



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**
FACULTAD DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGÍA



**“ESTUDIO DEL AREOLAL Y SU OXIMA POR RESONANCIA
MAGNÉTICA NUCLEAR”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACOBIOLOGA

PRESENTA:

VERÓNICA CORTÉS MUÑOZ

ASESOR DE TESIS:

D.C. HUGO ALEJANDRO GARCÍA GUTIÉRREZ

MORELIA, MICHOACÁN, DICIEMBRE DE 2013.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Medicinal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría de D.C. Hugo Alejandro García-Gutiérrez, con una Beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. Becario 18774) y una Beca a estudiante de Apoyo a la Incorporación de Nuevos PTC, UMSNH-PTC-330.

Con el apoyo económico de los proyectos: CONACYT No.167952 “Diseño de nuevos derivados semisintéticos a partir de los diterpenos naturales del género *Eupatorium* y estudio de su efecto en la inestabilidad dinámica de los microtúbulos”, PROMEP UMSNH-PTC-330 y CIC-UMSNH.

Parte de este trabajo se presentó en el evento académico:

“Estudio del areolal por resonancia magnética nuclear en dos dimensiones”
Verónica Cortés-Muñoz, Leticia Yáñez-Chávez, Miriam Leco-González, José L. Salvador-Hernández, Hugo A. García-Gutiérrez, Luisa U. Román-Marín, Juan D. Hernández-Hernández, Rosa E. Del Río. Presentado en el marco de las actividades académicas del 8º Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e innovación y 2do Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán, celebrado el 7 y 8 de Noviembre de 2013.

ÍNDICE

I.	ÍNDICE DE FIGURAS	vi
II.	ÍNDICE DE TABLAS	viii
III.	TABLA DE ABREVIATURAS	ix
1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	ANTECEDENTES	4
2.1.	Productos del metabolismo secundario.	4
2.2.	Terpenos.	7
2.2.1.	Clasificación de los terpenos.	9
2.2.2.	Generalidades del género <i>Eupatorium</i> .	12
2.2.3.	Generalidades de <i>Piptotrix areolare</i> .	16
2.3.	Generalidades de oximas.	17
2.3.1	Estereoisomería de oximas.	18
2.3.2.	Métodos de formación de oximas.	19
2.3.3.	Mecanismo de acción.	19
2.3.4.	Espectroscopia de infrarrojo en oximas.	20
2.4.	Microorganismos.	21
2.4.1.	Antibiograma.	23
2.4.2.	Método de difusión en agar según Kirby-Bauer.	24

2.4.3.	Composición de los medios de cultivo.	24
3.	OBJETIVOS	26
3.1.	Objetivo General.	26
3.2.	Objetivos Específicos.	26
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1.	Aislamiento del areolal.	27
4.2.	Asignación de la oxima del areolal.	37
4.3.	Actividad antimicrobiana.	45
5.	CONCLUSIÓN	47
6.	PERSPECTIVAS	48
7.	PARTE EXPERIMENTAL	48
7.1.	Obtención del extracto.	49
7.2.	Aislamiento del areolal.	49
7.3.	Obtención de la oxima del areolal.	50
7.4.	Determinación de la actividad antimicrobiana.	50
8.	BIBLIOGRAFÍA	52
9.	ANEXO	55

I. ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.	Mural el pueblo demanda salud.	3
Figura 2.	Biosíntesis de metabolitos secundarios.	5
Figura 3.	Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno que contienen.	8
Figura 4.	Estructura química del isopreno.	9
Figura 5.	Estructuras químicas del limoneno y el mentol.	9
Figura 6.	Estructura química del ácido giberélico y del gosipol.	10
Figura 7.	Estructuras químicas del estigmasterol y del sitosterol.	11
Figura 8.	Ejemplos de esqueletos de diterpenos.	12
Figura 9.	Fórmula general de una oxima.	17
Figura 10.	Reacción de una oxima en medio básico y ácido.	17
Figura 11.	Isómeros de aldo y cetoximas.	19
Figura 12.	Mecanismo general de formación de oximas con hidroxilamina.	20
Figura 13.	Maceración de la raíz de <i>Piptorix areolare</i> .	27
Figura 14.	Concentración del extracto.	27
Figura 15.	Cromatografía en columna.	28
Figura 16.	Estructura del areolal aislado de <i>Piptotrix areolare</i> .	29
Figura 17.	Espectro de RMN de ^1H del areolal.	30
Figura 18.	Espectro de RMN de ^{13}C del areolal.	32
Figura 19.	Ampliación del espectro de RMN de ^{13}C del areolal en la	

	región 149.0 a 116.0 ppm.	33
Figura 20.	Espectro HETCOR del areolal en la región de 8.00 a 1.50 ppm.	35
Figura 21.	Estructura obtenida por difracción de rayos X del areolal.	36
Figura 22.	Espectro de RMN ^1H de la oxima del areolal.	38
Figura 23.	Espectro de RMN ^{13}C de la oxima del areolal.	40
Figura 24.	Ampliación del espectro de RMN de ^{13}C de la oxima del areolal en la región de 134.0 a 117.0 ppm.	41
Figura 25.	Ampliación del espectro COSY de la oxima del areolal en la región 8.20 a 3.00 ppm.	42
Figura 26.	Siembra del microorganismo.	45
Figura 27.	Areolal y timol empleados en el ensayo antimicrobiano.	46
Figura 28.	Ampliación del espectro de RMN ^1H en la región de 7.80 a 7.28 ppm.	56
Figura 29.	Ampliación del espectro COSY del areolal en la región 5.00 a 1.40 ppm.	56
Figura 30.	Ampliación del espectro HETCOR del areolal en la región 7.84 a 7.32 ppm.	57
Figura 31.	Ampliación del espectro HMBC del areolal en la región 7.84 a 7.36 ppm.	57
Figura 32.	Ampliación del espectro HETCOR del areolal en la región 8.00 a 1.50 ppm.	58
Figura 33.	Ampliación del espectro de RMN ^1H de la oxima del areolal del rango de 7.65 a 7.25 ppm.	56
Figura 34.	Ampliación del espectro COSY de la oxima del areolal en la región 7.70 a 6.30 ppm.	59
Figura 35.	Ampliación del espectro HETCOR de la oxima del areolal en la región 7.70 a 6.30 ppm.	59
Figura 36.	Ampliación del espectro HMBC de la oxima del areolal en la	

	región 8.10 a 6.40 ppm.	60
Figura 37.	Ampliación del espectro de HMBC de la oxima del areolal en la región de 4.80 a 1.40 ppm.	60
Figura 38.	Figura 38. Ampliación del espectro NOESY de la oxima del areolal en la región de 8.50 a 1.50 ppm.	61

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Ejemplos de plantas medicinales de la familia Asteraceae y sus aplicaciones.	14
Tabla 2.	Comparación de datos espectroscópicos de RMN- ¹ H de areolal con respecto a los reportados en la literatura.	43
Tabla 3.	Comparación de datos espectroscópicos de RMN- ¹³ C de areolal con respecto a los reportados en la literatura.	44
Tabla 4.	Ensayo antimicrobiano del areolal empleando la técnica de antibiograma, inhibición en mm.	46

III. TABLA DE ABREVIATURAS.

ACoA	Acetil Coenzima A
AcOEt	Acetato de etilo
AMC	Amoxicilina con ácido clavulánico
CMI	Concentración mínima inhibitoria
COSY	Espectro de Correlación Homonuclear
CRO	Ceftriaxona
DMAPP	Dimetilalil Difosfato
FPP	Farnesil Difosfato
FOS	Fosfonicina
GDD	Geranil Difosfato
GGPP	Geranilgeranil Difosfato
h	Hora
HETCOR	Espectro de Correlación Heteronuclear
H ₂ O	Agua
IPP	Isopentenil Difosfato
IR	Infrarrojo
MeOH	Metanol
MEP	Metileritritol Fosfato
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mo	Microorganismo
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
NOESY	Espectro de Correlación Homonuclear de efecto Overhauser
OMS	Organización Mundial de la Salud
R _f	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear

RMN de ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
RMN de ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno
SNC	Sistema Nervioso Central
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
μg	Microgramos
μL	Microlitros

1. INTRODUCCIÓN.

Todos los pueblos de la antigüedad adquirieron información sobre las propiedades medicinales de un gran número de plantas propias de su medio ambiente debido a que las enfermedades han estado presentes desde el inicio de la humanidad y nuestros antepasados tuvieron que hacer uso de remedios caseros para contrarrestar dicha enfermedad, si bien no buscaban el saber cómo o por qué actuaban pero era un hecho inexplicable y que parecía mágico. Este conocimiento fue transmitido de generación en generación, con lo cual el ser humano ha librado numerosas batallas en contra de las enfermedades.

El potencial de las plantas para curar la enfermedad es conocida desde siempre en todas las sociedades por lo cual hoy en día aun se siguen usando, tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna ya que son fuente directa de agentes terapéuticos para la obtención de medicamentos más complejos, con esto se busca hacer un estudio fitoquímico el cual consiste en dar a conocer los principios activos responsables de curar enfermedades, determinar sus estructuras químicas, procurar su síntesis, proponer modificaciones estructurales en busca de una mayor actividad y finalmente dar a conocer los resultados.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos.¹

Las plantas son organismos autótrofos además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa, por el cual las plantas sintetizan sustancias fundamentales para garantizar su sobrevivencia a nivel individual y que además su importancia trasciende hasta niveles de organización más complejos como los ecosistemas en los que son un elemento base para la construcción de los equilibrios naturales. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios, se

distribuyen de manera diferente en grupos taxonómicos que presentan propiedades biológicas, se caracterizan y diferencian por sus usos y aplicaciones ya sea como pigmentos, atrayentes o repelentes de animales, defensa, colorantes o perfumes entre otros.² El metabolismo secundario constituye una adaptación en el reino vegetal, para su diferenciación las plantas han necesitado miles de años de evolución y perfeccionamiento a través de la interacción con el medio ambiente.

