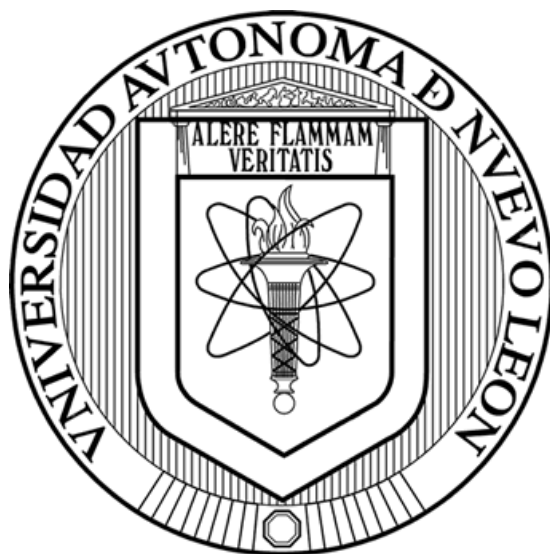


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



OBTENCIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD
CONTRA *Mycobacterium tuberculosis* A PARTIR DE
Leucophyllum frutescens

POR

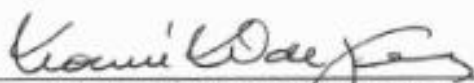
M. C. Blanca Alicia Alanís Garza

Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en
Química Biomédica

Mayo 2011

**"Obtención de nuevos compuestos con actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*
a partir de *Leucophyllum frutescens*"**

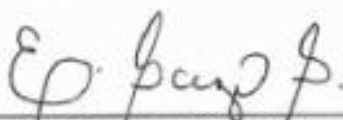
Aprobación de la Tesis:



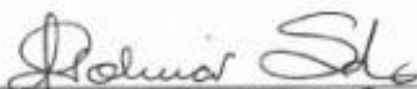
Dr. C. Noemi H. Waksman de Torres
Director de Tesis



Dr. C. Ricardo Salazar Aranda
Miembro de la Comisión



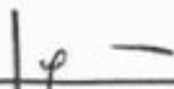
Dr. C. Elvira Garza González
Miembro de la Comisión



Dr. C. Gloria María Molina Salinas
Miembro de la Comisión



Dr. C. Rosalba Ramírez Durón
Miembro de la Comisión



Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado

OBTENCIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD
CONTRA *Mycobacterium tuberculosis* A PARTIR DE
Leucophyllum frutescens

Presentado por:

M. C. Blanca Alicia Alanís Garza

El presente trabajo se realizó en el departamento de
Química Analítica de la Facultad de Medicina de la
Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de
la Dra. Noemí Waksman de Torres.

FIRMA

DIRECTOR


DRA. NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES

“Donde quiera que le lleve su camino,
el alumno puede perder de vista a su maestro,
pero no olvidarlo”

Anónimo

DEDICATORIA

Es mi deseo, como sencillo gesto de agradecimiento, dedicar mi humilde obra de Trabajo de Grado plasmada en el presente informe a:

Mis padres

Ing. Homero Alanís Hinojosa (†) y Blanca Esthela Garza González

Mi marido

Mi hermana, cuñado, ahijada y sobrinos

A todos los docentes que me acompañaron durante este largo camino, brindándome siempre su orientación y apoyo con profesionalismo ético en la adquisición de conocimientos y afianzando mi formación como profesionista.

Y muy especialmente a ese Angelito que Dios puso a mi cuidado desde hace un año, mi hija

Andrea Valladares Alanís

AGRADECIMIENTOS

Si bien esta tesis doctoral ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por parte de la autora y su directora de tesis, no hubiese sido posible llegar a su finalización sin la cooperación desinteresada de muchas personas y algunas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en momentos difíciles.

Doy gracias a Dios, por permitirme llegar hasta aquí y por demostrarme tantas veces su existencia.

Por haberme abrigado en el programa doctoral y sus instalaciones para la realización de este proyecto, gracias a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Agradezco al departamento de Química Analítica, que permanentemente gestiona el enriquecimiento y crecimiento académico de alumnos de la facultad de Medicina de la U. A. N. L., el permitirme formar parte de él.

A CONACYT por la beca de doctorado otorgada por tres años.

A mi comisión de tesis, quienes me apoyaron activamente en la búsqueda de solución a las dificultades y sobre todo me dieron aliento, espacio y recursos para llevar adelante este trabajo y concluirlo.

Mi más sincero agradecimiento para la directora de tesis, *Dra. Noemí Waksman de Torres*, por creer en mí y permitirme el honor de aprender, convivir y trabajar con ella.

Deseo agradecer, por su constante seguimiento y paciente asistencia compartiendo su tiempo de manera generosa durante el desarrollo del presente trabajo, al *Dr. Ricardo Salazar Aranda*.

Agradezco profundamente a la *Dra. Elvira Garza González* el haberme permitido trabajar con ella y conocerla, así como el compartir conmigo parte de sus conocimientos y experiencias en cuanto al trabajo con tuberculosis.

Por sus aportaciones y asesoría en el desarrollo de este trabajo, así como por la revisión de este escrito, gracias a las *Dra. Rosalba Ramírez Durón* y *Dra. Gloria Ma. Molina Salinas*.

Gracias al *Dr. Jonathan Pérez Meseguer* por facilitarme los compuestos semi-sintéticos, fruto de muchas horas de trabajo en el laboratorio.

A la técnica *Juanne Carrera*, muchas gracias niña, sin tu apoyo no hubiera podido concluir este trabajo.

Con estimación y respeto agradezco a *Gloria Martínez, Martha García, Vero Camarillo*, las secretas de Química analítica, por su apoyo diario.

Al personal del centro regional de control de enfermedades infecciosas por todo su apoyo para la capacitación y desarrollo de los ensayos con *M. tuberculosis*.

Desde luego pude llegar al final de este proyecto gracias al apoyo que me brindó y al amor que me inspiró mi familia, a ellos debo en parte el haber logrado llegar hasta este punto en mi vida. Gracias a mi *padre*, porque sé que siempre estuvo aquí tomando mi mano, a mi *madre* porque sin escatimar esfuerzo alguno sacrificó gran parte de su vida para formarme y educarme.

Por brindarme todo su apoyo e infinita paciencia para que continuara con mi superación profesional y personal... gracias a mi *marido*. Por permitirme ser parte de su familia y de su tiempo.

Gracias a *Andrea Valladares*, *mi muñe* por ceder su tiempo para que “mamá estudie” y saque adelante este proyecto. Muñe, el futuro es solo una promesa, pon tu fé en el presente, pero nunca dejes de soñar, los sueños ponen más valor en el corazón.

A mis Tíos, *Irene y Omar*, *Yola y Oscar* y a mi prima *Jackie*, por acortar las distancias para estar siempre cerca de mí y de mi familia.

Por los gratos momento compartidos y el apoyo moral, agradezco a mis amigas *Karina Tijerina*, *Laura Elizondo*, *Graciela* y *Elvira Zertuche*.

Por ser un buen amigo entre tantos compañeros, compartir sus experiencias y aligerar el trabajo diario agradezco al *Dr. Luis Alejandro Pérez*.

RESUMEN

Blanca Alicia Alanís Garza

Fecha de Graduación: Mayo del 2011

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título de Estudio: Obtención de nuevos compuestos con actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* a partir de *Leucopyllum frutescens*.


Número de páginas: 108

Candidata para el grado de Doctor en Ciencias
con Especialidad en Química Biomédica.

Área de Estudio: Química Biomédica

Propósito y método de estudio: Debido a que no se han agregado nuevos medicamentos a los tratamientos de primera línea para Tb en más de 30 años y a la emergencia de casos de Tb-MDR, surge la necesidad de buscar nuevos fármacos. En el año 2004, se aisló el leubetanol del extracto hexánico de la corteza de la raíz de *Leucopyllum frutescens*, el cual presentó actividad anti-Tb interesante, sin embargo resultó tóxico en el ensayo de *Artemia salina*. Se optimizaron las reacciones para obtener dos derivados del leubetanol. Se sustituyó el protón fenólico por un metilo y por otro lado se generó la formación del epóxido en la cadena alifática. Se aisló el compuesto responsable de la actividad anti-Tb de una de las fracciones minoritarias de la VLC. Para la purificación del compuesto se emplearon ELL, VLC, cromatografía gravitacional de sílica gel, cromatografía de baja presión FR y HPLC-Preparativo guiando el fraccionamiento mediante MABA. La elucidación estructural se realizó con experimentos de 1D y 2D de RMN. A los compuestos puros aislados y semi-sintéticos, así como 26 derivados más del leubetanol, se les determinó la CMI frente a la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* y la CI₅₀ frente a las líneas celulares vero y HeLa.

Conclusiones y contribuciones: El fraccionamiento biodirigido de una de las fracciones activas del extracto hexánico de la corteza de raíz de *L. frutescens*, condujo al aislamiento y caracterización de un lignano de tipo dimetoxisesamina con actividad anti-Tb (CMI 63 µg/mL), el cual se identificó como 2',5"-dimetoxisesamina, no se encontró reporte de este compuesto en la literatura. No se potenció la actividad anti-Tb del compuesto líder, con ninguno de los 28 derivados del leubetanol, sin embargo se incrementó considerablemente el Índice de Selectividad (IS).



Dra. Noemi Waksman de Torres
Director de tesis

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	Página
I. Introducción	1
1.1 Origen de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
1.2 Transmisión de la Tuberculosis	1
1.3 Epidemiología de la Tuberculosis	2
1.4 Farmacoterapia para la Tb	6
1.5 Las plantas como fuente de nuevos agentes terapéuticos	7
II. Antecedentes	10
2.1 Antecedentes directos	10
2.2 Justificación	14
2.3 Objetivos	15
2.3.1 Objetivo general	15
2.3.2 Objetivos específicos	15
III. Material y Métodos	16
3.1 Material, reactivos y equipos	16
3.1.1 Material biológico	16
3.1.2 Material	16
3.1.3 Reactivos y solventes	18
3.1.4 Estándares	20
3.1.5 Equipos	20

3.2 Metodología	22
3.2.1 Identificación de la localidad con mayor cantidad de serrulatano	22
3.2.1.1 Recolección de material vegetal	22
3.2.1.2 Preparación del extracto metanólico	22
3.2.1.3 Obtención de la fracción hexánica	23
3.2.1.4 Confirmación de la presencia y semicuantificación de los serrulatanos en las cuatro muestras.	23
3.2.1.5 Obtención de la fracción hexánica a gran escala	24
3.2.1.6 Aislamiento de los serrulatanos	24
3.2.1.6.1 Cromatografía de Líquidos al Vacío (VLC)	24
3.2.1.6.1.1 Confirmación de la presencia de los serrulatanos.	25
3.2.1.6.2 Cromatografía de baja presión fase reversa (FR)	25
3.2.1.6.3 Aislamiento del serrulatano 1	26
3.2.1.6.4 Aislamiento del serrulatano 2	26
3.2.1.6.5 Purificación de los serrulatanos	26
3.2.1.7 Confirmación de la estructura de los serrulatanos por Resonancia Magnética Nuclear	27
3.2.1.8 Determinación del Poder Rotatorio	27
3.2.2 Modificación estructural del serrulatano	28
3.2.2.1 Formación del epóxido	28
3.2.2.1.1 Seguimiento de la reacción	28
3.2.2.1.2 Purificación del epóxido	29
3.2.2.2 Metilación del OH fenólico	29
3.2.2.2.1 Purificación del compuesto metilado	29
3.2.3 Actividad anti-Tb	30
3.2.3.1 Preparación de los compuestos o fracciones	30

3.2.3.2 Cepa micobacteriana y condiciones de crecimiento	30
3.2.3.3 Suspensión de trabajo	30
3.2.3.4 Micro-método de Alamar Azul	31
3.2.3.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	32
3.2.4 Aislamiento de otros compuestos con actividad anti-Tb de la fracción hexánica de <i>L. frutescens</i>	32
3.2.4.1 Sistema de CLAR	32
3.2.4.2 Cromatografía gravitacional con sílica gel	32
3.2.4.2.1 Monitoreo de fracciones obtenidas en la cromatografía gravitacional de sílica gel	33
3.2.4.3 Cromatografía de baja presión	34
3.2.4.3.1 Monitoreo de las fracciones obtenidas con columna de baja presión	34
3.2.4.4 CLAR-Preparativa	34
3.2.4.4.2 Elucidación estructural del compuesto	35
3.2.4.5 Actividad anti-Tb y determinación de la CMI	35
3.2.5 Actividad citotóxica	35
3.2.5.1 Conservación de las células vivas	35
3.2.5.2 Preparación de compuestos a evaluar	36
3.2.5.3 Ensayo	36
3.2.5.3.1 Suspensión celular	36
3.2.5.3.2 Conteo celular	36
3.2.5.3.3 Metodología del ensayo de citotoxicidad	37
3.2.5.3.4 Determinación de la concentración Inhibitoria del 50% (CI ₅₀)	37
3.2.6 Determinación del índice de selectividad (IS)	37
IV. Resultados	38

4.1 Obtención de los serrulatanos	38
4.1.1 Material vegetal	38
4.1.2 Confirmación de la presencia y semi-cuantificación de los serrulatanos en las muestras colectadas en cuatro diferentes regiones de Nuevo León	38
4.1.3 Obtención del extracto metanólico de raíz de <i>L. frutescens</i>	41
4.1.4 Aislamiento y purificación de los serrulatanos	41
4.1.4.1 Cromatografía de Líquidos al Vacío (VLC)	41
4.1.4.2 Cromatografía de baja presión	42
4.1.4.3 Aislamiento de los serrulatanos	42
4.1.4.4 Purificación de los serrulatanos	43
4.1.4.4.1 Confirmación de la estructura de los Serrulatanos por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	44
4.1.4.4.1.2 Determinación del poder Rotatorio	48
4.2 Obtención de derivados del leubetanol	49
4.2.1 Bloqueo del OH fenólico	49
4.2.2 Formación del epóxido	50
4.2.3 Otros derivados del leubetanol	52
4.2.4 Determinación de la actividad anti-Tb y CMI de los derivados	57
4.2.5 Determinación de la citotoxicidad de los derivados	58
4.3 Aislamiento y purificación de un compuesto, con actividad anti-Tb, partiendo de las fracciones minoritarias de la VLC	62
4.3.1 Sistema óptimo para el monitoreo de los compuestos de interés	62
4.3.2 Análisis de la fracción VLC (3:1)	63
4.3.3 Aislamiento biodirigido de compuestos activos a partir	63

de la fracción VLC (3:1)	
4.3.3.1 Cromatografía en columna gravitacional	63
4.3.3.1.1 Determinación de la actividad anti-Tb y CMI de las fracciones obtenidas de la columna gravitacional	64
4.3.3.1.2 Determinación de la composición de las fracciones que presentaron CMI <125 µg/mL por CLAR	65
4.3.3.2 Cromatografía lobar	68
4.3.3.3 Purificación mediante CLAR-Preparativa	69
4.4 Elucidación estructural del compuesto aislado de la fracción 3:1(6)	70
4.5 Actividad anti-Tb del compuesto aislado de la fracción 3:1(6)	79
4.6 Actividad citotóxica del compuesto aislado de la fracción 3:1(6)	79
 V. Discusión	 80
5.1 Obtención de los serrulatanos a gran escala	82
5.2 Derivados del leubetanol	86
5.3 Actividad biológica de los derivados del leubetanol	87
5.4 Aislamiento biodirigido de fracciones minoritarias de <i>L. frutescens</i> .	92
 VI. Conclusiones y perspectivas	 100
6.1 Conclusiones	100
6.2 Perspectivas	102

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Estructura planar del compuesto aislado de <i>L. frutescens</i> por Molina-Salinas.	12
2	Cromatograma de la fracción hexánica de la corteza de raíz de <i>L. frutescens</i> colectado en la carretera a Saltillo, Coah. Km 55.	39
3	Cromatograma de la fracción hexánica de la corteza de raíz de <i>L. frutescens</i> colectado en Villaldama, N.L.	39
4	Cromatograma de la fracción hexánica de la corteza de raíz de <i>L. frutescens</i> colectado en Ex-hacienda, Zuazua, N.L.	40
5	Cromatograma de la fracción hexánica de la corteza de raíz de <i>L. frutescens</i> colectado en Agualeguas, N.L.	40
6	Cromatograma de la fracción 20:1 de la VLC bajo las condiciones descritas en el apartado 3.2.1.6.1.1.	41
7	Cromatograma de la fracción obtenida mediante la FR-C18 bajo las condiciones descritas en el apartado 3.2.1.6.1.1.	42
8	Cromatograma de la fracción obtenida mediante una segunda FR-C18 bajo las condiciones descritas en el apartado 3.2.1.6.1.1.	43
9	Cromatograma del serrulatano, obtenido bajo las condiciones redactadas en el apartado 3.2.1.6.1.1 y su correspondiente espectro de absorción en UV.	44
10	Espectro de ^1H -RMN del serrulatano, aislado de la corteza de raíz de <i>L. frutescens</i> .	45
11	Espectro de ^{13}C -RMN del serrulatano, aislado de la corteza de raíz de <i>L. frutescens</i> .	46
12	Espectro de ^1H -RMN, del producto de reacción de bloqueo de OH fenólico, serrulatano metoxilado.	50

13	Espectro de ^1H -RMN del producto de reacción de la formación del epóxido.	51
14	Espectro de ^{13}C -RMN del producto de reacción de la formación del epóxido.	52
15	Cromatograma de la fracción 3:1 de la VLC con las condiciones descritas en el apartado 3.2.4.1.	63
16	Cromatograma de la fracción 2, de la columna de sílica gel gravitacional, obtenido bajo las condiciones descritas en el apartado 3.2.4.1.	66
17	Cromatograma de la fracción 4, de la columna de sílica gel gravitacional, obtenido bajo las condiciones descritas en el apartado 3.2.4.1	66
18	Cromatograma de la fracción 6, de la columna de sílica gel gravitacional, obtenido bajo las condiciones descritas en el apartado 3.2.4.1.	67
19	Cromatograma de la fracción 7, de la columna de sílica gel gravitacional, obtenido bajo las condiciones descritas en el apartado 3.2.4.1.	67
20	Cromatograma de la fracción 8, de la columna de sílica gel gravitacional, obtenido bajo las condiciones descritas en el apartado 3.2.4.1.	68
21	Cromatograma y espectros, de la fracción con un compuesto casi puro, con las condiciones descritas en el apartado 3.2.4.1.	69
22	Cromatograma y espectro del compuesto puro, obtenido con CLAR-Preparativo, con las condiciones descritas en el apartado 3.2.4.1.	70
23	Espectro de ^1H RMN del compuesto aislado de la fracción 3:1(6) de la corteza de raíz de <i>L. frutescens</i> .	71
24	Espectro de ^{13}C RMN del compuesto aislado de la fracción 3:1(6) de la corteza de raíz de <i>L. frutescens</i> .	71
25	Espectro DEPT 90 del compuesto aislado de la fracción 3:1(6) de la corteza de raíz de <i>L. frutescens</i> .	73

26	Espectro DEPT 135 del compuesto aislado de la fracción 3:1(6) de la corteza de raíz de <i>L. frutescens</i> .	73
27	Espectro HMBC del compuesto aislado de la fracción 3:1(6) de la corteza de raíz de <i>L. frutescens</i> .	74
28	Espectro HMQC del compuesto aislado de la fracción 3:1(6) de la corteza de raíz de <i>L. frutescens</i> .	75
29	Espectro HSQC del compuesto aislado de la fracción 3:1(6) de la corteza de raíz de <i>L. frutescens</i> .	76
30	Espectro NOESY del compuesto aislado de la fracción 3:1(6) de la corteza de raíz de <i>L. frutescens</i> .	77
31	Espectro COSY90 del compuesto aislado de la fracción 3:1(6) de la corteza de raíz de <i>L. frutescens</i> .	78
32	Estructura del leubetanol.	85
33	Estructuras de sesamina (A) y asarinina (b).	98
34	Estructura de 2'5"-dimetoxisesamina.	98

LISTA DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
I	CMI de las fracciones obtenidas por ELL del extracto metanólico de corteza de raíz y hoja de <i>L. frutescens</i> para las cepas M tb-sensible y M tb-MDR.	10
II	CMI de las fracciones obtenidas por VLC de la fracción hexánica de <i>L. frutescens</i> para las cepas M tb-sensible y M tb-MDR.	11
III	CMI de los anti-Tb de primera línea para las cepas M tb-sensible y M tb-MDR.	12
IV	Gradiente de elución apartado 3.2.1.4.	24
V	Gradiente de elución apartado 3.2.1.6.1.1.	25
VI	Gradiente de elución apartado 3.2.4.1.	32
VII	Sistemas de elución evaluados para el apartado 3.2.4.2.1.	33
VIII	Desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN (100.62 MHz); integraciones de ^1H -RMN (400.13 MHz), multiplicidades y constantes de acoplamiento (Hz).	47
IX	Lecturas obtenidas y ángulo de rotación específico para los serrulatanos.	48
X	Derivados semisintéticos del leubetanol, obtenidos por el Dr. Jonathan Pérez Meseguer en la Universidad de Salamanca, España.	53
XI	CMI de los derivados, obtenidos en el departamento de Química Analítica, frente a la cepa sensible H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> .	58
XII	CMI para los derivados, obtenidos por el Dr. Pérez, frente a la cepa sensible H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> .	59

XIII	Actividades biológicas de los derivados semisintéticos frente a la cepa H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> , células Vero e índice de selectividad.	60
XIV	Actividad citotóxica de los derivados, en $\mu\text{g/mL}$, CI_{50} e IS.	61
XV	Porcentajes de recuperación de extractos y fracciones.	62
XVI	Fracciones obtenidas con la columna de sílica gel gravitacional, sus picos mayoritarios y respectivos porcentajes de recuperación.	64
XVII	CMI de las fracciones obtenidas con la columna gravitacional frente a la cepa H37Rv.	65
XVIII	Desplazamiento químico del compuesto aislado de la fracción 3:1(6). ^1H -RMN (400.13 MHz) y ^{13}C -RMN (100.62 MHz) en CDCl_3 , J en Hz y δ en ppm.	72

ABREVIATURAS

%	Por ciento
°C	Grados Celsius
¹³ C	Carbono de masa atómica 13
¹³ C-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
1D	Una dimensión
¹ H	Hidrógeno de masa atómica 1
¹ H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
2D	Dos dimensiones
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Anti-Tb	Actividad anti-tuberculosa
ATCC	Por sus siglas en inglés (American Type Culture Collection)
AU	Por sus siglas en inglés (Absorbance Units)
C18	Octadecilsilano
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CDC	Por sus siglas en inglés (Centers for Disease Control and prevention)
Células/mL	Células por mililitro
CENAVECE	Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades
CI ₅₀	Concentración que reduce la población un 50%
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DMEM	Por sus siglas en inglés (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELL	Extracción Líquido-Líquido

EM	Espectrometría de Masas
FD	Factor de Dilución
FM	Fase Móvil
FR-C18	Fase Reversa de octadecilsilano
g	Gramos
g/mol	Gramos por mol
h	Horas
Hz	Hertz
INH	Isoniazida
IS	Índice de Selectividad
Kg	Kilogramos
M tb-MDR	Cepa de <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> -MDR por sus siglas en inglés (Multidrug-Resistant Tuberculosis)
M tb-XDR	Cepa de <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> -XDR por sus siglas en inglés (Extensively Drug Resistant Tuberculosis)
MABA	Por sus siglas en inglés (Micro Assay Blue Alamar)
MCPB	Por sus siglas en inglés (<i>meta</i> -Chloroperbenzoic Acid)
mg/mL	Miligramos por mililitro
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mL/min	Mililitros por minuto
mM	Milimolar
mm ²	Milímetro cuadrado
mm ³	Milímetro cúbico
mmol	Milimoles
MTBC	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dihidrobromuro de tetrazolio
N. L.	Nuevo León
NCI	Por sus siglas en inglés (National Cancer Institute)
nm	Nanómetros

OADC	Por sus siglas en inglés (Oleic acido, Albumin, Dextrose and Catalase)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PFTE	Politetrafluoroetileno
pH	Concentración de iones hidronio
ppm	Partes por millón
R_f	Factor de retardo
RIF	Rifampicina
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Por sus siglas en inglés (Roswell Park Memorial Institute)
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
Tb	Tuberculosis
Tb-MDR	Por sus siglas en inglés (Multidrug-Resistant Tuberculosis)
Tb-XDR	Por sus siglas en inglés (Extensively Drug Resistant Tuberculosis)
TMS	Tetra Metil Silano
t_R	Tiempo de Retención
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
V/V	Relación Volumen/Volumen
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VLC	Por sus siglas en inglés (Vacuum Liquid Chromatography)
WHO	Por sus siglas en inglés (World Health Organization)
δ	Desplazamiento químico en espectros de RMN, expresado en ppm
μL	Microlitros
μm	Micrómetro

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 El origen de *Mycobacterium tuberculosis*

La Tuberculosis (Tb) es considerada una de las primeras enfermedades humanas de las que se tiene constancia; *Mycobacterium tuberculosis* puede preceder al origen de los primates, incluyendo al *Homo sapiens*. Se estima una antigüedad entre 15,300 a 20,400 años (Daniel TM, 2000).

Las especies estrechamente vinculadas *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti* y *Mycobacterium canetti*, que forman el complejo *M. tuberculosis* (MTBC), son los agentes causales de Tb en humanos y animales; aunque las especies están estrechamente relacionadas desde el punto de vista genético, difieren en sus hospederos y patogenicidad. *M. tuberculosis* y *M. africanum* afectan exclusivamente a los humanos, mientras que *M. bovis* causa enfermedad en un amplio rango de animales domésticos y salvajes, así como en humanos (Abass NA, 2010).

1.2 Transmisión de la Tuberculosis

La Tb se transmite de persona a persona, a través de pequeñas gotas, que miden de 1 a 5 μm de diámetro, que sirven como vehículo para los bacilos de *M. tuberculosis*. Estas gotas se producen cuando una persona infectada con Tb tose y contienen de dos a tres bacilos; son tan pequeñas que la corriente de aire

normalmente presente en cualquier lugar cerrado puede mantenerlas suspendidas por largos períodos de tiempo (Dunlap NE, 2000).

La infección inicial usualmente ocurre en los pulmones, lo que hace al aire la ruta más importante de transmisión y el responsable de la mayoría de los casos de infección, aunque puede afectar diversos órganos, y en la mayoría de los casos es controlada por el sistema inmune.

1.3 Epidemiología de la Tuberculosis

La Tb fue un problema de salud pública predominante en Europa y América durante los siglos XVIII, XIX y XX. Con el advenimiento de la terapia con antibióticos efectivos en la década de los 50 del siglo pasado, la prevalencia de la enfermedad y la investigación de ésta declinó rápidamente. Sin embargo, desde los años 80 resurgió la Tb en el área urbana de países desarrollados así como en países en desarrollo, lo que generó que se haya retomado la investigación de *M. tuberculosis* (Takiff HE, 2007).

La Tb continúa siendo una de las enfermedades con mayor índice de mortalidad en el mundo. *M. tuberculosis*, es responsable de más muertes que cualquier otro organismo infeccioso solo. Las estrategias de control para Tb se basan en la detección de casos y tratamiento con al menos tres diferentes medicamentos por largos periodos de tiempo. Consecuentemente, el desarrollo de resistencia a varios medicamentos (Tb-MDR) es un serio impedimento para todos los intentos por controlar esta enfermedad (Martin C, 2007).

La Tb es una enfermedad que afecta principalmente poblaciones de ingresos bajos con familia numerosa, que habitan en comunidades urbanas densas, en condiciones habitacionales deficientes. También el riesgo de infección y enfermedad por Tb es mayor entre las personas que viven en instituciones, tales

como prisiones, correccionales de menores, refugios, albergues sociales, guarderías y escuelas (Dunlap NE, 2000; WHO, 2006 [A]).

Son cuatro los factores que participan en el desarrollo de la enfermedad (Dunlap NE, 2000):

- 1) El número de organismos que son expelidos en el aire.
- 2) La concentración de organismos en el aire determinado por el volumen del espacio y su ventilación.
- 3) El tiempo que las personas expuestas inhalan el aire contaminado.
- 4) El estado del sistema inmune del individuo expuesto.

Los factores que facilitan el desarrollo de Tb son: las enfermedades y condiciones que debilitan la inmunidad, tales como malnutrición, alcoholismo, edad avanzada, VIH/SIDA, diabetes, insuficiencia renal crónica, paracoccidiodomicosis, leucemia, tumor sólido, tratamientos inmunosupresores y factores hereditarios. Factores adicionales incluyen la co-infección bacteriana, la patogenicidad y virulencia del bacilo tuberculoso y la susceptibilidad genética del hospedero (Dunlap NE, 2000).

La Tb ocupa el séptimo lugar de las causas de muerte de manera global. El 75% de la población que se contagia de Tb son individuos económicamente productivos, con edades entre 15 y 54 años. En algunas áreas del mundo, la Tb ha alcanzado dimensiones alarmantes con un número creciente de casos y muertes asociado al VIH/SIDA (WHO, 2007).

En la última década la Tb ha sido reconocida como una enfermedad reemergente. México reportó en el 2002 tasas de entre 25 y 49 casos por cada 100 mil habitantes (Said-Fernández S, 2005).

Debido a que la resistencia a los medicamentos para Tb está asociada a una tasa más elevada de falla en el tratamiento y muerte que en las cepas sensibles a los medicamentos, y es más difícil y caro tratar la enfermedad, se está ejerciendo una gran presión en los sistemas de salud (Espinal MA, 2001).

El último estimado de la OMS respecto a Tb, muestra que hubo 9.7 millones de casos nuevos de Tb en 2007 (incluyendo 1.37 millones de casos de VIH positivos), 1.32 millones de muertes a causa de Tb en pacientes VIH positivos y 13.7 millones de casos prevalentes, de los cuales 687,000 fueron casos VIH positivos. Se reportaron 0.5 millones de casos Tb-MDR, de los cuales 0.3 millones fueron de pacientes que no habían sido tratados previamente y 0.2 millones eran pacientes previamente tratados. La mayor tasa de detección de casos nuevos fue en la región Europea, seguida de la región de las Américas (WHO, 2009).

