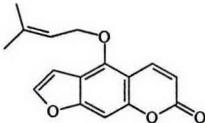
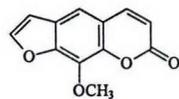
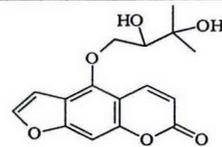
Compuesto			
	isoimperatorina (19)	8-metoxisoraleno (22)	dihidrooxipeucedanina (27)
Fórmula molecular	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>
Punto de fusión	104-106 °C	130-132 °C	134-135 °C
IR <sub>ν</sub> máx (KBr) cm <sup>-1</sup>	2979, 1728, 1455, 1122, 818	2950, 1708, 1583, 1153, 1099, 756	3432, 2925, 1727, 1624, 1455, 1133, 826
EIME <i>m/z</i> (int. rel.)	270 [M <sup>+</sup> ](100), 255 (95), 227 (53), 215 (25)	216 [M <sup>+</sup> ](100), 201 [M-15](40), 188 (20), 173 (63), 145 (30)	304 [M <sup>+</sup> ](100), 215 (30), 187 (30)

Tabla 5. Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de las furanocumarinas isoimperatorina (19), 8-metoxisoraleno (22) y dihidrooxipeucedanina (27).

Posición	 isoimperatorina (19)	 8-metoxisoraleno (22)	 dihidrooxipeucedanina (27)
	$\delta_H^*$	$\delta_H^*$	$\delta_H^*$
3	6.28 (d, $J = 9.4$ Hz)	6.38 (d, $J = 9.4$ Hz)	6.30 (d, $J = 9.6$ Hz)
4	8.17 (d, $J = 9.8$ Hz)	7.77 (d, $J = 9.2$ Hz)	8.20 (d, $J = 9.6$ Hz)
5	-	7.36 (s)	-
8	7.16 (s)	-	7.18 (s)
2'	7.60 (d, $J = 2.4$ Hz)	7.70 (d, $J = 2.0$ Hz)	7.62 (d, $J = 2.4$ Hz)
3'	6.96 (d, $J = 2.6$ Hz)	6.83 (d, $J = 2.0$ Hz)	7.00 (dd, $J = 2.4$ y 0.8 Hz)
2''	4.92 (d, $J = 6.9$ Hz)	-	2'' <sub>A</sub> 4.72 (dd, $J = 2.0$ y 10.0 Hz)
3''	5.54 (t, $J = 7.1$ Hz)	-	2'' <sub>B</sub> 4.67 (dd, $J = 7.6$ y 10.0 Hz)
5''	1.80 (s)	-	4.07 (dd, $J = 2.8$ y 7.2 Hz)
6''	1.70 (s)	-	1.7 (s)
CH <sub>3</sub> O-8	-	4.31 (s)	1.7 (s)
OH	-	-	2.6 (sa)

\* Los valores del desplazamiento químico se expresan en ppm. El estándar interno es TMS.

**Tabla 6.** Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de las furanocumarinas isoimperatorina (19), 8-metoxisoraleno (22) y dihidrooxipeucedanina (27).

Posición	 isoimperatorina (19)	 8-metoxisoraleno (22)	 dihidrooxipeucedanina (27)
	$\delta_c^*$	$\delta_c^*$	$\delta_c^*$
2	161.31	160.45	161.10
3	112.56	114.75	113.11
4	139.58	144.32	139.07
4a	107.51	116.47	107.33
5	148.94	112.88	152.51
6	114.19	126.11	114.12
7	158.12	147.66	158.06
8	94.23	132.79	94.87
8a	152.65	144.76	148.31
2'	144.87	146.63	145.32
3'	105.03	106.71	104.65
2''	69.73	-	74.06
3''	119.07	-	76.50
4''	139.84	-	71.45
5''	18.22	-	28.68
6''	15.82	-	28.68
CH <sub>3</sub> O-8	-	61.34	-

\* Los valores del desplazamiento químico se expresan en ppm.

El compuesto **27** se obtuvo como un sólido amarillo con un punto de fusión de 134-135 °C. El ión molecular de 304 una observado en el EMIE del producto natural corresponde a la fórmula  $C_{16}H_{16}O_6$ , la cual permite nueve insaturaciones.

El espectro en el IR, además del carbonilo en  $1727\text{ cm}^{-1}$ , presentó una absorción intensa para grupo hidroxilo en  $3432\text{ cm}^{-1}$ . La acetilación del producto natural con  $Ac_2O$ /piridina generó el diacetato (**27a**) confirmándose químicamente la presencia de dos hidroxilos carbinólicos en la molécula.

El análisis de los espectros de RMN (**Espectros 10 y 11**), permitieron comprobar que el producto **27** era una furanocumarina lineal (Wayne, 1978) sustituida en la posición C-5 con un residuo 2,3-dihidroxi-3-metilbutiriloxi. Las características más relevantes de los espectros de RMN del compuesto **27** se describen a continuación:

- a) En  $\delta_H$  8.20 (d,  $J = 9.6\text{ Hz}$ , H-4) y 6.3 (d,  $J = 9.6\text{ Hz}$ , H-3) se observan dos señales dobles diagnósticas del doble enlace de la unidad  $\alpha$ -pirona de una cumarina. Estas señales correlacionan en el espectro HETCOR con los metinos en  $\delta_C$  139.06 y 113.11, respectivamente.
- b) En  $\delta_H$  7.62 se aprecia un doblete ( $J = 2.4\text{ Hz}$ , H-2') y en  $\delta_H$  7.0 se observa una señal doble de doble ( $J = 2.4$  y  $0.8\text{ Hz}$ , H-3'), características del anillo furánico de una furanocumarina (Wayne, 1978; Harkar *et al.*, 1984). Estas señales correlacionan en el espectro HETCOR con los metinos en  $\delta_C$  145.32 y 104.65, respectivamente.
- c) En  $\delta_H$  7.18 aparece un singulete atribuible a un protón de tipo aromático. Esta señal correlaciona en el espectro HETCOR con la absorción en  $\delta_C$  94.87.
- d) En  $\delta_H$  2.60 se observa un singulete ancho atribuible a dos grupos hidroxilo. La señal desaparece al equilibrar el espectro con  $D_2O$ .
- e) Finalmente, las absorciones del residuo 2,3-dihidroxi-3-metilbutiriloxi aparecen en  $\delta_H/\delta_C$  4.72 (dd,  $J = 2.0$  y  $10.0\text{ Hz}$ , H-2''<sub>A</sub>), 4.67 (dd,  $J = 7.6$  y  $10.0\text{ Hz}$ , H-2''<sub>B</sub>), 4.07 (dd,  $J = 2.8$  y  $7.2\text{ Hz}$ , H-3'') y 1.70 (s, H-5'' y H-6'')/ 74.06 (C-2''), 76.50 (C-3''), 71.45 (C-4'') y 28.68 (C-5'' y C-6'').

Las características espectroscópicas y espectrométricas recién descritas sustentan que el producto **27** es una furanocumarina sustituida con un residuo de 2,3-dihidroxi-3-metilbutiriloxi en el anillo bencénico. Las correlaciones H-2''/H-3'', H-3''/H-5'', H-6'', H-3''/H-

4 y H-3'/H-2<sub>A</sub>" , H-2<sub>B</sub>" (**Figuras 14 y 15**) observadas en el espectro NOESY son congruentes con la disposición lineal del furano y con la ubicación del residuo 2,3-dihidroxi-3-metilbutiriloxi en C-5.

Por último, el valor positivo de la rotación óptica permitió establecer la configuración absoluta del centro C-3" como *R* (Nielsen y Lemmich, 1964; Nielsen y Lemmich, 1969).

Así, con base en las evidencias anteriores, la estructura del compuesto **27** se estableció como la de la dihidrooxipeucedanina.

La isoimperatorina (**19**) se obtuvo como un sólido cristalino blanco con punto de fusión de 104-106 °C. El espectro en el IR, evidenció la presencia de un grupo carbonilo de lactona (1728 cm<sup>-1</sup>) y el carácter aromático de la molécula (2979, 1455, 1122 y 818 cm<sup>-1</sup>). El EMIE permitió determinar su fórmula molecular como C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>. El ión molecular presentó 34 unidades de masa menos que el del producto **27**.

Los espectros de RMN (**Espectros 12 y 13**) resultaron muy similares a los del producto **27**, difiriendo fundamentalmente en la presencia de una señal asignable a una doble ligadura en  $\delta_{\text{H}}$  5.54 (t,  $J = 7.1$  Hz, H-3'')/  $\delta_{\text{C}}$  119.07 (C-3'') y  $\delta_{\text{C}}$  139.84 (H-4'') en los espectros de **19**, en lugar de las absorciones correspondientes al diol (C-3'' y C-4'') del producto **27**. La diferencia entre los productos **27** y **19** radica entonces en la naturaleza del residuo ubicado en C-5. Estas observaciones, aunadas a la diferencia de 34 unidades de masa en el EMIE permitían inferir que el producto **19** era la isoimperatorina.

El producto **22** fue muy similar al **19** difiriendo tan solo en el sustituyente en C-8, ya que los espectros de RMN (**Espectros 14 y 15**), en lugar de las absorciones para el residuo 2(*R*)-3-dihidroxi-3-metilbutiriloxi, presentaron las señales características de un grupo metoxilo ( $\delta_{\text{H}}$  4.31/ $\delta_{\text{C}}$  61.34). La ubicación de este grupo en C-8 se realizó con base en las correlaciones observadas entre H-3/H-4, H-4/H-5, H-5/H-3' y H-3'/H-2' en el espectro NOESY (**Figuras 16 y 17**).

Con base en las evidencias presentadas, el producto natural se caracterizó como el 8-metoxisoraleno (**22**).

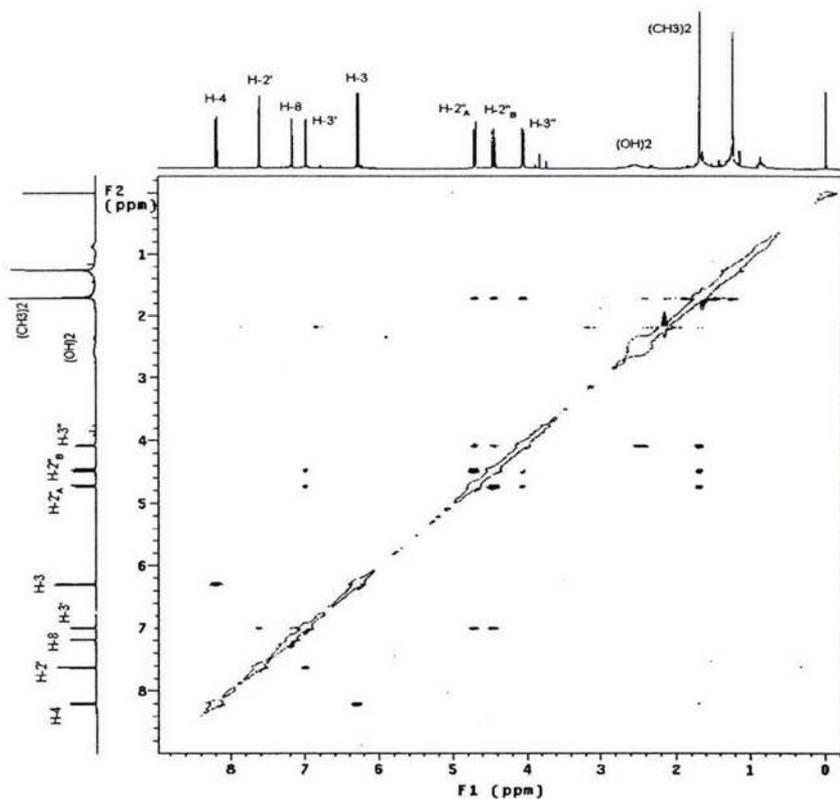


Figura 14. Espectro  $\text{RMN}^1\text{H}$ -NOESY de la dihidrooxipeucedanica (27).

