



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION ESTRUCTURAL  
DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA DE LA ESPECIE *Acacia farnesiana*  
Willd

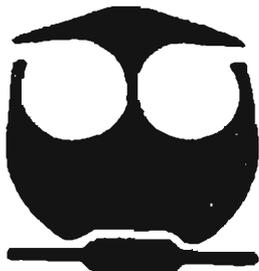
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

ANA LILIA ABREGO ALVAREZ



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

MEXICO, D. F.

2005

0350216



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:**

Presidente	<i>Prof. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS</i>
Vocal	<i>Prof. RACHEL MATA ESSAYAG</i>
Secretario	<i>Prof. ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA</i>
Primer Suplente	<i>Prof. JOSE FAUSTO RIVERO CRUZ</i>
Segundo Suplente	<i>Prof. MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO</i>

**Sitio de realización de la tesis:**

LABORATORIO 125, DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO "E",  
DIVISIÓN DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA,  
UNAM, CD. UNIVERSITARIA

**ASESOR:**

  
DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS

**SUSTENTANTE:**

  
ANA LILIA ABREGO ALVAREZ

## AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, por la oportunidad de permitirme tener un futuro mejor en el ámbito profesional, y ayudarme a crecer como ser humano.

A la Facultad de Química, por otorgarme conocimientos, experiencias, amistades y perspectivas que permiten forjar una base sólida para la superación académica y personal.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) mediante el proyecto IN211205

Al personal académico de la USAI, por el registro de los espectros para el análisis de espectroscopia y espectrometría

El trabajo experimental de esta tesis no se hubiera desarrollado sin el apoyo otorgado de las siguientes personas a quienes expreso mi gratitud:

A la Bióloga Margarita Áviles del Herbario del Instituto Nacional de Antropología e Historia en Morelos, por la colecta e identificación del material vegetal.

Al M. en C. Víctor Navarro del centro de Investigación Biomédica del Sur, IMSS por la realización de las pruebas antimicrobianas.

A los miembros del jurado designado por la revisión del manuscrito de tesis, por su análisis, comentarios y observaciones.

Por último deseo agradecer de manera muy especial a la Dra. MARÍA ISABEL AGULAR LAURENTS, por su guía a través de su experiencia a lo largo de la tesis, su enseñanza, la paciencia y tiempo dedicado tan amablemente, pero sobre todo,

por su cariño y amistad, me alegra haber conocido a tan encantadora persona que me apoyó en situaciones difíciles de mi vida, solo me queda decir, gracias...

## DEDICATORIAS

A Dios; por la oportunidad de poder llegar y cumplir un sueño

A mis padres; Aurelio Abrego J. y Ma. Eugenia Alvarez E., con todo mi amor y agradecimiento por el apoyo incondicional, les dedico la presente Tesis.

A mi hermano Julio César Abrego A., por su comprensión, cariño y apoyo a lo largo de mi vida.

A mi amado esposo, Ovidio Urbina I., por su apoyo incesante, su fe en mis sueños, y su amor incondicional.

A mi hijo; Ovidio D. Urbina A., por ser la luz de mi vida, mi motivación, mi ilusión, mi alegría, por hacerme sentir la persona más feliz y completa en el mundo cuando me dice mamá.

A mi amiga; Beatriz Aceves V. por todos los momentos felices en la universidad, por su apoyo, sus consejos, por su sincera amistad.

A mis profesores, a mis amigos, a mi familia en general, que de alguna manera han contribuido a la realización de mis sueños y metas, a todos ellos les dedico mi esfuerzo y alegría en la realización de este trabajo.

## INDICE

	Página.
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
LISTA DE CUADROS.....	V
LISTA DE ESPECTROS.....	VI
LISTA DE ESQUEMAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VII

## CONTENIDO

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 OBJETIVOS.....	2
1.1.1 Principal.....	2
1.1.2 Particular.....	3

## 2. ANTECEDENTES

2.1 Perfil fitoquímico del género <i>Acacia</i> .....	5
2.1.1 Generalidades de <i>Acacia farnesiana</i> .....	9
2.1.2 Usos.....	10
2.1.3 Botánica.....	10
2.1.4 Distribución.....	11
2.1.5 Nombre científico.....	11
2.1.6 Nombres comunes.....	12

## 3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Material y equipo utilizado.....	14
3.1.2 Reacción general de acetilación.....	15
3.2 Material vegetal.....	15
3.3 Extracción y fraccionamiento preliminar.....	15
3.4 Determinación de la actividad tóxica de los extractos en el crustáceo <i>Artemia salina</i> .....	17
3.4.1 Preparación de los organismos.....	17
3.4.2 Preparación de las muestras.....	17

3.4.3	Bioensayo.....	17	
3.5	Determinación de la actividad antimicrobiana (CMI) de los extractos hexánico, CHCl <sub>3</sub> y CHCl <sub>3</sub> -MeOH.....	18	
3.6	Análisis cromatográfico del extracto hexánico.....	19	
3.7	Análisis espectroscópico de las fracciones hexánicas F6 y F7.....	20	
3.8	Partición del extracto CHCl <sub>3</sub> -MeOH con metanol-agua (1:1).....	20	
3.9	Análisis cromatográfico del extracto clorofórmico.....	20	
3.10	Separación del galato de metilo (22) de la fracción F10.....	21	
3.11	Análisis cromatográfico de la interfase clorofórmica acetilada.....	22	
3.11.1	Aislamiento del éster métilico del ácido 3,4,5-tri-O-acetilgálico.....	22	
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS			
4.1	Determinación de la actividad tóxica de los extractos hexánico, CHCl <sub>3</sub> y CHCl <sub>3</sub> -MeOH en el crustáceo <i>Artemia salina</i> .....	24	
4.2	Determinación de la actividad antimicrobiana (CMI) de los extractos.....	24	
4.3	Resultados del fraccionamiento biodirigido del extracto hexánico.....	26	
4.3.1	Análisis espectroscópico de las fracciones primarias hexánicas bioactivas.....	27	
4.4	Partición del extracto CHCl <sub>3</sub> -MeOH con metanol-agua (1:1).....	29	
4.5	Resultados del fraccionamiento biodirigido del extracto clorofórmico.....	29	
4.5.1	Aislamiento e identificación del galato de metilo (22).....	30	
4.5.2	Análisis espectroscópico del galato de metilo (22).....	31	
4.5.3	Actividad antimicrobiana del galato de metilo (22).....	33	
4.5.4	Aislamiento de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (Farnisina) (34).....	33	
4.5.5	Análisis espectroscópico de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34).....	35	
4.5.6	Actividad antimicrobiana del compuesto 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34).....	40	
4.5.7	Compuestos aislados de la fracción primaria clorofórmica F10.....	40	
4.6	Obtención del derivado triacetilado del galato de metilo.....	41	
4.6.1	Análisis espectrométrico del tri-O-acetilgalato de metilo.....	42	
5. CONCLUSIONES.....			45
6. BIBLIOGRAFÍA.....			48
7. ANEXOS (Espectros).....			52

## Lista de Abreviaturas

>	Mayor que
<	Menor que
$\delta$	Desplazamiento químico
<i>A. farnesiana</i>	<i>Acacia farnesiana</i>
AcOEt	Acetato de etilo
An	<i>Aspergillus niger</i>
Biól.	Bióloga
Ca	<i>Candida albicans</i>
ccd	Cromatografía en capa delgada
CDCl <sub>3</sub>	Cloroforno deuterado
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado
CG-EM	Cromatografía de gases espectrometría de masas
CHCl <sub>3</sub>	Cloroforno
CL <sub>50</sub>	Concentración letal al 50%
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
COSY	Espectroscopia de correlación
d	Doblete
dd	Doblete de doble
DEPT	Prueba de desacoplado de protones
$\delta$	Desplazamiento químico
Ec	<i>Escherichia coli</i>
eV	Electrón volt
FM	Fórmula Molecular
HMBC	Correlación heteronuclear de múltiples ligaduras
HSQC	Espectroscopia de correlación carbono-hidrógeno
Hz	Hertz
IR	Espectroscopia infrarroja
J	Constante de acoplamiento
Kn	<i>Klebsiella pneumonia</i>
Lit.	Literatura
$\lambda_{máx}$	Longitud máxima
MeOH	Metanol
M <sup>+</sup>	Ion molecular
MHz	Mega Hertz
m/z	relación masa-carga
N	Normalidad
nm	Nanómetros
NOESY	Espectroscopia incrementada del efecto nuclear overhauser
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
Rf	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
s	Singulete
Sa	Singulete ancho
Sau	<i>Staphylococcus aureus</i>

Sb	<i>Streptococcus beta-hemolítico</i>
Sf	<i>Streptococcus faecalis</i>
St	<i>Salmonella tify</i>
Tm	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
TMS	Tetrametilsilano
Tr	<i>Trichophyton rubrum</i>
t.r.	Tiempo de retención
UV	Luz ultravioleta
$v_{máx}$	Frecuencia máxima
v/v	relación volumen-volumen
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{L}$	Microlitro

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Resultado de la determinación de la actividad tóxica a <i>Artemia salina</i> de los extractos probados.....	18
Cuadro 2.	Fraccionamiento mediante columna cromatográfica abierta del extracto hexánico de <i>Acacia farnesiana</i> .....	19
Cuadro 3.	Fraccionamiento mediante columna cromatográfica abierta del extracto clorofórmico.....	21
Cuadro 4.	Fraccionamiento mediante columna cromatográfica abierta de la interfase acetilada de los frutos de <i>Acacia farnesiana</i> .....	22
Cuadro 5.	Resultado de la determinación de la CMI en los extractos probados.....	25
Cuadro 6.	Resultado del ensayo de la actividad antimicrobiana de las fracciones más activas provenientes del fraccionamiento primario del extracto hexánico.....	26
Cuadro 7.	Análisis espectroscópico de las fracciones hexánicas F6 y F7.....	27
Cuadro 8.	Resultado de la actividad antimicrobiana de las fracciones primarias más activas del extracto Clorofórmico.....	29
Cuadro 9.	Constantes espectroscópicas y espectométricas del galato de metilo (22) .....	31
Cuadro 10.	Resultado de la actividad antimicrobiana de los cristales aislados de la fracción F10 del extracto $\text{CHCl}_3$ .....	33
Cuadro 11.	Constantes espectroscópicas y espectométricas de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona.....	35
Cuadro 12.	Actividad antimicrobiana del compuesto 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona, Farnisina (34).....	40

Cuadro 13.	Constantes espectroscópicas y espectrométricas del derivado acetilado del galato de metilo.....	42
------------	---	----

## LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1.	Espectro de IR de la mezcla constituida por los ésteres de los ácidos grasos hexadecanoico (palmitico) (41), octadecenoico (42) y octadecanoico (esteárico) (43).....	52
Espectro 2.	Espectro de masas por impacto electrónico del ácido hexadecanoico (palmitico) (41).....	53
Espectro 3.	Espectro de masas por impacto electrónico del ácido octadecenoico (42).	54
Espectro 4.	Espectro de masas por impacto electrónico del ácido octadecanoico (esteárico) (43).....	54
Espectro 5.	Espectro de IR del galato de metilo (22).....	55
Espectro 6.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del galato de metilo (22).....	56
Espectro 7.	Espectro de RMN <sup>13</sup> C del galato de metilo (22).....	57
Espectro 8.	Espectro de masas por impacto electrónico del galato de metilo (22).....	58
Espectro 9.	Espectro de UV de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34).....	59
Espectro 10.	Espectro de IR de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34).....	60
Espectro 11.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34).....	61
Espectro 12.	Espectro en modalidad COSY de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34).....	63
Espectro 13.	Espectro en modalidad HSQC de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34).....	64
Espectro 14.	Espectro de RMN <sup>13</sup> C de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34).....	66
Espectro 15.	Espectro de masas por impacto electrónico de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34).....	67
Espectro 16.	Espectro en modalidad HMBC de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34).....	68
Espectro 17.	Espectro en modalidad NOESY de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34).....	69
Espectro 18.	Espectro de IR de la interfase antes de ser acetilada.....	70
Espectro 19.	Espectro de IR del tri-O-acetilgalato de metilo (44).....	71
Espectro 20.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del tri-O-acetilgalato de metilo (44).....	72
Espectro 21.	Espectro de RMN <sup>13</sup> C del tri-O-acetilgalato de metilo (44).....	73
Espectro 22.	Espectro en modalidad DEPT del tri-O-acetilgalato de metilo (44).....	75

Espectro 23. Espectro de masas por impacto electrónico del tri- <i>O</i> -acetilgalato de metilo (44).....	76
--	----

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Compuestos químicos aislados del genero <i>Acacia</i> .....	6
Esquema 2. Procesamiento biodirigido de los frutos de <i>Acacia farnesiana</i> .....	16
Esquema 3. Compuestos identificados en las fracciones hexánicas F6 y F7: ácidos hexadecanoico (palmitico) (41), octadecenoico (42) y octadecanoico (esteárico) (43).....	28
Esquema 4. Fragmentación observada por CG-EM del compuesto 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona.....	38

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotografía de la planta <i>Acacia farnesiana</i> Willd.....	11
Figura a.	Estructura del galato de metilo (22).....	30
Figura b.	Estructura de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (Farnisina) (34).....	34
Figura c.	Estructura del éster métilico del ácido 3,4,5-tri- <i>O</i> -acetilgálico (44).....	41
Figura 2.	Cromatograma de gases de la mezcla constituida por los ésteres de los ácidos grasos hexadecanoico (palmitico) (41), octadecenoico (42) y octadecanoico (esteárico) (43).....	53
Figura 3.	Cromatograma de gases del galato de metilo (22).....	58

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

## INTRODUCCIÓN

El estudio químico y biológico de recursos vegetales permite el descubrimiento de principios activos con acción terapéutica que validan el uso definido de una planta en la medicina tradicional. Estos principios activos también pueden constituir nuevas fuentes de materias primas que contribuyan al desarrollo de la medicina actual, ya que muchas moléculas de compuestos naturales sirven de prototipo para el desarrollo de fármacos semisintéticos con una mayor eficacia y/o potencia terapéutica. Por otro lado se pueden aislar compuestos bioactivos ya conocidos pero con mejor rendimiento, lo que facilitaría su empleo en la industria farmacéutica.

Cabe mencionar que el porcentaje de estudios fitoquímicos integrados a estudios biológicos realizados en plantas mexicanas es bajo en comparación a la diversidad de los recursos vegetales que ofrece el país, por lo que es importante fomentar el estudio de nuevas especies que permitan un mejor aprovechamiento de los mismos.

Por lo descrito anteriormente, se presenta en esta tesis el estudio de la planta *Acacia farnesiana* Willd, la cual es parte de un proyecto que promueve la investigación de recursos naturales con interés medicinal.

### 1.1 OBJETIVOS

#### 1.1.1 Objetivo principal:

Generar conocimiento acerca de los métodos para aislar, purificar e identificar estructuralmente los metabolitos secundarios contenidos en los frutos de *Acacia farnesiana* Willd (Huizache) que presenten actividad biológica antimicrobiana.

### 1.1.2 Objetivos particulares.

Para el cumplimiento del objetivo principal, se desglosa éste en los siguientes objetivos particulares:

- 1) Búsqueda bibliográfica de antecedentes previos de estudios químicos y biológicos realizados con *Acacia farnesiana*.
- 2) Elaboración de los extractos hexánico, CHCl<sub>3</sub>-MeOH y a partir de éste, el clorofórmico por partición líquido-líquido, de los frutos de *Acacia farnesiana*.
- 3) Fraccionamiento biodirigido del o de los extractos que presenten actividad biológica en los ensayos de toxicidad a *Artemia salina* y pruebas antimicrobianas.
- 4) Separación de los compuestos mediante métodos cromatográficos de columna abierta de gel de sílice, de placa fina o por cristalización de las fracciones bioactivas obtenidas en el punto 3.
- 5) Purificación de los compuestos bioactivos del punto 4 por los métodos cromatográficos ahí mencionados, según se requiera.
- 6) Elucidación estructural por métodos espectroscópicos y espectrométricos del ó de los constituyentes que se aislen de los extractos.
- 7) Integración de los resultados químicos y biológicos que se obtengan para la conclusión sobre el estudio biodirigido.

## 2. ANTECEDENTES

## ANTECEDENTES

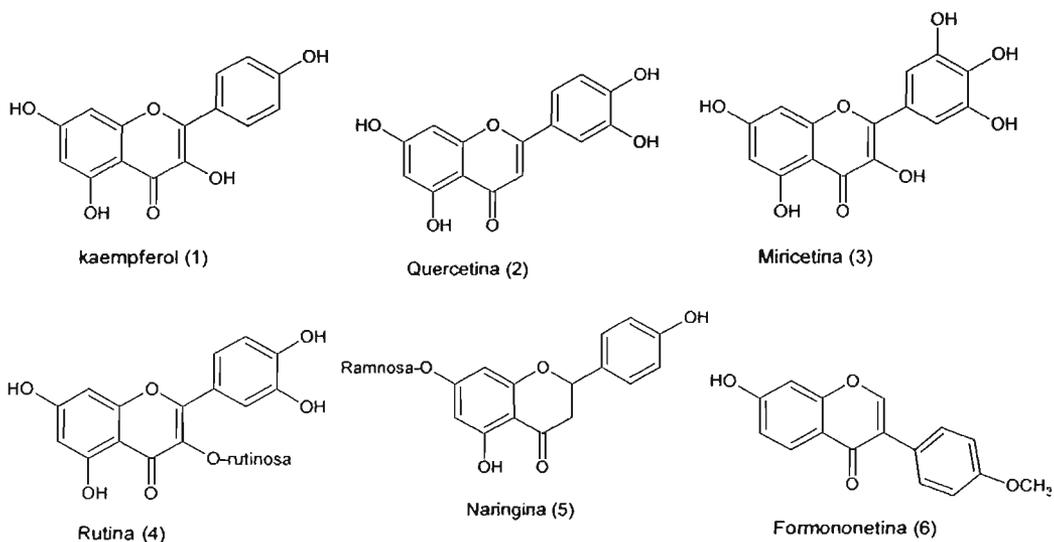
2.1 Perfil fitoquímico del género *Acacia*

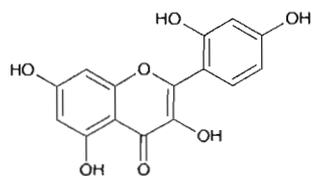
Los estudios químicos efectuados en flores de este grupo de plantas han llevado al aislamiento y caracterización de flavonoides como iso-ramnetina (8) (Ilyas *et al.*, 1970), pinitol (9) (Domínguez *et al.*, 1967) y compuestos fenólicos como ácido gálico (10) y sus derivados (galatos), así como los flavonoides kaempferol (1), aromadendrina (11) y naringenina (12) de *Acacia farnesiana* (El Sissi *et al.*, 1973). Giral *et al.* (1978) reportan entre otros géneros, el contenido proteico y lipídico de semillas del género *Acacia* y por otra parte, la ausencia de alcaloides en el mismo.

Secor y colaboradores (1976), han detectado e identificado glucósidos cianogénicos como prunasina (13) en *A. deanei* ssp. *paucijuga*, sambunigrina (14) en *A. cunninghamii* y acacipetalina (15) en *A. giraffae* en diferentes partes de plantas jóvenes y maduras de bioterio. Otros metabolitos encontrados son glucósidos de mandelonitrilo (16) en *A. parramattensis* y *A. pulchella* y algunos no identificados en *A. farnesiana*. Janzen (1980) menciona el contenido de ácido cianhídrico (17) en el follaje de *A. farnesiana*. Dentro de la composición química de las semillas del género *Acacia*, se hace referencia a ácidos grasos, con especial atención a ácidos epoxidicos C18:1 (18) en *A. aunculiformis*, *A. Catechu*, *A. Coriacea* y *A. Mellifera*. (Chowdhury, 1983). 7-galoil-glucósido de kaempferol (19) y 7-glucósido de kaempferol (20) han sido aislados del extracto etanólico de los brotes de *A. farnesiana* (El-Negoumy *et al.*, 1981). Referente a las especies *A. farnesiana* y *A. nilotica* se han aislado constituyentes fenólicos y taninos como: galato de etilo (21), galato de metilo (22), ácido gálico (10), ácido m-digálico (23), catecol (24) y ácido elágico (25) (Wassel *et al.*, 1990). El estudio de la composición del mucilago obtenido de estas dos especies reveló la presencia de los azúcares arabinosa (26), xilosa (27), galactosa (28) y manosa (29) entre otras (Wassel *et al.*, 1992). Un escrutinio fitoquímico de diferentes partes de dichas

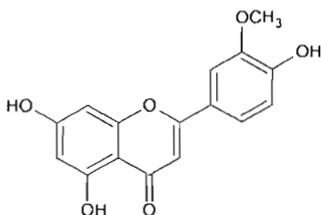
especies determinó la presencia de taninos, saponinas, cumarinas, carbohidratos, glicósidos, esteroides insaturados, triterpenos, alcaloides y/o bases nitrogenadas, flavonoides y compuestos cianogénicos (Wassel *et al.*, 1992). Taninos y polifenoles aislados de hojas, cortezas y brotes de diferentes especies de *Acacia* provenientes de la India han sido reportados por Devi y colaboradores (1991), enfatizando que el contenido más alto de taninos y compuestos fenólicos en total se encontró en hojas y brotes de *A. nilotica* y en corteza de *A. famesiana*. En las hojas de *A. famesiana* se han detectado los esteroides colesterol (30), estigmasterol (31) y beta-sitosterol (32), el alcaloide isoquinolínico tiramina (33) y el flavonoide kaempferol (1) (Argueta,1994). Sahu y colaboradores (1998) describen el aislamiento y elucidación estructural de farnisina (7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona) (34) como el mayor constituyente de las semillas de *A. famesiana*, diosmetina (35) y glucósido de sitosterol (36) también fueron detectados. Los flavonoides galoi-glucósidos de naringenina (37), quercetina (38), miricetina (39) y kaempferol (40) fueron identificados de los brotes de *A. famesiana* (Barakat, 1999). Los compuestos mencionados se enlistan en el esquema 1.