El 80% de las notificaciones de Tb en todas sus formas a nivel mundial se concentró en 12 países, entre los que se encontraba México. Estos doce países fueron declarados prioritarios para el control de la Tb (Del Granado-Cosio M, 2009).

El CENAVECE publicó que durante el año 2008 se presentaron 18,210 casos nuevos de Tb en todas sus formas, de los cuales el 83% fueron de forma pulmonar y 574 casos de farmacorresistencia prevalentes. La tasa de morbilidad, por cada 100 mil habitantes, de Tb pulmonar en el estado de Nuevo León fue de 19.90 superando la media nacional (14.1). En cuanto a mortalidad la tasa media nacional (1.77) del año 2007 fue superada por el estado de Nuevo León con 2.81 por cada 100 mil habitantes (CENAVE, 2009).

En el boletín informativo de la alianza comunitaria, solución Tb, se reportó que en México en el año 2009 se presentaron 17,598 casos nuevos en todas sus formas. El 83% de éstos fueron en forma pulmonar y 488 casos de farmacorresistentes prevalentes. La tasa de morbilidad reportada para Nuevo

León fue de 18.0, quedando por arriba de la media nacional (13.5), mientras que la tasa de mortalidad para el año 2008 en este mismo estado se reportó en 2.8 superando la media nacional de 1.8 por cada 100 mil habitantes (Solución Tb, 2010).

A pesar de que el CENAVECE publicó una tasa decreciente de incidencia en morbilidad y mortalidad por Tb pulmonar, cabe resaltar que la tasa está retrocediendo más lento cada año desde el comienzo del tercer milenio.

Por otro lado, el pasado 26 de Febrero de 2008 la OMS publicó un informe sobre los casos de Tb-MDR como tasa récord. Este informe se basó en la recopilación de información de 2002 a 2006 en 90,000 pacientes con Tb de 81 países; reveló así mismo la existencia de Tb-XDR y demostró que la Tb-MDR era casi dos veces más frecuente en pacientes infectados por el VIH. La OMS calculó que cada año se presentan en todo el mundo cerca de medio millón de nuevos casos de Tb-MDR (aproximadamente el 5% de los 9 millones de casos nuevos anuales de Tb). Las cifras correspondientes en pacientes infectados con VIH, eran entre el 14.8% y 19.4%. Esto superaba las mayores tasas de farmacorresistencia publicadas en el último informe de la OMS en el año 2004 (WHO, 2008).

La OMS publicó en el reporte del 2010 que en el 2008, un estimado de 390,000 – 510,000 casos de Tb-MDR surgieron globalmente. Entre la incidencia total de casos global, el 3.6% se estimó que eran Tb-MDR. En ese mismo año el estimado de muertes a causa de Tb-MDR fue de 150,000. Este reporte incluyó los datos evaluados para XDR-Tb de 46 ciudades que reportaron el surgimiento continuo de casos con resistencia a medicamentos de segunda línea entre los casos de Tb-MDR, de los cuales el 5.4 % de los casos eran Tb-XDR.

La Tb causada por cepa M tb-MDR no responde al tratamiento estándar de seis meses con medicamento de primera línea anti-Tb y puede tomar dos años o más para tratar la enfermedad con medicamentos de segunda línea, menos

potentes, más tóxicos y más caro. El costo es de 50 a 200 veces mayor que el tratamiento para una cepa susceptible (WHO, 2010).

La co-infección de Tb/VIH ha llamado agudamente la atención. El desarrollo de fármacos para Tb se ha retrasado, y desde el descubrimiento de la RIF ha habido un avance poco significativo en el tratamiento de la enfermedad. El costo de esta inercia ha sido el desarrollo de cepas M tb-MDR y M tb-XDR, con opciones de tratamiento limitadas y resultados desalentadores. Tb es la complicación más común del VIH y el co-tratamiento ha llevado complejidades como interacción entre fármacos, adherencia al tratamiento, promoción a la resistencia y fallas en el tratamiento. Por lo que surge la necesidad de nuevos medicamentos, seguros, efectivos contra cepas resistentes, capaces de acortar el esquema de tratamiento, que sean efectivos para la infección de Tb latente y que tengan mínima interacción con fármacos antiretrovirales (Lallo UG, 2010). Estos nuevos agentes terapéuticos se pueden encontrar en productos naturales, ya que estos juegan un papel dominante, en el desarrollo de medicamentos para el tratamiento de enfermedades humanas (Newman DJ, 2003)

1.4 Farmacoterapia para la Tb

Cabe resaltar que no se han agregado nuevos medicamentos a los tratamientos de primera línea para Tb en más de 30 años. Además, el impacto de *M. tuberculosis* en la salud pública se ha incrementado severamente en parte debido a la epidemia de VIH. Está claro el sinergismo entre *M. tuberculosis* y VIH; la Tb activa, incrementa la mortalidad relacionada a la inmunodeficiencia del VIH. De hecho, Tb sigue siendo la causa atribuible más grande de la muerte en individuos infectados con VIH (Martín C, 2007).

La resistencia a los medicamentos para la Tb, es una cuestión de gran preocupación para los programas de control, ya que no hay cura para algunas

cepas de *M. tuberculosis* (M tb-MDR). Existe la preocupación de que estas cepas puedan dispersarse en el mundo entero, lo que genera la necesidad de medidas de control adicionales, tales como nuevos métodos de diagnóstico, mejores medicamentos para el tratamiento y vacunas más efectivas. Tb-MDR se define como la infección causada por la cepa resistente por lo menos a Rifampicina (RIF) e isoniazida (INH) (Anandi M, 2007).

En el año 2006 se presentó el problema de una cepa con resistencia extensiva a fármacos (M tb-XDR). Esta cepa, además de ser M tb-MDR, fue inicialmente definida como resistente a por lo menos tres de las seis principales clases de medicamentos de segunda línea (aminoglicosidos, polipéptidos, fluoroquinolonas, tioamidas, cicloserina y ácido para-aminosalicílico) (CDC, 2006). A finales de ese mismo año, en el informe de la reunión del grupo de trabajo en Tb-XDR de la WHO, en Ginebra, se acordó que “M tb-XDR era una cepa que tenía resistencia a por lo menos RIF e INH, lo cual era la definición de M tb-MDR, adicionalmente presentaba resistencia a cualquier fluoroquinolona y por lo menos a uno de los tres medicamentos inyectables utilizados en el tratamiento de la Tb: capreomicina, kanamicina y amikacina (WHO, 2006 [B]). Tb-XDR emerge como una amenaza para el control de la enfermedad y la futura dispersión de resistencia a medicamentos, especialmente en pacientes infectados con VIH, como se reportó en este mismo año (Gandhi NR, 2006).

1.5 Las plantas como fuente de nuevos agentes terapéuticos.

A través de los años, los seres humanos han encontrado en la naturaleza la satisfacción a sus necesidades básicas: comida, calzado y vestido; no menos importante es el uso que desde tiempos remotos el hombre hizo de las fuentes naturales para curar sus afecciones (Laza-Loaces D, 2003).

Las plantas han formado la base de los sistemas tradicionales de medicina, los cuales han existido por cientos de años y continúan proveyendo a la humanidad con nuevos medicamentos. No se sabe exactamente cuándo y dónde se utilizaron las plantas medicinales por primera vez. Se presume que la mayoría de las veces los descubrimientos fueron simplemente resultado de la búsqueda de nuevos alimentos. Los antepasados tuvieron que comprobar si las especies vegetales eran comestibles, lo que les llevaba a descubrir en su propio cuerpo que muchas de ellas eran evidentemente comestibles; otras venenosas y otras producían efectos un tanto diferentes.

La medicación a base de plantas ha sido utilizada en el mundo entero a través de la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades. Aproximadamente el 80% de la población mundial continúa confiando en las plantas medicinales para el cuidado de su salud. El proceso del descubrimiento de un nuevo fármaco es multi e inter-disciplinario. En 1999, la mitad de los 20 medicamentos más vendidos eran obtenidos de productos naturales. De acuerdo a una revisión realizada por Newman DJ (2003) el 61% de las 877 pequeñas moléculas nuevas introducidas como medicamentos en el mundo entero de 1981 a 2002 fueron inspiradas en productos naturales. Esto incluye: productos naturales (6%), derivados de productos naturales (27%), compuestos sintéticos como derivados de productos naturales con actividad farmacológica (5%) y compuestos sintéticos diseñados como réplicas de productos de origen natural (23%). Las especies vegetales continúan sirviendo como una rica fuente de muchos compuestos nuevos biológicamente activos; algunas plantas han sido ampliamente investigadas en cuanto a sus propiedades medicinales. Así se renueva el interés en la fitomedicina durante las últimas décadas y hoy en día a muchas especies de plantas medicinales se les rastrea la actividad farmacológica, con la esperanza de encontrar nuevos compuestos (Jachak SM, 2006).

El objetivo de utilizar plantas como fuente de nuevos agentes terapéuticos no solo es aislar compuestos bioactivos que se puedan utilizar directamente como

medicamentos, sino también producir compuestos bioactivos a partir de estructuras nuevas o conocidas como base de compuestos semisintéticos para obtener entidades de mayor actividad o menor toxicidad (Fabricant DS, 2001).

En el año 2003, Copp BR realizó una extensa revisión abarcando los productos naturales con actividad anti-Tb reportados entre 1990 y 2002, el cual incluyó 248 citas para 352 compuestos aislados de fuentes marinas y terrestres.

Tres años después, Jachak SM (2006) realizó una amplia revisión en productos naturales derivados de plantas con actividad antimicobacteriana, describió la actividad de los extractos y compuestos aislados de 123 especies vegetales. En este mismo artículo se hizo referencia a una revisión de reportes realizada en el año 2004 por Okunade acerca de 88 compuestos naturales, algunos de ellos análogos sintéticos obtenidos de plantas, hongos y algunos organismos marinos, los cuales demostraron una importante actividad en ensayos *in-vitro* contra *M. tuberculosis* y otras especies de micobacterias.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Antecedentes directos

En el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. se desarrolló un proyecto, en el cual se evaluó la actividad de 14 plantas del Noreste de México, seleccionadas en base al criterio etnofarmacológico, contra dos cepas, una sensible (H37Rv) y otra MDR (CIBIN/UMF 15:99, resistente a estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida) de *M. tuberculosis*. En base a los resultados obtenidos mediante este rastreo se prepararon extractos más selectivos, a partir de los extractos metanólicos, de hoja y de raíz de *Leucophyllum frutescens*, tratados con solventes de diferentes polaridades se obtuvieron los resultados que se presentan en la tabla 1 (Molina-Salinas GM, 2004)

Tabla I.- CMI de las fracciones obtenidas por ELL del extracto metanólico de corteza de raíz y hoja de *L. frutescens* para las cepas de M tb-sensible y M tb-MDR.

Parte de la planta	Extracto/ Fracción	CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
		M tb-Sensible	M tb-MDR
Hoja	Metanólico crudo	250.00	125.00
	Hexánica	500.00	250.00
	AcOEt	500.00	125.00
	Butanólica	>500.00	500.00
Corteza de Raíz	Metanólico crudo	62.50	62.50
	Hexánica	31.25	31.25
	AcOEt	250.00	125.00
	Butanólica	>500.00	500.00

El extracto hexánico de corteza de raíz de *L. frutescens* fue el más activo, por lo que se continuó el fraccionamiento biodirigido con una VLC. La actividad biológica de las fracciones obtenidas al variar la proporción de solventes de la FM, se presentan en la tabla II.

Tabla II.- CMI de las fracciones obtenidas por VLC de la fracción hexánica de *L. frutescens* para las cepas M tb-sensible y M tb-MDR.

Fracción	CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	M. tb sensible	M. tb MDR
Fracción hexánica	31.25	31.25
VLC 20:1 (hexano:AcOEt)	15.63	15.63
VLC 15:1	62.50	62.50
VLC 10:1	62.50	125.00
VLC 5:1	125.00	125.00
VLC 3:1	62.50	125.00
VLC 2:1	62.50	250.00
VLC 1:1	250.00	250.00
AcOEt	125.00	250.00
MeOH	250.00	250.00

La fracción 20:1 mostró la mayor actividad anti-Tb con una CMI de 15.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra ambas cepas. A partir de esta fracción se aislaron, purificaron e identificaron dos estereoisómeros con estructura de serrulato (Figura 1) que fueron más potentes que algunos de los medicamentos sobre la cepa M tb-MDR (Tabla III). Ambos serrulatos resultaron ser bactericidas.

Tabla III.- CMI de los medicamentos de primera línea para las cepas *M. tb*-sensible y *M. tb*-MDR.

Medicamento	CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	<i>M. tb</i> Sensible	<i>M. tb</i> MDR
Estreptomina	0.50	≥ 100.00
Isoniazida	0.06	3.13
Rifampicina	0.06	100.00
Etambutol	2.00	8.00
Serrulatano 1	12.50	6.25
Serrulatano 2	12.50	12.50

La toxicidad de los compuestos aislados de *L. frutescens*, evaluada mediante el bioensayo de letalidad con larvas de *Artemia salina* fue de 8.72 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 9.87 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el serrulatano 1 y 2 respectivamente.

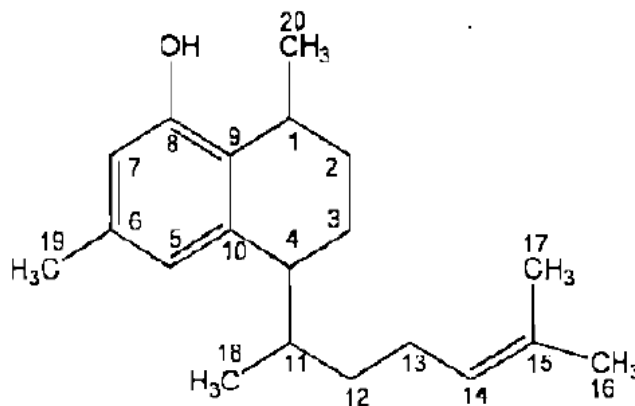


Figura 1.- Estructura planar del compuesto aislado de *L. frutescens* por Molina-Salinas.

Por la poca cantidad que obtuvieron de serrulatanos, no se logró establecer su esteroquímica y por lo tanto conocer la diferencia entre ellos.

De esta manera, si bien se contaba con compuestos con una actividad anti-Tb interesante, su toxicidad no les permitía ser candidatos para continuar con estudios preclínicos. De tal forma que resultaron como perspectivas del proyecto:

- a) Obtener suficiente cantidad de ambos serrulatanos para establecer su estereoquímica absoluta.
- b) Obtener productos semi-sintéticos a partir de los serrulatanos aislados.
- c) Aislar e identificar los compuestos de las otras fracciones activas del extracto de la raíz de *L. frutescens*.

2.2 Justificación

Con la alarmante emergencia de cepas M tb-MDR y M tb-XDR de *Mycobacterium tuberculosis*, dado que no se dispone aún de alguna opción para tratar a los pacientes que desarrollan la enfermedad generada por estas cepas y se tiene el firme propósito de controlar estas infecciones, surge la necesidad de continuar con la búsqueda de nuevos agentes que presenten una marcada actividad y menor toxicidad; por esta razón se propone aislar los compuestos responsables de la actividad en las fracciones minoritarias de la fracción hexánica de *L. frutescens*, además de obtener compuestos semisintéticos a partir de los serrulatanos aislados previamente.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo General

Obtener e identificar nuevas moléculas con actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* a partir de *Leucophyllum frutescens*.

2.3.2 Objetivos específicos

1. Sintetizar derivados de los serrulatanos previamente aislados de la fracción hexánica de *L. frutescens*.
2. Obtener compuestos activos a partir de las fracciones minoritarias provenientes del extracto hexánico de *L. frutescens*.
3. Elucidar las estructuras e identificar los compuestos activos.
4. Evaluar la actividad biológica de los compuestos purificados de *L. frutescens* así como de los obtenidos mediante semi-síntesis.

CAPÍTULO 3

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material, reactivos y equipos

3.1.1 Material biológico

Cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 sensible a los medicamentos de primera línea para la tuberculosis (isoniazida, rifampicina, estreptomycin, etambutol y piracinamida).

Línea celular HeLa (Células de cáncer cervical), ATCC CCL-2

Línea celular Vero (Células renales de mono verde africano), ATCC CCL-81

Raíz de *Leucophyllum frutescens* (cenizo) colectada en Agualeguas, N. L. en el mes de Mayo de 2008.

3.1.2 Material

Cajas petri de vidrio Pyrex®

Columna lobar LiChroprep RP-18 (40-63 µm), 240mm X 11mm, Merck®

Embudo de filtración con fondo de vidrio poroso, 150 mL, Kymax®

Embudo de separación, 250 mL, Pyrex®

Filtro para jeringa PTFE 0.45 μm , 13 mm diámetro, Millipore, Millex®

Frasco para cultivo celular de poliestireno, estéril, 25 cm^2 , CORNING®

Kit de cristalería para laboratorio All-In-One, unión 14/20, Aldrich®

Matraz bola de boca esmerilada 24/40, 100 mL, Pyrex ®

Matraz bola de boca esmerilada 24/40, 250 mL, Pyrex ®

Matraz quitasato, 1 L, Pyrex®

Membrana de nylon HNWP, 0.45 μm , 50 mm diámetro, Millipore®

Pipeta lineal 10 mL (1/10), estéril, desechable, Falcón®

Pipeta serológica lineal 5 mL (1/10), estéril, desechable, VWR®

Pipetas automáticas, Eppendorf®

Placa de 96 pozos, Corning incorporated 3599, Costar®

Placas de aluminio para cromatografía en capa fina de sílica gel 60 F₂₅₄ (20 x 20), Merck®

Puntillas con filtro desechables para pipeta automática, 200 μL , BIOzym budget line®

Puntillas desechables para pipeta automática, Probiotek®

Sistema de filtración con membrana de Nylon 0.45 μm , 500 mL, VWR®

Tubo cónico para centrifuga con tapa de rosca, estéril, 15 mL, CORNING®

Tubo, 1.5 mL, Eppendorf®

Tubos de vidrio de 150 x 18 con tapón de rosca

3.1.3 Reactivos y solventes

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dihidrobromuro de tetrazolio (MTT), Sigma®

Acetato de etilo grado analítico, CTR®

Ácido meta cloro per-benzoico (MCPB), Sigma-Aldrich®

Bicarbonato de sodio (NaHCO_3), Acytsa®

Bisulfito de sodio (NaHSO_3), An-Alit®

Cloroformo grado analítico, Lemont®

Dimetilsulfóxido grado analítico, Fermont®

Doxorubicina, Sigma®

Enriquecimiento para medio de cultivo OADC, Becton Dickinson®

Glicerol, Analytyka®

Glutaraldehído al 2%, Degasa SA de CV, Dermo Dex®

Hexano grado analítico, CTR ®

Hidróxido de sodio (NaOH), Sigma®

Indicador de crecimiento celular Resazurin, Probiotek®

Isoniazida, Sigma®

Medio de cultivo líquido DMEM, Sigma®

Medio de cultivo líquido Middlebrook 7H9, Difco®

Medio de cultivo sólido Lowenstein-Jensen, Merck®

Metanol grado analítico, CTR ®

Metanol grado HPLC, CTR ®

Nitrógeno gas de alta pureza, AGA®

Ofloxacina, Sigma®

Rifampicina Sigma®

Sephadex lipofílico LH-20, Sigma®

Sílica gel 60 (0.063 – 0.200 mm), Merck®

Sílica gel 60 (0.2 – 0.5 mm), Merck®

Solución azul de tripano 0.4%, Sigma®

Solución salina en buffer de fosfatos, Sigma®

Suero Fetal Bovino, Hyclone®

Tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), Sigma®

Tween-80, Sigma Aldrich®

Yoduro de metilo (CH_3I), Sigma-Aldrich®

3.1.4 Estándares

Estándar 1 de la escala de McFarland

3.1.5 Equipos

Agitador Hidolth instrument Unimax 1010

Agitador Vortex, Ika Works, Inc. Mod. MS1 S1

Balanza analítica, BP2215, SARTORIUS®

Bomba de vacío GAST 1HAB-25-M100X

Bomba peristáltica Mod EP-1Econo pump, Bio-RAD

Campana de bioseguridad tipo II en cuarto de contención, Labconco

Campana de flujo laminar, environmental air control, AECI ENVIRCO

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución preparativo Waters LC 2000, detector UV Waters 486

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Waters® 2996, con detector de arreglo de diodos 600 Waters® y automuestreador 717 Waters®

Cromatógrafo de líquidos serie 1200- Agilent Technologies® con Detector de Masas modelo 6130, Agilent Technologies®

Equipo de filtración rápida, filtro con fondo de vidrio poroso de 250 mL, matraz quitasato de 1000 mL, Millipore®

Espectrómetro de RMN modelo Avance DPX 400, Bruker

Invertoscopio 47 12 03 9901, ZEISS west Germany

Lámpara, Highest Ultraviolet intensity 254nm y 365nm, Spectroline®

Lector de micro placas modelo Benchmark, Bio Rad®

Polarímetro 341Perkin Elmer®

Rotavapor R-BÜCHI con baño de agua HB4 Basic Kika, Labortechnik®

Ultrasonido 2510, Branson®

3.2 Metodología

3.2.1 Identificación de la localidad con mayor cantidad de serrulatano.

3.2.1.1 Recolección del material vegetal.

Se colectó la raíz de *Leucophyllum frutescens*, en cuatro diferentes puntos de Nuevo León:

Kilómetro 55 de la carretera Monterrey-Salttillo Coahuila
Ejido el Potrero en Villaldama, N. L.
Ex-hacienda San Pedro en Zuazua, N. L.
Colonia Raúl Molina en Agualeguas, N .L.

Una muestra de cada espécimen fue enviada al Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León para su identificación y registro.

3.2.1.2 Preparación del extracto metanólico.

A cada raíz colectada se le separó la corteza, por ser la parte de interés y se dejó secar en una habitación ventilada por una semana a temperatura ambiente. Una vez seca la corteza de la raíz se molió en una licuadora hasta tener aspecto polvoso. El material previamente pulverizado se pasó a un matraz Erlenmeyer en el cual se agregó metanol hasta cubrir el material vegetal. Se dejó reposar toda la noche, posteriormente se agregaron 200 mL más de metanol y se dejó una hora bajo agitación constante (200 rpm). Se filtró el sobrenadante, el filtrado se recolectó en un matraz bola. Al residuo vegetal se le realizaron dos

extracciones más con 200 mL de metanol cada una. Se recolectó el filtrado en el mismo matraz para obtener todo el extracto metanólico junto y se redujo el volumen de solvente a presión reducida con temperatura controlada (28°C) hasta tener un volumen final de 100 mL de extracto metanólico.

3.2.1.3 Obtención de la fracción hexánica.

La fracción hexánica se obtuvo mediante una extracción líquido-líquido del extracto metanólico. En un embudo de separación, a los 100 mL de extracto metanólico de cada espécimen se les agregaron 100 mL de hexano, se agitó por inversión. Se recuperó la fase metanólica y la hexánica, a la fase metanólica se le realizaron dos extracciones más con hexano. Los extractos hexánicos se recuperaron y se eliminó el solvente a presión reducida con temperatura controlada (28°C), en un rotavapor, hasta llegar a sequedad. Se almacenó en atmósfera de Nitrógeno y se guardó a 0°C hasta su uso.

3.2.1.4 Confirmación de la presencia y semicuantificación de los serrulatanos en las cuatro muestras.

Se pesó 1 mg de cada extracto hexánico en una balanza analítica y se disolvió en 100 μ L de cloroformo; una vez disuelto se agregaron 900 μ L de metanol grado HPLC, para tener una solución con una concentración de 1 mg/mL; de esta solución se inyectaron 10 μ L a un CLAR. El análisis de los extractos se realizó con una columna Symmetry C18 (5 μ m, 3.9 X 150 mm); como FM se empleó un gradiente (Tabla IV) con un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó con un detector UV a 254 nm.

Tabla IV.- Gradiente de elución apartado 3.2.1.4.

Tiempo (minutos)	Metanol	Agua
0	50	50
8	100	0
23	100	0
25	50	50
30	50	50

3.2.1.5 Obtención de la fracción hexánica a gran escala.

Se procedió a realizar la colecta en la colonia Raúl Molina en Agualeguas, N. L. en el mes de mayo del año 2008, para obtener la fracción hexánica a mayor escala.

3.2.1.6 Aislamiento de los serrulatanos.

3.2.1.6.1 Cromatografía de Líquidos al Vacío (VLC).

En un embudo de filtración con fondo de vidrio poroso de 150 mL, se colocaron 60 g de sílica gel 60 G lavada previamente tres veces con metanol 100% y secada a temperatura ambiente. Se disolvieron 3 g de la fracción hexánica en el mínimo volumen de hexano para mezclarlo con 9 g de sílica gel, la muestra se aplicó al vacío para tener un empaquetamiento adecuado. Se empleó una mezcla de dos solventes para la elución de la muestra, hexano y acetato de etilo (AcOEt), variando las proporciones de estos desde 20:1 (hexano: AcOEt) hasta 1:1. Finalmente se pasó AcOEt 100% y metanol 100%. Se colectaron así siete fracciones de 300 mL cada una.

3.2.1.6.1.1 Confirmación de la presencia de los serrulatanos.

El contenido de serrulatanos en cada una de las fracciones hexánicas obtenidas se verificó mediante CLAR como se describe en el apartado 3.2.1.4, empleando el gradiente de elución de la tabla V.

Tabla V.- Gradiente de elución apartado 3.2.1.6.1.1.

Tiempo (minutos)	% Agua	% Metanol
	50	50
23.0	0.0	100
25.0	50	50
40.0	50	50

Las fracciones que contenían los serrulatanos se agruparon para continuar con el aislamiento.

3.2.1.6.2 Cromatografía de baja presión fase reversa (FR).

Se realizó una cromatografía en columna Lobar FR-C18 de 150 mL con 1 g de la fracción 20:1 de la VLC; para la elución se emplearon soluciones hidroalcohólicas de metanol 80%, 90% y 100% (300 mL). Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas con CCF, empleando como FM hexano:AcOEt (9:1); las placas se revelaron con ácido sulfúrico y ácido fosfomolibdico; el análisis de las fracciones se realizó por CLAR, con las condiciones descritas en el apartado 3.2.1.6.1.1, para verificar la presencia del analito de interés.

3.2.1.6.3 Aislamiento del serrulatano 1.

El aislamiento se realizó por cromatografía en columna con sílica gel de 350 mL, modalidad flash (sílica gel 60 0.040 – 0.063 mm), se inyectaron 4.0 g de la fracción 100% metanol, obtenida de la cromatografía FR-C18 (apartado 3.2.1.6.2). Para aplicar presión se utilizó una bomba de acuario. La elución se realizó con hexano:AcOEt (95:5) y se colectaron fracciones de 3 mL hasta completar 50 fracciones. La presencia del serrulatano se confirmó por CLAR como indica el apartado 3.2.1.6.1.1.

3.2.1.6.4 Aislamiento del serrulatano 2.

De la cromatografía FR-C18 (apartado 3.2.1.6.2) se tomó la fracción obtenida con metanol 90% y se le realizó otra cromatografía en la columna FR-C18, eluyéndola con solución hidroalcohólica de metanol 90%, 95% y 100%. En la fracción 90%, mediante el empleo de CLAR (apartado 3.2.1.6.1.1) se detectó la presencia del serrulatano.

3.2.1.6.5 Purificación de los serrulatanos.

La purificación se realizó utilizando cromatografía en columna de sílica gel 60 de 100 mL en modalidad flash (sílica gel 0.063 – 0.200 mm). Ésta fue eluída con 400 mL de hexano:AcOEt (95:5), AcOEt (100 mL, 100%) y metanol (100 mL, 100%), colectando fracciones de 10 mL por tubo. Se le dio seguimiento al fraccionamiento mediante CCF, empleando como FM hexano:AcOEt (9:1). Para el revelado de las placas, éstas se rosearon con ácido sulfúrico y ácido fosfomolibdico, y se calentaron en una placa de calentamiento. Se confirmó la pureza por CLAR (apartado 3.2.1.6.1.1).

3.2.1.7 Confirmación de la estructura de los serrulatanos por Resonancia Magnética Nuclear.

Se obtuvieron los espectros de ^1H y ^{13}C en un espectrómetro Bruker modelo Avance DPX 400 de 9.4 teslas de campo magnético, frecuencia de 400.13 MHz para ^1H y 100.62 MHz para ^{13}C , los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm) y fueron referenciados al tetrametilsilano (TMS) empleando las señales del CDCl_3 (δ_{H} 7.260 ppm, δ_{C} 77.000 ppm relativo al TMS) como estándar interno. En los espectros se confirmaron las multiplicidades y desplazamientos de las señales esperadas para los serrulatanos.

3.2.1.8 Determinación del Poder Rotatorio.

El poder rotatorio de cada uno de los serrulatanos se determinó en soluciones clorofórmicas de 2 mg/mL, aplicando la ley de Biot a 589 nm.

$$\alpha = ([\alpha]D^t) (l) (C)$$

α = Ángulo de rotación

$[\alpha]D^t$ = Ángulo de rotación específica

l = Camino óptico en dm

C = Concentración (g/mL)

3.2.2 Modificación estructural del serrulatano.

3.2.2.1 Formación del epóxido

Se disolvieron 0.8 mmol del serrulatano en 2 mL de cloroformo. Se colocó en agitación magnética en baño de hielo y se adicionaron 0.9 mmol de MCPB disueltos en 1 mL de CHCl_3 gota a gota, la adición se intercaló con 0.9 mmol de NaHCO_3 sólido, para eliminar el ácido formado. Se dejó en el baño de hielo por 15 min y posteriormente se dejó en agitación a temperatura ambiente de 6 a 12 h. Una vez que terminó la reacción, se agregó NaHSO_3 a discreción para eliminar peróxidos. Se llevó a sequedad con evaporación a baja presión y se disolvió en AcOEt. Se transfirió a un embudo de separación y se agregó solución saturada de NaHCO_3 hasta pH básico. Se recuperó la fase orgánica, la cual se lavó con agua hasta pH neutro. Se evaporó la fase orgánica y se preparó para la purificación del epóxido.

