



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**INHIBICIÓN DEL *Trametes versicolor* POR
LA OXIMA DEL ALIODORIN**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

JOSÉ REFUGIO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

ASESOR

D.C. RAFAEL HERRERA BUCIO

CO-ASESOR

**M.C. FREDY GEOVANNINI MORALES
PALACIOS**



MORELIA, MICHOACÁN

FEBRERO DE 2020

UMSNH

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Síntesis Química y Laboratorio de Cómputo de Alto Desempeño del Instituto de Investigaciones Químico - Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría del Dr. Rafael Herrera Bucio.

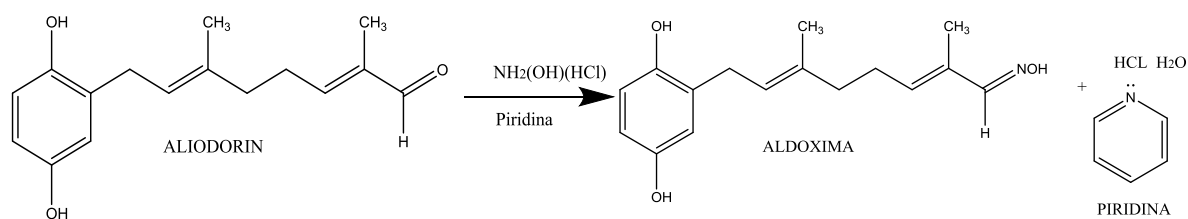


ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

°C	Grados centígrados
π	Enlace pi
σ	Enlace sigma
Ψ	Funciones de onda
Ψ^2	Cuadrado de la función de onda
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
CDCl ₃	Deuterocloroformo
d	Señal doble
dd	Señal doble de dobles
DFT	Teoría del funcional de la densidad
H ₂ O	Agua
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
kg/h	Kilogramo sobre hora
LIP	Lignino-peroxidasa
m	Metro
mg/L	Miligramos sobre litro
MHz	Mega hertz
MnP	Magnesio-peroxidasa
RHF	Hartree-Fock)
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN de ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN de ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono-13
s	Señal simple
THF	Tetrahidrofurano

Resumen

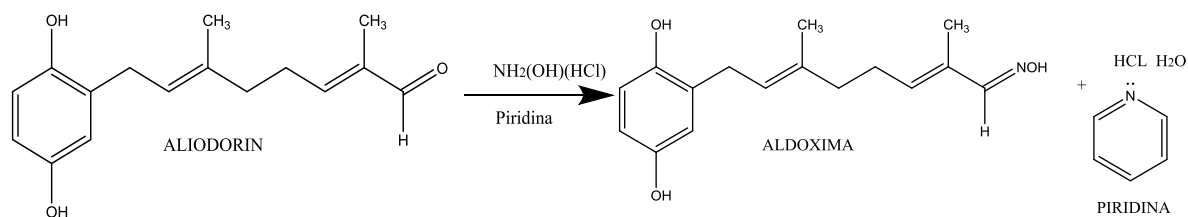
En el presente trabajo se describe el aislamiento del **aliodorin** (8-(2,5-Dihidroxifenil)-2,6-dimetilocta-2,6-dienal) y su actividad sobre el hongo *Trametes versicolor*, se realizó una reacción de adición nucleofílica para comprobar químicamente el grupo aldehído presente en este compuesto en la cual se utilizó hidroxilamina como nucleófilo para así obtener la correspondiente **oxima** [8-(2,5-dihidroxifenil)-2,6-dimetilocta-2,6-dioxima], de la cual se describe su actividad biológica sobre el hongo *Trametes versicolor* esto mediante el método de difusión en placa. Ambos compuestos fueron confirmados mediante RMN de ^1H , ^{13}C , y sus experimentos de dos dimensiones: correlación heteronuclear $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ (HETCOR), de correlación homonuclear $^1\text{H}/^1\text{H}$ (COSY) y correlación homonuclear Overhauser (NOESY). Por otra parte, se realizó un análisis conformacional mediante métodos computacionales DFT (Teoría del Funcional de la Densidad) con el conjunto de funciones base STO-3G, 3-21G y 6-31G, obteniendo los conformeros de mayor estabilidad los cuales fueron usados para obtener las frecuencias vibracionales obtenidas por métodos computacionales y comparar con la espectroscopia de infrarrojo, también se llevó a cabo un estudio de acoplamiento molecular Docking, para buscar las poses conformacionales entre el aliodorin y la enzima lacasa, así también para la oxima y la enzima lacasa.



PALABRAS CLAVE: extracción, purificación, lacasa, hongo, pudrición.

Abstract

The present work describes the isolation of aliodorin (8- (2,5-Dihydroxyphenyl) -2,6-dimethylocta-2,6-dienal) and its activity on the presence of fungus *Trametes versicolor*, this done by a nucleophilic addition reaction to chemically checking the aldehyde group, Hydroxylamine was used as a nucleophile to obtain the corresponding oxime (8- (2,5-dihydroxyphenyl) -2,6-dimethylocta-2,6-dioxime), which in the same way that aliodorin, it will be described its biological activity on the fungus *Trametes versicolor* by using the plate diffusion method. Both compounds were confirmed by NMR spectroscopy of ^1H , ^{13}C , and their two-dimensional experiments such as heteronuclear correlation diagrams $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ (HECTOR), homonuclear correlation $^1\text{H} / ^1\text{H}$ (COSY) and homonuclear correlation Overhauser (NOESY). On the other hand, a conformational search was carried out using DFT (Density functional theory) computational methods with the basis set STO-3G, 3-21G and 6-31G respectively, obtaining the highest stability conformers which were used to obtain the vibrational frequencies at DFT computational level of theory in order to compare their infrared spectra, in addition, a molecular Docking also was performed to analyze the most energetically stable ligand - enzyme complexes.



Contenido

1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1. Vegetación en Michoacán	1
1.2. Características de la madera.....	2
1.3. Clasificación de la madera.....	3
1.4. Durabilidad natural de la madera.....	3
1.5. Química computacional	4
1.5.1. Generalidades de la química computacional.....	5
1.5.2. Programas utilizados en química computacional y modelado molecular .	6
2.- ANTECEDENTES	7
2.1. Composición de la madera	7
2.2. <i>Cordia elaeagnoides</i> (cueramo).	8
2.3. Biodegradación de la madera por hongos xilófagos	9
2.4. Tipos de pudrición de la madera	10
2.5. <i>Trametes versicolor</i>	11
2.6.- Métodos de cálculo computacionales.....	12
2.6.1. Acoplamiento Molecular (Docking).....	14
2.7. Características de los aldehídos.....	16
2.7.1. Reactividades relativas de los compuestos carbonílicos (aldehídos)	17
2.7.2. Reacciones de aldehídos	18
3.- JUSTIFICACIÓN	20
4.- OBJETIVOS	21
4.1. Objetivo general	21
4.2. Objetivos específicos.....	21
5.- MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
6.1. Obtención de extraíbles de <i>Cordia elaeagnoides</i>	24
6.2. Purificación en columna cromatográfica.....	24
6.3. Análisis del aliodorin mediante RMN	25
6.4. Derivado oxima del aliodorin	31
6.5. Análisis del derivado oxima mediante RMN	32
6.6. Pruebas de inhibición del aliodorin y su derivado oxima	38

6.7. Análisis conformacional mediante métodos computacionales.....	39
6.7.1. Análisis conformacional del aliodorin	39
6.7.2. Análisis conformacional del la oxima.....	44
6.8. Acoplamiento Molecular (DOCKING)	49
7.- CONCLUSIONES	52
8.- PARTE EXPERIMENTAL	53
8.1. Compuesto aliodorin: 8-(2,5-Dihidroxifenil)-2,6-dimetilocta-2,6-dienal	53
8.2. Derivado oxima de aliodorin: 8-(2,5-Dihidroxifenil)-2,6-dimetilocta-2,6-dioxima	54
9.- APÉNDICE DE ESPECTROS	56
10.- BIBLIOGRAFÍA	63

Figuras

Figura 1. Estado de Michoacán	1
Figura 2. Partes del tronco de un árbol.....	3
Figura 3. Árbol de <i>Cordia elaeagnoides</i>	8
Figura 4. Setas características del hongo <i>Trametes versicolor</i>	11
Figura 5. Degradación de la lignina.	15
Figura 6. Estructura de la Medicarpina obtenida por difracción de Rayos-X	16
Figura 7. Enzima Lacassa del <i>Trametes versicolor</i>	16
Figura 8. Reactividad relativa de distintos compuestos carbonílicos	17
Figura 9. Extracto de THF.....	24
Figura 10. Extracto de Hexano	24
Figura 11. Espectro de RMN ¹ H del aliodorin.	25
Figura 12. Espectro de RMN de ¹³ C del aliodorin.	26
Figura 13. Espectro de RMN COSY del aliodorin.	27
Figura 14. Espectro de RMN NOESY del aliodorin.....	28
Figura 15. Espectro de RMN HETCOR del aliodorin.	29
Figura 16. Espectro infrarrojo del aliodorin.	30
Figura 17. Condiciones de reacción para obtener la oxima del aliodorin.....	31
Figura 18. Espectro de RMN ¹ H del oxima.	32
Figura 19. Espectro de RMN ¹³ C de la oxima.	33
Figura 20. Espectro COSY de RMN de la oxima.	34
Figura 21. Espectro RMN NOESY de la oxima.....	35
Figura 22. Espectro RMN HETCOR de la oxima.	36
Figura 23. Espectro infrarrojo del derivado oxima.	37
Figura 24. Prueba realizada mostrando grado de inhibición.....	38
Figura 25. control de las pruebas de inhibición.....	38
Figura 26. Aliodorin (8-(2,5-Dihidroxifenil)-2,6-dimetilocta-2,6-dienal).....	39
Figura 27. incon2	41
Figura 28. confórmers de incon1 a incon10.....	42
Figura 29. Oxima (8-(2,5-dihidroxifenil)-2,6-dimetilocta-2,6-dioxima).	44
Figura 30. aldoxcon1 6-31G	46
Figura 31. confórmers de aldoxcon2 a aldoxcon9	47
Figura 32. Mejor pose del Aliodorin en el sitio de entrada del oxígeno de 1GYC ...	49
Figura 33. Mejor pose del la oxima en el sitio de entrada del oxígeno de 1GYC...	50
Figura 34. Interacciones de puente de hidrógeno (azul) Aliodorin y 1GYC	50
Figura 35. Interacciones de puente de hidrógeno (azul) entre Oxima-Aliodorin y 1GYC	51

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. Vegetación en Michoacán

El estado de Michoacán presenta casi todos los tipos de vegetación que existen en nuestro país gracias a su variedad de relieves y climas. Esto también debido a que al estado lo conforman dos grandes regiones montañosas o provincias fisiográficas, que son: la sierra madre del sur y el sistema volcánico transversal, además de valles intermontañosos (**Figura 1**).



Figura 1. Estado de Michoacán

Los trópicos climáticos que predominan en Michoacán son: clima tropical lluvioso con lluvias en verano; clima seco estepario cálido, con lluvia escasa que predomina en verano; clima templado subhúmedo con lluvias en verano, la temperatura media del mes más caliente es mayor a 22°C; Clima templado subhúmedo, con lluvias en verano, la temperatura del mes más cálido es inferior a 22°C; clima templado con lluvias todo el año y una época más seca en el invierno. En cuanto a los principales tipos de vegetación que existen en el estado, se pueden localizar bosques de coníferas en las principales sierras del estado, entre los 2,600 y 3,500 m de altitud; el bosque mixto, constituido por pinos y encinos, localizados entre los 1,000 y 2,600 m siendo la vegetación predominante en parte de territorio de 62 municipios de la entidad, otras áreas de vegetación de matorrales espinosos y pastizales sobresalen al Norte y Noreste del Estado, así como en la zona que ocupa la depresión del Balsas Tepalcatepec. Al sur, en las partes meridionales de la Sierra Tarasca, así como en las laderas y partes bajas de la Sierra de Coalcomán existen extensas áreas con vegetación de selvas secas, como la baja caducifolia (**Enciclopedia de los municipios, 2009**).

Dentro de los municipios que cuenta con una gran vegetación en el estado se encuentra Taretan el cual se localiza al oeste del estado, limitado al norte con Ziracuaretiro, al este con Santa Clara del cobre y Ario de Rosales, al sur con Nuevo Urecho y Gabriel Zamora y al oeste con Uruapan.

Su relieve está constituido principalmente por el sistema volcánico transversal y la sierra de Santa Clara, su clima es templado con lluvias en verano, predominando el bosque tropical deciduo, selva y pastizales. La superficie forestal maderable está ocupada por pino y encino, la no maderable, por matorrales de distintas especies (**Palma, 2018**).

1.2. Características de la madera

Se llama madera al conjunto de tejidos del xilema que forman el tronco, las raíces y las ramas de los árboles o arbustos. La madera no es un material homogéneo, sino que está formado por un conjunto de células especializadas en tejidos que llevan a cabo las funciones fundamentales del árbol o arbusto como son: la conducción de la savia, la transformación y almacenamiento de los productos vitales así como sostén de árbol. Considerándose como un material biológico, renovable, orgánico, poroso, higroscópico, anisotrópico y heterogéneo las partes que componen al tronco del árbol son (**Oramas, 2019**):

Corteza: es una capa de aspecto irregular en la que se encuentran dos capas; *la corteza externa*, que es la capa exterior y está formada por células muertas que protegen el árbol del daño físico y del cambio climático, *la corteza interna*, también llamada floema y tiene la función de conducir de forma descendente la savia elaborada por las hojas.

Cambium: es el tejido generatriz de casi la totalidad de los tejidos que están formando el tronco y por lo tanto es el crecimiento del grosor del árbol.

Albura o Sámago: es la parte viva del tejido leñoso, la cual es por lo general más clara que el duramen, y por la cual se conduce la savia (agua y sales minerales) en forma ascendente hasta las hojas.

Duramen: aparece continuo a la albura y su color es normalmente más oscuro, le confiere propiedades características al árbol de durabilidad y resistencia, ya que contiene sustancias solubles como carbohidratos, polisacáridos, alcaloides, flavonoides y taninos que al oxidarse generan el color oscuro.

Medula: es la zona que ocupa el centro del tronco de consistencia frágil. Y respecto a la forma puede ser circular, elíptica, cuadrada, triangular o en forma de estrella (**Figura 2**).

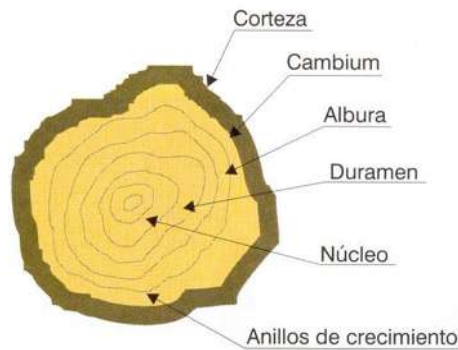


Figura 2. Partes del tronco de un árbol

1.3. Clasificación de la madera

El tipo particular del árbol del cual proviene la madera se denomina especie, existen dos grandes grupos botánicos que incluye la mayor parte de las especies vegetales susceptibles de suministrar maderas comerciales: las Gimnospermas y Angiospermas (**Palma, 2018**).

El primer grupo lo constituyen las coníferas (orden *Coniferales*) también llamadas como arboles de madera blanda, los cuales se caracterizan por sus hojas en forma de aguja y por la falta de vasos en la madera. El segundo grupo lo forman las latifoliadas, también llamadas como arboles de madera dura o de hojas frondosas, esto debido a que las plantas son de hoja ancha puede ser perennes o caedizas y con presencia de vasos en su madera. Normalmente se distingue entre frondosas de zonas templadas y frondosas tropicales.

Los términos madera blanda y madera dura no expresan el verdadero grado de dureza de las distintas especies de árboles. Algunos árboles de madera blanda son tan duros como los arboles de madera dura de densidad media, en tanto que algunas especies de árboles de madera dura tienen madera más suave que algunos árboles de madera blanda.

1.4. Durabilidad natural de la madera

Durante su crecimiento, el árbol produce cada año un cierto volumen de madera. La parte joven de árbol, compuesta por las capas exteriores más recientemente formadas, constituye la albura, que asegura la función de conducción de líquidos. Mientras que el árbol llega a una cierta edad, las capas más ancianas de la albura, por lo tanto las internas pierden esta función de

conducción y se transforman en madera de duramen que ocupa la parte central del tronco. La transformación de la albura en duramen, es un factor particularmente importante en la medida en la que es ella la que confiere a la madera su durabilidad natural. Esto debido a que la albura es siempre más susceptible a modificación. Esta vulnerabilidad se debe a la presencia de hidratos de carbono (almidón, azúcar), que constituyen sustancias nutritivas susceptibles a favorecer el desarrollo de insectos y hongos lignolíticos. Por el contrario, el duramen, que no contiene estas sustancias de reserva, es simplemente más resistente frente a agresiones biológicas (**Jiménez, 2005**).

Además, (**Kollman, 1959**) sostiene que el duramen se protege de hongos e insectos lignícolas mediante obstrucción mecánica de los vasos, taponamiento de las punteaduras e impregnación de las paredes celulares, con metabolitos que la hacen resistente a los ataques de organismos xilófagos. Además se depositan en las células del duramen sustancias poli fenólicas, básicamente derivados del ácido shiquímico, cinámico y cafeíco, cuyas combinaciones con compuestos orgánicos determinan una gran variedad de preservadores de la madera, capaces de ejercer efectos tóxicos y/o repelentes contra organismos lignícolas.

La durabilidad natural de la madera es entendida como la resistencia que presentan algunas especies contra el deterioro ambiental que se puede manifestar como pudrición.

1.5. Química computacional

La química computacional es todo aquel aspecto de la química el cual es explicado mediante el uso de un equipo de computo y un software. Principalmente, se puede decir que es la evolución de la química teórica ya que su principal uso se centra en la aplicación de los métodos de cálculo para resolver ecuaciones y calcular propiedades a nivel molecular. Dado que la química computacional es útil en la comprensión de sistemas químicos, es utilizada como herramienta de aprendizaje y de respaldo en investigaciones experimentales. Ésta comprende dos grandes enfoques, la mecánica molecular y la mecánica cuántica, siendo ésta última usada en química computacional en la década de los setentas al ser incluida en los modelos teóricos y basada en la ecuación de Erwin Schrödinger. De la química computacional se puede obtener la información molecular necesaria para describir un sistema, dado que es utilizada para conocer estados intermedios de reacción, ángulos de enlace, propiedades electrónicas de la molécula, etc. En la actualidad existen programas específicos para realizar cálculos de química computacional, los cuales difieren en el método de cálculo, así como en la exactitud y recursos computacionales necesarios (**Cuevas, 2005**).

1.5.1. Generalidades de la química computacional

La química computacional es una parte de la ciencia que comprende las áreas de química, biología y física unidas a la computación, la cual permite la investigación de átomos, moléculas y macromoléculas mediante un sistema de ordenadores. Este tipo de análisis generalmente se llevan a cabo cuando la investigación de laboratorio es inapropiada, impracticable o imposible, debido a las condiciones extremas de dichos experimentos (altas temperaturas, condiciones de vacío, etc.), o bien a los altos costo que se generan **(Figuroa, 2008)**.

El objetivo principal de la química computacional es predecir todo tipo de propiedades moleculares de sistemas químicos utilizando la fisicoquímica, la física molecular y la física cuántica, y emplea una gran variedad de técnicas teóricas en constante desarrollo.

La química teórica tiene como objetivo explicar el comportamiento de las sustancias que observamos a nivel macroscópico, a partir de las interacciones fundamentales que ocurren entre los electrones y los núcleos. Estudiando los métodos teóricos aplicables a sistemas químicos, utilizando la mecánica cuántica, teoría introducida por Erwin Schrödinger, quien propuso la naturaleza ondulatoria del electrón con la solución de una ecuación la cual lleva su nombre, la cual al resolverse presenta no uno sino varias soluciones llamadas funciones de onda (Ψ) las cuales representan diversos estados energéticos del electrón. La función de onda no tiene ningún significado físico; sin embargo Max Born propuso que el cuadrado de la función de onda (Ψ^2) puede interpretar la probabilidad de encontrar un electrón dentro de una región. Gracias a estas teorías, se tiene una visión más clara de cómo están formadas las moléculas y ésta es la base de la química computacional **(Fabian, 2019)**.

La química computacional es el subcampo de la química teórica que implica el modelado de aspectos químicos por computadora, que incluye métodos matemáticos y algoritmos computacionales combinados con las leyes fundamentales de la física para estudiar sistemas químicos de manera que puedan determinar sus propiedades y explicar los comportamientos observados experimentalmente, en consecuencia influye directamente sobre la química molecular, teniendo aplicaciones en múltiples ramas de la ciencia.

Los métodos computacionales son numéricos y por ello es necesario de interfaces gráficas que interpreten la solución de éstos al ser aplicados a un sistema químico. Los métodos gráficos permiten la visualización y manipulación de las moléculas que son objeto de estudio, siendo una herramienta esencial en la química computacional y que están comprendidos dentro del modelado molecular.

1.5.2. Programas utilizados en química computacional y modelado molecular

Spartan 14: Spartan es una aplicación de modelado molecular y química computacional que contiene algoritmos para mecánica molecular, métodos *semi-empíricos* y *ab initio*, modelos de densidad funcional y post-Hartree–Fock y fórmulas termoquímicas incluyendo G3 (MP2) y T1.

Molden: Es un paquete para mostrar la densidad molecular de los métodos *Ab Initio* GAMESS-UK, GAMESS-US y GAUSSIAN y los métodos *semi-empíricos* Mopac/Ampac. Molden lee toda la información requerida del archivo de salida GAMESS/GAUSSIAN. Molden es capaz de mostrar los orbitales moleculares, la densidad de electrones y la densidad molecular menos atómica. Molden admite gráficos de contorno, gráficos de cuadrícula tridimensional con líneas ocultas y una combinación de ambos. Molden también puede predecir caminos de reacción y vibraciones moleculares, puede calcular y mostrar el potencial electrostático derivado verdadero o multipolar y las cargas atómicas se pueden ajustar al potencial electrostático calculado en una superficie Connolly. También presenta un programa de campo de fuerza independiente ambfor, que puede optimizar las geometrías con los campos de fuerza combinados Ámbar (proteína) y GAFF (moléculas pequeñas); tiene un potente editor de matriz Z que brinda un control total sobre la geometría y le permite construir moléculas desde cero, incluidos los polipéptidos.

LingPlot: Genera automáticamente diagramas esquemáticos de interacciones proteína-ligando para un archivo PDB dado. Las interacciones que se muestran son las mediadas por enlaces de hidrógeno y por contactos hidrófobos. Los enlaces de hidrógeno están indicados por líneas discontinuas entre los átomos involucrados, mientras que los contactos hidrófobos están representados por un arco con radios que irradian hacia los átomos del ligando con los que contactan. Los átomos contactados se muestran con radios que irradian hacia atrás **(Laskowski, 2011)**.

PLIP: Perfilador de interacción proteína-ligando totalmente automatizado, la caracterización de las interacciones en los complejos de proteínas y ligandos es esencial para la investigación en bioinformática estructural, descubrimiento de fármacos y biología, (PLIP), un servicio web novedoso para la detección y visualización totalmente automatizadas de contactos de proteína-ligando no covalentes relevantes en estructuras 3D. La entrada es una estructura del Banco de datos de proteínas, un nombre de proteína o ligando, o un complejo de proteína-ligando personalizado (por ejemplo, desde el acoplamiento). A diferencia de otras herramientas, devuelve una lista de interacciones detectadas a nivel de un solo átomo, que abarca siete tipos de interacción (enlaces de hidrógeno, contactos hidrofóbicos, apilamiento de π , interacciones de π -catión, puentes salinos, puentes de agua y enlaces halógenos) **(Salentin, 2015)**.

2.- ANTECEDENTES

2.1. Composición de la madera

La madera por ser de origen vegetal, está formada principalmente por fibras de celulosa y poliosas (hemicelulosa) que conforman el esqueleto, y de lignina que le proporciona la rigidez y dureza. Además de contener en menor proporción sustancias de baja masa molar conocidos como extraíbles y sustancias minerales.

De manera que la madera está construida por componentes estructurales y no estructurales, los cuales son los que componen la pared celular (celulosa, hemicelulosa y lignina) y los no estructurales se denominan sustancias extraíbles o extrañas al no pertenecer a la pared celular y encontrarse en menor proporción. La proporción es muy variable entre especies, también en la madera de árboles de la misma especie, en diferentes partes del árbol, en albura y el duramen, así como por parámetros edafoclimáticos (variación por zonas templadas y tropicales) **(Oramas, 2019)**.

Los árboles mantienen volúmenes variables de albura (la parte fisiológica, activa del tronco que ocupa el área más externa) para asumir las funciones de conducción de agua, almacenamiento de carbohidratos y su capacidad de responder a heridas externas e internas. Por otro lado la parte central del tronco se convierte gradualmente en duramen que contiene solamente células muertas sin la capacidad de conducir agua y almacenamiento de sustancias nutritivas. La albura, de color generalmente más claro que la madera del duramen, tiene sus elementos conductores libres de obturaciones por depósitos de extraíbles. A medida que se crean nuevas capas de albura, las próximas al duramen van perdiendo su función conductora y se convierten en duramen, proceso que se caracteriza por modificaciones morfológicas (anatómicas) y químicas como la formación de sustancias orgánicas como taninos u otras materias colorantes (extraíbles) que al oxidarse le dan su característico color obscuro **(Guzmán, 2008)**.