Esquema 1. Compuestos químicos aislados del género *Acacia*

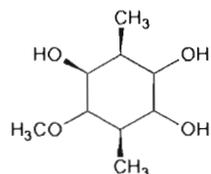




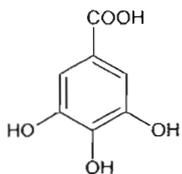
Morina (7)



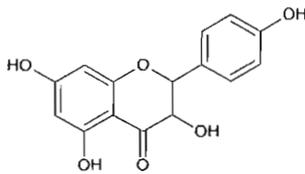
Isoramnetina (8)



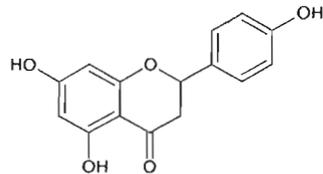
D-Pinitol (9)



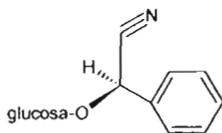
Ácido gálico (10)



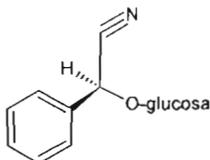
Aromadendrina (11)



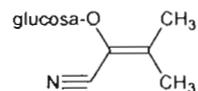
Naringenina (12)



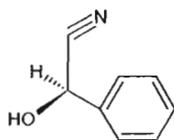
(R) Prunasina (13)



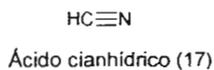
(S) Sambunignna (14)



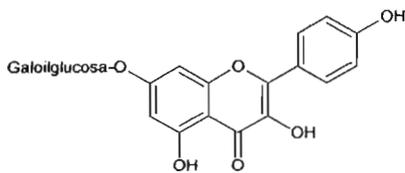
Acacipetalina (15)



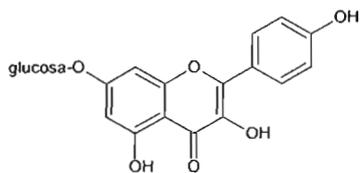
D-Mandelonitrilo (16)



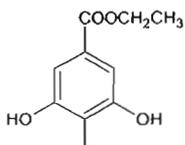
Ácido cianhídrico (17)



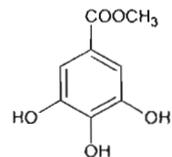
7-galoilglucósido de Kaempferol (19)



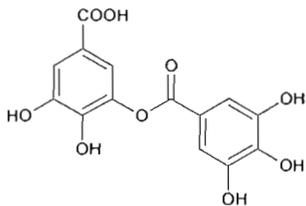
7-glucósido de Kaempferol (20)



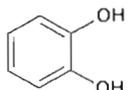
Galato de etilo (21)



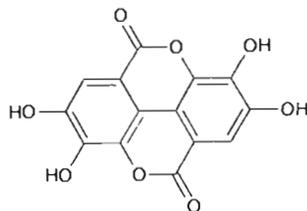
Galato de metilo (22)



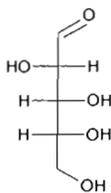
Ácido m-digálico (23)



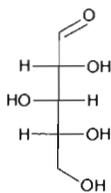
Catecol (24)



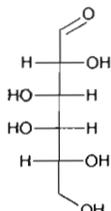
Ácido elágico (25)



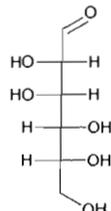
D-arabinosa (26)



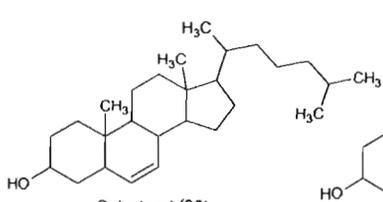
D-xilosa (27)



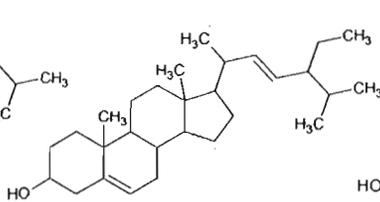
D-galactosa (28)



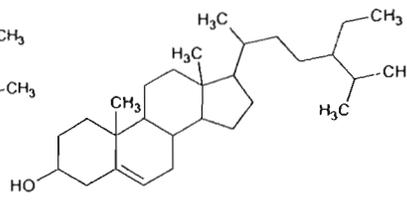
D-manosa (29)



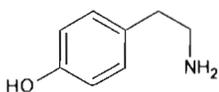
Colesterol (30)



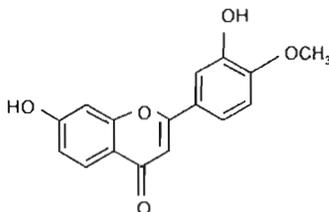
Estigmasterol (31)



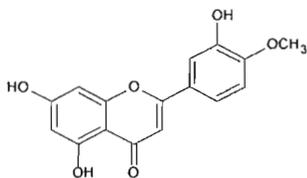
$\beta$ -Sitosterol (32)



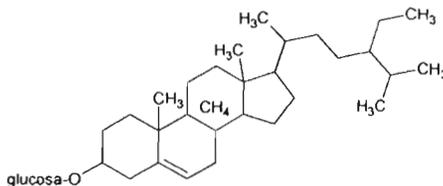
Tiramina (33)



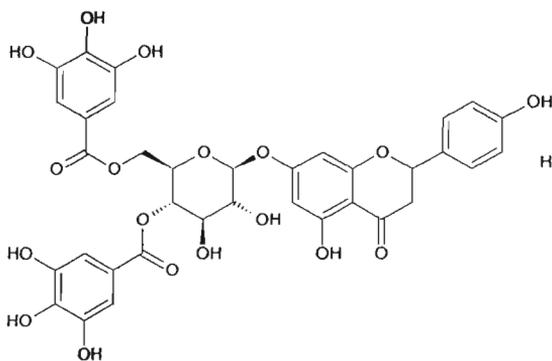
Farnisina (34)



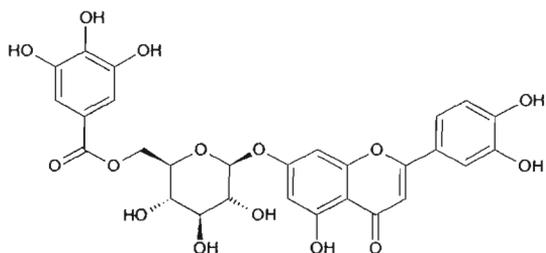
Diosmetina (35)



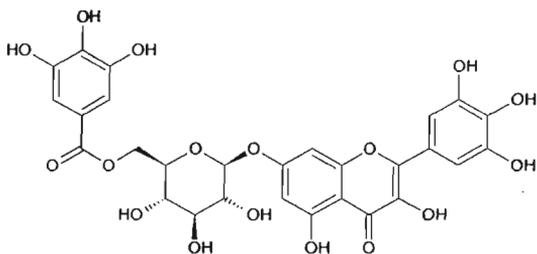
Glucósido de sitosterol (36)



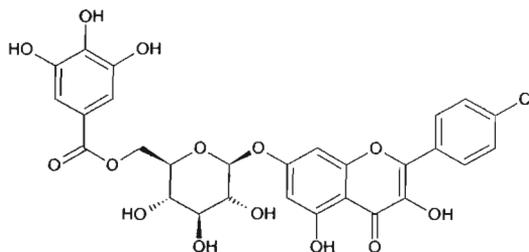
7-O-B-(4'',6''-digalloylglucopiranosido) de naringenina (37)



7-O-B-(galoilglucopiranosido) de quercetina (38)



7-O-B-(6''-galoilglucopiranosido) de miricetina (39)



7-O-B-(6''-galoilglucopiranosido) de kaempferol (40)

### 2.1.1 Generalidades de *Acacia farnesiana*

En el Códice florentino, que data del siglo XVI (Argueta, 1994), se relata el uso de este vegetal para las "enfermedades de la cabeza". En el siglo XX, Maximino Martínez lo registra como antidisentérico, antiespasmódico, astringente y para tratar la dispepsia y según Seller para tratar la tuberculosis (Argueta, 1994; Martínez, 1989).

El-Gammal y colaboradores (1986), detectaron la actividad antimicrobiana de seis flavonoides: kaempferol (1), quercetina (2), miricetina (3), rutina (4), naringina (5) y formononetina (6), aislados de diferentes materiales de la planta; todos estos compuestos inhibieron levaduras y hongos, y sólo cuatro flavonoides, kaempferol

(1), quercetina (2), miricetina (3) y morina (7), mostraron actividad antibacteriana. Estudios biológicos del extracto etanólico de los brotes de *A. farnesiana* y tallos de *A. nilotica* revelaron una importante actividad hipoglucemiante; en pruebas antimicrobianas estos extractos inhibieron el crecimiento de bacterias Gram positivas, mientras que las hojas de ambas especies presentan actividad contra bacterias Gram negativas, (Wassel, 1992). Diferentes concentraciones de una fracción glicosídica obtenida de arbustos de *A. farnesiana* se estudiaron en músculo esquelético cardíaco y músculo liso de animales, también se hizo el estudio para acción emética en palomas. La fracción mostró acción cardíaca directa positiva cronotrópica y positiva inotrópica, no hubo efecto en otros músculos. No se observó el efecto de emesis. (Triverdi, 1985).

### 2.1.2 Usos

Márquez y colaboradores (1999) mencionan el empleo de *A. farnesiana* contra la diarrea, la tifoidea, el bazo crecido, la inflamación de la garganta, heridas y dolor de cabeza y contra las "nubes en los ojos". El cocimiento de la raíz combinada con otras plantas como la tuna, se utiliza contra el "empacho". El fruto se aplica contra los "fuegos" en la boca, como antiespasmódico, astringente y contra la tuberculosis. El cocimiento de la corteza "abre el apetito y cura el dolor de estómago". Como tintura se usa para curar piquetes de insectos y en té para curar picaduras de alacrán. La infusión de las flores se bebe contra la disentería, la dispepsia, las inflamaciones de la piel y las mucosas. La raíz hervida se usa como "agua de tiempo" para combatir las hemorragias vaginales. La resina es antitusígena.

### 2.1.3 Botánica

Las características de la planta son las siguientes: es un arbusto o árbol de 7 m de altura, muy ramificado, de tallos lisos con muchas espinas blancas. Las hojas son pequeñas y divididas en hojitas más chiquitas que dan la apariencia de plumas

(figura 1), tiene flores como motitas amarillas muy perfumadas. Los frutos son vainas, que pueden estar solas o agrupadas, con las puntas redondeadas, gruesas y aplanadas, con semillas numerosas en forma de riñón de color pardo amarillo (Argueta, 1994).



Figura 1. *Acacia farnesiana* Willd

#### 2.1.4 Distribución

Es originaria de los trópicos y subtropicos de América. Habita en climas cálido, semicálido y templado. Crece silvestre a orilla de caminos, de ríos y de riachuelos, en vegetación de bosque espinoso, pastizal, bosque mesófilo de montaña, de encino y de pino (Argueta, 1994), se localiza en los estados de Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Morelos, Quintana Roo, Veracruz, Tabasco, Hidalgo, Puebla, Guanajuato (Márquez, et al, 1999).

#### 2.1.5 Nombre científico

*Acacia farnesiana* Willd (Sin: *Mimosa farnesiana* L; *Vachellia farnesiana* Wrigt; *Acacia acicularis* Willd, *Cassia farnesiana*). Familia: Mimosaceae.

### 2.1.6 Nombres comunes

Huisache, huizache, huechachin, wichachin (náhuatl), aroma, cascalote, colita, corteza de curtidora, espina divina o sagrada, espino blanco, maroma, vinorama, inúcuá (mixteco) entre otros (Argueta, 1994).

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

## PARTE EXPERIMENTAL

## 3.1 Material y equipo utilizado

El análisis por cromatografía en capa delgada, se llevó a cabo en cromatofolios Alugram Sil G/UV 254 Macherey-Nagel Duren. Como reveladores cromatográficos se emplearon una lámpara de luz UV Spectroline Modelo ENF-240c de longitud de onda a 254 y 365 nm y solución de sulfato cérico amoniacal  $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$  al 1% en ácido sulfúrico 2N (Stahl, 1969) como agente cromógeno. Para las cromatografías en columna abierta se utilizó como fase estacionaria gel de sílice 60 (malla 0.063-0.200 mm) Merck. Las cromatografías preparativas se realizaron en placas Merck de 1 mm de grosor y una superficie de 20x20 cm.

- Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher Johns y no están corregidos.
- Los espectros en el UV se determinaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160.
- Los espectros en el IR se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 283-B.
- Los espectros de RMN se determinaron a 300 ó 400 MHz para el caso de  $^1\text{H}$ , a 75 y 100 MHz para el caso de  $^{13}\text{C}$ . Para esto se utilizaron espectrómetros analíticos Varian XR 300 Varian Unity 500, según el caso. Como disolventes se emplearon  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  y deuteroacetona, y como referencia interna TMS.

- Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro de masas Hewlett Packard 5985-B, utilizando la técnica de ionización por impacto electrónico a 70 eV.

### 3.1.2 Reacción general de acetilación (Shriner et al., 1997)

A 100 mg de compuesto o fracción se adicionaron 1.0 mL de anhídrido acético y 0.3 mL de piridina a temperatura ambiente y con agitación magnética durante 24 h. Transcurrido el tiempo de reacción se añadieron 5.0 g de agua/hielo y se aciduló con una solución de HCl al 10%. Posteriormente se extrajo con 3 porciones de 15 mL de acetato de etilo. La fase orgánica se extrajo con 3 porciones de 5 mL de solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y se lavó 2 veces con porciones de 5 mL de H<sub>2</sub>O y finalmente el extracto orgánico se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y por evaporación del disolvente se obtuvieron los productos acetilados.

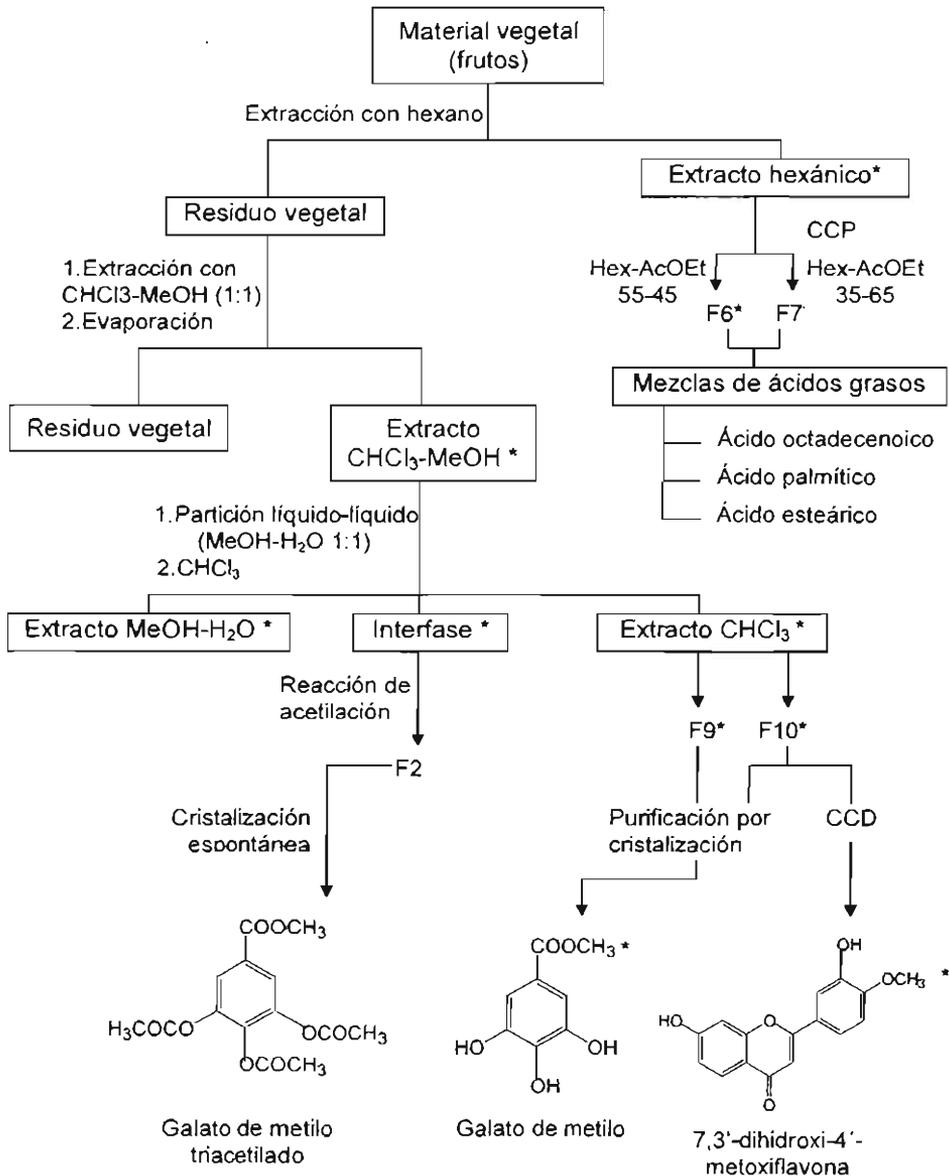
## 3.2 Material vegetal

El material vegetal empleado para el desarrollo de esta tesis (frutos frescos de *Acacia farnesiana*, Leguminosae), fue colectado en el estado de Morelos en el año 2003, e identificado por la Biól. M. Avilés. Una muestra de referencia fue guardada en el Herbario del Instituto Nacional de Antropología e Historia en Morelos.

## 3.3 Extracción y fraccionamiento preliminar

El material vegetal (2.0 Kg de los frutos secos de *A. farnesiana*) se cortó en trozos pequeños y se extrajo por el método de maceración a temperatura ambiente con hexano y posteriormente con CHCl<sub>3</sub>-MeOH (1:1). En ambos casos, el disolvente se eliminó por destilación al vacío obteniéndose los extractos hexánico (14.55 g) y CHCl<sub>3</sub>-MeOH (389.04 g), (Esquema 2).

Esquema 2. Procesamiento biodirigido de los frutos de *Acacia farnesiana*.



\*Extractos, fracciones y compuestos con actividad antimicrobiana

### 3.4 Determinación de la actividad tóxica de los extractos en el crustáceo *Artemia salina* (McLaughlin et al., 1991; Meyer et al., 1982)

#### 3.4.1 Preparación de los organismos

Se preparó una solución de sales de mar comercial (38g de medio salino artificial por litro de agua destilada), en un recipiente de vidrio al cual se le acondicionó una bomba de oxígeno y burbujeó durante aproximadamente 20 minutos. Posteriormente se adicionaron los huevecillos de *Artemia salina* Leach, los cuales se incubaron durante 48 horas en un baño de agua con temperatura controlada (de 28-30°C)

#### 3.4.2 Preparación de las muestras

Se pesaron 20 mg de cada muestra (extracto, fracción o compuesto puro) en un tubo de ensayo por separado, se agregaron 2 mL del disolvente adecuado para disolver a cada muestra, posteriormente se tomaron de cada tubo de ensayo, alícuotas por triplicado de 500, 50 y 5  $\mu$ L, una vez evaporado el disolvente, se aforó con solución de agua de mar (5 mL) para obtener las concentraciones de 10, 100 y 1000  $\mu$ g/mL.

#### 3.4.3 Bioensayo (Teng, 1993)

Pasado el tiempo de incubación descrito en el punto 3.4.1, se depositaron 10 larvas de *A. salina* en cada uno de los tubos con la muestra por evaluar sin alterar el volumen de 5 mL de la solución de agua de mar; se dejaron las larvas 24 horas en contacto con la muestra a 28°C. Posteriormente se contaron los crustáceos sobrevivientes y el resultado se expresó por medio de la  $CL_{50}$  (el cálculo se realizó utilizando gráficas en excel, graficando organismos vivos y muertos acumulados vs el logaritmo de la concentración).

Cuadro 1. Resultado de la determinación de la actividad tóxica a *Artemia salina* de los extractos probados.

Extractos	Conc. [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Núm. de sobrevivientes			Núm. de muertos			CL <sub>50</sub> [ $\mu\text{g/mL}$ ]
Extracto Hexánico.	1000	10/10	10/10	10/10	0/10	0/10	0/10	> 1000
	100	10/10	10/10	10/10	0/10	0/10	0/10	
	10	10/10	10/10	10/10	0/10	0/10	0/10	
Extracto CHCl <sub>3</sub> -MeOH	1000	9/10	9/10	10/10	1/10	1/10	0/10	> 1000
	100	9/10	7/10	9/10	1/10	3/10	1/10	
	10	9/10	10/10	10/10	1/10	0/10	0/10	
Extracto CHCl <sub>3</sub>	1000	10/10	6/10	9/10	0/10	4/10	1/10	> 1000
	100	10/10	10/10	10/10	0/10	0/10	0/10	
	10	10/10	10/10	10/10	0/10	0/10	0/10	

### 3.5 Determinación de la actividad antimicrobiana (CMI) de los extractos hexánico, CHCl<sub>3</sub> y CHCl<sub>3</sub>-MeOH

El ensayo antimicrobiano fue diseñado mediante el método de dilución en agar utilizando cajas petri de 100 mm x 15 mm (Navarro *et al*, 2003). Las soluciones de los controles y los extractos se prepararon en diluciones seriales en el rango de 8-0.125 mg/mL y 128-1  $\mu\text{g/mL}$  respetivamente. Se evaluó la actividad de los extractos hexánico, CHCl<sub>3</sub> y CHCl<sub>3</sub>-MeOH frente a las siguientes bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella tiphy* y los hongos dermatofitos: *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* y la levadura *Candida albicans*. Como compuestos de referencia de la actividad antimicrobiana se empleó gentamicina para bacterias y nistatina para la levadura y

hongos. El valor de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se definió como la concentración más baja del extracto que inhibió visiblemente el crecimiento microbiano sobre agar. El mismo procedimiento fue aplicado para el monitoreo de la actividad antimicrobiana en fracciones y compuestos.

### 3.6 Análisis cromatográfico del extracto hexánico

Se adsorbieron 14.55 g del extracto seco hexánico en 14.5 g de sílica gel, la mezcla homogénea se dejó secar a temperatura ambiente por 48 h. Posteriormente se fraccionó en una columna abierta cromatográfica de sílica gel (291.1 g), eluyendo la muestra con mezclas de hexano–AcOEt y posteriormente de acetona–MeOH, ambas de polaridad creciente. Las fracciones se reunieron de acuerdo a sus características cromatográficas similares, obteniéndose un total de 332 fracciones las cuales por el análisis cromatográfico posterior se decidió reunir en 10 subfracciones. En el Cuadro 2 se muestran las fracciones obtenidas así como los sistemas de elución empleados.

Cuadro 2. Fraccionamiento mediante columna cromatográfica abierta del extracto hexánico de *Acacia farnesiana*.

Eluyente	Proporción (%)	Núm. de fracciones	Fracciones reunidas	Clave
Hexano	100	1-32	1-12	F1
Hexano-AcOEt	95:5	33-64	45-58	F2
Hexano-AcOEt	85:15	65-101	59-69	F3
Hexano-AcOEt	75:25	101-118	70-94	F4
Hexano-AcOEt	65:35	119-198	95-100	F5
Hexano-AcOEt	55:45	199-213	101-121	F6
Hexano-AcOEt	35:65	214-250	127-207	F7
AcOEt	100	251-270	208-302	F8
Acetona	100	271-286	303-304	F9
Acetona-MeOH	99:1	287-295	305-332	F10
Acetona-MeOH	50:50	296-308	—	—
MeOH	100	309-332	—	—

### 3.7 Análisis espectroscópico de las fracciones hexánicas bioactivas F6 y F7

Las fracciones hexánicas bioactivas F6 y F7 se sometieron a un análisis independiente mediante espectroscopia de IR y un análisis espectrométrico por CG-EM para elucidar la composición principal de las fracciones. Las señales espectrométricas observadas se muestran en el Cuadro 7, en discusión de resultados.

### 3.8 Partición del extracto $\text{CHCl}_3$ -MeOH con metanol-agua (1:1)

El extracto  $\text{CHCl}_3$ -MeOH seco de los frutos de *A. famesiana*, se resuspendió en un embudo de separación con una mezcla de MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  en la proporción (1:1) en la mínima cantidad (100 mL). Posteriormente, se procedió a extraer la mezcla anterior mediante una partición líquido-líquido con porciones de 200 mL de  $\text{CHCl}_3$ . Al finalizar la extracción, se reunieron respectivamente las porciones clorofórmicas, acuoso-metanólicas y una porción denominada interfase, a las cuales se les destiló el disolvente a sequedad.

En la Interfase se obtuvo un residuo sólido café claro que resultó ser soluble en metanol, el cual al parecer se oxida, ya que al cabo de 24 h el compuesto se observó café oscuro, por tal motivo se decidió acetilar el compuesto (Shriner *et al.*, 1997).

### 3.9 Análisis cromatográfico del extracto clorofórmico

Para la preparación de la columna abierta cromatográfica del extracto  $\text{CHCl}_3$ , se adsorbieron 20.36 g del extracto en 20 g de sílica gel, la mezcla se dejó secar a temperatura ambiente por 48 h. Posteriormente se aplicó a una columna cromatográfica de vidrio que fue montada con 407.26 g de sílica gel, posteriormente se fueron adicionando porciones de  $\text{CHCl}_3$  y acetona con gradiente positivo de polaridad y se finalizó con una mezcla de acetona-MeOH de polaridad

creciente. Se reunieron las fracciones de acuerdo a la similitud en sus características cromatográficas, obteniéndose un total de 96 fracciones, que posteriormente se agruparon en 11 subfracciones (Cuadro 3).