3.2.2.1.1 Seguimiento de la reacción

Se monitoreó el consumo de compuesto de partida mediante CCF, a intervalos de tiempo controlado. Se probaron diferentes sistemas de elución, empleando como FM una mezcla de hexano: AcOEt, en diferentes proporciones para seleccionar aquel con el cual se tuviera una mejor resolución entre los compuestos que se tenían presentes. Se seleccionó como mejor FM hexano:AcOEt (8:2) y se reveló con H_2SO_4 10% en etanol.

3.2.2.1.2 Purificación del epóxido

Para la purificación, se disolvió el producto de reacción en 1 mL de hexano:AcOEt (95:5), y se pasó por una columna de sílica gel de 100 mL en modalidad flash (sílica gel 60 0.040 – 0.063 mm). Para aplicar presión se utilizó una bomba de acuario. La columna se eluyó con hexano:AcOEt (95:5) y se colectaron fracciones de 3 mL hasta completar 20. Al final la columna se eluyó con AcOEt. Las fracciones se analizaron por CCF, con hexano:AcOEt (8:2) como eluente. Se reveló con H₂SO₄ (10%) en etanol. La presencia y pureza del producto esperado se evidenció con los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN.

3.2.2.2 Metilación del OH fenólico

Se pesaron 0.34 mmol de serrulano perfectamente seco y se resuspendieron en acetona previamente deshidratada, (para lo cual se le dejó reposar por 24 h con CaCl₂); a esta solución se agregaron 0.87 mmol de K₂CO₃ y se colocó en agitación por 15 min en baño de hielo. Una vez transcurrido este tiempo, se agregaron 0.87 mmol de CH₃I y se dejó evolucionar la reacción por 48h bajo agitación constante, con el correspondiente monitoreo por CCF (apartado 3.2.2.1.1). Al llegar al punto final de la reacción se evaporó el solvente y se resuspendió el producto de reacción en AcOEt; a esta solución se le realizaron lavados con agua hasta un pH neutro, para finalmente eliminar el solvente y dejar a sequedad el producto de reacción. La presencia y pureza del producto esperado se evidenció con los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN.

3.2.2.2.1 Purificación del compuesto metilado

La purificación se realizó disolviendo el producto de reacción en 1 mL de hexano:AcOEt (8:2), y se pasó por una columna de sílica gel de 100 mL en

modalidad flash (sílica gel 60 0.040 – 0.063 mm). Para aplicar presión se utilizó una bomba de acuario. La columna se eluyó con hexano:AcOEt (8:2) y se colectaron 2 mL por tubo hasta completar 20 fracciones. Al final la columna se eluyó con AcOEt. Las fracciones se analizaron por CCF, con hexano:AcOEt (8:2) como eluente. La presencia y pureza del producto esperado se evidenció con los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN.

3.2.3 Actividad anti-Tb

3.2.3.1 Preparación de los compuestos o fracciones

Se prepararon soluciones madre de 1mg/mL de la siguiente manera: se pesaron 2 mg de compuesto o fracción los cuales se disolvieron en 50 μL DMSO y se llevó a un volumen final de 2 mL con medio Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC; se pasó a través de un filtro de PTFE con poro de 0.45 μm y se recuperó el filtrado.

3.2.3.2 Cepa micobacteriana y condiciones de crecimiento

Mycobacterium tuberculosis H37Rv ATCC 27294 se dejó crecer en medio Lowenstein-Jensen, incubado a 37.0°C por un periodo de tres a cuatro semanas.

3.2.3.3 Suspensión de trabajo

A partir del cultivo de la cepa H37Rv en medio Lowenstein-Jensen, se tomaron algunas colonias para obtener una suspensión en 10 mL de medio Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC y se dejó a 37°C, hasta alcanzar una

turbidez comparable al estándar No. 1 de McFarland. Posteriormente se realizó una dilución 1:50 que equivale a 6×10^6 UFC/mL y corresponde al inóculo de trabajo.

3.2.3.4 Micro-método de Alamar Azul

El ensayo de susceptibilidad micobacteriana se desarrolló en placas de 96 pozos. El perímetro de la placa se llenó con 200 μ L de agua destilada en cada pozo para prevenir la deshidratación. En el resto de la placa se colocaron 100 μ L de medio Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC, se agregaron 100 μ L de la solución de compuestos recién preparada y filtrada al pocillo que contendría la mayor concentración y a partir de este primer pocillo se hicieron diez diluciones seriadas para obtener un rango de concentración de compuesto entre 125 y 0.122 μ g/mL. Una vez realizadas las diluciones, se agregaron 100 μ L de suspensión de trabajo de micobacterias.

En todos los ensayos se incluyó un pocillo con 200 μ L de medio Middlebrook 7H9 para comprobar su esterilidad, un pocillo para cada uno de los extractos en el cual se colocaron 200 μ L de extracto a una concentración de 125 μ g/mL para comprobar su esterilidad, un control de crecimiento en los que se colocó el inóculo bacteriano sin extracto vegetal ni antibiótico y otro pocillo para control del inóculo diluido 1:100 para garantizar el crecimiento del 1% de la población bacilar.

Se cerró la placa, se selló con plástico parafilm y se introdujo en una bolsa de plástico para incubarla a 37°C por cinco días, al quinto día se agregaron 20 μ L de Alamar azul y 12 μ L de Tween 80 al 20% v/v.

3.2.3.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Las placas se observaron a las 24 y 48 h de forma visual, tomando como referencia el viraje de coloración de un color azul a cualquier tonalidad de rosa. La CMI se consideró como la menor concentración de compuesto que evitó el crecimiento de las micobacterias.

3.2.4 Aislamiento de otros compuestos con actividad anti-Tb de la fracción hexánica de *L. frutescens*

3.2.4.1 Sistema de CLAR

Se trabajó como se indica en el apartado 3.2.1.4. Se modificó el gradiente de elución como se muestra en la tabla VI.

Tabla VI.- Gradiente de elución apartado 3.2.4.1.

Tiempo (minutos)	Metanol	Agua
0	50	50
23	100	0
25	50	50
30	50	50

3.2.4.2 Cromatografía gravitacional con sílica gel

Se realizó una cromatografía gravitacional con 25 g de sílica gel (0.2 – 0.5 mm) en la cual se sembraron 200 mg de la fracción 3:1 de la VLC, disueltos en FM hexano:AcOEt (15:1); esta columna fue eluida con 50 mL de cada FM en

diferentes proporciones, comenzando en 15:1 hasta terminar con AcOEt 100%; finalmente se barrió la sílica con metanol 100%.

3.2.4.2.1 Monitoreo de fracciones obtenidas en la cromatografía gravitacional de sílica gel

El monitoreo de las fracciones obtenidas por cromatografía gravitacional de sílica gel, se realizó con CCF. Se evaluaron sistemas de elución en los que se mezclaron dos diferentes solventes, variando las proporciones de éstos, para seleccionar aquel con el que se tuviera una mejor resolución entre los compuestos (Tabla VII). La presencia y pureza del compuesto de interés se determinó por CLAR (apartado 3.2.4.1).

Tabla VII.- Sistemas de elución evaluados para el apartado 3.2.4.2.1.

Fase móvil	Proporción	Separación
Hex:CHCl ₃	10:1	Mala
Hex:CH ₂ Cl ₂	10:1	Mala
Hex:AcOEt	15:1	Mala
Hex:AcOEt	10:1	Buena
Hex:AcOEt	5:1	Buena
Hex:AcOEt	3:1	Buena
Hex:AcOEt	2:1	Mala
Hex:AcOEt	1:1	Mala
Hexano	100%	Mala
Metanol	100%	Mala

3.2.4.3 Cromatografía de baja presión

Se aplicaron 120 mg de la fracción 6, obtenida con la cromatografía gravitacional de sílica gel, en una columna FR-C18, se utilizó un flujo de 1 mL/min y se dejó acondicionando toda la noche con una FM metanol:agua (60:40) con 1% de ácido acético. El sistema de elución fue disminuyendo en polaridad con soluciones hidroalcohólicas de metanol, 60:40, 70:30, 80:20 y 90:10 para finalmente eluir la columna con metanol 100%.

3.2.4.3.1 Monitoreo de las fracciones obtenidas con columna de baja presión

El seguimiento de estas fracciones se realizó mediante CCF con FM hexano:AcOEt (3:1) y se agruparon las fracciones en base a su composición. La presencia y pureza del compuesto de interés se determinó por CLAR (apartado 3.2.4.1).

3.2.4.4 CLAR-Preparativa

Se inyectaron 400 μ L de la fracción de interés, y se pasaron a través de una columna μ Bondapak (C18 10 μ m, 8 x 100 mm) Radial-PakTM Cartridge. Se empleó como FM metanol:agua en proporción 70:30 con un flujo de 4 mL/min empleando el detector de UV-Vis en 254 nm. La pureza del compuesto se determinó por CLAR (apartado 3.2.4.1).

3.2.4.4.2 Elucidación estructural del compuesto

El peso molecular y fórmula molecular del compuesto se establecieron por espectrometría de masas. Con los datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT 135, DEPT 90, COSY 90, HMQC, HSQC, HMBC y NOESY se estableció la estructura del compuesto.

3.2.4.5 Actividad anti-Tb y determinación de la CMI

La actividad anti-Tb y la CMI se determinaron como se redacta en el apartado 3.2.3.

3.2.5 Actividad citotóxica.

3.2.5.1 Conservación de las células vivas

Tanto las células Vero como las HeLa se mantuvieron en frascos de cultivo con medio DMEM libre de glucosa y bicarbonato, suplementado con 100 unidades/mL de Penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina y 10% de suero fetal bovino. Se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% CO_2 . El medio se cambió cada 24 o 48 h y la población celular se dividió al alcanzar el 80% de confluencia.

3.2.5.2 Preparación de compuestos a evaluar

Se pesaron 2 mg de cada compuesto a evaluar y se disolvieron en 16 μL de DMSO, llevando a un volumen final de 2 mL con medio DMEM. El rango final de concentraciones evaluadas fue de 500 a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

3.2.5.3 Ensayo

3.2.5.3.1 Suspensión celular

Se revisó el crecimiento celular bajo un invertoscopio, y se lavó el cultivo con solución salina. Las células se desprendieron con 3 mL de tripsina, durante 5 minutos a 37°C y se inactivó la tripsina con 3 mL de medio. La suspensión celular se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min y el paquete celular se resuspendió en 1mL de medio DMEM. Se preparó una dilución 1:10 de la suspensión celular en medio de cultivo y azul de tripán, para proceder al conteo de células.

3.2.5.3.2 Conteo celular

El conteo de células se realizó por duplicado en cuatro cuadrantes de una cámara de Neubauer; se calculó la cantidad de células/mL, empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración celular} = (\text{células contadas} \times 10^4 \times \text{FD})/\text{mL}$$

3.2.5.3.3 Metodología del ensayo de citotoxicidad.

Se emplearon placas de 96 pozos, se colocaron en cada pozo 100 µL de una suspensión celular de 40,000 cel/mL, se incubaron por 24 h a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. Se agregaron 100 µL de la solución de compuesto a evaluar y se re-incubaron 48 h; se observó la presencia de precipitado con el invertoscopio. Se agregaron 25 µL de MTT (4000 ppm) a cada pozo y se incubaron bajo las mismas condiciones por 3 h; el medio se desechó y los cristales

de formazan se disolvieron en 200 μ L de DMSO. La absorbancia de cada pozo fue medida en un lector de placa a 575 nm. En cada placa se colocaron controles negativos (medio de cultivo, células y DMSO) y positivos (doxorubicina). En cada ensayo se evaluaron seis repeticiones de cada concentración y cada ensayo se realizó por triplicado.

3.2.5.3.4 Determinación de la concentración inhibitoria del 50% (CI_{50}).

La CI_{50} se calculó mediante la ecuación de regresión lineal, comparando con el control celular sin tratamiento y se determinó la concentración del compuesto que da un 50% de viabilidad celular.

3.2.6 Determinación del índice de selectividad (IS)

Se empleó la siguiente fórmula para determinar el IS solamente para los compuestos evaluados cuya CMI fue $<125 \mu\text{g/mL}$ contra *M. tuberculosis*:

$$IS = \frac{CI_{50} \text{ Vero}}{CMI_{Tb}}$$

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 Obtención de los serrulatanos.

4.1.1 Material vegetal.

Todos los especímenes recolectados fueron identificados y registrados en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León como *Leucophyllum frutescens*.

4.1.2 Confirmación de la presencia y semi-cuantificación de los serrulatanos en las muestras colectadas en cuatro diferentes regiones de Nuevo León.

En las figuras 2 a la 5 se presentan los cromatogramas obtenidos con las condiciones redactadas en el apartado 3.2.1.4. En los cromatogramas se observa el pico representativo del serrulatanos, con t_R entre 23.7 y 23.9 min. En la escala del lado izquierdo aparecen las AU en que se miden las intensidades de los picos. El cromatograma representativo del extracto de Agualeguas, N. L. es el que tiene una mayor intensidad, con 0.20 AU, por lo que se decidió realizar la colecta a gran escala en esta región.

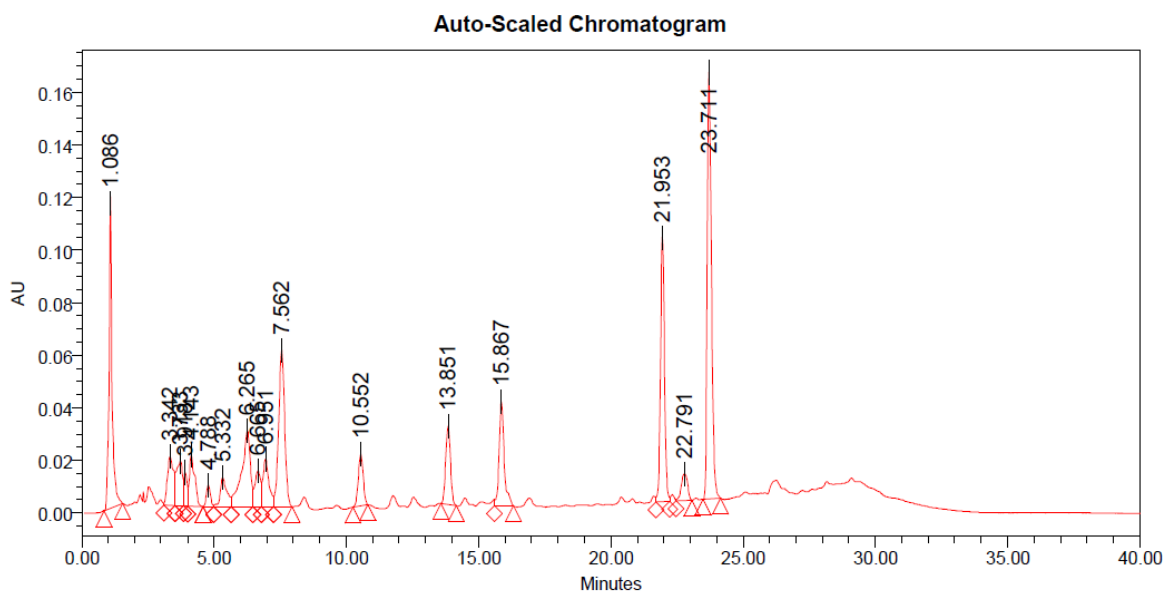


Figura 2.- Cromatograma de la fracción hexánica de la corteza de raíz de *L. frutescens* colectado en la carretera a Saltillo, Coah. Km 55.

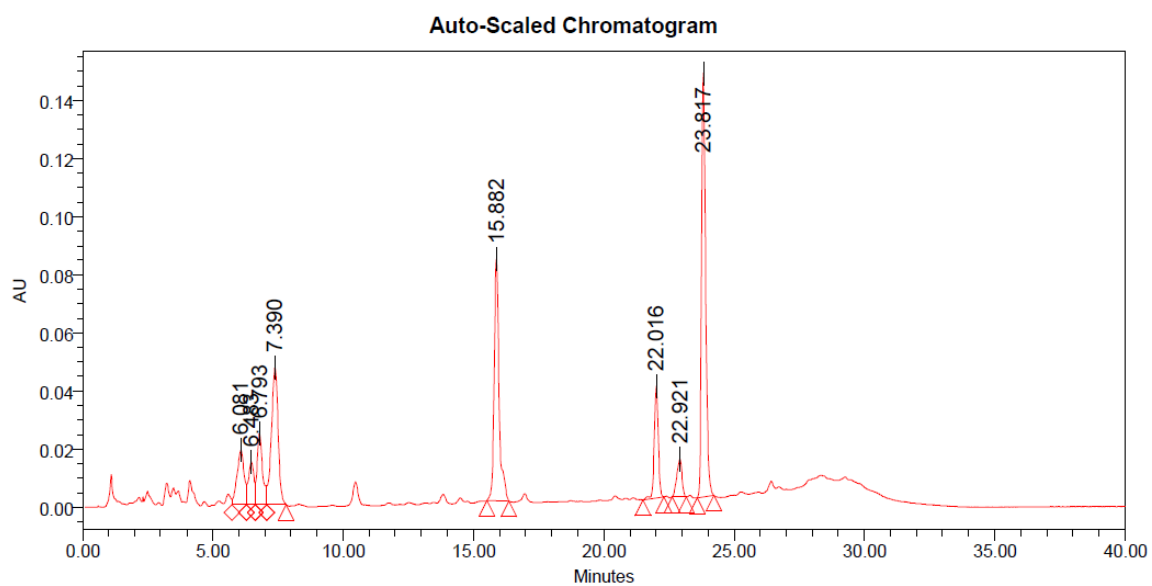


Figura 3.- Cromatograma de la fracción hexánica de la corteza de raíz de *L. frutescens* colectado en Villaldama, N. L.

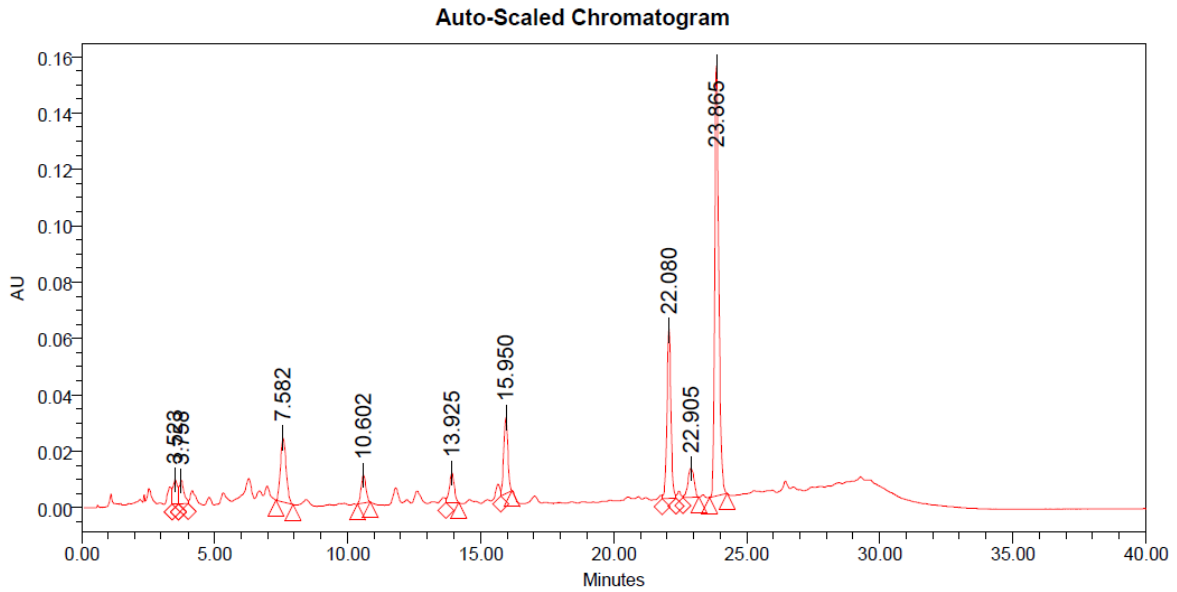


Figura 4.- Cromatograma de la fracción hexánica de la corteza de raíz de *L. frutescens* colectado en la Ex-hacienda, Zuazua, N. L.

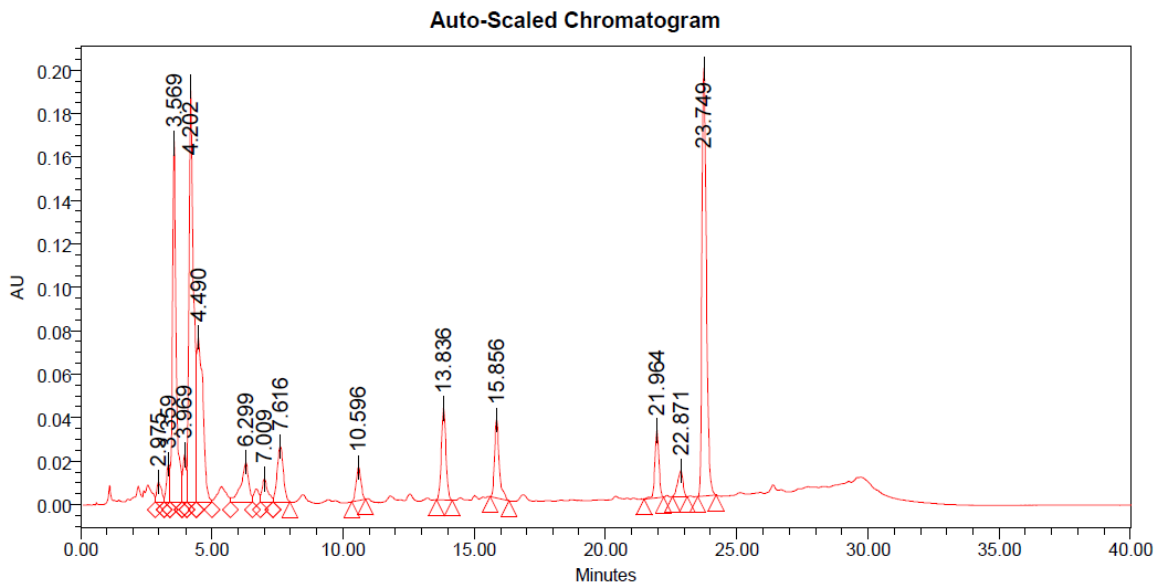


Figura 5.- Cromatograma de la fracción hexánica de la corteza de raíz de *L. frutescens* colectado en Agualeguas, N. L.

4.1.3 Obtención del extracto metanólico y fracción hexánica de raíz de *L. frutescens*.

Se partió de 3.6 Kg de corteza de raíz de *L. frutescens* colectado en Agualeguas, N. L. para obtener 262.80 g del extracto metanólico, y a éste se le realizó una ELL para obtener 94.79 g de la fracción hexánica seca.

4.1.4 Aislamiento y purificación de los serrulatanos.

4.1.4.1 Cromatografía de Líquidos al Vacío (VLC).

En el cromatograma de la fracción 20:1 de la VLC (Figura 6), se observan dos picos principales con t_R muy parecidos y proporciones de abundancia diferentes, uno a los 27.511 min, con una intensidad de 0.725 AU y el otro al minuto 27.872, con 0.50 AU, cada uno se atribuyó a uno de los serrulatanos. Además se observan otros picos.

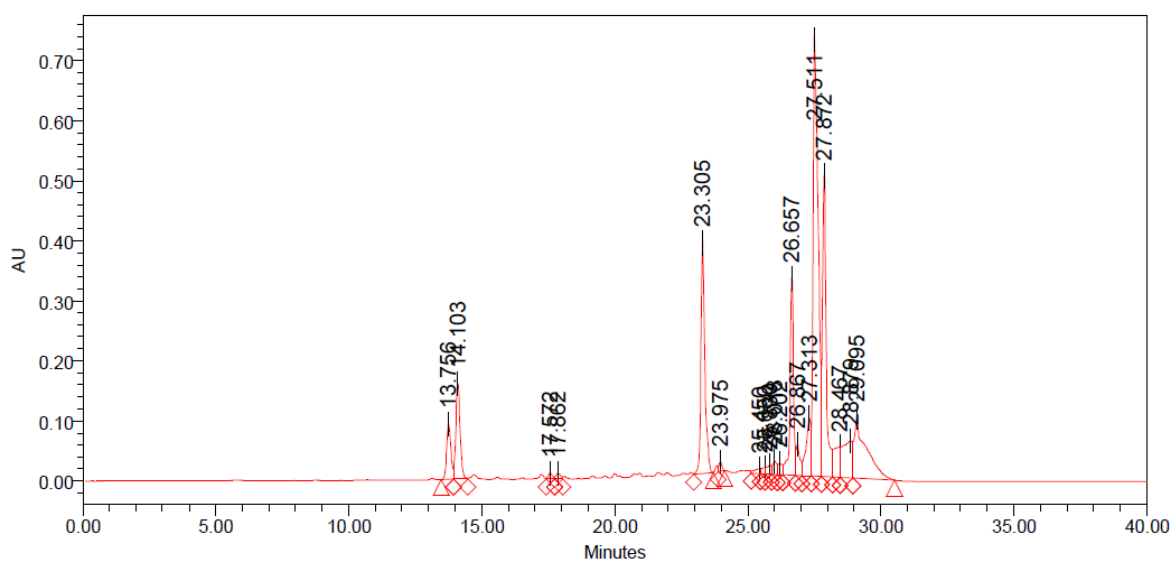


Figura 6.- Cromatograma de la fracción 20:1 de la VLC bajo las condiciones descritas en el apartado 3.2.1.6.1.1.

4.1.4.2 Cromatografía de baja presión

Después de pasar la fracción 20:1 por la columna lobar FR-C18 se obtuvo una fracción enriquecida con los picos de interés. En la figura 7 se observa dos picos con t_R similar (27.332 y 27.826 min), así como dos picos minoritarios con t_R de 26.376 y 26.847 min.

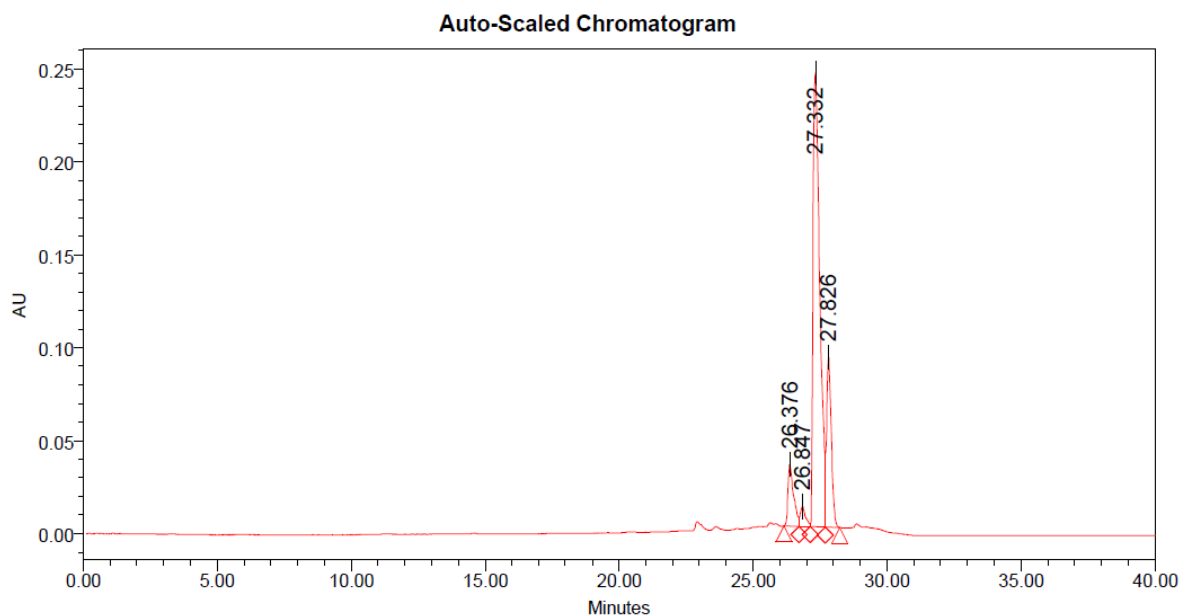


Figura 7.- Cromatograma de la fracción obtenida mediante la FR-C18 bajo las condiciones descritas en el apartado 3.2.1.6.1.1.

4.1.4.3 Aislamiento de los serrulatanos

Para aislar los serrulatanos se pasó la fracción que los contenía, nuevamente, por una FR-C18, con la cual se obtuvo una fracción en la que se observaron solamente los picos de interés (t_R 27.586 y 28.119 min); el cromatograma perteneciente a esta fracción se muestra en la figura 8.

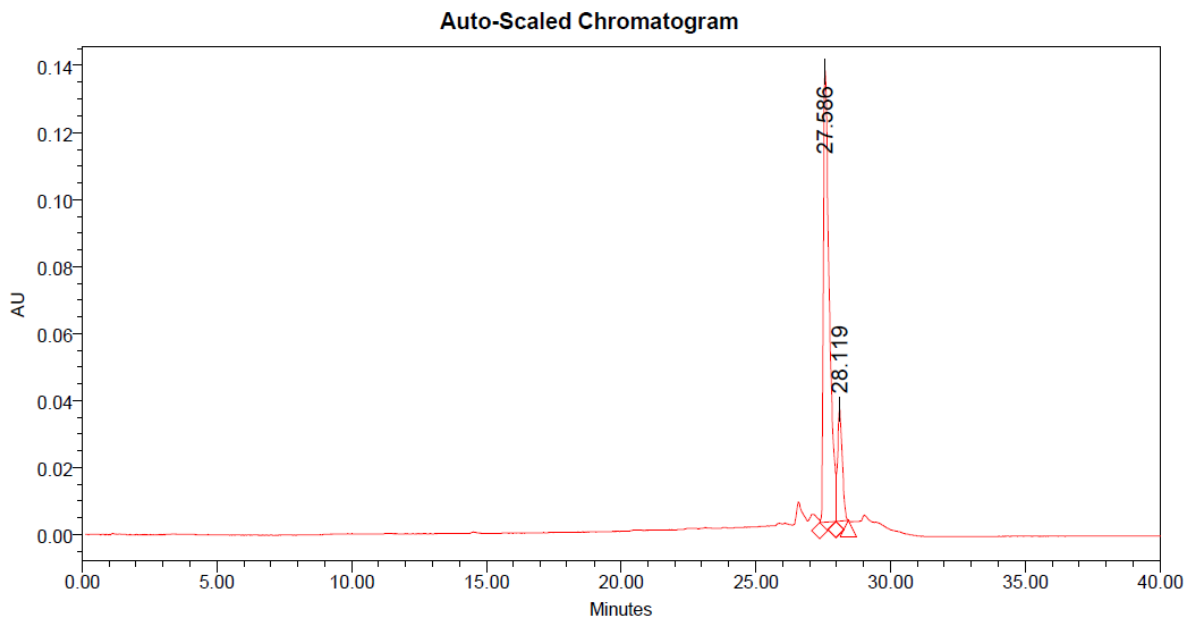


Figura 8.- Cromatograma de la fracción obtenida mediante una segunda FR-C18 bajo las condiciones descritas en el apartado 3.2.1.6.1.1.