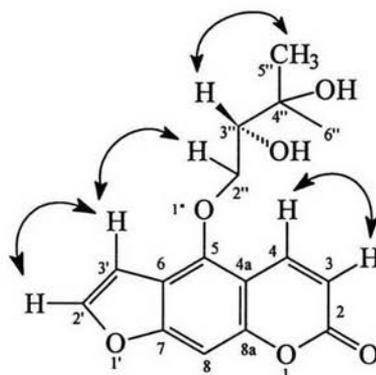


Figura 15. Correlaciones observadas en el espectro  $\text{RMN}^1\text{H}$ -NOESY del compuesto 27.

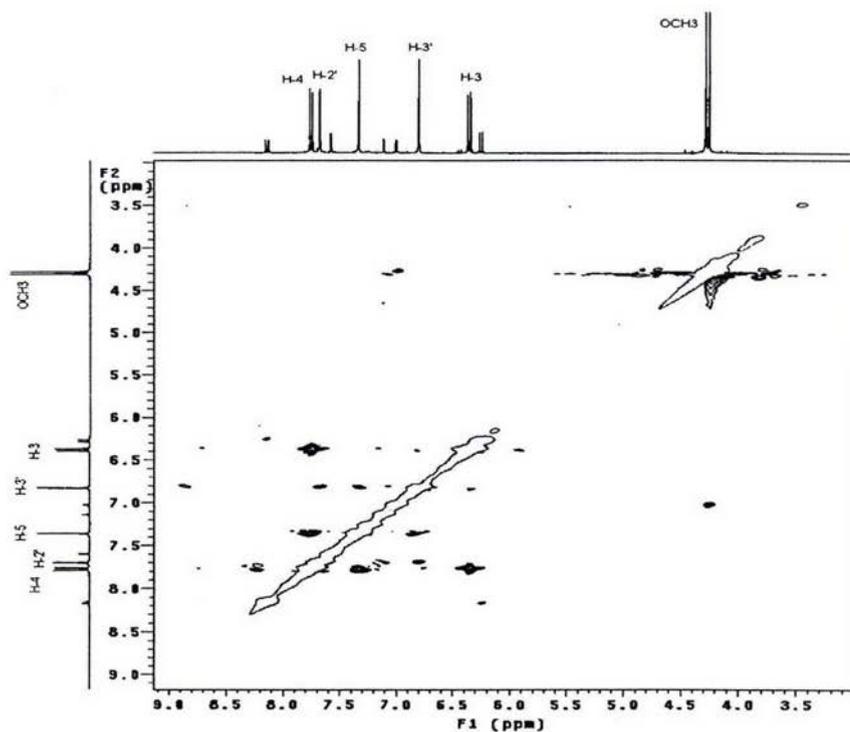


Figura 16. Espectro RMN<sup>1</sup>H-NOESY del 8-metoxisoraleno (22).

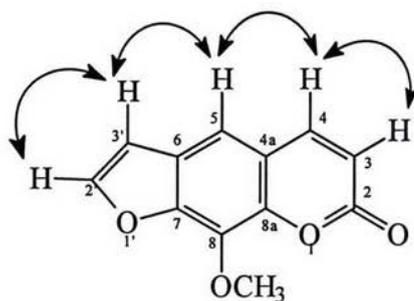


Figura 17. Correlaciones observadas en el espectro RMN<sup>1</sup>H-NOESY del compuesto 22.

Es de hacer notar, que este trabajo constituye el primer reporte de furanocumarinas en el género *Arracacia*. Sin embargo, estos productos se han aislado previamente de algunas especies de los géneros *Angelica* y *Ammi*, entre otros (Wayne, 1978; Harkar *et al.*, 1984).

El 8-metoxisoraleno (**22**), junto con el soraleno y el 5-metoxisoraleno, representan una clase de furanocumarinas utilizadas para el tratamiento de enfermedades de la piel, tales como el vitiligo, la soriasis y micosis. Sin embargo, el tratamiento prolongado con el compuesto **22** seguido de radiación con luz UVA, está asociado con una serie de efectos adversos que involucran un daño severo en la membrana celular, intercalamiento en el DNA y la unión a una gran variedad de proteínas citosólicas que desencadenan procesos de apoptosis y mutagenicidad (Heshmati, 2003). La isoimperatorina (**19**) tiene efectos antiinflamatorios, quimiopreventivos, inhibidores de la agregación plaquetaria y analgésicos, entre otros. Las propiedades antiinflamatorias de este producto son atribuidas a la supresión de la actividad de las enzimas ciclooxigenasa 1 (COX-1) y ciclooxigenasa 2 (COX-2) (Chen *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996; Abad *et al.*, 2001).

#### 4.4 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICOBACTERIANO DE LOS METABOLITOS AISLADOS

El potencial antimicobacteriano de los productos naturales obtenidos del extracto activo de *Arracacia toluensis* (H.B.K.) var. *multifida* Hemsley (S. Wats.) Mathias & Constance (*Umbelliferae*) se determinó también mediante la evaluación de su efecto inhibitorio del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>RV ATCC 27294, utilizando el bioensayo de tipo fluorimétrico MABA. Los resultados de las evaluaciones se indican en la **Tabla 7** y se encuentran expresadas como CMI. El criterio de actividad empleado considera como activo a un compuesto que presente una CMI menor o igual a 128 µg/mL (Cantrell *et al.*, 1998).

Los constituyentes más activos incluyeron a los productos naturales isoimperatorina (**19**), suberosina (**20**) y ostol (**21**). El 8-metoxisoraleno (**22**) presentó una actividad marginal y los demás resultaron inactivos.

**Tabla 7.** Actividad antimicobacteriana de los productos naturales aislados a partir de la especie *A. toluensis*.

Compuesto	Actividad antimicobacteriana
	Concentración Mínima Inhibitoria CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )[ $\mu\text{M}$ ]
isoimperatorina (19)	64 [236.7872]
suberosina (20)	16 [65.4958]
ostol (21)	32 [130.9917]
8-metoxisoraleno (22)	128 [592.0632]
herniarina (23)	>100
escoparona (24)	>100
umbeliferona (26)	>100
dihidrooxipeucedanina (27)	>100
rifampina <sup>a</sup>	0.1 [0.1215]

<sup>a</sup> Control positivo

Este trabajo constituye el segundo reporte de la propiedad antimicobacteriana de cumarinas. En el estudio de Schinkovitz y colaboradores (2003) se demostró que la ostrutina inhibe significativamente el crecimiento de *M. fortuitum* (CMI 6.7  $\mu\text{M}$ ). Este producto al igual que la suberosina (20) y el ostol (21) posee una cadena isoprenílica. La umbeliferona (26), sin embargo, fue poco sensible a *M. tuberculosis*. Este resultado se encuentra en armonía con los datos reportados por Schinkovitz y colaboradores (2003) quienes comprobaron que 26 no inhibe significativamente el crecimiento de *M. fortuitum* (CMI 760  $\mu\text{M}$ ). Cabe destacar que la sensibilidad de ambas micobacterias a los agentes terapéuticos y otros productos naturales es similar.

La presencia de las cumarinas suberosina (20) y el ostol (21) en la especie *A. toluensis* podría estar relacionada con sus usos en la medicina tradicional para el tratamiento de la tos y la bronquitis. A su vez, la isoimperatorina (19), con propiedades sedantes, podría explicar el empleo de la decocción de las hojas de *A. toluensis* como tranquilizante.

## V. RESUMEN Y CONCLUSIONES

- En el presente estudio se demostró el potencial antimicobacteriano de la especie *Arracacia toluensis* (H.B.K.) var. *multifida* Hemsley (S. Wats.) Mathias & Constance (*Umbelliferae*) mediante la evaluación del efecto de un extracto íntegro, fracciones y productos puros derivados de la planta sobre la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis*.
- Los resultados de la presente investigación corroboran que la preselección de las especies con base en el criterio etnomédico en conjunto con la determinación del potencial biológico mediante evaluaciones apropiadas puede conducir al descubrimiento de productos de posible utilidad terapéutica.
- El estudio fitoquímico biodirigido del extracto antimicobacteriano obtenido a partir de las partes aéreas de la especie *A. toluensis* permitió el aislamiento de ocho metabolitos secundarios caracterizados como la suberosina (20), ostol (21), escoparona (24), umbeliferona (26), herniarina (23), isoimperatorina (19), 8-metoxisoraleno (22) y la dihidrooxipeucedanina (27). A diferencia de *A. nelsonii*, esta especie no biosintetiza piranocumarinas
- Se determinó el potencial antimicobacteriano de los productos naturales aislados, encontrándose que la suberosina (20), el ostol (21) y la isoimperatorina (19) inhiben de manera significativa el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* (CMI 16, 32 y 64 µg/mL, respectivamente). El nivel de actividad que presentaron estos compuestos es comparable al de otros productos de origen vegetal.
- La presente investigación fitoquímica constituye una contribución original al conocimiento del contenido metabólico secundario de género *Arracacia* y de la flora medicinal mexicana.
- La especie *A. toluensis* constituye una fuente potencial de productos de uso terapéutico como la suberosina (20), el ostol (21) y el 8-metoxisoraleno (22).