Cuadro 3. Fraccionamiento mediante columna cromatográfica abierta del extracto clorofórmico.

Eluyente	Proporción (%)	Núm. de fracciones	Fracciones reunidas	Clave
Hexano	100	1-5	1	F1
Hexano-CHCl <sub>3</sub>	90:10	6	2	F2
Hexano-CHCl <sub>3</sub>	70:30	7	3-6	F3
Hexano-CHCl <sub>3</sub>	30:70	8-9	7-11	F4
CHCl <sub>3</sub>	100	10-18	12	F5
CHCl <sub>3</sub> -Acetona	90:10	19-40	13-17	F6
CHCl <sub>3</sub> -Acetona	80:20	41-56	18-19	F7
CHCl <sub>3</sub> -Acetona	60:40	57-65	20-36	F8
CHCl <sub>3</sub> -Acetona	40:60	66-73	37-50	F9
CHCl <sub>3</sub> -Acetona	20:80	74-79	51-55	F10
Acetona	100	80-84	56-96	F11
Acetona-MeOH	90:10	85-88	—	—
Acetona-MeOH	70:30	89-93	-----	--
MeOH	100	94-96	-----	-

### 3.10 Separación del galato de metilo (22) de la fracción F10

En la fracción F10, el galato de metilo (1.634 g) se aisló por cristalización espontánea, los cristales se purificaron lavándolos con la mínima cantidad de CHCl<sub>3</sub>, y por recristalización con CHCl<sub>3</sub>/acetona. El sobrenadante (369 mg) se aplicó en dos cromatoplasmas preparativas, en un sistema de elución Hexano-AcOEt (1:1) y se separó el resto de los cristales (22) de un compuesto de fluorescencia azul al UV, obteniéndose 290 mg y 25 mg respectivamente.

### 3.11 Análisis cromatográfico de la interfase clorofórmica acetilada

Se adsorbieron 590 mg de la interfase acetilada en 0.5 g de sílica gel; la mezcla se dejó secar a temperatura ambiente por 48 h. Posteriormente se aplicó en una columna abierta cromatográfica de sílica gel (12.0 g), eluyendo la muestra con una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ -acetona de polaridad creciente. Se reunieron 61 fracciones de acuerdo a la similitud en sus características cromatográficas. En el cuadro 4 se muestran las fracciones obtenidas así como los sistemas de elución empleados.

Cuadro 4. Fraccionamiento mediante columna cromatográfica abierta de la interfase acetilada de los frutos de *Acacia farnesiana*.

Eluyente	Proporción (%)	Núm. de fracciones	Fracción
$\text{CHCl}_3$	100	1	F1
$\text{CHCl}_3$	100	2	F2
$\text{CHCl}_3$	100	3-39	F3
$\text{CHCl}_3$ -Acetona	90:10	40-44	F4
$\text{CHCl}_3$ -Acetona	70:30	45-51	F5
$\text{CHCl}_3$ -Acetona	50:50	52-56	F6
Acetona	100	57-61	F7

#### 3.11.1 Aislamiento del éster métilico del ácido 3,4,5-tri-O-acetilgálico

De la fracción F2 obtenida en el fraccionamiento de la interfase acetilada, se observó la presencia de un compuesto blanco translúcido que cristalizó espontáneamente. Esta fracción se purificó mediante una cristalización con cloroformo-acetona, obteniéndose un compuesto cristalino de punto de fusión de 125-127 °C (141 mg). El análisis espectrométrico se describe en el cuadro 13 en discusión de resultados.

## 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Determinación de la actividad tóxica de los extractos en el crustáceo *Artemia salina*.

El bioensayo de toxicidad al crustáceo *Artemia salina*, es de carácter general y es útil en los procedimientos fitoquímicos para correlacionar con las actividades biológicas como citotoxicidad *in vitro* para células cancerígenas, actividad antihelmíntica y actividad antipalúdica (Mata *et al*; 2000), por lo cual y a pesar de que este estudio se enfocó a la actividad antimicrobiana, se realizó el de toxicidad por su accesibilidad, así; los extractos hexánico, CHCl<sub>3</sub> y CHCl<sub>3</sub>-MeOH se analizaron con este ensayo con la finalidad de extender la perspectiva de estudio de la planta. Los resultados del bioensayo con los extractos crudos presentaron una concentración letal media mayor a 1000 µg/mL (Cuadro 1), lo cual se considera inactivo para una fracción o extracto proveniente de una planta, de acuerdo a los protocolos internacionales (Anderson *et al.*, 1991).

## 4.2 Determinación de la actividad antimicrobiana (CMI) de los extractos.

El propósito del estudio fitoquímico biodirigido de *Acacia famesiana* fue el de aislar los metabolitos secundarios responsables de actividad antimicrobiana, por lo que se eligió el bioensayo de actividad antimicrobiana para el monitoreo del fraccionamiento. La evaluación de la actividad antimicrobiana en los frutos de *Acacia famesiana* se basó en el uso tradicional que tiene la planta en la medicina popular como remedio para la diarrea, la tifoidea, el bazo crecido, la inflamación de la garganta. El fruto se aplica contra las infecciones en la boca, se emplea como antiespasmódico, astringente y contra la tuberculosis (Márquez *et al*, 1999).

Cuadro 5. Resultado de la determinación de la CMI en los extractos probados

Extractos crudos	Bacterias Valores de CMI (mg/mL)				Hongos Valores de CMI (mg/mL)		Levadura Valores de CMI (mg/mL)
	Ec	Sa	Sf	St	Tm	Tr	Ca
Extracto hexánico	—	< 8	< 8	---	---	---	-----
Extracto CHCl <sub>3</sub>	4	2	4	4	4	1	4
Extracto CHCl <sub>3</sub> - MeOH	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	<4
Gentamicina	0.016	0.008	0.01	0.007	NP	NP	NP
Nistatina	NP	NP	NP	NP	0.018	0.017	0.020

Máxima concentración ensayada (8 mg/mL)

NP: No probado

--- No tiene actividad biológica

En el cuadro 5, se presentan los resultados de las pruebas antimicrobianas correspondientes a los extractos crudos de los frutos de *A. famesiana*. Los valores de CMI  $\leq 8$  mg/mL para los extractos crudos se consideraron de actividad (Navarro *et al*, 2003). El extracto hexánico resultó con actividad inhibitora para el crecimiento de bacterias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (< 8 mg/mL) y *Streptococcus faecalis* (< 8mg/mL), así como los extractos CHCl<sub>3</sub> y CHCl<sub>3</sub>-MeOH. Estos últimos extractos resultaron también activos contra bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella tiphy*), así como contra los hongos dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* y la Levadura *Candida albicans* con valores de CMI  $\leq 4$  mg/mL. En el ensayo, resaltó la actividad del extracto CHCl<sub>3</sub> frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* y al hongo dermatofito *Trichophyton rubrum* con valores de CMI del orden de 2 y 1 mg/mL respectivamente. De acuerdo a los resultados obtenidos con los extractos, se procedió al fraccionamiento de los mismos (Esquema 2), empleando el bioensayo de actividad antimicrobiana para el monitoreo de las fracciones y compuestos.

## 4.3 Resultados del fraccionamiento biodirigido del extracto hexánico. -

El extracto hexánico se fraccionó en una columna abierta cromatográfica de sílica gel, obteniéndose un total de 332 fracciones de las cuales por el análisis cromatográfico posterior se decidió reunir en 10 subfracciones (Cuadro 2). El resultado de la actividad antimicrobiana de las fracciones primarias hexánicas más activas se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6. Resultado del ensayo de la actividad antimicrobiana de las fracciones más activas provenientes del fraccionamiento primario del extracto hexánico.

Fracciones hexánicas	Bacterias Valores de CMI (mg/mL)					Hongos Valores de CMI (mg/mL)			Levadura Valores de CMI (mg/mL)
	Sa	Sf	Ec	Kn	St	Tm	Tr	An	Ca
F6	2	2	>2	>2	>2	1	0.5	>2	>2
F7	1	1	>2	>2	>2	2	2	>2	>2

Sa: *Staphylococcus aureus*, Sf: *Streptococcus faecalis*, Ec: *Escherichia coli* Kn: *Klebsiella pneumoniae*, St: *Salmonella tiphy*. Hongos: Tm: *Trichophyton mentagrophytes*, Tr: *Trichophyton rubrum*, An: *Aspergillus niger*. Levadura Ca: *Candida albicans*. Rango de concentración: 125 – 2.0 mg/mL

Para este ensayo se tomó como referencia de fracciones bioactivas, el valor de la concentración máxima ensayada (2 mg/mL). Los resultados obtenidos muestran que las fracciones F6 y F7 son bioactivas contra las bacterias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*, siendo más activa contra estas bacterias la fracción F7, con valor de CMI de 1 mg/mL en ambos casos. La fracción F6 destaca por su actividad antifúngica en contra de los hongos dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes* (CMI: 1 mg/mL) y *Trichophyton rubrum* (CMI: 0.5 mg/mL), mientras que la fracción F7 fue menos activa ya que la CMI para estos dos hongos es de 2 mg/mL.

## 4.3.1 Análisis espectroscópico de las fracciones primarias hexánicas bioactivas

Cuadro 7. Fracciones hexánicas F6 y F7

IR, $\nu_{\text{máx}}$ (película), $\text{cm}^{-1}$ , (Espectro 1):	3400-3200 (banda ancha), 2924, 2853, 1742, 1711, 1462, 1378, 722.
CG-EM (Espectro 2) (41). t.r. = 11.89 min.	$m/z$ (%): 256 [ $\text{M}^+$ ] (100), 239 (2), 227 (13), 213 (54), 199 (8), 185 (22), 171 (23), 157 (22), 143 (8), 129 (59), 115 (19), 97 (19), 85 (23), 73 (80), 60 (64), 43 (61), 41 (34).
CG-EM (Espectro 3) (42). t.r. = 12.84 min,	$m/z$ (%): 282 [ $\text{M}^+$ ] (13), 264 (52), 239 (3), 235 (3), 222 (13), 194 (3), 180 (10), 151 (12), 138 (11), 123 (18), 111 (12), 97 (60), 83 (67), 69 (77), 55 (100), 41 (55).
CG-EM (Espectro 4) (43). t.r. = 12.91 min,	$m/z$ (%): 284 [ $\text{M}^+$ ] (100), 264 (9), 241 (45), 227 (9), 222 (8), 199 (11), 185 (31), 171 (12), 157 (4), 143 (9), 129 (52), 115 (13), 111 (17), 97 (29), 83 (30), 73 (59), 71 (36), 57 (55), 43 (56), 41 (34).

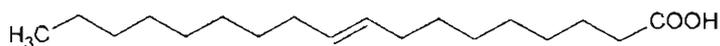
El análisis espectroscópico de las fracciones hexánicas F6 y F7 (Cuadro 7), reveló que contienen la misma composición de una mezcla constituida principalmente por los ésteres de los ácidos grasos: hexadecanoico (palmítico) (41), octadecenoico (42) y octadecanoico (esteárico) (43). Esta mezcla resultó ser irresoluble en su separación por los métodos cromatográficos empleados por nosotros y los compuestos (41) (42) y (43) se identificaron por las siguientes señales espectroscópicas: en el espectro de IR de las fracciones F6 y F7 (Espectro 1), se observaron bandas de absorción para grupos funcionales como: oxhidrilo (banda ancha entre  $3400\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ ), metilos y metilenos ( $2924$ ,  $2853\text{ cm}^{-1}$ ), grupo carboxilo de éster ( $1742\text{ cm}^{-1}$ ), carbono-hidrógeno de metilos y metilenos (alrededor de  $1450$  y  $1378\text{ cm}^{-1}$ ) y cadena de metilenos en número mayor a cuatro ( $722\text{ cm}^{-1}$ ).

El análisis por CG-EM (Espectros 2, 3, 4) reveló la presencia de tres compuestos en común en las fracciones F6 y F7, los ácidos grasos: hexadecanoico (palmítico) (41), octadecenoico (42) y octadecanoico (esteárico) (43). El perfil en el espectro de masas de estos compuestos se observó en forma de curva de Gauss sesgada a la izquierda con un decaimiento progresivo en la intensidad de señales adyacentes, este tipo de fragmentación es típico de ácidos grasos de cadena larga. Por el peso molecular observado en los espectros se identificaron los ácidos grasos: hexadecanoico (palmítico) (41), octadecenoico (42) y octadecanoico (esteárico) (43) (Esquema 3). El patrón de fragmentación observado en los espectros de masas de los constituyentes presentes en las fracciones F6 y F7, fue idéntico al patrón observado en los espectros de los mismos compuestos aislados de la especie *Parmentiera edulis* (Silva, 2002).

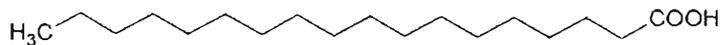
Esquema 3. Compuestos identificados en las fracciones hexánicas F6 y F7: ácidos grasos; hexadecanoico (palmítico) (41), octadecenoico (42) y octadecanoico (esteárico) (43)



Ácido hexadecanoico (palmítico) (41)



Ácido 9-octadecenoico (42)



Ácido octadecanoico (esteárico) (43)

#### 4.4 Partición del extracto CHCl<sub>3</sub>-MeOH con metanol-agua (1:1)

La finalidad de particionar el extracto CHCl<sub>3</sub>-MeOH con metanol-agua, fue separar y eliminar los azúcares que pudieran estar presentes en los frutos de *Acacia famesiana*, para facilitar el aislamiento de los compuestos de los extractos resultantes de la partición (Esquema 2). El extracto acuoso-metanólico resultó tener actividad antimicrobiana, pero no se realizó su fraccionamiento debido a que la mezcla de compuestos se vislumbraba muy compleja y con alta polaridad, irresoluble por métodos cromatográficos convencionales.

#### 4.5 Resultados del fraccionamiento biodirigido del extracto clorofórmico

Se utilizó una columna abierta cromatográfica de silica gel para el fraccionamiento del extracto CHCl<sub>3</sub> (obtenido de la partición líquido-líquido del extracto MeOH-CHCl<sub>3</sub>), Se obtuvo un total de 96 fracciones, que posteriormente se agruparon en 11 subfracciones (Cuadro 3). Las fracciones eluidas con hexano permitieron eliminar los posibles residuos de grasas.

Cuadro 8. Resultado de la actividad antimicrobiana de las fracciones primarias más activas del extracto clorofórmico.

Fracciones Clorofórmicas	Bacterias CMI (mg/mL)					Hongos CMI (mg/mL)			Levadura CMI (mg/mL)
	Sa	Sf	Ec	Kn	St	Tm	Tr	An	Ca
F9	0.4	0.8	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	>0.8	>0.8
F10	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4	>0.8	>0.8
Gentamicina	0.002	0.002	0.004	0.004	0.004	NP	NP	NP	NP
Miconazol	NP	NP	NP	NP	NP	0.004	0.004	0.008	NP
Nistatina	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	0.008

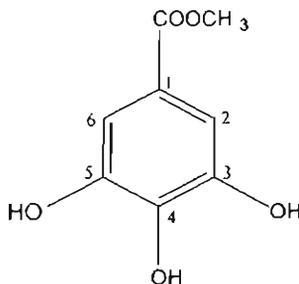
Sa: *Staphylococcus aureus*, Sf: *Streptococcus faecalis*, Ec: *Escherichia coli* Kn: *Klebsiella pneumoniae*, St: *Salmonella tiphy*. Hongos: Tm: *Trichophyton mentagrophytes*, Tr: *Trichophyton rubrum*, An: *Aspergillus niger*. Levadura Ca: *Candida albicans*. Rango de concentración probado: 0.00156-0.8 mg/mL, NP: No probado

Las fracciones primarias clorofórmicas más activas (F9 y F10) se muestran en el cuadro 8, en donde se tomó como referencia la concentración máxima ensayada (0.8 mg/mL) para marcar la actividad. En este cuadro se aprecia que la fracción F10 resultó ser la más activa contra las bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*, bacterias Gram negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella tiphy*, con valores de CMI del orden de 0.2 mg/mL, y los hongos dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* con una CMI de 0.4 mg/mL respectivamente, mientras que con la levadura *Candida albicans* no se observa inhibición de crecimiento. Los resultados anteriores sugieren que en esta fracción se encuentra (n) el ó los compuestos activos.

#### 4.5.1 Aislamiento e identificación del galato de metilo (22).

En la fracción F10 se observaron en cromatografía de capa fina revelada con UV, dos manchas; una con Rf de 0.64 y la otra con Rf de 0.36 en hexano-AcOEt (5:5 v/v) como sistema de elución. La pimera corresponde a un compuesto que se identificó como galato de metilo (Fig. a), el cual cristalizó espontáneamente, lo que permitió su separación y purificación. La segunda pertenece al compuesto identificado como 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34). El galato de metilo resultó ser el componente mayoritario aislado de la fracción F10 (1.924 g) con un p.f. 205-206 °C (lit. 201-203 °C, Buckingham, 1994) Su estructura fue confirmada por las señales espectrométricas presentadas en el cuadro 9.

Figura a. Estructura del galato de metilo (22)



## 4.5.2 Análisis espectroscópico del galato de metilo (22).

Cuadro 9. Constantes espectroscópicas y espectométricas del galato de metilo (22)

P. f.	205-206 °C
F.M	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>
IR, $\nu_{\text{máx}}$ (pastilla), cm <sup>-1</sup> , (Espectro 5)	3407, 3322 (banda ancha), 2955, 1677, 1613, 1465, 1380, 1205, 1035
RMN <sup>1</sup> H, 300 MHz, CD <sub>3</sub> OD, $\delta$ (Espectro 6)	7.04 (s, 2H, H-2 y H-6), 3.81 (s, 3H, -O-CH <sub>3</sub> )
RMN <sup>13</sup> C, 75.5 MHz, CD <sub>3</sub> OD, $\delta$ (Espectro 7)	169.2 (-COOCH <sub>3</sub> ), 146.6 (C-3 y C-5), 139.9 (C-4), 121.6 (C-1), 110.2 (C-2 y C-6), 52.4 (-OCH <sub>3</sub> )
CG-EM (Espectro 8) t.r. = 6.94 min.	<i>m/z</i> (%): 184 [M <sup>+</sup> ] (60), 153 [M <sup>+</sup> -OCH <sub>3</sub> ] (100), 152 (2), 125 (18), 107 (5), 97 (2), 79 (7), 78 (4), 51 (2.5) 50 (2), 39 (2).

En el cuadro 9 se observan en el análisis en el IR (espectro 5), bandas anchas a 3407 y 3322 cm<sup>-1</sup>, estas bandas de absorción se asociaron a la presencia de grupos oxhidrilo presentes en la molécula; en 2955, 1465 y 1380 cm<sup>-1</sup> se observan bandas de absorción características del grupo metilo, una banda de absorción en 1677 cm<sup>-1</sup>, se asoció a la presencia del grupo carboxilo que podía ser de ácido o del éster de un ácido aromático con puentes de hidrógeno intramoleculares (Pretsch, 1980), la banda de absorción a 1613 cm<sup>-1</sup> se identificó como la señal de la vibración carbono-carbono doble ligadura de un compuesto aromático, y en 1205 y 1035 cm<sup>-1</sup> se observan dos bandas que caracterizan el estiramiento simétrico y asimétrico de carbono-oxígeno. El análisis de RMN<sup>1</sup>H (Espectro 6), muestra una señal en la zona de los hidrógenos aromáticos, un singulete que integra para dos hidrógenos a 7.04 ppm; estos hidrógenos se asignaron a la posición 2 y 6 de los carbonos del anillo aromático, un singulete que integra para

tres hidrógenos a 3.81 ppm se asoció a la presencia del grupo metoxilo, que forma parte del éster del galato de metilo; la presencia de grupos oxhidrilo de la molécula se observa en el espectro de RMN<sup>13</sup>C (Espectro 7). El desplazamiento químico de 146.6 ppm revela la presencia de grupos OH unidos a los carbonos 3 y 5 del anillo aromático, también se observa un grupo OH unido a carbono aromático en la posición 4, a 139.9 ppm; en 110.2 ppm se confirma la presencia de hidrógeno unido a carbono aromático en las posiciones 2 y 6 de anillo bencénico, la presencia del carbono del carbonilo de éster, se observa a 169.2 ppm y una señal característica del grupo metoxilo se observó en 52.4 ppm. La localización de los sustituyentes en el anillo se resolvió por la simplicidad de las señales observadas en el espectro de RMN<sup>1</sup>H, del cual se deduce un arreglo simétrico en la molécula, al existir una sola señal sin acoplamiento para los hidrógenos aromáticos.

Se sugiere la equivalencia de dos grupos C-H, C-H y C-OH, C-OH en el anillo, por las señales observadas para los hidrógenos bencénicos en RMN<sup>1</sup>H, así como de los dos carbonos unidos a oxihidrilos en RMN<sup>13</sup>C; en este último espectro se observan seis señales y únicamente cuatro de ellas se localizaron para carbonos aromáticos, lo que confirma que dos pares de señales equivalentes deben de estar en posición *meta* entre sí, mientras que las otras dos señales restantes se asignaron a un grupo carboximetilo vecinal a los dos carbonos con hidrógenos bencénicos, de manera que la molécula está conformada por ocho carbonos en total. Estos resultados permiten concluir que las señales observadas en los espectros corresponden a un metilo, dos carbonos protonados, un grupo carbonilo y cuatro carbonos completamente sustituidos, dos de los cuales equivalentes entre sí están unidos a oxihidrilos. El espectro de masas (Espectro 8) confirmó el peso molecular esperado (184) para una fórmula molecular C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>5</sub>, resaltando que el fragmento más estable observado en el espectro es el ión por pérdida del grupo metoxilo. La estructura correspondiente a estas determinaciones espectroscópicas y espectrométricas se muestra en la figura a. Los datos obtenidos se corroboraron con la literatura (Martínez, 2000).

## 4.5.3 Actividad antimicrobiana del galato de metilo (22)

Cuadro 10. Resultado de la actividad antimicrobiana de los cristales aislados de la fracción F10 del extracto  $\text{CHCl}_3$

Compuesto	Bacterias CMI ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )					Hongos CMI ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			Levadura CMI ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
	Sa	Sf	Ec	Kn	St	Tm	Tr	An	Ca
Galato de metilo	100	200	200	200	200	>400	>400	>400	>400

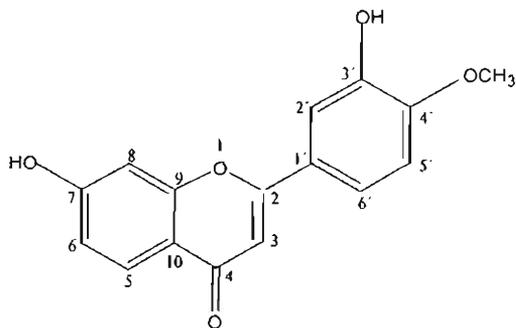
Sa: *Staphylococcus aureus*, Sf: *Streptococcus faecalis*, Ec: *Escherichia coli*, Kn: *Klebsiella pneumoniae*, St: *Salmonella tiphy*. Hongos Tm: *Trichophyton mentagrophytes*, Tr: *Trichophyton rubrum*, An: *Aspergillus niger*. Levadura Ca: *Candida albicans*. Rango de concentración ensayado: 1.56-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$

En el Cuadro 10 se muestran los valores de CMI para el galato de metilo el cual mostró actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), *Streptococcus faecalis* (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), y bacterias Gram negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella tiphy* con valores de CMI de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente, sin embargo, no mostró actividad antifúngica contra los hongos *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*, ni contra la Levadura *Candida albicans*. El valor  $\leq 400$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  se consideró de actividad significativa para el compuesto puro (Villareal et al; 1994).