4.1.4.4 Purificación de los serrulatanos.

Se obtuvieron 1.5 g de serrulatanos 1 (t_R 28.118 min); se inyectó en el CLAR una solución de 1mg/mL de este compuesto y en el cromatograma se observó un solo pico, representativo del serrulatanos aislado y puro, con un t_R de 27.403 min y un pico máximo de absorbancia a 283.5 nm. En la figura 9 se presenta el cromatograma con su correspondiente espectro de absorción en UV de 220 a 380 nm.

Se obtuvieron 5.7 g de serrulatanos 2 cuyo cromatograma presenta un solo pico con t_R y espectro de absorción idéntico a los del serrulatanos 1 (t_R 27.586 min).

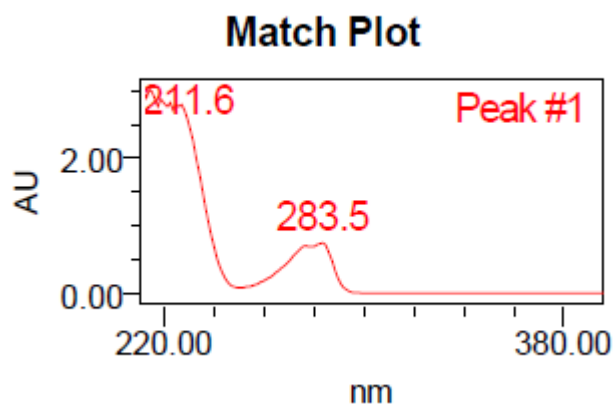
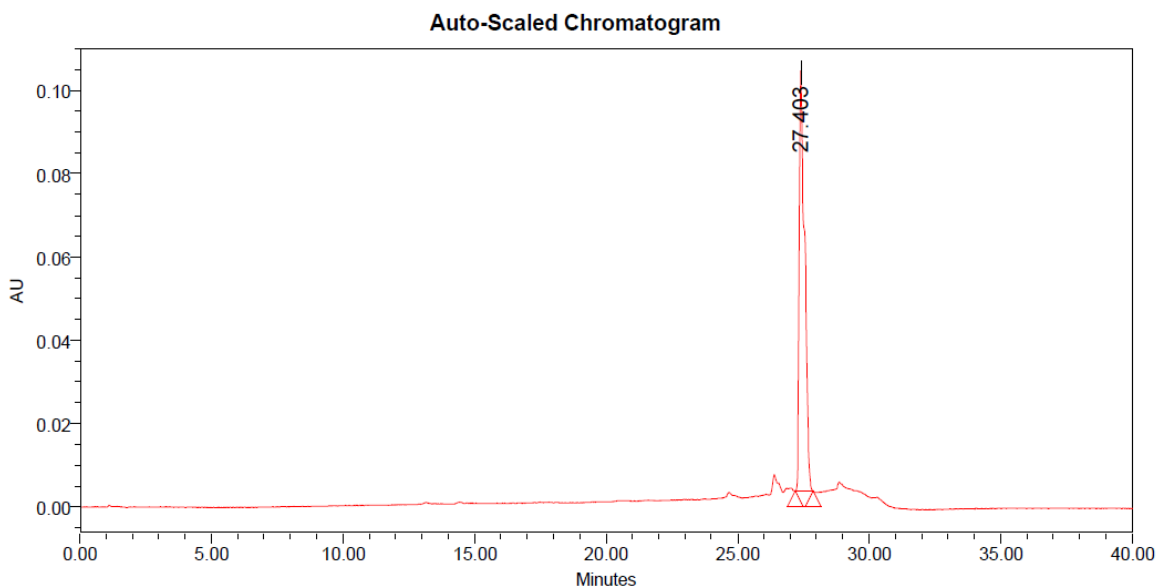


Figura 9.- Cromatograma del serrulatano, obtenido bajo las condiciones redactadas en el apartado 3.2.1.6.1.1 y su correspondiente espectro de absorción en UV.

4.1.4.4.1 Confirmación de la estructura de los serrulatanos por Resonancia Magnética Nuclear.

Se obtuvieron los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de los serrulatanos (Figura 10 y 11), en ellos se confirmó el desplazamiento químico de las señales, las multiplicidades esperadas para los serrulatanos y se calcularon los valores de las constantes de acoplamiento (Tabla VIII).

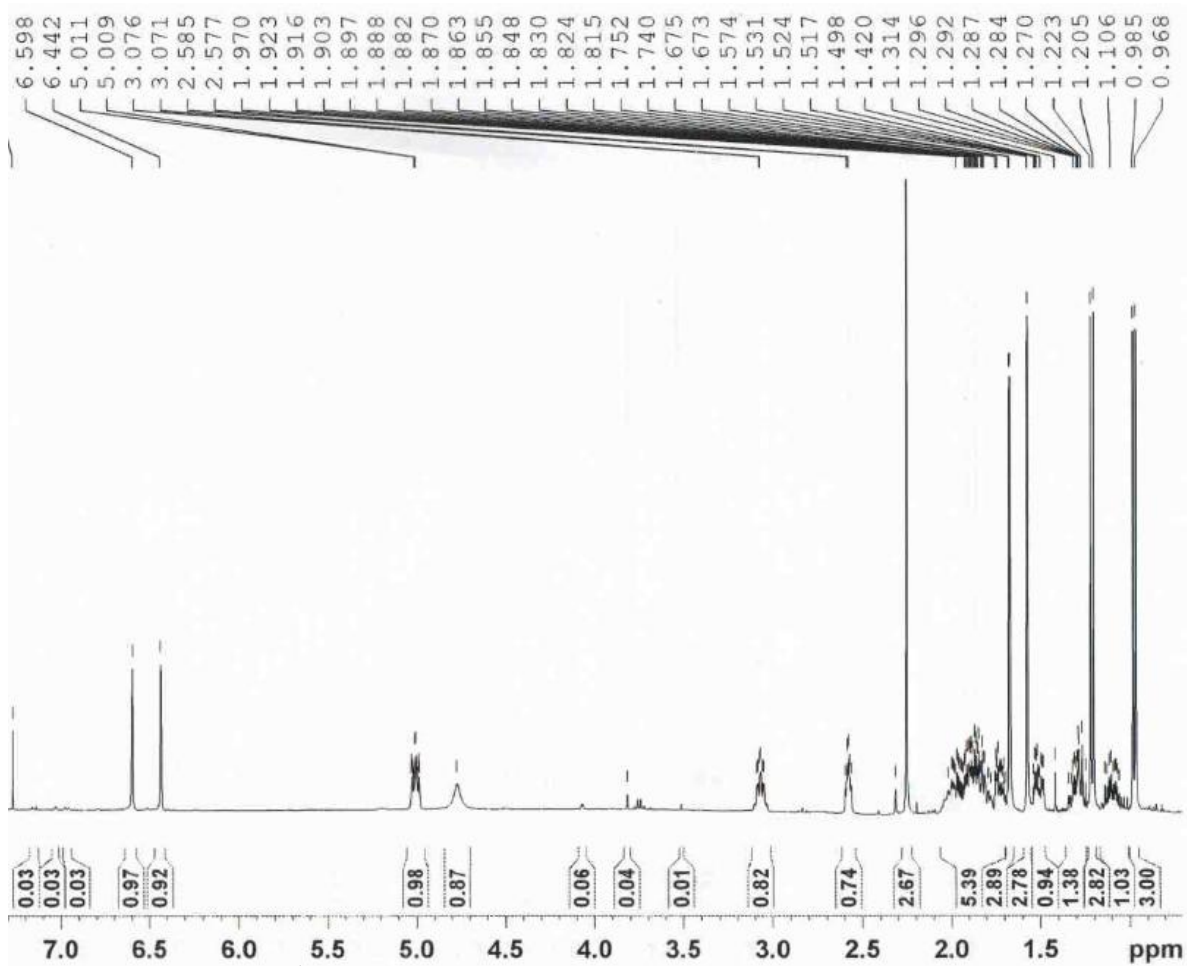


Figura 10.- Espectro de ¹H-RMN del serrulatano, aislado de la corteza de raíz de *L. frutescens*.

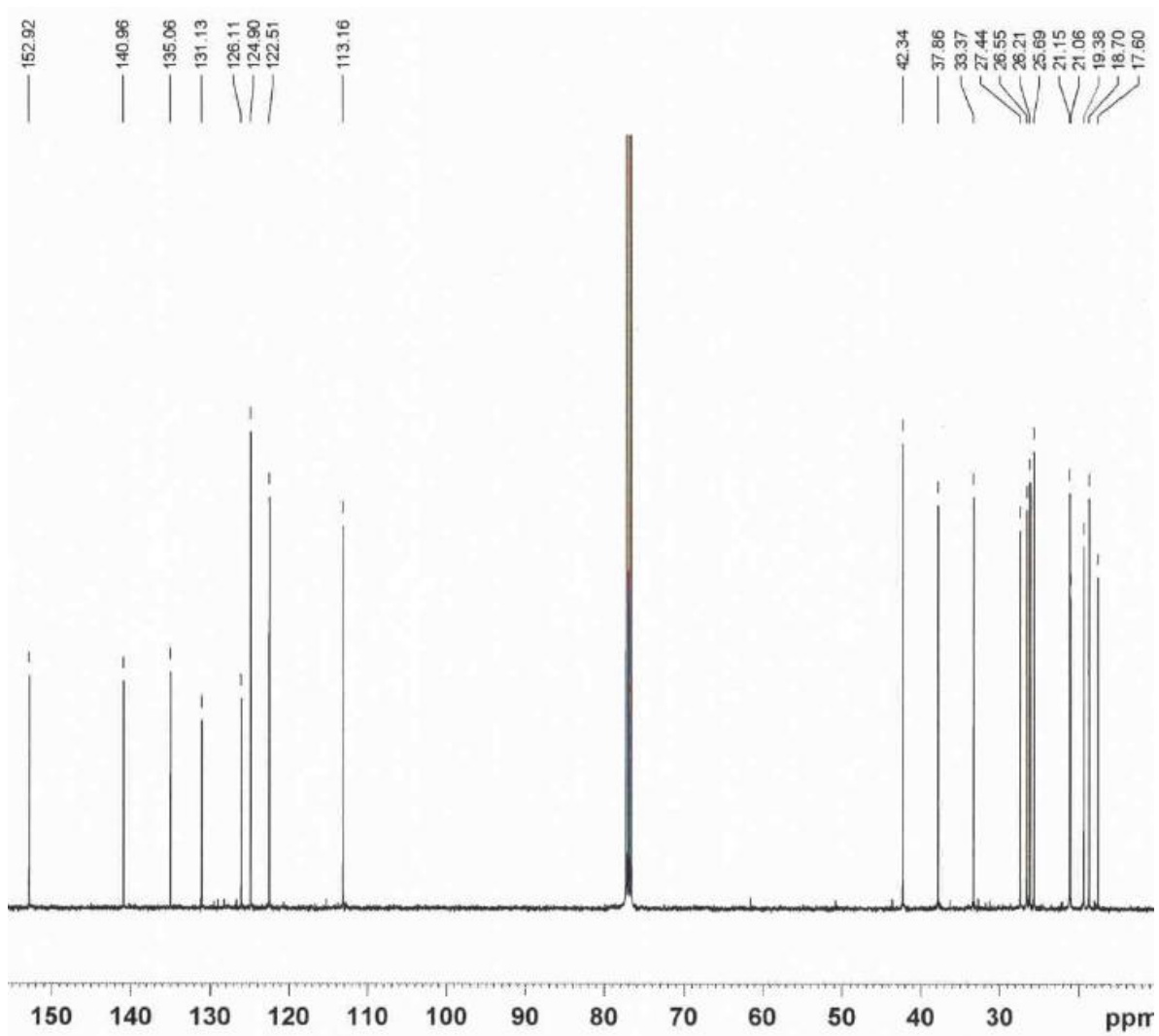


Figura 11.- Espectro de ^{13}C -RMN del serrulatano, aislado de la corteza de raíz de *L. frutescens*.

Tabla VIII.- Desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN (100.62 MHz); integraciones de ^1H -RMN (400.13 MHz), multiplicidades y constantes de acoplamiento (Hz).

No C	δC	δH
1	26.55	3.073 (m, 1H)
2	27.44	1.524 (m, 1H) y 1.965 (m, 1H)
3	19.38	1.824 (m, 1H) y 1.883 (m, 1H)
4	42.34	2.585 (m, 1H)
5	122.51	6.442 (s, 1H)
6	135.06	-----
7	113.16	6.598 (s, 1H)
8	152.92	-----
9	126.11	-----
10	140.96	-----
11	37.86	1.916 (m, 1H)
12	33.37	1.106 (m, 1H) y 1.314 (m, 1H)
13	26.21	1.970 (m, 1H) y 1.855 (m, 1H)
14	124.90	5.009 (m, 1H)
15	131.13	-----
16	25.69	1.674 (s, 3H)
17	17.60	1.574 (s, 3H)
18	18.70	0.976 (d, J 6.8 Hz, 3H)
19	21.06	2.252 (s, 3H)
20	21.15	1.214 (d, J 7.2 Hz, 3H)
	-----	4.776 (OH)

4.1.4.4.1.2 Determinación del Poder Rotatorio.

En la tabla IX se muestran los resultados del poder rotatorio de cada uno de los serrulatanos. Los cuales se calcularon con la siguiente fórmula:

$$\alpha = ([\alpha]D^t) (l) (C)$$

α = Ángulo de rotación

$[\alpha]D^t$ = Ángulo de rotación específica

l = Camino óptico en dm

C = Concentración (g/mL)

Tabla IX.- Lecturas obtenidas y ángulo de rotación específico para los serrulatanos.

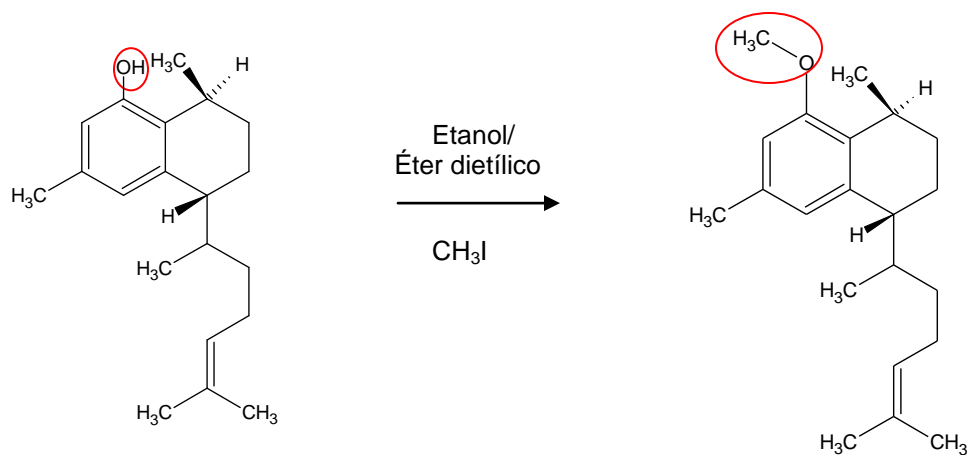
	Ángulo de rotación	Ángulo de rotación específica
Serrulatanos 1	-0.075	-37.5
Serrulatanos 2	-0.065	-32.5

En base a los resultados experimentales (datos espectroscópicos) obtenidos con ambos serrulatanos, se llegó a la conclusión que era una misma molécula la cual resulto ser novedosa, dado que no se encontró reporte de ésta en la literatura y se le dio el nombre de **leubetanol**.

4.2 Obtención de derivados del leubetanol.

4.2.1 Bloqueo del OH fenólico

La reacción se montó partiendo de 60 mg de leubetanol y se obtuvieron 3 mg como producto de reacción purificado. Se logró obtener el compuesto con la formación de un metoxilo.



El producto de reacción esperado, se confirmó con el espectro de ¹H-RMN (Figura 12), en el que se observó, entre otras, la señal de un metilo desplazado a campo bajo (δ 3.837 ppm), y ya no se percibió la señal del hidroxilo en δ 4.776 ppm.

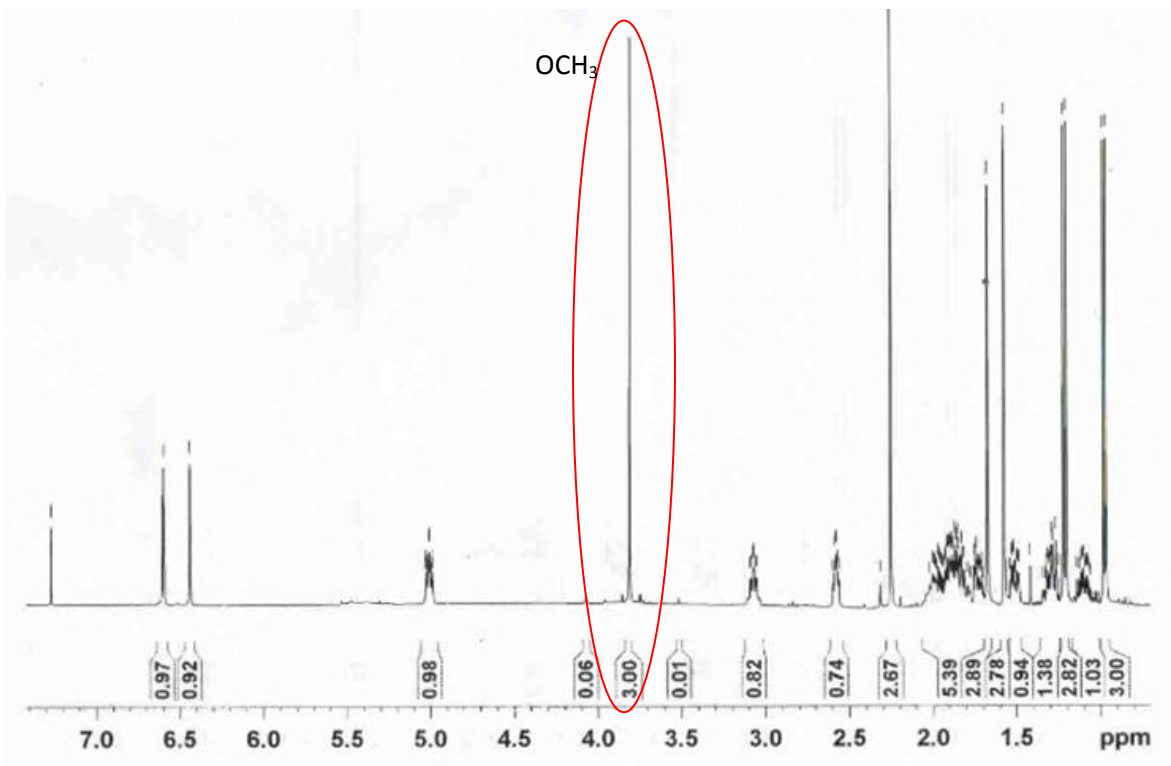


Figura 12.- Espectro de ^1H -RMN, del producto de reacción de bloqueo de OH fenólico, leubetanol metoxilado.

4.2.2 Formación del epóxido.

La reacción se llevó a cabo partiendo de 60 mg de leubetanol y se obtuvieron 4.6 mg como producto de reacción purificado. En CCF se observó que el R_f del epóxido fue menor al del compuesto de partida.



Se obtuvo el compuesto epoxidado, y se evidenció mediante los espectros de ^1H -RMN (Figura 13), y ^{13}C -RMN (Figura 14). En el espectro de protón ya no se observa el multiplete que aparecía a δ 5.005 ppm con una integración de un protón, representativo del metino olefínico.

En el espectro de carbono, se confirmó la ausencia de las señales de los carbonos olefínicos (δ 124.9 y 131.1 ppm) así como la presencia de dos señales de carbono de epóxido (δ 65.05 y 64.84 min).

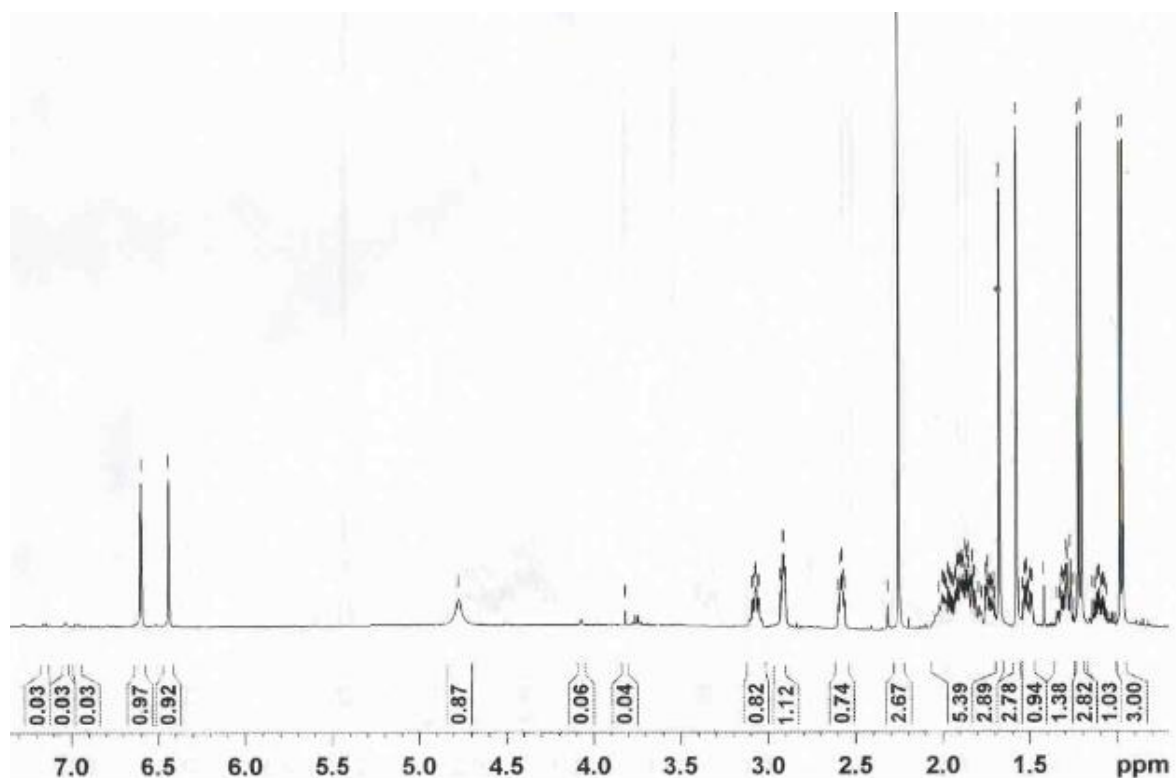


Figura 13.- Espectro de ^1H -RMN del producto de reacción de la formación del epóxido.

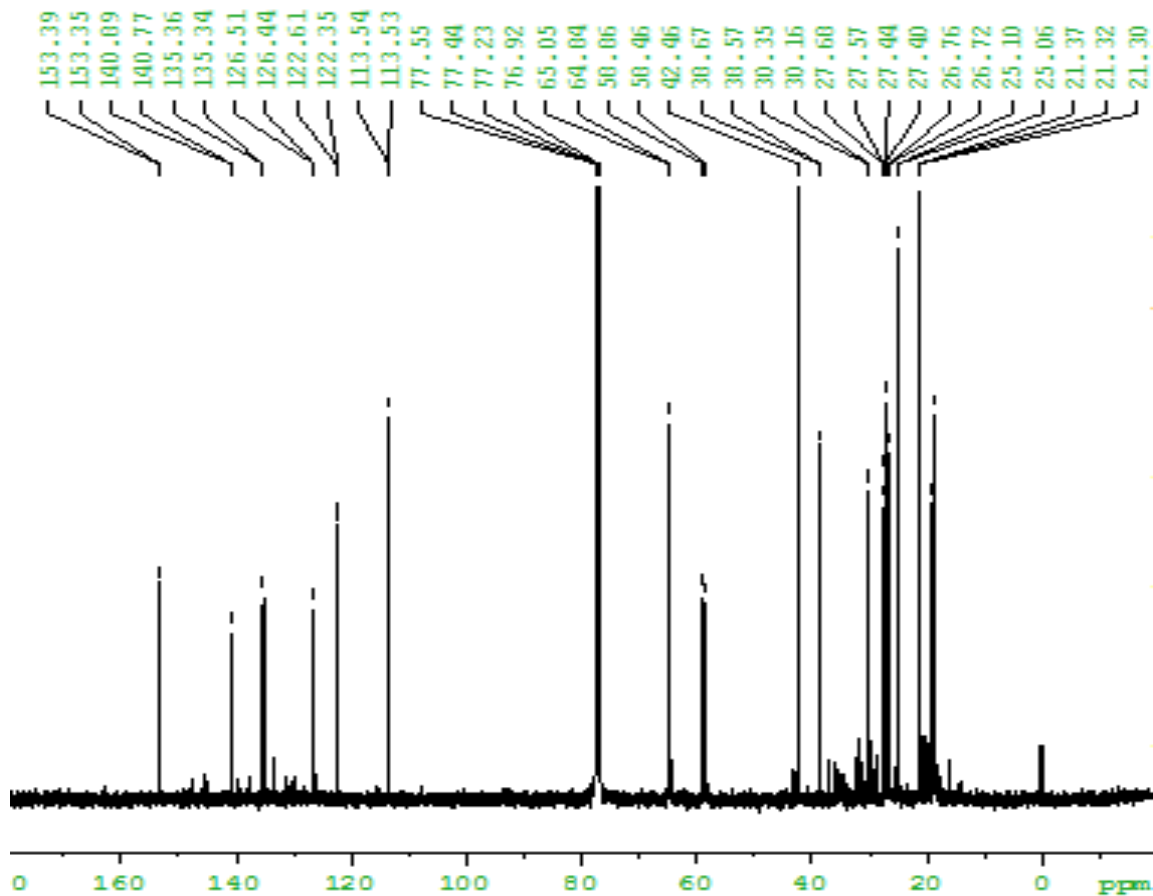


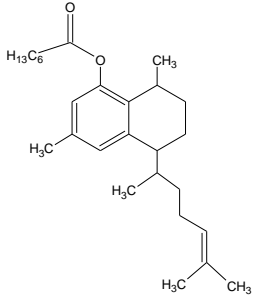
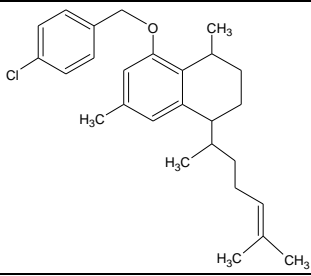
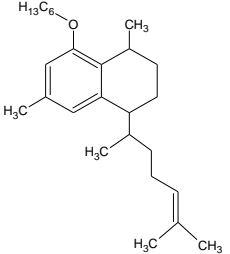
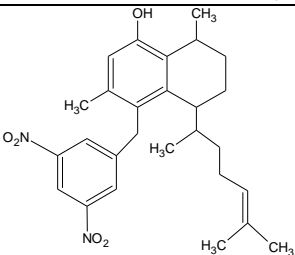
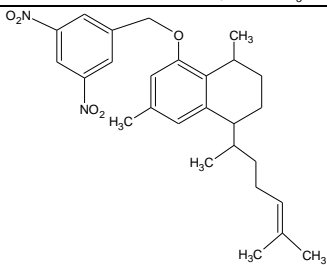
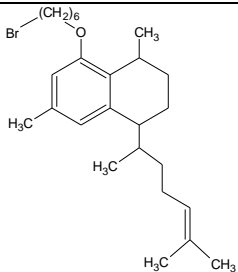
Figura 14.- Espectro de ^{13}C -RMN del producto de reacción de la formación del epóxido.