El estudio de las rutas metabólicas en las plantas ha dado respuesta de su procedencia medicinal las cuales provienen de metabolitos que éstas producen, en la mayoría de éstos compuestos se desconoce su función metabólica dentro del organismo vegetal por lo tanto es de gran interés el estudio fitoquímico de estas sustancias para determinar su estructura molecular y comprobar si presentan alguna actividad terapéutica.

La OMS define a los principios activos como los ingredientes de los medicamentos herbarios que tienen actividad terapéutica.³

Más del 25% de los principios activos usados actualmente son derivados de productos naturales y México es un país afortunado ya que tiene una gran riqueza de ecosistemas y variabilidad genética debido a su topografía y su clima, posee una gran variedad de plantas que son útiles para el hombre ya sea como medicinas, vestimenta, refugio, o combustibles.

En la medicina moderna se pretende encontrar la cura de enfermedades, que si bien han estado presentes en el ser humano no se tenían los conocimientos ni los equipos necesarios con los que se cuenta ahora para llegar al tratamiento.

Se han realizado estudios fitoquímicos del género *Eupatorium*, algunas especies de este género han sido estudiadas y usadas en la medicina tradicional por su actividad antiinflamatoria, antifúngica, bactericida y antipirética para el tratamiento de la malaria, úlceras gástricas, fiebre, actividad analgésica y diarrea.⁴

La planta *Piptotrix areolare*, también es conocida como *Eupatorium areolare* y *Ageratina aerolaris*,⁵ a la cual se le realizó el estudio fitoquímico, y por medio de este se aisló e identificó a el areolal.

Una vez aislado el producto natural se procedió a preparar su oxima tomando como base que tiene un grupo funcional aldehído empleando clorhidrato de hidroxilamina en piridina. Finalmente debido a que el areolal es un derivado del timol se realizó el estudio antimicrobiano empleando antibiogramas por el método de Kirby-Bauer⁶ con el cual se determinó de forma preliminar algunas cepas bacterianas patógenas comunes al hombre.



Figura 1. Mural el pueblo demanda salud.⁷

2. ANTECEDENTES.

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en forma de moléculas comunes a todas las células, estas moléculas son necesarias para el funcionamiento celular. Los metabolitos primarios son los aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todos los organismos desempeñando básicamente las mismas funciones.

A diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios (también denominados productos naturales). Los metabolitos secundarios difieren de los metabolitos primarios en que ciertos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas, a menudo su producción está restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies.⁸

2.1. Productos del metabolismo secundario.

La síntesis específica de cada compuesto suele estar restringida a estados específicos del desarrollo respectivo de cada tipo de organismo, células especializadas y períodos de estrés causados por la deficiencia de nutrientes o por el ataque de microorganismos. Este fenómeno se debe a la formación, dependiente de fase, de la correspondiente enzima, lo que significa que la expresión del metabolismo secundario se basa en un proceso de diferenciación.

Muchos factores afectan la síntesis de los metabolitos secundarios; la concentración de C, H, S, el estado acuífero y la temperatura ambiental son algunos de los más importantes.

Atendiendo a las vías biosintéticas que les dan origen, los compuestos secundarios se agrupan en tres clases principales:

- **Terpenos.**
- **Compuestos fenólicos.**
- **Alcaloides.**

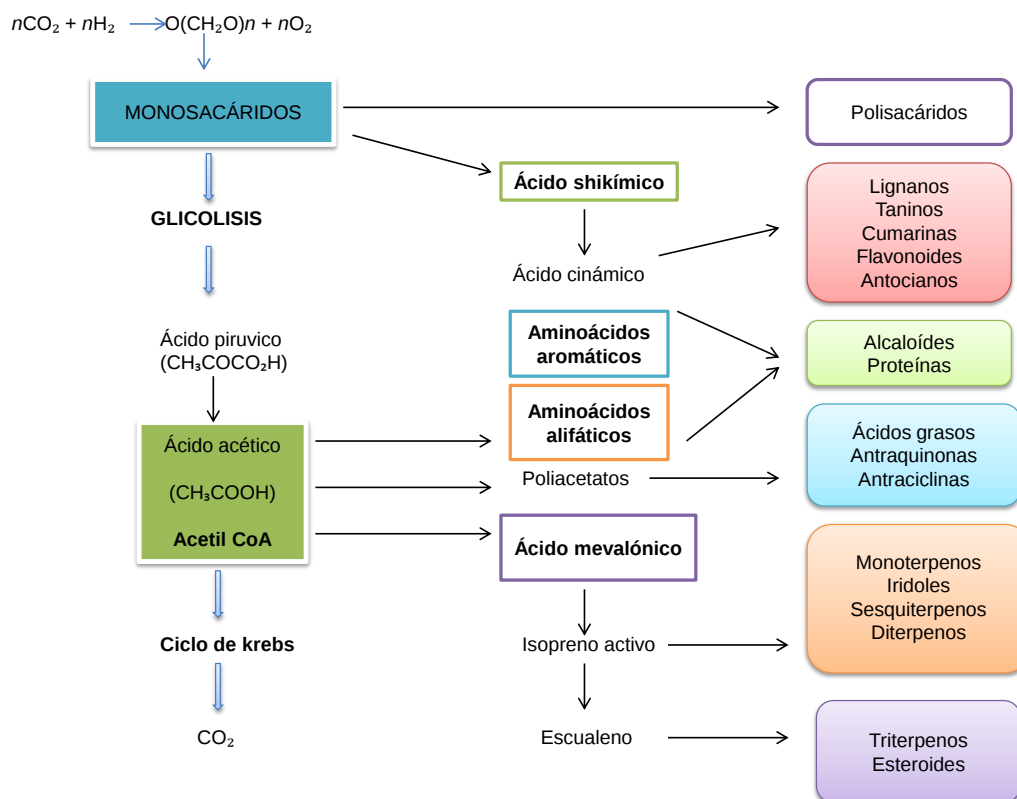


Figura 2. Biosíntesis de metabolitos secundarios.²

El ácido acético es el precursor de los ácidos grasos y de los policétidos en la ruta del acetato-malonato, y los terpenos o isoprenoides son sintetizados en la ruta del acetato-mevalonato. Los aminoácidos son precursores de los alcaloides y los antibióticos peptídicos.

Todos los terpenos naturales proceden de unidades de acetato activo (acetil-Coenzima A), que se condensan y transforman para originar ácido mevalónico, unidad de cinco átomos de carbono, específica de la biosíntesis de terpenos.

La biosíntesis de las estructuras fenólicas se efectúa por dos rutas metabólicas esenciales: la del ácido shikímico y la del ácido malónico (conocida como la de los policétidos); la primera es mayoritaria en las plantas superiores y la segunda es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias.

La fenilalanina y la tirosina son intermediarios metabólicos en la biosíntesis de numerosos compuestos fenólicos, y el triptófano es el precursor de hormonas como el ácido indolacético.

Los alcaloides se forman por rutas biosintéticas muy diversas, a partir de muchos aminoácidos como la *L*-arginina, la *L*-lisina, la *L*-fenilalanina, *L*-triptófano y otros. Ocasionalmente derivan de la *L*-prolina, el ácido antranílico (precursor y producto de degradación del *L*-triptófano), el ácido nicotínico (formado a partir del ácido aspártico), raras veces del *L*-triptófano, restos de isopentenilo, isopentenil pirofosfato, acetilo proveniente del acetil-Coenzima A y de grupos metilo de *S*-adenosilmetionina. En la biosíntesis de los alcaloides se han reconocido tres tipos generales de reacción que determinan su estructura principal: la formación de bases de Schiff, la reacción de Mannich y el acoplamiento oxidativo de fenoles.²

2.2. Terpenos.

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40,000 moléculas diferentes). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Entre los metabolitos primarios se encuentran hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas).

Se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y genera también IPP. El isopentenil difosfato y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP) son los precursores activados en la biosíntesis de terpenos en reacciones de condensación catalizadas por prenil transferasas para dar lugar a difenilbifosfatos como geranil difosfato (GPP), precursor de monoterpenos, farnesil difosfato (FPP) precursor de sesquiterpenos y geranilgeranil difosfato (GGPP) precursor de diterpenos(Figura 3).⁸

RUTA DEL ÁCIDO MEVALÓNICO (CITOPLASMA)

RUTA DEL METILERITRITOL FOSFATO (CLOROPLASTO)