## VI. BIBLIOGRAFÍA

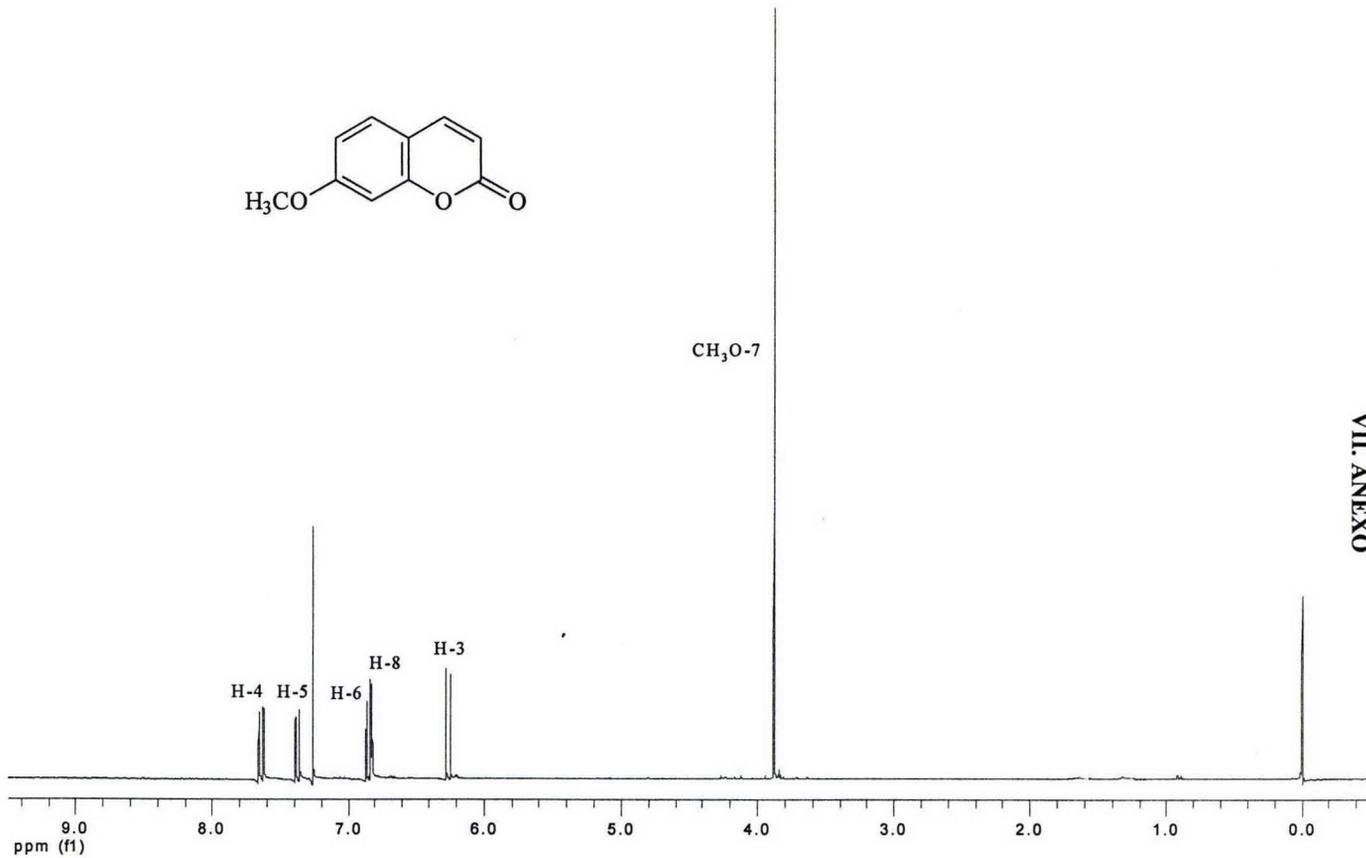
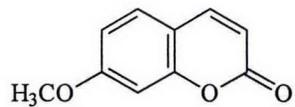
- Abad, M.J., De las Heras, B., Silvan, A.M., Pascual, R., Bermejo, P., Rodríguez, B., Villar, A.M. (2001). Effects of furocoumarins from *Cachrys trifida* on some macrophage functions. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **53**, 1163-1168.
- Baba, M., Jin, Y., Mizuno, A., Suzuki, H., Okada, Y., Takasuka, N., Tokuda, H., Nishina, H., Okuyama, T. (2002). Studies on cancer chemoprevention by traditional folk medicines XXIV. Inhibitory effect of a coumarin derivative, 7-isopentenylcoumarin, against tumor-promotion. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **25**, 244-246.
- Ban, H.S., Lim, S.S., Suzuki, K., Jung, S.H., Lee, S., Lee, Y.S., Shin, K.H., Ohuchi, Z. (2003). Inhibitory effects of furanocoumarins isolated from the roots of *Angelica dahurica* on prostaglandin E2 production. *Planta Medica*, **69**, 408-412.
- Brown, D., Asplund, R.O., McMahon, V.A. (1975). Phenolic Constituents of *Artemisia tridentata* spp. *vaseyana*. *Phytochemistry*, **14**, 1083-1084.
- Bye, R. (2004). Comunicación personal.
- Calderón, J. y Ríos, T. (1975). Isolation and Identification of Some Constituents of *Arracacia vaginata*. *Lloydia*, 174-175.
- Cantrell, C.L., Fisher, N.H., Urbatsch, L., McGuire, M.S., Franzblau, S.G. (1998). Antimycobacterial crude plant extracts from South, Central, and North America. *Phytomedicine*, **5**, 137-145.
- Cao, S., Lee, A.S.Y., Huang, Y., Flotow, H., Ng, S., Butler, M.S., Buss, A.D. (2002). Agonodepsides A and B: Two New Depsides from Filamentous Fungus F7524. *Journal of Natural Products*, **65**, 1037-1038.
- Chen, I.S., Chang, C.T., Sheen, W.S., Teng, C.M., Tsai, I.L., Duh, C.Y., Ko, F.N. (1996). Coumarins and antiplatelet aggregation constituents from Formosan *Peucedanum japonicum*. *Phytochemistry*, **41**, 525-530.
- Chen, I.S., Tsai, I.L., Wu, T.S. (1995). Anti-inflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens*. *Planta Medica*, **61**, 2-8.
- Coelho de Souza, G., Haas, A.P.S., von Poser, G.L., Schapoval, E.E.S., Elisabetsky, E. (2004). Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, **90**, 135-143.

- Coert, B.A., Anderson, R.E., Meyer, F.B. (2003). In neuroprotective efficacy of nNOS inhibitor 7-NI dependent on ischemic intracellular pH?. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, **284**, 151-159.
- Collins, L. y Franzblau, S.G. (1997). Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 system for high throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**, 1004-1009.
- Copp, B.R. (2003). Antimycobacterial natural products. *Natural Product Reports*, **20**, 535-557.
- Craig, W. (1999). Health-promoting properties of common herbs. *American Journal of Clinical Nutrition*, **70**, 4915-4995.
- Delgado, G. y Garduño, J. (1987). Pyranocoumarins from *Arracacia nelsonii*. *Phytochemistry*, **26**, 1139-1141.
- Eloff, J.N. (1998). Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?. *Journal of Ethnopharmacology*, **60**, 1-8.
- Estévez-Braun, A. y González, G.A. (1997). Coumarins. *Natural Product Reports*, **14**, 465-475.
- Evans, W.C. (2002). Pharmacognosy. Eds. WB Saunders. Edit. WB Saunders. UK. p 1-585.
- Ghannoum, M.A. y Rice, L.B. (1999). Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**, 501-517.
- Goodman, L.S. y Gilman, A. (1996). Antimicrobial Agents: Drugs Used in The Chemotherapy of Tuberculosis and Leprosy. En: The Pharmacological Basis of therapeutics. Eds. Molinoff y Ruddon. Ninth Edition. Edit. McGraw-Hill. USA. pp 1155-1174.
- Harkar, S., Razdan, T.K., Waight, E.S. (1984). Steroid, Chromone and Coumarins from *Angelica officinalis*. *Phytochemistry*, **23**, 419-426.
- Heshmati, F. (2003). Mechanism of action of extracorporeal photochemotherapy. *Transfusion & Apheresis Science*, **29**, 61-70.

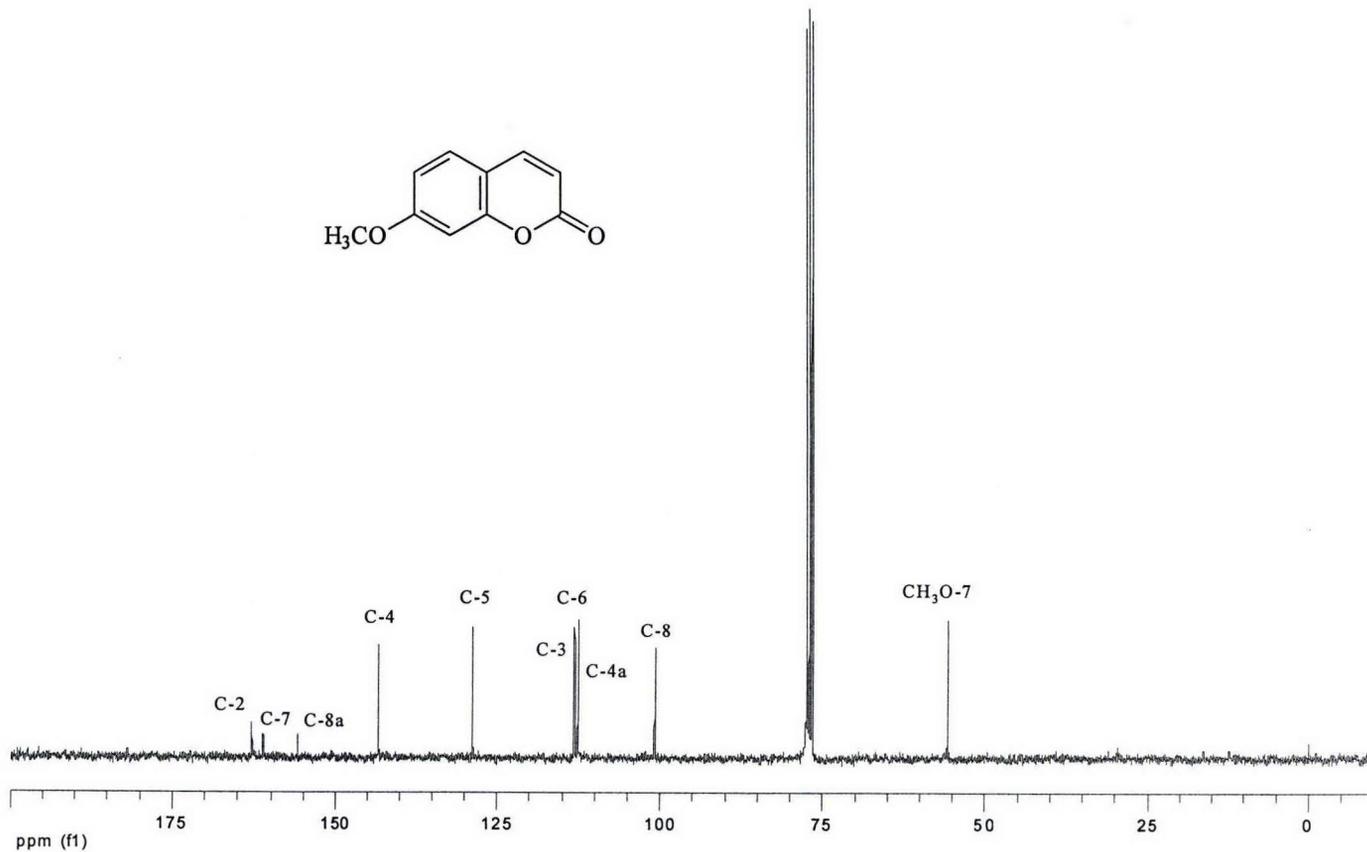
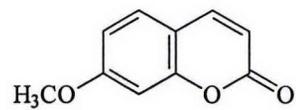
- Hoult, J.R. y Paya, M. (1996). Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *General Pharmacology*, **27**, 713-722.
- Iseman, D.M. (1994). Evolution of drug-resistant tuberculosis: A tale of two species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **19**, 2428-2429.
- Ivie, W.G. (1978). Linear Furocoumarins (Psoralens) from the Seed of Texas *Ammi majus* L. (Bishop's Weed). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **26**, 1394-1402.
- Jong, T.T., Hwang, H.C., Jean, M.Y., Wu, T.S., Teng, C.M. (1992). An antiplatelet aggregation principle and X-ray structural analysis of *cis*-khellactone diester from *Peucedanum japonicum*. *Journal of Natural Products*, **55**, 1396-1401.
- Kawaii, S., Tomono, Y., Ogawa, K., Sugiura, M., Yano, M., Yoshizawa, Y., Ito, C., Furukawa, H. (2001). Antiproliferative effect of isopentenylated coumarins on several cancer cell lines. *Anticancer research*, **21**, 1905-1911.
- Knudsen, S.R., Hermann, M., Sorensen, M. (2001). Flowering in six clones of the Andean root crop arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Brancroft). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **76**, 454-458.
- Kwon, Y.S., Choi, W.G., Kim, W.J., Kim, W.K., Kim, M.J., Kang, W.H., Kim, Ch.M. (2002). Antimicrobial constituents of *Foeniculum vulgare*. *Archives of Pharmacol Research*, **25**, 154-157.
- Long, R. (2000). Drug-resistant tuberculosis. *Journal de l'Association Médicale Canadienne*, **163**, 425-428.
- Lowery, C. (1993). Reagents Chemicals. American Chemical Society Specification. Edit. Washington D.C., pp 90-91.
- Mathias, M.E. y Constance, L. (1976). Flora of Ecuador. En: Umbelliferae. Eds. G. Marling y B. Sparre. Edit. Berlingska Baktryckeriet, 145 (5).
- Matu, E.N. y van Staden, J. (2003). Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, **87**, 35-41.
- Maureen, R.A. (1999). Tuberculosis: A Tough Adversary. *Chemical and Engineering News*, 52-69.