En general, las coníferas tienen un mayor contenido de extraíbles que las maderas latifoliadas, la mayoría de los extraíbles están localizados en el duramen y algunos son responsables de características tales como olor, color y durabilidad de la madera **(Jiménez, 2005)**.

Tuset y Duran, señalan que la madera de albura y duramen presentan distinta resistencia a los organismos de deterioro; en la albura suelen encontrarse sustancias de reserva como azúcares y almidones que lo hacen especialmente preferible para hongos e insectos xilófagos; por el contrario, la madera de duramen contiene otro tipo de sustancias, propias del proceso de duraminización, que tienen en algunos casos, propiedades inhibitorias para el desarrollo de esos organismos, como aceites esenciales, resinas, taninos, gomas, compuestos fenólicos y

sustancias hidrosolubles diversas de alta toxicidad. A la presencia de estos extraíbles se les atribuye características como la durabilidad, el color, el olor, la permeabilidad y la reducción en contracción e hinchamiento de cada especie maderera.

El término “durabilidad” de las maderas, hace referencia a la capacidad sin tratamiento del material leñoso para resistir el ataque de los hongos xilófagos, las bacterias, los insectos, y perforadores marinos como también el desgaste químico y mecánico (**Arostegui, 1976**).

Darrel señala que la durabilidad de la madera de duramen deriva de la acción de los componentes de los extraíbles como preservarte natural. Estos extraíbles, como los que le dan el color más oscuro, son creados en gran cantidad durante la transformación de la madera de albura a duramen. Los extraíbles conocidos como inhibidores de la degradación son compuestos fenólicos, con la efectividad determinada por los tipos y cantidades presentes de estos, su estabilidad química y resistencia a la degradación. La densidad y otras características físicas de la madera no afectan apreciablemente la resistencia a la degradación (**Darrel, 1989**).

2.2. *Cordia elaeagnoides* (cueramo).

Familia Boraginaceae. Árbol de fuste recto, de hasta 20 m de altura y diámetros a altura de pecho de 30 cm, con ramas gruesas y horizontales de copa dispersa. Se trata de una especie endémica de México de gran importancia ecológica y económica. Su madera es de las más duras y pesadas de género y presenta un color y vetado muy atractivo, por lo que es una de las maderas comerciales más importantes de las más de 200 especies correspondientes a este género (**Ruiz, 2014**).



Figura 3. Árbol de *Cordia elaeagnoides*

Se distribuye en la vertiente del Pacífico desde el sur de Nayarit, Jalisco, Guerrero, Oaxaca y Chiapas, incluyendo la cuenca del río Balsas y Quintana Roo. Se asocia principalmente con la selva mediana subcaducifolia y baja caducifolia.

La albura es de un color claro amarillo, de transición abrupta al duramen de un color café oscuro, con vetado pronunciado en tonalidades más oscuras y casi negras, sin olor ni sabor, de brillo medio y de hilo recto (**Figura 3**).

Se utiliza principalmente para la elaboración de pisos (parquet tipo mosaico); chapas decorativas rebanadas, muebles finos, ebanistería, artículos artesanales variados, tallados y torneados. Y se ha clasificado el duramen como resistente a moderadamente resistente a los hongos de pudrición (clase 2 y 3 según **ASTM D 2017**).

El duramen de *Cordia elaeagnoides* se clasificó de durable a moderadamente durable por (**Lomelí, 1991**) quien determinó la durabilidad natural al ataque de los hongos xilófagos *Lentinus lepideus* Fr. Y *Aetiporus sulphureus*. Además se ha probado la inhibición de hongo *Trametes versicolor* con los extractos de *C. elaeagnoides* (**Morales, 2015**).

2.3. Biodegradación de la madera por hongos xilófagos

La madera por ser un material de origen orgánico es susceptible a la degradación por procesos biológicos naturales. Entre los numerosos agentes de biodegradación de la madera, los hongos xilófagos son los organismos más importantes y potentes de la pudrición de la madera, ya que tienen la capacidad de degradar por procesos biológicos enzimáticos algunos de los componentes principales de la madera. La degradación fúngica resulta de la despolimerización enzimática de los principales componentes de la pared celular: celulosa, hemicelulosa y lignina, descomposición que provoca la alteración de las propiedades físicas y mecánicas del leño. Dichas alteraciones son de diferente magnitud en función de la actividad enzimática del hongo responsable del deterioro (determinante del tipo de pudrición), de las características químico-anatómicas del leño como también de la colonización fúngica al atravesar los obstáculos/barreras que ofrecen las maderas, como son de su estructura y composición química (**González, 2012**).

El proceso por el cual los hongos infectan a la madera es mediante la producción de hifas que se originan por la germinación de las esporas que se hallan en el aire a la espera de condiciones favorables para su desarrollo. Las esporas son trasladadas por el viento, los animales, el agua, etc. las cuales al entrar en contacto con la madera susceptible pueden germinar. Las hifas se introducen en la madera a través de los elementos leñosos, vasos y traqueidas,

alimentándose de las sustancias de reserva o segregando enzimas que producen la descomposición de la pared celular (**Remacha, 2014**).

Es posible establecer una secuencia en la colonización:

La pudrición o degradación puede extenderse también sin la formación de esporas, por el crecimiento directo con el micelio desde la madera infectada (o suelo) hasta la madera sana en contacto con ella.

1. La pudrición empieza cuando la hifa o el hongo de la pudrición penetra la madera, inicia la colonización, y libera las enzimas. En esta fase de colonización, el daño es limitado y aún no hay evidencias visibles. Esta etapa es llamada incipiente.

2. A medida que se desarrolla el proceso de pudrición aparecen pequeños cambios en el color, en la textura de la madera, y pueden aparecer fibras quebradizas; estos cambios constituyen la fase temprana, cuando la pudrición es detectable, pero no obvia.

3. A medida que el proceso de pudrición continúa a la fase intermedia, hay evidentes cambios de color y textura en la madera, pero el grosor de la estructura permanece aún intacto.

4. La fase tardía es cuando hay un rompimiento total de la estructura de la madera y la madera residual se vuelve blancuzca y de mala calidad (**Morrell, 1992**).

2.4. Tipos de pudrición de la madera

Hay varios tipos de pudrición:

La **pudrición marrón o cúbica** es la más grave y peligrosa y está producida por hongos que se alimentan preferentemente de la celulosa y la hemicelulosa dejando, como consecuencia, un residuo de color marrón oscuro formado principalmente por lignina. Al secarse la pieza el material residual tiende a agrietarse formando una estructura de pequeños cubos o prismas que se disgrega con facilidad entre los dedos como si fuera polvo. El ataque inicial de estos hongos favorece el ataque posterior de los insectos de ciclo larvario (generalmente anóbidos) (**León, 2010**).

La **pudrición blanda** Producida por hongos ascomicetes y deuteromicetes (hongos imperfectos), cuyas hifas se desarrollan no solo en el lumen sino también en el interior de la pared celular secundaria, realizando su daño (cavidades). Se alimentan principalmente de la celulosa. Es muy parecida a la pudrición parda y se diferencia de esta porque la madera se siente al tacto muy blanda o esponjosa, y cuando se seca se resquebraja formando cubos pequeños. Se produce cuando existe alta humedad, tanto en el ambiente como en la madera y en las zonas muy húmedas en contacto con el muro o la pared. Esta causada por un amplio rango de

hongos ascomicetos de los géneros *Chaetomium*, *Xylaria*, *Hypoxylon*; y de deuteromicetos como los *Alternaria*, *Coniothyrium*, *Humicola*, *Stemphylium* y *Stysanus*.

La **putrición blanca o fibrosa** está producida por hongos que se alimentan preferentemente de la lignina, y simultáneamente todos los componentes de la madera hasta CO₂ y H₂O. La madera atacada toma un color blanco debido al complejo celulósico resultante (complejo de celulosa más o menos blanco que rara vez es de tono uniforme, sobre el que aparecen vetas blancas separadas por zonas de madera normal). La madera atacada presenta un aspecto fibroso, por lo que a veces se la llama pudrición fibrosa. Generalmente afectan más a las maderas de frondosas que a las de coníferas, debido a que estas tienen un mayor contenido en lignina. A menudo se denomina pudrición corrosiva o deslignificante por la capacidad de los hongos ligninolíticos por su capacidad de mineralizar las ligninas basada en la producción de radicales libres, principalmente por medio de las enzimas estructurales lignino-peroxidasa (LIP), manganeso peroxidasa (MnP) y la lactasa.

2.5. *Trametes versicolor*

Este es un hongo de pudrición blanca, el cual desarrolla cuerpos fructíferos o setas (basidiomas) con sombreros de 3 a 6 cm, delgados de borde ondulado, carece de pie, carecen de forma imbricada (sobrepuestos unos con otros). La cara superior es aterciopelada, satinada y presenta anillos concéntricos de varios colores que van del pardo al blanco y del marrón al ocre, a veces con iridiscencias dependiendo del grado de humedad presente en el ambiente (**Figura 4**) (**valderrey, 2006**).

El hongo *Trametes versicolor* es uno de los más importantes degradadores de la madera ya que pueden degradar y metabolizar la lignina y los carbohidratos aproximadamente a la misma velocidad. Por estas razones la norma anual Book of ASTM Estándar (ASTM, 1994) recomiendan a este hongo para ensayos de durabilidad (**Collins, 1997**).



Figura 4. Setas características del hongo *Trametes versicolor*

2.6.- Métodos de cálculo computacionales

La química computacional nos puede ser de gran utilidad al predecir la estructura molecular, caracterizar a una molécula objetivamente de acuerdo a sus niveles de energía y propiedades electrónicas, verificar la estabilidad de sistemas químicos y estimar diferencias de energía en distintos estados para explicar avances de reacción y mecanismos a nivel atómico. Esto basándonos en dos principios físicos que rigen la aplicación de los métodos computacionales, uno es la mecánica molecular la cual aplica las leyes de la física clásica al núcleo molecular sin considerar explícitamente a los electrones, basado en la mecánica clásica, los átomos se consideran como masas con energía según la ley de Coulomb. El segundo se basa en la química cuántica, la cual considera la estructura electrónica de los átomos y toma como base la ecuación de Schrödinger, para la que no existe solución, pero se pueden hacer aproximaciones de acuerdo a las necesidades del cálculo **(Rodríguez, 2014)**.

Con lo anterior se producen tres métodos principales de estructura electrónica como son los *ab-initio*, funcionales de la densidad y *semi-empíricos*.

Los métodos *semi-empíricos*, utilizan parámetros experimentales para simplificar el cálculo computacional. Estos métodos resuelven en forma aproximada la ecuación de Schrödinger que depende de parámetros apropiados al tipo de sistema químico.

Los métodos *ab-initio* (primeros principios), a diferencia de la mecánica molecular y métodos *semi-empíricos*, no utilizan parámetros experimentales en el cálculo, están basados únicamente en las leyes de la mecánica cuántica y valores de las constantes físicas fundamentales (velocidad de la luz, masas y cargas de electrones y núcleos, constante de Planck).

Los métodos *semi-empíricos* tienen un bajo costo computacional, y proveen una descripción cualitativa razonable, pero la exactitud en la predicción cuantitativa de la energía y las estructuras moleculares depende de que tan buenos sean los conjuntos de parámetros, el tamaño del sistema y tipo de átomos que lo conformen. Los métodos *ab-initio*, a diferencia de los *semi-empíricos*, predicen con mayor exactitud desde el punto de vista cuantitativo y cualitativo, pero el costo computacional aumenta sustancialmente.

El tipo más simple de cálculo de estructura electrónica *ab-initio* es el método de Hartree-Fock (RHF) en el cual sus ecuaciones se basan en la aproximación orbital. Esta aproximación supone a la función de onda para un sistema de N electrones un producto anti-simetrizado, de N orbitales mono-electrónicos es decir, para el electrón definido por un orbital, considera que se comporta como si hubiera

una carga distribuida en el espacio pero con distinto componente de spin (**Valles, 2014**).

La teoría de funcionales de la densidad es una tercera clase de método de cálculo de estructura electrónica basada en el modelo molecular tomando en cuenta la correlación electrónica como un funcional (una función de una función) general de la densidad electrónica a diferencia de Hartree-Fock que toma la correlación electrónica como un campo medio. La teoría del funcional de la densidad (DFT) es similar a los métodos *ab-initio* en muchas formas; requiere fuentes similares de cálculo a la teoría Hartree-Fock, y tiene un costo computacional bastante cercano a los métodos *ab-initio*.

La DFT calcula la energía y otras propiedades moleculares a partir de la densidad electrónica del estado fundamental. El objetivo de esta es designar funcionales que relacionan la densidad electrónica con la energía, ésta puede dividirse en tres partes; energía cinética, atracción entre núcleo y electrón y repulsión electrón-electrón, mientras la repulsión núcleo-núcleo es una constante en la aproximación de Born-Oppenheimer.

Los métodos computacionales están basados en el cálculo de las Superficies de Energías Potenciales, las cuales se describen cómo las fuerzas de interacción entre sus átomos, y es así como los métodos computacionales difieren en la manera de calcularla.

Los orbitales moleculares se pueden representar como combinaciones lineales de un conjunto predefinido de funciones de un electrón, conocidas como funciones de base y se ubican generalmente en los núcleos atómicos, clasificándose como:

- a) Conjunto de base mínima: contienen el mínimo número de funciones de base requeridas para cada átomo, estos usan orbitales de tipo atómico de tamaño fijo, la base STO-3G es la mínima base posible.
- b) Conjunto de base de valencia dividida: la primera forma en que una base puede hacerse mayor es incrementando el número de funciones de base por átomos, los conjuntos tales como 3-21G y 6-31G tienen dos o más tamaños de funciones de base por cada orbital de valencia.
- c) Conjunto de base polarizados: los conjuntos de base dividida permiten cambiar el tamaño de los orbitales, pero no cambiar su forma; así los conjuntos de base polarizada remueven esta limitación al adicionar orbitales con momento angular más allá del que es requerido para la descripción del estado fundamental de cada átomo, el conjunto de base 6-31G* agrega funciones d y el conjunto de base 6-31G** agrega funciones d y p.

d) Funciones difusas: son funciones tipo s o p que permiten a los orbitales ocupar una gran región en el espacio. Estos son importantes para sistemas cuyos electrones están lejos del núcleo: moléculas con pares libres, aniones, dímeros con enlace de hidrógeno, etc. Como son 6-31+G (d) y 6-31++G (d).

Con todo lo antes mencionado se puede diseñar y construir una molécula con un conjunto de programas de cómputo, tridimensionalmente para poder así manipular y visualizar el compuesto. A partir de este modelo tridimensional se generan una serie de coordenadas. Los cálculos matemáticos se realizan en función de la solución aproximada de la ecuación de Schrödinger el cuadrado de la función de onda dependerá de las coordenadas de las partículas graficadas anteriormente y el resultado de estos métodos numéricos son unas nuevas coordenadas en las que se puede observar las características específicas del cálculo.

2.6.1. Acoplamiento Molecular (Docking)

El acoplamiento o reconocimiento molecular (conocido como Molecular Docking) es una técnica basada en la mecánica molecular ampliamente utilizada para predecir energías y modos de enlace entre ligandos y proteínas, información de gran utilidad en el estudio de nuevos compuestos con efectos terapéuticos. Con el Docking se estudia la interacción proteína–ligando, cuyo objetivo principal es predecir energías y modos de enlace, y que suele hacerse previamente un estudio experimental. En estudios donde se aplica el acoplamiento molecular, usualmente se considera la mejor pose aquella que reporta la menor energía de unión.

Aunque los parámetros energéticos son muy importantes al momento de efectuar esta selección, es conveniente tener en cuenta que los campos de fuerza empleados por los métodos de mecánica molecular (MM) llevan consigo algunas aproximaciones que lógicamente conducirían a resultados no tan reales. Estas aproximaciones se relacionan principalmente con el hecho de considerar sólo la disposición nuclear de los átomos, prescindiendo de los electrones, al asumir que éstos se distribuirán óptimamente a su alrededor.

En nuestro grupo de trabajo se empleó la enzima lacasa (identificada como 1GYC), tomada de la base de datos Protein Data Bank (PDB) ya que es la que lleva la degradación de las ligninas al tomarlas como sustrato.

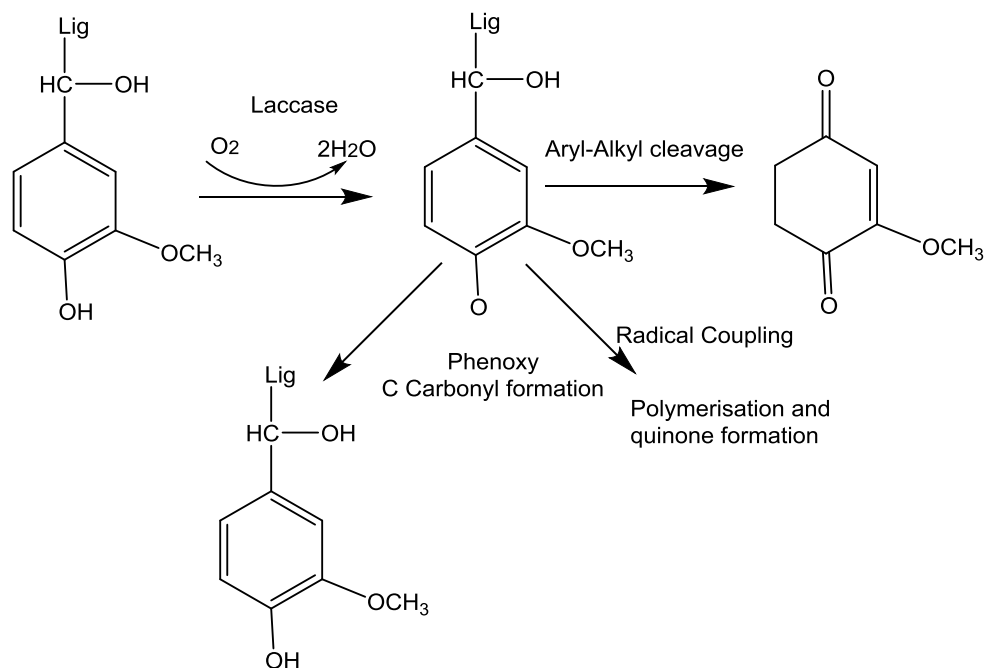


Figura 5. Degradación de la lignina.

En general, la enzima lacasa lleva la degradación del sustrato para sustraer un electrón transportándolo al oxígeno el cual se trasforma a agua (**Figura 5**). En estudios previos o reportados (**Morales, 2016**) por acoplamiento molecular muestran que los ligandos como la Medicarpina (**Figura 6**) se depositan en el sitio del oxígeno obstruyen la entrada de este (**Figura 7**), lo que sugiere que ligandos con fuertes interacciones de unión en el sitio del oxígeno son inhibidores de la lacasa lo que es consistente con los resultados experimentales donde se observó que inhibían el crecimiento del *Trametes versicolor*. En nuestro grupo de trabajo (**Morales, 2016**), se aisló del duramen de *A. inermis* la Medicarpina (**Figura 6**), un compuesto perteneciente a la familia de los isoflavonoides, específicamente a la subdivisión de los pterocarpanos. Además este compuesto fue aislado del duramen de *Dalbergia congestiflora pittier* por (**Martínez, 2012**), la cual probó su efecto antifúngico sobre el hongo *Trametes versicolor* al obtener un porcentaje de inhibición del 100% a una concentración de 150 mg/L.

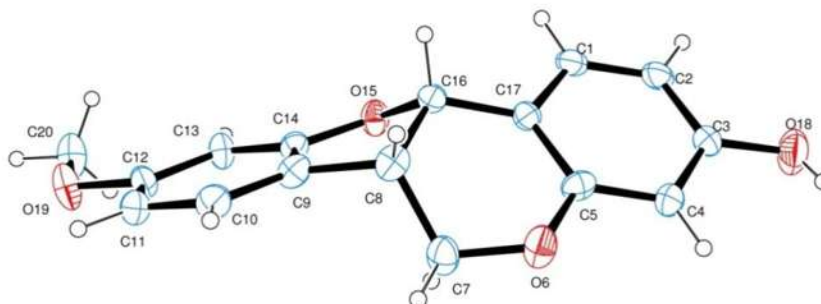


Figura 6. Estructura de la Medicarpina obtenida por difracción de Rayos-X

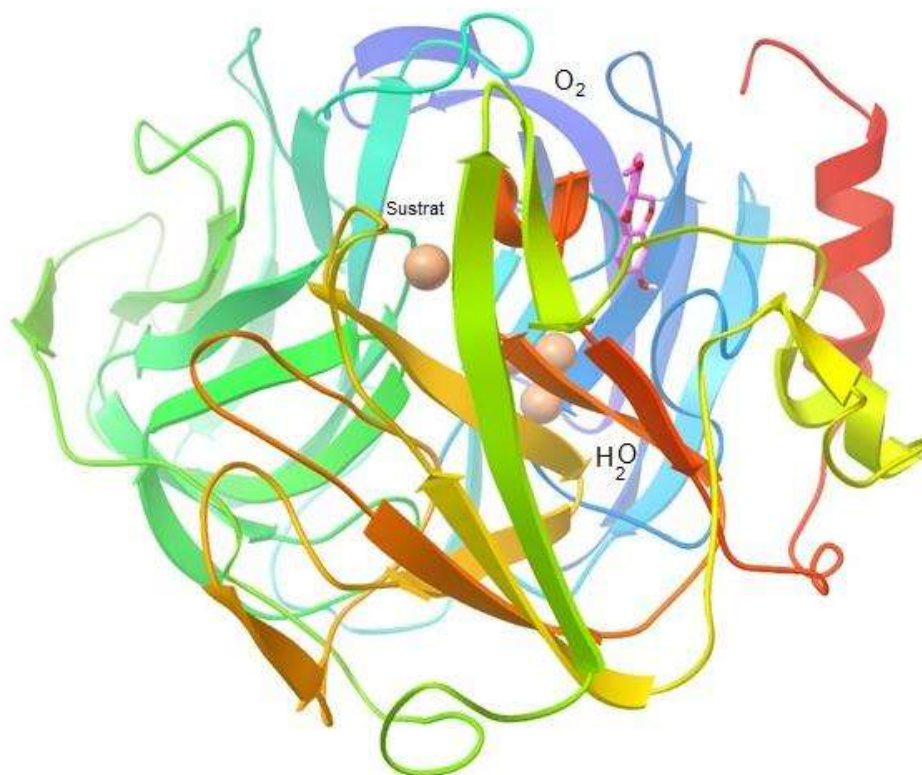


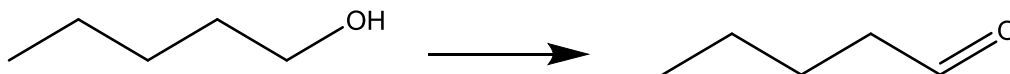
Figura 7. Enzima Lacase del *Trametes versicolor*

2.7. Características de los aldehídos

Los aldehídos son compuestos orgánicos caracterizados por poseer el grupo funcional carbonilo (-CHO), unido a un solo radical orgánico (**Carey, 2006**).

Los aldehídos se obtienen de la deshidratación de un alcohol primario.

Esto se puede llevar a cabo calentando el alcohol en una disolución ácida de dicromato de potasio (también hay otros métodos en los que se emplea Cr en el estado de oxidación $+6$). El dicromato se reduce a Cr^{+3} (de color verde). También mediante la oxidación de Swern, en la que se emplea dimetilsulfóxido, (DMSO), dicloruro de oxalilo, $(\text{CO})_2\text{Cl}_2$, y una base. Esquemáticamente el proceso de oxidación es el siguiente:



El átomo de carbono y el átomo de oxígeno que forman el grupo carbonilo se encuentran unidos mediante dos enlaces: uno σ y otro π . El átomo de carbono del grupo carbonilo presenta hibridación sp^2 y está enlazado al átomo de oxígeno y a otros dos átomos mediante tres enlaces σ coplanares, separados entre sí 120° . El segundo enlace entre el carbono y el oxígeno, el enlace π , se forma por solapamiento del orbital p no hibridizado del carbono con un orbital p del átomo de oxígeno.

2.7.1. Reactividades relativas de los compuestos carbonílicos (aldehídos)

Se ha visto que el grupo carbonilo es polar porque el oxígeno, al ser más electronegativo que el carbono, tiene una mayor atracción hacia los electrones de enlace doble. La carga positiva parcial en el carbono del carbonilo hace que sea atacado por nucleófilos. La carga positiva parcial en el carbono del carbonilo de una cetona es más pequeña que la de un grupo carbonilo de un aldehído porque, en relación con un hidrógeno, un grupo alquilo es donante de electrones. Por lo tanto, un aldehído es más reactivo ante el ataque nucleofílico (**Bruice, 2007**).

Los factores estéricos también contribuyen a la mayor reactividad de un aldehído. El carbono del carbonilo de un aldehído es más accesible al nucleófilo que el carbono del carbonilo de una cetona, porque el hidrógeno unido al carbono del carbonilo de un aldehído es más pequeño que el segundo grupo alquilo unido al carbono del carbonilo de una cetona (**Figura 8**).