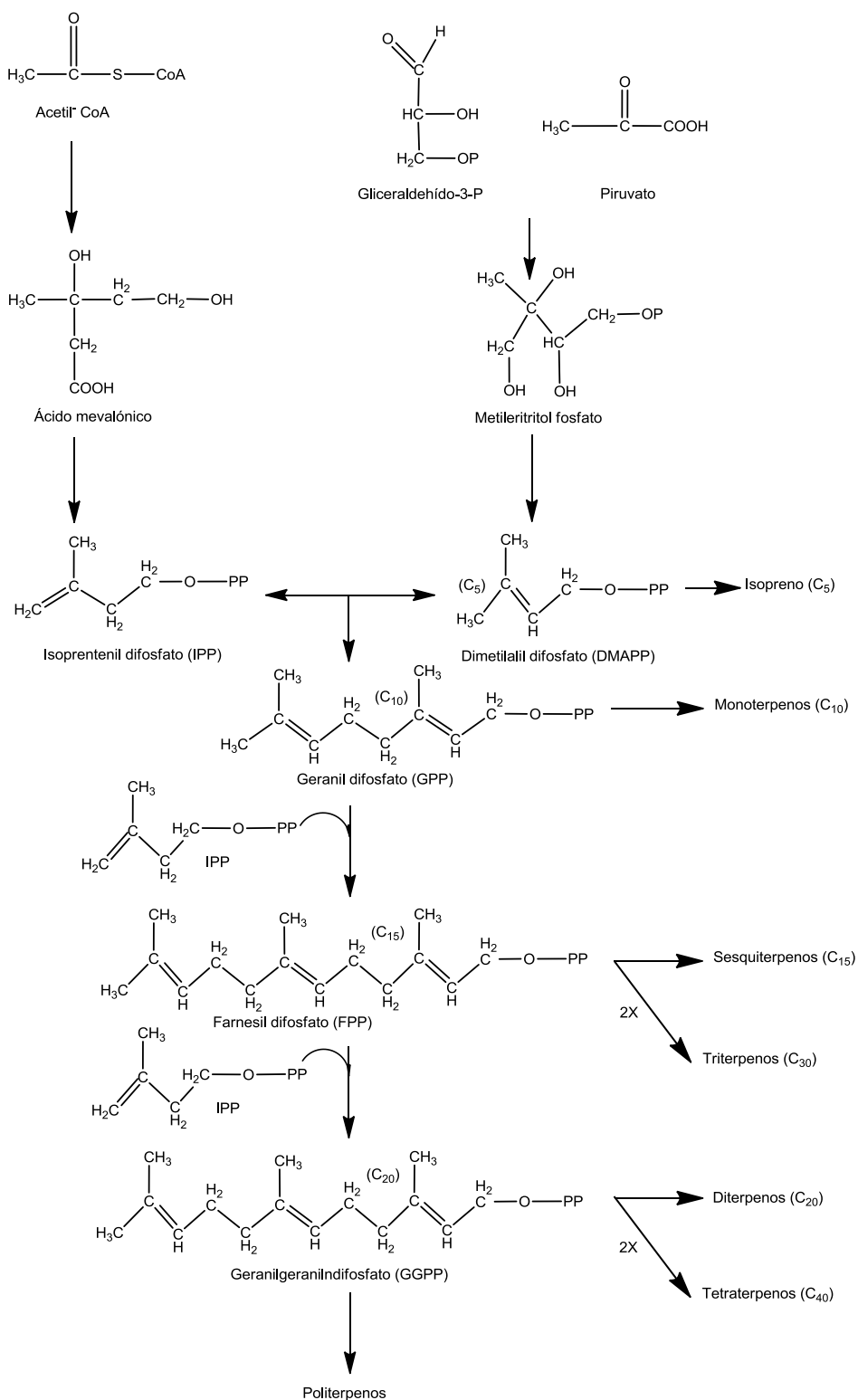


Figura 3. Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno que contienen.⁸

2.2.1 Clasificación de los terpenos.

Los terpenos, también llamados terpenoides o isoprenoides, tienen como unidad estructural fundamental al compuesto de cinco átomos de carbono llamado isopentenil pirofosfato. El nombre de isoprenoides fue dado porque éstos compuestos se descomponen a altas temperaturas y producen isopreno.

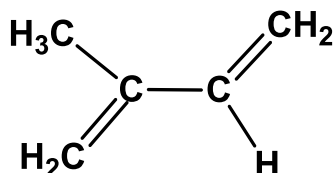


Figura 4. Estructura química del isopreno.⁹

De acuerdo al número de unidades de isopreno que contengan, los terpenos se clasifican en acíclicos, monoterpenos, con dos unidades; en sesquiterpenos, con tres; en diterpenos, con cuatro; en triterpenos, con seis; en tetraterpenos, con ocho. (Figura 3).

Dentro de cada tipo de terpenos existen compuestos muy importantes desde el punto de vista fisiológico y ecológico, pero también importantes desde el punto de vista antropocéntrico porque son sustancias con actividades biológicas muy diversas. Dentro de los monoterpenos se pueden destacar a los piretroides, con potente actividad insecticida, y a los constituyentes de los aceites esenciales y las resinas de las plantas, como el limoneno y el mentol (Figura 5).

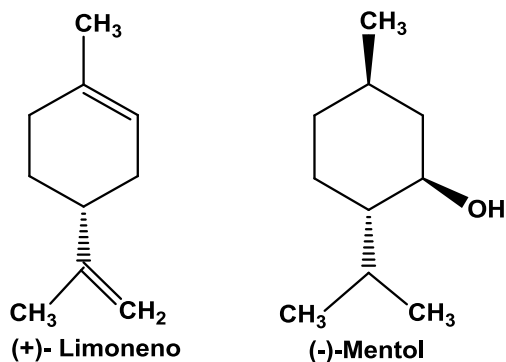


Figura 5. Estructuras químicas del limoneno y el mentol.^{10,11}

Las sesquiterpenlactonas, y el gossipol, un dímero, son ejemplos de sesquiterpenos. Como ejemplos de los diterpenos están el forbol, componente abundante en las resinas de las plantas leñosas y el ácido giberélico de cadena abierta que forma parte de la estructura de las clorofilas (Figura 6).

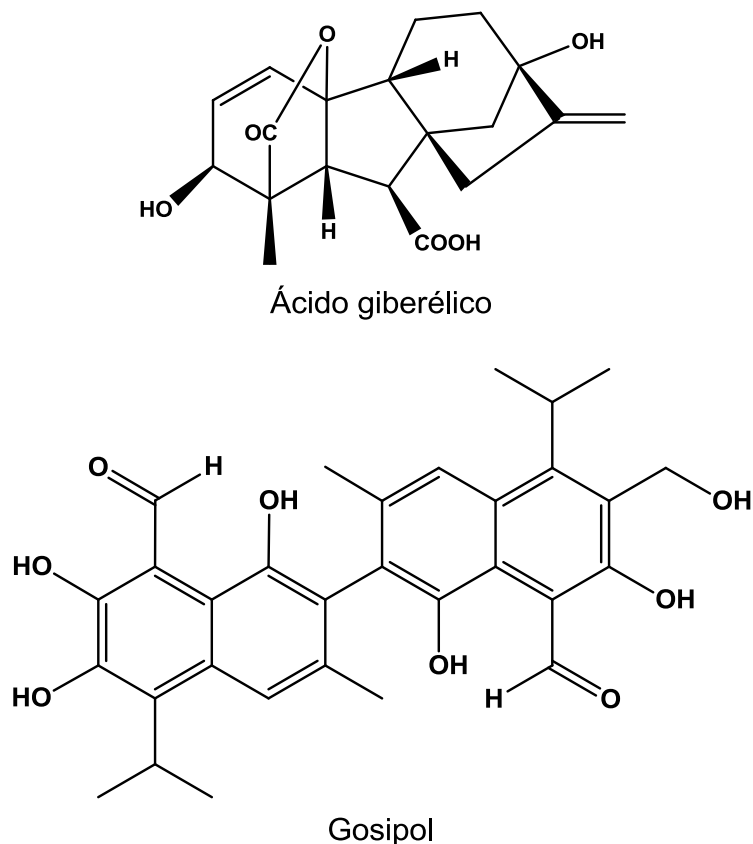


Figura 6. Estructura química del ácido giberélico y del gossipol.⁸

Las fitocedisonas, los cardenólidos o glicósidos cardíacos y las saponinas son importantes representantes de los triterpenos, estos compuestos tienen potentes actividades biológicas sobre los animales, desde insectos hasta mamíferos. En las plantas se encuentran esteroides y esterol, los esteroides que contienen un grupo alcohol, y es el caso de casi todos los esteroides vegetales, se denominan esterol. Los más abundantes en plantas son el estigmasterol y el sitosterol. (Figura 7).

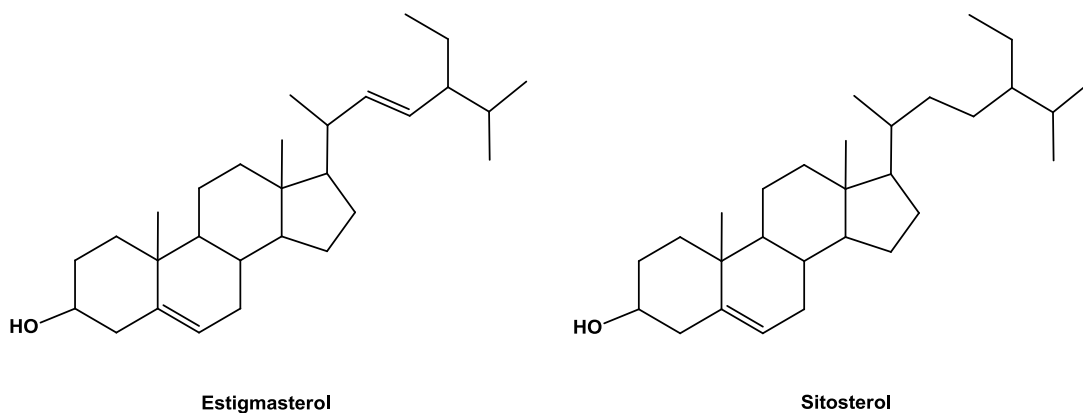


Figura 7. Estructuras químicas del estigmasterol y del sitosterol.¹²

Un polímero de 1500 a 15000 unidades de isopentenil es el elemento principal del hule en especies vegetales que sintetizan esta sustancia, de las cuales la más importante es el árbol del hule, *Hevea brasiliensis*.¹³

Los diterpenos se subdividen atendiendo al tipo de esqueleto carbonado, entre otros; como bicíclicos (tipo labdano y clerodano); tricíclicos (tipo primario, abietano, cassano, toratona y podocarpano); tetracíclicos (tipo kaurano, beyerano, atisano, gibberelano).¹⁴