## 4.5.4 Aislamiento de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (Farnisina) (34)

De las aguas madres de cristalización del galato de metilo, de la fracción F10, se separó mediante cromatoplas preparativas el galato de metilo restante y un compuesto de fluorescencia azul con luz UV de onda larga (345 nm) identificado como 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (25 mg), figura b.

Figura b. Estructura de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (Farnisina) (34)



## 4.5.5 Análisis espectroscópico de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34)

Cuadro 11. Constantes espectroscópicas y espectométricas de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (Farnisina) (34)

P. f.	161-164 °C
F.M	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
UV λ <sub>máx</sub> (MeOH), nm (Espectro 9)	235 y 334
IR ,ν <sub>máx</sub> (película), cm <sup>-1</sup> , (Espectro 10)	3360 a 3100 (banda ancha), 2955, 2927,1731, 1626, 1443, 1384, 1511, 1261, 767
RMN <sup>1</sup> H, 400 MHz, Acetona d <sub>6</sub> , δ (Espectro 11)	9.69 (1H, s ancho, -OH, C-7), 8.09 (1H, s ancho, -OH, C-3'), 7.93 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-5), 7.52 (1H, dd, J = 8.4 Hz, J = 2.4 Hz, H-6'), 7.46 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 7.09 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5'), 7.03 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-8), 6.94 (1H, dd, J = 8.4, J = 2.4, H-6), 6.59 (1H, s, H-3), 3.94 (3H, s, -OCH <sub>3</sub> )
RMN <sup>13</sup> C, 75.5 MHz, Acetona d <sub>6</sub> , δ (Espectro 14)	177.3 (C=O), 163.4 (C-2), 163.3 (C-7), 158.7 (C-9), 151.5 (C-4'), 147.8 (C-3'), 127.6 (C-5), 125.8 (C-1'), 119.3 (C-6'), 117.5 (C-10), 115.36 (C-6), 113.4 (C-2'), 112.3 (C-5'), 106.2 (C-3), 103.5 (C-8), 56.3 (-OCH <sub>3</sub> )
CG-EM (Espectro 15) t.r. = 12.29 min.	m/z (%): 284 [M <sup>+</sup> ] (98), 256 [M <sup>+</sup> -C=O] (8), 241 [-CH <sub>3</sub> ] (52), 227 (129), 185 (34), 171 (15), 151 (4), 143 (14), 136 (1), 129 (70), 123 (4), 108 (1), 97 (28), 73 (100), 60 (65), 57 (55), 43 (30).

El compuesto presentó un p.f de 161-164 °C con absorciones en el espectro UV (Espectro 9)  $\lambda_{\text{máx}}$  (MeOH) a 235 y 334 nm (Lit. UV  $\lambda_{\text{máx}}$  (MeOH) 235, 338 nm. Sahu *et al.*, 1998). En el espectro 9, las absorciones de la molécula se relacionaron con la presencia de grupos cromofóricos derivados del benceno. Estos mismos se observaron al incidir la luz UV sobre el compuesto aplicado a una placa cromatografica de gel de sílice, en donde se aprecia una fluorescencia azul. En el espectro en el IR (Espectro 10) se apreciaron bandas anchas de absorción de 3360 a 3100  $\text{cm}^{-1}$ , que se asignaron a grupos oxhidrilo presentes en la molécula; en 1730  $\text{cm}^{-1}$  se observa una señal intensa relacionada con el grupo carbonilo proveniente de la cromona, otra banda de absorción en 1626  $\text{cm}^{-1}$ , se asignó a la vibración de carbono-carbono con doble ligadura de un compuesto aromático, las señales en 2955, 1443 y 1384  $\text{cm}^{-1}$  son bandas de absorción asociadas al grupo metilo, una banda de absorción a 1261  $\text{cm}^{-1}$  intensa, a menudo doblete, se relaciona con la presencia de un carbono aromático unido al grupo oxhidrilo (Pretsch, 1980).

En el espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  (Espectro 11), las señales intensas de los protones se encuentran en la región de los compuestos aromáticos (de 6 a 8 ppm; Pretsch, 1980) en donde se aprecian las señales de dos sistemas aromáticos que conforman la estructura de una flavona (Harborne, 1975). En el espectro se aprecian nueve señales y cada una de ellas integra para un protón; dos de las señales aparecen a campo bajo como un singulete ancho a 9.69 y 8.09 ppm, estas señales se asignaron a los grupos oxhidrilos localizados en los carbonos C-7 y C-3' respectivamente. El protón H-5 aparece a campo bajo (7.93 ppm) debido a que se encuentra fuertemente desprotegido por el grupo cetónico de la flavona y aparece como un doblete con una constante de 8.8 Hz debido al acoplamiento *orto* con el protón H-6. La señal de H-6 aparece como un doble de dobles (6.94 ppm) con las constantes 8.4 Hz por el acoplamiento *orto* con H-5 y 2.4 Hz por el acoplamiento *meta* con H-8, este último protón aparece como un doblete (7.03 ppm) con una constante de 2.4 Hz por el acoplamiento *meta* con H-6. Ambos protones, H-8 y H-6, aparecen a campo más alto que H-5, pero los tres protones

pertenecen a un mismo sistema, el anillo A de la estructura de la flavona. Por otro lado, los protones del anillo B se comportan de igual manera que los protones del anillo A, es decir, a campo más alto se observa la señal del protón H-5' (7.09 ppm) con una constante de 8.8 Hz debido al acoplamiento orto con H-6', mientras que a campo más bajo se observan las señales de H-6' (7.52 ppm) como un doble de dobles con las constantes 8.4 Hz, por el acoplamiento orto con H-5' y 2.4 Hz por el acoplamiento meta con H-2', que de igual manera aparece con una constante de 2.0 Hz (7.46 ppm) por acoplamiento meta con H-6', el comportamiento de las señales del anillo A es equivalente a las señales del anillo B, por lo que se deduce que son dos sistemas aromáticos similares. Las señales observadas en el espectro de RMN<sup>1</sup>H se compararon con la literatura (Sahu *et al.*, 1998).

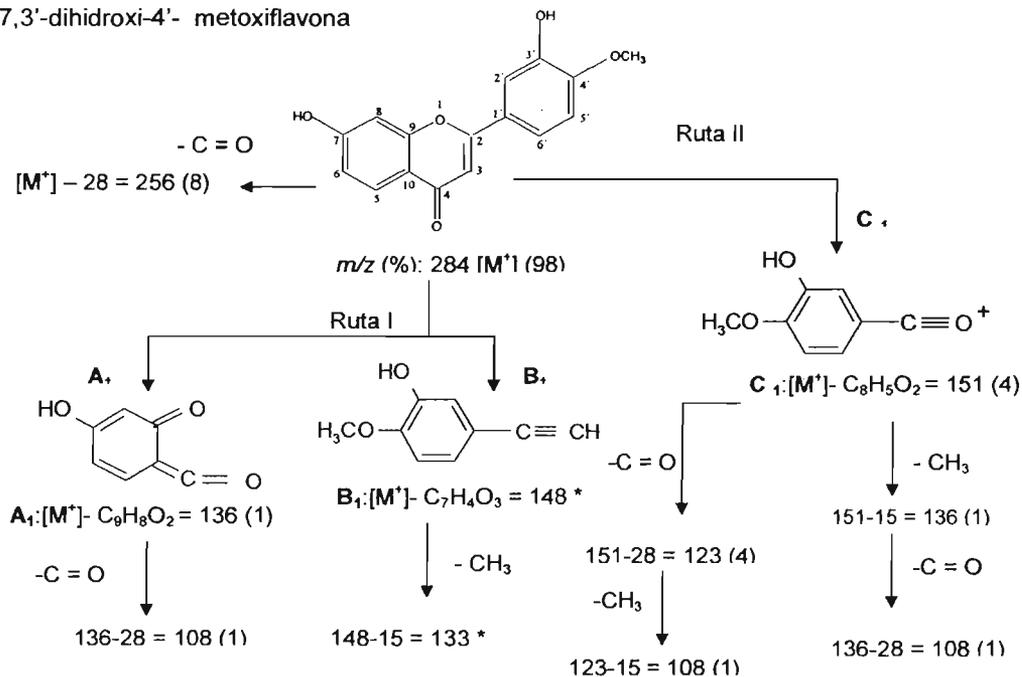
En el espectro COSY (Espectro 12) se observan las señales que correlacionan con los protones vecinos, en este espectro se aprecia que H-5 es vecino de H-6, mientras que H-6' es vecino de H-5', lo que concuerda con las constantes calculadas para cada protón en el espectro de RMN<sup>1</sup>H. El último protón (H-3) aparece como una señal a campo más alto que H-5, H-6, H-5', H-6' y H-2' como un singulete en 6.59 ppm, debido a que se encuentra fuertemente protegido por el grupo cetónico vecino, además de estar en una posición donde permite que la conjugación sea extensa. Por último, un singulete a 3.94 ppm que integra para tres protones, se asignó a un metoxilo, el cual aparece como un sustituyente en el anillo B; cabe resaltar que el anillo B se encuentra dioxigenado por un grupo oxhidrilo y un grupo metoxilo. El desplazamiento químico y las constantes de los protones aromáticos reportados en la literatura para los 7-hidroxiflavonoides (Harborne, 1975) confirma la posición de los protones en los anillos A y B observados en el espectro de RMN<sup>1</sup>H.

En el espectro HSQC (Espectro 13) al analizar la relación hidrógeno-carbono, se aprecian siete carbonos unidos a hidrógeno, los desplazamientos químicos se confirmaron en el espectro de RMN<sup>13</sup>C (Espectro 14), donde las señales 127.6, 115.36 y 103.5 ppm se asignaron a los carbonos protonados C-5, C-6 y C-8

respectivamente, y para los carbonos protonados C-5', C-6' y C-2' se asignaron las señales 112.35, 119.3 y 113.4 ppm respectivamente; la señal a 106.2 se asoció al carbono protonado C-3 y la señal a 56.3 ppm al grupo metoxilo; esto último permite concluir que de los 15 carbonos que conforman el esqueleto de la flavona siete están protonados, y el resto de los carbonos son cuaternarios.

En el espectro de masas (Espectro 15), se observa el peso molecular esperado (284) para una fórmula molecular  $C_{16}H_{12}O_5$  (Sahu *et al.*, 1998), el cual corresponde al compuesto 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona. El espectro confirmó la presencia del grupo metoxilo en el anillo B, ya que el patrón de fragmentación, de acuerdo con la fragmentación típica de las flavonas (Harborne, 1975), concuerda con los pesos moleculares de los iones observados en el espectro de masas del (34). Este proceso se explica en el siguiente esquema.

Esquema 4. Fragmentación observada en el espectro de masas del compuesto 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona



\* Especies químicas no observadas en el espectro de masas (Espectro 15).

Las especies químicas que se observan en el espectro de masas del compuesto (34), son el fragmento  $A_1$  y  $C_1$  (Esquema 3), los pesos moleculares de dichas especies y de los iones posteriormente formados por una desmetilación y/o descarbonilación aparecen, aunque en un porcentaje pequeño. Se calcularon los pesos moleculares de los fragmentos formados con el metoxilo unido al anillo A, pero estos no coincidieron, al igual que la especie química  $B_1$ , con lo reportado en el espectro. Este análisis confirma que el anillo B se encuentra dioxigenado por un grupo oxhidrilo y un grupo metoxilo.

El desplazamiento de los carbonos cuaternarios se determinó mediante un estudio bidimensional HMBC (Espectro 16) donde la interacción de los hidrógenos con los carbonos a dos y tres ligaduras, permitió determinar su posición en la estructura de la flavona mediante las siguientes correlaciones: para el protón H-3 (6.59 ppm) se observaron cuatro correlaciones en el espectro con los carbonos: C-4 (carbonilo en 177.2 ppm), C-2 (163.4 ppm), C-1' (125.8 ppm) y C-10 (117.5 ppm); el protón H-5' (7.09 ppm), mostró dos correlaciones con C-3' (C-OH, 147.8 ppm) y C-1' (125.8 ppm); la señal del protón H-2' (7.46 ppm) correlacionó con C-2 (163.4 ppm), C-4' (C-OCH<sub>3</sub>, 151.5 ppm), C-3' (C-OH, 147.8 ppm) y C-6' (119.3 ppm); el protón H-8 (7.03 ppm), mostró dos correlaciones: con C-9 (C-O, 158.7 ppm) y C-10 (117.5); el protón H-5 (7.93 ppm) presentó tres correlaciones: con C-4 (carbonilo con 177.2 ppm), C-7 (C-OH, 163.3 ppm), y C-9 (C-O, 158.7 ppm), por último, la señal del hidrógeno del grupo metoxilo (3.94 ppm) correlacionó con el carbono C-4' (C-OCH<sub>3</sub>, 151.5 ppm). La confirmación de la posición del grupo metoxilo en la posición 4' del anillo B de la flavona, lo determinó el estudio bidimensional NOESY (Espectro 17), en el cual se observó la interacción de la señal del protón H-5' (7.09 ppm) con la señal de los hidrógenos del grupo metoxilo (3.93 ppm), este resultado ubicó al metoxilo en la posición 4'. La estructura que corresponde al análisis espectroscópico y espectrométrico realizado es de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (figura b).

## 4.5.6 Actividad antimicrobiana del compuesto 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34)

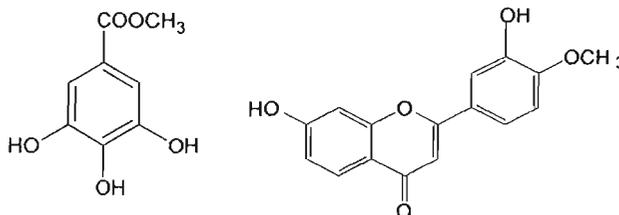
Cuadro 12. Actividad antimicrobiana del compuesto 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona, Farnisina (34)

Compuesto	Bacterias CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )					Levadura CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )
	Sa	Sf	Sb	Ec	St	Ca
7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona	250	500	62	>1000	>1000	1000
Gentamicina	8	8	8	16	---	NP
Nistatina	NP	NP	NP	NP	NP	20

Sa: *Staphylococcus aureus*, Sf: *Streptococcus faecalis*, Sb: *Streptococcus beta-hemolítico*, Ec: *Escherichia coli*, St: *Salmonella tiphy*. Levadura Ca: *Candida albicans*  
Concentración máxima ensayada: 1 mg/mL

En el Cuadro 12 se observa la actividad antimicrobiana del compuesto 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34), el cual muestra una actividad inhibitoria específica para bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (CMI 250  $\mu\text{g/mL}$ ), *Streptococcus faecalis* (500  $\mu\text{g/mL}$ ) y el resultado más sobresaliente se observa frente al microorganismo *Streptococcus beta-hemolítico* (62  $\mu\text{g/mL}$ ). No se observa actividad antimicrobiana por parte de este compuesto contra bacterias Gram negativas: *Escherichia coli* y *Salmonella tiphy*, y la levadura *Candida albicans*.

## 4.5.7 Compuestos aislados de la fracción primaria clorofórmica F10

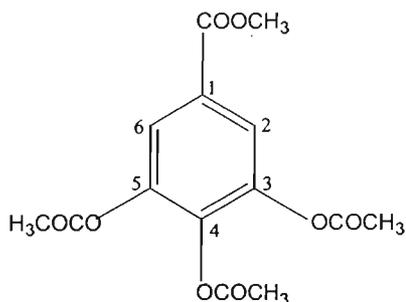


Galato de metilo (22) y 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona, farnisina (34)

## 4.6 Obtención del derivado triacetilado del galato de metilo (44)

El residuo sólido de la interfase producida al someter a partición el extracto clorofórmico-metanólico con cloroformo, se acetiló, debido a que la mezcla de compuestos presentaba oxidación con el tiempo. Posteriormente la mezcla acetilada se fraccionó en una columna cromatográfica de sílica gel (Cuadro 4). Del fraccionamiento en columna se aislaron unos cristales de la fracción F2 (Fig. c) que por métodos espectroscópicos y espectrométricos se identificó como el derivado triacetilado del galato de metilo (éster métilico del ácido 3,4,5-tri-O-acetilgálico, 141 mg) con un punto de fusión de 125-127 °C.

Figura c. Estructura del éster métilico del ácido 3,4,5-tri-O-acetilgálico (44)



## 4.6.1 Análisis espectrométrico del tri-O-acetil-galato de metilo (44)

Cuadro 13. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del derivado acetilado del galato de metilo

P. f.	125-127 °C (lit 120-122 °C, Buckingham, 1994)
F.M	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>
IR $\nu_{\text{máx}}$ (pastilla), cm <sup>-1</sup> , (Espectro 19)	2954, 1776, 1721, 1618, 1431, 1372, 1300-1050
RMN <sup>1</sup> H, 400 MHz, CDCl <sub>3</sub> , $\delta$ (Espectro 20)	7.80 (s, 2H, H-2 y H-6), 3.90 (s, 3H, -O-CH <sub>3</sub> ), 2.307 y 2.300 (2s, 9H, 3 x -OCOCH <sub>3</sub> posiciones 3, 4, 5)
RMN <sup>13</sup> C, 100 MHz, CDCl <sub>3</sub> , $\delta$ (Espectro 21)	167.6 (-OCOCH <sub>3</sub> x 2), 166.4 (-OCOCH <sub>3</sub> ) 164.7 (- COOCH <sub>3</sub> ), 143.3 (C-3 y C-5), 138.5 (C-4), 128.2 (C-1), 122.2 (C-2 y C-6), 52.5 (-OCH <sub>3</sub> ), 20.55 (- COCH <sub>3</sub> C-3 y C-5) 20.1 (-COCH <sub>3</sub> C-4)
CG-EM (Espectro 23) t.r. = 17.51 min.	<i>m/z</i> (%): 310 [M <sup>+</sup> ] (2), 279 [M <sup>+</sup> -OCH <sub>3</sub> ] (2), 268 (12), 237 [-OCH <sub>3</sub> ] (6), 226 (62), 195 [-OCH <sub>3</sub> ] (4), 184 [C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub> <sup>+</sup> ] (100), 153 [C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub> <sup>+</sup> -OCH <sub>3</sub> ] (22), 152 (8), 125 (5), 124 (4), 79 (1), 59 (2), 43 (52), 42 (1)

La interfase obtenida en el punto 4.6 se secó y analizó por espectroscopia en el IR. Las señales presentadas en los espectros se analizaron de la manera siguiente: antes de acetilar, se analizó una muestra de la interfase y el espectro en el IR reveló una serie de bandas anchas de absorción en 3469 y 3310 cm<sup>-1</sup> (Espectro 18), estas señales se asociaron con grupos oxhidrilo. De la acetilación de la interfase por tratamiento con anhídrido acético y su posterior purificación cromatográfica, se confirmó químicamente la presencia de los oxhidrilos en la fracción F2, en donde se formó el derivado acetilado como éster métilico del ácido 3,4,5-tri-O-acetilgálico, el cual cristalizó espontáneamente. A diferencia del espectro en el IR de la interfase antes de acetilar (Espectro 18), en el espectro en

el IR del éster métilico del ácido 3,4,5-tri-*O*-acetilgálico (espectro 19) (Cuadro 13), las bandas anchas de absorción en la región de los oxhidrilos en 3200 a 3469  $\text{cm}^{-1}$  ya no aparecen, sin embargo aparece una banda intensa en 1776  $\text{cm}^{-1}$  que es propia del carbonilo del grupo acetilo. En el espectro de RMN<sup>1</sup>H (Espectro 20), se observan cuatro señales, un singulete en 7.80 ppm en la región de los hidrógenos aromáticos que integra para dos protones, esta señal pertenece a los hidrógenos bencénicos H-2 y H-6 de la molécula, en 3.90 ppm, un singulete que integra para tres protones se asoció al grupo metilo del éster. Hasta aquí existe similitud en las señales observadas en el espectro de RMN<sup>1</sup>H de este compuesto (44) con el galato de metilo (22) (Espectro 6) la diferencia con éste es el par de singuletes intensos a 2.307 y 2.300 ppm en el espectro 18, que integran para nueve protones, los cuales se asignaron a las señales presentadas por los metilos de los grupos acetilo. En la resonancia de <sup>13</sup>C (Espectro 21) las señales en 167.6 y 166.4 ppm corresponden a los tres carbonos de los grupos carbonilo mientras que el desplazamiento químico en 164.7 ppm se asignó al carbonilo del ester de la molécula, la señal de los carbonos 2 y 6 se desplazó en este compuesto a campo bajo (12 ppm), ubicándose en 122.2 ppm, este desplazamiento es debido a los grupos *O*-acetilo que al estar vecinos a ellos, causan un efecto electrónico paramagnético. Las señales para los metilos de los grupos acetilo para los carbonos 3 y 5 se observaron a 20.55 ppm y para el carbono 4 en 20.1 ppm. En el espectro de <sup>13</sup>C en su modalidad DEPT (Espectro 22) se observó la señal de un metoxilo (52.5 ppm), los metilos de los grupos acetilo (20.55 y 20.1 ppm) y la señal de un carbono unido a hidrógeno (122.2 ppm) que por simetría de la molécula se establece para los dos carbonos protonados C-2 y C-6. De acuerdo a esto último, el anillo aromático debe presentar cuatro carbonos cuaternarios, y de acuerdo al análisis en conjunto de los espectros, tres de estos carbonos están sustituidos con grupos *O*-acetilo, mientras que un carbono está unido a un éster métilico. El espectro de masas (Espectro 23), reveló el peso molecular esperado (310), el cual corresponde a la fórmula molecular C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>O<sub>8</sub>, que pertenece al galato de metilo tri-*O*-acetilado (44). En el espectro se observa que el ión molecular más estable pertenece al galato de metilo sin los acetilos como sustituyentes, con un

peso molecular de 184. De acuerdo al análisis anterior se estableció la estructura del derivado acetilado del galato de metilo (44).

## 5. CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

1.- De los frutos de *Acacia farnesiana* Willd (nombre común: huizache) se prepararon tres extractos orgánicos: hexánico (0.73%), clorofórmico-metanólico (19.45%) y por partición de este último, el clorofórmico (0.06%). Los extractos presentaron actividad positiva de inhibición de crecimiento microbiano contra microorganismos Gram positivo y Gram negativo.

2.- Ninguno de los extractos ensayados fueron activos contra el Crustáceo *Artemia salina* Leach.

3.- Del fraccionamiento primario del extracto hexánico se identificaron los esterés de los ácidos grasos: hexadecanoico (palmítico) (41), octadecenoico (42) y octadecanoico (esteárico) (43) en las fracciones F6 y F7, las cuales presentaron actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positiva. La Fracción F6 resultó tener actividad antifúngica al inhibir el crecimiento de los hongos dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* con valores de CMI de 1 mg/mL y 0.5 mg/mL respectivamente.

4.- El Fraccionamiento químico biodirigido del extracto clorofórmico por cromatografía en columna abierta de vidrio, permitió el aislamiento del galato de metilo (22) y de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34); ambos compuestos fueron significativamente activos frente a microorganismos Gram positivo y Gram negativo. Los valores de CMI para el compuesto (22) fueron de alrededor de 200 µg/mL para bacterias Gram positivas y Gram negativas respectivamente. Sin embargo, no mostró actividad antifúngica contra los hongos *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*, ni contra la Levadura *Candida albicans*. La actividad antimicrobiana del compuesto 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34) muestra una actividad inhibitoria específica para bacterias Gram positivas y el resultado más sobresaliente se observa frente al microorganismo *Streptococcus*

*beta-hemolítico* con una CMI de 62 µg/mL. No se observó actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas y la levadura *Candida albicans* por el compuesto (34).

5.- La actividad antimicrobiana de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34) mencionada en este trabajo, es el primer estudio biológico que se reporta para este compuesto.

6.- Fue posible identificar las estructuras de los compuestos 22, 34, 41, 42, y 43 a través de sus características espectroscópicas y espectrométricas y de 22, por formación de derivados.