- McKinney, D.J. (2000). *In vivo* veritas: The search for TB drug targets goes live. *Nature Medicine*, **6**, 1330-1333.
- Mitscher, L.A., Leu, R., Bathala, M.S., Wu, W., Beal, J.L., White, R., (1972). Antimicrobial Agents from Higher Plants. I. Introduction, Rationale, and Methodology. *Lloydia*, **35**, 157-166.
- Nayar, M.N.S. y Bhan, M.K. (1972). Coumarins and other Constituents of *Hesperethusa crenulata*. *Phytochemistry*, **11**, 3331-3333.
- Newton, S.M., Lau, C., Wright, C.W. (2000). A review of antimycobacterial natural products. *Phytotherapy Research*, **14**, 303-322.
- Nielsen, E.B. y Lemmich, J. (1964). Constituents of Umbelliferous Plants. IV. The Coumarins of *Peucedanum palustre* L. The Structure of a New Coumarin. *Acta Chemica Scandinavica*, **18**, 1379-1383.
- Nielsen, E.B. y Lemmich, J. (1969). Constituents of Umbelliferous Plants. IX. The Configuration of (+)-Oxypeucedanin Hydrate and Related Coumarins. *Acta Chemica Scandinavica*, **23**, 962-966.
- Ninomiya-Tsuji, J., Kajino, T., Ono, K., Ohtomo, T., Matsumoto, M., Shiina, M., Mihara, M., Tsuchiya, M., Matsumoto, K. (2003). A Resorcylic Acid Lactone, 5Z-7-Oxozeanol, Prevents Inflammation by Inhibiting the Catalytic Activity of TAK1 MAPK Kinase Kinase. *J. Biol. Chem.*, **278**, 18485-18490.
- Okunade, L.A., Elvin-Lewis, F.M.P., Lewis, H.W. (2004). Natural antimycobacterial metabolites : current status. *Phytochemistry*, **65**, 1017-1032.
- Okuyama, E., Hasegawa, T., Matsushita, T., Fujimoto, H., Ishibashi, M., Yamazaki, M. (2001). Analgesic components of *Saposhnikovia* root (*Saposhnikovia divaricata*). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **49**, 154-160.
- Parrish, N.M., Kuhajda, F.P., Heine, H.S., Bishai, W.R., Dick, J.D. (1999). Antimicrobial activity of cerulenin and its effects on lipid biosynthesis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **43**, 219-226.
- Ram, A.J., Bhakshu, L.Md., Raju, R.R.V. (2004). In vitro antimicrobial activity of certain medicinal plants from Eastern Ghats, India, used for skin diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, **90**, 353-357.

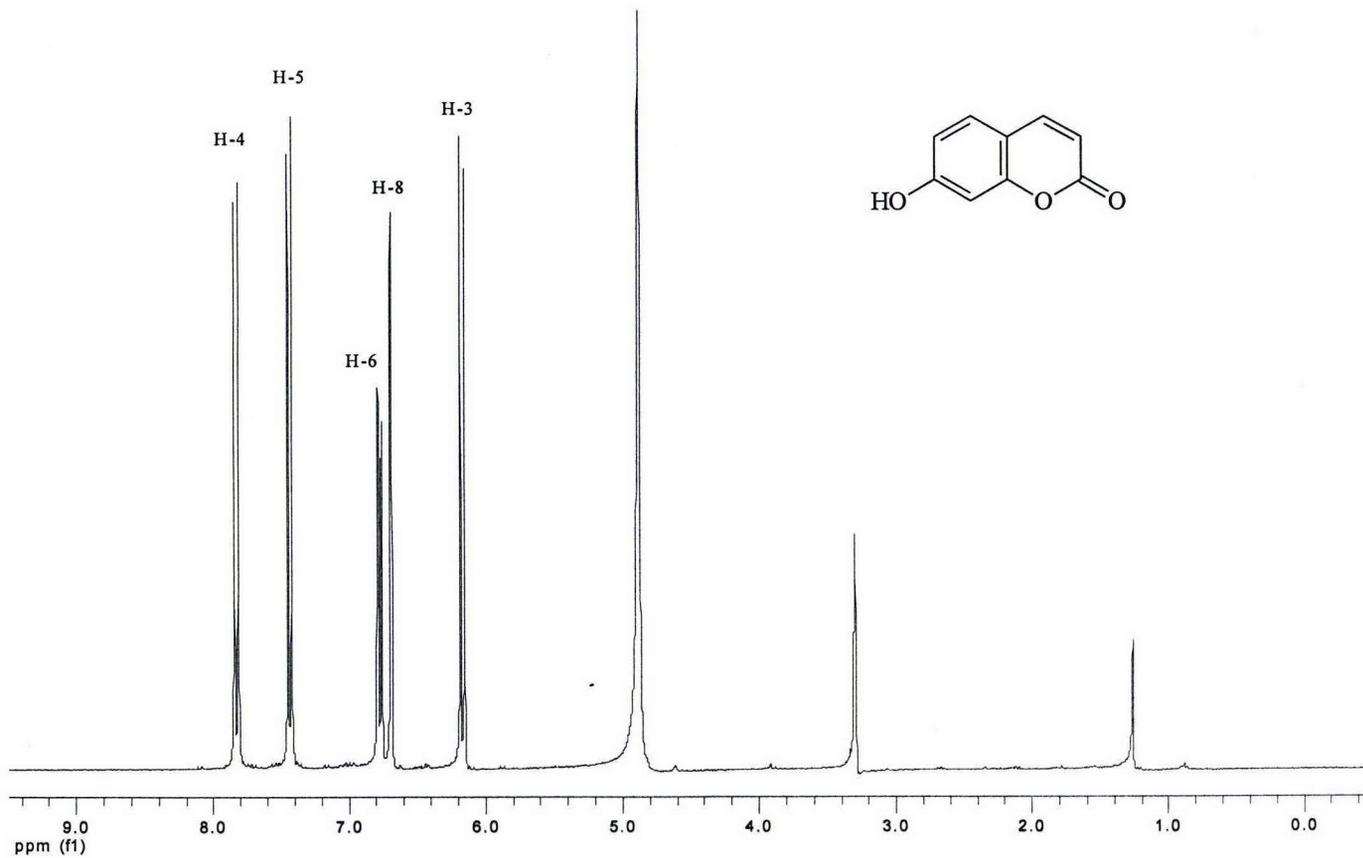
- Schinkovitz, A., Gibbons, S., Stavri, M., Cocksedge, M.J., Bucar, F. (2003). Ostruthin: An Antimycobacterial Coumarin from the roots of *Peucedanum ostruthium*. *Planta Medica*, **69**, 369-371.
- Sepkowitz, K.A., Raffalli, J., Riley, L., Kiehn, T.E., Armstrong, D. (1995). Tuberculosis in the AIDS Era. *Clinical Microbiology Reviews*, 180-199.
- Slayden, R.A., Lee, R.E., Armour, J.W., Cooper, A.M., Orme, I.M., Brennan, P.J., Besra, G.S. (1996). Antimycobacterial Action of Thiolactomycin: an Inhibitor of Fatty Acid and Mycolic Acid Synthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **40**, 2813-2819.
- Tegos, G., Stermitz, F.R., Lomovskaya, O., Lewis, K. (2002). Multidrug Pump Inhibitors Uncover Remarkable Activity of Plant Antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**, 3133-3141.
- Tomesi, C.N., Viale, A.A., Buschi, C.A., Scheingart, C.D., Iñigo, R.P.A., Zallocchi, F.M., Pomilio, A.B. (1986). Antimicrobial Screening of Some Argentine Higher Plants Part II. *Fitoterapia*, **57**, 46-50.
- Waters, B., Saxena, G., Wanggui, Y., Kau, D., Wrigley, S., Stokes, R., Davies, J. (2002). Identifying Protein Kinase Inhibitors Using an Assay Based on Inhibition of Aerial Hyphae Formation in *Streptomyces*. *The Journal of Antibiotics*, **55**, 407-416.
- Wayne, I.G. (1987). The chemistry of plant furanocoumarins and their medical, toxicological, environmental, and coevolutionary significance. *Revista Latinoamericana de Química*, **18**, 1-5.
- World Health Organization (2003). WHO *Tuberculosis*. WHO Geneva.