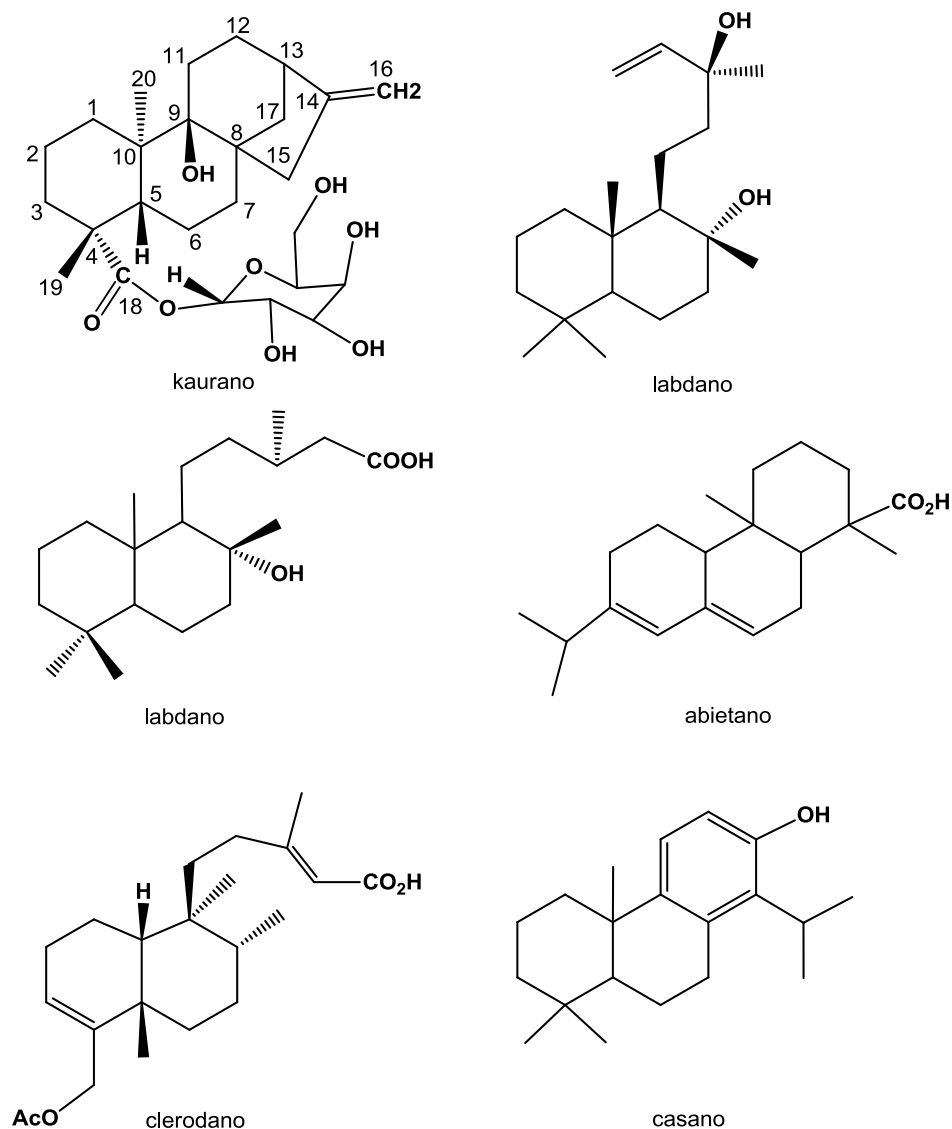


Figura 8. Ejemplos de esqueletos de diterpenos.¹⁵

2.2.2 Generalidades del género *Eupatorium*.

El género *Eupatorium* son hierbas generalmente perennes, arbustos o arbolitos bajos, hojas opuestas o en ocasiones alternas; capítulos homógamos, generalmente pequeños, dispuestos en inflorescencias corimbiformes o paniculiformes, rara vez solitarios; involucro cilíndrico, turbinado, campanulado o hemisférico, sus brácteas en número variable, dispuestas en dos o más series,

imbricadas, de longitud similar y entonces a menudo con cálculo, otras veces desiguales y graduadas; receptáculo plano, convexo o cónico, desnudo; flores pocas o numerosas, todas hermafroditas, blancas, rosadas, moradas o azulosas; corola tubulosa, tubo corto, limbo brevemente pentalobulado o pentadentado, anteras con la base obtusa y el apéndice del conectivo reducido o bien desarrollado; ramas del estilo largas y sobresalientes, lineares o claviformes, a veces coloreadas, su ápice obtuso, sin pelos y cubierto de numerosas papilas cortas; aquenios prismáticos de ápice truncado, con cuatro a seis costillas bien definidas, glabros o pilosos, vilano de pocas o numerosas cerdas capilares persistentes y libres de la base.¹⁵

El género *Eupatorium* pertenece a la familia *Asteraceae* tribu Eupatorieae, subtribu Eupatoriinae. La familia *Asteraceae* es utilizada en la República Mexicana ya sea como alimento o empleada en la medicina tradicional, a continuación se muestran algunos ejemplos de especies de la familia, el nombre con el cual se identifica mediante su nombre común, usos como planta medicinal, compuestos que han sido aislados y finalmente su distribución.

Tabla 1. Ejemplos de plantas medicinales de la familia Asteraceae y sus aplicaciones.¹⁶

ESPECIE	NOMBRE COMÚN	USO EN MEDICINA TRADICIONAL	COMPUESTOS AISLADOS	DISTRIBUCIÓN
<i>Conyza filaginoides</i>	Zacachichic Prodigiosa	Aperitivo Antiemético Diurético Eupéptico Analgésico Antitusígeno Antipirético Carminativo Astringente	Esteroides Triterpenos Sesquiterpenos Flavonoides Hidrocarburos	Hidalgo Morelos Michoacán Guanajuato Edo. de México
<i>Perezia hebeclada</i>, <i>Acourtia hebeclada</i>	Coapatli Hierba del diablo Cola de zorra Zazamaca	Laxante	Benzoquinonas y derivados de Benzoquinonas	Morelos Edo. de México
<i>Tagetes lucida</i>	Pericón Santa María Jericón Hierbanís	Antidiarreico Antidisentérico Antiemético Antirreumático Antiasmático Antifoida Antihelmíntico Enemagogo	Terpenos Cumarinas Fenilpropanoides	Chiapas Morelos Jalisco Oaxaca Puebla Edo. de México Guerrero Michoacán

El género *Eupatorium* fue reconocida por Teofrasto aproximadamente en el 300 a. C pero las contribuciones más importantes al conocimiento y sistemática de la familia comienzan con el francés Henri Cassini a través de numerosas publicaciones que incluyen descripciones detalladas de la morfología estableciendo 19 tribus en la familia, posteriormente Lessing redujo a 8 el número de tribus y Candolle a 3.

Otros contribuyentes al conocimiento de la familia fueron George Bentham y Joseph Dalton Hooker los cuales en su obra "*Genera plantarum*" establecieron 13 tribus que son las usadas hoy en día. Pero los trabajos de los botánicos estadounidenses Harold Robinson y Robert M. King con su obra cambiaron la tendencia de la clasificación de la familia ya que esta consistía en un mayor énfasis en el uso de caracteres anatómicos, citológicos y químicos en lugar de los macrocarácteres para tomar decisiones taxonómicas, también publicaron numerosos artículos científicos en los que dividieron el género *Eupatorium* que en ese momento tenía cerca de 600 especies en géneros menores. Uno de los aportes más significativos a la clasificación y filogenia de las asteráceas llegó con los estudios moleculares de ADN de Jansen y Palmer en 1987. Estos análisis van en paralelo con el avance de los análisis moleculares que llevaron en años recientes a la disgregación en numerosas tribus y subfamilias.¹⁷

El género *Eupatorium* representa el 10% de la familia Asteraceae y comprende aproximadamente 2000 especies distribuidas en regiones templadas y subtropicales de Europa, África, Asia, Oceanía y en América principalmente en el centro y el sur.

México ocupa el cuarto lugar entre los países considerados con megadiversidad y posee cerca del 10% del total de las especies conocidas, con un gran número de endemismos.

En México el género *Eupatorium* se ha registrado en Chiapas, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas.¹⁸

El estudio del género *Eupatorium* en el estado de Michoacán comienza en el siglo XIX con el botánico C. Pringle quien colectó la planta en 1861 en Pátzcuaro, Michoacán, este es el primer registro de la presencia del género en la zona posteriormente se hicieron estudios que reportaron la amplia distribución debido a la variada geografía, tipos de suelos y abundantes climas e índice de

humedad apropiados para el crecimiento y reproducción de la planta. Actualmente la podemos encontrar en regiones con clima templado subhúmedo con lluvias en verano. De los 113 municipios que conforman el Estado de Michoacán en 42 de ellos no ha sido reportado la presencia de este género.¹⁹

Dentro de los 71 municipios en los que el género ha sido reportado se encuentra principalmente en: Acuitzio, Álvaro Obregón, Angangueo, Aporo, Charapan, Charo, Cherán, Chilchota, Chucándiro, Coeneo, Contepec, Copándaro, Cuitzeo, Epitacio Huerta, Erongarícuaro, Hidalgo, Huandacareo, Huaniqueo, Indaparapeo, Irimbo, Jiménez, Jiquilpan, Jungapeo, Lagunillas, Maravatio, Marcos Castellanos, Morelia, Morelos, Nahuatzen, Ocampo, Paracho, Pátzcuaro, Purépero, Puruándiro, Queréndaro, Quiroga, Santa Ana Maya, Senguio, Tangamandapio, Tangancícuaro, Tarímbaro, Tingambato, Tlazazalca, Tuxpán, Tzintzuntzan, Villamar, Zacapu, Zinapécuaro y Zitácuaro.^{20,21}

2.2.3. Generalidades de *Piptotrix areolare*.

Arbusto de hasta de 3 m de altura; ramas arqueado-péndulas, cilíndricas, de ± 3 mm de diámetro hacia la parte superior, café-amarillentas, vellosas; hojas opuestas, peciolo de 8 a 15 mm de largo, vellosos, lámina ovado-lanceolada, de 7 a 12 cm de largo por 3 a 5 cm de ancho, ápice largamente acuminado, borde aserrado, base redondeada, haz areolado, con pelos cortos, envés reticulado, pubescente, con glóbulos resinosos, 3 de los 5 nervios que salen desde la base son más prominentes; numerosos capítulos de unos 8 mm de largo dispuestos en racimos de corimbos axilares más cortos que las hojas y en corimbos compuestos terminales, pedicelos vellosos; involucro campanulado, de ± 4 mm de largo por ± 5 mm de ancho, cubriendo la mitad del largo de las corolas, sus brácteas dispuestas en 2 series de aproximadamente la misma longitud, lineares, agudas, las externas algo más pubescentes que las internas, con pocos glóbulos resinosos y un nervio central; flores ± 20 ; corola de ± 4.5 mm de largo, blanca, glabra; aquenio de ± 1.5 mm de largo, piloso sobre todo en las costillas y en el ápice, vilano de la mitad del

largo de la corola, cerdas blancas. Se ha encontrado entre 2500 y 2700 m.s.n.m, en sitios con bosques de encino y bosque mesófilo. Se conoce de Durango a Guatemala.⁵

En un estudio fitoquímico de *P. areolare* realizado en 1986 se aisló y caracterizó el areolal, de los extractos hexánicos de raíz obtenidos por maceración, mediante cromatografía en columna eluída con mezclas de hexano-benceno, obteniéndolo en forma de una miel color amarillo claro.²²

2.3. Generalidades de oximas.

Una oxima recibe los nombres particulares de aldoxima o cetoximas, según deriven de aldehídos o de cetonas, cuya fórmula general es $RR'C=NOH$, donde R es un residuo orgánico y R' puede ser un grupo orgánico o hidrógeno. El término oxima data del siglo XIX, posiblemente de la contracción de las palabras oxígeno e imina.²³

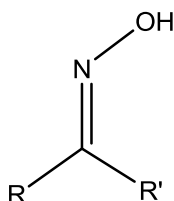


Figura 9. Fórmula general de una oxima.