6.- El análisis químico diferencial de los frutos de *Acacia farnesiana* permitió el aislamiento e identificación estructural de compuestos con actividad antimicrobiana y/o antifúngica que validan el uso de la planta en la medicina tradicional mexicana.

7.- Este constituye el primer estudio químico y biológico realizado a los frutos de *Acacia farnesiana*.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

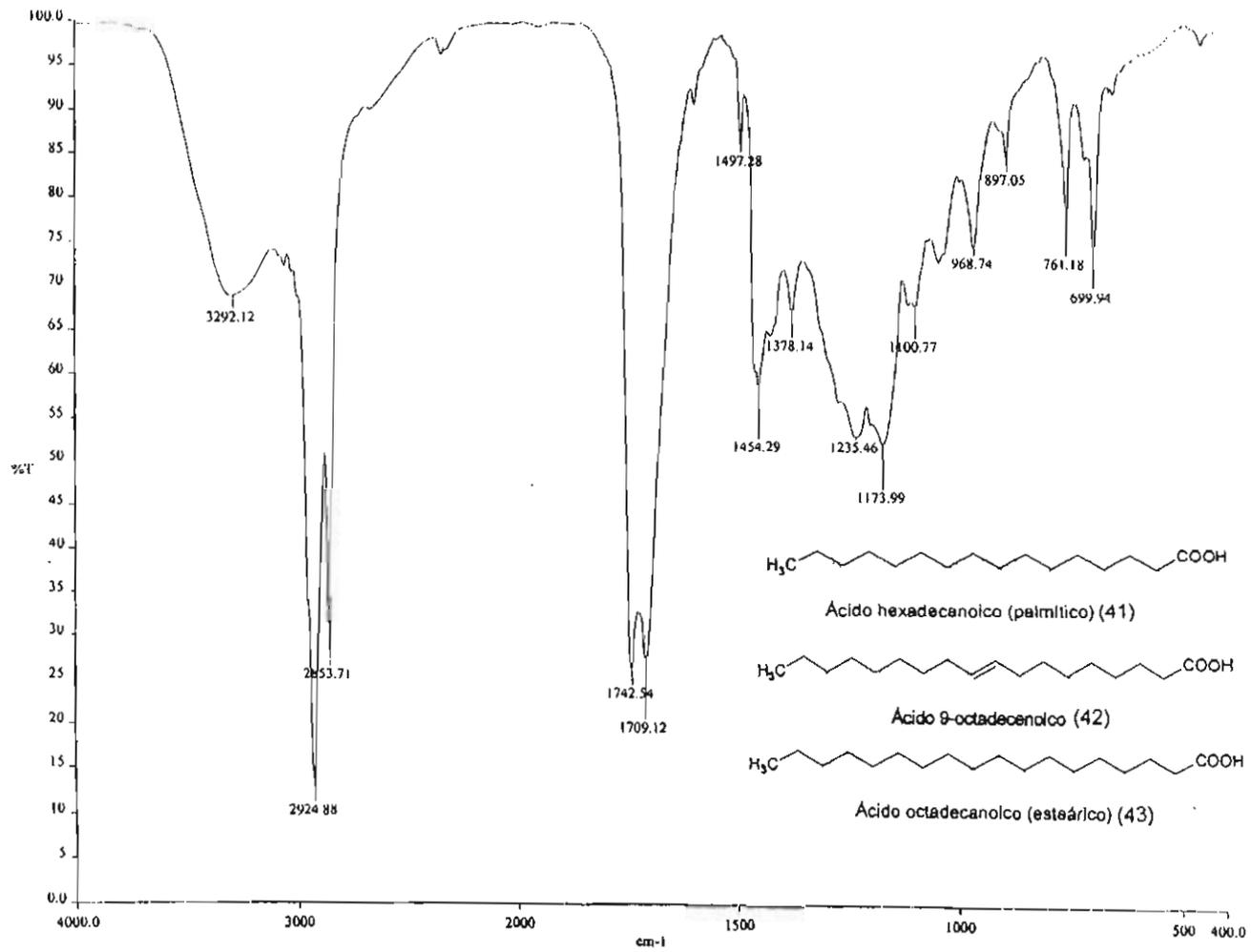
## BIBLIOGRAFIA

- Argueta, V. A., Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana II. Editorial Inst. Nacional Indigenista, México, 1994, p.833
- Anderson, J. E., Goetz, C. M. y McLaughlin, J. L. (1991). A Blind Comparison of Simple Bench-top Bioassays and Human Tumor Cell Citotoxicities as Antitumor Prescreens. *Phytochemical Analysis*, Vol. 2, p. 107-111
- Barakat, H. H. (1999). Flavonoid galloyl glucosides from the pods of *Acacia famesiana*. *Phytochemistry*, 51(1), p. 139-142
- Buckingham, J. (1994). Dictionary of Natural Products; Vol. 5, p. 5719, Stanford University
- Chowdhury, A. R. (1983). Chemical composition of *Acacia* seeds. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60(11), p. 1893-4
- Devi, S. R., *et al.* (1991). Tannins and related polyphenols from ten common *Acacia* species of India. *Bioresour Technol.*, 36(2), p. 189-92,
- El-Gammal, A. A. (1986). Antimicrobial activities of some flavonoid compound. *Zentralbl. Mikrobiol*, 141(7), p. 561-5
- El-Negoumy, S. I., *et al.* (1981). Kaempferol 7-galloylglucose from *Acacia famesiana*. *Egypt J. Chem.*, 24(4-6), p. 471-3
- El Sissi, Hassan I. (1973). Phenolics of *Acacia famesiana*. *Phytochemistry*, 12(9), p. 2303-6
- Giral, F., Sotelo, A. y Lucas, B. (1978). Chemical composition and toxic factors content in fifteen leguminous seeds. *Q. J. Crude Drug Res. Fac. Chem., Univ. Nac. Auton. México*, 16(3), p. 143-9
- Harborne, J., Mabry, T. y Mabry, H. The Flavonoids. Parte 1. Edit. Academic Press, p. 63-66, 82-87, New York 1975.
- Ilyas, M., Hammed, N., Rahman, W. J. (1970). Flavonoids of flowers of *Acacia famesiana*. *Indian Chem. Soc.*, 47 (2), p. 183-4

- Janzen, D. H. (1980). Seasonal constancy of intra-population variation of hydrogen cyanide content of Costa Rica *Acacia farnesiana* foliage. *Phytochemistry*, 19(9), p. 2022-3
- Martínez, M. Las Plantas Medicinales de México. Sexta Edición. Ed. Botas, p.381, México 1989
- Marquez, A. *et al.* Plantas medicinales de México II, composición, usos y actividad biológica. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, p.101, México 1999
- Martínez, Díaz M. C. Trabajo de Tesis: Aislamiento e identificación de algunos compuestos fenólicos presentes en *Blomia prisca* (Sapindaceae), p. 18-20, 27-29. UNAM, Facultad de Ciencias; Mexico 2000
- Mata, R. y Rivero, J. F. Curso Teórico de Farmacognosia, Segunda versión; Facultad de Química, UNAM; pag. 11, México 2000
- Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D. and McLaughlin, J. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45, p. 31-34
- McLaughlin, J., Chang, C. and Smith, D. "Bench-top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In *Studies in Natural Products Chemistry*, (Rahman, A. u., ed.). Elsevier, Amsterdam, in press, 1991.
- Navarro, V., González, A., Fuentes, M., Aviles, M., Rios, Y., Zepeda, G., y Rojas, M. (2003). Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* Vol. 87, p. 85-88
- Pretsch, E., Clerc, T., Seibl, J. and Simon, W. Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos. Edit. Alhambra, España 1980
- Sahu, N. P. (1998). 7,3'-dihydroxy-4'-metoxyflavone from seeds of *Acacia farnesiana*. *Phytochemistry*, 49(5), p. 1425-1426
- Secor, J. B., *et al.* (1976). Detection and identification of cyanogenic glucosides in six species of *Acacia*. *Phytochemistry*, 15(11), p. 1703-6

- Shiner, R., Fuson, R., Curtin, D.; Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos. Edit. Limusa, p. 269, México 1997
- Silva, M. R. Trabajo de Tesis: Estudio químico y biológico preliminar de los frutos de *Parmentiera edulis* (Bignoniaceae), p. 28, 63-67. UNAM, Facultad de Química; Mexico 2002
- Stahl, E. And Schorn, P. J., Thin Layer Chromatography-A Laboratory Handbook. Edit. E. Stahl., p. 384, Berlin 1965
- Triverdi, C. P. (1985). Preliminary phytochemical and pharmacological studies on glycosidal fraction of *Acacia farnesiana*. *Orient J. Chem.*, 1(1), p. 29-31
- Villareal, M., Alvarez, L., Alonso, D., Navarro, V., García, P. y Delgado, G. (1994). Cytotoxic and antimicrobial screening of selected terpenoids from *Asteraceae* species. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 42, p. 25-29
- Wassel G. M., *et al.* (1990). Study of phenolic constituents and tannins isolated from *Acacia nilotica* and *Acacia farnesiana*. *Herba Hung*, 29(1-2), p. 43-9
- Wassel G. M., *et al.* (1992). Phytochemical examination and Biological studies of *Acacia nilotica* L. Willd and *Acacia farnesiana* L. Willd growing in Egypt. *Egypt J. Pharm. Sci.*, 33(1-2), p.327-40
- Wassel G. M., *et al.* (1992). Investigation of micilage of pods of *Acacia nilotica* L. Willd and *Acacia farnesiana* L. Willd growing in Egypt. *Egypt J. Pharm. Sci.*, 33(1-2), p.319-25
- Teng, W. S. (1993). Bioactive Natural Products : Toxicity Testing Using the Brine Shrimp: *Artemia Salina*. Editorial S. M. Colegate and R. J. Molyneaux, CRC Press, INC. E. U. A., p. 441-457

## 7. ANEXOS



Espectro 1. Espectro de IR de la mezcla constituida por los ésteres de los ácidos grasos: Hexadecanoico (palmítico) (41), octadecenoico (42) y octadecanoico (esteárico)(43)

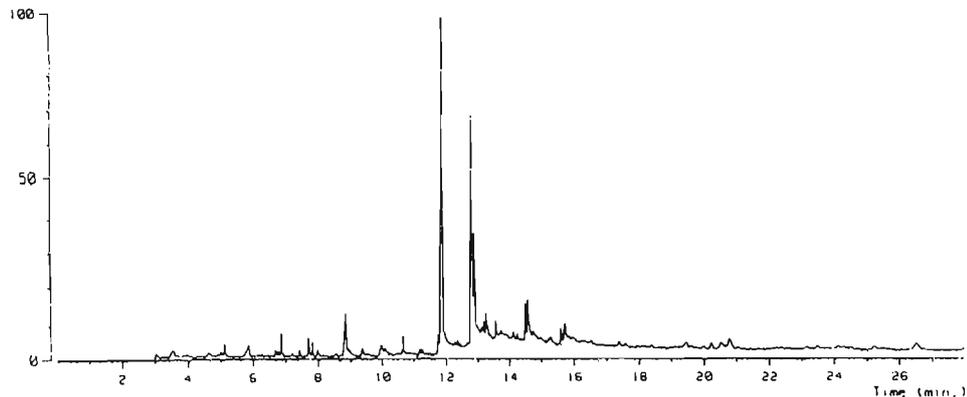
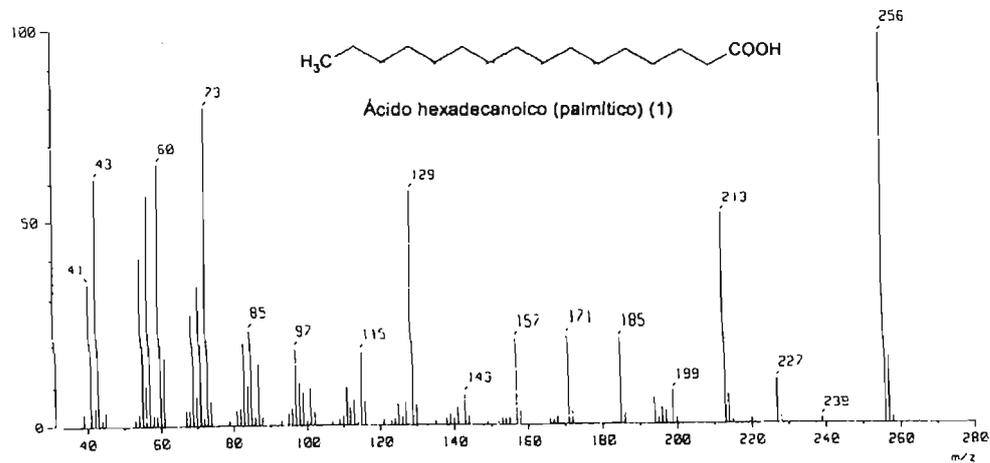
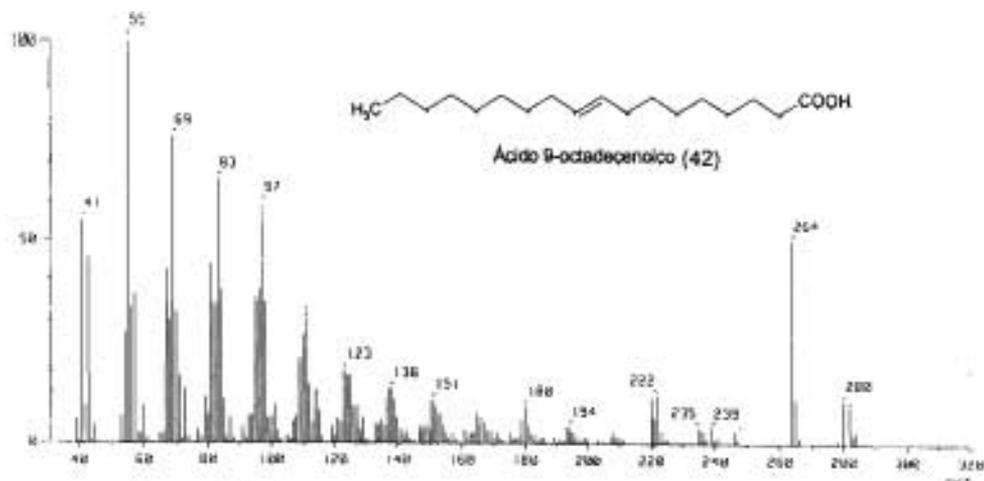


Figura 2. Cromatograma de gases de la mezcla constituida por los ésteres de los ácidos grasos: Hexadecanoico (palmítico) (41), octadecenoico (42) y octadecanoico (esteárico) (43).

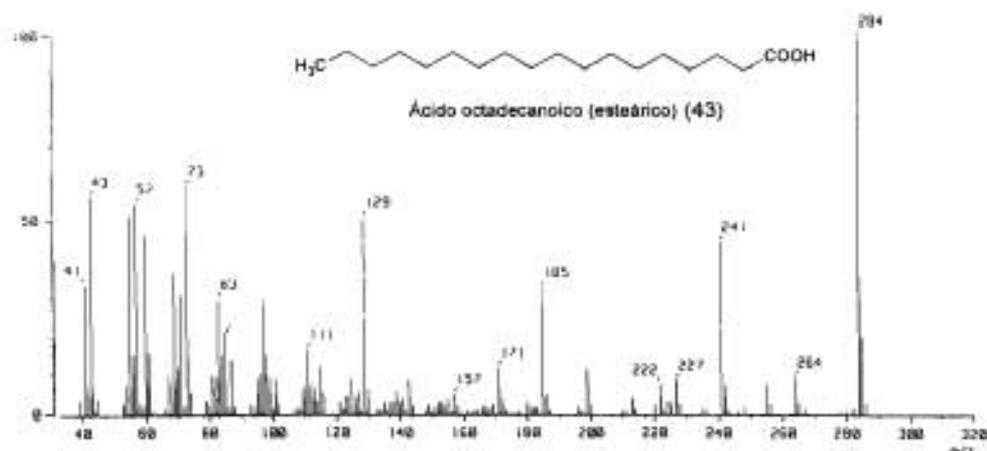


8

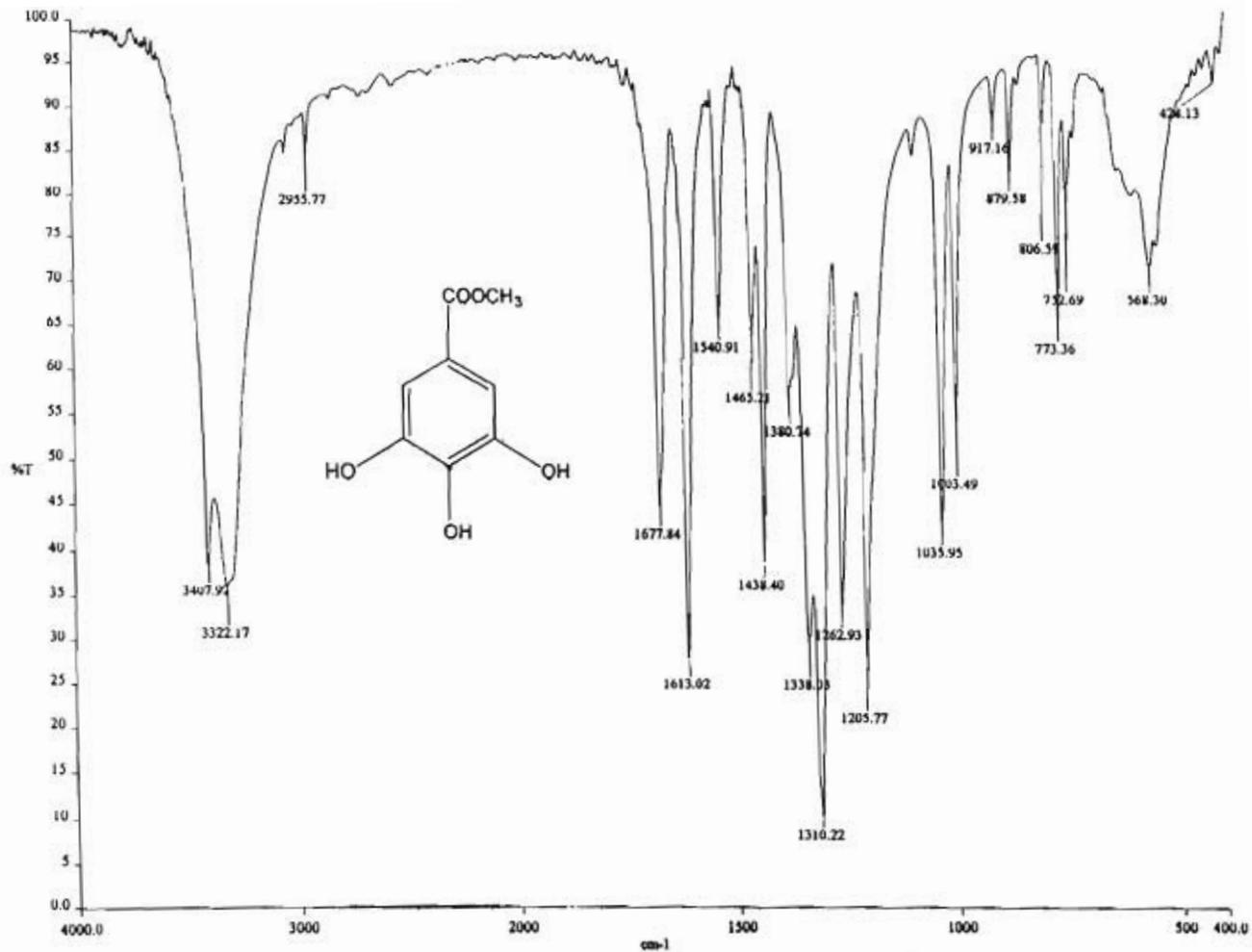
Espectro 2. Espectro de masas por impacto electrónico del ácido hexadecanoico (palmítico) (41)



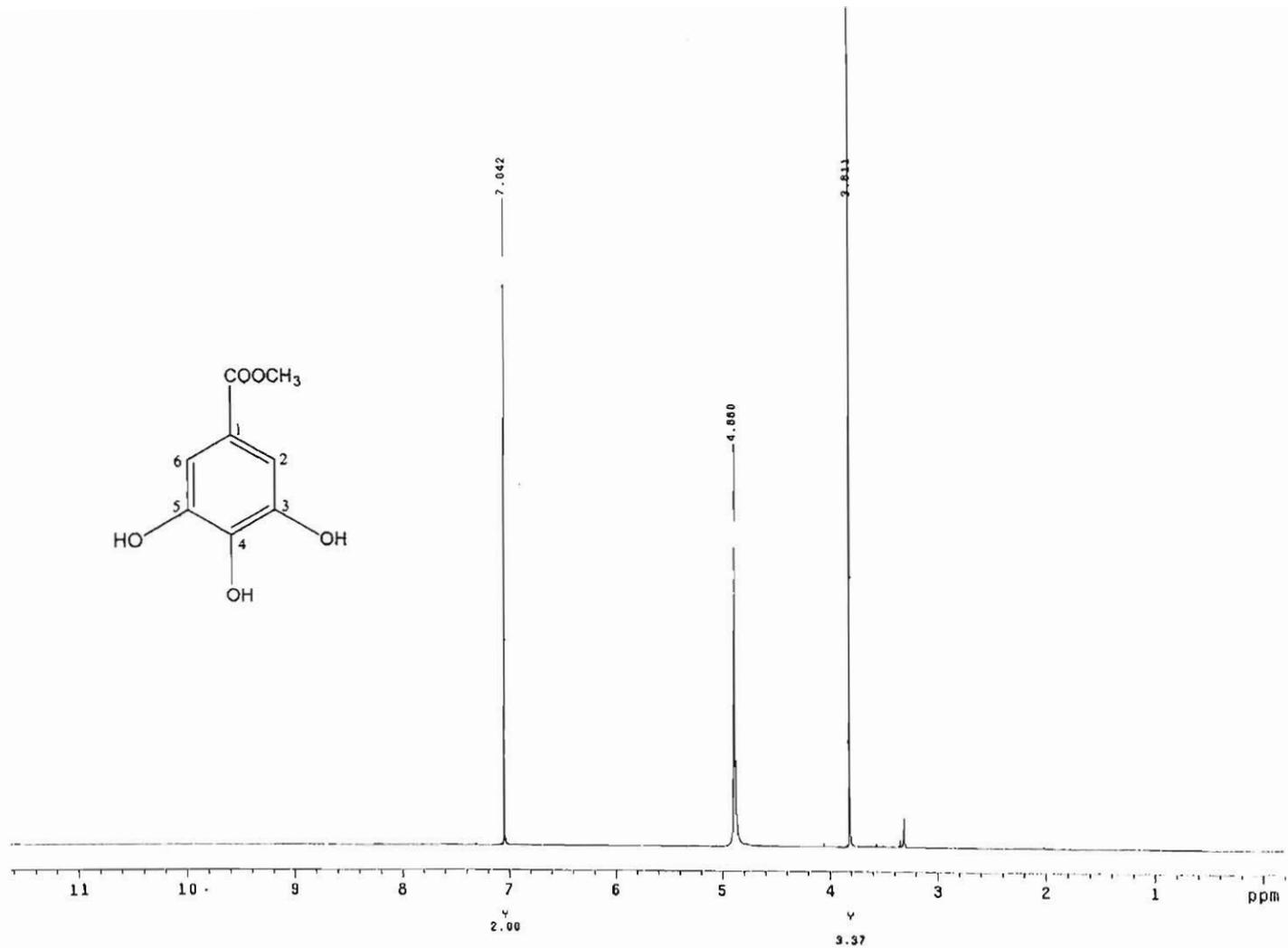
Spectro 3. Espectro de masas por impacto electrónico del ácido octadecenoico (42)