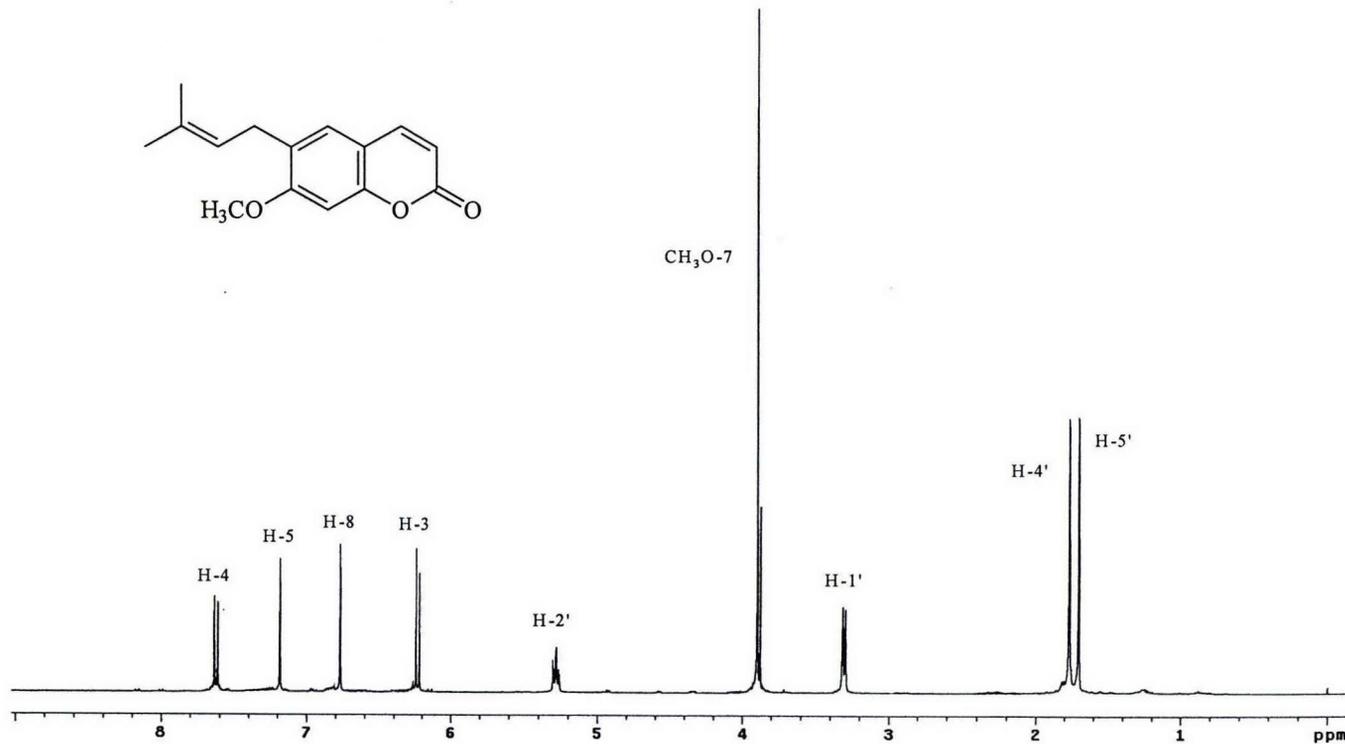
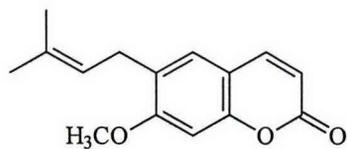
**Espectro 1.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H de la hemiarina (**23**) [300 MHz, CDCl<sub>3</sub>].



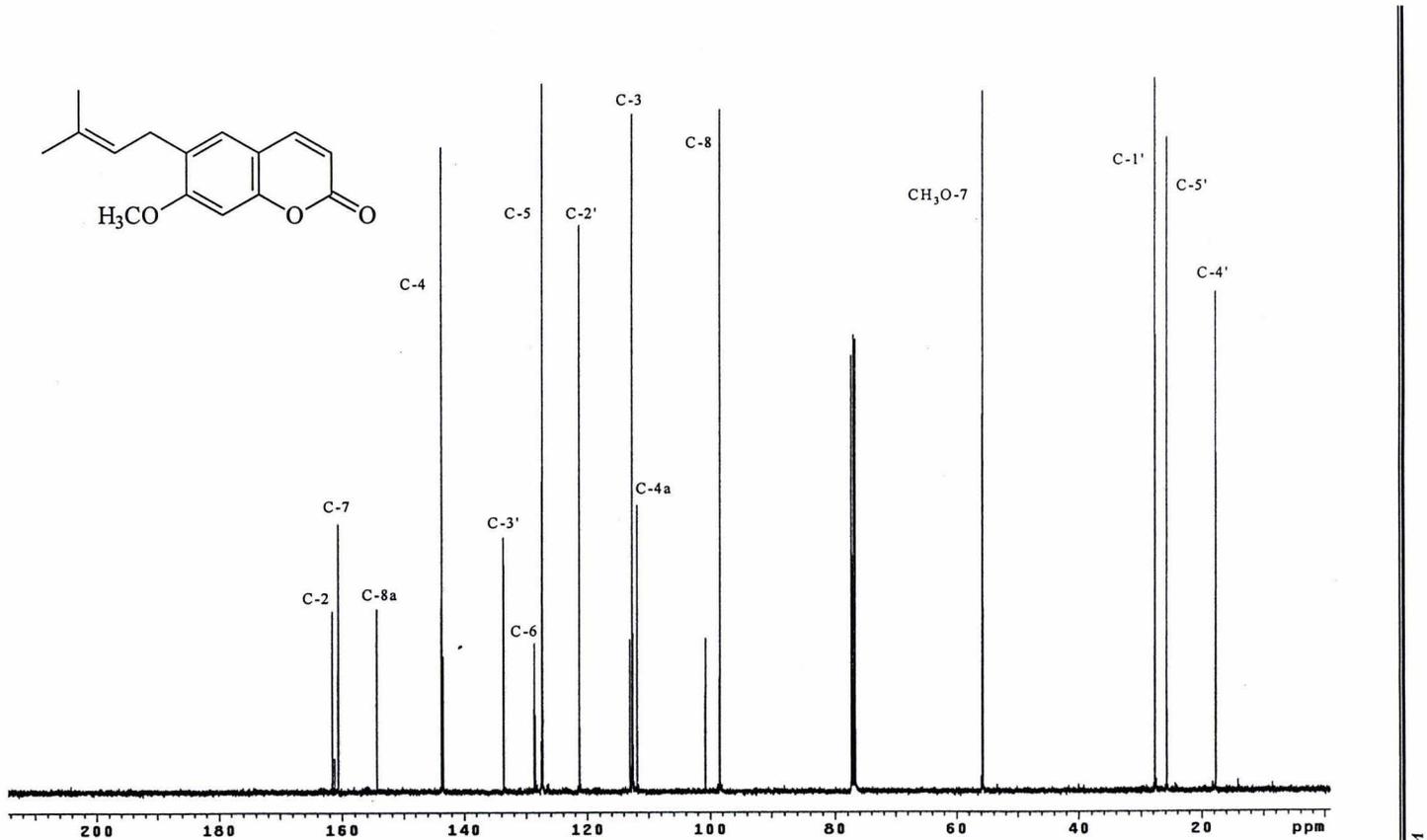
**Espectro 2.** Espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  de la herniarina (23) [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ].



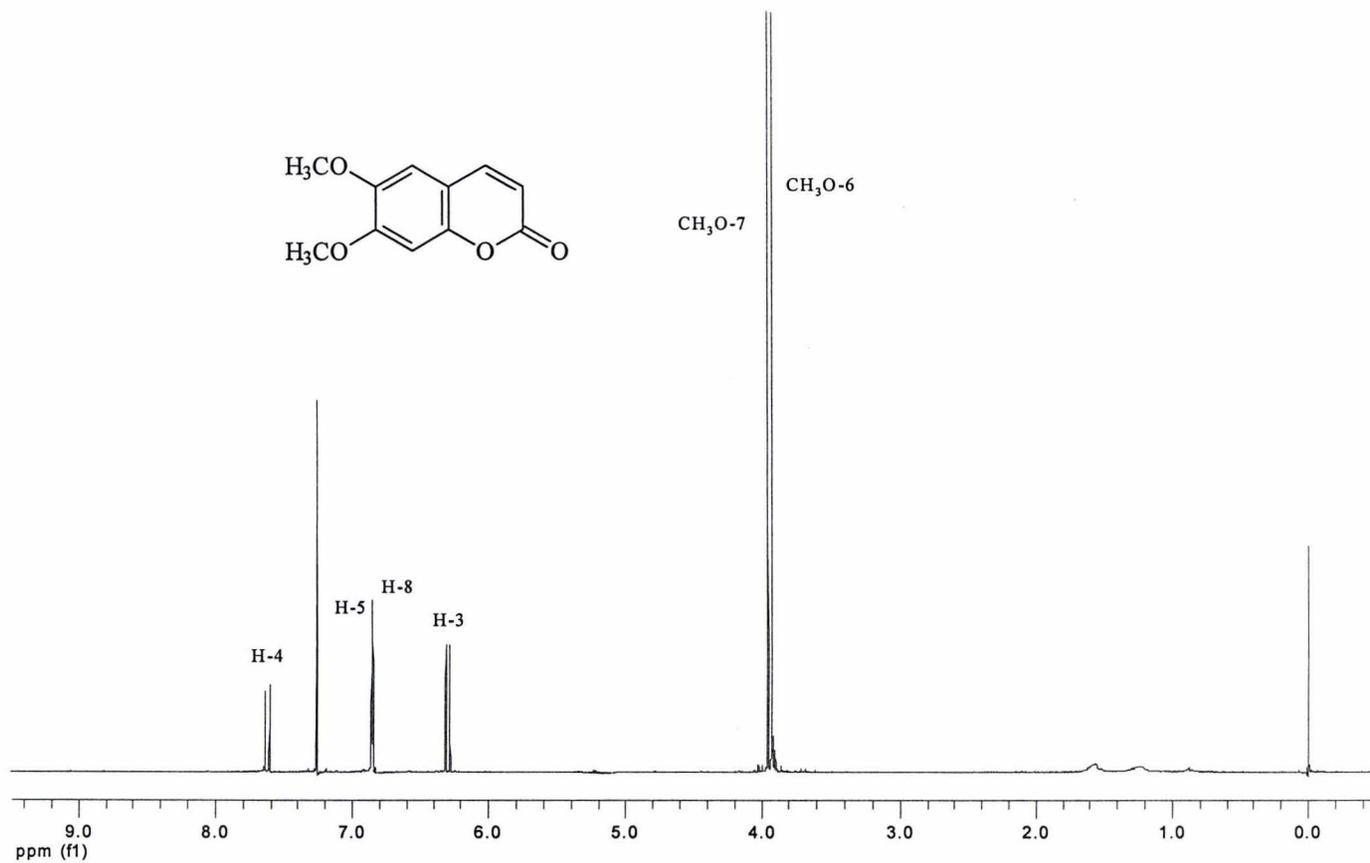
**Espectro 3.** Espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  de la umbeliferona (26) [300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ].