Las oximas son compuestos anfóteros. Son bases muy débiles que al reaccionar con ácidos minerales fuertes forman sales que se hidrolizan fácilmente con agua. Las oximas son también ácidos débiles que suelen disolverse en álcalis acuosos, precipitándolas de nuevo con dióxido de carbono.²⁴

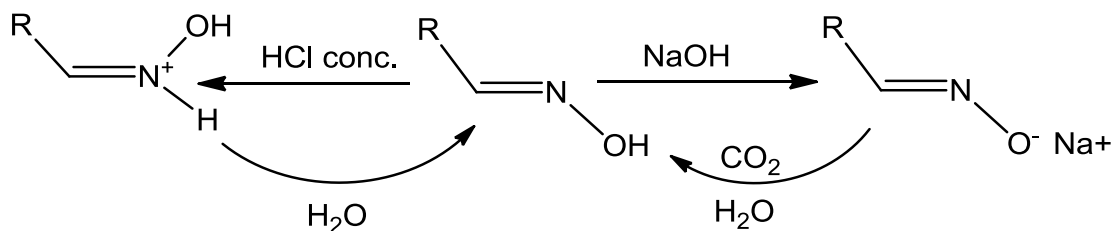


Figura 10. Reacción de una oxima en medio básico y ácido.²⁴

Convencionalmente las oximas son preparadas de compuestos carbonílicos con clorhidrato de hidroxilamina. Las condiciones experimentales dependen sobre todo de la naturaleza de las materias primas y la basicidad del medio de reacción; por lo general, las reacciones proceden suavemente en pH cercanos a neutros, a través de un ataque nucleofílico del par electrónico del nitrógeno al carbono electrofílico del grupo carbonílico. La condensación de una amina primaria con compuestos carbonílicos (aldehídos y/o cetonas) fue reportada primeramente por Schiff en 1864 y desde entonces un gran número de estas reacciones se han realizado.²⁴ Las oximas son intermediarios útiles en síntesis orgánica, altamente cristalinas y son usadas no solo para la protección, caracterización y purificación de compuestos carbonílicos, si no también pueden ser usadas como intermediarios para la preparación de amidas, nitronas, α -sulfiniloximas, nitrilos y aminas. la preparación de amidas, nitronas, α -sulfinil oximas, nitrilos y aminas.²⁵

También son empleadas como precursores en rearrreglos de Beckmann, para la síntesis de oxazoles, oxazinas, y para otros heterociclos. El interés de dichos compuestos radica en que son excelentes sintones para posteriores reacciones con imidazoles; ya que los imidazoles sustituidos y/o ciclados tienen un potencial uso como agentes antibacterianos y como agentes antimicóticos.

2.3.1. Estereoisomería de oximas.

En los compuestos con nitrógeno unido por dobles enlaces, como es el caso de las oximas, estos forman un ángulo de tal manera, que la presencia de sustituyentes diferentes sobre el átomo de carbono puede dar lugar a la existencia de isómeros *cis* y *trans*, los cuales en este tipo de sistemas se distinguen también como forma *syn* y forma *anti*.^{26,27}

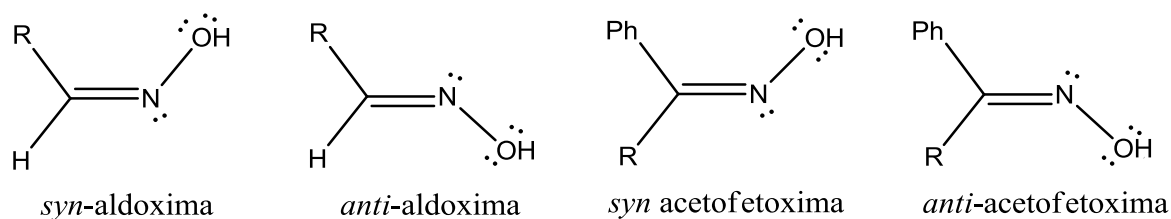


Figura 11. Isómeros de aldo y cetoximas.²⁷

2.3.2. Métodos de formación de oximas.

Convencionalmente las oximas se preparan a partir de compuestos carbonílicos con clorhidrato de hidroxilamina en reflujo de una solución alcohólica en presencia de una base.²⁸

2.3.3. Mecanismo de reacción.

El ataque nucleofílico a la cetona o aldehído por el par de electrones no compartido del nitrógeno de la hidroxilamina origina un intermediario tetrahédrico polar. Luego un protón del nitrógeno migra al oxígeno, con lo que se produce el amino-alcohol (carbinolamina) que resulta neutro, el catalizador ácido protona al oxígeno hidroxílico, el par de electrones no compartido del nitrógeno expulsa agua, con lo cual se produce un ión imino. La pérdida de H del nitrógeno da el producto neutro, generando la oxima.²⁹

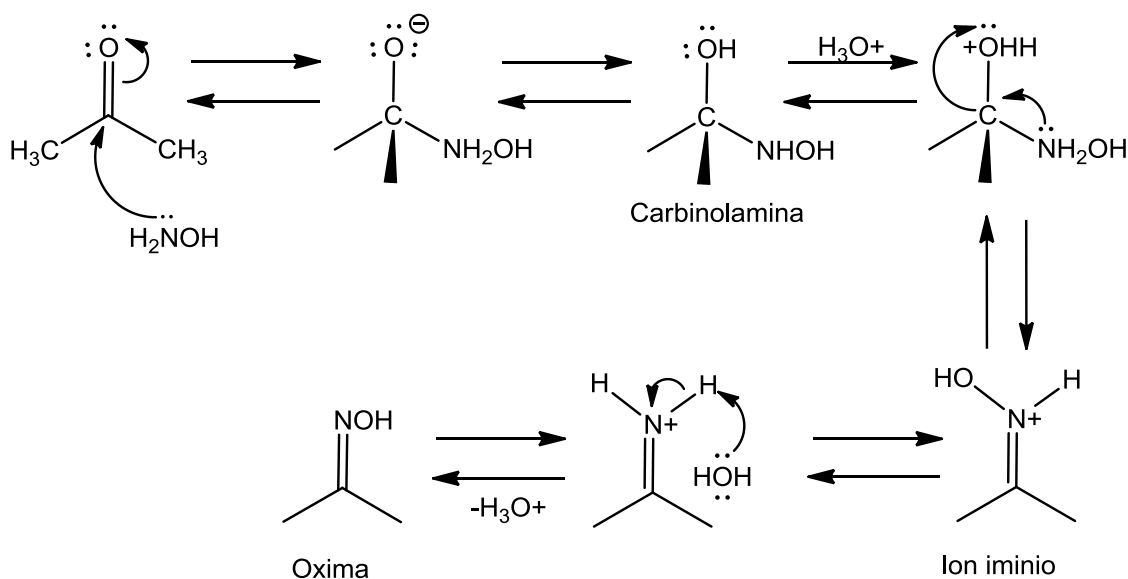


Figura 12. Mecanismo general de formación de oximas con hidroxilamina.

La formación de la oxima es lenta y ocurre con un pH alto o pH bajo, pero alcanza su velocidad máxima con un pH débilmente ácido alrededor de 4-5.²⁹

2.3.4. Espectroscopía de infrarrojo en oximas.

Los espectros de IR proporcionan un amplio campo de información acerca de los detalles estructurales de los compuestos orgánicos, la espectroscopía infrarroja abarca la detección e identificación de virtualmente todos los grupos funcionales porque ellos muestran absorciones específicas y características en la región del infrarrojo.

La espectroscopía IR detecta los cambios en las vibraciones que ocurren cuando una molécula absorbe energía electromagnética en la región IR del espectro electromagnético.

Los posibles momentos vibracionales de una molécula dependen de dos cosas: la masa de los átomos que forman el enlace dado y la naturaleza del enlace en sí mismo, esto es, su tensión de enlace.

Cuando se agregan cetonas y aldehídos a soluciones acuosas de hidroxilamina a pH de 7, rápidamente desaparece la banda de estiramiento IR carbonílico; luego aparece lentamente la absorción IR correspondiente a la oxima. Estos aumentos de absorción subsiguientes pueden acelerarse por adición de ácidos.

La oximas presentan bandas características: la debida al grupo O-H libre y asociado entre $3450\text{--}3030\text{ cm}^{-1}$ ($2.9\text{--}3.3\text{ }\mu\text{m}$) y la debida al grupo imino que es una banda débil de estiramiento de enlace $\text{C}=\text{N}$ en $1695\text{--}1585\text{ cm}^{-1}$ ($5.9\text{--}6.3\text{ }\mu\text{m}$). En oximas alifáticas, la banda es próxima a 1665 cm^{-1} ($6\text{ }\mu\text{m}$). En compuestos cíclicos de 5 miembros, la banda aparece más cercana a 1695 cm^{-1} ($5.9\text{ }\mu\text{m}$).