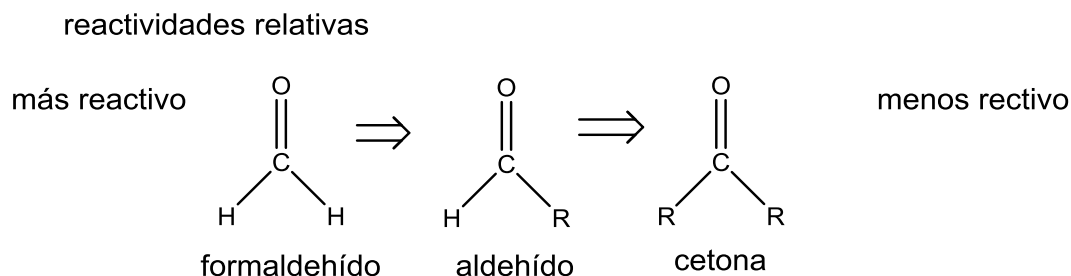


Figura 8. Reactividad relativa de distintos compuestos carbonílicos

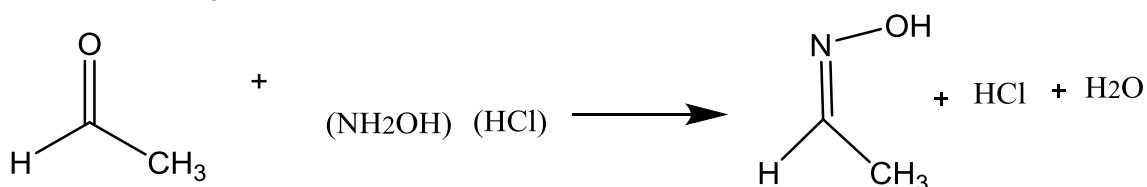
Por la misma razón, las cetonas con grupos alquilo pequeños unidos al carbono del carbonilo son más reactivas que las cetonas con grupos alquilo grandes.

2.7.2. Reacciones de aldehídos

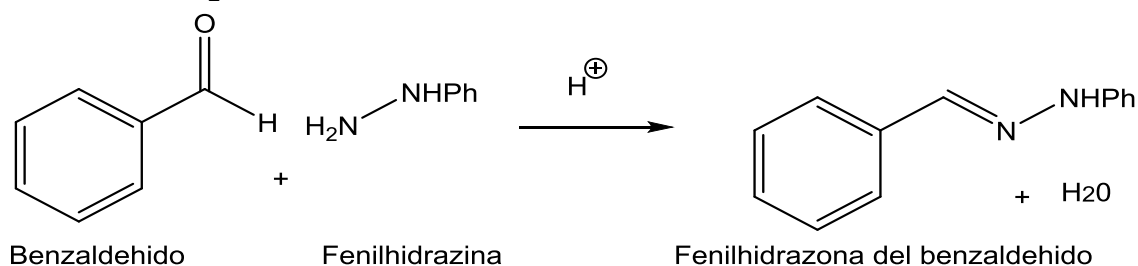
2.7.2.1. Reacciones de adición nucleofílica

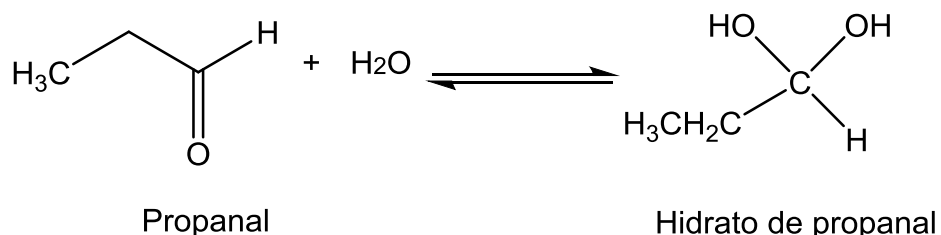
La reactividad del grupo carbonilo es consecuencia de la diferencia de electronegatividad entre el átomo de carbono y el átomo de oxígeno. La reacción más común de este grupo funcional es la adición nucleofílica, que consiste en la adición de un nucleófilo y de un protón al doble enlace C=O. El átomo de carbono electrofílico del grupo carbonilo presenta hibridación sp^2 y es plano, y por tanto está relativamente libre de impedimento estérico y abierto al ataque desde ambos lados del doble enlace C=O. Cuando una especie nucleofílica ataca al átomo de carbono del grupo carbonilo, los electrones del enlace π son desplazados hacia el átomo de oxígeno, generándose un ión alcóxido. En este proceso el átomo de carbono cambia su hibridación de sp^2 a sp^3 . En un paso posterior, el ión alcóxido puede protonarse para dar lugar al producto de la adición nucleofílica. Entre las reacciones de adición nucleofílica más comunes se encuentran: adición de H_2O , ROH , HCN , NH_2X , donde $X = NH_2, OH, NHCONH_2, NHAR$ (Yurkanis, 2014).

Adición de NH_3OH



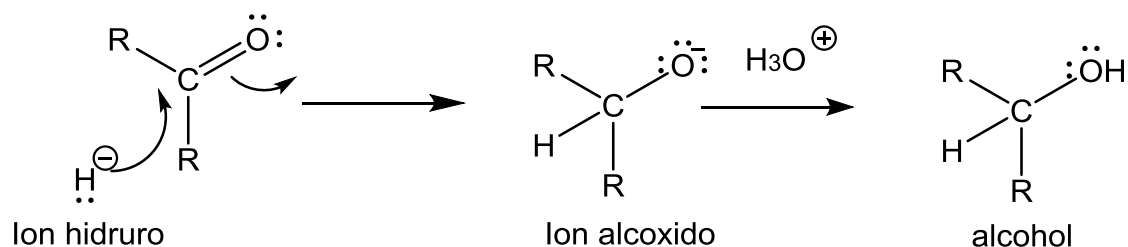
Adición de NH_2X



Adición de H₂O

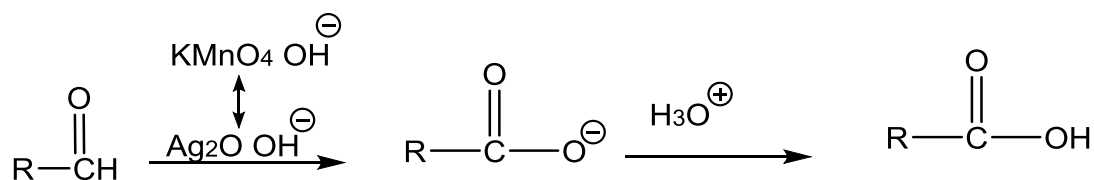
2.7.2.2. Reacciones de reducción

En presencia de sustancias reductoras como algunos hidruros o incluso otros aldehídos pueden ser reducidos al alcohol correspondiente. Determinados hidruros metálicos son capaces de adicionar un ión hidruro al grupo carbonilo de los aldehídos y las cetonas. El resultado de este ataque nucleofílico es un ión alcóxido que por protonación proporciona un alcohol. Los dos reactivos que se emplean con mayor frecuencia para la reducción de aldehídos y de cetonas son el borohidruro de sodio (NaBH₄) y el hidruro de litio y aluminio (LiAlH₄).



2.7.2.3. Reacciones de oxidación

Los oxidantes fuertes los transforman en el correspondiente ácido carboxílico. Los aldehídos se pueden oxidar con oxidantes fuertes, como el KMnO₄, y también con oxidantes suaves como el Ag₂O. En estas oxidaciones el aldehído pierde el átomo de hidrógeno enlazado al grupo carbonilo. Las cetonas son resistentes a la oxidación por la ausencia de este enlace C-H. (**Wade, 2012**).



3.- JUSTIFICACIÓN

Se ha comprobado que algunas maderas presentan mayor durabilidad natural que otras, esta durabilidad es la capacidad de resistencia al deterioro biológico, la cual esta atribuida principalmente a sus componentes extraíbles que le confieren características de resistencia ante agentes degradadores como lo es el hongo *Trametes versicolor*.

La madera de *Cordia elaeagnoides*, es una madera considerada durable, por lo que resulta de interés el estudio químico de los compuestos presente en esta madera durable, ya que estudios previos (**Morales, 2015**), demuestra que los extraíbles de *Cordia elaeagnoides* presentan gran capacidad de inhibición sobre el hongo *Trametes versicolor*.

La química teórica y modelado molecular, juegan un papel fundamental en el desarrollo de la química moderna ya que la química computacional se ha convertido en una herramienta prácticamente indispensable en cualquier campo de la química, ya que el uso de la química computacional nos ayuda a comprobar que los modelos prácticos son los adecuados o que las propiedades calculadas son cercanas o correctas a las propiedades reales es el trabajo experimental por lo que resulta de gran importancia su utilización en este trabajo.

.

4.- OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Comprobar la actividad inhibitoria del aliodorin aislado de *Cordia elaeagnoides* y su derivado oxima sobre el hongo *Trametes versicolor* mediante métodos de difusión en placa y el acoplamiento molecular del aliodorin y su derivado con la diana 1GYC, así como un análisis comparativo del infrarrojo experimental con el calculado mediante métodos computacionales.

4.2. Objetivos específicos

- Extraer el aliodorin del duramen de *Cordia elaeagnoides* mediante purificación en columna cromatográfica.

- Obtener el derivado de oxima del aliodorin.

- Caracterizar el aliodorin y oxima mediante espectroscopia de infrarrojo y RMN de ^1H , ^{13}C y experimentos de dos dimensiones: COSY, NOESY y HETCOR.

- Realizar un análisis conformacional del aliodorin y oxima mediante métodos computacionales, como lo son los métodos de cálculo *DFT* empleando el funcional híbrido B3LYP, con el conjunto de funciones base STO-3G, 3-21G Y 6-31G

- Emplear el conformero de mínima energía del aliodorin y oxima como ligando de la diana 1GYC para encontrar el sitio de unión más favorable mediante el Docking.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

La madera de *Cordia elaeagnoides* fue colectada en la comunidad de Taretan Michoacán, de la muestra de la madera se tomó solamente el duramen, el cual fue reducido de tamaño con formón y martillo en forma de astillas, para poder llevar a un molino (marca Micrón k-20 con capacidad de 20 kg/h) y obtener harina de duramen, la cual se dejó al aire libre para facilitar la pérdida de humedad.

Posteriormente la harina fue sometida a extracciones en un equipo Soxhlet por cuatro horas por cada solvente, empleando los solventes en polaridad creciente: hexano y tetrahidrofurano (THF). Los extractos obtenidos fueron llevados a la evaporación del solvente mediante un rotavapor para obtener los extractos crudos.

El crudo de THF se llevó a purificación en columna cromatográfica con el fin de obtener así el componente aliodorin presente en el crudo para su posterior estudio.

Ya obtenido el componente aliodorin y comprobado la presencia de este mediante resonancia magnética nuclear, para comprobar químicamente la existencia del grupo carboxilo del aldehído, se preparó el derivado oxima, utilizando clorhidrato de hidroxilamina y piridina.

Para las cromatografías en columna, se utilizó como fase estacionaria gel de sílice malla 70-230 Mesh ASTIM (Whatman) y como fase móvil proporciones de mezclas de disolventes (hexano y acetato de etilo). Estos disolventes utilizados fueron destilados en el laboratorio.

Los compuesto aliodorin y oxima (8-(2,5-dihidroxifenil)-2,6-dimetilocta-2,6-dioxima), fueron utilizados para determinar su capacidad anti fúngica sobre el hongo *Trametes versicolor* mediante pruebas de difusión en placa; estas pruebas fueron preparadas en caja Petri, utilizando como medio de cultivo agar papa-dextrosa, el cual se preparó siguiendo las instrucciones del proveedor, para posteriormente someterse a un proceso de esterilización en autoclave, al término de este proceso se incorporó el compuesto a una concentración de 150, 100, 75mg/L, esto para ambos compuestos, una vez solidificado el agar este se inoculó con el micelio del hongo *Trametes versicolor* y se incubó por 7 días a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, de igual manera se preparó un control el cual consistió en el agar sin tratamiento, trascurrido el tiempo de incubación, se determinó el porcentaje de inhibición que presentaron los extractos con la siguiente fórmula.

$$\% \text{inhibición} = \frac{\text{crecimiento del control} - \text{crecimiento del tratamiento}}{\text{crecimiento del tratamiento}} \times 100$$

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H (RMN- ^1H) así como los espectros de ^{13}C (RMN ^{13}C) fueron obtenidos del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, en un espectrómetro Varian Mercuri plus a 400MHz y un espectrómetro Varian Mercuri plus a 200MHz. También se realizaron las determinaciones de los diagramas de correlación heteronuclear $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ (HETCOR) y de correlación homonuclear $^1\text{H}/^1\text{H}$ (COSY) y correlación homonuclear Overhauser (NOESY). Las determinaciones se realizaron en Deuterocloroformo (CDCl_3) y Tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

Para la preparación de las estructuras del aliodorin y oxima, se empleó un análisis conformacional mediante métodos computacionales, esto se llevó a cabo al aplicar el método de cálculo DFT (métodos del funcional de la densidad), empleando el funcional híbrido B3LYP, con los conjuntos de funciones de bases STO-3G, 3-21G Y 6-31G, de los cuales se obtuvo el conformero de mayor estabilidad (menor energía). Este análisis estructural se basó principalmente en un comparativo con los diagramas de infrarrojo reportados para el aliodorin y oxima.

La estructura tridimensional de la enzima lacasa del hongo *Trametes versicolor* se obtuvo de la base de datos Protein Data Bank (PDB), con la clave 1GYC (Piontek, K. col. 2002).

El software utilizado para la simulación de la interacción enzima-ligando fue AutoDock, por ser de licencia libre además de su amplia difusión y aceptación en el campo científico. Dicho software medirá la energía libre del sistema (enzima-ligando) para una función que estará basada en el análisis de regresión lineal, con el campo de fuerza AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement). Además se empleó AutoDocktools como software de visualización.

6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Obtención de extraíbles de *Cordia elaeagnoides*

De la harina del duramen de *Cordia elaeagnoides* y empleando un equipo Soxhlet se obtuvieron los extractos de hexano y THF. La obtención de los extraíbles de *Cordia elaeagnoides* se realizó mediante reflujo utilizando un equipo Soxhlet, los reflujo se realizaron por 4 horas en lotes de 16 g de harina de duramen, utilizando distinta polaridad con los solventes hexano y tetrahidrofurano. Los resultados de las extracciones en este trabajo se muestran en la **Tabla 6.1.1**, donde se muestra en que polaridad, el peso y el porcentaje de los extractos obtenidos, para así obtener también el total de extraíbles para lotes de 16 g de harina.

Tabla 6.1.1 Extraíbles de *Cordia elaeagnoides*.

Solvente	Peso de extracto (g)	Porcentaje (%)	%Total de extraíbles
Hexano	0.295	1.84	18.7
THF	2.7	16.87	

El extracto de hexano presentó una consistencia mielosa de una coloración amarillo rojiza, con un porcentaje minoritario del 1.84% (**Figura 10**) y el extracto de THF presento una consistencia mielosa de color negro, el cual obtuvo un porcentaje mayoritario del 16.87% del total de extraíbles (**Figura 9**).



Figura 9. Extracto de THF



Figura 10. Extracto de Hexano

6.2. Purificación en columna cromatográfica.

1 gr del extracto de THF se sometió a purificación en columna cromatográfica utilizando gel de sílice (malla 70-230 ASTM) como fase estacionaria y mezclas de hexano/ acetato de etilo como fase móvil, obteniéndose 30 mg de una miel café con presencia de cristales el cual fue sometido a RMN para su posterior estudio.

6.3. Análisis del aliadorin mediante RMN

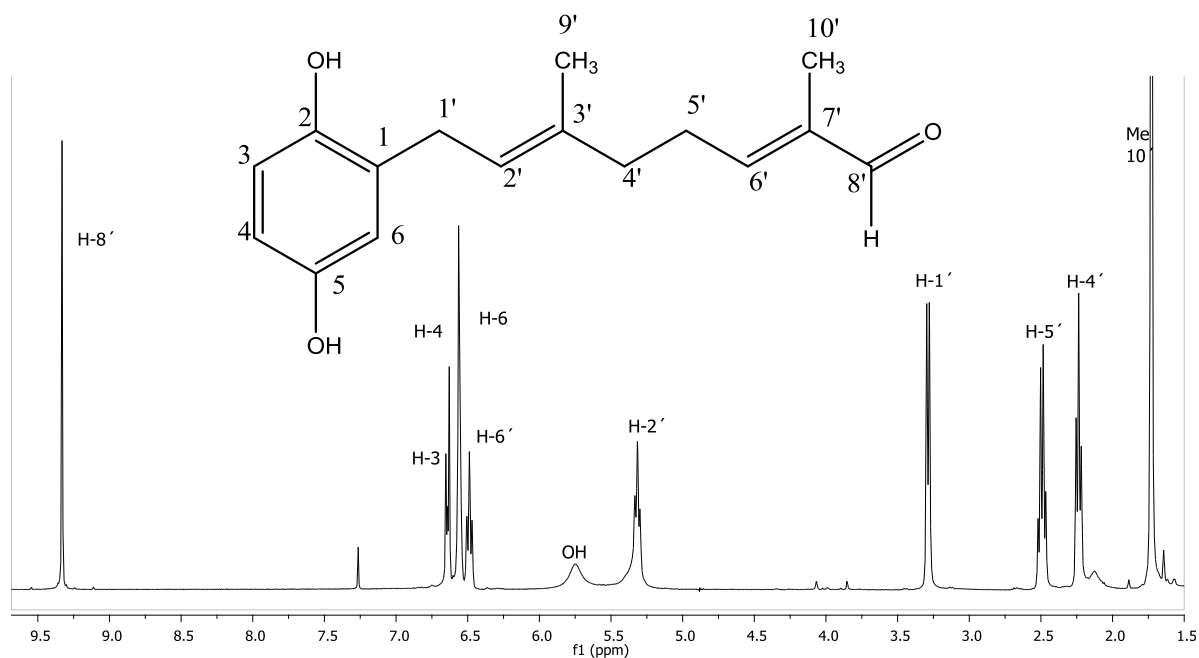


Figura 11. Espectro de RMN ^1H del aliadorin.

Del compuesto con consistencia tipo mielosa, color café y con formación de cristales, se obtuvo su espectro de RMN ^1H . Se le asignaron las señales simples observadas a 1.74 y 1.75 ppm respectivamente para los protones de los metilos H-9' y H-10', así como a 9.33 ppm se asignó la señal simple para el protón del aldehído como H-8', también se aprecia la señal asignada al sistema aromático como lo es la señal doble a 6.65 ppm con $J = 8.4 \text{ Hz}$ que integran para un hidrógeno asignado a H-3; otra señal asignada al sistema aromático es la señal doble de dobles a 6.57 ppm con $J = 8.4, 3.0 \text{ Hz}$ que integran para el H-4, se observó la señal del H-6 siendo una señal doble a 6.54 con $J = 3.0 \text{ Hz}$, se observa una señal simple para hidroxilos a 5.75 ppm, para la cadena alifática se asignaron dos señales triples a 6.49 ppm con $J = 7.3, 1.3 \text{ Hz}$ y a 5.32 ppm con $J = 8.5, 1.2 \text{ Hz}$ para los hidrógenos H-6' y H-2', la señal doble que se observa a 3.30 ppm con una $J = 7.2 \text{ Hz}$ asignada para el H-1' que integra para dos hidrógenos y la señal asignada a los protones H-4' y H-5' siendo el primero una señal triple a 2.26 ppm con $J = 7.3 \text{ Hz}$ y el segundo una señal cuádruple a 2.51 ppm con $J = 7.3 \text{ Hz}$ integrando estas dos señales para dos hidrógenos cada una (**Figura 11**).

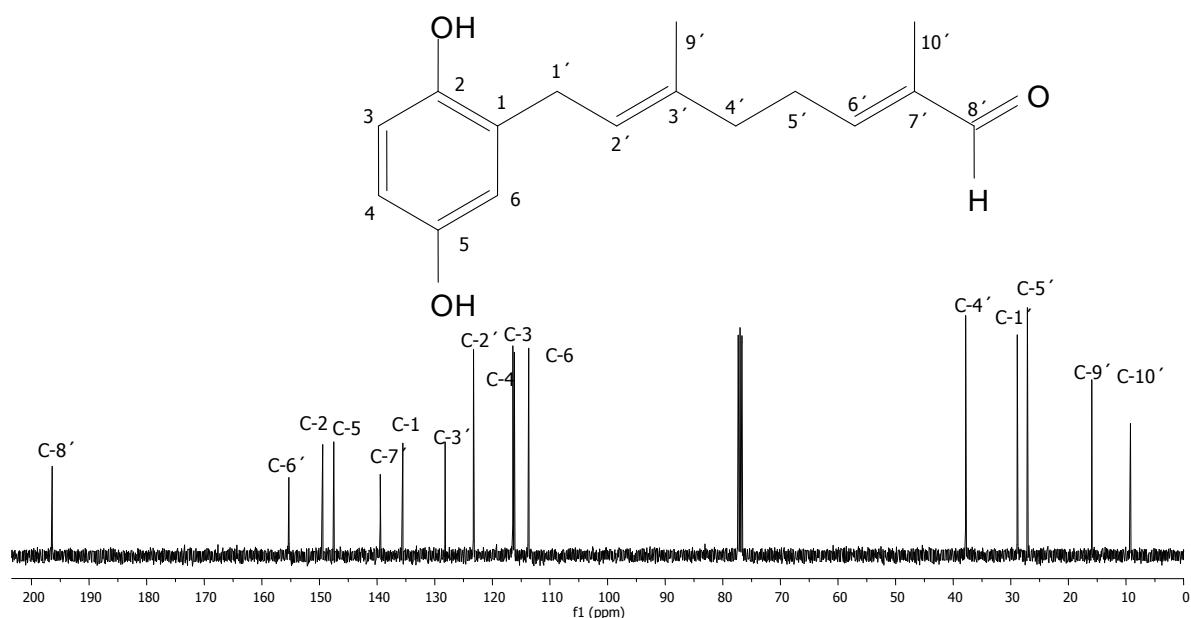


Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C del aliodorin.

El espectro de RMN de ^{13}C , en el cual se observaron 16 señales, de las cuales, en 196.4 ppm se localiza la señal asignada al carbono del carbonilo como C-8', además a 155.3, 123.2 ppm, se encuentran los carbonos para la cadena alifática como C-6' y C-2', 149.4, 147.5 ppm, se encuentran los carbonos de los carboxilos como C-2, C-5, se localiza a 139.4, 128.1 ppm los carbonos de la cadena alifática C-7', C-3', se encuentra a 135.5 ppm el carbono C-1, a 116.4, 116.1, 113.6 ppm se encuentran los carbonos del anillo aromático como C-4, C-3, C-6, también se localiza a 37.8, 28.8, 27.1 ppm los carbonos que dan origen a (-CH₂-) de la cadena alifática como C-4', C-1', C-5', a 15.9, 9.2 ppm, se localizan los carbonos de los metilos como C-9', C-10' (**Figura 12**).

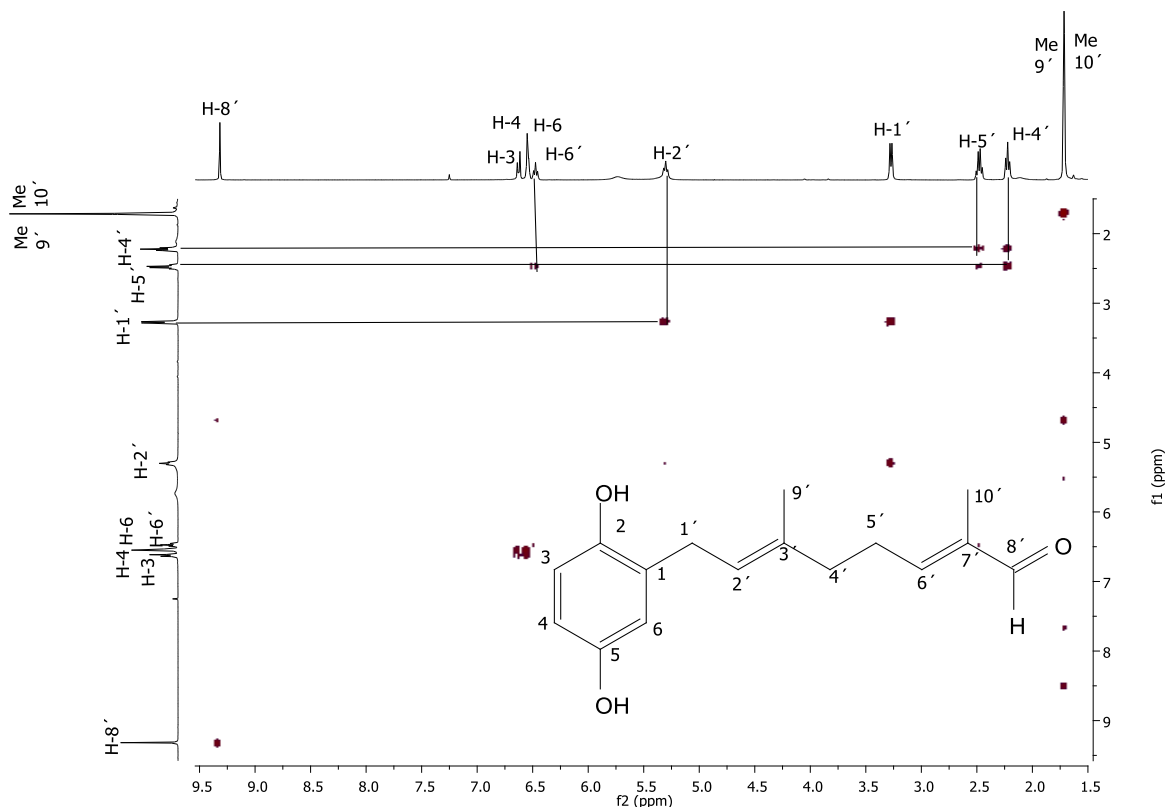


Figura 13. Espectro de RMN COSY del aliodorin.