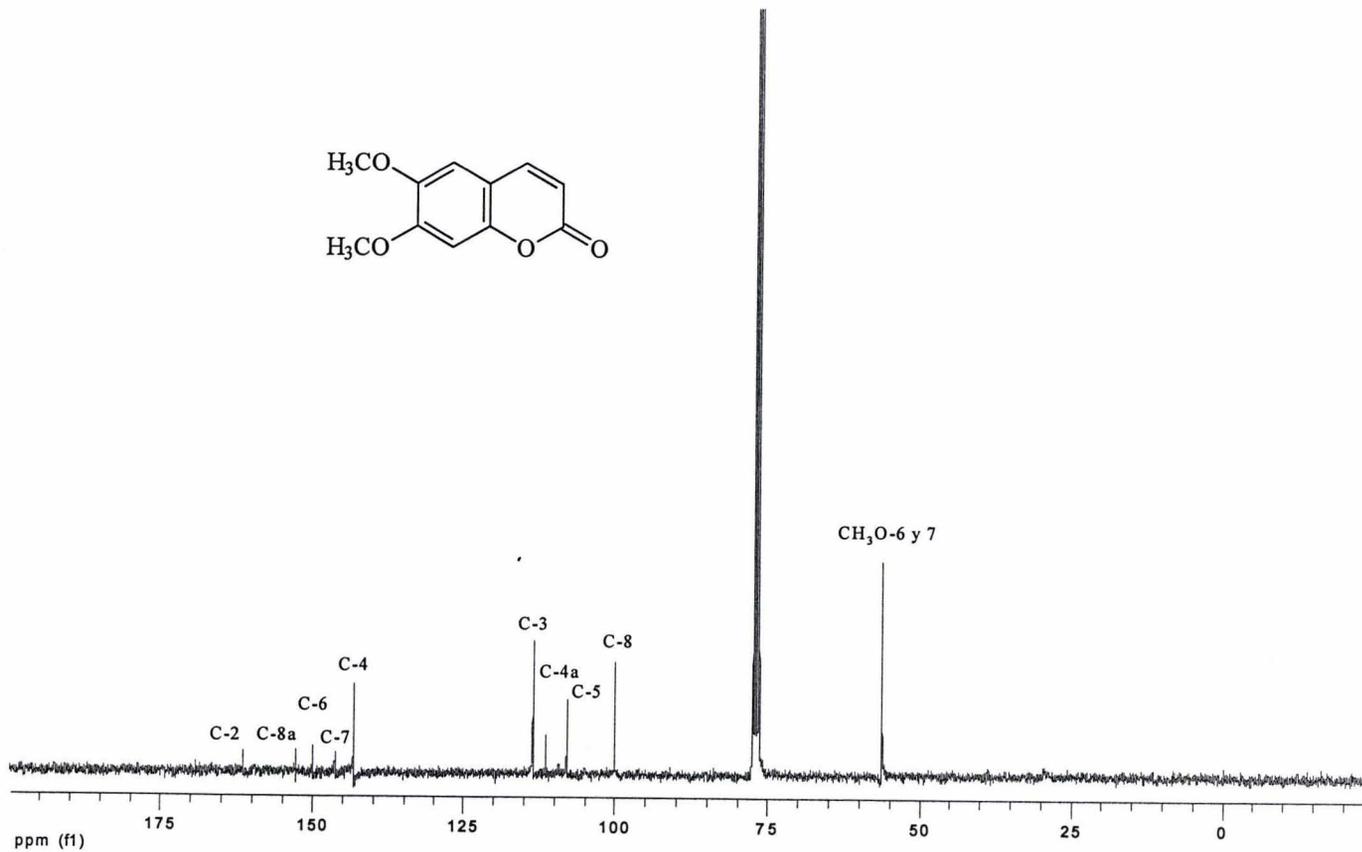
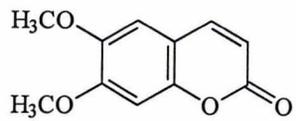
**Espectro 4.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H de la suberosina (20) [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>].



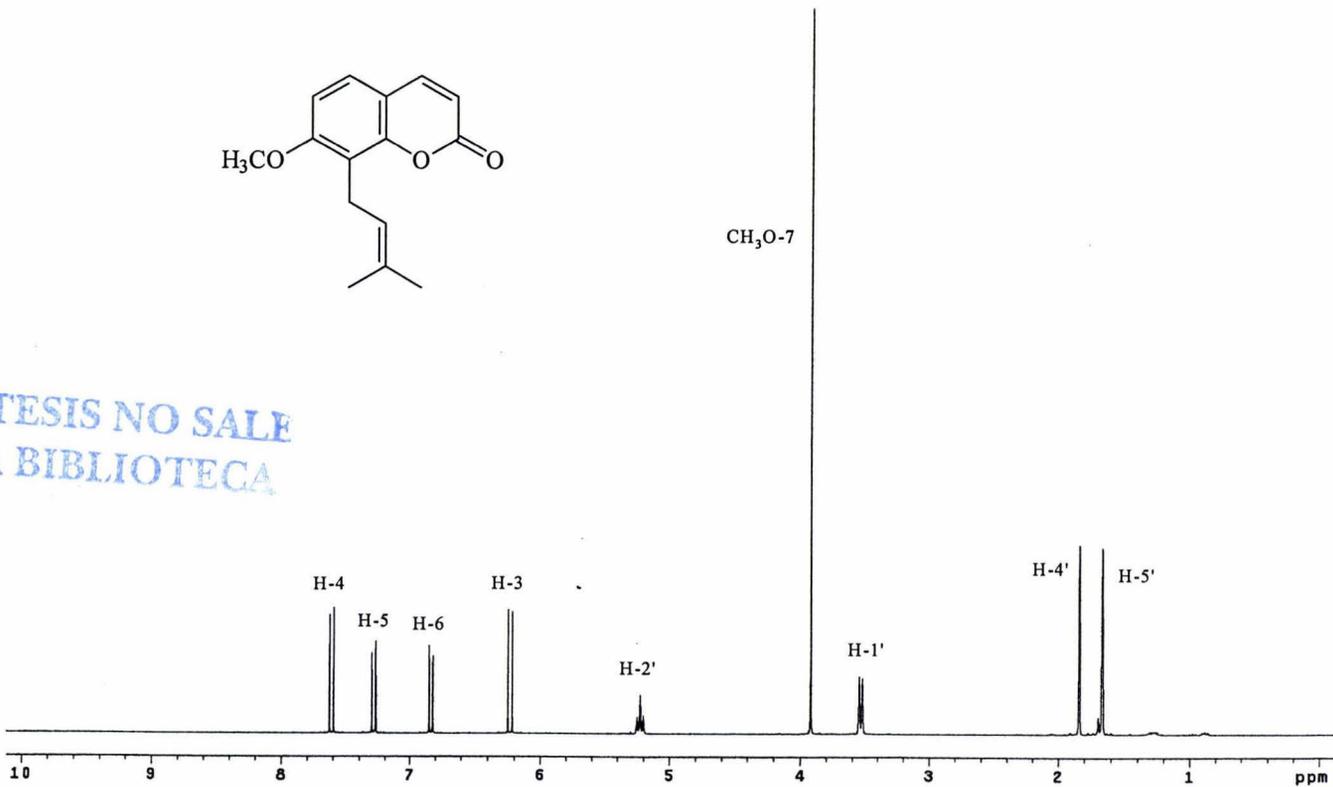
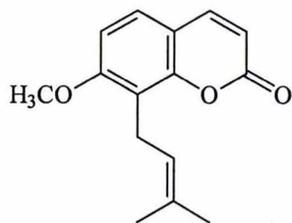
**Espectro 5.** Espectro de RMN $^{13}\text{C}$  de la suberosina (20) [400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ].



**Espectro 6.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H de la escoparona (**24**) [300 MHz, CDCl<sub>3</sub>].

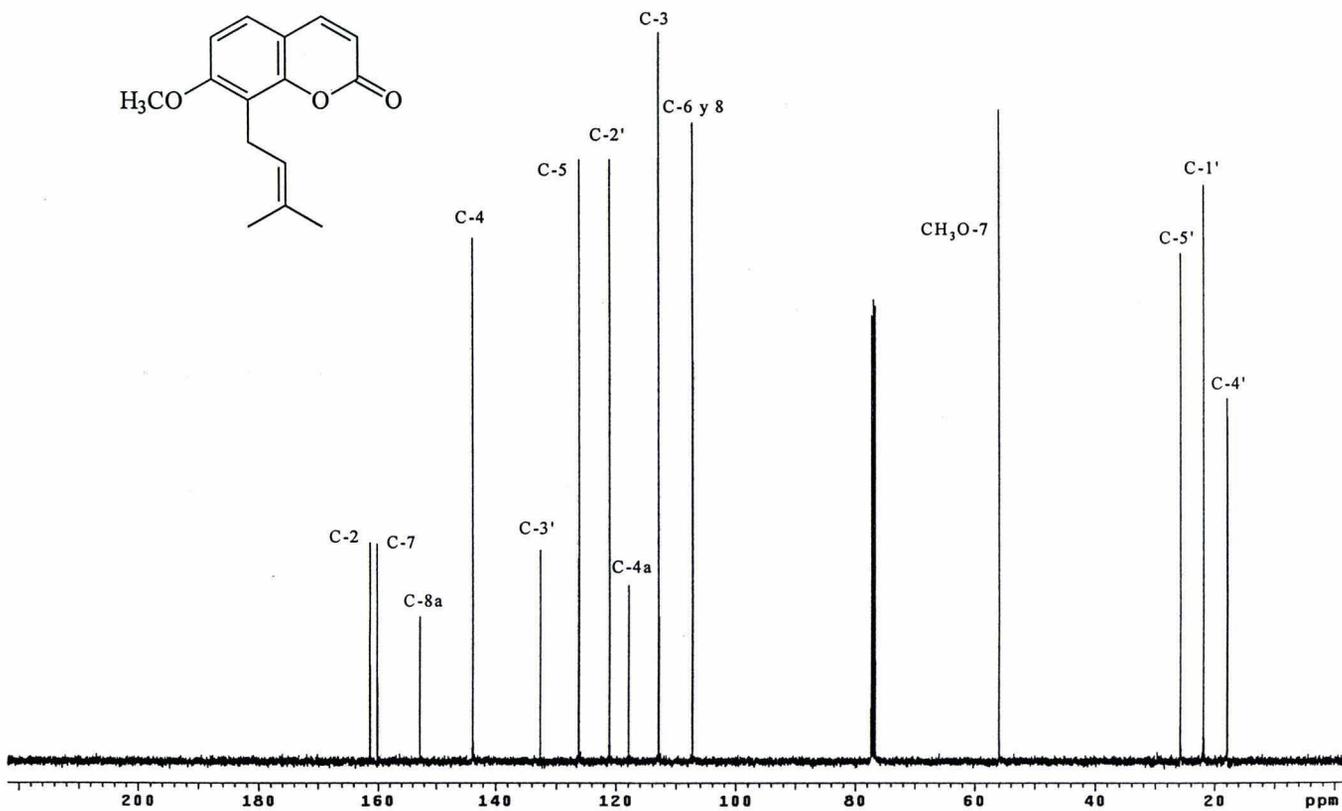
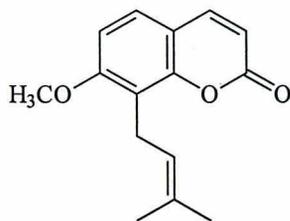