En el espectro de un aromático que tiene unido el grupo imino ($\text{C}=\text{N}$), esta banda cuando aparece está posicionada junto con la del anillo aromático cerca de $1615\text{--}1585\text{ cm}^{-1}$ ($6.2\text{--}6.3\text{ }\mu\text{m}$). La vibración del estiramiento N-O absorbe fuertemente entre $1055\text{--}870\text{ cm}^{-1}$ ($9.5\text{--}11.5\text{ }\mu\text{m}$) y a veces es dividida en varias bandas.³⁰

2.4. Microorganismos.

Se han reportado estudios en los cuales las oximas y sus derivados han presentado actividad bactericida.³¹ Los microorganismos son los seres más primitivos y numerosos que existen en la Tierra, colonizan todo ambiente: suelo, agua y aire, participan de forma vital en todos los ecosistemas y están en interacción continua con las plantas, los animales y el hombre. Los microorganismos son clave para el funcionamiento de los sistemas biológicos.

Se agrupan en dos categorías: procarióticos y eucarióticos. En la primera están las archaeas y las bacterias, mientras que en la segunda se encuentran hongos, algas y protozoarios.³²

El cuerpo humano presenta una gran superficie cutánea y mucosas por lo que entra en contacto con el medio ambiente, en esta superficie residen microorganismos con diferentes características, algunos de estos conviven con el huésped sin causarle enfermedad denominados flora normal humana, otros son agentes patógenos que pueden ocasionar serias complicaciones en el organismo, uno de estos es el género *Shigella* el cual se incluye en la familia Enterobacteriaceae; está constituido por bacilos cortos Gram negativos sin agrupación, que miden de 0.7 μm x 3 μm ; son inmóviles, no esporulan ni presentan cápsula se encuentra estrechamente relacionada con el género *Escherichia*, por sus propiedades bioquímicas, serológicas y por similitudes genéticas. Se caracteriza por no fermentar la lactosa, ser inmóvil, no produce lisina descarboxilasa y raramente produce gas a partir de hidratos de carbono.³³

La primera mención de una especie del género *Klebsiella* fue realizada por von Frisch en 1881, que se refirió a un bacilo capsulado observado en muestras de pacientes con rinoscleroma. El género *Klebsiella* fue denominado así por Trevisan en 1885, en honor al microbiólogo alemán Edwin Klebs (1834-1913). La especie tipo de este género es *Klebsiella pneumoniae*, que fue descrita por Schroeter en 1886, y por Trevisan en 1887. El género *Klebsiella* está formado por

bacilos Gram negativos, anaeróbicos facultativos y oxidasa negativos. Pertenecen pues a la familia *Enterobacteriaceae*, familia formada por una gran cantidad de especies bacterianas. Además de los rasgos ya mencionados, las bacterias del género *Klebsiella* se caracterizan por ser generalmente capsuladas, no móviles, productoras de la enzima lisina descarboxilasa pero no de la enzima ornitina descarboxilasa, y normalmente positivas a la prueba de Voges-Proskauer. En humanos portadores *K. pneumoniae* se encuentra en las vías respiratorias superiores y en el tracto intestinal.³⁴

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*, está formada por bacilos no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios-anaerobios facultativos, capaces de crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin agregado de NaCl, fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivos, oxidasa negativos, reductores de nitratos a nitritos.

Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea.³⁵

Staphylococcus aureus es anaerobio facultativo, pertenece a la familia *Staphylococcaceae*, género *Staphylococcus*, especie *S. aureus*, está formado por cocos Gram positivos, de aproximadamente 1 µm de diámetro, que se agrupan en racimos, sus colonias son circulares, prominentes, brillantes, 1-2 µm, pigmentos (blanco-amarillo dorado), no son esporulados y no tienen capsula salvo excepciones, son inmóviles.

Es un agente etiológico de diversas patologías, incluyendo infecciones de piel y tejidos blandos, bacteremia, endocarditis, infección del SNC y del tracto genitourinario.³⁶

2.4.1. Antibiograma.

Es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de una bacteria a un grupo de antibióticos, el método de difusión en agar es un ensayo donde se enfrenta la bacteria seleccionada e inoculada sobre la superficie de un medio semisólido, a soluciones de diferentes antibióticos absorbidos en discos de papel filtro.

La sensibilidad de un organismo a determinados antimicrobianos ha sido definida como la menor concentración del antimicrobiano en $\mu\text{g/ml}$, que evita el crecimiento *in vitro* del microbio y se refiere como la concentración mínima inhibitoria (CMI).³⁷

En la actualidad se cuenta con diversos métodos para evaluar la actividad de sustancias de orígenes naturales y sintéticos, uno de estos es el método de difusión en agar según Kirby-Bauer.

2.4.2. Método de difusión en agar por el método Kirby-Bauer.

Es un estudio de susceptibilidad por difusión en disco, el cual tiene una cantidad específica de antimicrobiano. El antimicrobiano difunde desde el disco al medio de cultivo produciendo una zona de inhibición en la cual una concentración crítica de antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano. La zona de inhibición es medida y se relaciona inversamente con la CMI.⁶

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los

microorganismos es el medio de cultivo y el crecimiento de los microorganismos se denomina cultivo. Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante.

2.4.3. Composición de los medios de cultivo.

Los constituyentes más utilizados en la composición de los medios de cultivo son:

- Agar, comercialmente se presenta en gránulos y polvos, la concentración en la que se encuentra en los medios de cultivo, dependerá del uso que quiera darse al medio.
- Peptona, es un producto de composición variable, obtenido generalmente de la hidrólisis ácida o enzimática de las proteínas vegetales o animales.
- Extracto de carne, contiene bases orgánicas solubles, productos de degradación de las proteínas, vitaminas y minerales.
- Extracto de levadura, se consigue a partir de levadura de pan o de cerveza y es una fuente de aminoácidos y vitaminas del complejo B.
- Sangre, la más utilizada es la de sangre de carnero, tiene que estar libre de agentes antimicrobianos para evitar la inhibición el crecimiento de los microorganismos.

- Plasma, se utiliza para emplear la actividad coagulasa de las bacterias, se emplea plasma humano o de conejo.
- Suero, se prepara a partir de sangre recolectada sin adición de anticoagulante, eliminando el líquido que se separa cuando se contrae el coágulo.
- Bilis, contiene varios ácidos biliares, como compuestos conjugados con aminoácidos, bilirrubina y biliverdina.
- Sales biliares, inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas y bacilos en forma de esporas, sin afectar el desarrollo de los bacilos entéricos Gram negativos.
- Gelatina, proteína obtenida mediante extracción de material colágeno a partir de tejidos animales.
- Carbohidratos se adicionan por dos motivos fundamentales: para incrementar el valor nutritivo del medio y para detectar reacciones de fermentación de los microorganismos que ayuden a identificarlos.

El medio de cultivo a emplear ha de ser aquel que permita un buen desarrollo del microorganismo cuya sensibilidad se determina y además no debe ejercer ningún efecto inhibitor sobre la actividad antibacteriana de los antibióticos o quimioterápicos ensayados.³⁸

3. OBJETIVOS.

3.1. Objetivo General.

Explorar los metabolitos secundarios mayoritarios de los extractos de raíz de *Piptotrix areolare*, además de determinar de forma preliminar su actividad antimicrobiana ante cepas de diferentes tipos de bacterias patógenas al humano.

3.2. Objetivos Específicos.

- Aislar el areolal del extracto hexánico y de cloruro de metileno de la raíz de *Piptotrix areolare*.
- Actualizar los espectros de Resonancia Magnética Nuclear del areolal en una y dos dimensiones y compararlos con la literatura.
- Realizar la obtención de la oxima con clorhidrato de hidroxilamina usando como materia prima el areolal.
- Determinar de forma preliminar la susceptibilidad de las bacterias: *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnei* y *Staphylococcus aureus*, ante el areolal por el método de Kirby-Bauer.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Aislamiento del areolal.

Un lote de 130 g de raíz de la planta *Piptotrix areolare* colectada en octubre de 2010 en la carretera Tiripetío-Nocupétaro a la altura del kilómetro 35, con coordenadas N 19° 20.645', W 101° 21.348' y 2509 m.s.n.m., previamente secada a la sombra, se sometió a maceración a temperatura ambiente usando como disolvente 500 mL de hexano durante ocho días por tres veces, posteriormente se maceró con cloruro de metileno (CH_2Cl_2).



Figura 13. Maceración de la raíz de *Piptotrix areolare*.

Transcurridos los 8 días de maceración el extracto obtenido se filtró y concentró a sequedad en el rotavapor.



Figura 14. Concentración del extracto.

Después de la evaporación del disolvente se obtuvieron 2 g de extracto de color amarillo claro, con un rendimiento del 1.5%. La extracción hexánica fue repetida en 3 ocasiones.



Figura 15. Cromatografía en columna.

En las fracciones eluidas en la polaridad de Hexano-AcOEt (19:1) se obtuvieron unos cristales de color blanco con punto de fusión de 50-52 °C, este compuesto fue caracterizado por resonancia magnética nuclear. En el espectro de RMN ^1H a 400 MHz (Figura 17) se observó en 10.00 ppm una señal simple correspondiente al hidrógeno aldehídico H-7, en 7.65 ppm se encontró una señal doble con constante de acoplamiento de 16.4 Hz correspondiente al protón H-3", en 6.38 ppm se observó otra señal doble con constante de acoplamiento también de 16.4 Hz debida al protón H-2", ambas señales corresponden al sistema AX originado por el doble enlace en posición α al carbonilo del grupo cinamoilo, cabe mencionar que en la región de 7.80 a 7.27 ppm se encontraron traslapadas las ocho señales de protón de los anillos aromáticos, en 4.73 y 4.39 ppm se observaron dos señales dobles con constante de acoplamiento de 12.3 Hz de un sistema AB correspondiente al metileno base del cinamoilo, otro sistema AB pero con constantes de acoplamiento de 5.1 Hz se distinguió en 2.88 y 3.15 ppm, en esta ocasión este sistema resultó de la interacción de los protones del metileno base de oxígeno del anillo de oxirano. En 2.92 ppm se observó una señal séptuple con una constante de acoplamiento de 7.2 Hz para el metino base de metilos del grupo isobutirato, en 1.37 ppm se observó una señal doble intensa que integra

para seis protones con una constante de acoplamiento de 7.2 Hz características de los metilos del isobutirato, (Tabla 2). Después de analizar el espectro de RMN de ^1H se realizó una búsqueda bibliográfica con el fin de verificar si había información en la literatura al respecto, encontrándose que había sido reportado en 1986; esta molécula es un derivado del timol conocido como areolal (Figura 16).²²