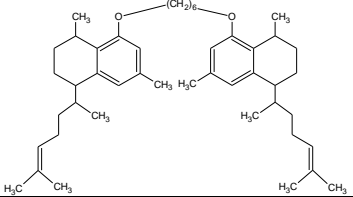
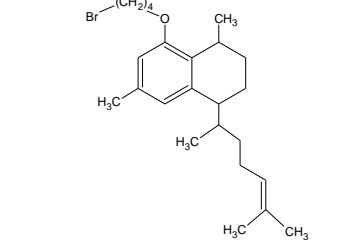
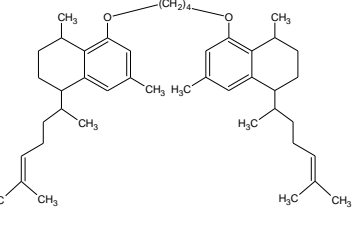
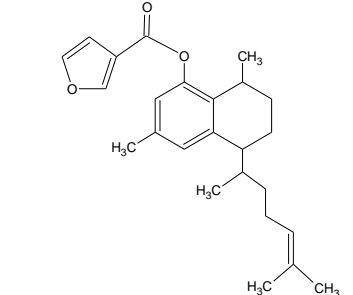
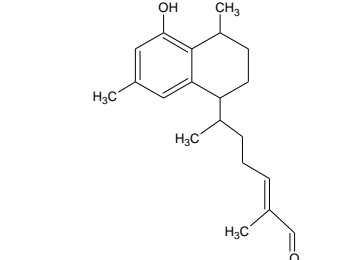
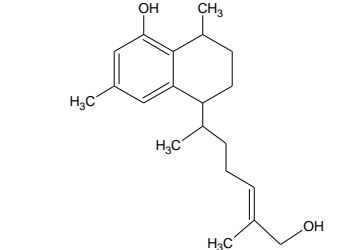
4.2.3. Otros derivados del leubetanol

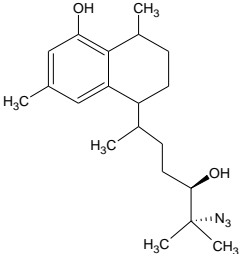
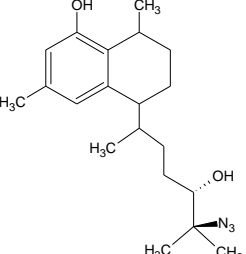
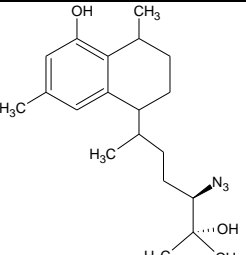
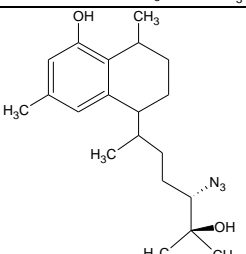
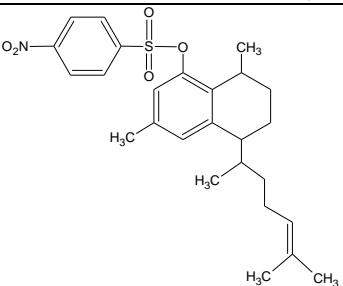
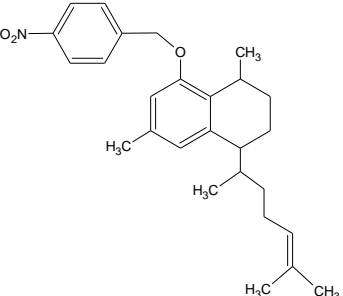
Como producto de una estancia post-doctoral del Dr. Jonathan Pérez Meseguer en la Universidad de Salamanca, España, se obtuvieron una serie de derivados semi-sintéticos del leubetanol. Las claves, estructuras, fórmula molecular y peso molecular se muestran en la tabla X.

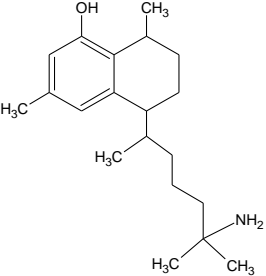
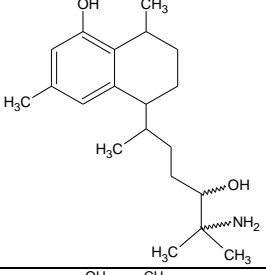
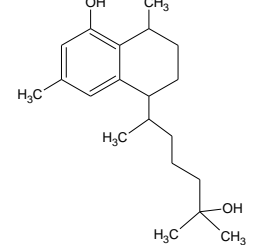
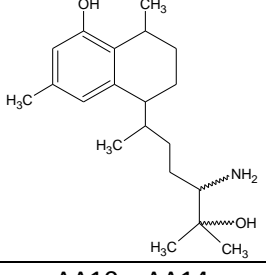
Tabla X.- Derivados semisintéticos del leubetanol, obtenidos por el Dr. Jonathan Pérez Meseguer en la Universidad de Salamanca, España.

Clave	Modificación	Estructura	FM	PM
E	Leubetanol		$C_{20}H_{30}O$	286.5
A-0	Hidrogenado		$C_{20}H_{32}O$	288.5
D-1	Acetilado		$C_{22}H_{32}O_2$	328.5
I-2	RO-p-nitro-benzoilo		$C_{27}H_{33}O_4N$	435.5
J-2	RO-benzoilo		$C_{27}H_{34}O_2$	390.5

K-2	RO-hexanoilo		$C_{27}H_{42}O_2$	398.5
L-1	RO-p-Cl-benzoilo		$C_{27}H_{35}OCl$	411
M-2	RO-hexilo		$C_{26}H_{42}O$	370.5
O-9	R-3,5-dinitro bencilo		$C_{27}H_{34}O_5N_2$	466.5
Q-4	RO-3,5-dinitrobencilo		$C_{27}H_{34}O_5N_2$	466.5
R-4	RO-hexil-bromo		$C_{26}H_{41}OBr$	449.5

R-7	RO-hexil-OR		$C_{46}H_{70}O_2$	655.0
S-5	RO-butil-bromo		$C_{24}H_{37}OBr$	421.5
S-8	RO-butil-OR		$C_{44}H_{66}O_2$	627.0
T-3	RO-furoilo		$C_{25}H_{32}O_3$	380.5
Y-4	Aldehído α,β insaturado		$C_{20}H_{28}O_2$	300.5
Z-11	Alcohol alílico		$C_{20}H_{30}O_2$	302.5

AA-10	Azida		$C_{20}H_{31}O_2N_3$	345.5
AA-14	Azida		$C_{20}H_{31}O_2N_3$	345.5
AB-2	Azida		$C_{20}H_{31}O_2N_3$	345.5
AB-4	Azida		$C_{20}H_{31}O_2N_3$	345.5
AJ-3	RO-p-nitro sulfonilo R-p-nitrobencensulfonato		$C_{26}H_{33}O_5N_1S$	471.5
AL-2	RO-p-nitrobencilo		$C_{27}H_{33}O_3$	421.5

AM-8	Amino		$C_{20}H_{33}ON$	303.5
AM-17	Amino, alcohol		$C_{20}H_{33}O_2N$	319.5
AN-9	Alcohol		$C_{20}H_{32}O_2$	304.5
AP-2	Amino, alcohol		$C_{20}H_{33}O_2N$	319.5
AA-12	Mezcla de azidas	AA10 y AA14	-----	-----
V16	Mezcla de azidas	AB2 y AB4	-----	-----

4.2.4 Determinación de la actividad anti-Tb y CMI de los derivados.

Se determinó la actividad anti-Tb y CMI de los derivados semi-sintéticos con el ensayo de MABA como se describe en el apartado 3.2.3. Los resultados se muestran en las tablas XI y XII.

Tabla XI.- CMI de los derivados, obtenidos en el departamento de Química Analítica, frente a la cepa sensible H37Rv de *M. tuberculosis*.

Derivado	CMI	
	$\mu\text{g/mL}$	μM
Metoxilado	>125.00	ND
Epóxido	31.25	103.3
Isoniazida	0.061	0.44
Rifampicina	0.061	0.07

ND = No Determinado

4.2.5 Determinación de la citotoxicidad de los derivados.

Los resultados de la citotoxicidad frente a la línea celular Vero, de los derivados semi-sintéticos cuya CMI para *M. tuberculosis* fue igual o menor a 62.5 $\mu\text{g/mL}$ se muestran en la tabla XIV como CI_{50} . Adicionalmente se evaluó la toxicidad de estos mismos compuestos frente a una línea celular neoplásica de cáncer cervical, HeLa, y se determinó el IS entre ambas líneas celulares.

Tabla XII.- CMI para los derivados, obtenidos por el Dr. Pérez, frente a la cepa sensible H37Rv de *M. tuberculosis*.

Clave	Anti-Tb	
	µg/mL	µM
E	7.80	27.90
A-0	7.80	27.70
D-1	16.00	48.70
I-2	>125.00	>287.00
J-2	>125.00	>320.10
K-2	>125.00	>313.60
L-1	>125.00	>304.10
M-2	>125.00	>337.30
O-9	7.80	17.10
Q-4	>125.00	>267.90
R-4	>125.00	>278.00
R-7	>125.00	>190.80
S-5	>125.00	>296.50
S-8	>125.00	>199.30
T-3	>125.00	>328.50

Clave	Anti-Tb	
	µg/mL	µM
Y-4	7.80	25.80
Z-11	7.80	25.80
AA-10	62.50	180.90
AA-14	31.25	90.40
AB-2	62.50	180.90
AJ-3	>125.00	>265.10
AL-2	>125.00	>296.50
AM-8	15.62	51.50
AM-17	31.25	97.80
AN-9	62.50	203.60
AP-2	31.25	97.80
AA-12	7.80	ND
V16	7.80	ND
INH	0.06	0.44
RIF	0.06	0.07

ND = No Determinado

INH y RIF controles positivos

Tabla XIII.- Actividades biológicas de los derivados semisintéticos frente a la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, células Vero e índice de selectividad.

	CMI H37Rv <i>M. tuberculosis</i>	CI₅₀ Vero	Relación CI₅₀ Vero	IS	Relación IS
Clave	µg/mL	µg/mL	Deriv/Orig	CI ₅₀ /CMI	Deriv/Orig
E	7.80	35.33	ND	4.53	ND
Epóxido	31.25	200.00	5.66	6.40	1.41
A-0	7.80	55.50	1.57	7.11	1.57
D-1	16.00	362.00	10.24	22.65	5.00
O-9	7.80	360.00	10.19	46.15	10.18
Y-4	7.80	35.00	0.99	4.49	0.97
Z-11	7.80	40.00	1.13	5.13	1.13
AA-10	62.50	70.30	1.99	1.12	0.24
AA-14	31.25	43.66	1.23	1.40	0.31
AB-2	62.50	52.50	1.48	0.84	0.18
AM-8	15.62	ND	ND	ND	ND
AM-17	31.25	45.00	1.27	1.44	0.32
AN-9	62.50	62.40	1.76	0.99	0.22
AP-2	31.25	50.50	1.43	1.61	0.13
AA-12	7.80	33.66	0.95	4.30	0.95
V16	7.80	445.00	12.59	57.05	12.60
Doxorrubicina	ND	0.15	ND	ND	ND

ND = No Determinado

Doxorrubicina control positivo

Tabla XIV.- Actividad citotóxica de los derivados, en $\mu\text{g/mL}$, Cl_{50} e IS.

	Cl_{50} Vero	Cl_{50} HeLa	IS
Clave	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\text{Cl}_{50}\text{Vero}/\text{Cl}_{50}\text{HeLa}$
E	35.33	8.64	4.08
A-0	55.50	5.60	9.91
D-1	362.00	40.50	8.93
O-9	360.00	38.50	9.35
Y-4	35.00	50.60	0.69
Z-11	40.00	91.64	0.43
AA-10	70.30	61.67	1.13
AA-14	43.66	55.33	0.78
AB-2	52.50	55.05	0.95
AM-8	ND	47.26	ND
AM-17	45.00	32.26	1.39
AN-9	62.40	30.28	2.06
AP-2	50.50	20.07	2.51
AA-12	33.66	ND	ND
V16	445.00	72.00	6.18
Doxorrubicina	0.15	1.91	0.08

ND = No Determinado

Tabla XV.- Porcentajes de recuperación de extractos y fracciones.

Extracto o fracción	Porcentaje	Gramos
Metanólica	7.30	262.80
Hexánico	36.07	94.79
20:1 (VLC)	42.00	39.81
15:1	10.15	9.62
10:1	6.57	6.22
5:1	6.57	6.22
3:1	1.23	1.16
2:1	13.44	12.73
1:1	3.28	3.10
AcOEt	4.06	3.84
Metanol	12.70	12.03

4.3 Aislamiento y purificación de un compuesto, con actividad anti-Tb, partiendo de las fracciones minoritarias de la VLC.

Los porcentajes de recuperación de las fracciones de la VLC se muestran en la tabla XV.

4.3.1. Sistema óptimo para el monitoreo de los compuestos de interés.

De los sistemas de elución evaluados en el apartado 3.2.4.2.1 para CCF, se seleccionó como FM, hexano:AcOEt (3:1). Se agruparon las fracciones afines y se ubicó el compuesto de interés. En cada placa se incluyó la fracción original como referencia.

4.3.2 Análisis de la fracción VLC (3:1)

El aislamiento biodirigido se continuó con la fracción 3:1. Se analizó con CLAR. En el cromatograma obtenido con esta fracción, se observaron dos picos principales, uno con t_R de 17.810 min y otro con t_R de 21.788 min (Figura 15).

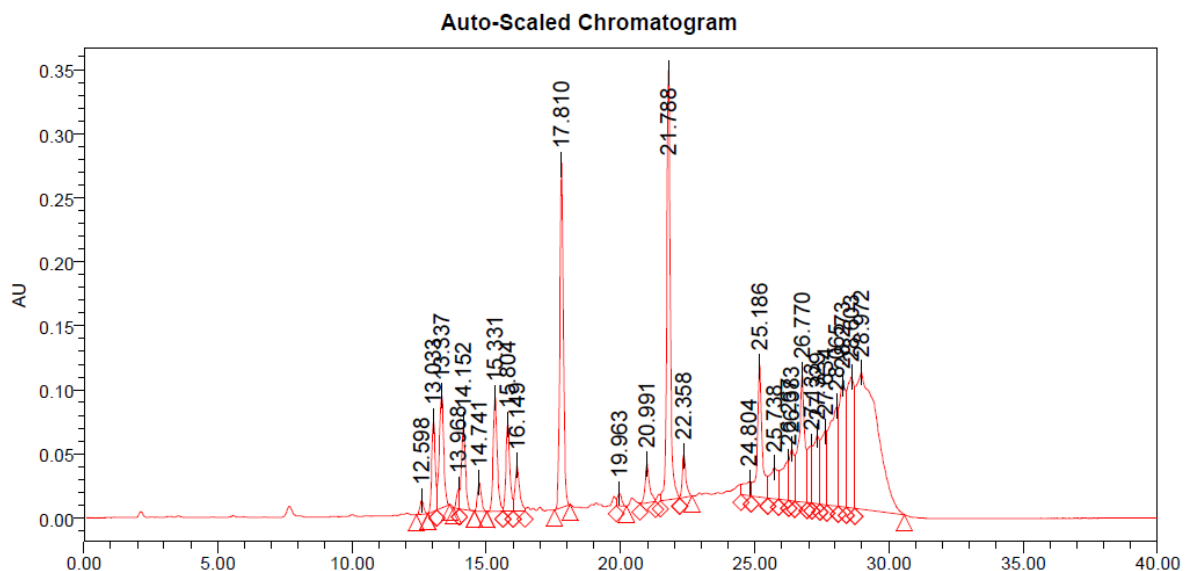


Figura 15.- Cromatograma de la fracción 3:1 de la VLC con las condiciones descritas en el apartado 3.2.4.1.

4.3.3. Aislamiento biodirigido de compuestos activos a partir de la fracción VLC (3:1)

4.3.3.1 Cromatografía en columna gravitacional

Se realizó una cromatografía en columna con sílica gel gravitacional, bajo las condiciones descritas en el apartado 3.2.4.2 y se colectaron fracciones de 3 mL. Éstas fueron agrupadas en 10 fracciones en base a la similitud de R_f que mostraron sus componentes. Las diez fracciones se analizaron por CLAR, con las condiciones indicadas en el apartado 3.2.4.1. En la tabla XVI se listan las fracciones con sus porcentajes de recuperación y el t_R de los picos mayoritarios.

Tabla XVI.- Fracciones obtenidas con la columna de sílica gel gravitacional, sus picos mayoritarios y respectivos porcentajes de recuperación.

Fracción	t _R Pico mayoritario (min)	% recup.
1	29.144	1.82
2	6 picos entre 25 y 30	7.51
3	13.746 y 14.080	5.57
4	12.772 y 17.211	6.26
5	19.416	11.92
6	17.747	19.74
7	17.907	8.05
8	7 picos entre 12.5 y 16.3	9.66
9	13.037	5.26
10	1.093	24.19

4.3.3.1.1 Determinación de la actividad anti-Tb y CMI de las fracciones obtenidas de la columna gravitacional.

Se evaluó la actividad anti-Tb de las diez fracciones obtenidas y se determinó la CMI, como se indica en el apartado 3.2.3 (Tabla XVII).

Tabla XVII.- CMI de las fracciones obtenidas con la columna gravitacional frente a la cepa H37Rv.

Fracción	CMI μg/mL
1	NE
2	31.25
3	125.00
4	63.00
5	125.00
6	63.00
7	63.00
8	63.00
9	125.00
10	NA

NE: No evaluada; NA: No activo

4.3.3.1.2. Determinación de la composición de las fracciones que presentaron CMI <125 μg/mL por CLAR.

Las fracciones que presentaron una CMI <125 μg/mL fueron analizadas con CLAR y se emplearon las condiciones descritas en el apartado 3.2.4.1. Los cromatogramas de estas fracciones se muestran en las figuras 16 a la 20.

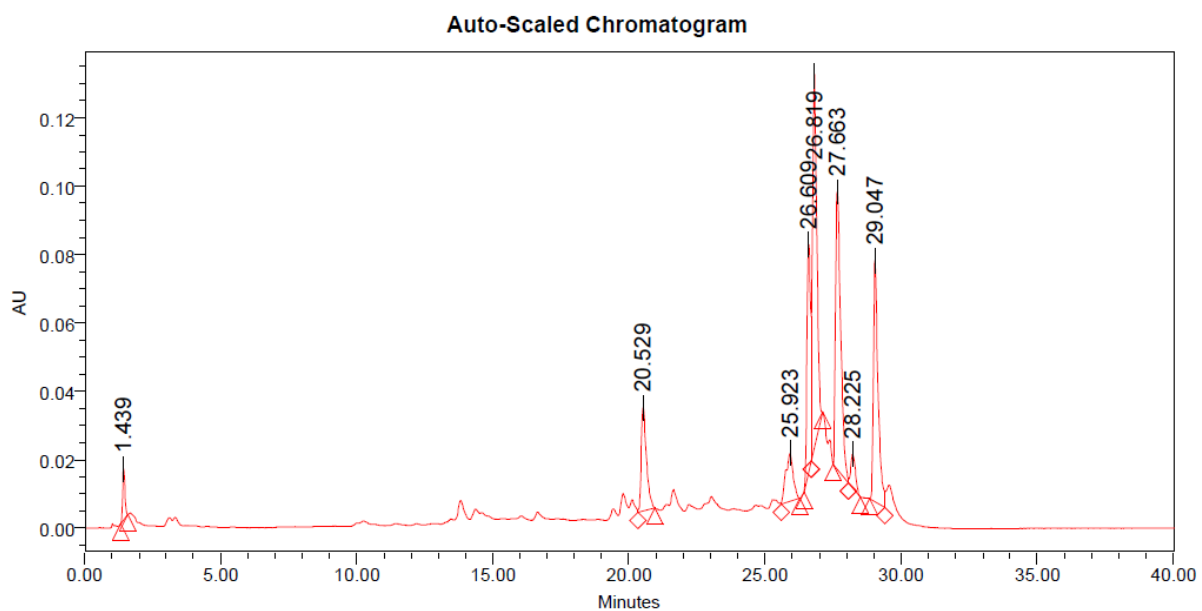


Figura 16.- Cromatograma de la fracción 2, de la columna de sílica gel gravitacional, obtenido bajo las condiciones descritas en el apartado 3.2.4.1.

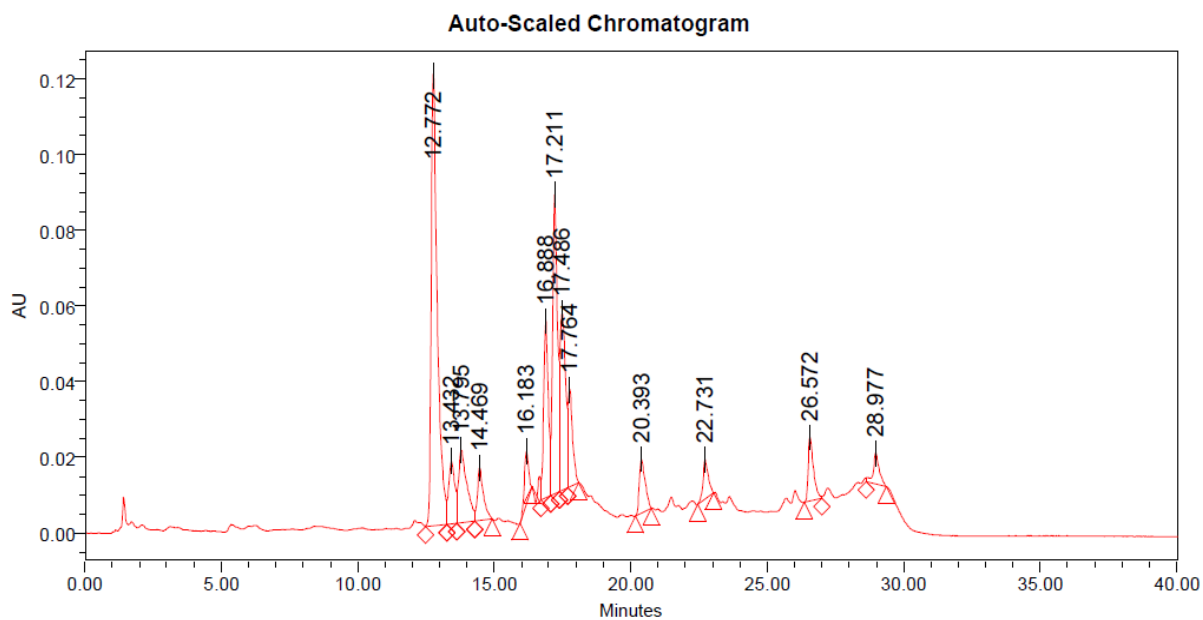


Figura 17.- Cromatograma de la fracción 4, de la columna de sílica gel gravitacional, obtenido bajo las condiciones descritas en el apartado 3.2.4.1.

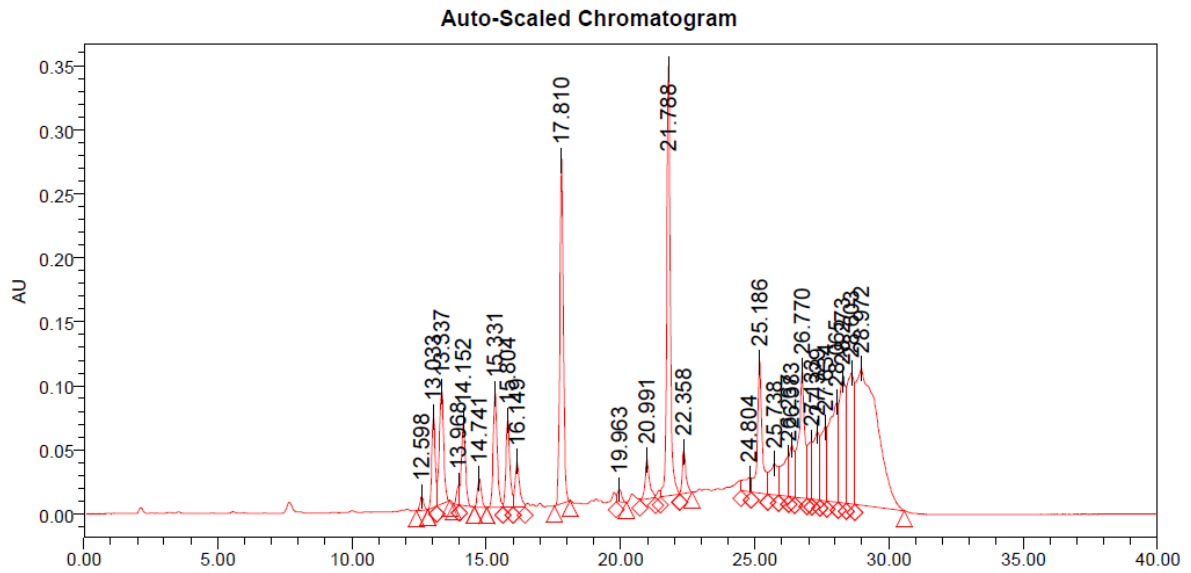


Figura 18.- Cromatograma de la fracción 6, de la columna de sílica gel gravitacional, obtenido bajo las condiciones descritas en el apartado 3.2.4.1.

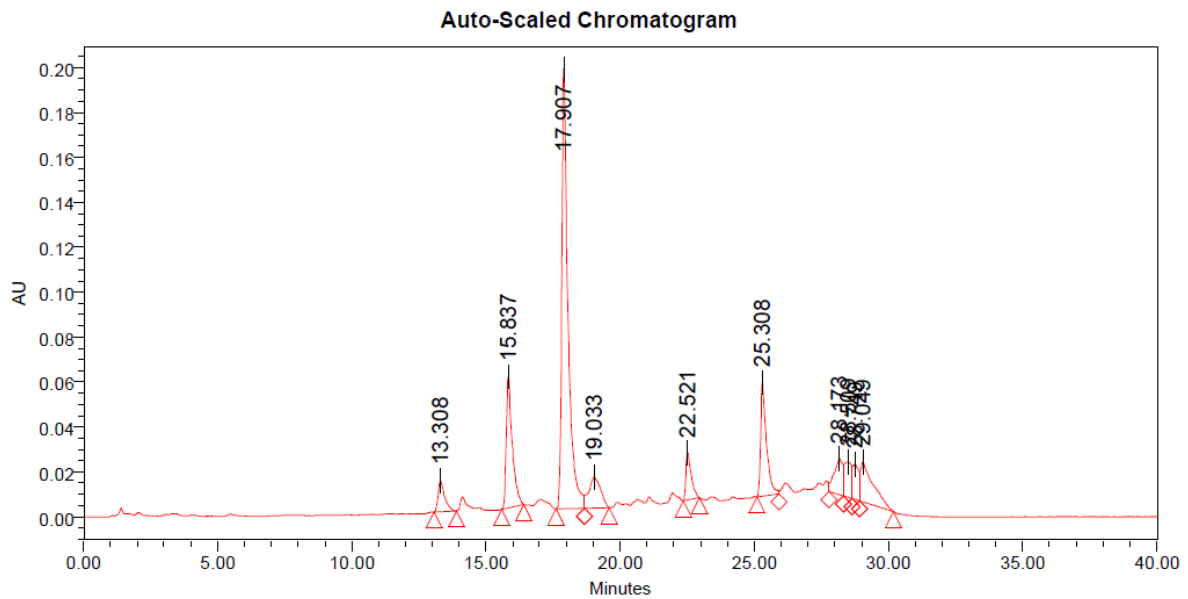


Figura 19.- Cromatograma de la fracción 7, de la columna de sílica gel gravitacional, obtenido bajo las condiciones descritas en el apartado 3.2.4.1.

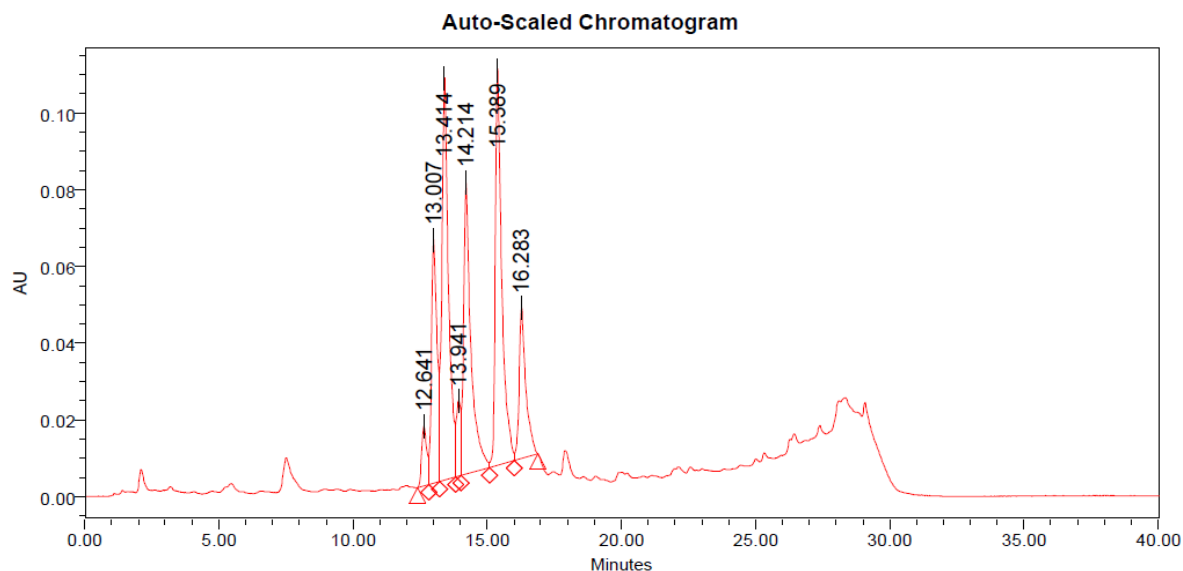


Figura 20.- Cromatograma de la fracción 8, de la columna de sílica gel gravitacional, obtenido bajo las condiciones descritas en el apartado 3.2.4.1.

4.3.3.2. Cromatografía lobar

La fracción seis de la columna de sílica gel gravitacional, denominada 3:1(6), se re-cromatografió con una columna FR-C18, como se indica en el apartado 3.2.4.3. El contenido de las fracciones colectadas, se monitoreo por CCF, con el sistema de elución seleccionado en el apartado 4.3.1, y se confirmó la presencia del compuesto de interés mediante CLAR, empleando las condiciones y gradiente descritos en el apartado 3.2.4.1. En el cromatograma obtenido (Figura 21) se observaron dos picos con t_R de 17 min. Un pico mayoritario con t_R de 17.116 min seguido de otro con t_R de 17.688 min, ambos con el mismo espectro de UV-Vis.