**Espectro 7.** Espectro de RMN<sup>13</sup>C de la escoparona (**24**) [300 MHz, CDCl<sub>3</sub>].

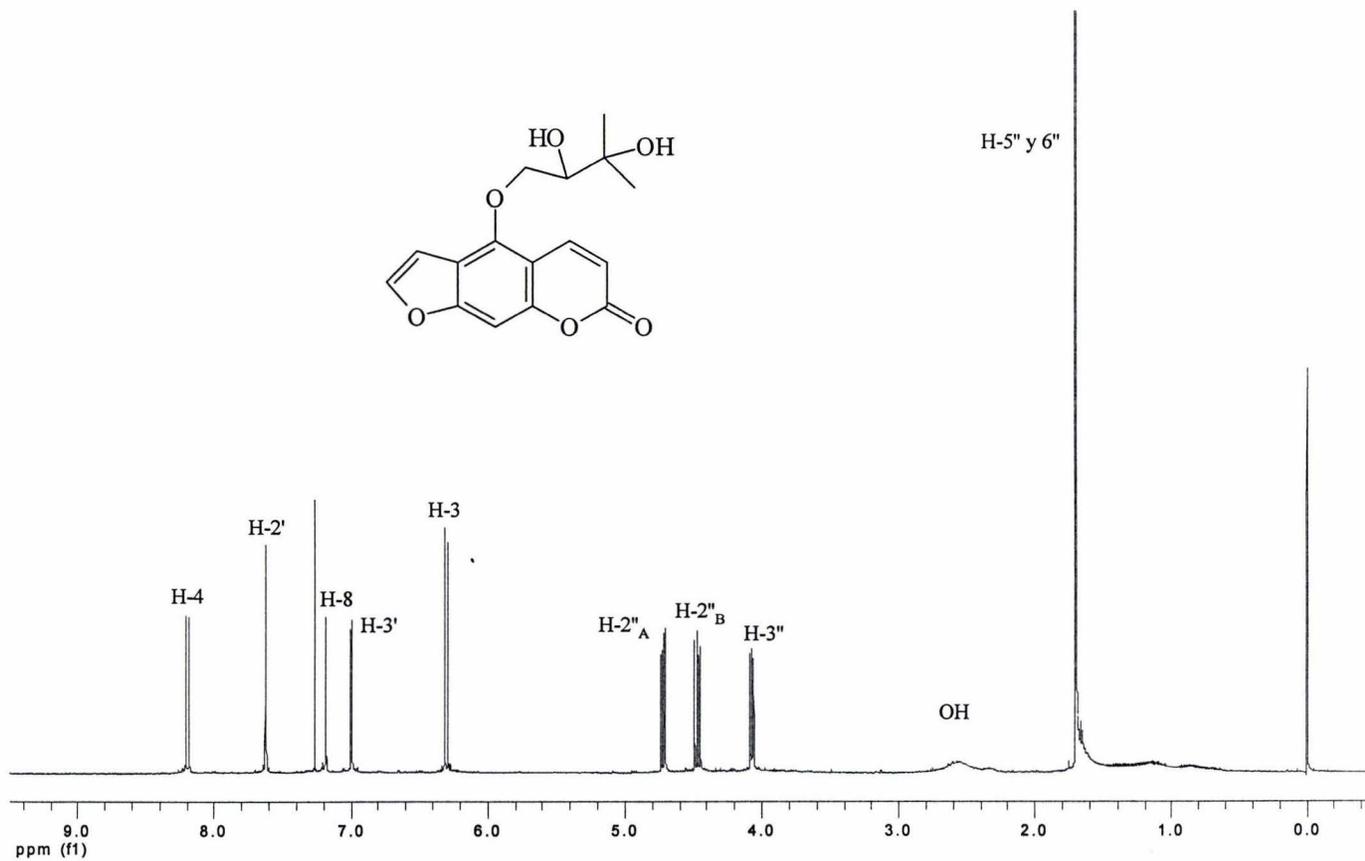


ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

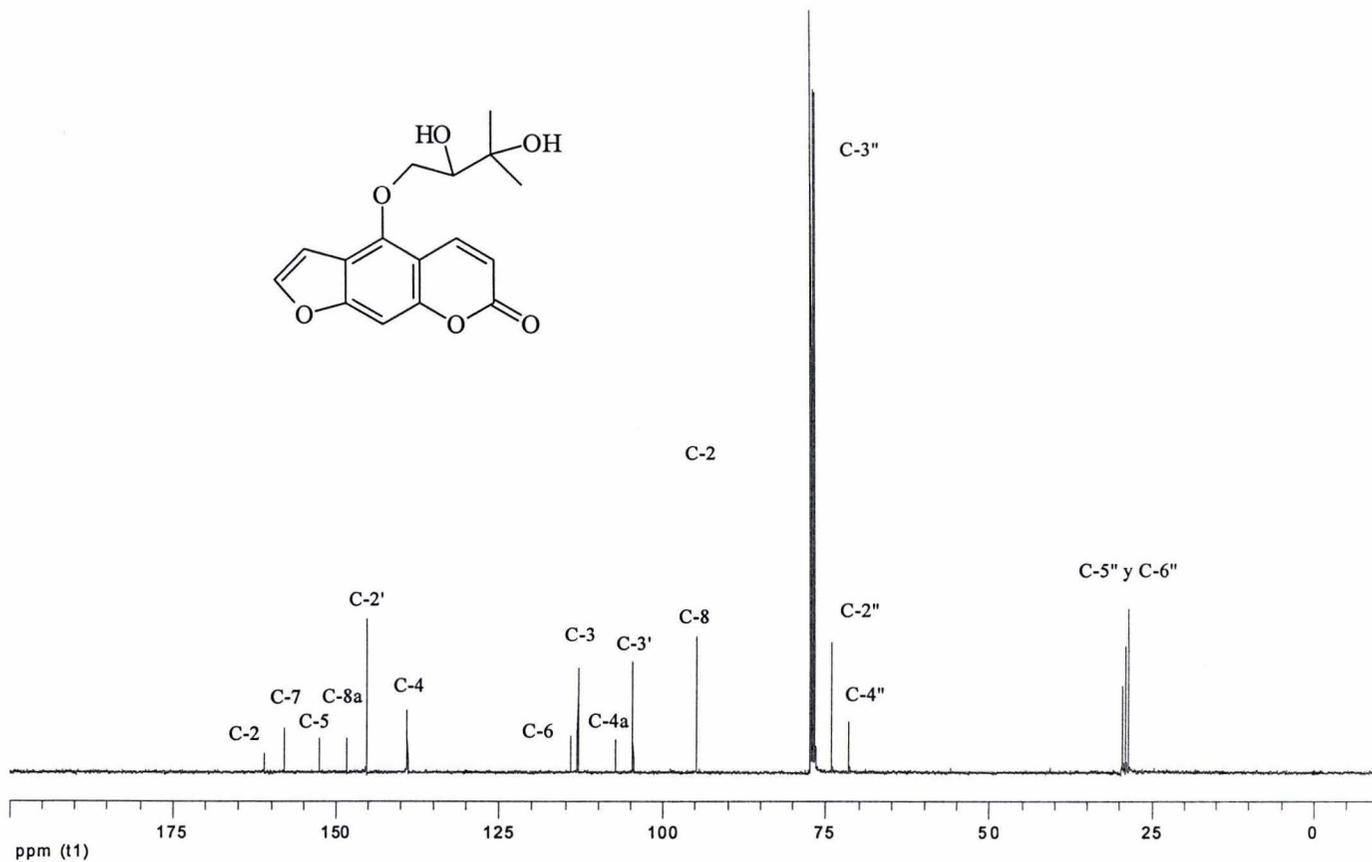
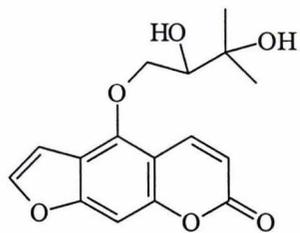
**Espectro 8.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H del ostol (21) [300 MHz, CDCl<sub>3</sub>].



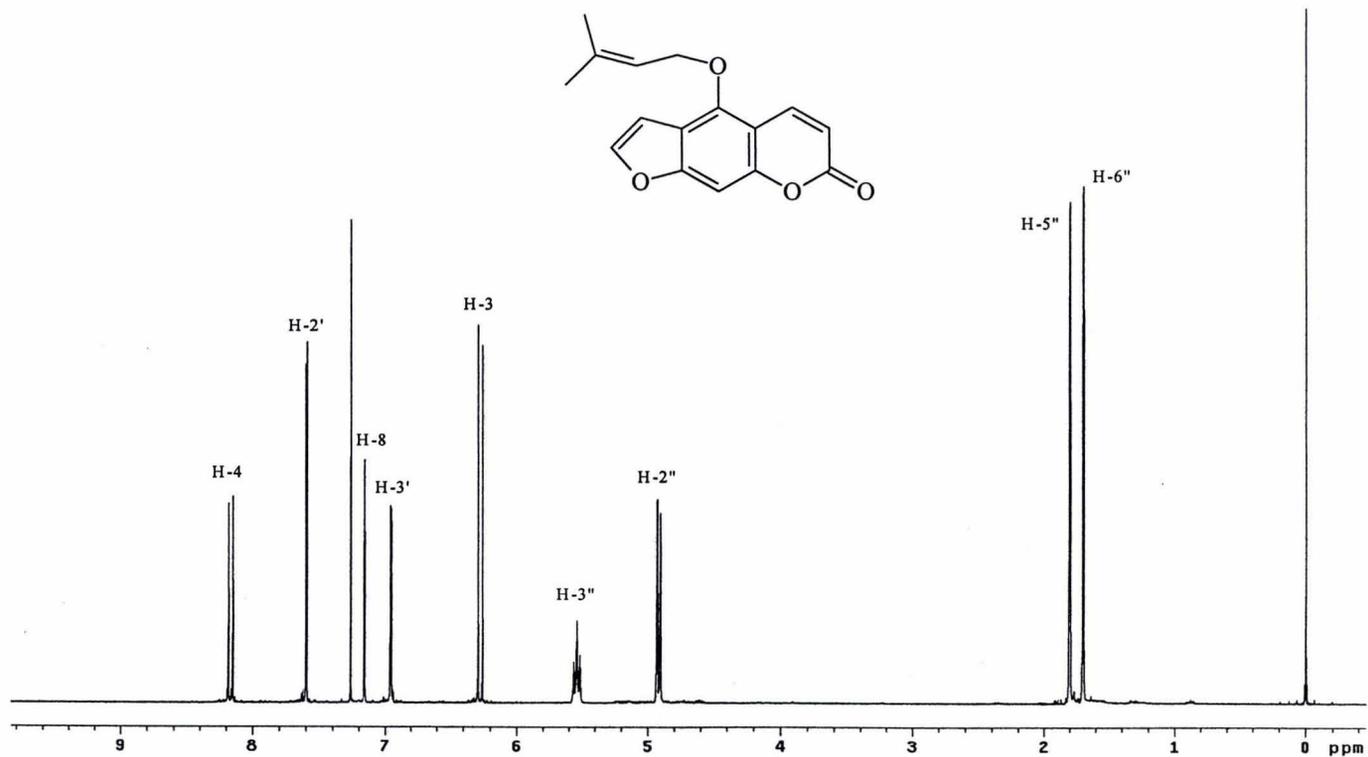
**Espectro 9.** Espectro de RMN<sup>13</sup>C del ostol (21) [300 MHz, CDCl<sub>3</sub>].