El espectro de dos dimensiones COSY que se obtuvo del compuesto aliodorin nos sirvió para apreciar la correlación existente entre protones vecinos como lo es el caso de la señal doble a 3.30 ppm del H-1' correlacionando con la señal triple a 5.32 ppm asignada al H-2', también se puede observar la correlación entre los protones asignados a H-4' y H-5' siendo el primero una señal triple a 2.26 ppm y la segunda señal siendo una cuádruple a 2.51 ppm, además de la correlación entre los protones H-5' y H-6' siendo este último una señal triple de cuádruples a 6.49 ppm (**Figura 13**).

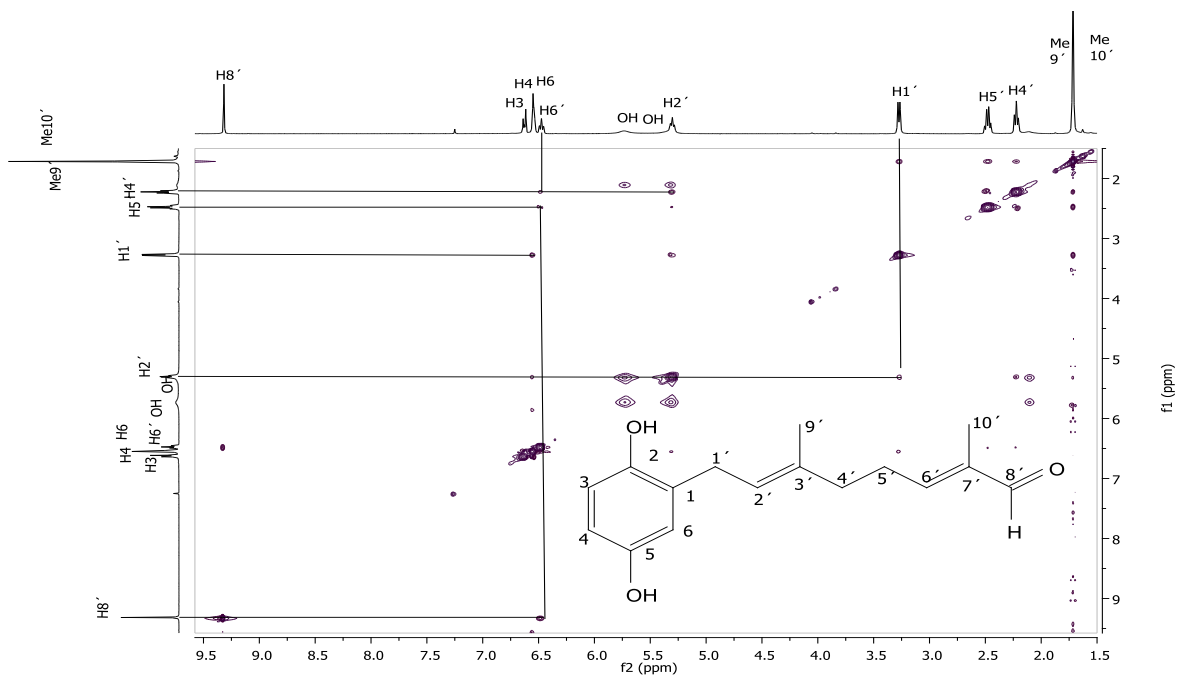


Figura 14. Espectro de RMN NOESY del aliodorin.

Uno más de los experimentos obtenidos para este análisis fue el espectro de dos dimensiones denominado NOESY en el cual se pudo observar la interacción de protones vecinos lejanos y sus correlaciones en el espacio debido a su cercanía con ellos. Se puede observar la correlación entre los protones asignados como H-2' con los H-4' y H-5' de la cadena alifática y estos dos últimos a su vez correlacionan con el protón asignado como H-6' de la cadena alifática, de igual manera el protón H-8' correlaciona con el protón H-6' de la cadena alifática, también se observa la correlación de los hidrógenos asignados como H-1' con el protón del anillo aromático asignado como H-6 (Figura 14).

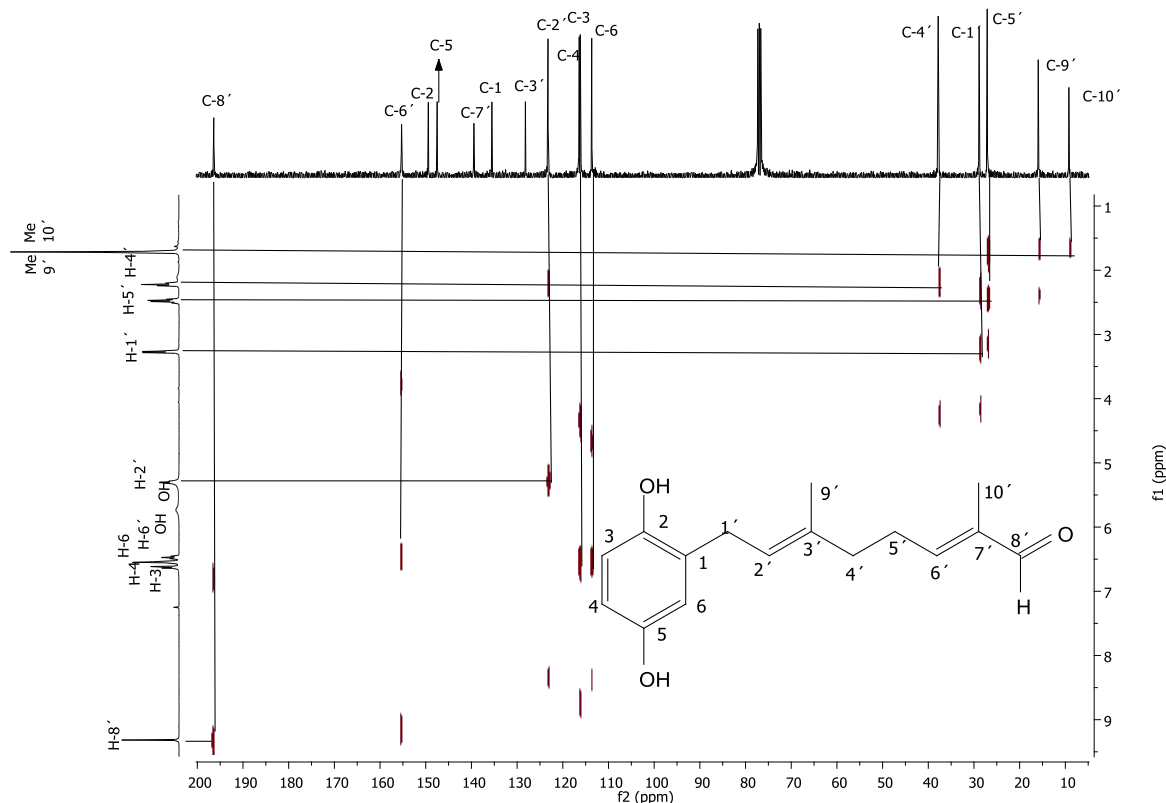


Figura 15. Espectro de RMN HETCOR del aliodorin.

Con el experimento de dos dimensiones denominado HETCOR fue posible asignar las señales de los carbonos a partir de su correlación con el espectro de protón, como es el caso de la señal simple a 9.36 ppm del H-8' que correlaciona con la señal a 196.4 ppm asignada al carbono de carbonilo C-8', de igual manera la señal triple a 6.49 ppm para el protón H-6' que corelaciona con el carbono asignado como C-6' a 155.2 ppm, como también las señales de los protones H-3, H-4 y H-6 del sistema aromático que correlacionan con los carbonos asignado como C-3, C-4 y C-6 a 116.07, 116.1 y 113.8 ppm, se pudo observar la correlación de la señal doble del protón H-1' a 3.30 ppm con el carbono asignado C-1' A 28.7 ppm, y de igual manera se observa la correlación del protón H-5' a 2.51 ppm con el C-5' a 26.9 ppm y el protón asignado como H-4' a 2.26 ppm con el carbono C-4' a 37.7 ppm, otra correlación que se pudo observar fue la de las señales simples para los metilos 9' a 1.75 ppm y 10' a 1.74 ppm con los carbonos asignados como C-9' y C-10' a 15.8 y 9.1 ppm (**Figura 15**).

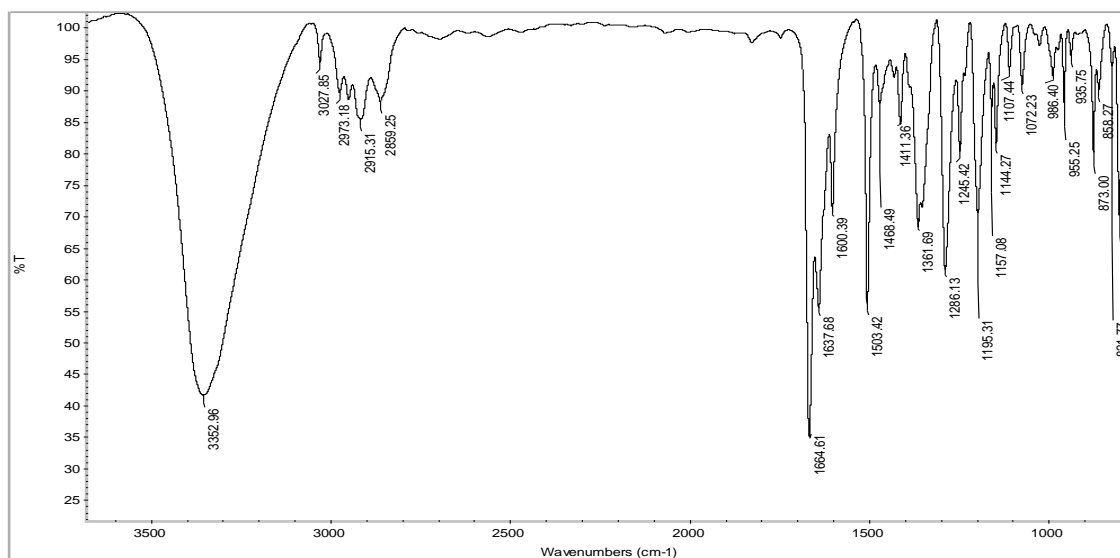


Figura 16. Espectro infrarrojo del aliodorin.

El infrarrojo fue otra técnica utilizada en el análisis del aliodorin, fue de gran utilidad ya que nos proporcionó información de los grupos presentes en este compuesto, se puede observar una banda ancha e intensa a 3362 cm^{-1} característica para grupos hidroxilos, además de 2859 a 2973 cm^{-1} se observan bandas de poca intensidad características para metilos, también se puede observar a 1664 cm^{-1} una banda intensa característica de carbonilo para aldehído, y de 1637 , 1286 cm^{-1} bandas de intensidad media para metilos y metilenos (**Figura 16**).

6.4. Derivado oxima del aliodorin

Con la finalidad de confirmar químicamente la presencia del grupo aldehído del aliodorin, se preparó el derivado oxima, sometiendo a reacción al aliodorin con clorhidrato de hidroxilamina y piridina como base (**Figura 17**) la reacción de dejó a temperatura ambiente por 24 horas. Al término de reacción, se realizaron lavados con acetato de etilo, HCl (10%), NaHCO₃ (saturado), y NaCl (saturado), para posteriormente evaporar el solvente y obtener el crudo de reacción. El crudo de las reacciones fue purificado mediante cromatografía en columna cromatográfica con una polaridad 9:1 Hex:AcOEt, se obtuvo una miel rojiza oscura. Para comprobar que la reacción llevo a proceder y se formó el derivado esperado, la miel obtenida se sometió a RMN de ¹H, ¹³C, y experimentos de dos dimensiones como son los diagramas de correlación heteronuclear ¹³C/¹H (HETCOR), y correlación homonuclear ¹H/¹H (COSY), y correlación homonuclear Overhauser (NOESY).

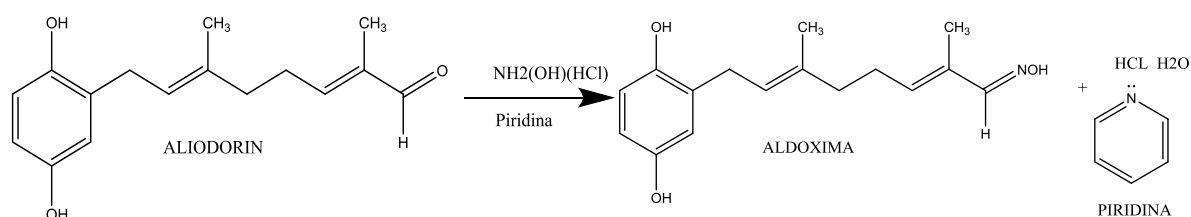


Figura 17. Condiciones de reacción para obtener la oxima del aliodorin

6.5. Análisis del derivado oxima mediante RMN

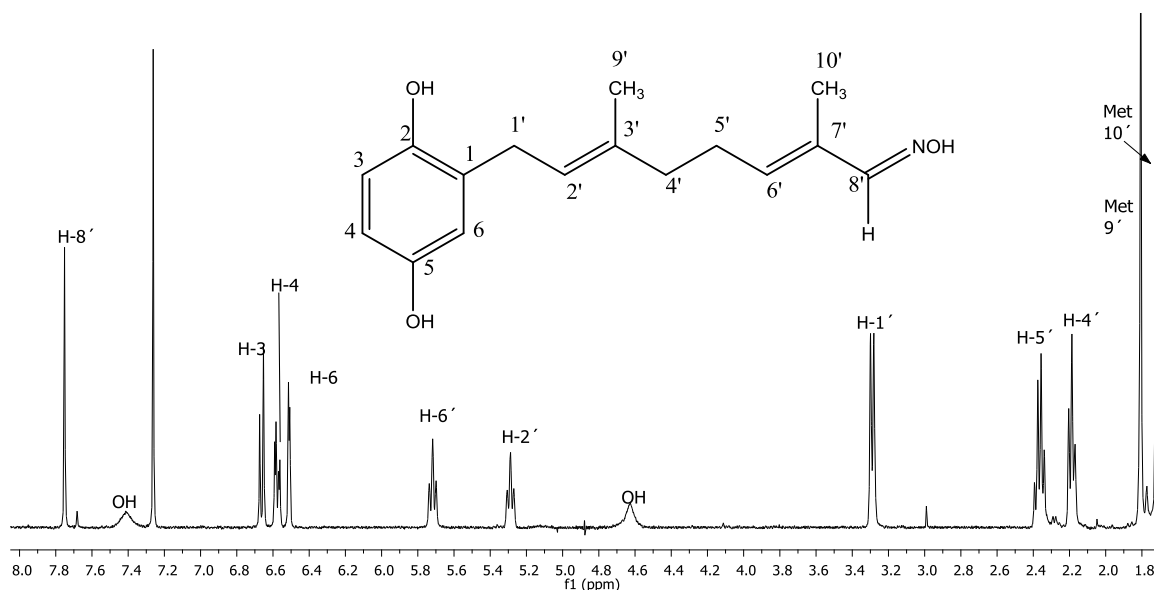


Figura 18. Espectro de RMN ¹H del oxima.

Se le asignaron las señales simples observadas a 1.72 y 1.80 ppm respectivamente para los protones de los metilenos H-9' y H-10', así como a 7.75 ppm se asignó la señal simple para el protón de la oxima como H-8', también se aprecia la señal asignada al sistema aromático como lo es la señal doble a 6.67 con una $J = 8.4 \text{ Hz}$ que integran para un hidrógeno asignada a H-3, otra señal asignada al sistema aromático es la señal doble de dobles a 6.57 ppm con una $J = 8.4, 3.0 \text{ Hz}$ que integran para el H-4, se observó la señal del H-6 siendo una señal doble a 6.51 con una $J = 3.0 \text{ Hz}$, se observa una señal simple para H de hidroxilo a 4.63 ppm, para la cadena alifática se asignaron las dos señales triples a 5.71 ppm con una $J = 7.3, 1.3 \text{ Hz}$ y a 5.28 ppm con una $J = 8.5, 1.2 \text{ Hz}$ para los hidrógenos H-6' y H-2', la señal doble que se observa a 3.29 ppm con una $J = 7.2 \text{ Hz}$ asignada para el H-1' que integra para dos hidrógenos y la señal asignada a los protones H-4' y H-5' siendo el primero una señal triple a 2.18 ppm con una $J = 7.3 \text{ Hz}$ y el segundo una señal cuádruple a 2.35 ppm con una $J = 7.3 \text{ Hz}$ integrando estas dos señales para dos hidrógenos cada una (**Figura 18**).

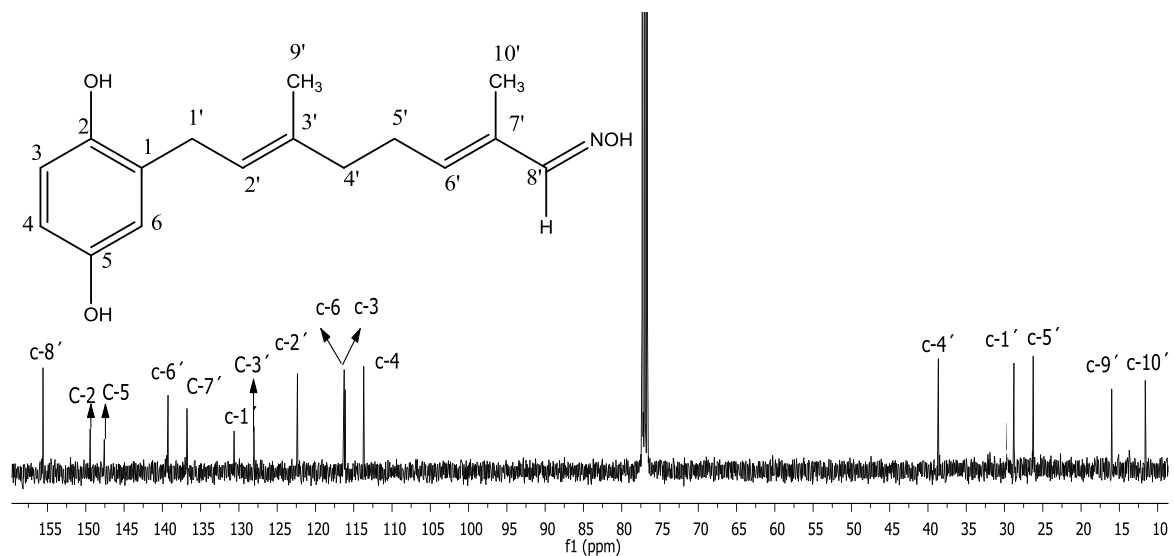


Figura 19. Espectro de RMN ^{13}C de la oxima.

El espectro de RMN de ^{13}C , se observaron 16 señales, de las cuales, en 130.5 ppm se localiza la señal asignada al carbono de la oxima como C-8', además a 155.5, 122.4 ppm, se encuentran los carbonos para la cadena alifática como C-6' Y C-2', a 149.3, 147.5 ppm, se encuentran los carbonos de los carboxilos como C-2, C-5, se localiza a 139.4, 128.1 ppm los carbonos de la cadena alifática C-7', C-3', se encuentra a 136.6 ppm el carbono C-1, a 116.2, 116.1, 113.7 ppm se encuentran los carbonos del anillo aromático como C-3, C-6, C-4, también se localiza a 38.6, 28.7, 26.2 ppm los carbonos que dan origen a (-CH₂-) de la cadena alifática como C-4', C-1', C-5', a 15.9, 11.6 ppm se localizan los carbonos de los metilos como C-9', C-10' (**Figura 19**).

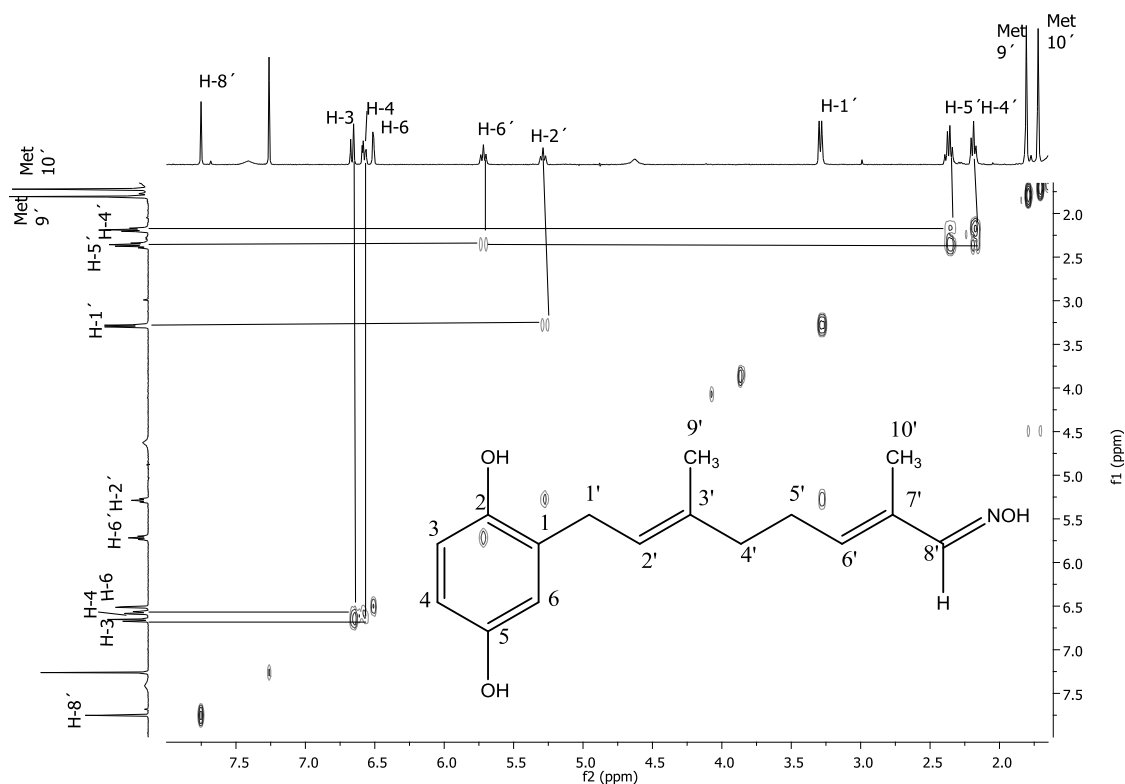


Figura 20. Espectro COSY de RMN de la oxima.

El espectro de dos dimensiones COSY que se obtuvo del compuesto aldoxima nos sirvió para apreciar la correlación existente entre protones vecinos como lo es el caso de la señal doble a 3.29 ppm del H-1' correlacionando con la señal triple a 5.28 ppm asignada al H-2', también se puede observar la correlación entre los protones asignados a H-4' y H-5' siendo el primero una señal triple a 2.18 ppm y la segunda señal siendo una cuádruple a 2.35 ppm, además de la correlación entre los protones H-5' y H-6' siendo este último una señal triple a 5.71 ppm, se observa la correlación entre los protones H-3, H-4, siendo la primera una señal doble a 6.50 ppm y la segunda una señal doble de dobles a 6.58 ppm, se observa la correlación entre los protones de los metilos 9' y 10' a 1.80 y 1.72 ppm respectivamente (**Figura 20**).

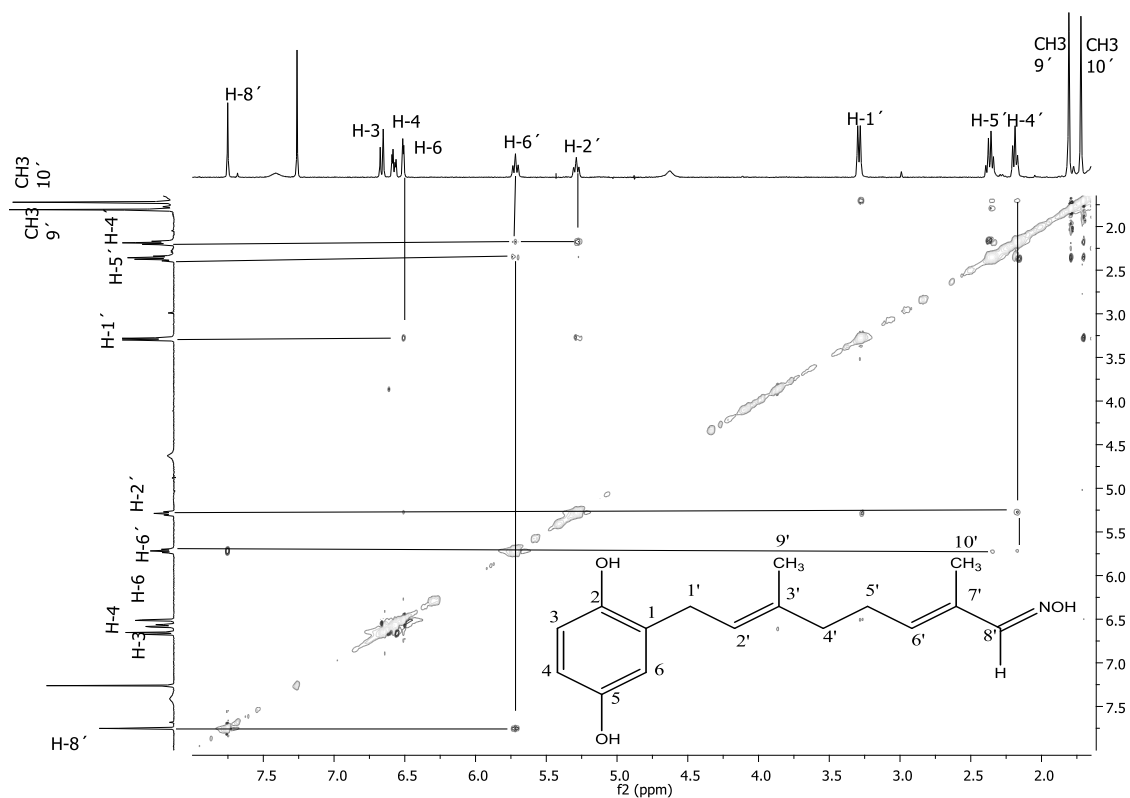


Figura 21. Espectro RMN NOESY de la oxima.