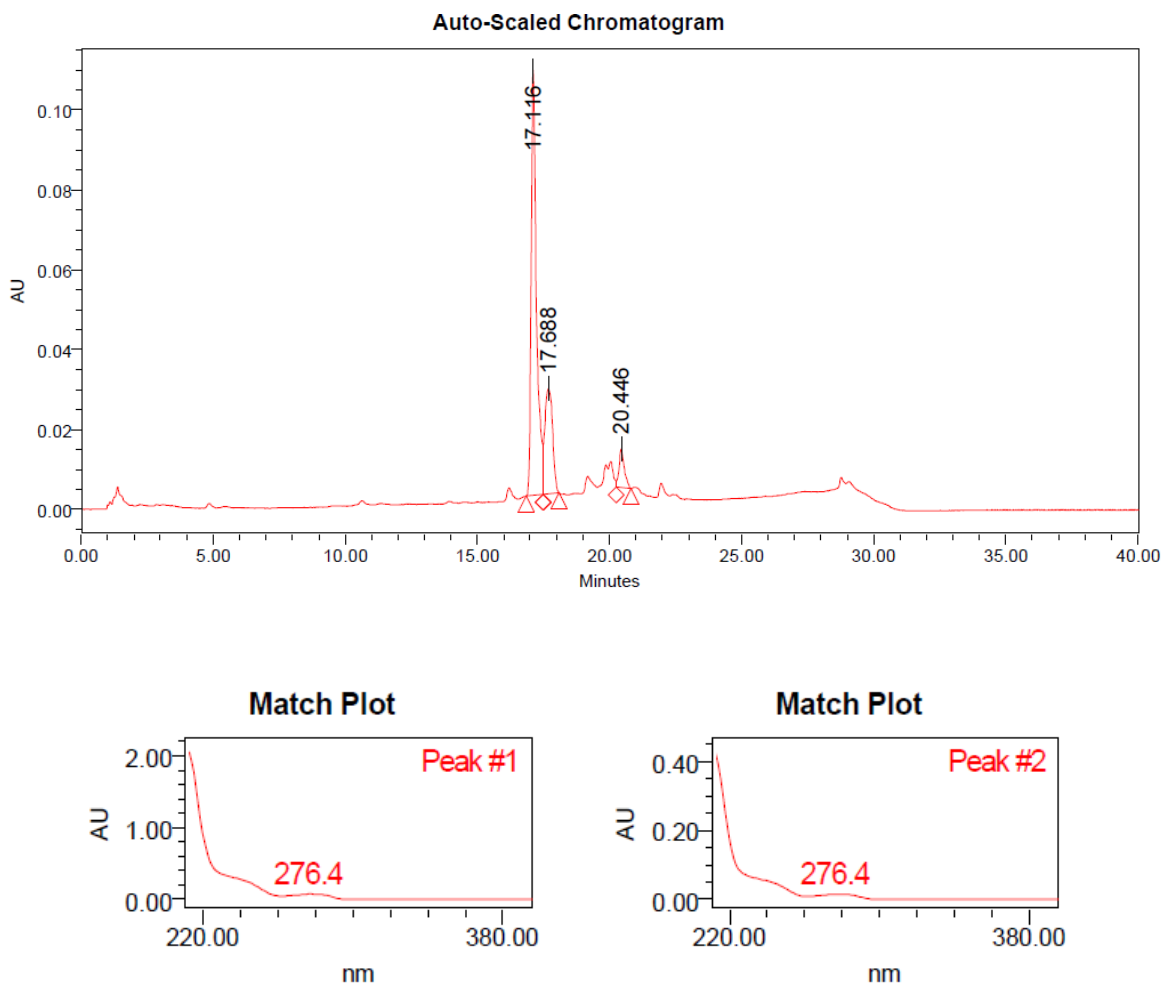


Figura 21.- Cromatograma y espectros, de la fracción con un compuesto casi puro, con las condiciones descritas en el apartado 3.2.4.1.

4.3.3.3. Purificación mediante CLAR-Preparativa.

De la CLAR-Preparativa, realizada siguiendo las condiciones descritas en el apartado 3.2.4.4, se obtuvo una fracción que presentó un solo pico, evidenciando el aislamiento de un compuesto puro, con un t_R de 17.557 min. El cromatograma se muestra en la figura 22.

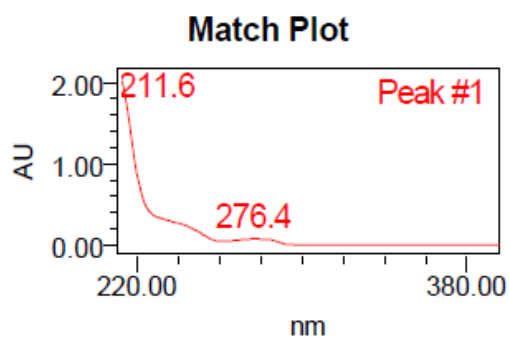
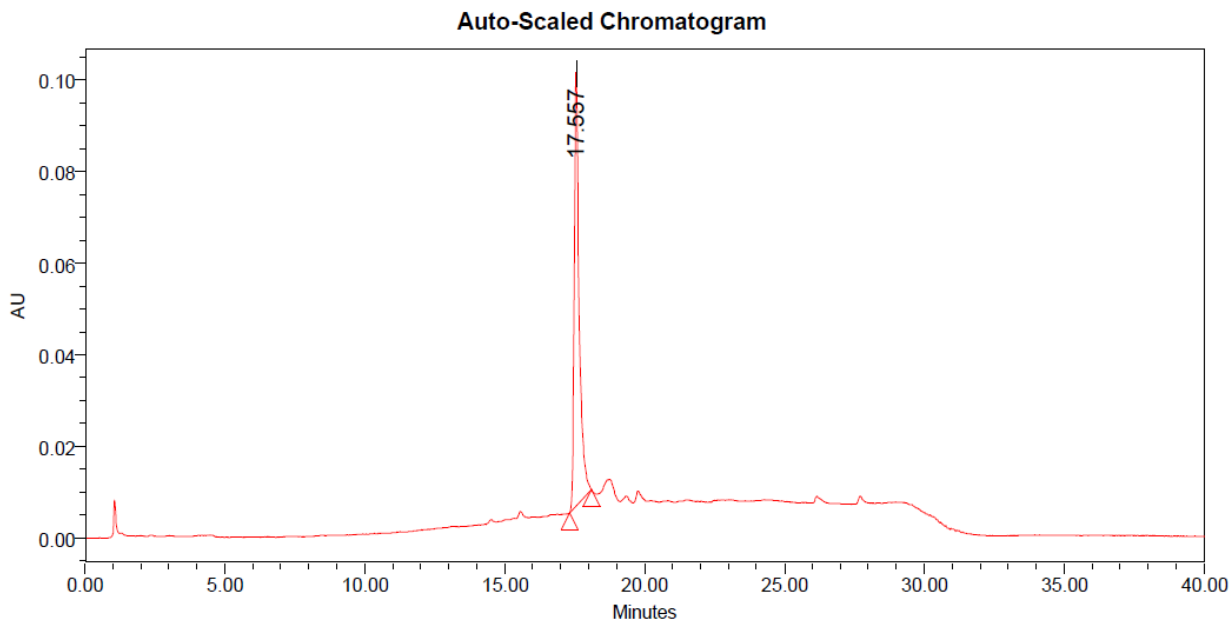


Figura 22.- Cromatograma y espectro del compuesto puro, obtenido con CLAR-Preparativo, con las condiciones descritas en el apartado 3.2.4.1.

4.4 Elucidación estructural del compuesto aislado de la fracción 3:1(6)

La estructura del compuesto aislado se estableció por el análisis de los espectros de RMN de 1D y 2D. Los espectros obtenidos se muestran en las figuras 23 a la 31. Con el espectro de ^{13}C -RMN (Figura 24) se obtuvo el desplazamiento químico de los carbonos y se clasificaron como metilo, metileno o metino, mientras que con el espectro de ^1H -RMN (Figura 23) se obtuvo el desplazamiento químico de las señales de los protones, las multiplicidades y se calcularon los valores de las constantes de acoplamiento (Tabla XVIII).

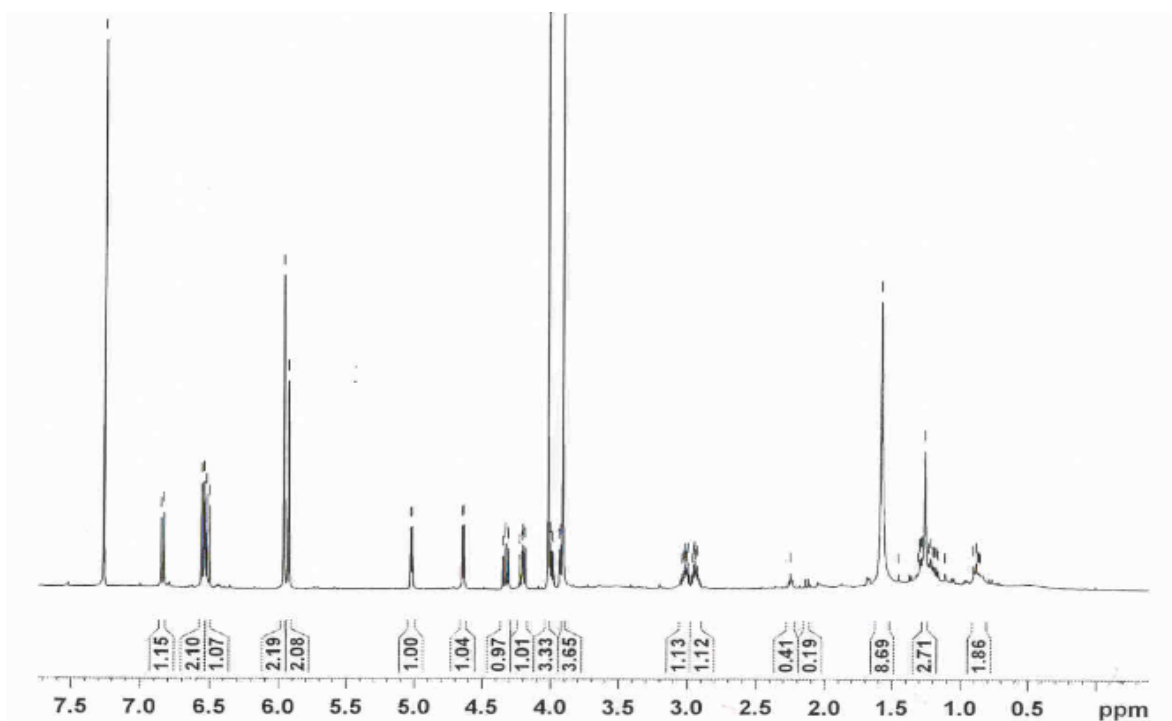


Figura 23.- Espectro de ^1H RMN del compuesto aislado de la fracción 3:1(6) de la corteza de raíz de *L. frutescens*.

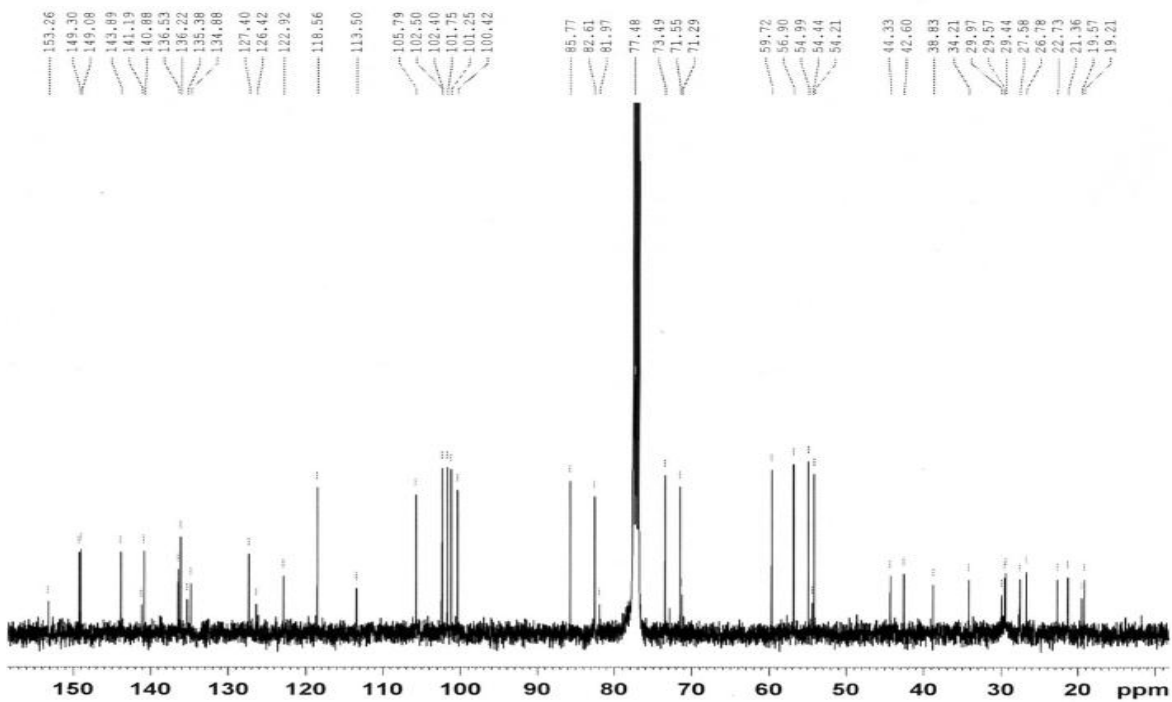


Figura 24.- Espectro de ^{13}C RMN del compuesto aislado de la fracción 3:1(6) de la corteza de raíz de *L. frutescens*.

Tabla XVIII.- Desplazamiento químico del compuesto aislado de la fracción 3:1(6). ^1H -RMN (400.13 MHz) y ^{13}C -RMN (100.62 MHz) en CDCl_3 , J en Hz y δ en ppm.

No.	δC	δH
1	54.2	3.01 (m, 1H)
2	82.6	5.03 (d, J 4.575, 1H)
4	71.5	4.21 y 3.90 (dd, J 9.111, 7.366, 2H)
5	55.1	2.95 (m, 1H)
6	85.7	4.65 (d, J 5.853, 1H)
8	73.6	4.33 y 4.00 (dd, J 9.096, 6.439, 2H)
1'	127.0	-----
2'	141.0	-----
3'	136.5	-----
4'	149.0	-----
5'	103.0	6.51 (d, J 8.08, 1H)
6'	118.0	6.84 (d, J 8.064, 1H)
7'	101.5	5.93 (s, 2H)
8'	60.0	3.91 (s, 3H)
1"	143.9	-----
2"	106.5	6.57 (d, J 1.245, 1H)
3"	135.0	-----
4"	149.5	-----
5"	144.0	-----
6"	100.5	6.55 (d, J 1.245, 1H)
7"	101.8	5.96 (s, 2H)
8"	57.0	4.1 (s, 3H)

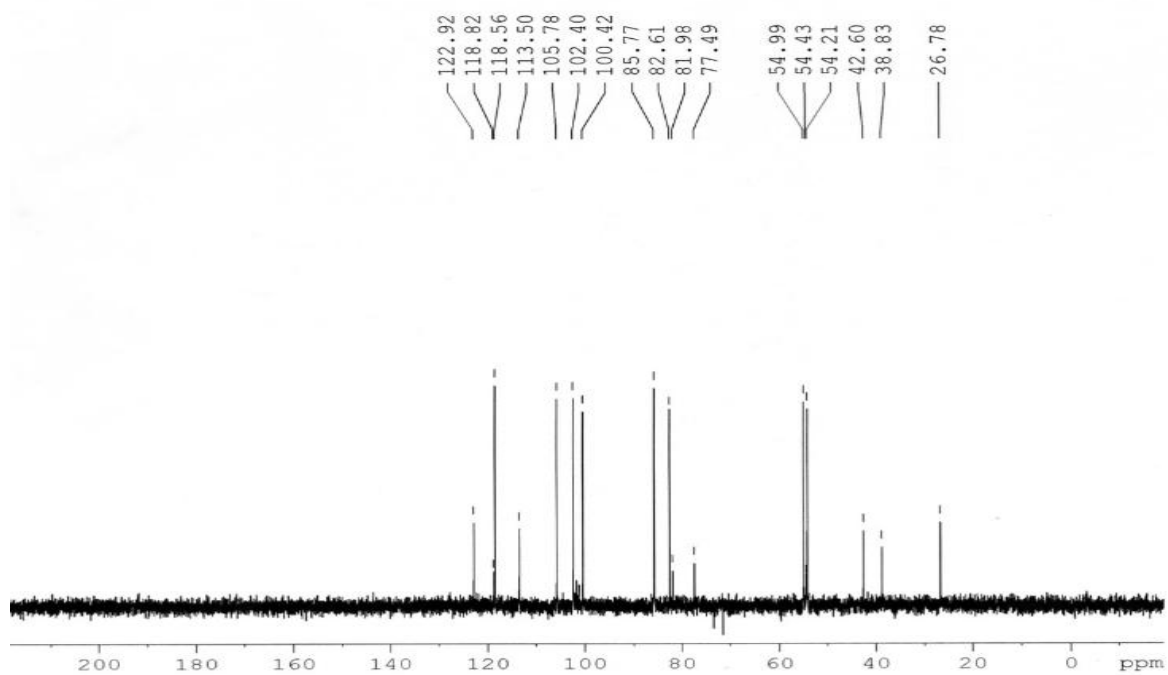


Figura 25.- Espectro DEPT 90 del compuesto aislado de la fracción 3:1(6) de la corteza de raíz de *L. frutescens*.

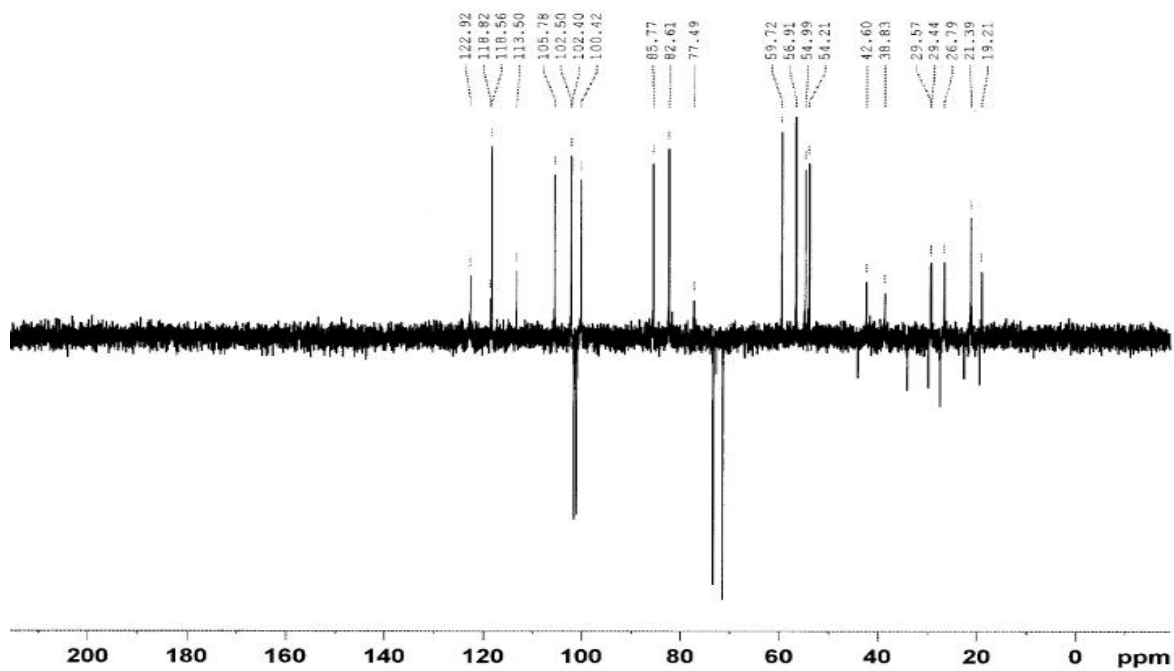


Figura 26.- Espectro DEPT 135 del compuesto aislado de la fracción 3:1(6) de la corteza de raíz de *L. frutescens*.

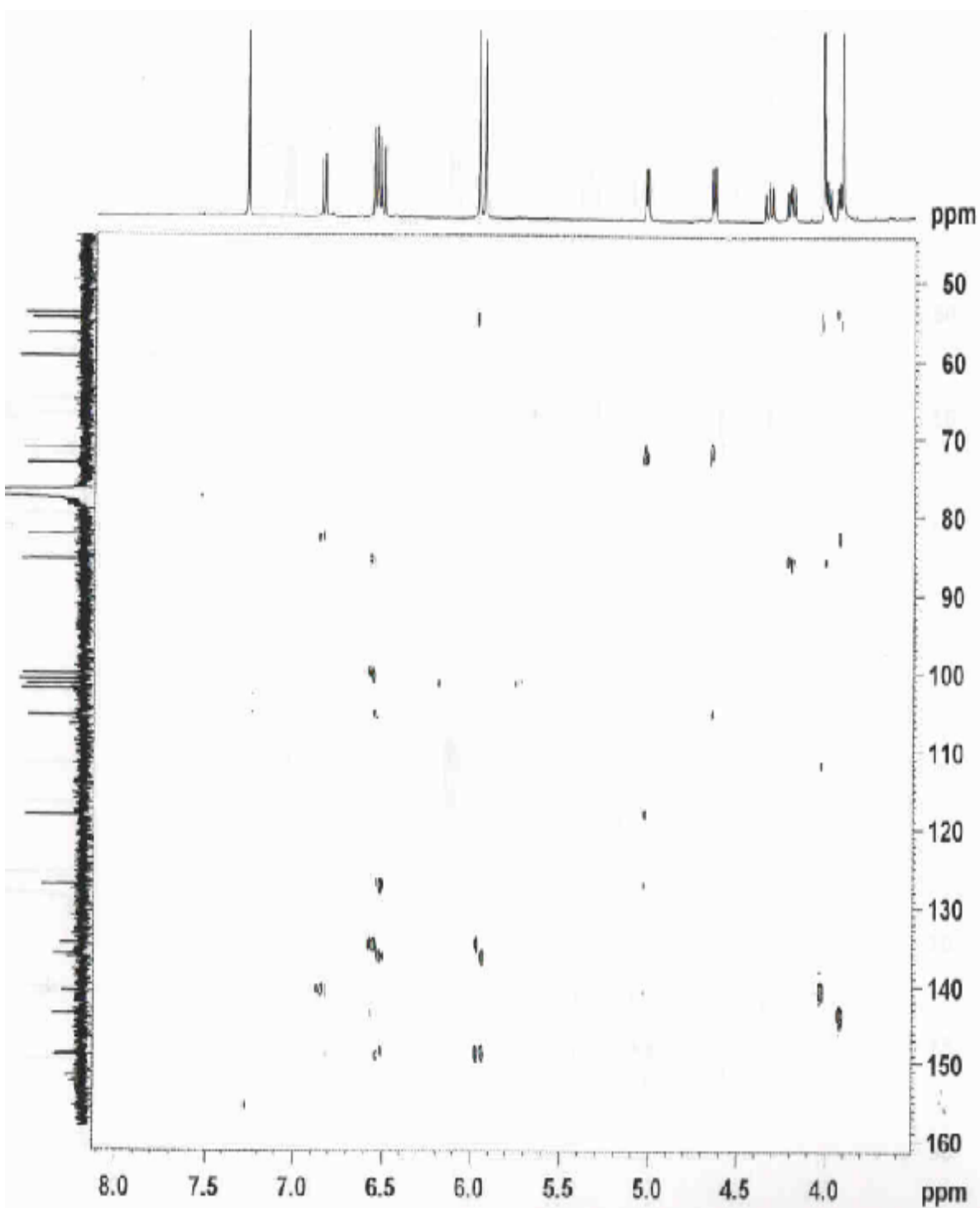


Figura 27.- Espectro HMBC del compuesto aislado de la fracción 3:1(6) de la corteza de raíz de *L. frutescens*.

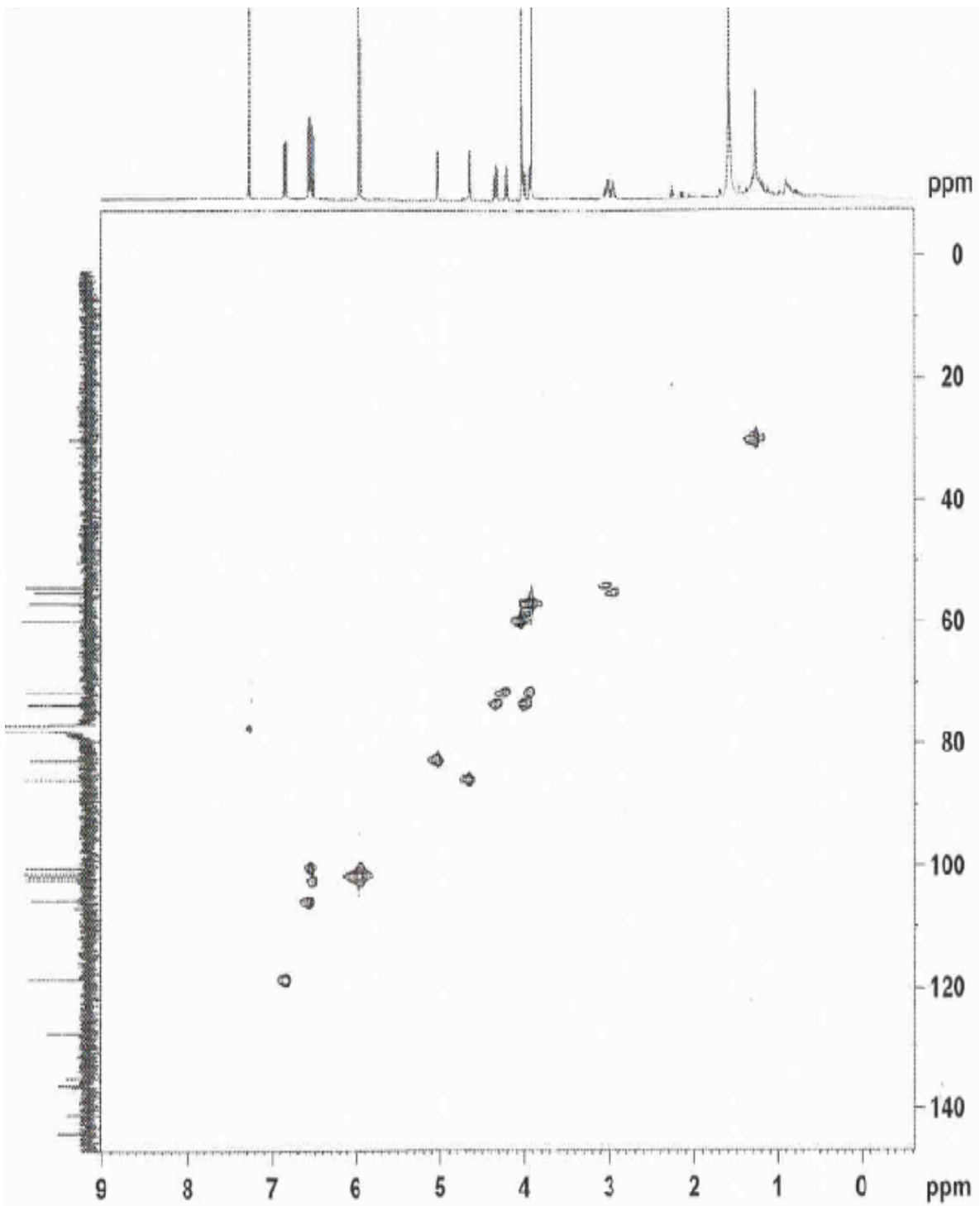


Figura 28.- Espectro HMQC del compuesto aislado de la fracción 3:1(6) de la corteza de raíz de *L. frutescens*.

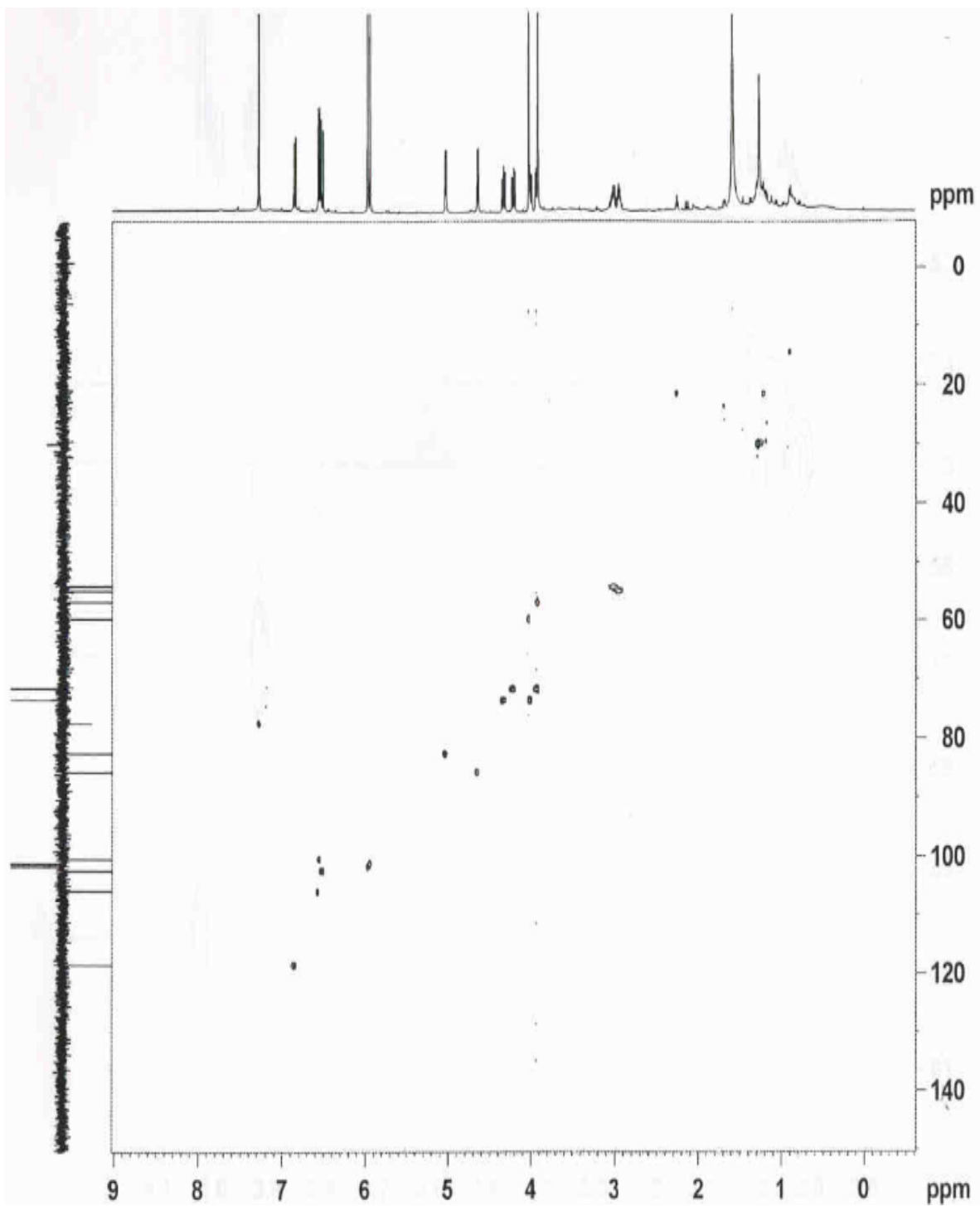


Figura 29.- Espectro HSQC del compuesto aislado de la fracción 3:1(6) de la corteza de raíz de *L. frutescens*.