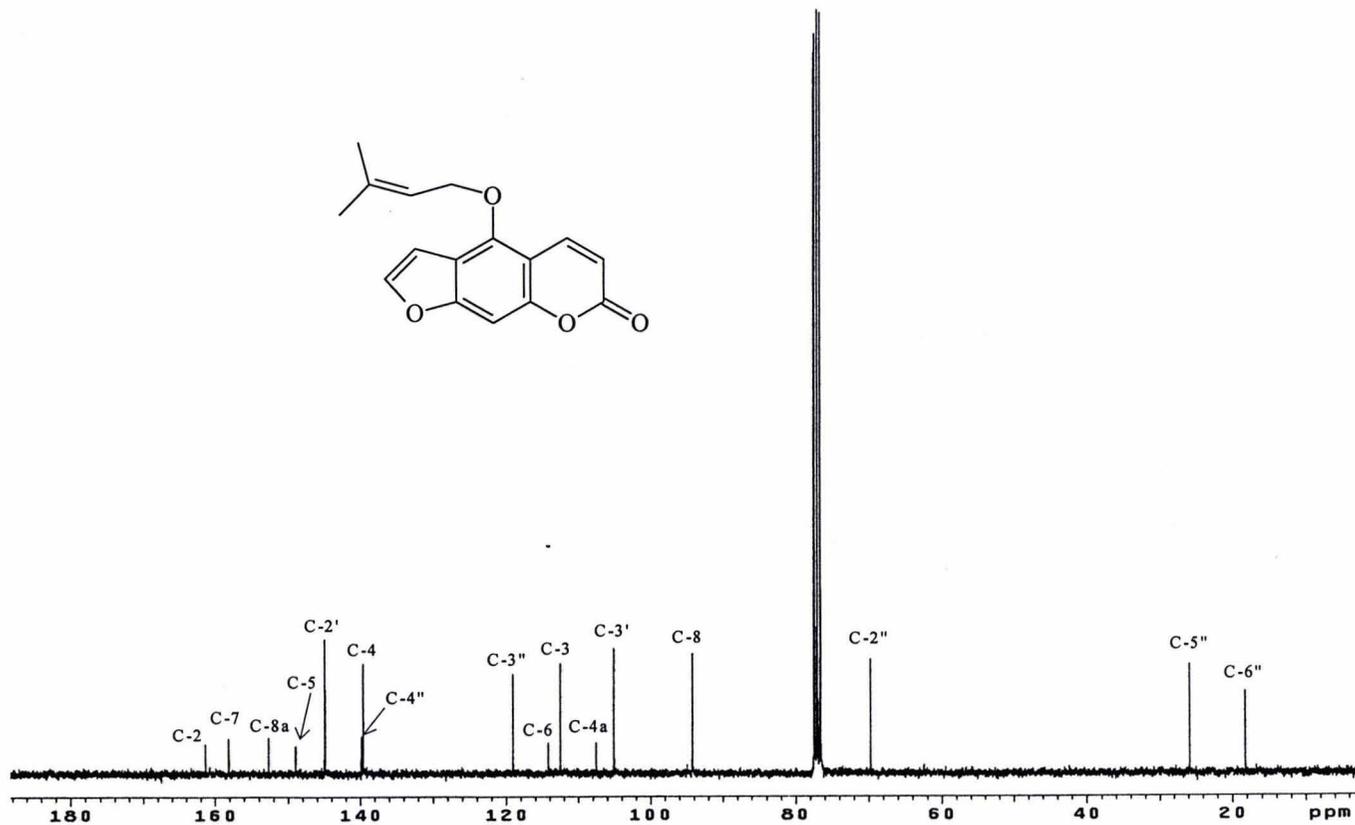
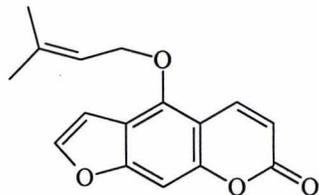
**Espectro 10.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H de la dihidroxipeucedanina (27) [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>].



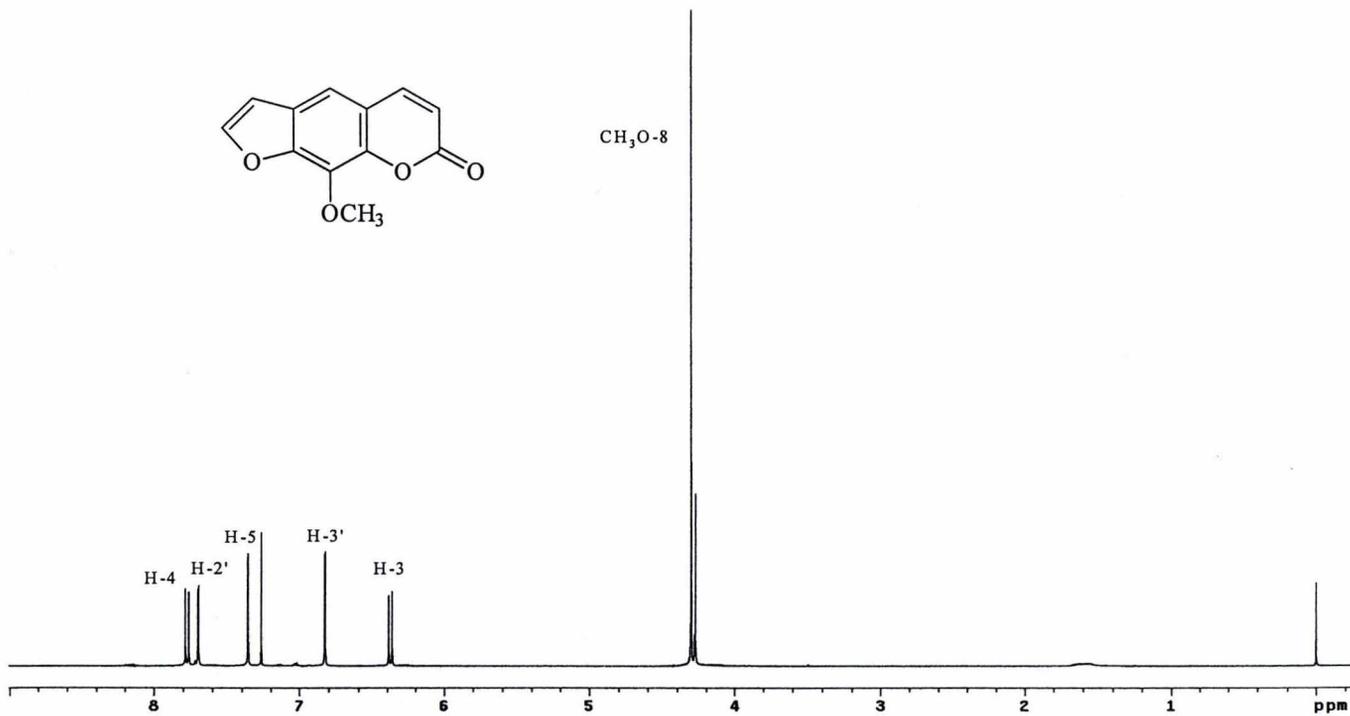
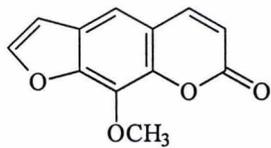
**Espectro 11.** Espectro de RMN<sup>13</sup>C de la dihidroxipeucedanina (27) [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>].

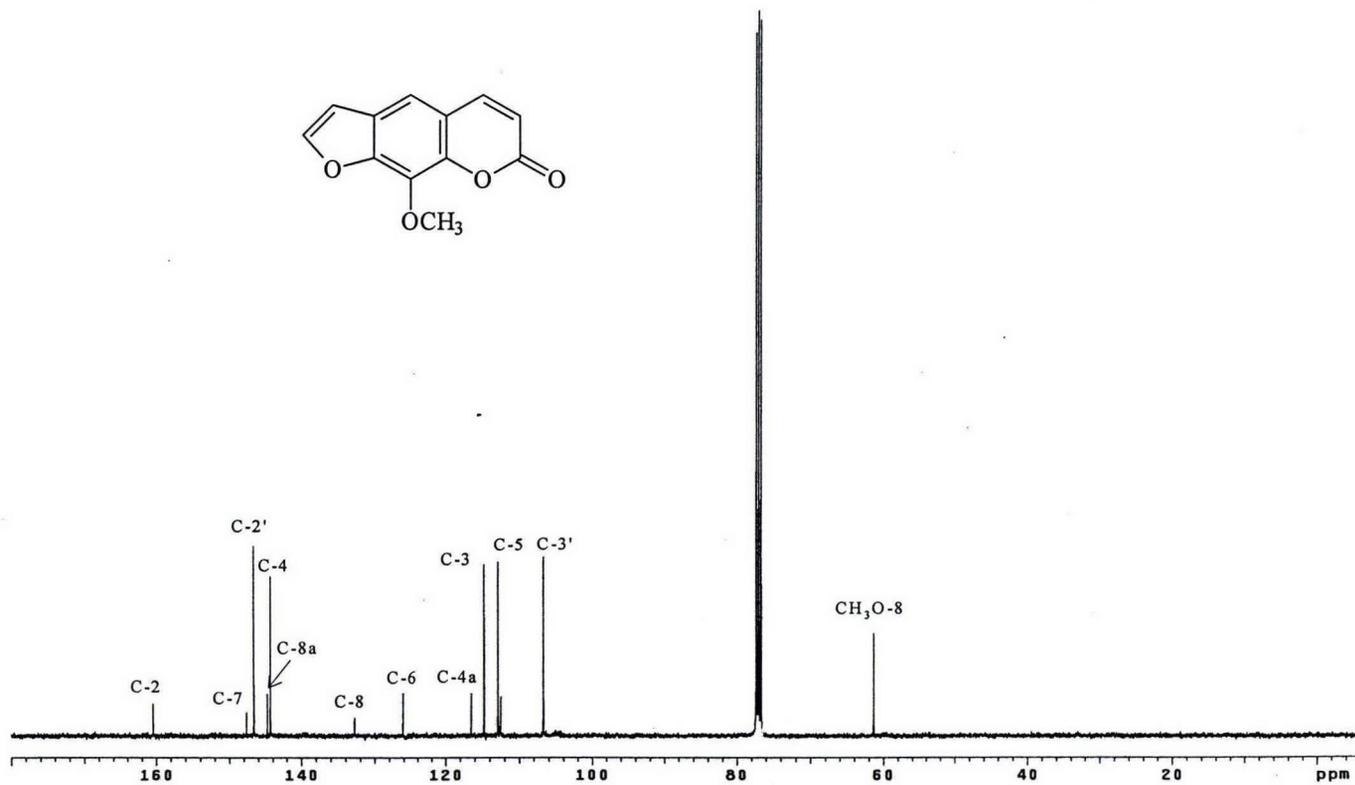
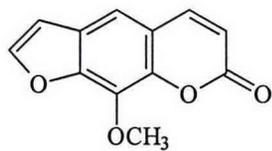


**Espectro 12.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H de la isoimperatorina (19) [300 MHz, CDCl<sub>3</sub>].



Espectro 13. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$  de la isoimperatorina (19) [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ].





**Espectro 15.** Espectro de RMN<sup>13</sup>C del 8-metoxisoraleno (22) [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>].