Uno más de los experimentos obtenidos para este análisis fue el espectro de dos dimensiones denominado NOESY en el cual se pudo observar la interacción de protones vecinos lejanos y sus correlaciones en el espacio debido a su cercanía con ellos. Se puede observar la correlación entre los protones asignados como H-2' con los H-4' y H-5' de la cadena alifática, y estos dos últimos a su vez correlacionan con el protón asignado como H-6'; y de igual manera el protón H-8' correlaciona con el protón H-6', se observa la correlación de los hidrógenos asignados como H-1' con el protón del anillo aromático asignado como H-6 (**Figura 21**).

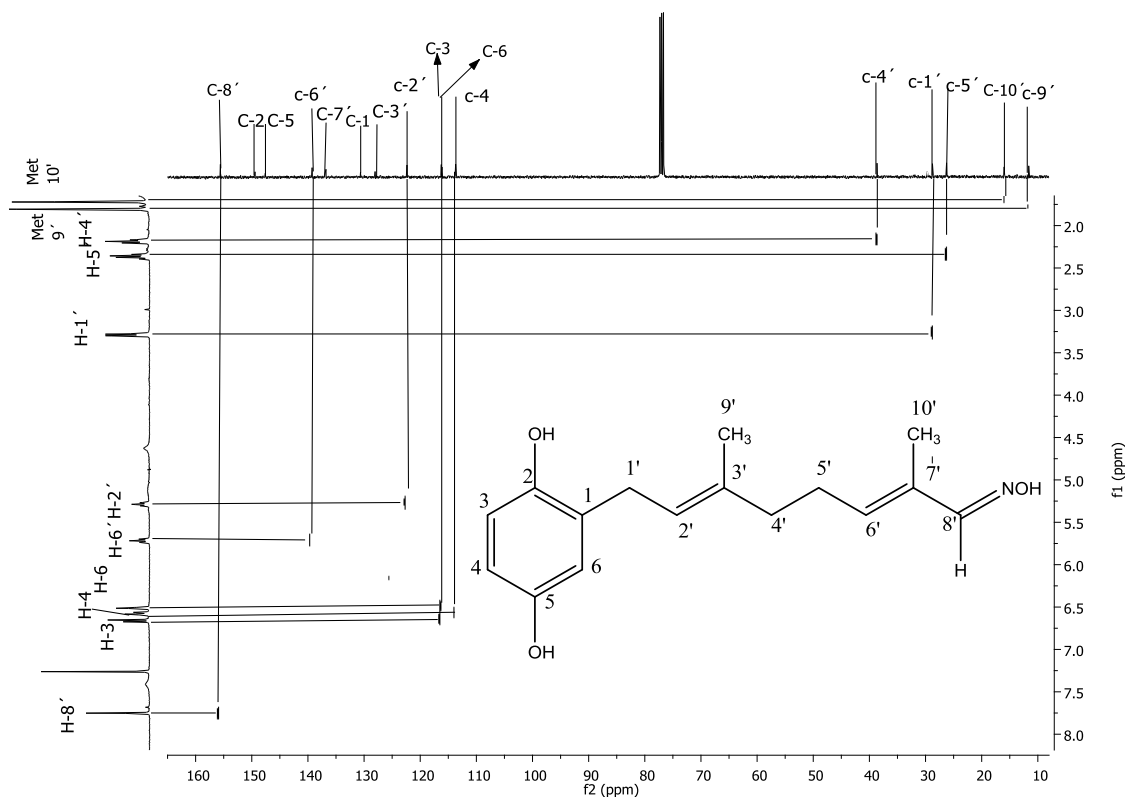


Figura 22. Espectro RMN HETCOR de la oxima.

Con el experimento de dos dimensiones denominado HETCOR fue posible asignar las señales de los carbonos a partir de su correlación con el espectro de protón, como es el caso de la señal simple a 7.75 ppm del H-8' que correlaciona con la señal a 155.5 ppm asignada al carbono de la oxima C-8', de igual manera la señal triple a 5.71 ppm para el protón H-6' que corelaciona con el carbono asignado como C-6' a 139.4 ppm, se correlaciona la señal triple a 5.28 ppm del H-2' con la señal a 122.4 ppm del C-2', como también las señales de los protones H-3, H-4 y H-6 del sistema aromático que correlacionan con los carbonos asignado como C-3, C-4 y C-6 a 116.1, 116.1 y 113.7 ppm, se pudo observar la correlación de la señal doble del protón H-1' a 3.3 ppm con el carbono asignado C-1' A 28.7 ppm, y de igual manera se observa la correlación del protón H-5' a 2.35 ppm con el C-5' a 26.2 ppm y el protón asignado como H-4' a 2.2 ppm con el carbono C-4' a 38.6 ppm, otra correlación que se pudo observar fue la de las señales simples para los metilos 9' a 1.80 ppm y 10' a 1.72 ppm con los carbonos asignados como C-9' y C-10' a 15.9 y 11.8 ppm (**Figura 22**).

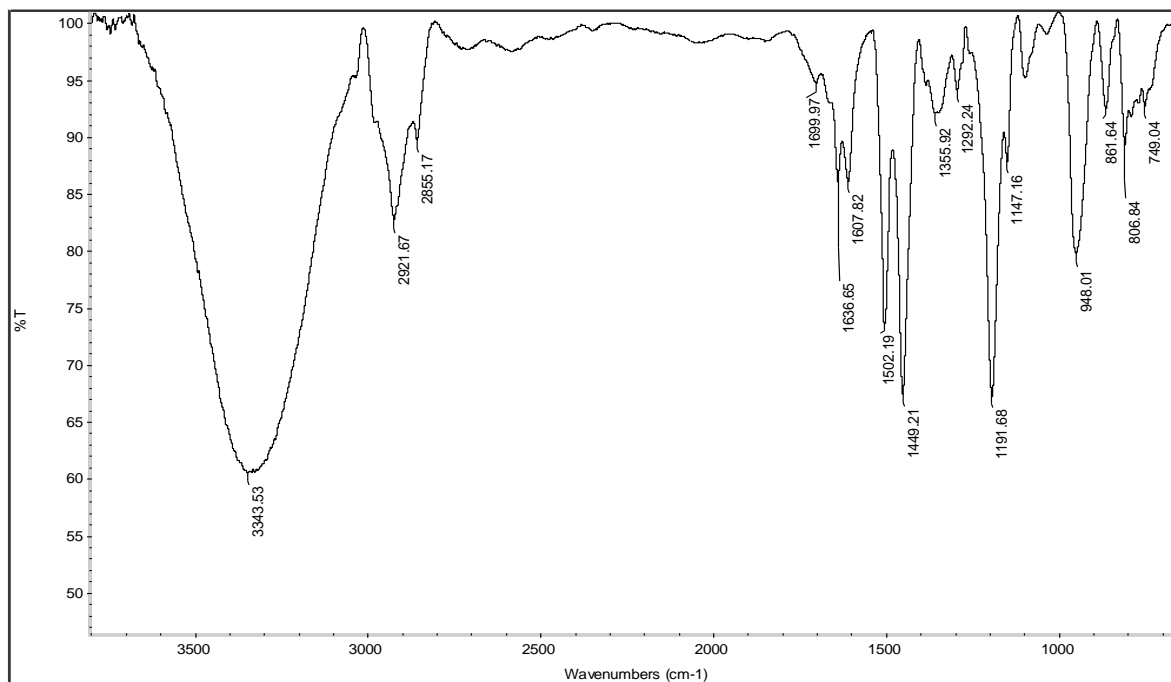


Figura 23. Espectro infrarrojo del derivado oxima.

El infrarrojo fue otra técnica utilizada en el análisis de la oxima del aliadorin, fue de gran utilidad ya que nos proporciona información de los grupos presentes. Se puede observar una banda ancha e intensa a 3343 cm^{-1} característica para grupos hidroxilos, además de 2921 a 2855 cm^{-1} se observan bandas de poca intensidad características de los metilos, también se puede observar a 1636 cm^{-1} una banda de poca intensidad característica de enlace carbono nitrógeno ($\text{C}=\text{N}$), y de 1502 a 1449 cm^{-1} bandas de intensidad media para metilenos, a 1191 cm^{-1} se observa pico de mediana intensidad, para $-\text{OH}$ deformación. Se puede observar claramente la ausencia de la señal para el $\text{C}=\text{O}$ del aldehído, a diferencia del IR del aliadorin (**Figura 23**).

6.6. Pruebas de inhibición del aliodorin y su derivado oxima

Ya confirmados los compuestos aliodorin y su oxima con espectroscopia de RMN, fueron utilizados para realizar los ensayos de inhibición del hongo *Trametes versicolor* por el método de difusión en placa. Como se observa en la **gráfica 6.6.1** las pruebas de inhibición se realizaron a las concentraciones de 75mg/L, 100mg/L y 150mg/L, comparando los dos compuestos, obteniéndose una diferencia entre la actividad biológica de ambos compuestos, ya que hay una disminución en el grado de inhibición entre estos ya que el aliodorin inhibe en un 100% el hongo *Trametes versicolor* a una concentración de 100mg/L mientras que la oxima inhibe solo el 42%, a una concentración de 150mg/L los dos compuestos inhiben en un 100% al hongo *Trametes versicolor*.

Gráfica 6.6.1. Resultados de inhibición sobre el hongo *Trametes versicolor*.

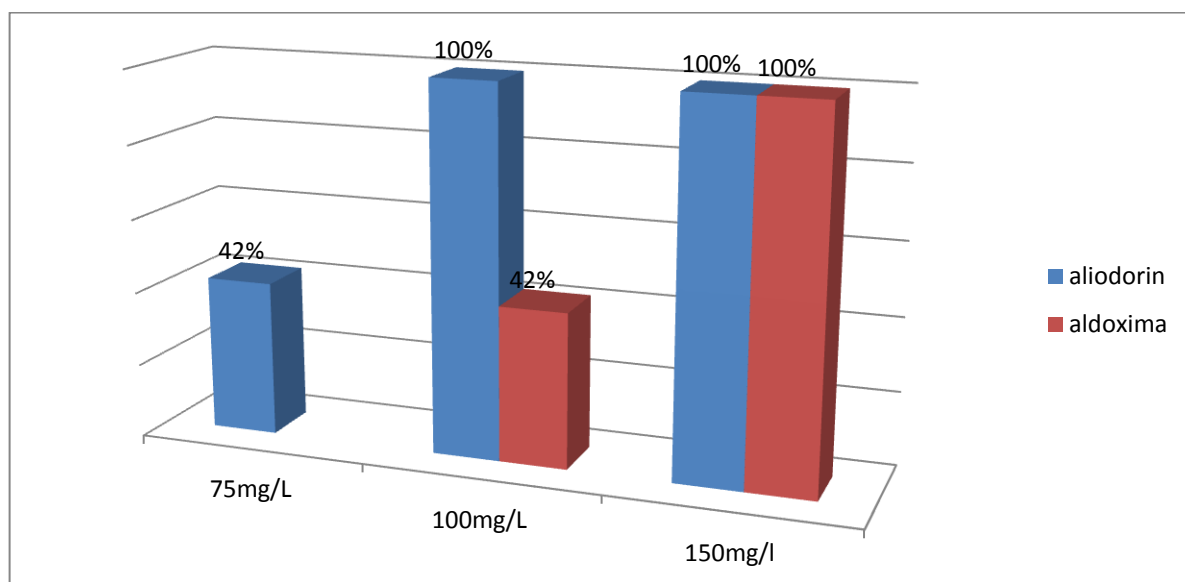


Figura 25. control de las pruebas de inhibición.



Figura 24. Prueba realizada mostrando grado de inhibición.

6.7. Análisis conformacional mediante métodos computacionales

Se realizó un análisis conformacional mediante métodos computacionales lo cual nos ayudo a predecir todo tipo de propiedades moleculares de los compuestos en cuestión como lo es el aliodorin y su oxima, utilizando la fisicoquímica, la física molecular y la física cuántica.

A continuación se presentan los datos obtenidos de cada conformero, aplicando los métodos de cálculo DFT, empleando el funcional híbrido B3LYP con el conjunto de funciones base STO-3G el cual es el conjunto de base mínima ya que contiene el mínimo número de funciones de base requeridas para cada átomo estos usan orbitales de tipo atómico de tamaño fijo, 3-21G Y 6-31G los cuales son un conjunto de base de valencia dividida, estos tienen dos o más tamaños de funciones de base por cada orbital de valencia.

Para que este análisis sea más claro, se separarán los dos compuestos (aliodorin y oxima).

6.7.1. Análisis conformacional del aliodorin

Se realizó un cálculo de distribución de conformeros del aliodorin en Spartan con mecánica molecular MMFF, obteniéndose 100 conformeros distintos, de los cuales se eligieron 21 en orden creciente eligiendo uno por cada cinco, se realizó el cálculo empleando el método DFT, con el funcional híbrido B3LYP con el conjunto de funciones base STO-3G, 3-21G y 6-31G.

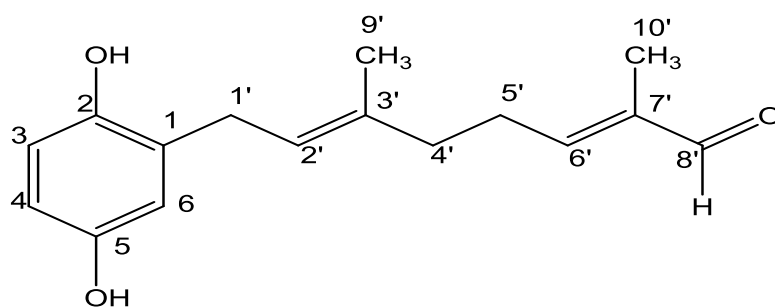


Figura 26. Aliodorin (8-(2,5-Dihidroxifenil)-2,6-dimetilocta-2,6-dienal).

Se elaboró una tabla en la cual muestra los resultados obtenidos para cada conjunto de función de base, se empleó el conformero de mínima energía como valor cero, como base para obtener la energía del resto de los conformeros, en unidades de kcal/mol para un mejor entendimiento.

Tabla 6.7.1.1. Valores del conjunto de funciones de base aplicados a los confórmeros del aliadorin, así como energías para cada confórmero en kcal/mol.

Confórmero	B3LYP Base STO-3G	Energía kcal/mol	B3LYP Base 3-21G	Energía kcal/mol	B3LYP Base 6-31G	Energía kcal/mol
incon1	-836.66521	11.7985685				
incon2	-836.67754	4.0581071	-842.73763	0	-847.41371	0
incon3	-836.67256	7.1850522	-842.73041	4.5318772	-847.40952	2.629266
incon4	-836.67471	5.8337722	-842.73567	1.2255270	-847.41133	1.490996
incon5	-836.67026	8.6291410				
incon6	-836.67026	8.6291410	-842.72406	8.5134281	-847.41005	2.293549
incon7	-836.68401					
incon8	-836.66931	9.2235184	-842.72237	9.61721826	-847.40819	3.460090
incon9	-836.67059	8.4236942	-842.72429	8.3709834	-847.41035	2.107806
incon10	-836.66744	10.3959582				
incon11	-836.66773	10.2144823				
incon12	-836.66773	10.2144823				
incon13	-836.67165	7.7597259	-842.72369	8.7430968	-847.40821	3.446912
incon14	-836.67326	6.7474895	-842.73002	4.7753511	-847.40772	3.755647
incon15	-836.68401	0	-842.73628	0.8440009	-847.41261	0.89071
incon16	-836.66643	11.0304963				
incon17	-836.66530	11.7435986				
incon18	-836.66823	9.9044923				
incon19	-836.66903	9.3992212	-842.72126	10.2685736	-847.40609	4.780371
incon20	-836.66475	12.0839601				
incon21	-836.66870	9.6074918	-842.72128	10.259161	-847.40578	4.973016

*Los valores en negritas representan los mínimos globales o confórmeros de mayor estabilidad relativa. Debido a que algunos confórmeros tienen diferencias energéticas muy altas no fue necesario realizar más cálculos, debido a esto hay espacios en blanco.

Como se puede observar en la **tabla 6.7.1.1**, en cada conjunto de función de base varían los valores para determinar el confórmero de mayor estabilidad relativa, sin embargo los valores que mejor referencia matemática nos da son los que usan el conjunto de función base 6-31G.

Para el conjunto de función de base STO-3G el confórmero más estable fue incon15 **tabla 6.4.1** pero debido a que es la función de base mínima se dará prioridad al conjunto de base 3.21G Y 6-31G.

Para el conjunto de base 3-21G Y 6-31G, hay una coincidencia, ya que ambos cálculos coinciden que incon2 es el confórmero más estable (**Figura 27**).

Para el conjunto de funciones base 6-31G, siendo la base más grande nos da una referencia más confiable sobre cuál es el mínimo global, debido a esto las figuras siguientes se tomarán de esta función de base.

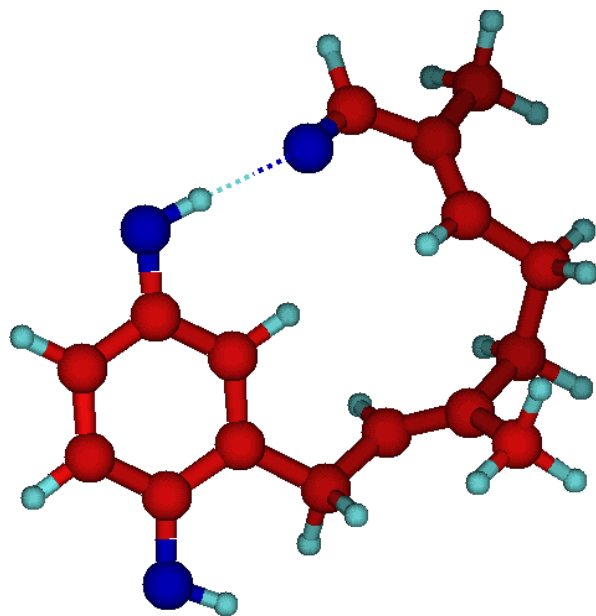
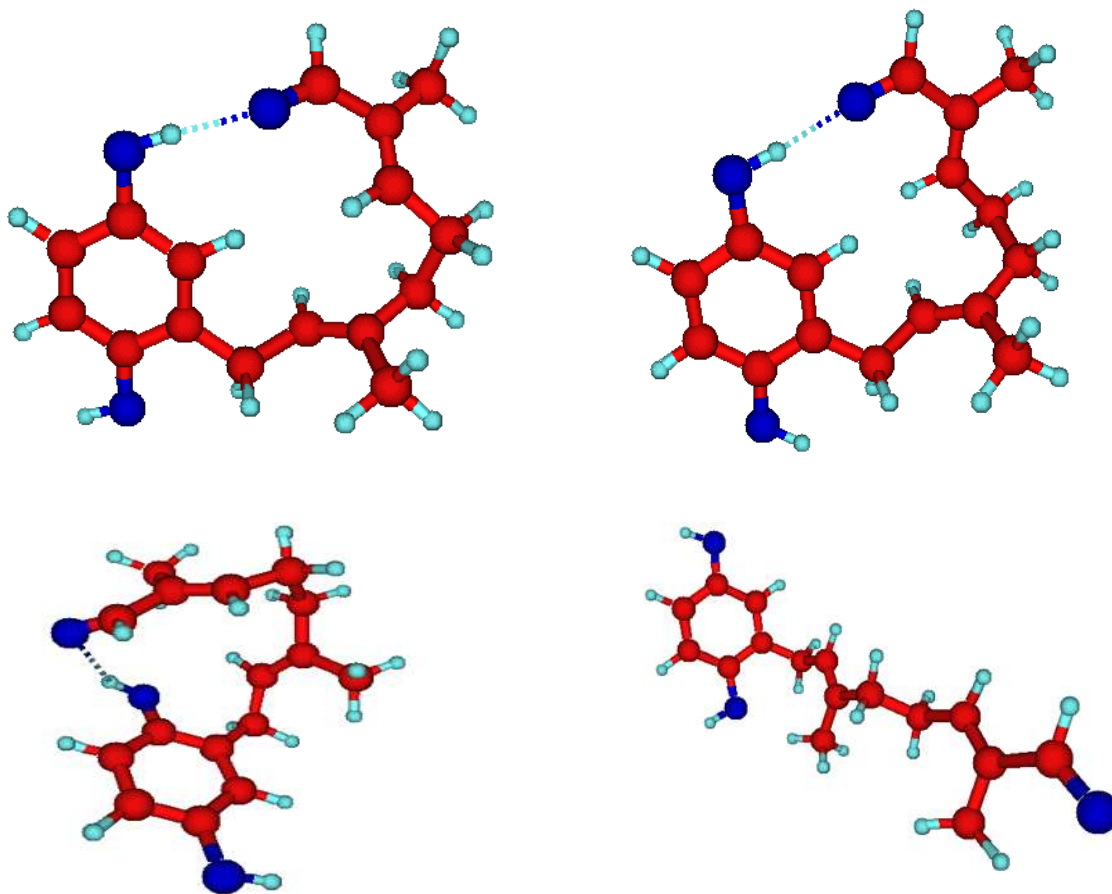


Figura 27. incon2



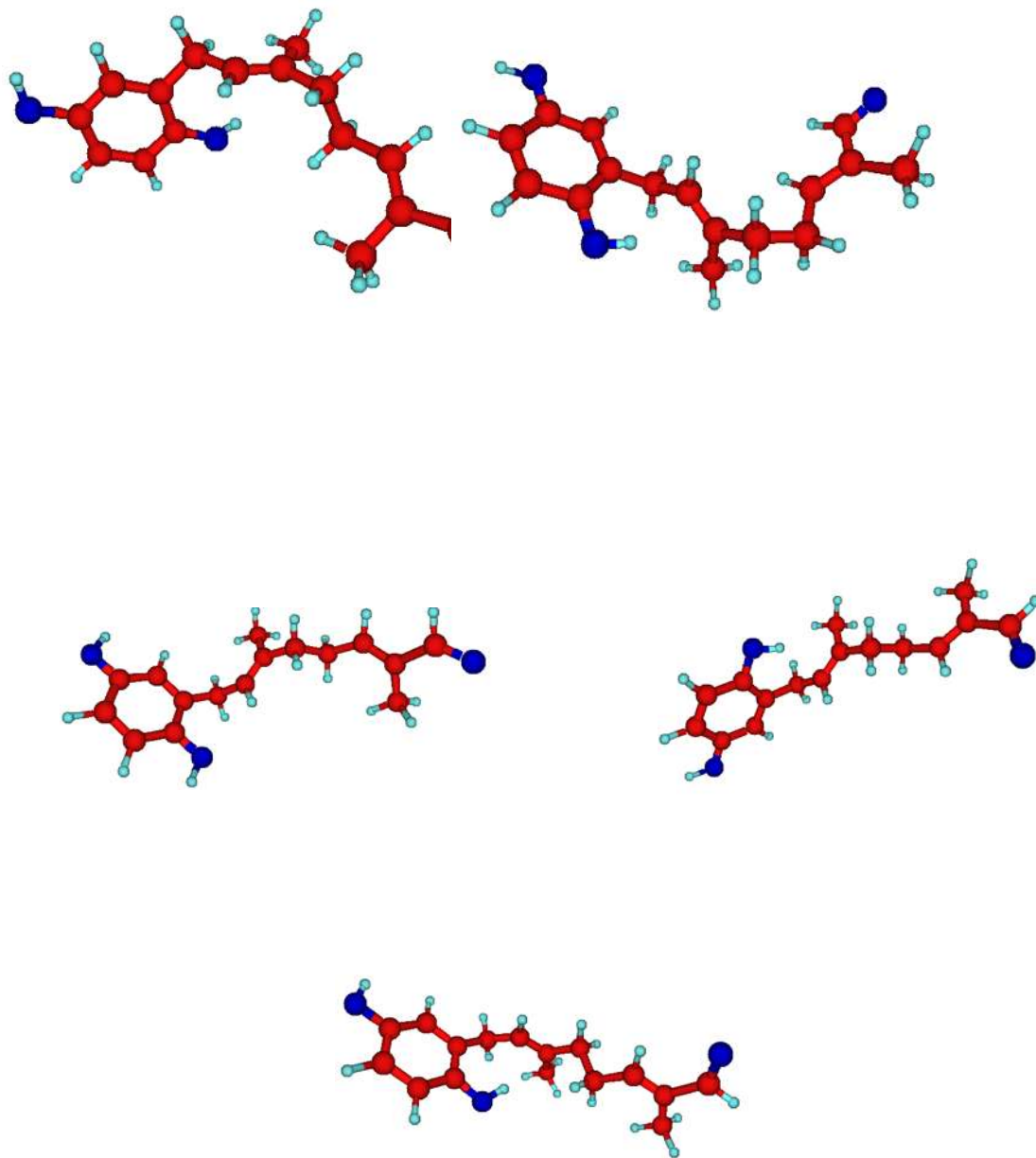


Figura 28. conformeros de incon1 a incon10

Tabla 6.7.1.2. Valores obtenidos del espectro infrarrojo del aliadorin y frecuencias vibracionales obtenidas por métodos computacionales.