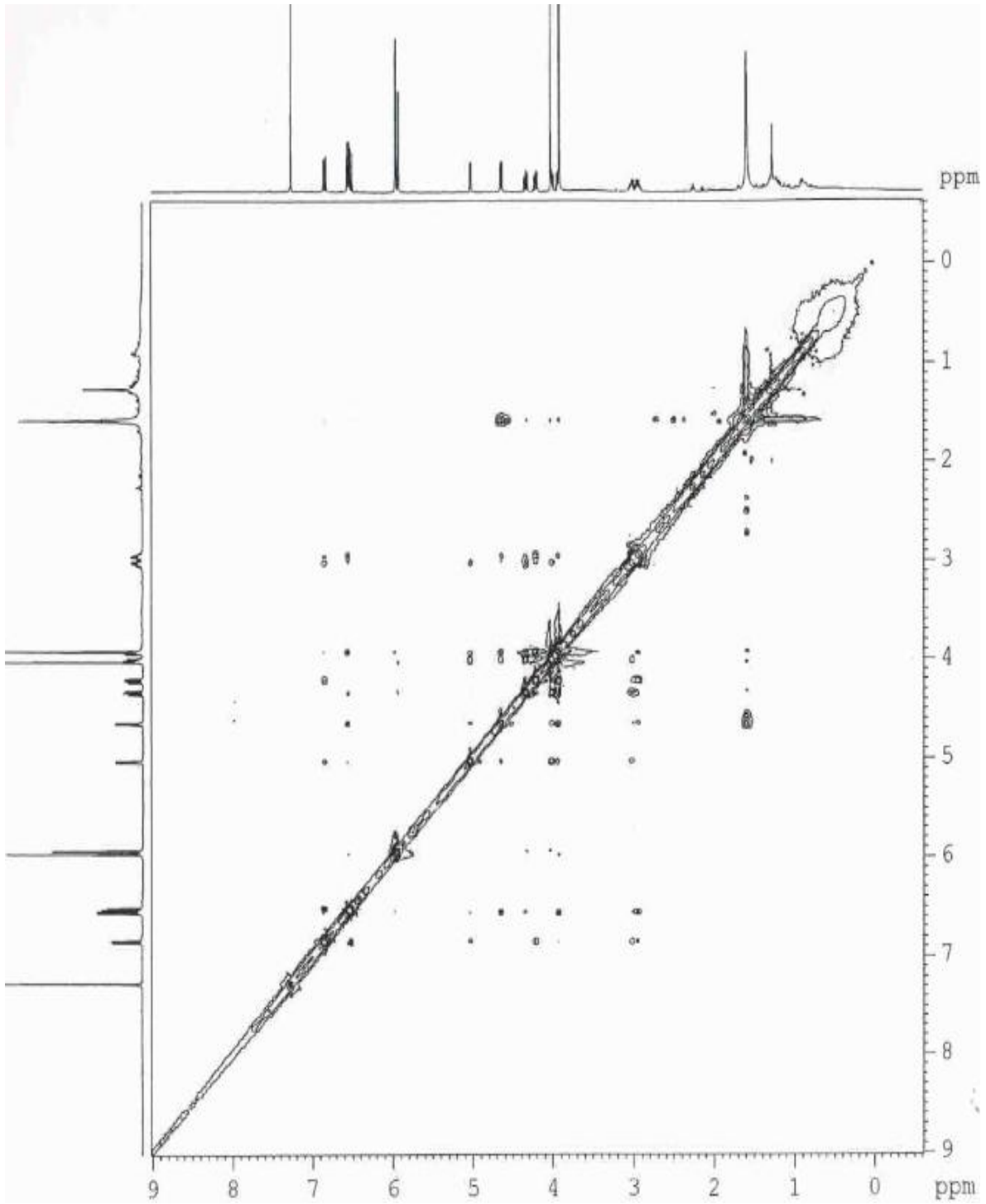


Figura 30.- Espectro NOESY del compuesto aislado de la fracción 3:1(6) de la corteza de raíz de *L. frutescens*.

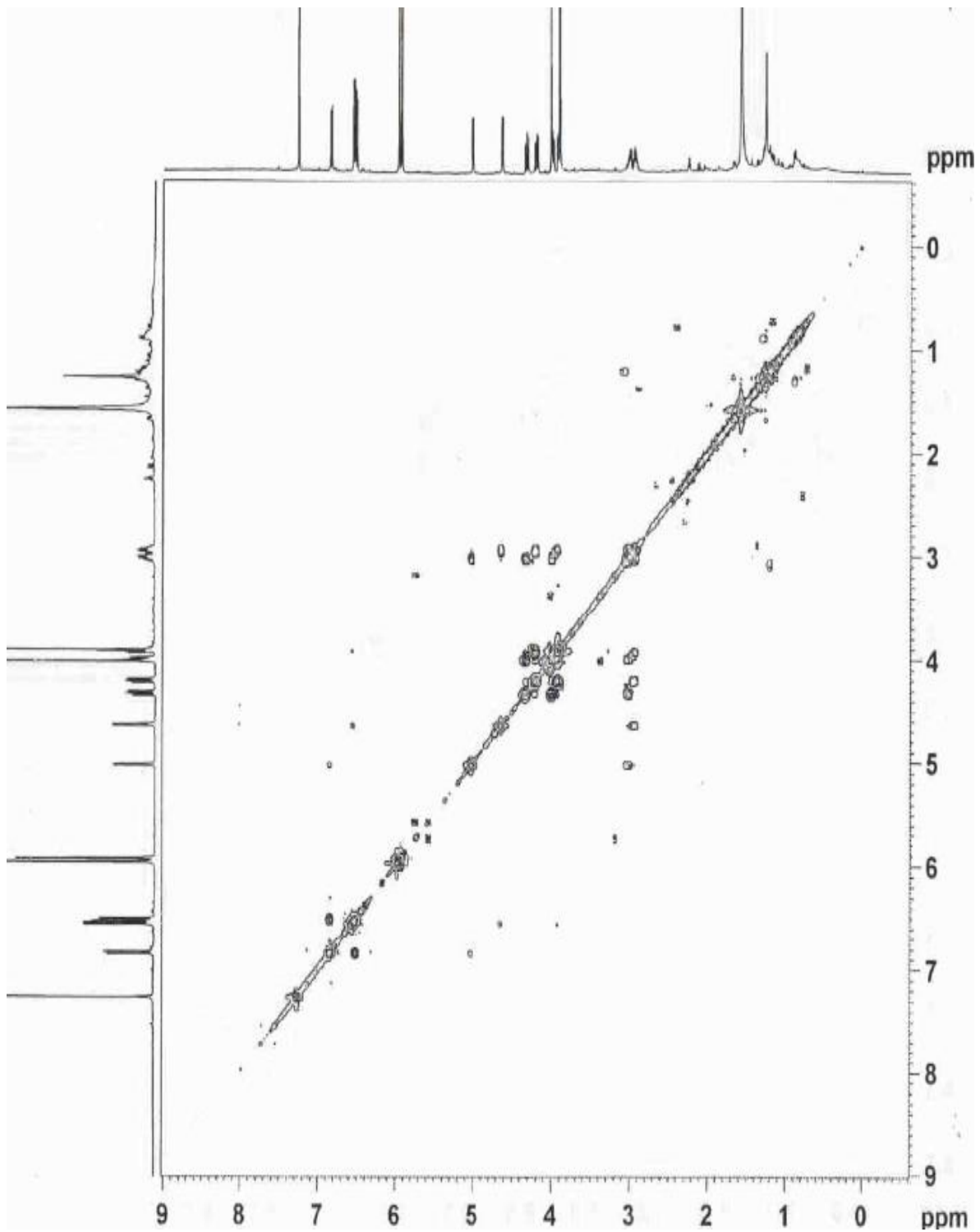


Figura 31.- Espectro COSY90 del compuesto aislado de la fracción 3:1(6) de la corteza de raíz de *L. frutescens*.

4.5 Actividad anti-Tb del compuesto aislado de la fracción 3:1(6)

Se siguió el procedimiento del apartado 3.2.3. La CMI obtenida fue de 63 $\mu\text{g/mL}$.

4.6 Actividad citotóxica del compuesto aislado de la fracción 3:1(6)

Se determinó la actividad citotóxica, expresada como CI_{50} , del compuesto aislado, frente a las líneas celulares Vero y HeLa como se describe en el apartado 3.2.4, con sus correspondientes IS. La CI_{50} hacia células Vero fue de 293.33 $\mu\text{g/mL}$ mientras que frente a células HeLa fue de 57.2 $\mu\text{g/mL}$. El IS se calculó como se indica en el apartado 3.2.6, y para *M. tuberculosis* fue de 4.65, mientras que para la línea celular neoplásica HeLa fue de 5.12.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

El resurgimiento de la Tb, es uno de los desafíos más serios de la salud pública desde principios del siglo XXI. A pesar de los continuos esfuerzos por controlarla, la Tb continúa siendo la principal causa de enfermedad y muerte en el mundo. El reciente incremento en casos de Tb, se asocia a la aparición del VIH y al rápido esparcimiento de cepas resistentes a medicamentos para esta enfermedad. Existe por lo tanto el requerimiento de nuevas clases de compuestos antimicrobianos que tengan actividad contra estas cepas. Algunos compuestos puros que se han encontrado de forma natural, así como extractos de formas superiores e inferiores de plantas, organismos marinos y terrestres, han demostrado que la actividad inhibitoria contra *M. tuberculosis* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. (Luna-Herrera J, 2007).

Son cuatro las razones que se pueden mencionar para justificar la necesidad de nuevos fármacos para el tratamiento de la Tb, dado que desde 1960 ha habido poco progreso en las terapias disponibles para el tratamiento de esta enfermedad (Bueno-Sanchez JG, 2010):

- 1) Mejorar el tratamiento actual mediante la disminución del tiempo de tratamiento y/o proveer un tratamiento intermitente más espaciado;
- 2) Mejorar el tratamiento para cepas M tb-MDR y M tb-XDR;
- 3) Proveer un tratamiento más efectivo para la Tb latente;

- 4) Disminuir efectos laterales, especialmente la hepatotoxicidad, lo cual a menudo, es un motivo por el que en algunos casos se obliga a terminar el tratamiento intempestivamente.

En una investigación desarrollada en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. se demostró que *L. frutescens* tiene buena actividad contra una cepa sensible y una cepa MDR de *M. tuberculosis* (CMI 62.5 $\mu\text{g/mL}$ para ambas cepas). A través del aislamiento biodirigido se reportaron dos estereoisómeros del serrulatano (Figura 1) activos, uno de ellos con CMI de 12.5 $\mu\text{g/mL}$ para ambas cepas y el otro con CMI de 12.5 $\mu\text{g/mL}$ y 6.25 $\mu\text{g/mL}$ para la cepa sensible y resistente, respectivamente; sin embargo, ambos compuestos resultaron tóxicos en un ensayo con larvas de *A. salina*, con una CI_{50} de 8.72 $\mu\text{g/mL}$ y 9.87 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Los compuestos aislados (Figura 1) presentaron prácticamente los mismos espectros en UV-Vis y espectrometría de masas (EM), el peso molecular de ambos se determinó en 286 g/mol y como fórmula molecular se estableció $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$; para ambos compuestos el pico base en el EM fue de m/z 175. En los espectros de ^1H -RMN de ambos compuestos se observaron las mismas señales, con los mismos patrones de multiplicidades, presentando ligeras variaciones en los desplazamientos de las señales que van de 0.01 a 0.18 ppm, mientras que en el espectro de ^{13}C -RMN se observaron el mismo número de señales para ambos compuestos con variaciones en los desplazamientos no significativos que van de 0.027 a 0.265 ppm. Solo se llegó a establecer la estructura planar de los compuestos, como diterpenos con estructura de serrulatanos similares al erogorgiaeno, sin llegar a identificar cuáles eran las diferencias entre ambos compuestos, sin embargo, un compuesto con la misma estructura planar, había sido reportado previamente como el isómero 5-[(1S)-1,5-dimetil-4-hexenil]-5,6,7,8-tetrahydro-3,8-dimetil-(5R,8S)-1-naftalenol (Figura 1), con número de CAS 433300-41-5; conocido también como elisabethanol (Jacobs RS, 2005).

Por esta razón, uno de los objetivos del presente trabajo consistió en aislar mayor cantidad de los serrulatanos para:

- a) Realizar los estudios necesarios mediante los cuales se pudiera establecer la diferencia y/o semejanza entre ambos compuestos.
- b) Utilizar este compuesto como punto de partida para obtener derivados con una mayor actividad y/o menor toxicidad.

5.1 Obtención de los serrulatanos a gran escala.

Para cumplir en forma eficiente con el propósito de tener los serrulatanos en gran escala, debido a que una misma especie vegetal, que crece en diferentes zonas, puede presentar variación en cuanto a la cantidad de cada uno de sus metabolitos secundarios se recolectó en una misma fecha la raíz de *L. frutescens*, en cuatro diferentes zonas de Nuevo León, y se comparó el contenido de serrulatanos en las fracciones hexánicas de los especímenes colectados.

De cada espécimen se obtuvo el extracto metanólico, y a partir de este se obtuvo la fracción hexánica, como se menciona. Las cuatro fracciones hexánicas se analizaron bajo las mismas condiciones por CLAR.

La primera extracción se realizó con un solvente polar orgánico; se seleccionó metanol, debido a que Molina-Salinas, en el 2007, demostró que el extracto metanólico de corteza de raíz de *L. frutescens* era activo contra una cepa sensible y una cepa MDR de *M. tuberculosis*, con una CMI de 62.5 µg/mL. Un solvente polar orgánico (etanol, metanol, o una mezcla hidro-alcohólica) se emplea en un intento por extraer tantos compuestos como sea posible. Esto se basa en la capacidad de los solventes alcohólicos de aumentar la permeabilidad de la pared

celular, facilitando una eficiente extracción de grandes cantidades de constituyentes polares, medianamente polares y poco polares.

La extracción es el proceso de pasar un soluto de una fase a otra. La razón más frecuente para emplear la extracción es: aislar, concentrar o separar un analito de su matriz. Es mediante el contacto directo de ambas fases que se lleva a cabo la separación del analito (Harris D, 2007). La extracción líquido-líquido es una técnica de separación en la cual participan dos fases inmiscibles donde las fuerzas puestas en juego son fundamentalmente de tipo físico basándose en la ley de distribución, propuesta por Berthelot y Jungfleisch y desarrollada por Nernst, la cual establece que en el equilibrio, a presión y temperatura constantes, la relación de concentraciones de un soluto, entre dos fases inmiscibles, es constante siempre que dicho soluto se encuentre en la misma forma en ambas fases (Valcárcel-Cases M, 1990). En este caso, como el analito de interés estaba en un solvente polar, siendo los serrulatanos de un carácter no polar, el siguiente paso consistió en una extracción líquido-líquido con un solvente orgánico no polar (hexano).

En los cromatogramas obtenidos por CLAR se observa una buena resolución de los picos representativos de cada componente de los extractos, con su respectivo espectro de absorción a 254 nm, por lo que se pudieron identificar los picos de interés (Figuras 2, 3, 4 y 5); la intensidad de absorción del pico obtenido del serrulatanos, sirvió para semicuantificarlo y saber qué extracto contenía el compuesto en mayor cantidad, por comparación de los cromatogramas obtenidos.

De esta manera, se tomó la decisión de trabajar con especímenes colectados en Agualeguas N. L. para llevar a cabo el siguiente paso, que fue la extracción a gran escala. Cabe aclarar que dicho sitio estaba programado para talarlo a la brevedad con motivo de construcción y pavimentación por lo que la colecta no tuvo ningún efecto adicional al ecosistema. Una vez que se tuvo el

extracto hexánico se procedió a hacer una VLC, la cual es esencialmente una cromatografía preparativa; la FM empleada fue una mezcla hexano:AcOEt, desde 20:1 hasta AcOEt 100%, el volumen de elución fue de 300 mL para cada fracción. Debido a que en los laboratorios de Química Analítica no se cuenta con la infraestructura para realizar este procedimiento a gran escala, se realizó este procedimiento 39 veces, que fueron las necesarias para agotar el total de extracto hexánico. Para entrar en la etapa de aislamiento de los serrulatanos se empleó sílica gel modificada. La gel de sílice puede ser modificada en una variedad de formas para alterar sus propiedades físicas y conducta cromatográfica. El principal propósito de la modificación de la superficie, es cubrir los grupos silanol activos y adjuntar, a la superficie accesible adsorbente, un ligando orgánico que es el responsable de las interacciones específicas superficiales. La fase estacionaria no polar (fase reversa) se prepara tratando la sílica gel con clorodimetilalquilsilanos o cloroalcoxisilanos de diferentes longitudes de cadena, desde C2 hasta C18 (Sarker SD, 2006). La fracción 20:1, obtenida de la VLC, se fraccionó dos veces por medio de una columna lobar FR-C18 para aislar, purificar e identificar lo que hasta este momento se habían descrito como dos serrulatanos. Se confirmó la pureza de cada uno por CLAR. La presencia de un solo pico en el cromatograma, perfectamente bien definido, simétrico y angosto, fue la evidencia de la presencia de un solo compuesto en la muestra inyectada, y analizada bajo las condiciones indicadas en el apartado 3.2.1.6.1.1. Al contar con un detector de UV, se pudo además, obtener el espectro de absorción del pico presente en el cromatograma. La absorción de radiación UV-Vis provoca la excitación de los electrones de los enlaces de la molécula y, en consecuencia, los picos de absorción pueden relacionarse con los tipos de enlace que existen en las especies en estudio.

Debido a que RMN es una de las herramientas más poderosas disponibles para la elucidación de la estructura de especies químicas (Skoog DA, 1998), la estructura del compuesto aislado fue confirmada por RMN.

Obtener 1.5 g o más de cada uno de los serrulatanos, brindó la oportunidad de repetir los experimentos de 1D y 2D para ambos compuestos, y adicionalmente realizar otros ensayos, tales como, un espectro de ^1H -RMN de alta resolución (900 MHz) para resolver claramente el traslape que se presentaba en las señales a campo alto en el espectro. Se realizaron también experimentos nOe de 1D y 2D, así como análisis total de espines en el espectro de ^1H -RMN, lo que permitió conocer las constantes de acoplamiento de todos los protones, incluyendo los de las señales muy solapadas, además de experimentos de dicroísmo circular vibracional, que condujeron a establecer la estereoquímica absoluta de la molécula, siendo ésta 1R, 4S, 11S. Hasta aquí se había evidenciado que el serrulatanos 1 y el serrulatanos 2, previamente reportados por Molina-Salinas, resultaron ser un mismo compuesto.

Una vez establecida la configuración absoluta de la molécula, se identificó la diferencia entre el elisabethanol (Jacobs RS, 2005) y este serrulatanos, dado que ambos tienen la misma estructura planar; sin embargo el elisabethanol tiene una configuración 1S, 4R, 11S; de esta manera, el serrulatanos aislado de *L. frutescens* en un compuesto natural nuevo al cual, con el fin de referir la analogía con el elisabetanol, se le llamó leubetanol (Figura 32) con configuración 1R, 4S, 11S (Molina-Salinas GM, 2011).

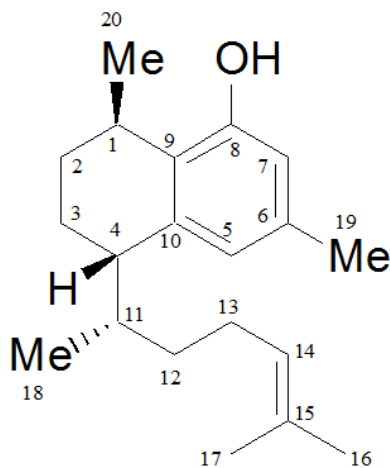


Figura 32.- Estructura del leubetanol

5.2 Derivados del leubetanol.

Otro de los propósitos de tener una gran cantidad de serrulatanos fue tomar este compuesto como punto de partida para obtener derivados con una mayor actividad y/o menor toxicidad. La modificación estructural de productos naturales se utiliza ampliamente en el descubrimiento de nuevos medicamentos y desarrollo de los mismos (Bo-Yang Y, 2007). El éxito de esta estrategia en el desarrollo de nuevas sustancias, las cuales pueden ser terapéuticamente atractivas, ha mostrado un significativo crecimiento en distintas áreas de la medicina, ésta es ampliamente utilizada por la industria farmacéutica para el descubrimiento de nuevos análogos terapéuticos. Esta estrategia de la química médica para el diseño racional de nuevos medicamentos, se aplica a compuestos base como un proceso especial en el cual se realiza una modificación molecular. Para aplicar esta estrategia se debe tratar una estructura perfectamente conocida y que posea una acción bien conocida. (Moreira-Lima L, 2005).

Así, el elisabethanol puede considerarse un compuesto líder o cabeza de serie puro y está perfectamente bien identificado, por lo que resulta un buen candidato para someterlo a variaciones estructurales. Para el desarrollo del presente trabajo se propusieron dos modificaciones:

- a) Una fue mediante una reacción de sustitución, en la cual se bloqueó el OH fenólico, poniendo a reaccionar el leubetanol con CH_3I ; para esta reacción resultó de suma importancia, eliminar totalmente el agua de los solventes en que se desarrollaría, por lo que se utilizó acetona anhidra, además del CH_3I en exceso con respecto al leubetanol.
- b) La otra reacción involucró la epoxidación del alqueno de la molécula empleando MCPB; ésta fue una reacción prácticamente equimolar.

Los productos de reacción se lavaron con agua, para eliminar el remanente de ácido que pudiera haber quedado y después proceder a la purificación de los mismos. La presencia y pureza de los productos de reacción esperados se evidenció con los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN.

5.3 Actividad biológica de los derivados del leubetanol.

La actividad de los compuestos se evaluó frente a la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* con el ensayo de MABA, el cual se realizó como fue descrito por Molina-Salinas en el 2006. Los bioensayos de dilución en caldo tienen una gran ventaja sobre los de difusión, principalmente porque la concentración del compuesto en el medio está bien definida. Consecuentemente los ensayos de dilución se han considerado como el método de elección para comparar valores de CMI; además resultan apropiados para evaluar extractos y/o compuestos polares y no polares. El uso de las placas de 96 pozos ha permitido además, reducir significativamente la concentración del compuesto a evaluar; aunado a que se puede combinar con el uso de lectores de placa espectrofotométricos o fluorimétricos. Una alternativa importante es el uso de indicadores de oxido/reducción tales como Alamar Azul (Bueno-Sánchez JG, 2010). El Alamar Azul es un indicador general de crecimiento celular y/o viabilidad; el color azul no fluorescente de la forma oxidada vira a rosa fluorescente de la forma reducida. El crecimiento celular o bacteriano puede ser medido con un fluorómetro, espectrofotómetro o determinado visualmente por cambio de coloración (Collins LA, 1997).

Porras TB en el 2005, evaluó la metodología de MABA como prueba de determinación rápida de susceptibilidad mediante el análisis por ROC (Receiver Operative characteristic Curves). El con sus resultados, determinó una sensibilidad de 100%. Y una especificidad mayor de 80%.

El DMSO empleado para disolver los compuestos a evaluar, fue previamente evaluado por Molina-Salinas GM en su tesis doctoral (2004) y determinó que a una concentración menor al 3% no afecta el crecimiento de las micobacterias; esto también fue reportado por Ignacimuthu S (2010), quien afirmó que este solvente, a una concentración de 1%, no suprime ni retarda el crecimiento de *M. tuberculosis*.

No se obtuvo incremento en la actividad anti-Tb de los derivados del leubetanol obtenidos en nuestro laboratorio, ésta disminuyó considerablemente para el derivado RO-metilo (CMI >125 µg/mL) y mientras que la del epóxido disminuyó ligeramente (CMI 31.25 µg/MI).

Además, dado que este trabajo forma parte del Proyecto "Síntesis, Aislamiento y Modificación Estructural de Análogos de Productos Naturales y Estudio de su Actividad Biológica" que realiza la Red de Colaboración, integrada por los Cuerpos Académicos de Química Orgánica Básica de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP-CA-157), por el Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Salamanca en España (QUIFARSAL) y por el Cuerpo Académico de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. (UANL-CA-135), se determinó la actividad anti-Tb de derivados obtenidos en dicho proyecto (Tabla X):

- Catorce derivados en que se sustituyó el H del OH fenólico por algún grupo diferente: 9 éteres (L1, M2, Q4, R4, R7, S5, S8, AJ3 y AL2) y 5 ésteres (D1, I2, J2, K2 y T3).
- Un derivado que resultó de una sustitución electrofílica aromática, el O9, en que se sustituyó el protón aromático del C5 por un 3,5-dinitrofenilo.
- Once derivados que surgieron por modificaciones en la cadena alifática del leubetanol, de los cuales 9 se obtuvieron por la apertura del epóxido.

Los aspectos más relevantes de los resultados de la actividad anti-Tb de estos compuestos son los siguientes:

- Para todos los derivados resultantes de la sustitución del protón fenólico se obtuvieron CMI $>125 \mu\text{g/mL}$, excepto D1 (derivado acetilado), para el cual se obtuvo una CMI de $16 \mu\text{g/mL}$.
- La actividad anti-Tb del único derivado que se obtuvo por sustitución electrofílica aromática (O9), fue igual que la del leubetanol, (CMI = $7.8 \mu\text{g/mL}$).
- La CMI del derivado hidrogenado (A0), el derivado en que se formó el alcohol alílico en la cadena alifática (Z11), así como del derivado en que se obtuvo el aldehído α, β insaturado (Y4), fue de $7.8 \mu\text{g/mL}$, igual que el leubetanol.
- La ruptura del epóxido del leubetanol dio lugar a varios derivados; es interesante señalar el caso de las azidas; entre las fracciones recolectadas durante el proceso de purificación de los productos de reacción, se llegaron a tener en dos fracciones, una mezcla de azidas, la fracción AA12 que contenía los estereoisómeros con N_3 unido a C15 (AA10 y AA14) y la fracción V16, mezcla de los estereoisómeros azidas con N_3 unido al C14, estas fracciones mostraron una CMI de $7.8 \mu\text{g/mL}$; sin embargo, cada uno de los estereoisómeros aislados y puros, presentaron una menor actividad, lo que nos hace pensar que se presentó efecto de sinergismo entre estas azidas cuando estaban juntas.

Los resultados obtenidos con estos derivados, sugieren que el OH fenólico juega un papel muy importante en la actividad del leubetanol contra *M. tuberculosis*; existe la posibilidad de que este grupo forme puentes de hidrógeno

con algún posible receptor, para confirmarlo se podría introducir algún azúcar en sustitución del protón del hidroxilo con lo cual se aumenta la formación de puentes de hidrógeno y como consecuencia incrementaría la actividad del compuesto; sin embargo el impedimento estérico podría ser una desventaja, debido al volumen del azúcar.

Las modificaciones en la cadena lateral de por lo menos tres derivados (A0, Y4 y Z11) no alteraron la actividad anti-Tb del leubetanol.

Por otro lado, los estudios de toxicidad son importantes para el desarrollo de un fármaco. El objetivo de estos estudios es evaluar el riesgo o peligro potencial que un compuesto bioactivo puede ocasionar sobre la salud, antes de pasar a la etapa de pruebas clínicas. Una forma de estimar la toxicidad de un compuesto es mediante ensayos de citotoxicidad, éstos son ampliamente usados en el campo de desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. En estos ensayos se mide el efecto de un posible nuevo agente terapéutico sobre el crecimiento de la población de células, y en el punto de corte se establece un estimado del número de células. El empleo de un colorante de tetrazolio como una medida indirecta del número de células se reportó a inicios de 1980. El NCI evaluó la reducción del colorante MTT, como un posible punto de corte en un ensayo rápido, esto estimuló a una gran cantidad de científicos a emplear el ensayo. El fundamento del ensayo de citotoxicidad, consiste en exponer a la célula en una fase exponencial de crecimiento al compuesto de interés. Después de remover el compuesto que se está evaluando, se hace la determinación de las células que sobreviven indirectamente con la reducción de MTT. El MTT es un colorante amarillo de tetrazolio soluble en agua, el cual es reducido por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa de las células vivas al producto formazan morado, que es insoluble en solución acuosa. La cantidad de MTT-formazan producido puede ser determinado espectrofotométricamente una vez solubilizado, por lo que la concentración de formazan es proporcional al número de células viables. Una de las líneas celulares más utilizadas, para realizar ensayos de toxicidad en

compuestos bioactivos, es la línea celular epitelial Vero, la cual se estableció en 1962 por Y. Yasumura y Y. Kawakita en Japón. Esta línea deriva de tejido renal de mono verde africano.

En este trabajo se determinó la toxicidad frente a la línea celular Vero de todos los compuestos con CMI $< 125 \mu\text{g/mL}$ (12 derivados). Además con los resultados obtenidos también se determinó el IS, mediante la relación $\text{CI}_{50\text{Vero}}/\text{CMI}_{\text{M.tb}}$ para cada compuesto. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 13 junto con la CMI y IS del leubetanol (E).

El IS muestra la selectividad del compuesto hacia el microorganismo patógeno usado como modelo de estudio. Si el IS es > 10 se considera como prometedor y significativo (Merlani MI, 2009; Vicente E, 2009). Los derivados D1 (formación de ester) y O9 (sustitución electrofílica aromática) del leubetanol, mostraron un incremento en su IS de 5 y 10 veces respectivamente en comparación al IS del compuesto original que fue de 4.53. De esta manera, se logró disminuir la toxicidad producida por el leubetanol en al menos cuatro derivados, para los cuales la reducción de toxicidad respecto del leubetanol fue de 5.66 veces (epóxido del leubetanol) hasta 12.59 veces (V16, mezcla de azidas), para los otros compuestos fue de 10.24 (D1, formación de ester) y 10.19 veces (O9, sustitución electrofílica aromática), aunque no se logró aumentar la actividad anti-Tb del compuesto original (tabla XIII).