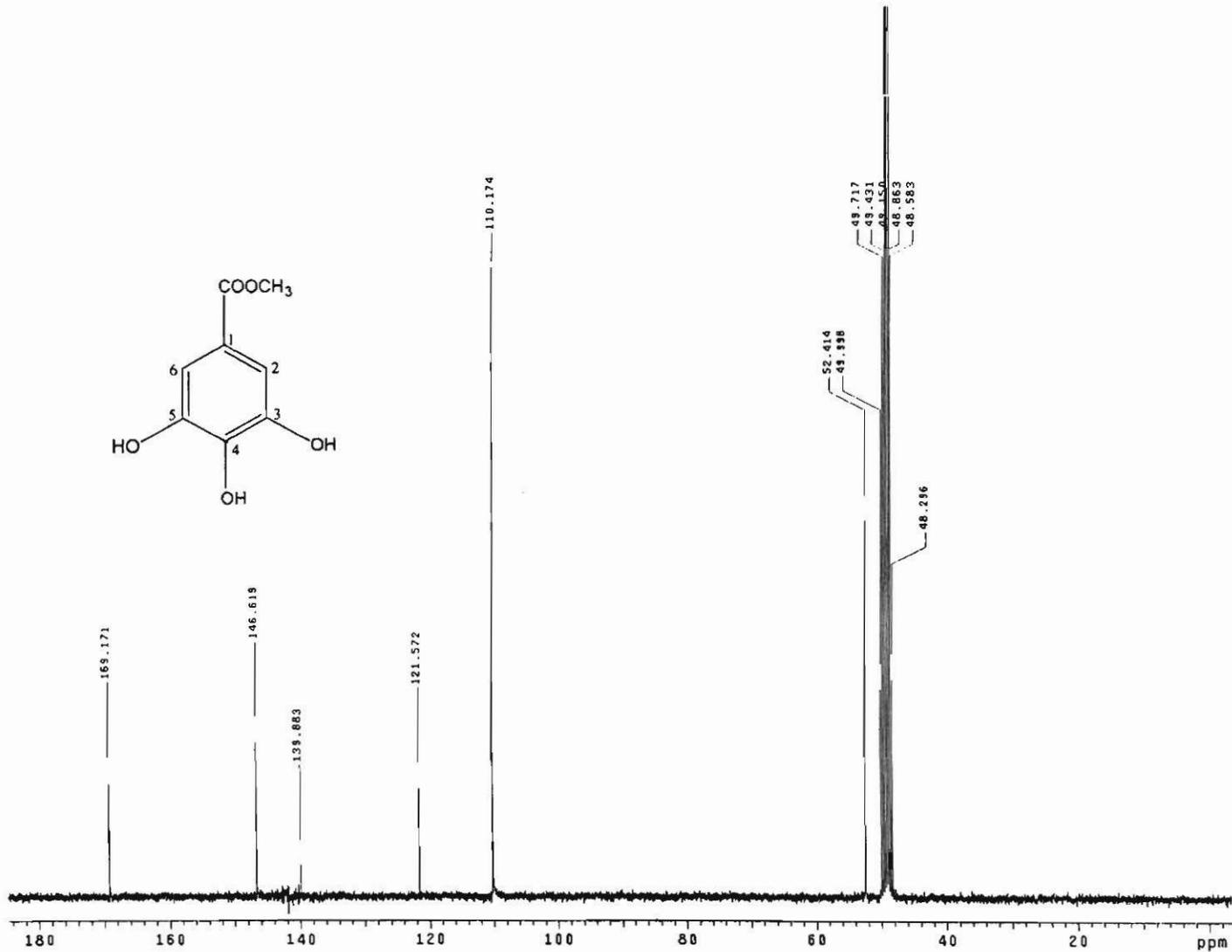
Spectro 4. Espectro de masas por impacto electrónico del ácido octadecanoico (esteárico) (43)



Espectro 5. Espectro de IR del galato de metilo (22)



Espectro 6. Espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  del galato de metilo (22)  $\text{CD}_3\text{OD}$

Espectro 7. Espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  del galato de metilo (22)  $\text{CD}_3\text{OD}$

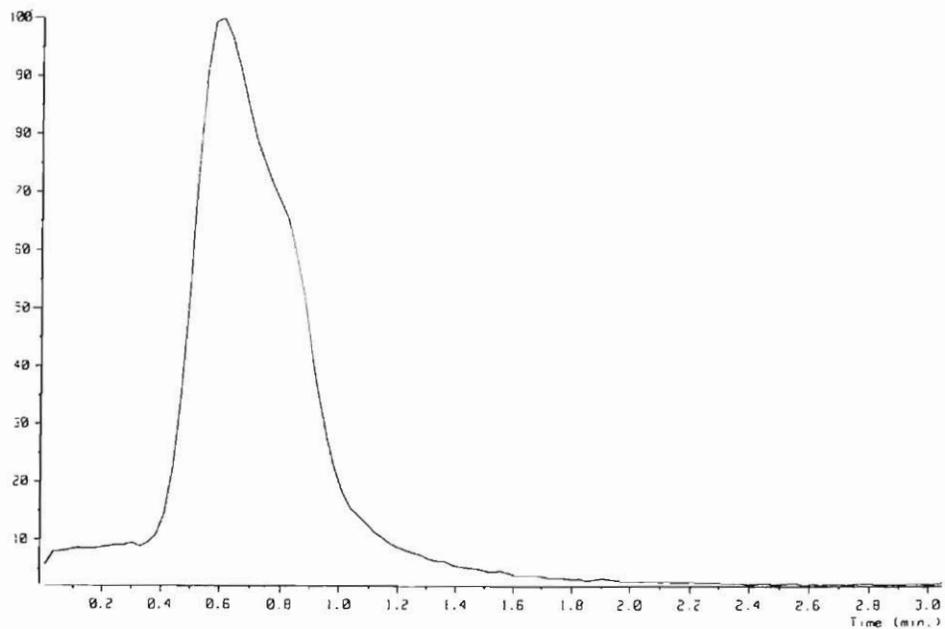
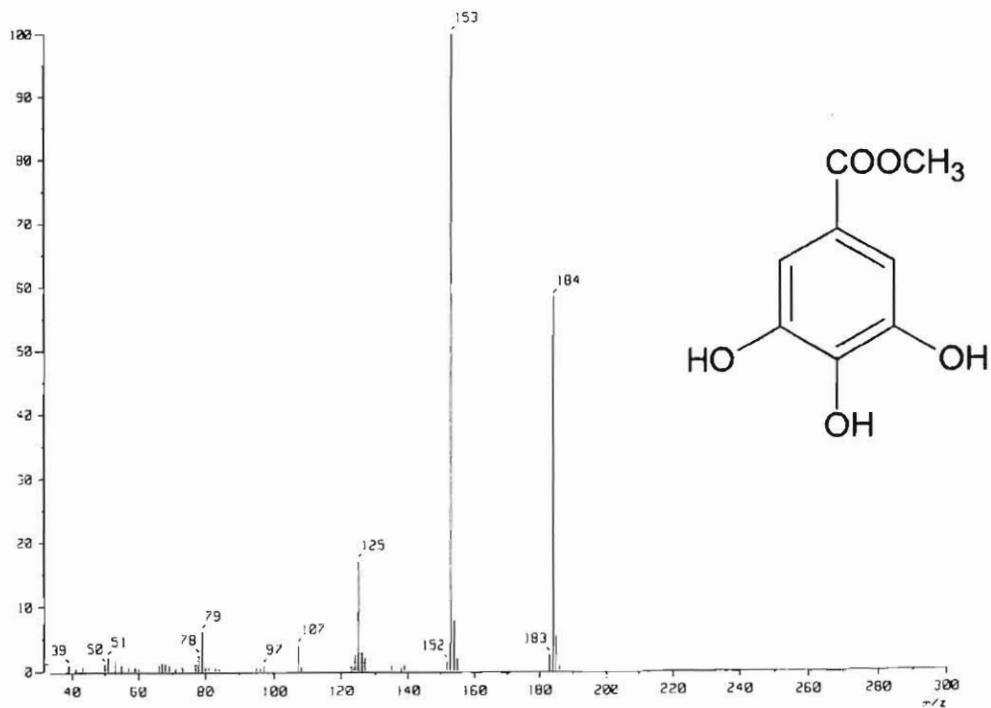
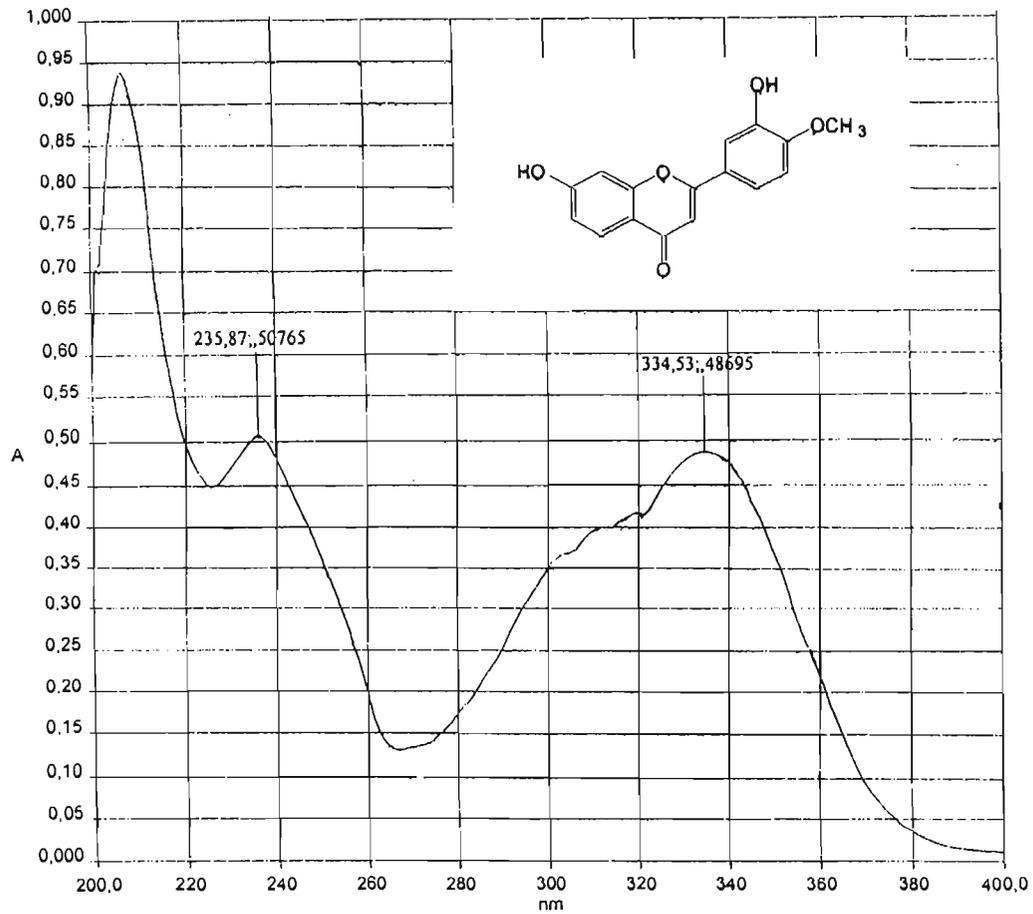


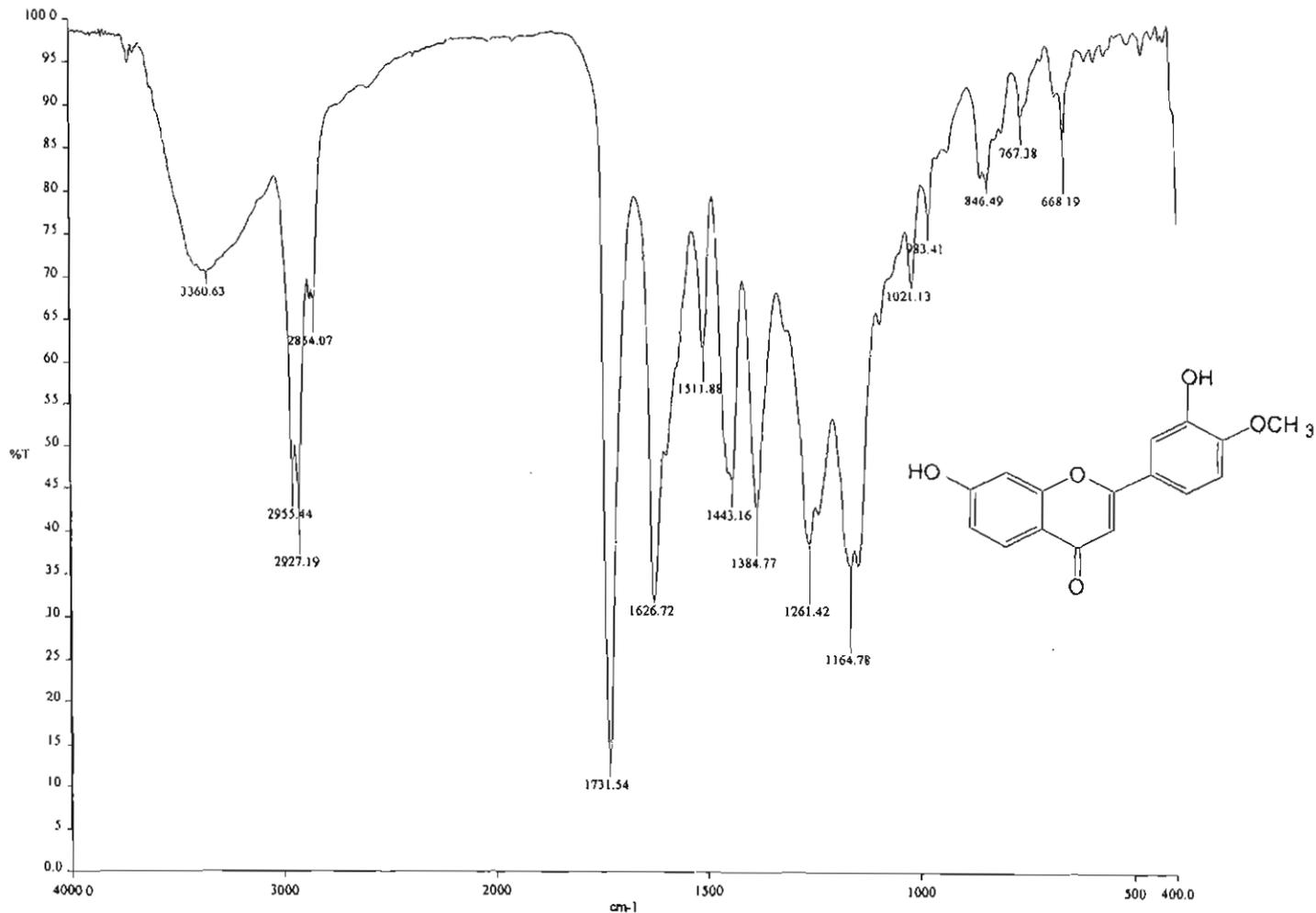
Figura 3. Cromatograma de gases del galato de metilo (22)



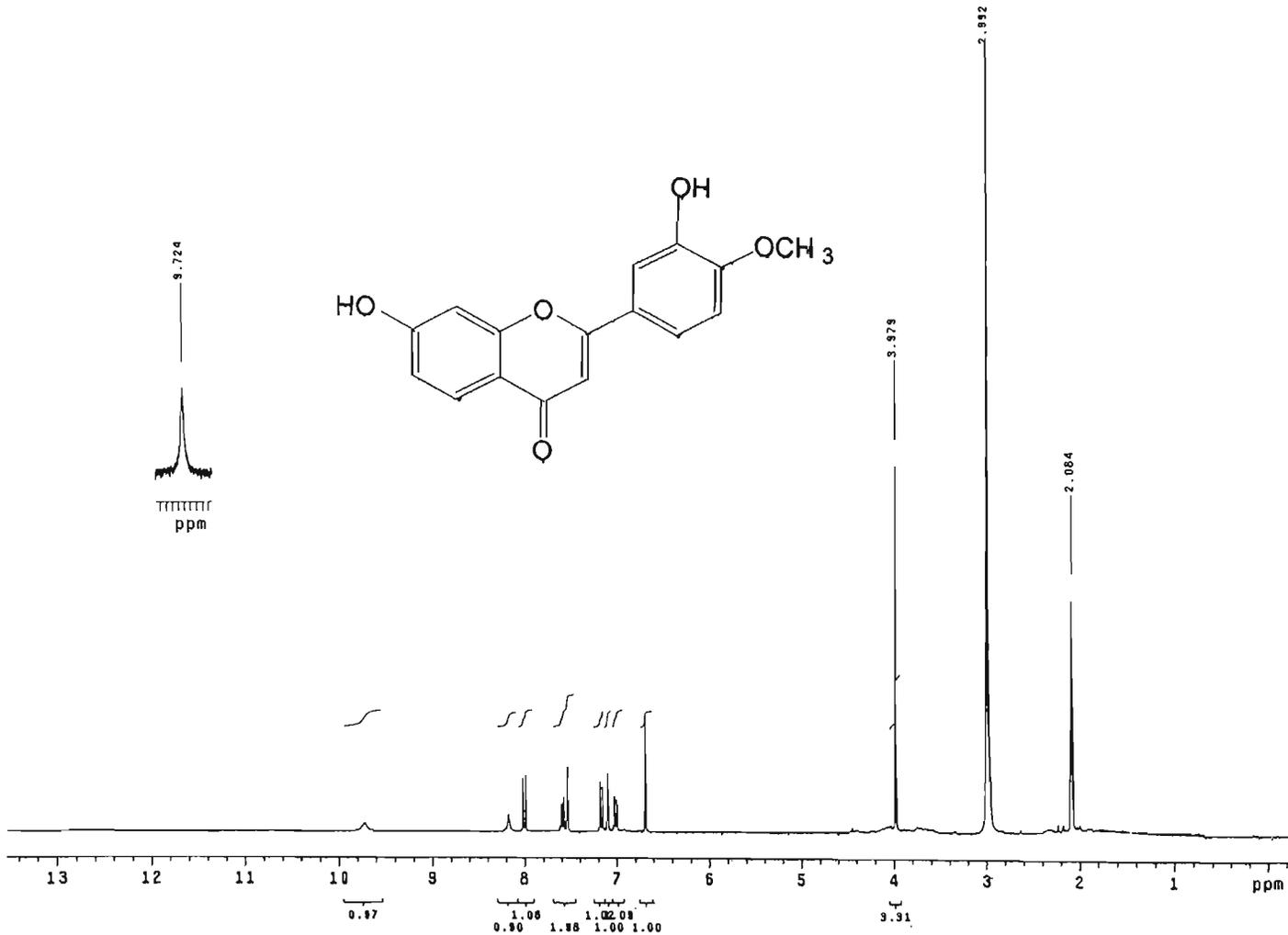
Espectro 8. Espectro de masas por impacto electrónico del galato de metilo (22)



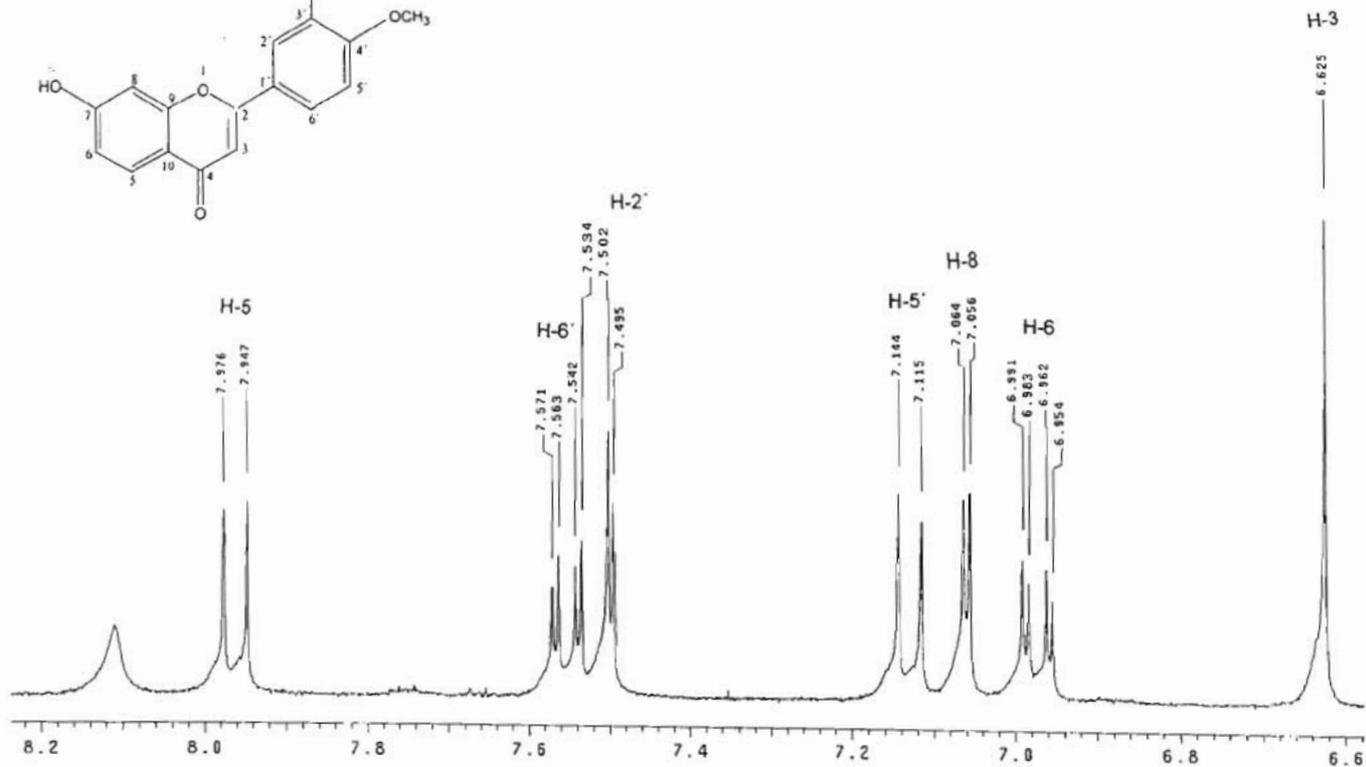
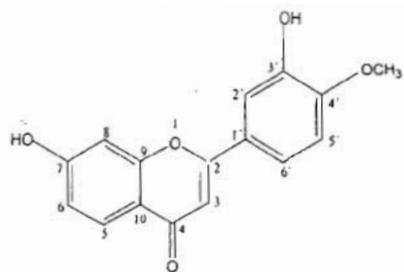
Espectro 9. Espectro de UV del la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34) MeOH