Espectro IR del aliadorin cm^{-1}			Frecuencias vibracionales por métodos computacionales cm^{-1}		
cm^{-1}	Grupo	Banda	cm^{-1}	Grupo	Tipo de movimiento
3362	OH	Ancha e intensa	3848 3711	OH _(C2) OH _(C5)	Estiramiento simétrico
3027	C-H Aromáticos	Banda de baja intensidad	3198	C-H (C2,C4,C5)	Estiramiento simétrico
2973	C-H Metilos	Región de picos débiles	3148 3075	C-H _(Met10') C-H _(Met9)	Estiramiento asimétrico
2915	C-H cadena alifática	Región de picos débiles	3042 3028	C-H _(C1') C-H _(C4',C5',C6')	Estiramiento asimétrico
2859	C-H Carbonilo	Región de picos débiles	2931	C-H Carbonilo	Estiramiento simétrico
1664	C=O	Pico intenso (característico de carbonilo)	1785	C=O	Estiramiento asimétrico
1637 1286	C-C y C=C	Bandas de mediana intensidad	1684 1247	C-C, y C=C	Fuera del plano

Como se muestra en la **Tabla 6.7.2** es una comparación entre los dos métodos, los datos obtenidos en el espectro IR del aliadorin, son basándose en datos teóricos y espectros tomados de diferentes bibliografías con características de grupos funcionales y el conjunto de estos. Los métodos computacionales proporcionan datos más específicos, ya que se puede visualizar el movimiento y el modo vibracional, sin embargo recordemos que son datos teóricos obtenidos del confórmero mas estable comparados con los datos ya obtenidos del aliadorin. Se logra apreciar que existe gran similitud entre ambos métodos.

En el espectro IR del aliadorin, se observa una banda ancha e intensa a 3362 cm^{-1} característica de grupo -OH, a 3027 cm^{-1} se observa una banda de baja intensidad para los C-H del anillo aromático, se observa a 2859 cm^{-1} en la región de picos débiles C-H del carbonilo, así como a 1664 cm^{-1} pico intenso característico para carbonilo C=O.

Por el método computacional se observó datos más específicos y en este caso solo se colocaron los más relevantes de la molécula ya que el cálculo nos brinda una gran lista de ellos, entre 3848 y 3711 cm^{-1} se observan los grupos -OH con un estiramiento simétrico, a 3198 cm^{-1} se observan los C-H del anillo aromático con un estiramiento simétrico, se observa de 3148 , 3075 cm^{-1} los C-H de los metilos $10'$ y $9'$ con un estiramiento asimétrico, a 2931 cm^{-1} se observa el enlace C-H del carbonilo con un estiramiento simétrico, a 1785 cm^{-1} se observa la señal del carbonilo C=O con un estiramiento simétrico.

El diagrama de IR teórico se muestra en el apéndice de espectros (**E.13**, **E.14**), debido a ser una captura de pantalla la imagen es de mala calidad, por esta razón se realizó una **Tabla 6.7.1.2** de comparación, de igual manera para la oxima **Tabla 6.7.2.2**.

6.7.2. Análisis conformacional del la oxima

De igual manera que con el aliodorin, para la oxima se realizó un cálculo de distribución de conformeros en Spartan con mecánica molecular MMFF, obteniéndose 100 conformeros distintos, de los cuales se eligieron 21 en orden creciente eligiendo uno por cada cinco, se realizó el cálculo empleando el método DFT, con el funcional híbrido B3LYP con el conjunto de funciones base STO-3G, 3-21G y 6-31G.

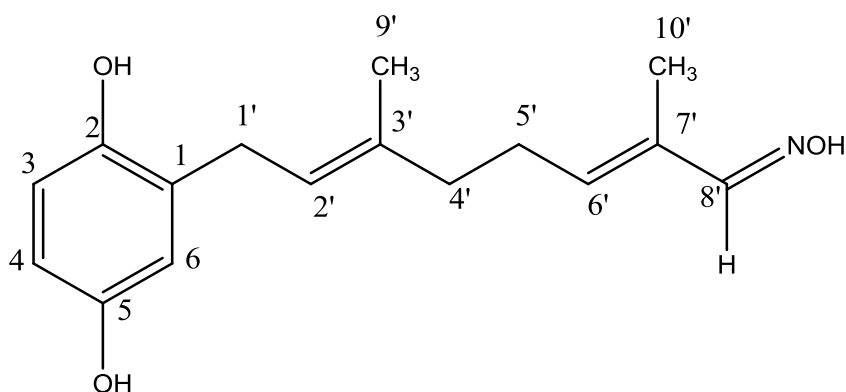


Figura 29. Oxima (8-(2,5-dihidroxifenil)-2,6-dimetilocta-2,6-dioxima).

Se elaboró una tabla en la cual muestra los resultados obtenidos para cada conjunto de función de base, se empleó el conformero de mínima energía como valor cero, como base para obtener la energía de los de mas conformeros, en unidades de Kcal/mol para un mejor entendimiento **Tabla 6.7.2.1**.

Tabla 6.7.2.1. Valores del conjunto de funciones de base aplicados a los confórmeros del oxima, así como las diferencias energéticas en Kcal/mol.

Confórmero	B3LYP Base STO-3G	Energía Kcal/mol	B3LYP Base 3-21G	Energía Kcal-mol	B3LYP Base 6-31G	Energía Kcal-mol
aldoxcon1	-891.28257	1.4934738	-897.73281	0	-902.71991	0
aldoxcon2	-891.27810	4.2984435	-897.72755	3.29756505	-902.71703	1.8053462
aldoxcon3	-891.27710	4.926581	-897.72755	3.29756505	-902.71703	1.8053462
aldoxcon4	-891.28089	2.5476906	-897.72860	2.63993457	-902.71519	2.9587096
aldoxcon5	-891.26987	9.4653608	-897.72105	7.37449755	-902.71510	3.0139305
aldoxcon6	-891.27260	7.750376	-897.72134	7.19628468	-902.71445	3.4262046
aldoxcon7	-891.26937	9.7791158				
aldoxcon8	-891.27040	9.130898	-897.71809	9.2369472	-902.71136	5.365838
aldoxcon9	-891.27888	3.8089857	-897.72510	4.83496455	-902.71249	4.6561242
aldoxcon10	-891.26837	10.407253				
aldoxcon11	-891.26939	9.7984481	-897.71798	9.30409077	-902.71291	4.393825
aldoxcon12	-891.26682	11.381148				
aldoxcon13	-891.26936	9.7853909				
aldoxcon14	-891.26982	9.4954813	-897.71385	11.8969621	-902.71101	5.5804464
aldoxcon15	-891.2659	11.959713				
aldoxcon16	-891.26405	13.116214				
aldoxcon17	-891.26790	10.699045				
aldoxcon18	-891.28495	0	-897.67898	33.776353		
aldoxcon19	-891.26854	10.301204				
aldoxcon20	-891.26932	9.8092363				
aldoxcon21	-891.26524	12.369477				

*Los valores en negritas representan los mínimos globales, confórmeros con mayor estabilidad relativa. Debido a que algunos confórmeros tienen energías muy altas no fue necesario realizar más cálculos, debido a esto hay espacios en blanco.

En este caso el procedimiento para elegir el confórmero de mínima energía es el mismo que para el aliadorin.

Para el conjunto de funciones de base STO-3G el confórmero más estable fue aldoxcon18 el cual se muestra en la **Tabla 6.7.2.1**, pero debido a que es la función de base mínima se dará prioridad a la función de base 6-31G.

Para el conjunto de funciones de base 3-21G Y 6-31G, hay una coincidencia, los cálculos coinciden que aldoxcon1 es el confórmero más estable, ya que en ambas bases es el mínimo global, (**Figura 30**).

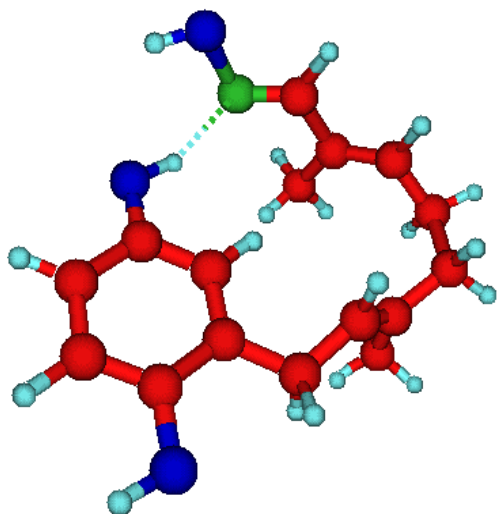
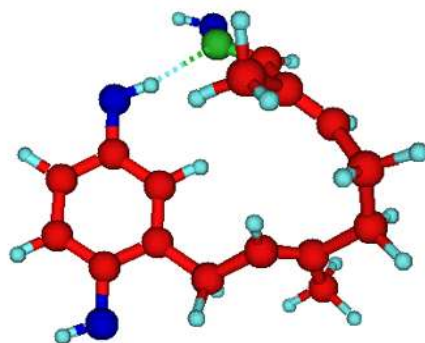
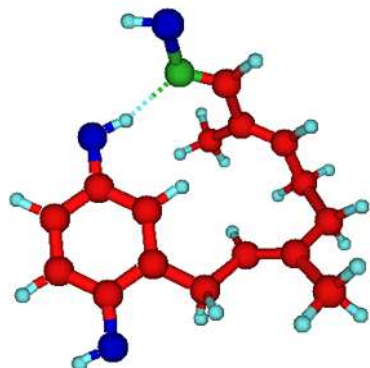
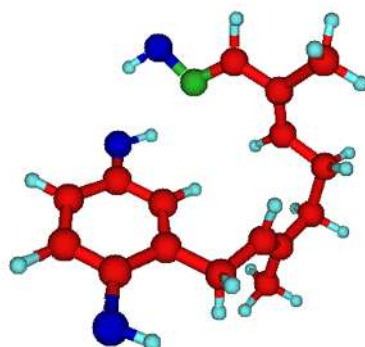
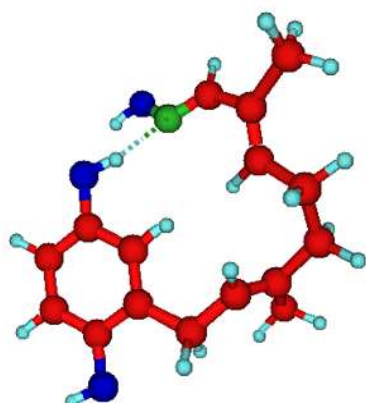


Figura 30. aldoxcon1 6-31G



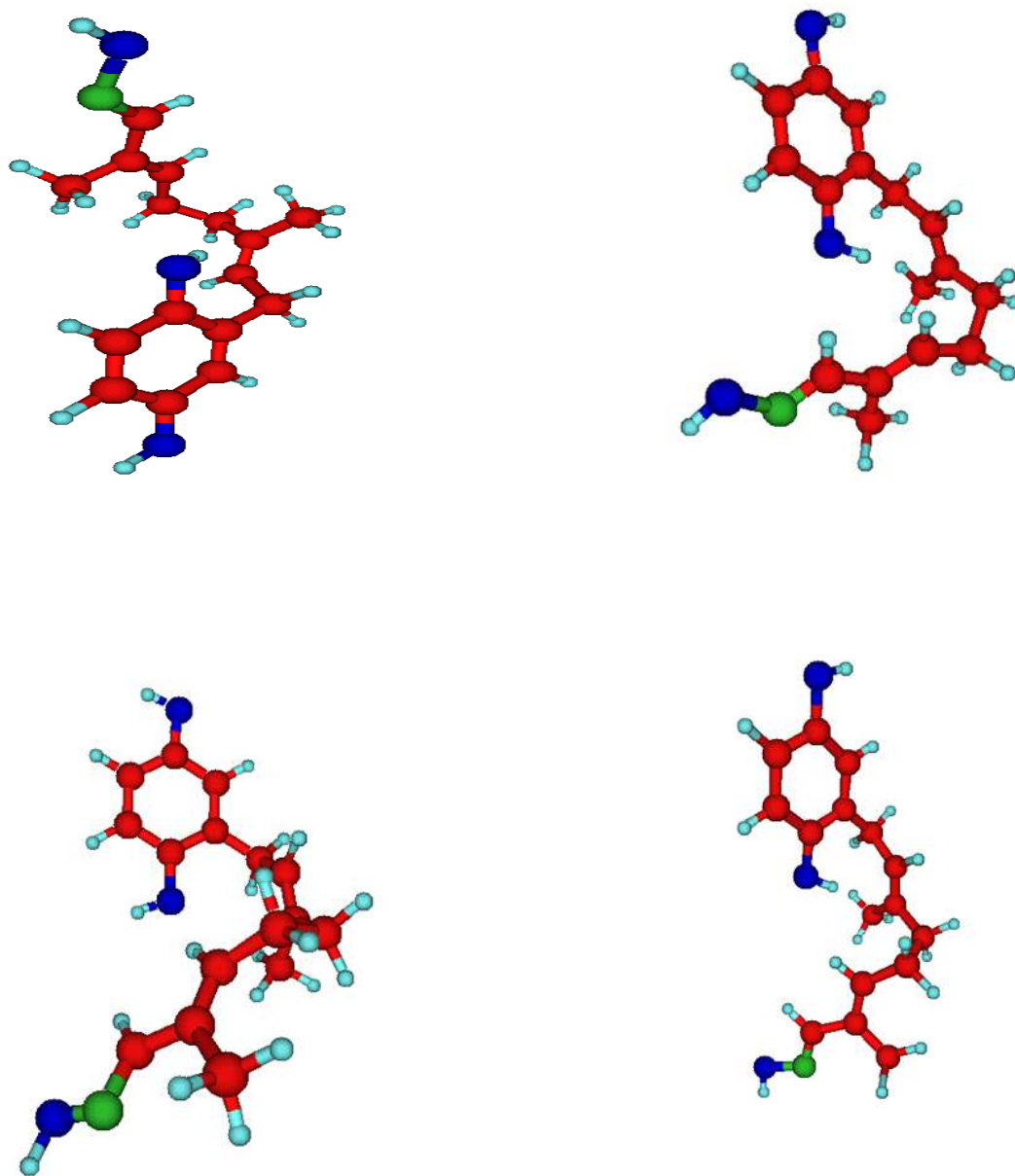


Figura 31. conformeros de aldoxcon2 a aldoxcon9

Tabla. 6.7.2.2. Valores obtenidos del espectro infrarrojo del derivado oxima del aliadorin y frecuencias vibracionales obtenidas por métodos computacionales.

Espectro IR de la oxima del aliadorin cm ⁻¹			Frecuencias vibracionales por métodos computacionales cm ⁻¹		
cm ⁻¹	Grupo	Banda	cm ⁻¹	Grupo	Tipo de movimiento
3343	O-H	Ancha e intensa	3533 3770 3829	O-H _(C5) N-OH O-H _(C2)	Estiramiento simétrico
3000	C-H Aromáticos	De poca intensidad	3209 3158	C-H _(C6) C-H _(C3,C4)	Estiramiento asimétrico
2921	Metilos CH ₃	De mediana intensidad	3152 3145	C-H _(Met10') C-H _(Met9')	Estiramiento asimétrico
2855	Metilenos C-H	De mediana intensidad	3135	C-H (2',6',8')	Estiramiento simétrico
1635	C=N	De poca intensidad	1696	C=N	Estiramiento simétrico
1699 1607	C=C C-C	De poca intensidad	1736 1662	C=C C-C	Fuera del plano

Al igual que el análisis anterior, se agregó un análisis de frecuencias vibracionales con el conformero de mayor estabilidad obtenido de los cálculos antes realizados del derivado oxima del aliadorin, el cual se comparó con el espectro IR obtenido del derivado oxima cuyos datos obtenidos, son con base en datos teóricos y bibliográficos. Se logró apreciar gran similitud entre ambos métodos.

En el espectro de infrarrojo se muestra, a 3343 cm⁻¹ una banda ancha e intensa para grupos -OH, a 3000 cm⁻¹ se muestra banda de poca intensidad para C-H aromáticos, se encuentra a 2921 cm⁻¹ banda de mediana intensidad para C-H de metilos, así como a 1635 cm⁻¹ banda de poca intensidad para C=N.

En el caso de las frecuencias vibracionales por métodos computacionales nos es más fácil identificar el movimiento de cada átomo dentro de la molécula y el tipo de este, ya que se puede visualizar, en 8829, 3770, 3533 cm⁻¹, se encuentra los grupos O-H_(C2), O-H_(N-OH), O-H_(C5), respectivamente, con un estiramiento simétrico, de 3209 a 3158 cm⁻¹ se encuentran las señales para C-H aromáticos con estiramiento asimétrico, de 3152 a 3145 cm⁻¹ se encuentran las señales para C-H de los metilos con estiramiento asimétrico, a 1696 cm⁻¹ se localiza la señal para C=N con estiramiento simétrico.

6.8. Acoplamiento Molecular (DOCKING)

El Docking se realizó con el software libre AutoDock v4.2 (**Morris, 1998**). Se realizó un Docking ciego entre cada uno de los 2 complejos proteína–ligando y su respectivo receptor, solicitándose para tal fin la generación de 1000 poses en cada caso. Posteriormente, se realizó una inspección visual de los resultados en el programa AutoDockTools v1.5.4 (**Sanner, 1999**). (ADT), a fin de observar el grado de similitud existente entre las poses generadas. El tratamiento de los receptores consistió en la eliminación de moléculas de agua y cofactores con los cuales vienen resueltas sus estructuras cristalinas tomada de la base de datos Protein Data Bank (PDB), que se encuentra registrada como 1GYC. El AutoDock emplea algoritmo genético para generar las conformaciones u orientaciones de los ligandos en el sitio de unión. La estructura cristalina de la enzima se refinó removiéndole todas las moléculas de agua presentes y posteriormente añadiéndole los átomos de hidrógenos faltantes con el ADT. La energía relativa de unión de los ligandos en el sitio unión de su receptor es la principal información que proporciona un docking. Las energías libres de unión para los complejos de Aliodorin (**Figura 32**) y aldoxima (**Figura 33**) con el sitio de unión de la 1GYC se reportan en la **Tabla 6.8.1**. En estos datos correspondientes a las orientaciones de menor energía de cada ligando.

Tabla 6.8.1. Energías relativas de Aliodorin y aldoxima

Molécula	Energía Unión	Energía intermolecular	Energía vdw	Flexible
Aliodorin	-6.43	-8.82	-8.64	-7.1
Oxima-Aliodorin	-6.58	-9.26	-8.96	-7.5

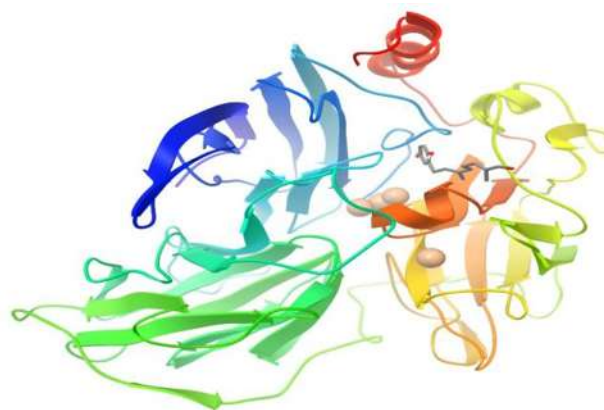


Figura 32. Mejor pose del Aliodorin en el sitio de entrada del oxígeno de 1GYC

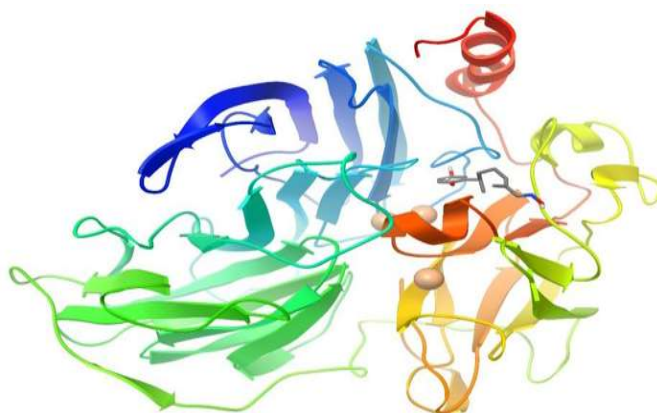


Figura 33. Mejor pose del la oxima en el sitio de entrada del oxígeno de 1GYC.

El análisis del diagrama generado con (PLIP)(Salentin, 2015) de los modos de unión de Aliodorin y oxima en el sitio activo de la 1GYC mostró que la mayoría de estos ligandos fueron capaces de establecer varias interacciones de puente de hidrógeno.

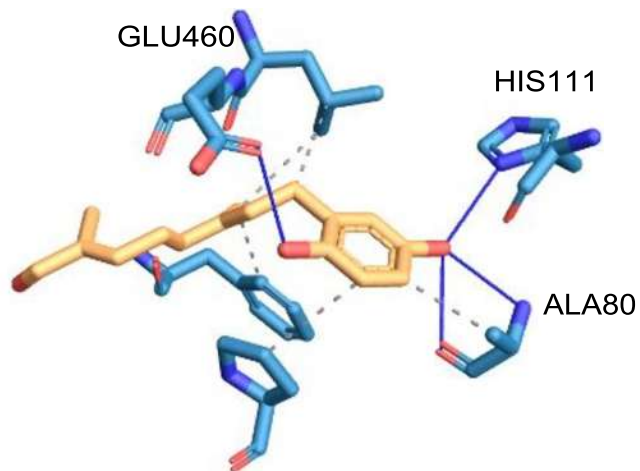


Figura 34. Interacciones de puente de hidrógeno (azul) Aliodorin y 1GYC

Los hidroxilos del Aliodorin mostraron 4 interacciones de puente de hidrógeno (azul) dos con la ALA80 con distancias de 2.23 Å y 2.59 Å, una con las HIS111 y otra con GLU460 con distancias de 2.40 Å y 2.27 Å respectivamente (**Figura 34**), mientras que las interacciones hidrofobicas se muestran con líneas punteadas. Los hidroxilos de la oxima mostraron 4 interacciones de puente de

hidrógeno (azul) dos con la HIS111 con distancias de 1.92 Å y 2.09 Å, una con la ALA80 con 2.56 Å y una con GLU460 con distancias de 1.76 Å y 2.14 Å el grupo Oxima mostró con ASN336 y SER443 distancias de 2.30 Å y 3.00 Å respectivamente (**Figura 35**), mientras que las interacciones hidrofobicas se muestran con líneas punteadas.

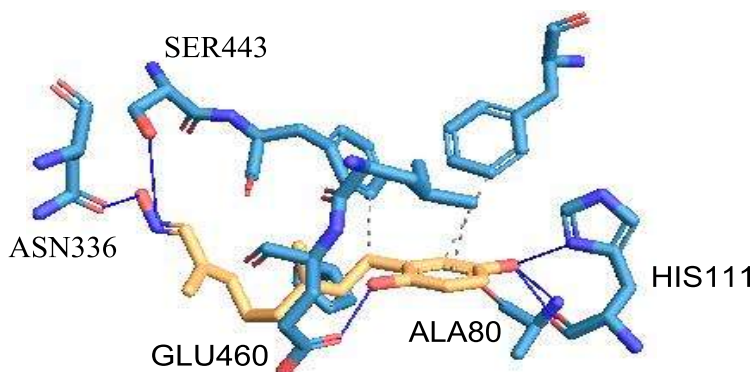


Figura 35. Interacciones de puente de hidrógeno (azul) entre Oxima-Aliodorin y 1GYC

Finalmente mediante la visualización con LigPlot (**Laskowski.,2011**) se considerando tanto los aminoácidos con interacciones con puente de hidrógeno como los de interacciones hidrofobicas y se realizo el Docking flexible **Tabla 6.8.1** con Vina (**Trott, Olson.,2010**), así se tomaron únicamente los aminoácidos PRO79, ALA80, HIS111, SER113, ASN336, SER343, PHE344, THR345, PRO346, PHE450, LEU459, GLU460, ALA461 y GLY462 que participan en el sitio del canal de entrada del oxigeno en la enzima lacaza 1GYC.

7.- CONCLUSIONES

De los extraíbles obtenidos con el disolvente THF se aisló mediante purificación en columna cromatográfica, el compuesto aliodorin, el cual fue identificado mediante espectroscopia de RMN, este compuesto presento buenos resultados al inhibir al hongo *Trametes versicolor* al 100% a una concentración de 100 mg/L.

Se comprobó químicamente la presencia de un grupo aldehído en el aliodorin mediante una transformación química obteniendo el derivado oxima, el cual se identificó mediante RMN, este compuesto presento resultados de inhibición del 100% a una concentración de 150 mg/L sobre el hongo *Trametes versicolor*, a diferencia del aliodorin a 100 mg/L presento solamente el 42% de inhibición.