Como un dato adicional de interés, se exploró la toxicidad de los derivados frente a una línea celular neoplásica HeLa. Esta es una de las líneas celulares neoplásicas más utilizadas en rastreos preliminares, y corresponde a células de cáncer cervicouterino que han sido utilizadas desde 1950, estas células fueron donadas por la paciente Henrietta Lacks (Langdon S, 2004) (tabla XIV).

En la tabla XIV se muestran los valores obtenidos para los derivados y el leubetanol (E) frente a la línea celular HeLa; el leubetanol y el derivado A0

(leubetanol hidrogenado) fueron los dos compuestos que mostraron la mayor actividad, dado que presentaron una CI_{50} de 8.64 (E) y 5.6 $\mu\text{g/mL}$ (A0) respectivamente, por lo que pueden ser considerados futuros candidatos para la evaluación de su actividad anti-neoplásica, sobre todo A0, ya que su IS frente a Vero/HeLa fue de 9.91. Resultaron también interesantes los IS obtenidos para el leubetanol con formación de ester (D1) y el leubetanol con la sustitución aromática (O9) (8.93 y 9.35 respectivamente).

5.4 Aislamiento biodirigido de fracciones minoritarias de *L. frutescens*.

Como se mencionó en la introducción, si bien la fracción 20:1 de la VLC, obtenida del extracto hexánico de la corteza de raíz fue la más activa, se contaba con otras fracciones más polares que también eran activas y de las cuales resultaba interesante aislar los principios activos mediante fraccionamiento biodirigido. De las cuatro fracciones con CMI de 63 $\mu\text{g/mL}$, se decidió realizar el aislamiento a partir de la fracción 3:1, debido a que es la más distante en cuanto a polaridad con respecto de la 20:1, lo que aumentaba la probabilidad de que el compuesto responsable de la actividad de dicha fracción fuera diferente al leubetanol previamente aislado.

Debido a que se estaba buscando un compuesto de mayor polaridad que el leubetanol, fue necesario hacer algunas modificaciones al gradiente de elución con que se trabajó en el CLAR, por lo que las muestras para este objetivo se analizaron bajo las condiciones descritas en el apartado 3.2.4.1, con el cual se logró una buena resolución entre los picos de los principales componentes de la fracción. Para monitorear de forma rápida las fracciones obtenidas en las diferentes etapas del aislamiento del compuesto, se evaluaron diferentes sistemas de elución en CCF, usando como FM mezcla de hexano:AcOEt en diferentes proporciones; los sistemas 10:1, 5:1 y 3:1 mostraron un mayor número de manchas y mejor resolución.

En el cromatograma, realizado por CLAR, de la fracción 3:1 (figura 15) se pueden ver dos picos principales con t_R de 17 y 21 min, los cuales podrían corresponder a los compuestos responsables de la actividad de esta fracción; por esta razón la atención se enfocó en el aislamiento de estos compuestos.

Primero se intento hacer una separación mediante cromatografía a baja presión en columna lobar fase reversa C18, utilizando como FM soluciones hidroalcohólicas desde 60:40 hasta 100%, pero a pesar de haber filtrado la muestra, se obtenía un precipitado al momento de aplicar la muestra en la columna, lo cual provocaba su obstrucción.

En el segundo intento, se empleó una columna rellena con Sephadex y fue eluida con metanol. Al hacer el análisis de las fracciones por CLAR, se evidenció que no hubo una buena separación, dado que el pico con t_R de 21 min no aparecía en ninguna fracción, mientras que el pico con t_R de 17 min aparecía distribuido en muchos tubos.

En un tercer intento por separar los componentes de la muestra, se realizó una cromatografía gravitacional en columna con sílica gel eluida con Hexano:AcOEt como se describe en el apartado 3.2.4.2, monitoreando con CCF las fracciones obtenidas, tal cual se redacta en el apartado 3.2.4.2.1; con esta cromatografía se obtuvo una buena separación en 130 fracciones, las cuales se agruparon en diez fracciones que fueron analizadas por CLAR y se determinó la CMI de cada una de ellas (Tabla XVI). En la fracción dos, cuya CMI fue de 31.5 $\mu\text{g/mL}$, se observaron 6 picos, sin embargo el porcentaje de recuperación no fue el mejor, además que no estaban presentes los picos con t_R de 17 y/o 21 min, que eran los de interés y en el cromatograma del CLAR se observaba un pico con t_R de 27 min, con un espectro igual al del leubetanol, lo que sugería que la actividad de esta fracción se debiera a la presencia del leubetanol. Otras cuatro fracciones mostraron una CMI de 63 $\mu\text{g/mL}$, la fracción 6 mostró el mejor porcentaje de

recuperación con un pico mayoritario con t_R de 17 min, por lo que se continuó con el aislamiento biodirigido de esta fracción.

La fracción denominada 3:1(6) se re-cromatografió mediante una columna lobar FR-C18, empleando las condiciones descritas en el apartado 3.2.4.3 y las fracciones colectadas se monitorearon por CCF tal cual se describe en el apartado 3.2.4.3.1. Se obtuvieron 50 fracciones de las cuales en 43 se encontraba el compuesto. Se realizó otra cromatografía en columna lobar FR-C18 pero esta vez se continuó eluyendo con la primera fase, metanol:agua (60:40) y monitoreando con CCF bajo los lineamientos del apartado 3.2.4.3.1, hasta que el compuesto de interés ya no se obtenía; en esta ocasión el compuesto de interés se repartió en 183 fracciones, la elución de la columna en total llevó 38 h y, aunque la separación fue buena, esta no era la mejor opción para aislar el compuesto, por cuestión de tiempo. Se realizó una modificación más, el gradiente de elución se preparó adicionando ácido acético (1%). Con estas condiciones se logró purificar el compuesto casi por completo; en una fracción aparecían dos picos con t_R muy similar, de 17 min, y con el mismo espectro de UV (λ_{max} 276.4 nm), esta fracción presentaba una CMI de 63 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 21).

La siguiente etapa fue intentar separar estos picos con una columna de Sephadex en una pipeta Pasteur eluida con metanol, pero con esta columna no hubo una buena separación. Por último se pasó la muestra por un cromatógrafo CLAR-Preparativo, eluyendo con solución hidroalcohólica como se describe en el apartado 3.2.4.4; de esta manera se logró aislar un compuesto, que se encontraba lo suficientemente puro para comenzar los experimentos espectroscópicos para identificarlo (Figura 22).

El compuesto tenía un aspecto oleoso, color café claro, cuyo espectro de masas dio un ión molecular $[M]^+$ de m/z 414.4, un pico base de m/z 206.2 $[M-H]$ (100%) correspondiente a la mitad de la molécula menos un protón y la fórmula molecular establecida fue $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_8$ con un total de 12 insaturaciones.

El espectro de ^1H RMN presentó seis señales en la región de aromáticos y heterociclos (δ 5.90-6.84 ppm) que en total integraban para ocho hidrógenos, seis señales que integraban para un total de doce hidrógenos entre δ 3.7 y 5.0 ppm y dos multipletes en δ 3.0 ppm que integraban para dos hidrógenos cada uno. En los espectros de ^{13}C RMN, por medio del experimento DEPT las señales pudieron ser clasificadas como ocho carbonos cuaternarios, ocho metinos, cuatro metilenos y dos señales para metilos. Los desplazamientos de las señales se listan en la tabla XVIII.

En el espectro de ^1H se observaron, en la región de aromáticos, cuatro señales, dos de ellas a δ 6.51 y 6.84 ppm ($\text{H5}'$, $\text{H6}'$) eran dobletes, con una J de 8.08 Hz y 8.06 Hz respectivamente, que integraban para un protón cada una, lo que indicaba que había un aromático tetra-sustituido, con dos protones en posición orto. Se identificaron otras dos señales a δ 6.57 y 6.55 ppm ($\text{H2}''$, $\text{H6}''$) dobletes con un valor de J 1.245 Hz que integraban para un protón cada una, lo que daba indicios de otro anillo aromático tetra-sustituido con dos protones que no estaban en posición orto. Las señales de δ 5.93 ppm ($\text{H7}'$) y δ 5.96 ppm ($\text{H7}''$), singuletes muy desplazados, integraban para 2 protones cada una de éstas; entre 4 y 5 ppm se identificó el patrón característico de señales de un centro furofurano; en δ 3.91 y 4.10 ppm se observaron dos singuletes que integraban para tres protones cada uno de ellos, muy desplazados; en δ 3.01 ppm (H1) y 2.95 ppm (H5) dos multipletes.

Por medio del HSQC se establecieron los enlaces carbono-protón, la asignación definitiva se realizó también con el DEPT y el HMBC a dos y tres enlaces. A través de éste se observó que en uno de los anillos aromáticos, el $\text{H5}'$, correlacionaba con el $\text{C1}'$ (cuaternario, δ 127.0 ppm) y con el $\text{C3}'$ (cuaternario, δ 136.5 ppm), el cual aparecía a campo bajo, por lo que se pensó debería tener un oxígeno unido; el $\text{H6}'$ correlacionaba con el $\text{C2}'$ (cuaternario, δ 141.0 ppm) y con el C2 (δ 82.6 ppm); con el DEPT se confirmó que la señal de

δ 5.93 ppm (H7') era un CH₂, por lo que se consideró como un metileno di-oxigenado (O-CH₂-O), sus protones se correlacionaban con C3' (cuaternario, δ 136.5 ppm) y con C4' (cuaternario, δ 149.0 ppm) el cual estaba desplazado a campos bajos, por lo que se consideró que el C3' debería tener un oxígeno unido, además de oxígenos unidos en los carbonos adyacentes. Con esto se dedujo que los oxígenos del metileno estaban unidos uno al C4' y el otro al C3', al lado del C4' debería haber un CH (C5'), ya que este CH se correlacionaba con el C de δ 136.6 ppm, éste (C5') a su vez debería tener a un lado un CH (C6') por el acoplamiento en orto observado de estos protones; de los dos carbonos restantes para este sistema aromático, uno de ellos aparecía muy desplazado δ 141.0 ppm, por lo que debería tener unido un oxígeno (C2') y el otro era un carbono cuaternario, que tenía otro sustituyente (C1').

Para el otro anillo se podía ver la correlación de H6'' con C1'' (cuaternario, δ 143.9 ppm) y C4'' (cuaternario, δ 149.5 ppm); el H2'' tenía correlación con C3'' (cuaternario, δ 135.0 ppm) y con C6'' (CH, δ 100.5 ppm); al igual que se mencionó para C7', el C7'' era la señal de O-CH₂-O, la cual presentaba correlación con C3'' y con C4'', lo que llevó a colocar los oxígenos del metileno di-oxigenado en cada uno de estos carbonos, el C5'' por su desplazamiento también debería tener unido un oxígeno a él, de los tres carbonos restantes de este anillo aromático (C2'', C1'' y C6''), C1'' era también cuaternario, por lo que los protones aromáticos quedaron uno en C2'' y otro en C6'', es decir, en posición meta. H6 (CH) se correlacionaba con C6'' (δ 100.5 ppm, CH) y C2'' (δ 106.5 ppm) por lo que debería estar unido al anillo aromático en el C1'', además el H2'' se correlacionaba con el C6', C1' y C2' con lo que se confirmó la unión entre C1'' y C6.

Los dos singuletes que integraban para tres protones cada uno de ellos, desplazados a δ 4.1 y 3.9 ppm (H8', H8'') eran característicos de metoxilos y que además por su desplazamiento deberían estar unidos a un anillo aromático; estos metoxilos se ubicaron en los C2' y C5'' respectivamente en base al HMBC.

El multiplete que se observaba en δ 3.01 ppm (H1) estaba originado por el acoplamiento de este protón con H8a, H8b y H2; en δ 2.95 ppm (H5) se veía otro multiplete originado por el acoplamiento de H5 con H6, H4a y H4b. Con el COSY se evidenció que H1 (CH, δ 3.01 ppm) tenía acoplamiento con H2 (CH) y H8 (CH₂), por lo que aparecía como multiplete mientras que H5 (CH, δ 2.95 ppm) daba acoplamientos con H6 (CH) y H4 (CH₂) y originaba un multiplete igual al de H1 con un desplazamiento muy parecido; con los dos oxígenos que faltaban por acomodar se consideraron dos heterociclos. Las señales de los C1 al C8 presentaron el patrón característico que dan los centros furofuranos (Rojas S, 2003; Kang SS, 1995). Dado que el H2 del centro furofurano daba correlación con C6' y C2', debía estar unido al C1' del anillo aromático que presentaba protones con acoplamiento en orto.

Hasta este momento se sabía que la molécula era 2'5"-dimetoxisesamina o su epímero 2'5"-dimetoxiasarinina (Figura 33); este punto se aclaró con el NOESY, en el cual se pudo observar claramente la correlación que guardaba el H2, H1, H8 y H6 lo que indicó que los protones mencionados estaban hacia el mismo lado del plano de la molécula; esto solo se puede dar en la sesamina, dado que los dos sustituyentes fenilos que presenta el centro furofurano están hacia el mismo lado del plano (posición *exo*), mientras que la asarinina tiene un sustituyente en *endo* y el otro en *exo*, lo que hace que uno de los sutituyentes fenilo esté casi perpendicular a la estructura del centro furofurano, lo que impediría ver esta correlación entre los protones antes mencionados (Li CY, 2005). En base a lo anterior el compuesto aislado fue identificado como 2'5"-dimetoxisesamina (Figura 34).

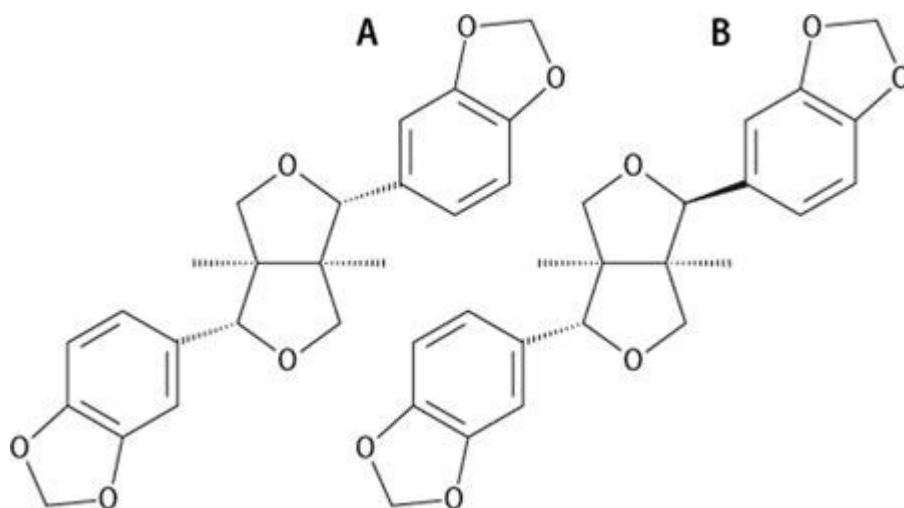


Figura 33.- Estructuras de sesamina (A) y asarinina (B).

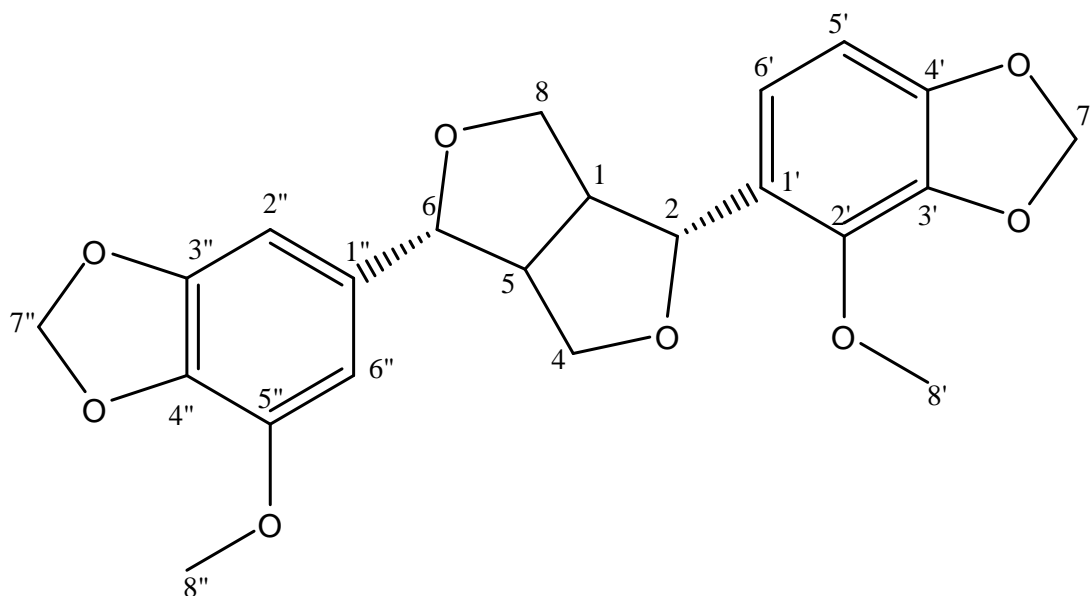


Figura 34.- Estructura de 2'5''-dimetoxisesamina.

La presencia de lignanos, en las fracciones más polares de la VLC, ya había sido sugerida previamente por experimentos de Molina-salinas GM (2004) y Tirado-Castillo AV (2004), en sus respectivas tesis, sin embargo, la biblioteca del EM los había caracterizado como asarinina.

A la fecha no se ha encontrado reporte sobre este compuesto en la literatura, por lo que se trata de un compuesto nuevo; la CMI de este compuesto frente a la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* fue de 63 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Baquero-Salazar E (2007) evaluó la actividad de la sesamina, la cual presentó una CMI frente a la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* $>200 \mu\text{g}/\text{mL}$. Considerando que la molécula aislada en este trabajo es una sesamina con dos grupos metoxilos, se consideró que la presencia de éstos permitió mejorar la actividad de la molécula base, por lo que la introducción de otros grupos funcionales pudieran mejorar la actividad de la sesamina. Este compuesto resultó no tóxico para las líneas celulares Vero (CI_{50} 293.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y HeLa (CI_{50} 57.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Otras dimetoxisesaminas simétricas han sido reportadas como, 2'2"- dimetoxisesamina aislada de *Leucophyllum ambiguum* (Rojas S, 2003), (\pm)-5,5'-dimetoxisesamina aislada de *Amorphophallus konjac* (Niwa T, 2002); sin embargo, no se ha evaluado la actividad ant-Tb para ninguna de ellas.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1 Conclusiones

- ✓ Se aisló cantidad suficiente del serrulatano con el cual se pudieron realizar los experimentos necesarios para establecer su configuración absoluta; estos estudios permitieron llegar a la conclusión de que se trataba de una sola molécula y no dos, como se había reportado anteriormente. Esta molécula resultó ser novedosa, ya que no se encontró reporte de ésta en la literatura, se le llamó LEUBETANOL.
- ✓ Se logró obtener el producto de reacción esperado para el bloqueo del OH fenólico del leubetanol; su actividad anti-Tb fue notoriamente menor que la del compuesto original.
- ✓ Se logró obtener el producto de reacción esperado para la formación del epóxido en el leubetanol; su actividad anti-Tb fue ligeramente menor que la de la molécula original.
- ✓ Ninguno de los 28 compuestos sintetizados en la Universidad de Salamanca, España y evaluados, presentó actividad anti-Tb mejor que la del compuesto original. Cuatro de ellos presentaron la misma actividad que el leubetanol (7.8 µg/mL).

- ✓ En forma interesante, dos de los derivados sintetizados en la Universidad de Salamanca, España presentaron un IS 5 y 10.18 veces mejor que el IS del compuesto original, el acetilado (D1) y el de la sustitución aromática (O9). Este IS es considerado como promisorio para desarrollos posteriores.
- ✓ El OH fenólico del leubetanol posee un papel importante para su actividad anti-Tb.
- ✓ El leubetanol y el derivado hidrogenado (A0) podrían ser futuros candidatos para posible evaluación como anti-neoplásicos.
- ✓ Se aisló uno de los compuestos responsables de la actividad anti-Tb de una fracción minoritaria de *L. frutescens* (CMI 63 µg/mL) el cual se identificó como 2',5''-dimetoxisesamina. Cabe destacar que, la sesamina es un lignano que se encuentra en muchas plantas y algunos metoxilignanos han sido ya reportados en otros materiales vegetales. No se encontró reporte del compuesto aislado en la literatura, por lo que es un compuesto novedoso. Si bien la actividad anti-Tb encontrada para este lignano no es muy buena, la sesamina está reportada como no activa, por lo que la introducción de los metoxilos parece mejorar esta actividad.

6.2 Perspectivas

- Continuar sintetizando otros derivados del leubetanol para evaluar su actividad biológica, tomando en cuenta las CMI e IS obtenidos para algunos de ellos.
- Realizar el aislamiento biodirigido de otras de las fracciones minoritarias de la VLC que dieron también una CMI de 63 $\mu\text{g/mL}$
- Aislar más cantidad de la 2'5"-dimetoxisesamina, para modificar su estructura buscando una mayor actividad anti-Tb.

BIBLIOGRAFÍA

- Abass NA, Suleiman KM, Jalii IM EI, Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by their GyrB polymorphism, Indian journal of medical microbiology, 2010, 28 (1); 26-29.
- Anandi M, Portales F, Drug resistance and drug resistance detection. Tuberculosis 2007, José Carlos Palomino, Sylvia Cardoso Leao, Viviana Ritacco (Eds), Tuberculosis Textbook.com, Primera edición, 2007.
- Baquero-Salazar E, Benavides J, Sepúlveda L, Quiñones W, Torres F, Cardona D, Archbold R, Guzmán JD, Cuca LE, Franzblau S, Echeverri F, Actividad antimicobacteriana de algunas plantas de la flora colombiana, Scientia et Technica Año XIII, 2007, 33; 133-136.
- Bo-Yang Y, Studies on the bio-combinatorial chemistry as the new method for finding higher bioactive or lower toxicity leading compound, Chinese journal of Natural Medicine, 2007, 5 (3); 169-173.
- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutiérrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Samper S, Soolingen DV, Cole ST, A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex, PNAS, 2002, 99 (6); 3684-3689.
- Bueno-Sánchez JG, Kouznetsov VV, Antimycobacterial susceptibility testing methods for natural products research, Brazilian journal of microbiology, 2010, 41; 270-277.
- Carrillo AM, Los médicos ante la primera campaña antituberculosa en México, Gac Méd Méx, 2001, 137 (4); 361-369.

CDC, Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs-worldwide, 2000-2004, MMWR 2006, 55: 301-305.

CENAVECE, Situación actual de la Tuberculosis en México y retos para su control, reporte 2009.

Collins LA, Franzblau SG, Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*, Antimicrobial agents and chemotherapy, 1997, 41 (5); 1004-1009.

Copp BR, Antimycobacterial natural products, Nat. Prod Rep, 2003, 20; 535-557.

Daniel TM, The origins and pre-colonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out?, Int. J. Tuberc. Lung. Dis., 2000, 4 (5); 395-400.

Del Granado-Cosio M, La Tb en el mundo, Enf. Emergentes, 2009, 11 (4); 189-191.

Dunlap NE, Bass J, Fujiwara P, Hopewell P, Horsburgh CR, Salfinger M, Simone PM, Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children, American Thoracic Society, Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161; 1376-1395.

Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, Boulahbal F, Kim SJ, Reinero A, Hoffner S, Rieder HL, Binkin N, Dye C, Williams R, Ravigione MC, Global trends in resistance to antituberculosis drugs, WHO-International unión against

tuberculosis and lung disease working group on anti-Tuberculosis drug resistance surveillance, N. Engl J Med, 2001, 344 (17); 1294-1303.

Fabricant DS, Fransworth NR, The value of plants used in traditional medicine for drug discovery, Environmental health perspectives, 2001, 109 (1); 69-75.

Gandhi NR, Moll A, Sturm AW, Pawinski R, Govender T, Lallo U, Zeller K, Andrews J, Friedland G, Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa, publicado en línea en Octubre 2006, DOI:10.1016/S0140-6736(06)69573-1.

Harris D, Análisis químico cuantitativo, tercera edición, 2007.

Hernández-Pando R, Chacón-Salinas R, Serafín-López J, Estrada I, Immunology, patogénesis, virulence. Tuberculosis 2007, José Carlos Palomino, Sylvia Cardoso Leao, Viviana Ritacco (Eds), Tuberculosis Textbook.com, Primera edición, 2007.

Ignacimuthu S, Shanmugam N, Antimycobacterial activity of two natural alkaloids, vasicine acetate and 2-acetyl benzylamine, isolated from Indian shrub *Adhatoda vasica* Ness. leaves, J. Biosc., 2010, 35 (4); 565-570.

Jachak SM, Jain R, Current status of target-based Antimycobacterial Natural Products, Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry, 2006, 5 (2); 123-133.

Jacobs RS, Kerr RG, Anti-inflammatory compounds derived from *Pseudopterogorgia elisabethae*, US20050182000A1, Pub Date Aug. 18, 2005.

- Kang SS, Kim JS, Jung JH, Kimm YH, NMR assignments of two furofuran lignans from Sesame seeds, Arch. Pharm. Res., 1995, 18 (5); 361-363.
- Lallo UG, Ambaram A, New antituberculous drugs in development, Curr HIV/AIDS Rep, 2010, 7; 143-151.
- Langdon S, Cancer cell culture Methods and protocols, Human press, Totowa New Jersey, 2004.
- Laza-Loaces D, Rodríguez-Luis I, Sardiña-Cabrera G, Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales, Rev. Cubana de plantas medicinales, 2003, 8 (3) [En línea] http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol8_3_03/pla12303.htm.
- Li CY, Chow TJ, Wu TS, The epimerization of sesamin and asarinin, J. Nat. Prod., 2005, 68 (11); 1622-1624.
- Luna-Herrera J, Costa MC, González HG, Rodrigues AI, Castilho PC, Synergistic antimycobacterial activities of sesquiterpene lactones from *Laurus* spp. Journal of antimicrobial chemotherapy, 2007, 59; 548-552.
- Martín C, Bigi F, Gicquel B, New bacines against tuberculosis, Tuberculosis 2007, José Carlos Palomino, Sylvia Cardoso Leao, Viviana Ritacco (Eds), Tuberculosis Textbook.com, Primera edición, 2007.
- Merlani MI, Amiranashvili LSh, Kemertelidze EP, Mulkidzhanyan KG, Synthesis and antimycobacterial activity of some steroidal derivatives of tigogenin, Chemistry of natural compounds, 2009, 45 (3); 389-392.
- Molina-Salinas GM, "Aislamiento y caracterización de compuestos con actividad bactericida y/o bacteriostática de plantas del Noreste de México

sobre cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensible y multidrogorresistente”, Tesis doctoral, 2004

Molina-Salinas GM, Pérez-López A, Becerril-Montes P, Salazar-Aranda R, Said-Fernandez S, Waksman de Torres N, Evaluation of the flora of northern México for in vitro antimicrobial and antituberculosis activity, *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, 109; 435-441.

Molina-Salinas GM, Ramos-Guerra MS, Vargas-Villarreal J, Mata-Cárdenas BD, Becerril-Montes P, Said-Fernández S, Bactericidal activity of organic extracts from *Fluorensia cernua* DC against Stains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Archives of medical Research*, 2006, 37; 45-49.

Molina-Salinas GM, Rivas-Galindo VM, Said-Fernández S, Lankin DC, Muñoz MA, Joseph-Nathan P, Pauli GF, Waksman de Torres N, Stereochemical analysis of an anti-Tb active diterpene from *Leucophyllum frutescens*, 2011, Artículo en prensa.

Moreira-Lima L, Barreiro EJ, Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design, *Current medicinal Chemistry*, 2005, 12; 23-49.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM, Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002, *J. Nat. Prod.*, 2003, 66 (7); 1022-1037.

Niwa T, Murakami K, Ohtake T, Etoh H, Shimizu A, Shimizu Y, Kato Y, Tanaka H, Peroxynitrite scavenging activities of aromatic compounds isolated from *Kannyaku*, *Amorphophallus konjac* K. Koch, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2002, 66 (6); 1386-1388.

Porras TB, León CI, Guerrero MI, Martín A, Portaels P, Palomino P, Evaluación de métodos fenotípicos y genotípicos para la detección de

farmacorresistencia de *Mycobacterium tuberculosis*, Biomédica, 2005, 25; 22-33.

Rojas S, Acevedo L, Macías M, Toscano RA, Bye R, Timmermann B, Mata R, Calmodulin inhibitors from *Leucophyllum ambiguum*. J. Nat. Prod., 2003, 66 (2), 221-224.

Said-Fernández S, Becerril-Montes P, Molina-Salinas GM. Tuberculosis causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* drogorresistentes, Enf emerg, 2005, 7 (1); 13-19.

Sarker SD, Latif Z, Gray AI, Natural products isolation, 2° edición, Human press, Totowa, New Jersey, 2006.

Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA, Principles of instrumental analysis, 5° edición, Saunders College Pub, Philadelphia, PA, 1998.

Takiff HE, Host genetics and susceptibility, Tuberculosis 2007, José Carlos Palomino, Sylvia Cardoso Leao, Viviana Ritacco (Eds), Tuberculosis Textbook.com, Primera edición, 2007

Tirado-Castillo AV, Desarrollo de un método por CLAR-EM para la identificación de componente de extractos de plantas biológicamente activos, Tesis de Maestría, 2004.

Valcárcel-Cases M, Gómez-Hens A, Técnicas analíticas de separación, Edición en español, Reverté, Barcelona, España, 1990.

Vicente E, Pérez-Silanes S, Lima LM, Ancizu S, Burguete A, Solano S, Villar R, Aldana I, Monge A, Selective activity against *Mycobacterium tuberculosis* of

new quinoxaline 1,4-di-N-oxides, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009, 17 (1); 385-389.

WHO, Global Tuberculosis Control, report 2006 [A].

WHO, Global Tuberculosis Control, report 2007.

WHO, Report of the meeting of the WHO global task force on XDR-TB, Ginebra, Suiza, 9-10 Octubre 2006 [B].

WHO, Tuberculosis MDR-TB & XDR-TB, reporte 2008.

WHO, Global tuberculosis control, reporte 2009.

WHO, Multidrug and extensively drug-resistant TB(M/XDR-TB), reporte 2010.

www.soluciontb.org, boletín informativo No 12, Febrero 2010.