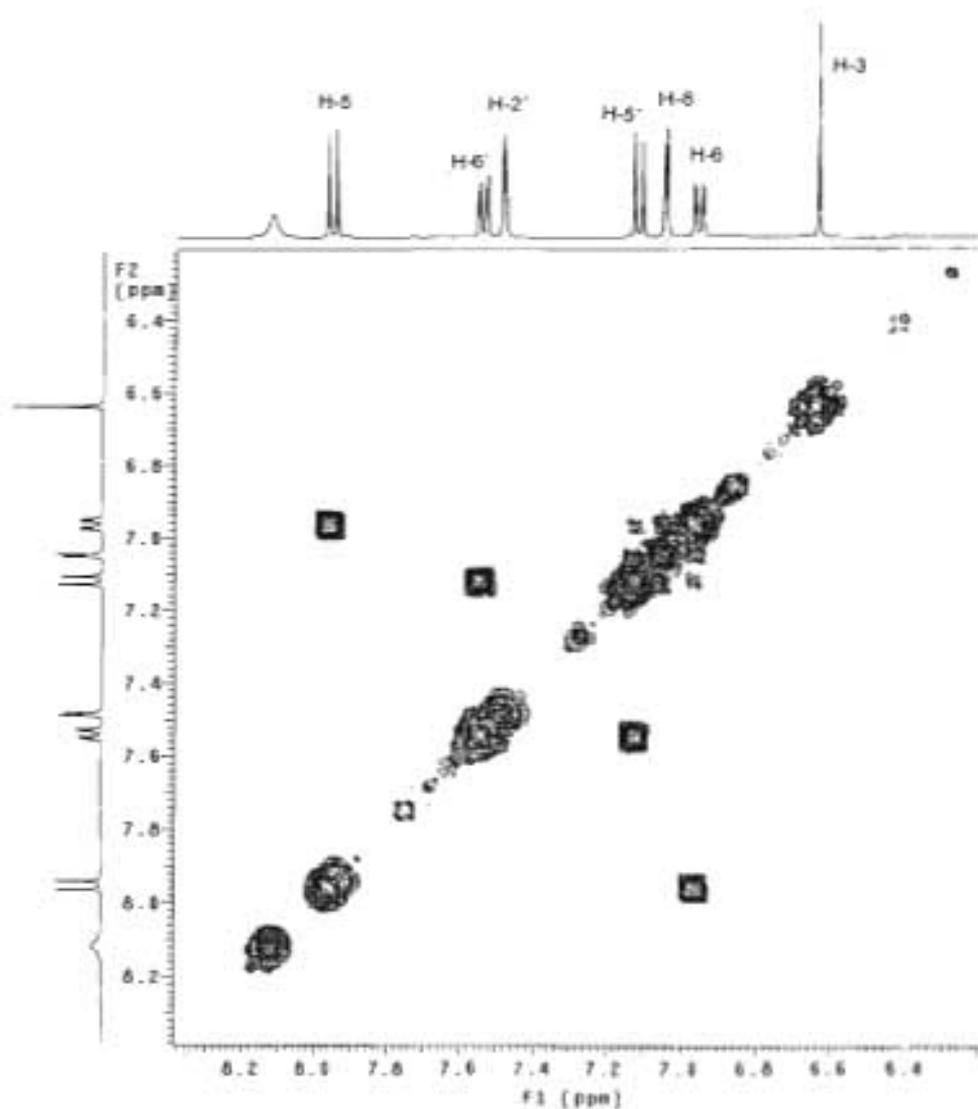
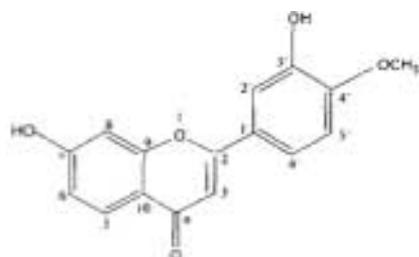
Espectro 10. Espectro de IR de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34)



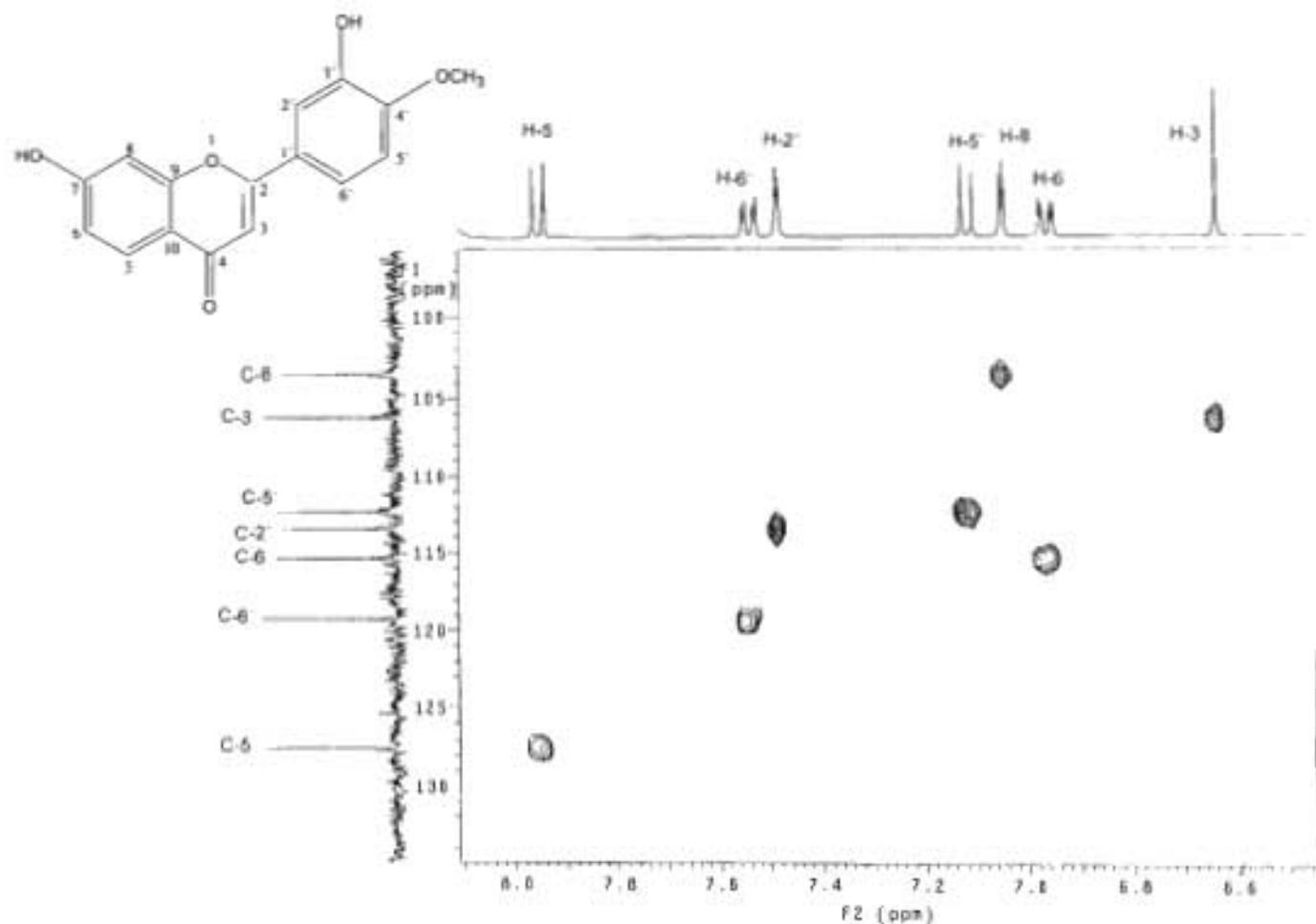
Espectro 11. Espectro de RMN<sup>1</sup>H de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34) Acetona d<sub>6</sub>



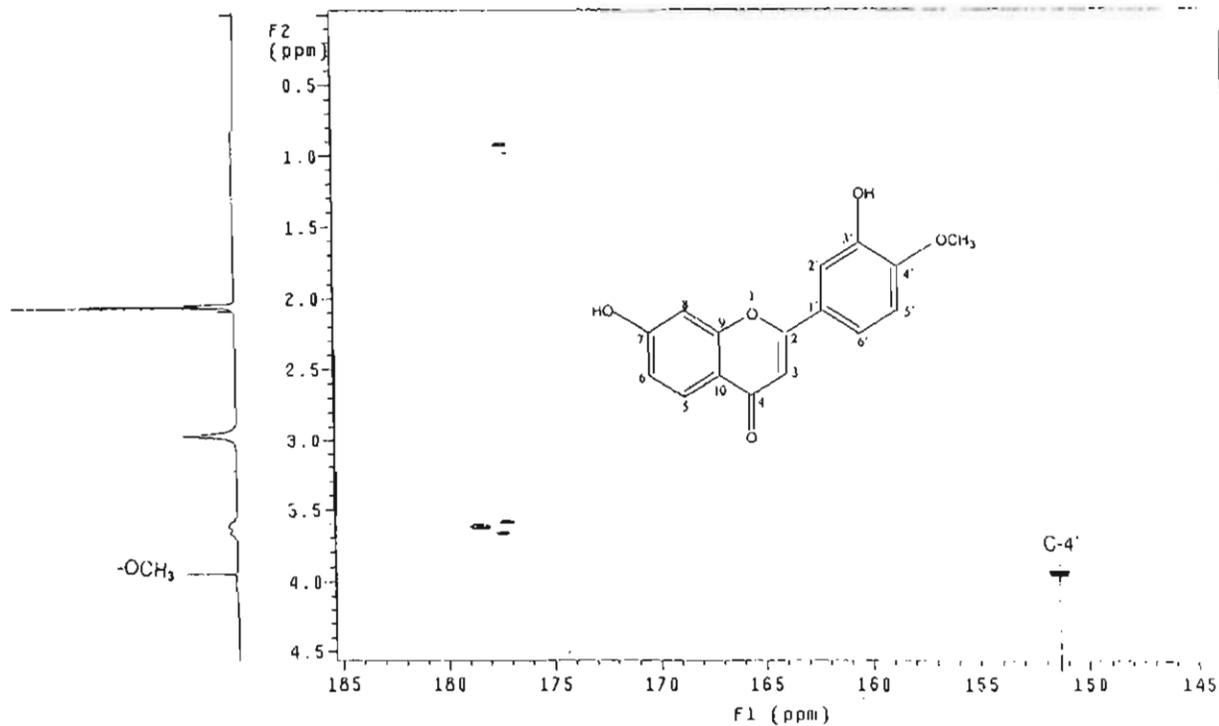
Espectro 11. Espectro de RMN<sup>1</sup>H de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34) Acetona d<sub>6</sub>



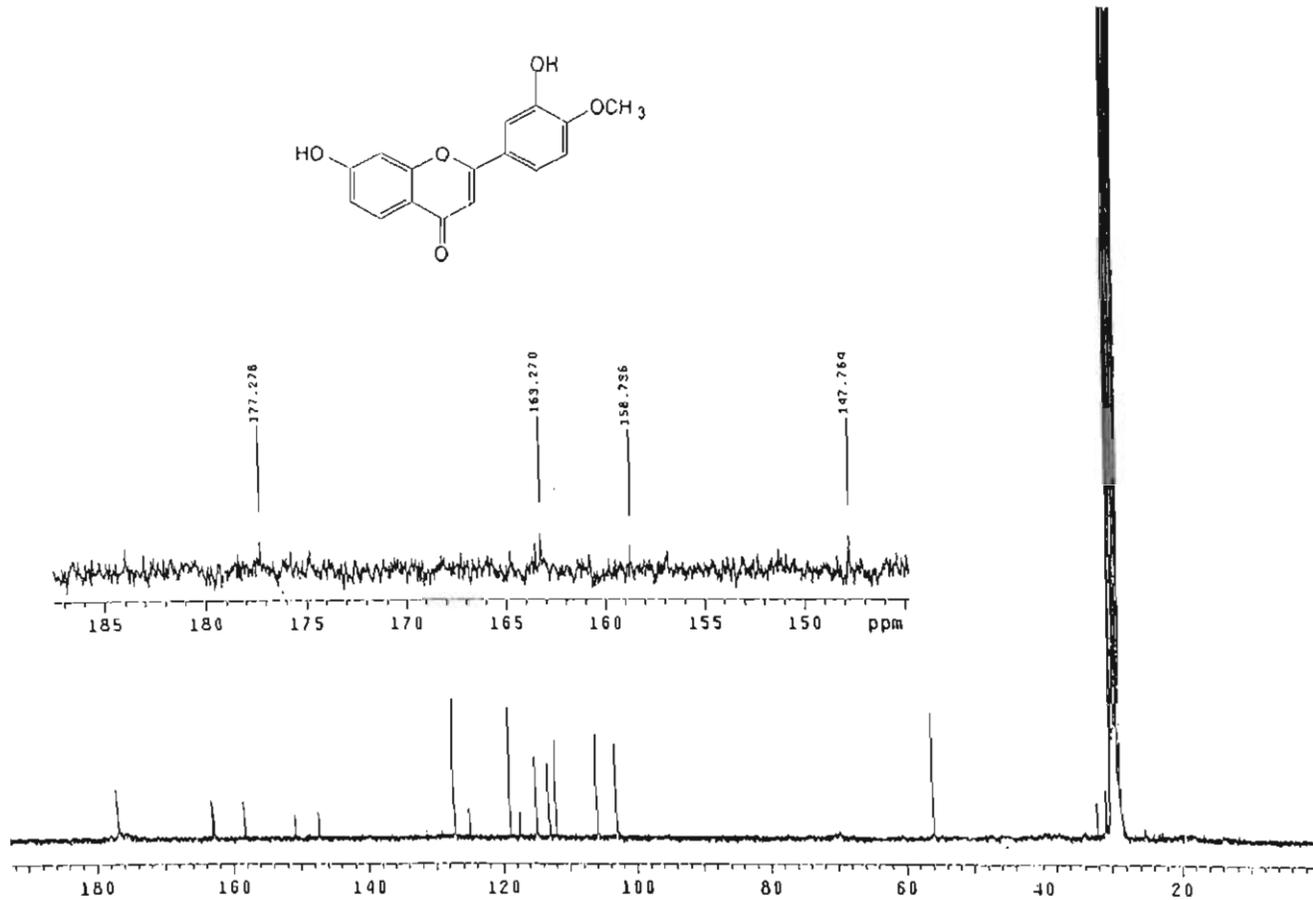
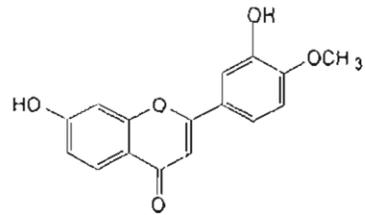
Espectro 12. Espectro en modalidad COSY de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34)



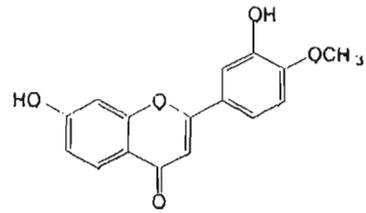
Espectro 13. Espectro en modalidad HSQC de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34)



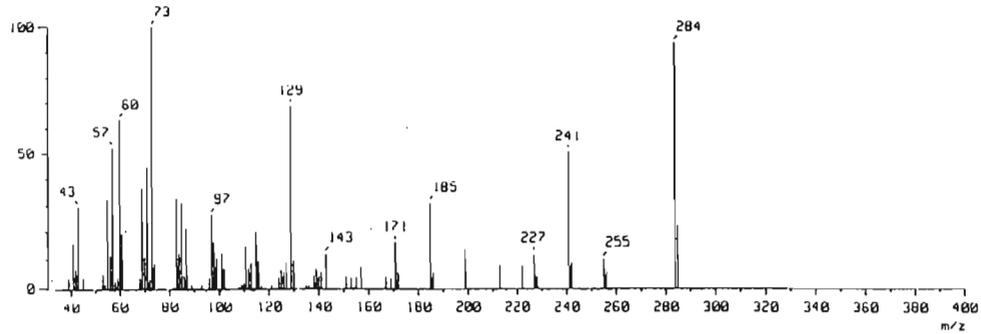
Espectro 13. Espectro en modalidad HSQC de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34)



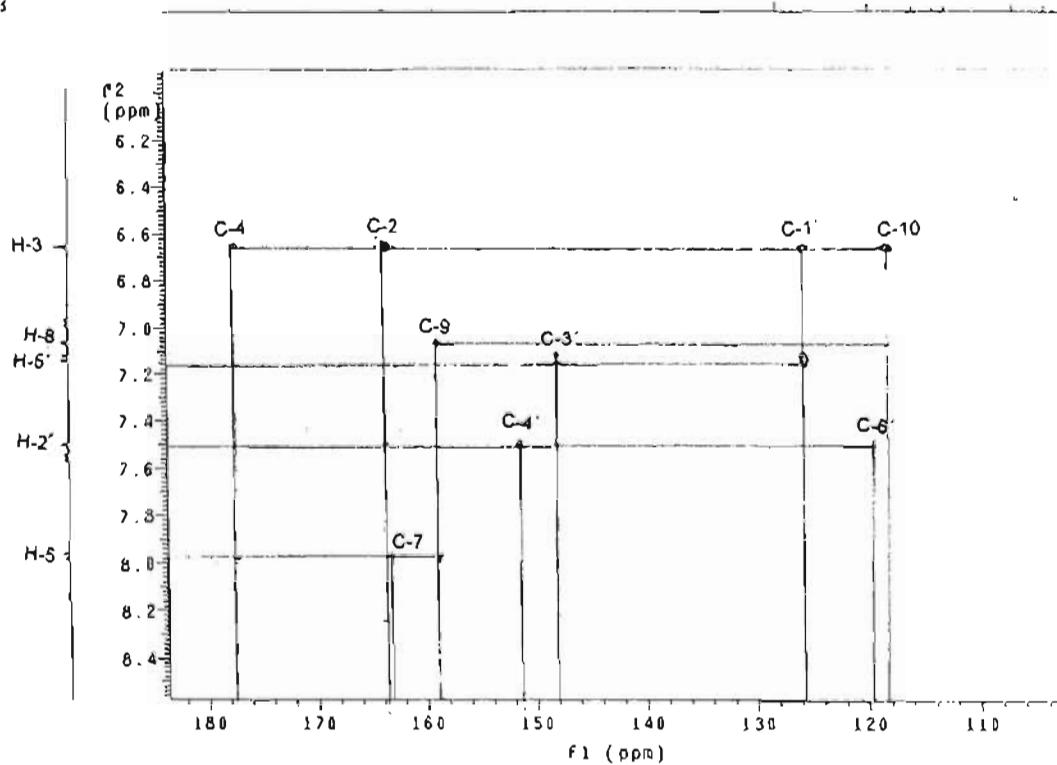
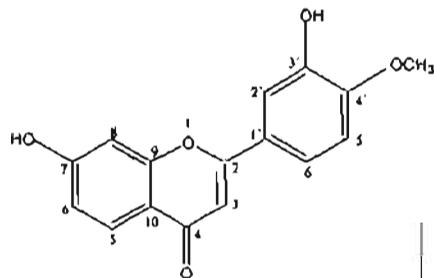
Espectro 14. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$  de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34)



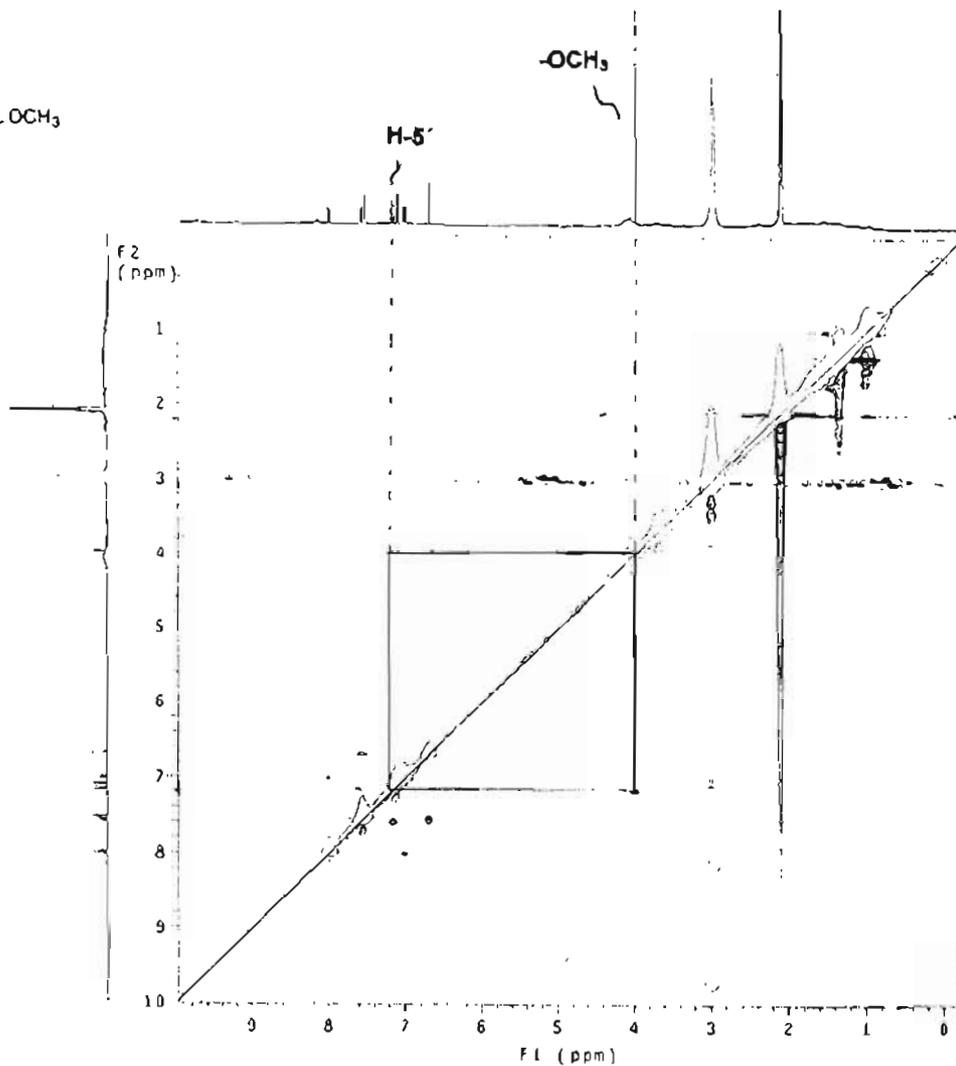
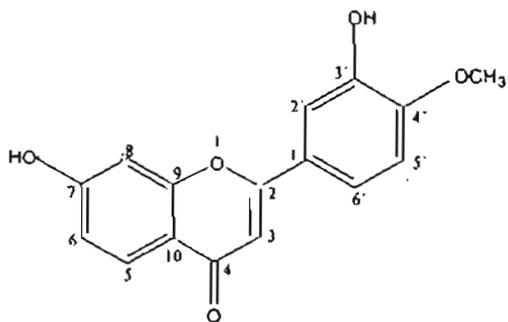
7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona



Espectro 15. Espectro de masas por impacto electrónico de la 7,3'-dihidroxi-4'- metoxiflavona (34)

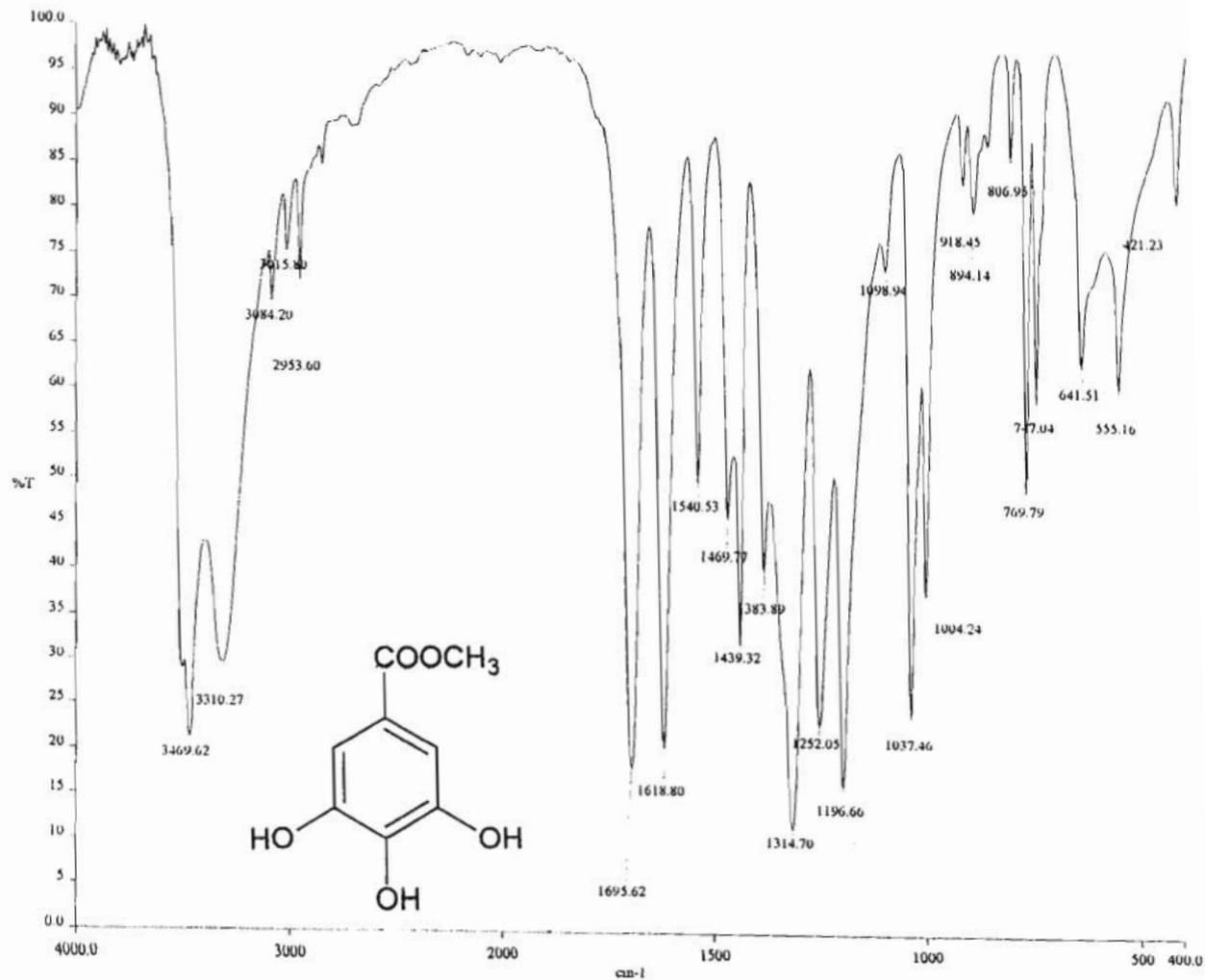


Espectro 18. Espectro en modalidad HMBC de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34)