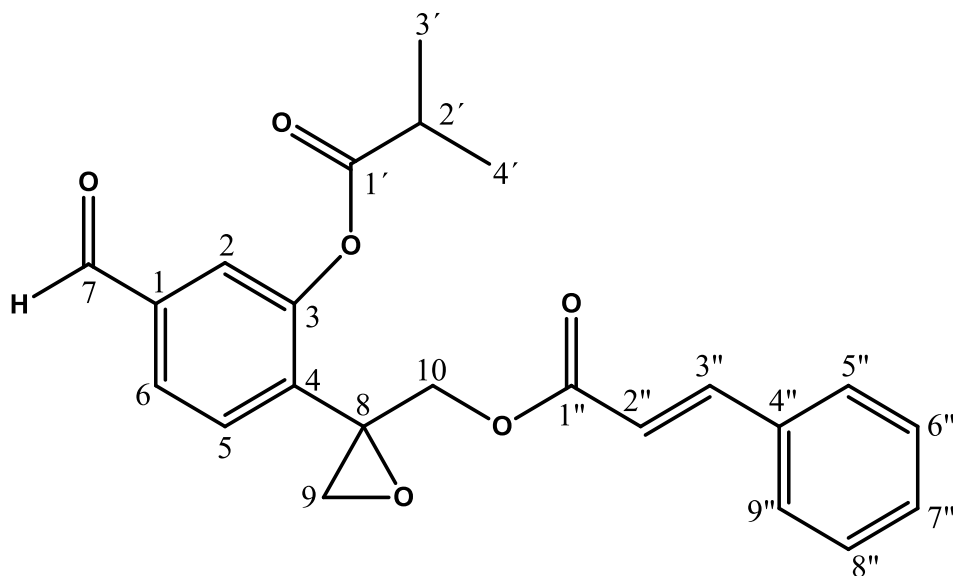


Figura 16. Estructura del areolal aislado de *Piptotrix areolare*.

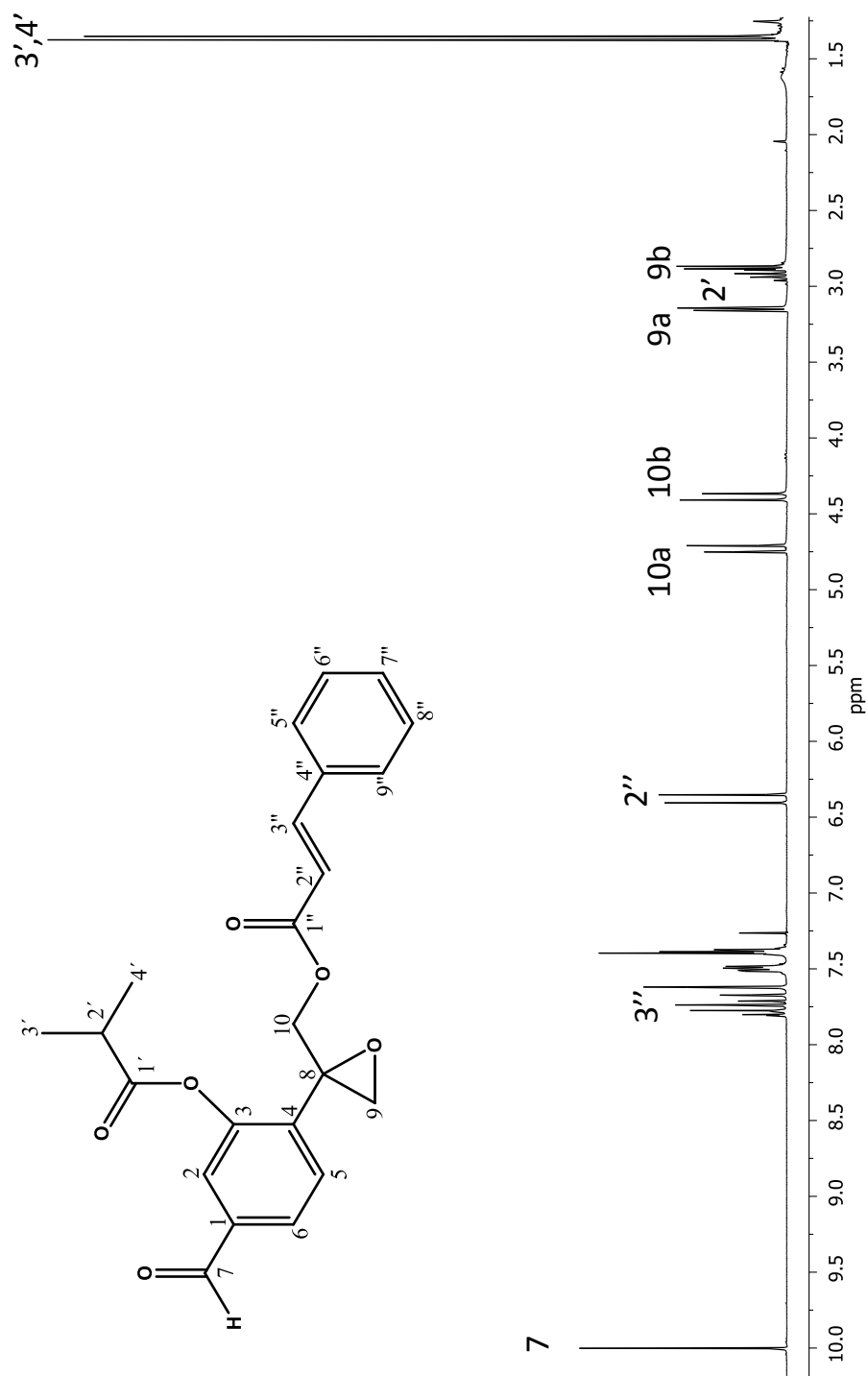


Figura 17. Espectro de RMN de ^1H del areolal.

En el espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz (Figura 18) se observaron 3 señales para carbonilo, una en 190.7 ppm correspondiente al grupo aldehído (C-7), las otras dos señales correspondieron a los carbonilos de los ésteres, en 175.0 ppm para el carbonilo del isobutirato (C-1') y en 166.2 ppm para el carbonilo del cinamoilo (C-1"). Se observaron 12 señales correspondientes a carbonos aromáticos (Figura 19); en 135.6 ppm estaba la señal correspondiente al carbono cuaternario C-4, en 128.9 ppm se observó una señal con el doble de intensidad debido a la sobreposición de los carbonos C-6" y C-8" del grupo cinamoilo, en 123.3 ppm se observó la señal correspondiente al carbono C-2. En 145.8 y 116.9 ppm se localizaron las señales correspondientes al doble enlace α al carbonilo del grupo cinamoilo, carbonos C-3" y C-2", en 65.3 ppm se observó la señal del metileno base de cinamato C-10, en 57.0 ppm se presentó la señal del único carbono quiral de la molécula, es decir, el carbono base del anillo de oxirano C-8. En 51.1 ppm se observó una señal que corresponde al metileno C-9 del epóxido; en 34.2 se presentó la señal del carbono metínico base de los metilos de isobutirato; finalmente, a pesar de la cercanía se pudieron distinguir los dos metilos de isobutirato, uno en 19.0 ppm y el otro en 18.9 ppm, (Tabla 3).

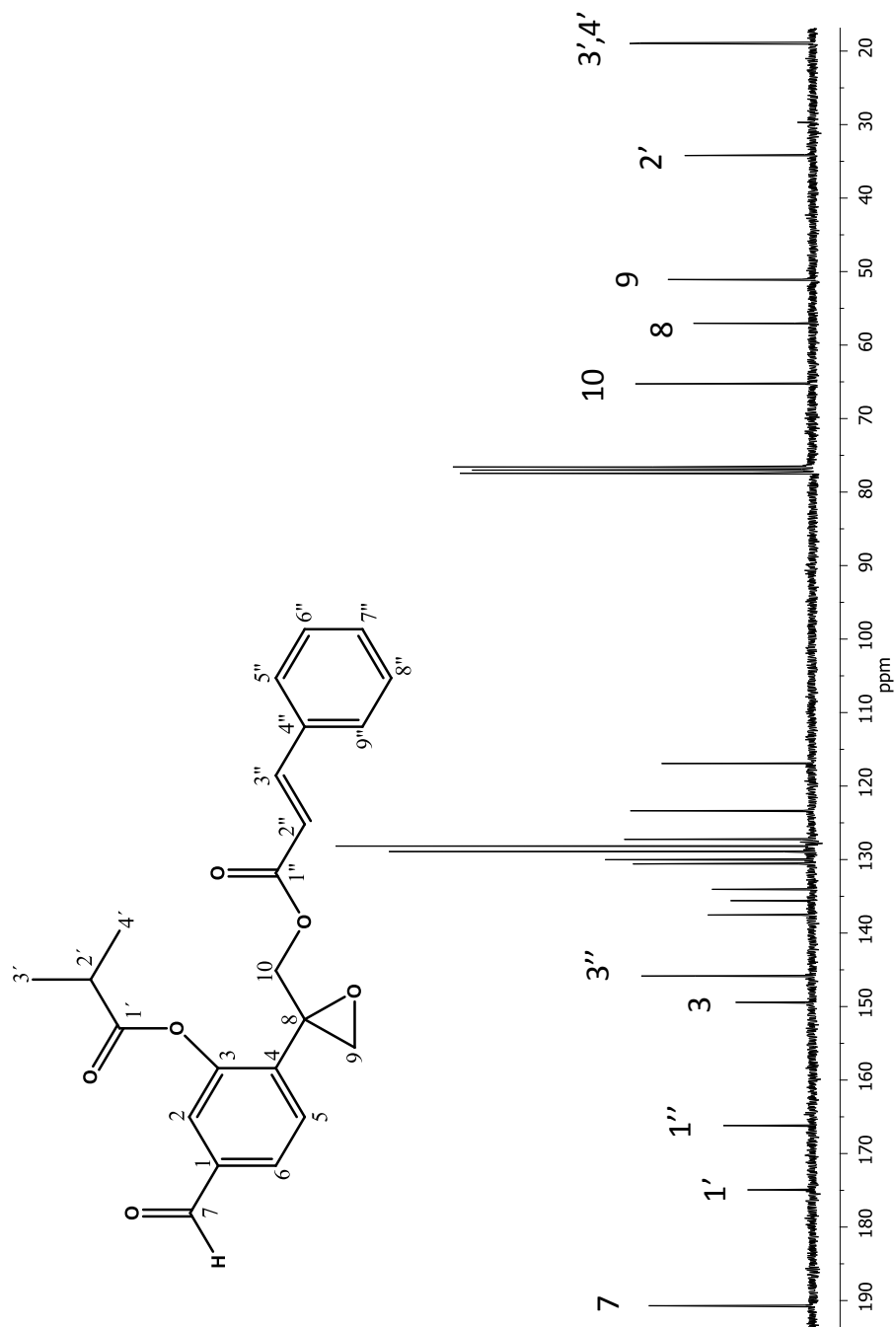


Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C del areolal.