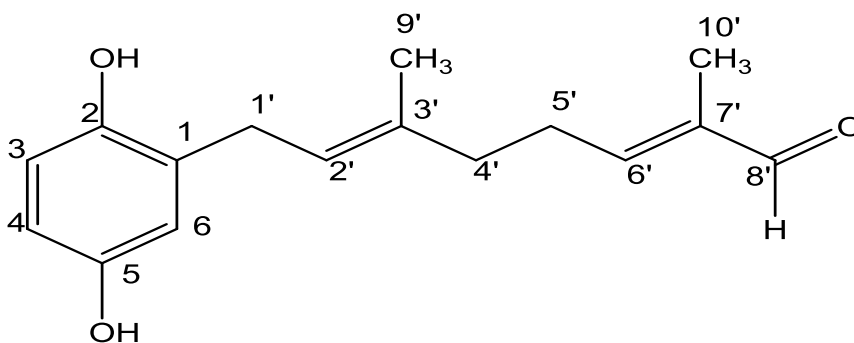
Se realizó una minimización mediante métodos DFT (Teoría funcional de la densidad) para el aliodorin y su oxima, en la cual se observa que los confórmeros incon2 (**Figura 27**) para el aliodorin y aldoxcon1 (**Figura 30**), para el derivado oxima, son los confórmeros de mayor estabilidad, por lo que se puede atribuir que esa es la conformación espacial más acertada de dichas moléculas, y las cuales fueron empleadas para obtener las frecuencias vibracionales obtenidas por métodos computacionales, y de esta manera se comparó con los espectros de infrarrojo, obteniendo similitudes entre ambos métodos ayudando a complementar este trabajo.

Por otra parte, para el acoplamiento molecular Docking, donde la energía relativa de unión de los ligandos en el sitio unión de su receptor es la principal información que proporciona, se corrobora que ambos compuestos son muy semejantes en cuanto estabilidad al momento de estar unido al receptor, ya que las energías relativas de ambas moléculas no difieren en gran medida.

8.- PARTE EXPERIMENTAL

8.1. Compuesto aliodorin: 8-(2,5-Dihidroxifenil)-2,6-dimetilocta-2,6-dienal

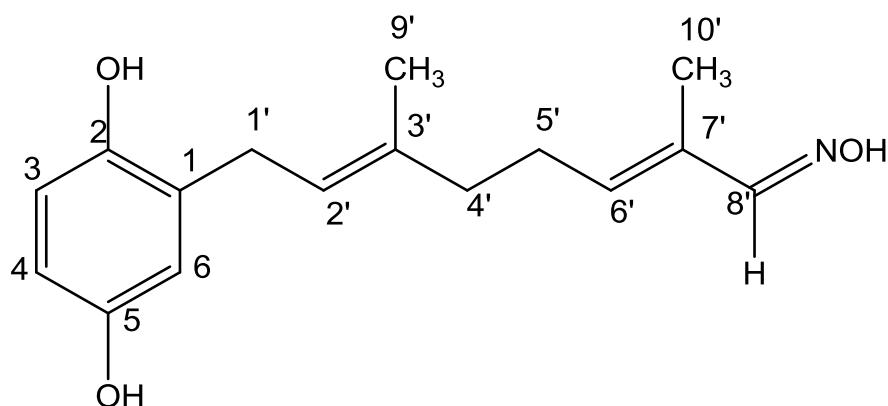
16 gr de harina de duramen de *Cordia elaeagnoides* fueron colocados en un dedal para llevar a reflujo con 200 ml de hexano y posteriormente con THF, en un equipo Soxhlet por 4 horas para obtener los extractos crudos. 1gr de extracto de THF se sometió a purificación en columna cromatográfica utilizando gel de sílice malla (70-230 ASTM) como fase estacionaria y mezclas de hexano-acetato de etilo como eluente, con lo cual se obtuvo 30mg de una miel de color café oscuro, posteriormente identificado como aliodorin; **¹H RMN (400MHz, CDCl₃)** δ 1.74 (s, 3H, H-10'), 1.75 (s, 3H, H-9'), 2.25(t, $J=7.2$ Hz, 2H, H-4'), 2.48(q, $J=7.3$ Hz, 2H, H-5'), 3.28(d, $J=7.2$ Hz, 2H, H-1'), 5.75 (s, 1H, OH), 5.31 (tq, $J=8.5, 1.2$ Hz, 1H, H-2'), 6.48(tq, $J=7.3, 1.3$ Hz, 1H, H-6'), 6.56(d, $J=3.0$ Hz, 1H, H-6), 6.57(dd, $J=8.4, 3.0$ Hz, 1H, H-4), 6.65 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H-3), 9.36 (s, 1H, H-8'). **¹³C RMN (101MHz, CDCl₃)** δ 9.28 (C-10'), 15.98 (C-9'), 27.09(C-5'), 28.95(C-1'), 37.91(C-4'), 113.72(C-6), 116.22(C-3), 116.35(C-4), 123.10(C-2'), 128.05(C-3'), 135.82(C-1), 139.58(C-7'), 147.56(C-5), 149.47(C-2), 154.70(C-6'), 196.09(C-8'). Rf:0.22 (Hex: AcOET, 8:2). **IR Vmax** 3352 cm⁻¹ (Banda amplia e intensa, O-H), 2859 a 2973 cm⁻¹ (Picos de poca intensidad, C-H del Metilo), 1664 cm⁻¹ (C=O de aldehído), 1637 a 1286 cm⁻¹ (C-H fuera del plano para metilos y metilenos). EM [M⁺] de 259.3834 m/z, calculado para 260 m/z (C₁₆H₂₀O₃)



8-(2,5-Dihidroxifenil)-2,6-dimetilocta-2,6-dienal (aliodorin)

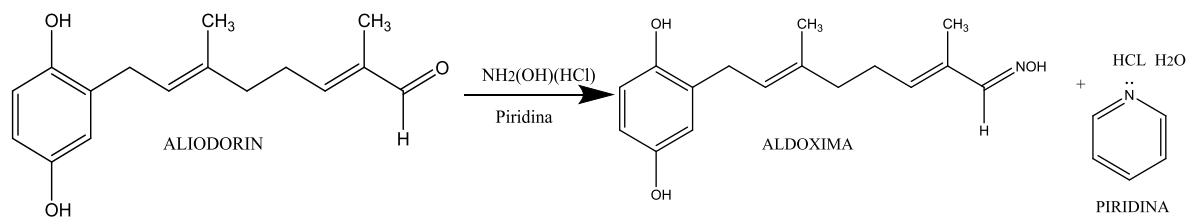
8.2. Derivado oxima de aliadorin: 8-(2,5-Dihidroxifenil)-2,6-dimetilocta-2,6-dioxima

A 30 mg de aliadorin se le agregaron 0.3 ml de piridina y 30 mg de clorhidrato de hidroxilamina, el cual se dejó reaccionar por 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se realizaron dos lavados con 30 ml con acetato de etilo, dos lavados con 50 ml de ácido clorhídrico al 10%, dos lavados con 30 ml de bicarbonato de sodio saturado, dos lavados con cloruro de sodio saturado, se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, para posteriormente evaporar en rota-vapor obteniendo un aceite denso de color café claro, el cual se sometió a purificación en columna cromatográfica utilizando gel de sílice (malla 70-230 ASTM) como fase estacionaria y mezclas de hexano: acetato de etilo (9:1) como fase móvil, obteniendo así 20 mg (63%) del derivado oxima; **¹H NMR (400MHz, CDCl₃)** δ 1.72 (s, 1H, Me-10'), 1.80 (s, 1H, Me-9'), 2.19 (t, J = 7.0 Hz, 2H, H-4'), 2.37 (q, J = 7.2Hz, 2H, H-5'), 3.29 (d, J = 7.3Hz, 2H, H-1'), 4.70 (s, 1H, OH), 5.28 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H-2'), 5.72(t, J = 7.2Hz, 1H, H-6'), 6.51 (d, J = 3.0 Hz, 1H, H-6), 6.58 (dd, J = 8.5, 3.0 Hz, 1H, H-4), 6.66 (d, J = 8.5Hz, 1H, H-3), 7.66 (s, 1H, N-OH), 7.75 (s, 1H, H-8'). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 11.62 (C-10'), 16.00 (C-9'), 26.27 (C-5'), 28.76 (C-1'), 38.73 (C-4'), 113.71 (C-6), 116.19 (C-3), 116.26 (C-4), 122.45 (C-2'), 128.12 (C-3'), 130.60 (C-8'), 136.65 (C-1'), 139.39 (C-7'), 147.59 (C-5), 149.41 (C-2), 155.57 (C-6'). **Rf:** 0.17 (Hex:AcOET, 8:2). **IR Vmax** 3343 cm⁻¹ (Banda intensa y ancha, O-H), 2921 a 2851 cm⁻¹ (Picos de poca intensidad, C-H de metilos), 1633 cm⁻¹ (Pico de poca intensidad, C=N), 1502 y 1449 cm⁻¹ (Picos de mediana intensidad, -CH₂-), 1191 cm⁻¹ (Pico de mediana intensidad, -OH deformación)

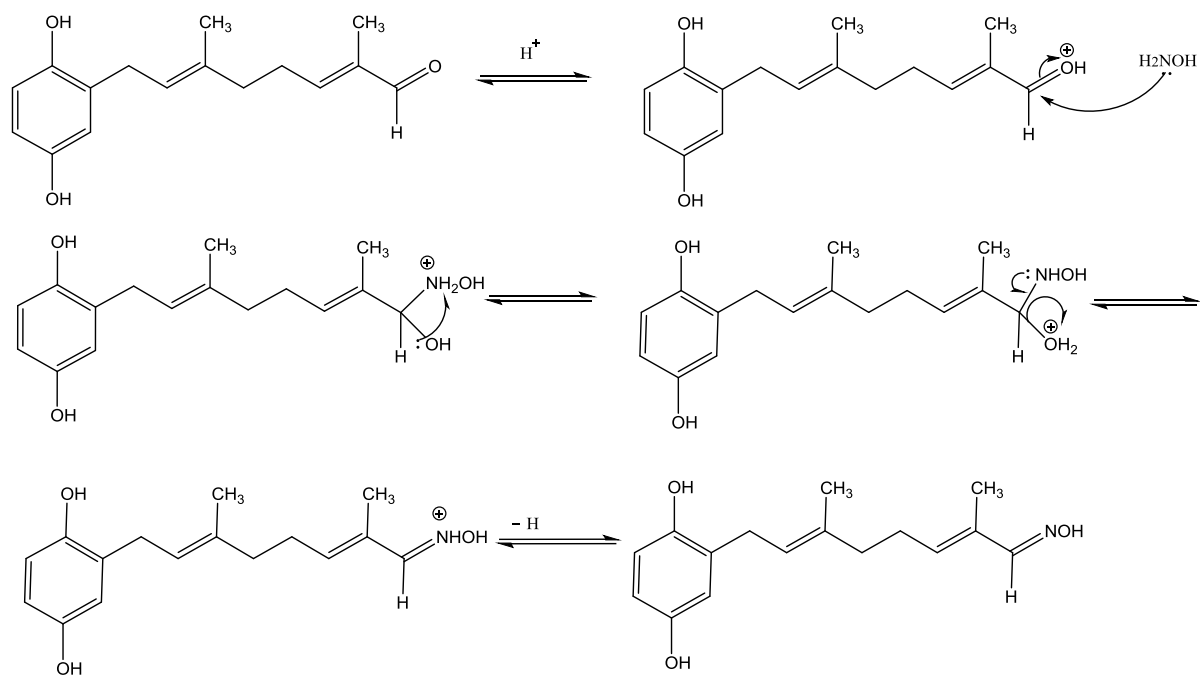


8-(2,5-Dihidroxifenil)-2,6-dimetilocta-2,6-dioxima (aldoxima)

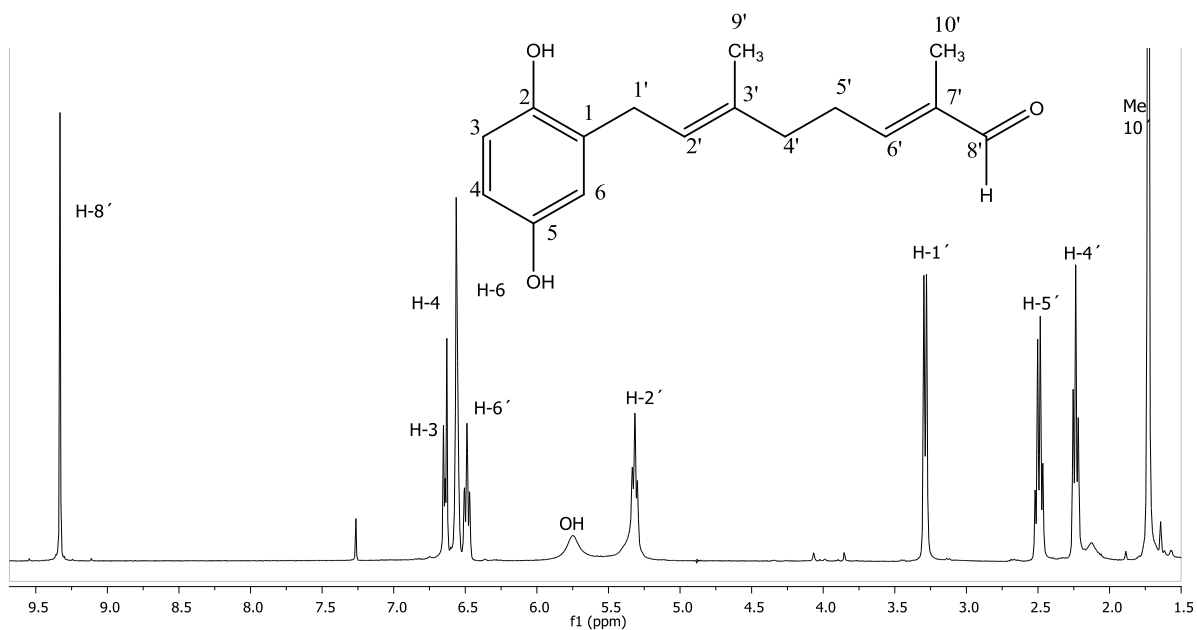
Reacción:



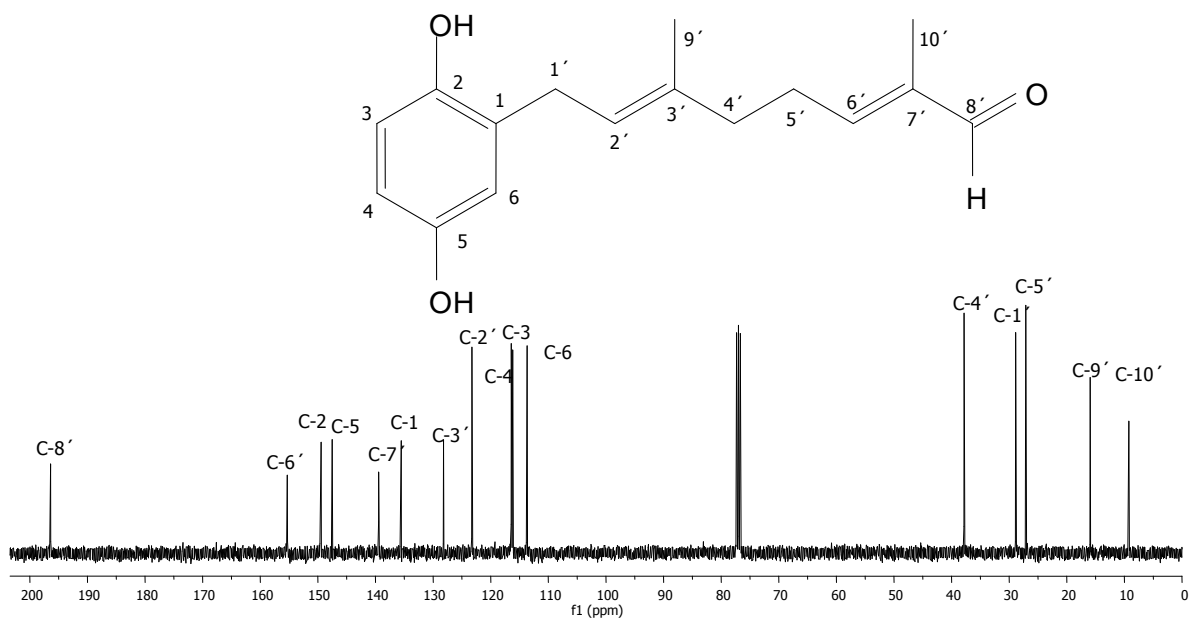
Mecanismo:



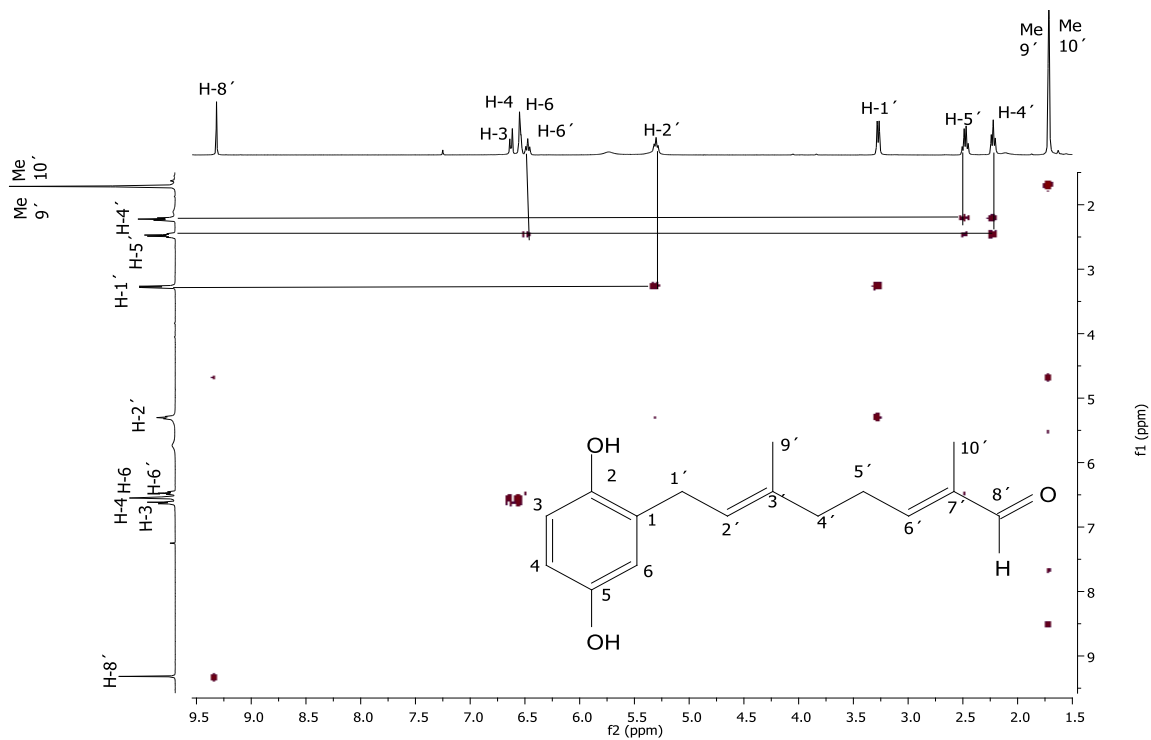
9.- APÉNDICE DE ESPECTROS



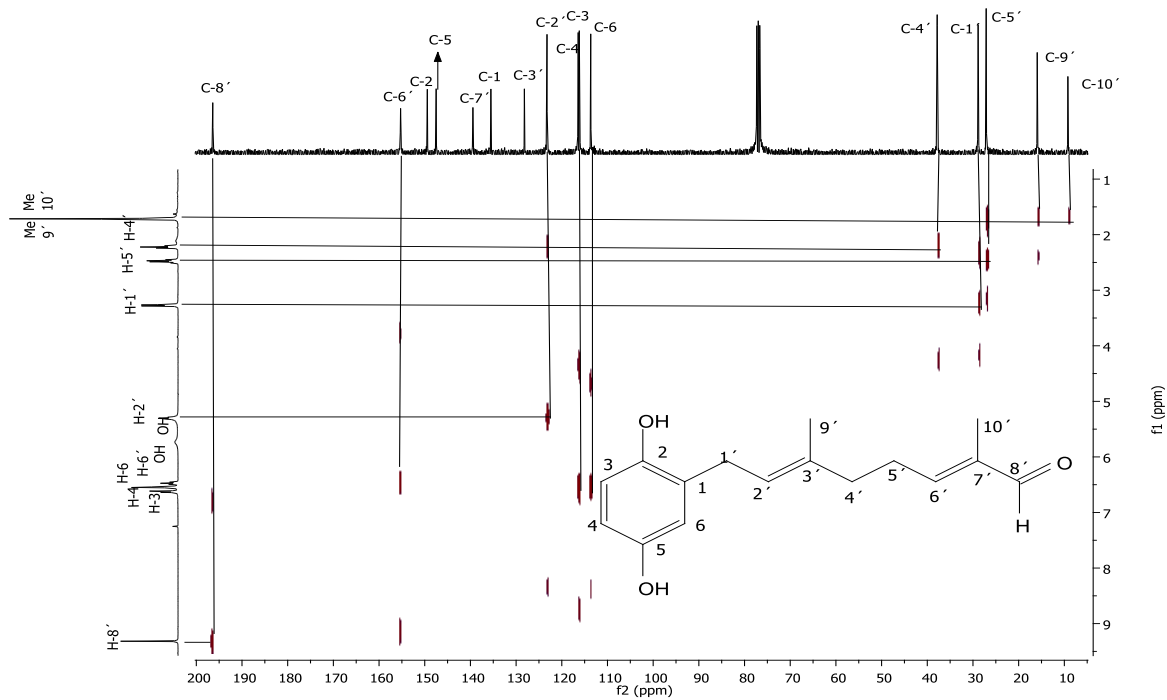
E.1 RMN ¹H aliadorin.



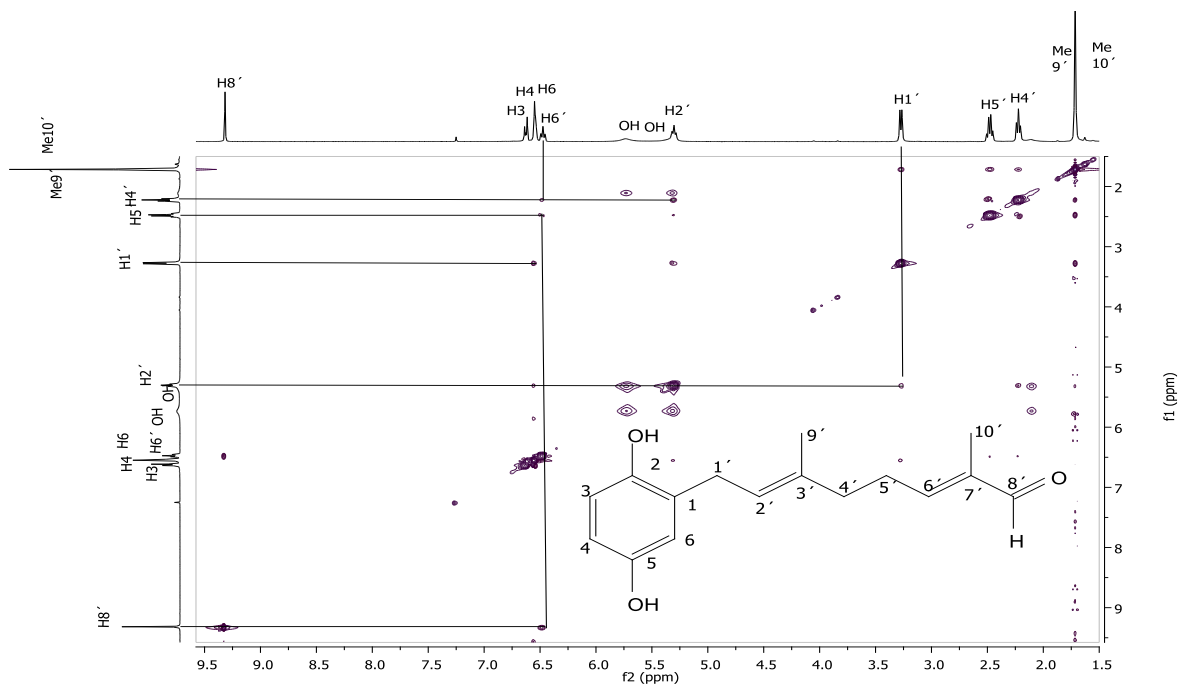
E.2 RMN ¹³C aliadorin.



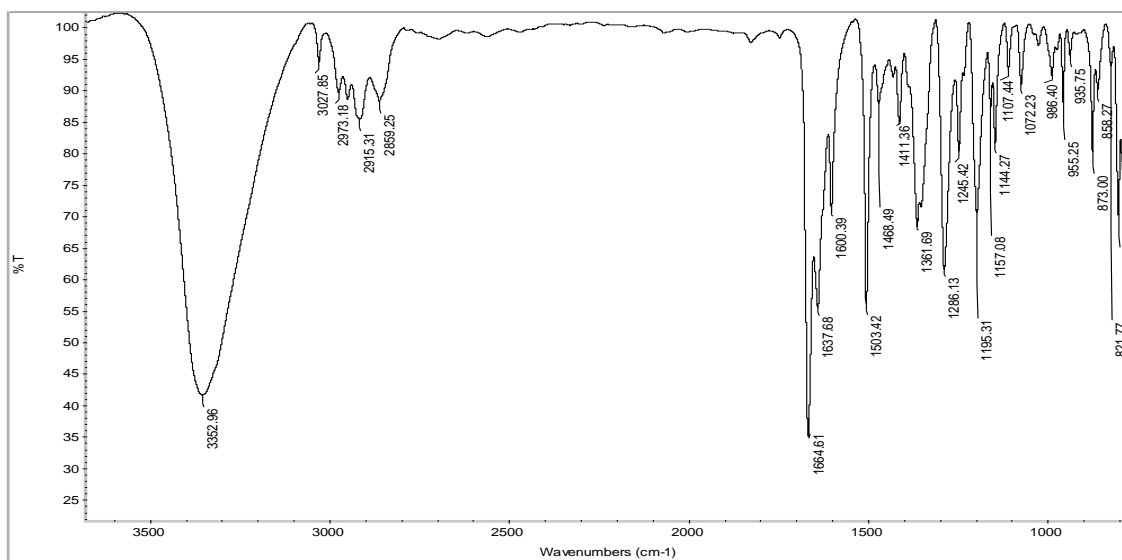
E.3 RMN COSY del aliodorin.