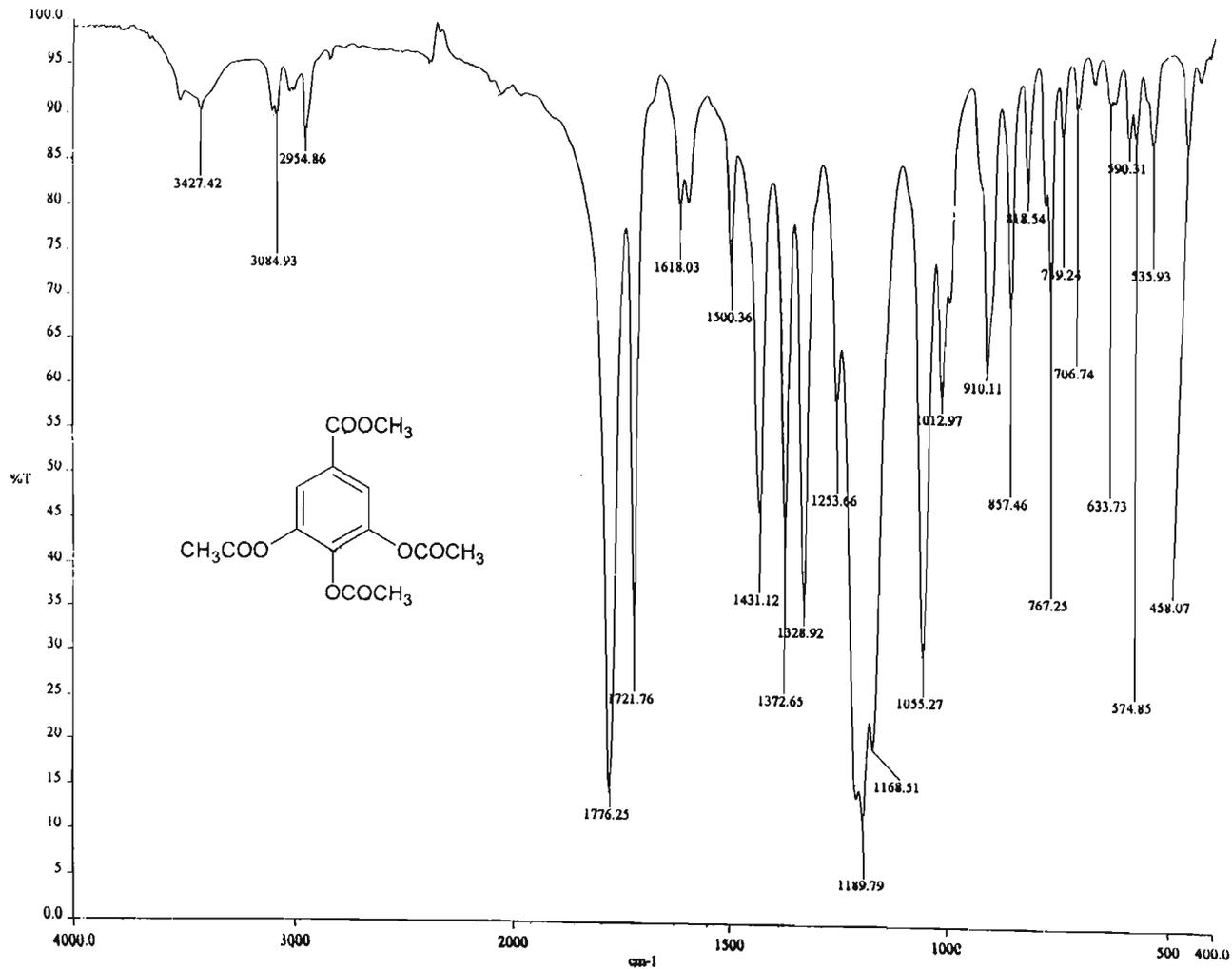


Espectro 17. Espectro en modalidad NOESY de la 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona (34)

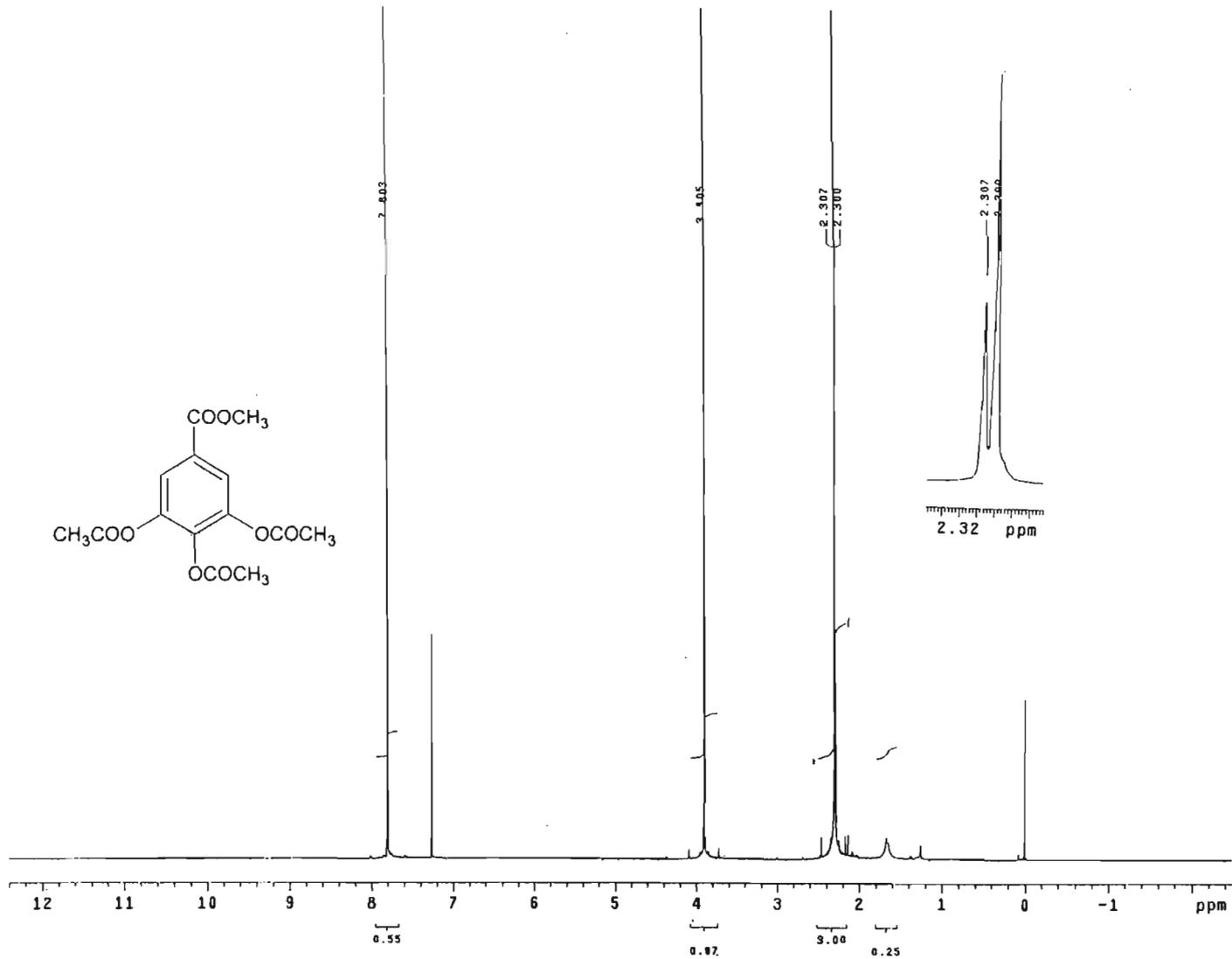
SALIR ESTE TESIS NO DEBE  
 DE LA BIBLIOTECA

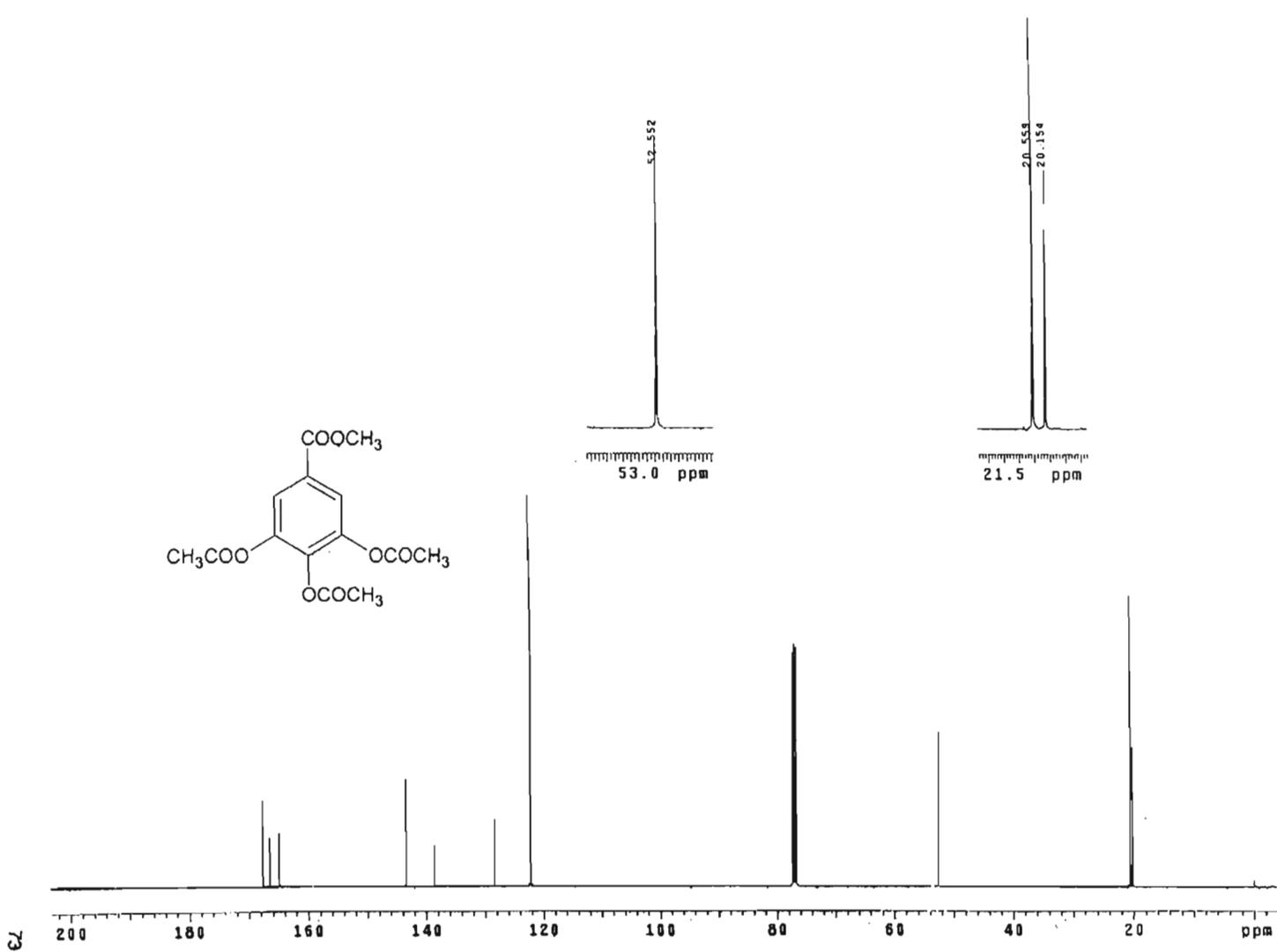


Spectro 18. Espectro de IR de la interfase antes de ser acetilada

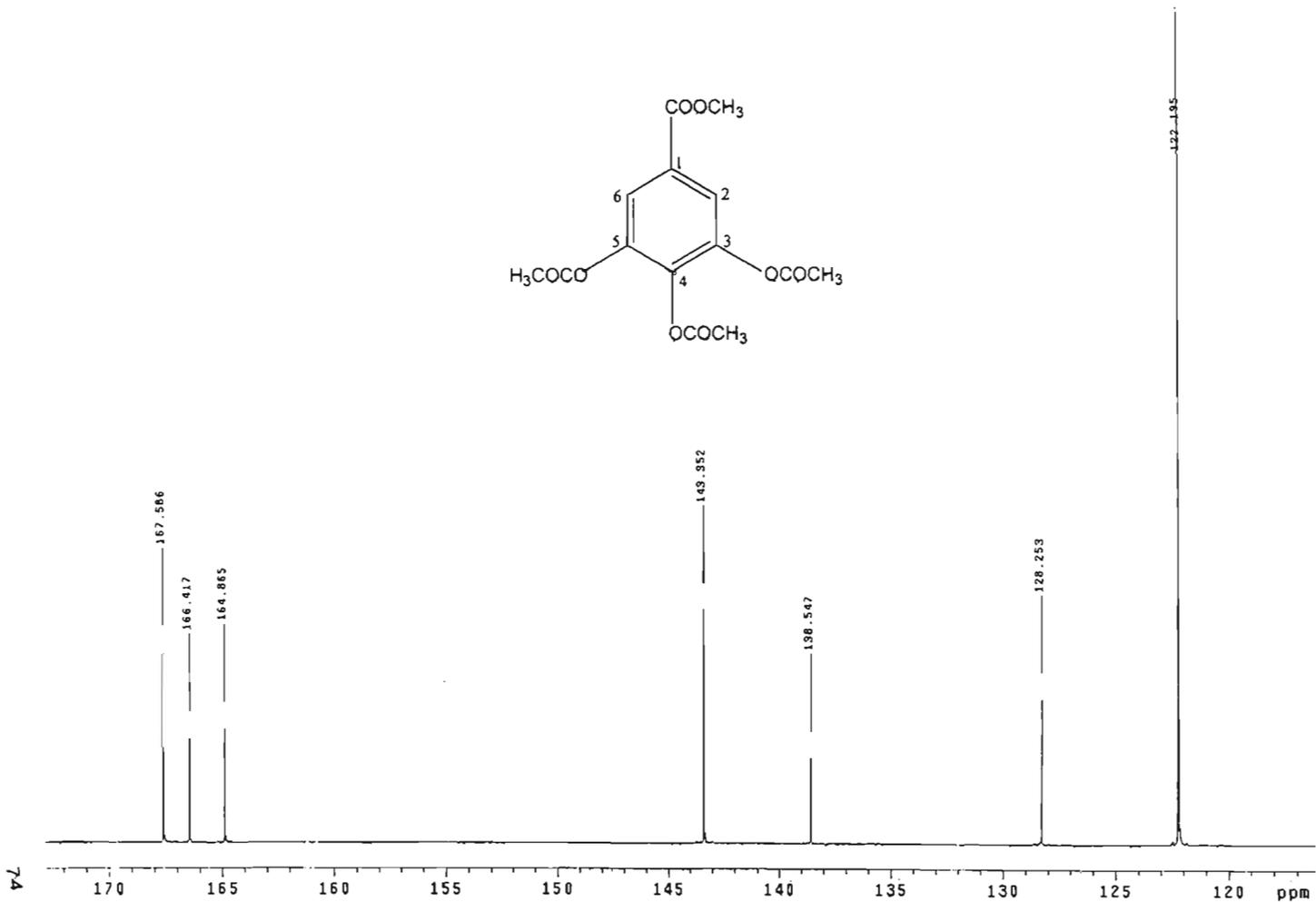
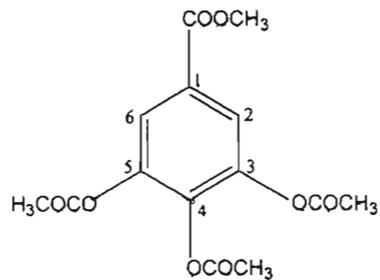


Espectro 19. Espectro de IR del tri-O-acetilgalato de metilo (44)

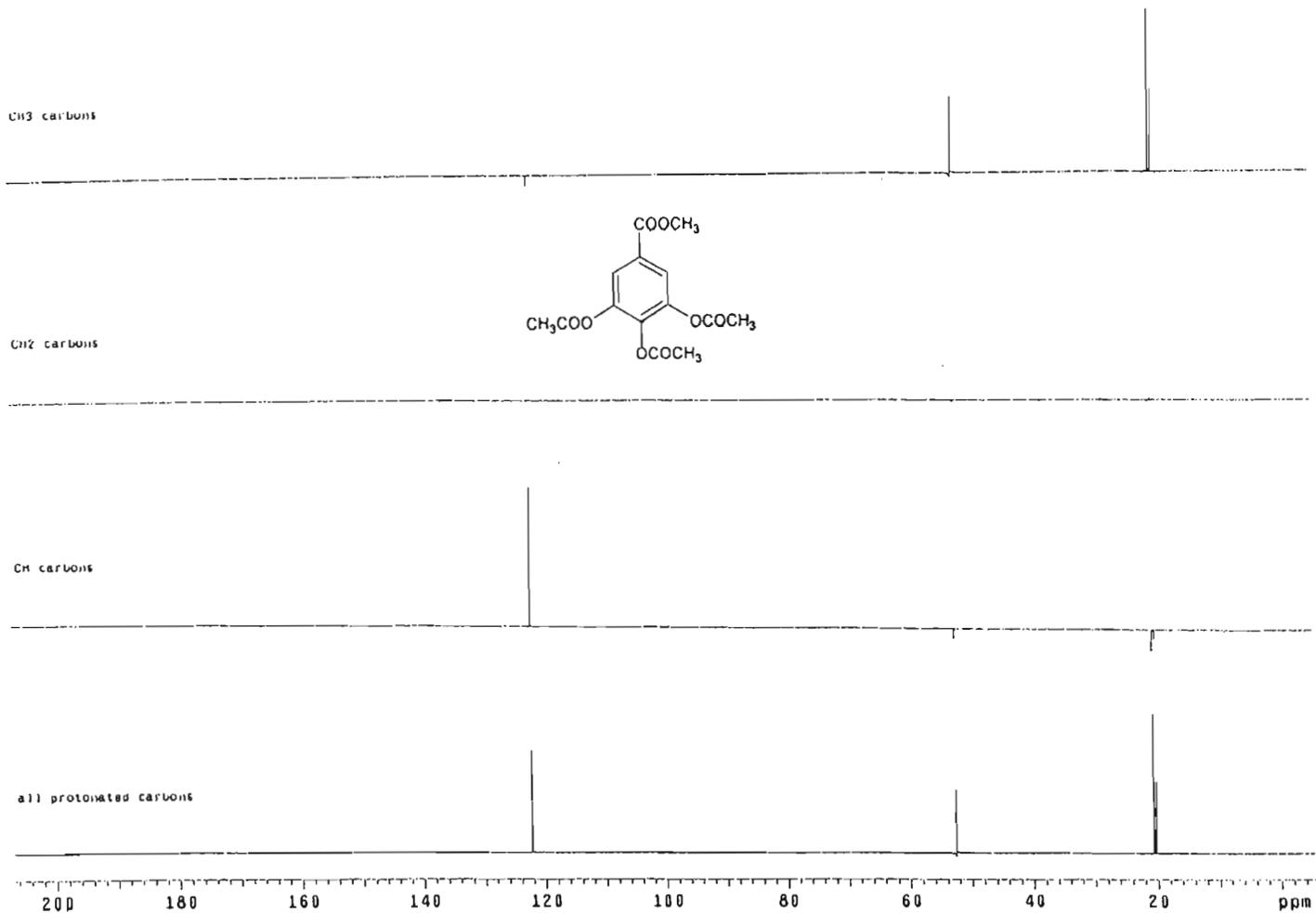
Espectro 20. Espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  del tri-O-acetilgalato de metilo- $\text{CDCl}_3$  (44)



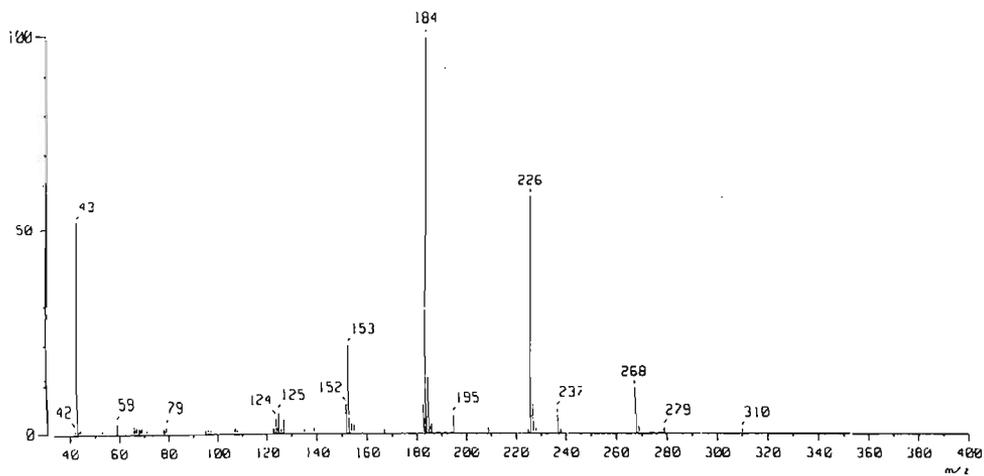
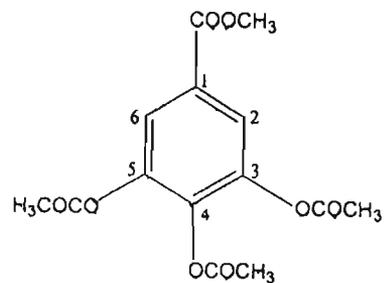
Espectro 21. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$  del tri-O-acetilgalato de metilo - $\text{CDCl}_3$  (44)



Espectro 21. Espectro de RMN<sup>13</sup>C del tri-O-acetilgalato de metilo -CDCl<sub>3</sub> (44)



Espectro 22. Espectro en modalidad DEPT del tri-O-acetilgalato de metilo (44)



Espectro 23. Espectro de masas por impacto electrónico del tri-O-acetilgalato de metilo (44)