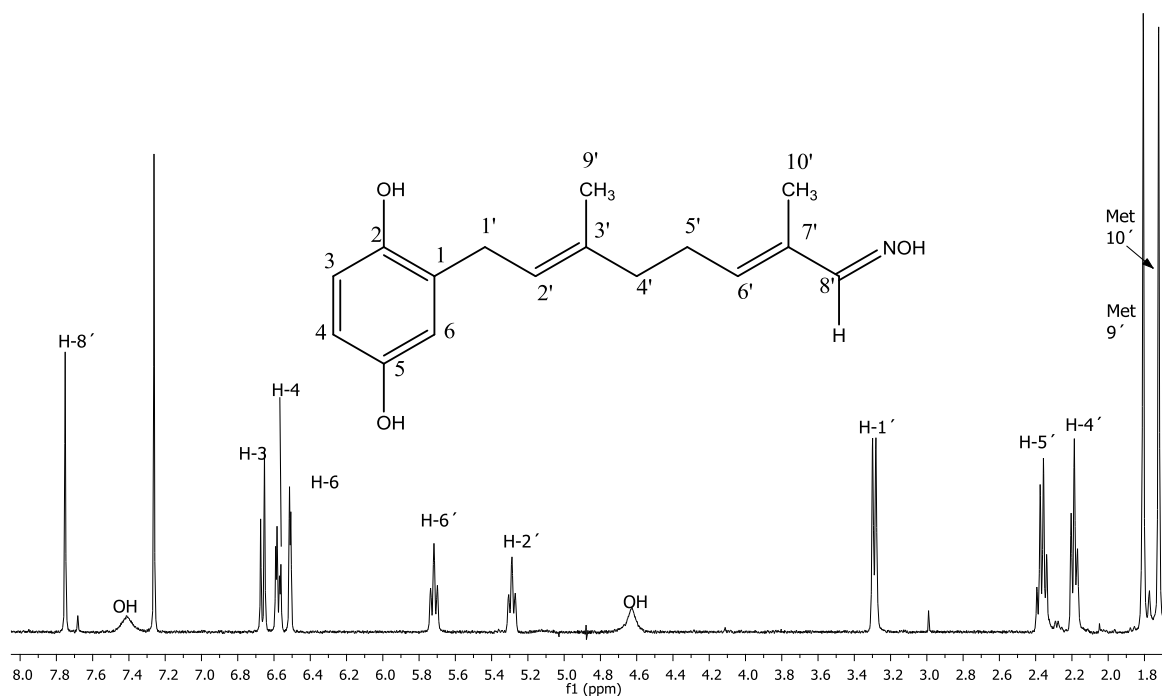
E.4 RMN HETCOR del aliodorin.



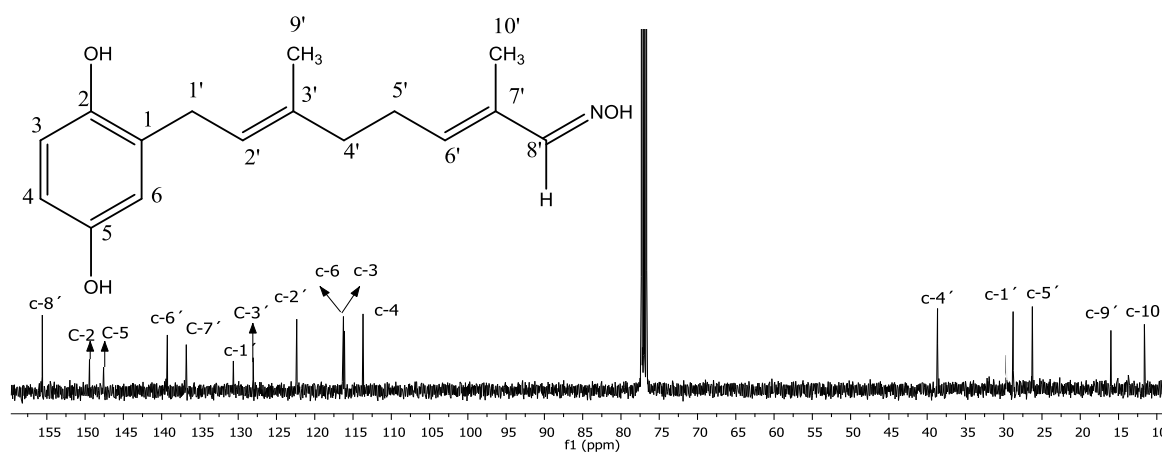
E.5 RMN NOESY del aliodorin.



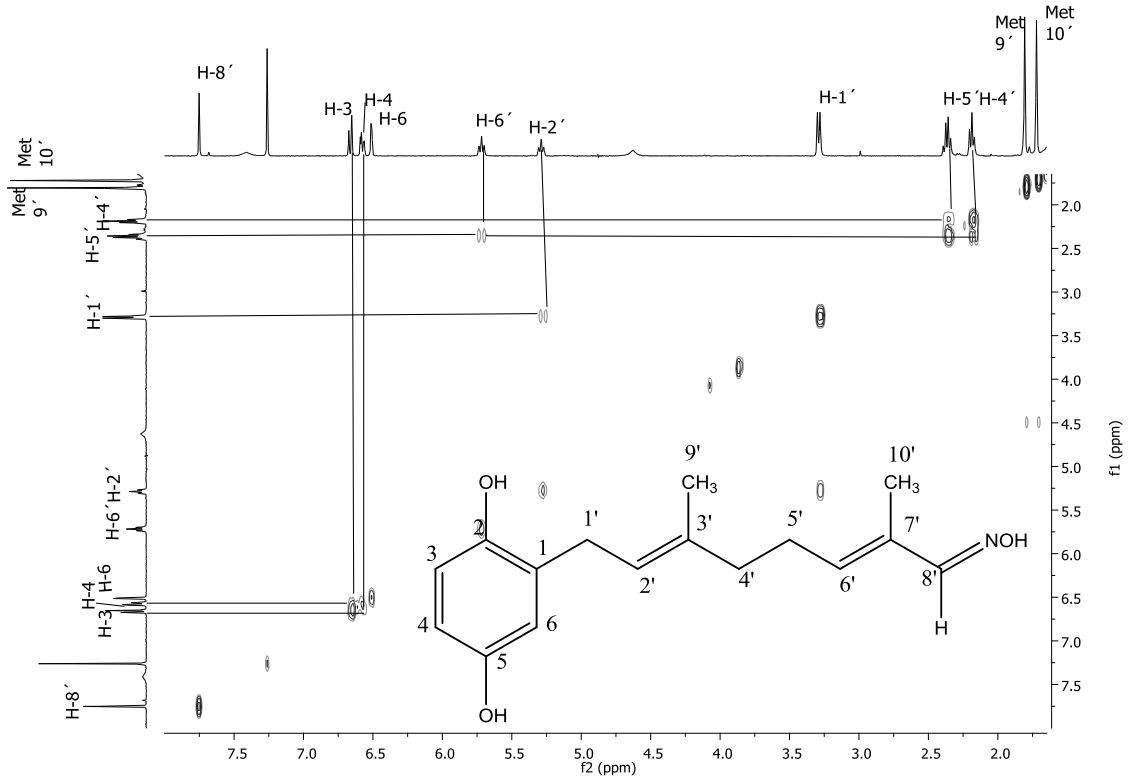
E.6 RMN Infrarrojo del aliodorin.



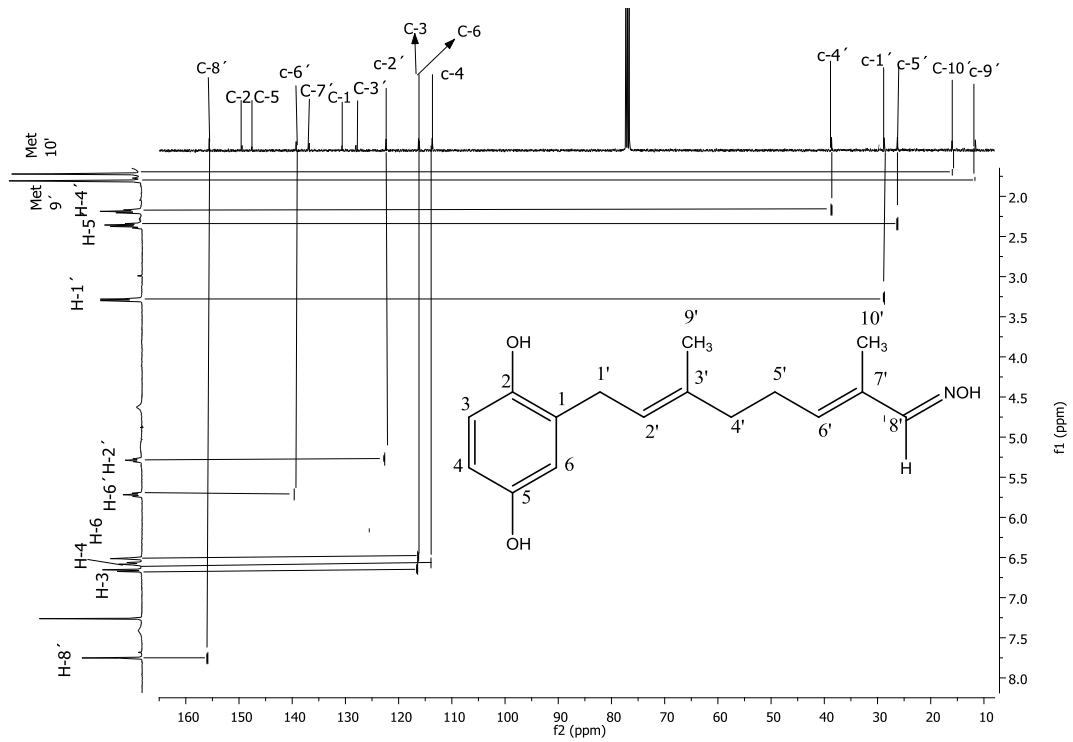
E.7 RMN ^1H de la oxima.



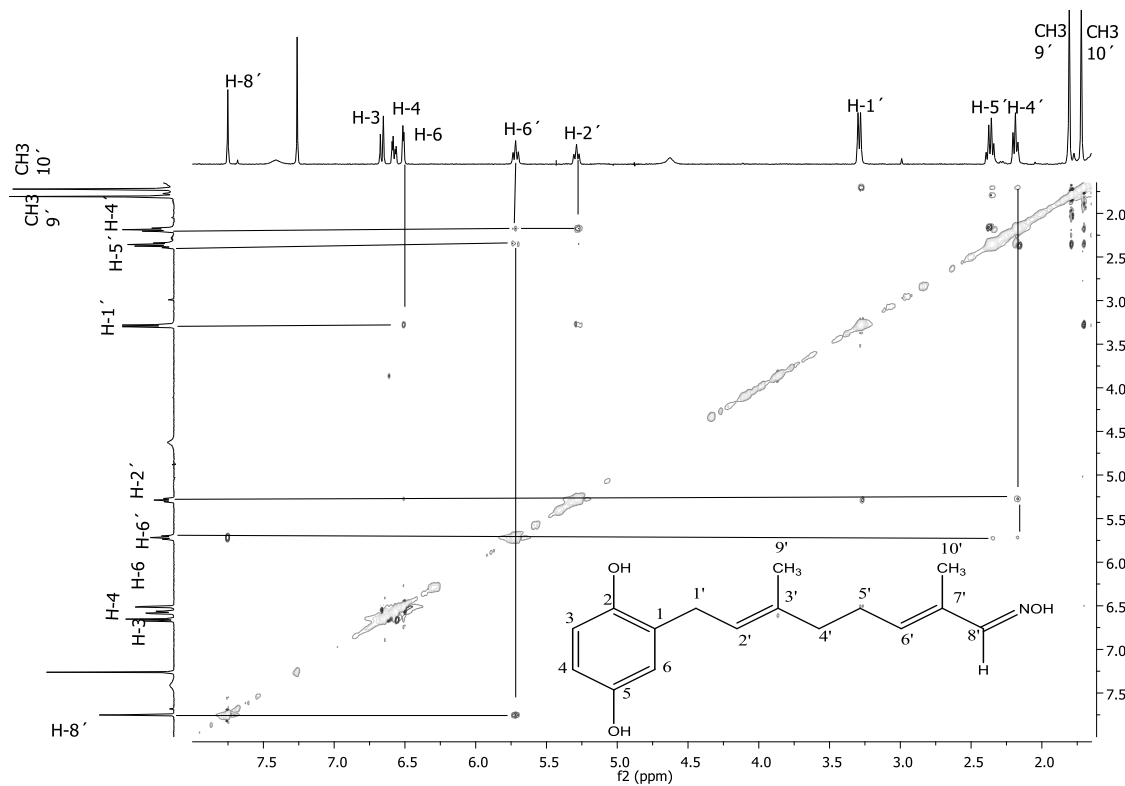
E.8 RMN ^{13}C del la oxima.



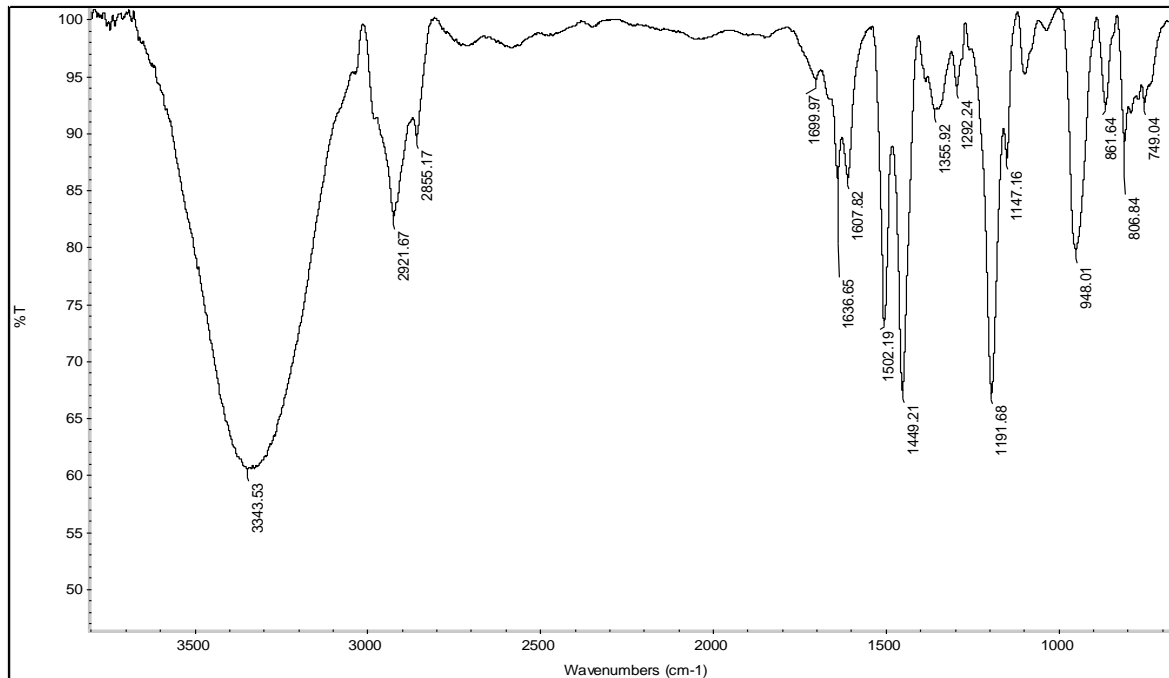
E.9 RMN COSY de la oxima.



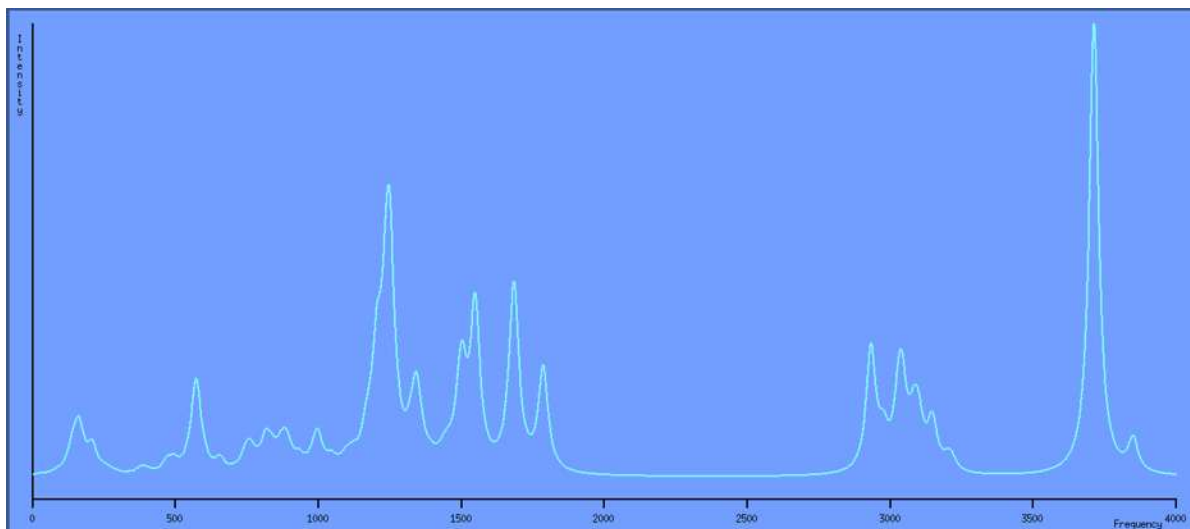
E. 10 RMN HETCOR de la oxima.



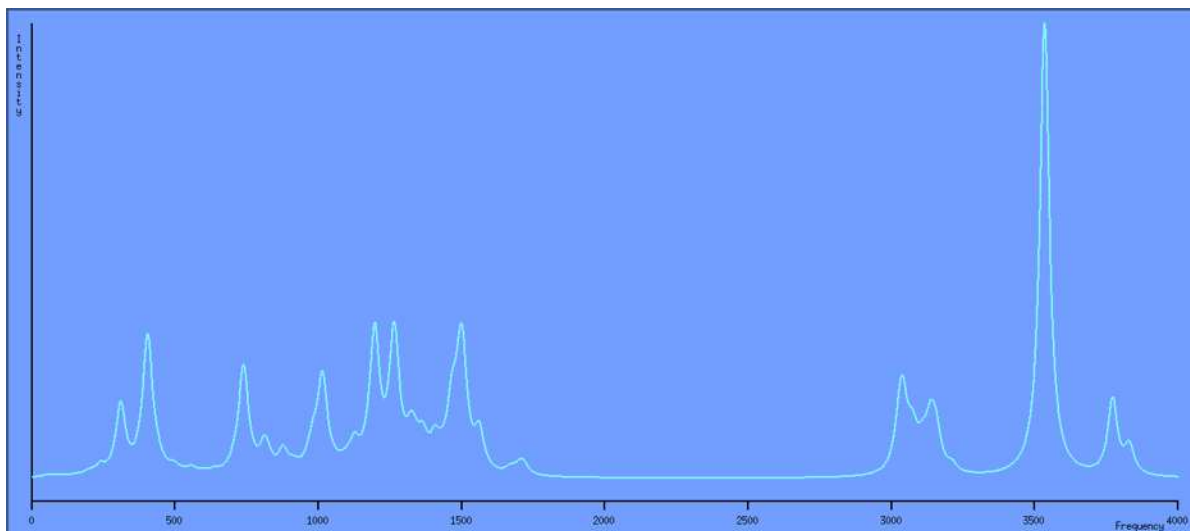
E.11 RMN NOESY de la oxima.



E.12 RMN Infrarrojo de la oxima.



E.13 IR teórico del aliodorin.



E.14 IR teórico de la oxima.

10.- BIBLIOGRAFÍA

- Agudo, R. C. (2018). introducción a las técnicas de simulación molecular y su potencial aplicación en el ámbito de la ingeniería química. Cantabria España.
- Sánchez, I. R. (2014). Método y usos de la Química Computacional. México.
- Jiménez, P. H. (2005). Anatomía de madera. Santiago del estero.
- Arostegui. (1976). Características Tecnológicas y usos de la Madera de 145 especies del país. En Arostegui, Características Tecnológicas y usos de la Madera de 145 especies del país. (pág. 472). Lima-Peru.
- Berrueta, T. U. (2017). Generalidades de Micología. México.
- Bruice, P. Y. (2007). Fundamentos de química orgánica. santa bárbara: Pearson educación .
- CAREY, R. A. (2006). Química orgánica. México: McGraw-Hill.
- CONAFOR. (2007). Elaboración de fichas técnicas sobre las características tecnológicas y usos de maderas Mexicanas de interés para las plantaciones forestales comerciales . Obtenido de www.conafor.gob.mx/conacyd-conafor
- Cuevas, G. (2005). Química Computacional. México.
- Durabilidad natural de la madera. (2015). directorio forestal maderero.
- Enciclopedia de los Municipios Delegaciones de México Estado de Michoacán de Ocampo.
<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM16michoacan/mediofisico.html>
- Fabián, E. S. (2019). Cálculos Computacionales de Estructuras moleculares. Alicante.
- física, D. d. (2012). Resonancia Magnética Nuclear. Valencia España.
- García Esteban L., GulIndeo Casasos A., Peraza Dramas C. De palacios p. (2003). *La Madera y su Anatomía*. Primera Edición, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid
- Gete, A. R. (2014). Degradación de la madera por organismos xilófagos vegetales.
- González, G. (2012). Patologías bióticas de la madera. Chile.
- Guzmán, J. A. (2008). fichas técnicas sobre características tecnológicas y usos de maderas en México. México.
- Fernández, A. F. (2016). Manual de propagación de plantas superiores. México.

- Hernández E. (2013) Desarrollo de formulación adhesiva anti fúngicas para madera a base de lignina despolimerizada y extraíbles latifoliadas. Tesis Maestría. Maestría en Tecnología de la Madera.
- Figueroa, W. R. (2008). Química Computacional. México.
- JR, L. W. (2012). Química Orgánica 7 edición. Estado de México: Pearson.
- Kollmann F. (1959) *Tecnología de la Madera y sus Aplicaciones*. ed. IFIE, España. 25-38.
- Laskowski R A, Swindells M B (2011). LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J. Chem. Inf. Model.*, 51, 2778-2786.
- León, D. J. (2010). Manual para la protección contra el deterioro. Morelia: Conafor.
- Lomeli Ramírez. M.G. (1991) Determinación de la Durabilidad Natural de la Madera de Arboles Tropicales (*Cordia elaeagnoides* D.C) Al Ataque de los Hongos Xilófagos *Lenitus lepideus* fr. *Laetiporus Sulphureus* (bull. fr) Murr. Tesis de licenciatura en biología. Centro Universitario de ciencias exactas e ingenierías CUCEI. Universidad de Guadalajara Departamento de Madera, celulosa y papel.
- Manners, G.D (1983). The Hidroquinone Terpenoids of *Cordia elaeagnoides*. *J. chem.soc.perkin trans.I,P.* 39-43.
- Menendez valderrey J. (2006). *Trametes versicolor* (L). Pill asturnatura.com.
- Morris, G.M., et al., Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem*, 1998. 19(14): p. 1639–1662.
- Murace M; Spavento E. (2014). Durabilidad de las Maderas. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. UNLP. La Plata Buenos Aires Argentina.
- O. Trott, A. J. Olson, (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *Journal of Computational Chemistry* 31 (455-461). <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- Oramas, C. P. (2019). La madera y sus propiedades. Obtenido de informadera.net: https://infomadera.net/uploads/articulos/archivo_875_16757.pdf
- Palma, J. M. (2018). Recursos arbóreos y arbustivos tropicales. 40-44.
- Yurkanis, (2014). Fundamentos de Química Orgánica" primera edición.p.320-343
- Paz de la C. (1993). Anatomía de la Madera de Ocho Especies de Importancia en las Artesanías en el Estado de Michoacán, *Acta Botánica Mexicana* 23: 103-136.

Prontuario de Información Geográfica Municipal de los Estados Unidos Mexicanos, (2009). Taretan, Michoacán de Ocampo, clave geoestadística 16087. <http://www.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos/16/16087.pdf>

Ralph J. Fessenden, J. S. (1993). QUÍMICA ORGANICA. México: Iberoamérica.

Rodríguez, B. F. (2014). Química computacional. Santiago de Compostela.

Sanner, M.F., Python: a programming language for software integration and development. J Mol Graph Model, 1999. 17(1): p. 57–61.

Salentin, S. et al. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. Nucl. Acids Res. (1 July 2015) 43 (W1): W443-W447. doi: 10.1093/nar/gkv315 (<https://projects.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>)

SEMARNAT (2010) Consideraciones Tecnológicas de la Madera-conafor .p.7-9.