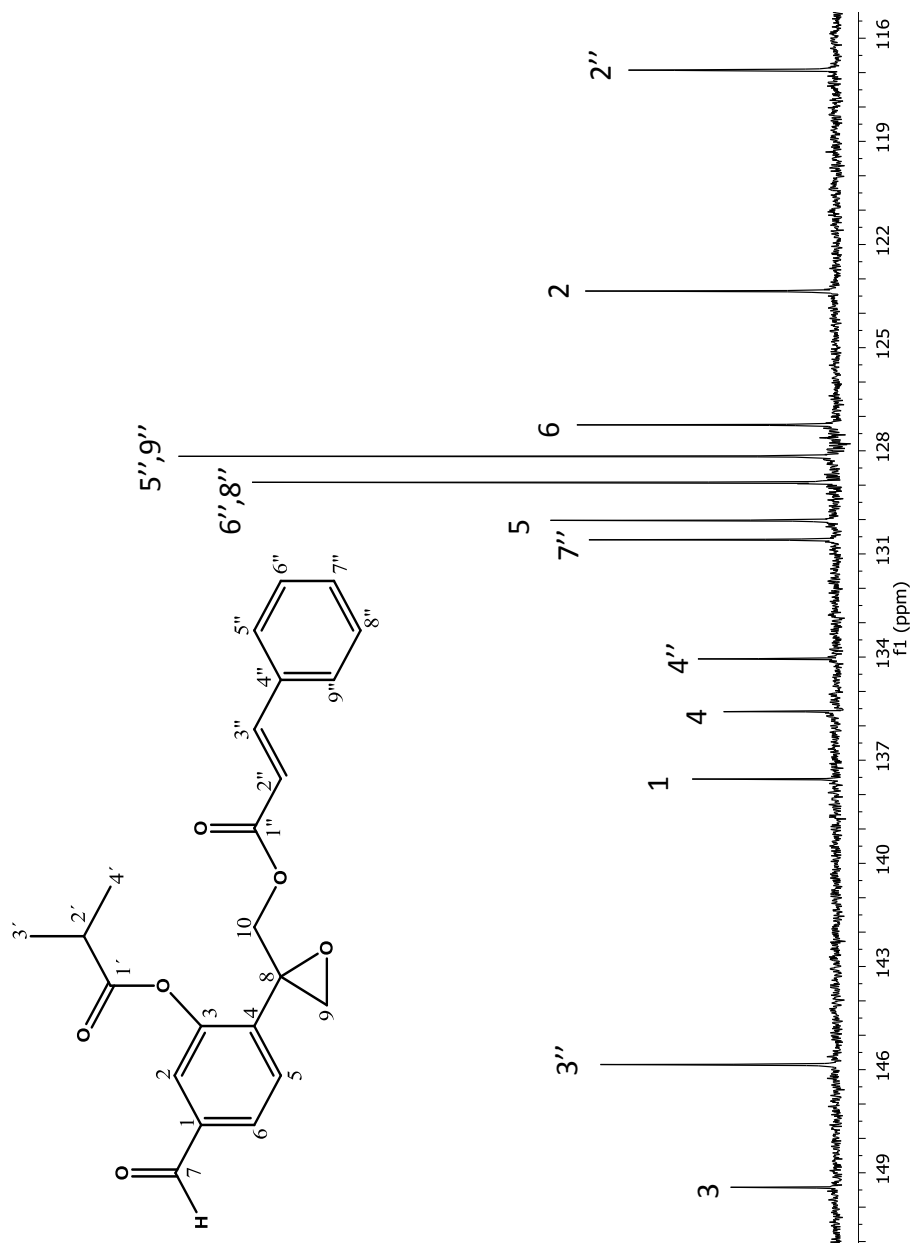


Figura 19. Ampliación del espectro de RMN de ^{13}C del areolal en la región 149.0 a 116.0 ppm.

En el espectro bidimensional de correlación heteronuclear (HETCOR), Figura 20, se apreciaron las correspondencias entre los hidrógenos y carbonos del areolal. Siendo evidente la correlación del carbonilo de aldehído C-7 con la señal simple de 10.00 ppm (H-7) característica de este grupo funcional. Asimismo, se observaron las correlaciones del sistema AX entre el protón H-2'' con el carbono C-2'' y el protón H-3'' con el carbono C-3''. De igual forma las correlaciones de los metilenos que originan los sistemas AB fueron claras. La señal séptuple del metino del isobutirato H-2' correlacionó de forma precisa con la señal de 34.2 ppm perteneciente al carbono C-2'. La señal doble que integra para seis protones de 1.37 ppm mostró correlación con las señales de los carbonos C-3' y C-4', sin dejar lugar a duda que se trata de un grupo isobutirato.

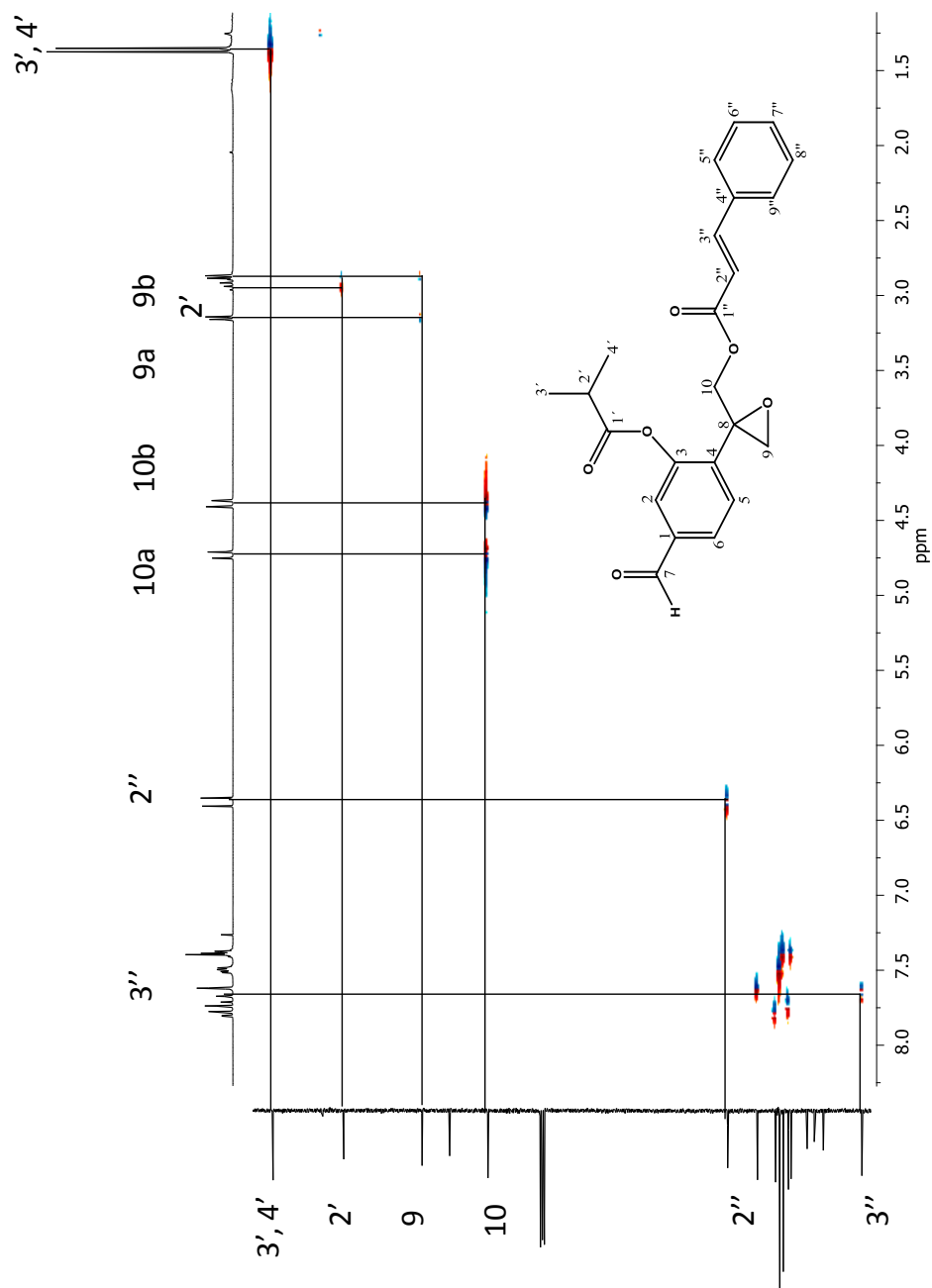


Figura 20. Ampliación del espectro HETCOR del areolal en la región 8.00 a 1.50

El areolal se sometió a cristalizaciones sucesivas en hexano de las cuales se obtuvieron cristales monoclinicos adecuados para ser sometidos a difracción de rayos X. Con la estructura obtenida se pudo apreciar el acomodo espacial de los átomos del areolal, se observa que los anillos aromáticos se encuentran alejados entre sí prácticamente en una posición perpendicular. Un dato interesante es la orientación del anillo de oxirano, donde el metileno se encuentra hacia atrás, mostrando la estereoquímica del único centro estereogénico de la molécula.

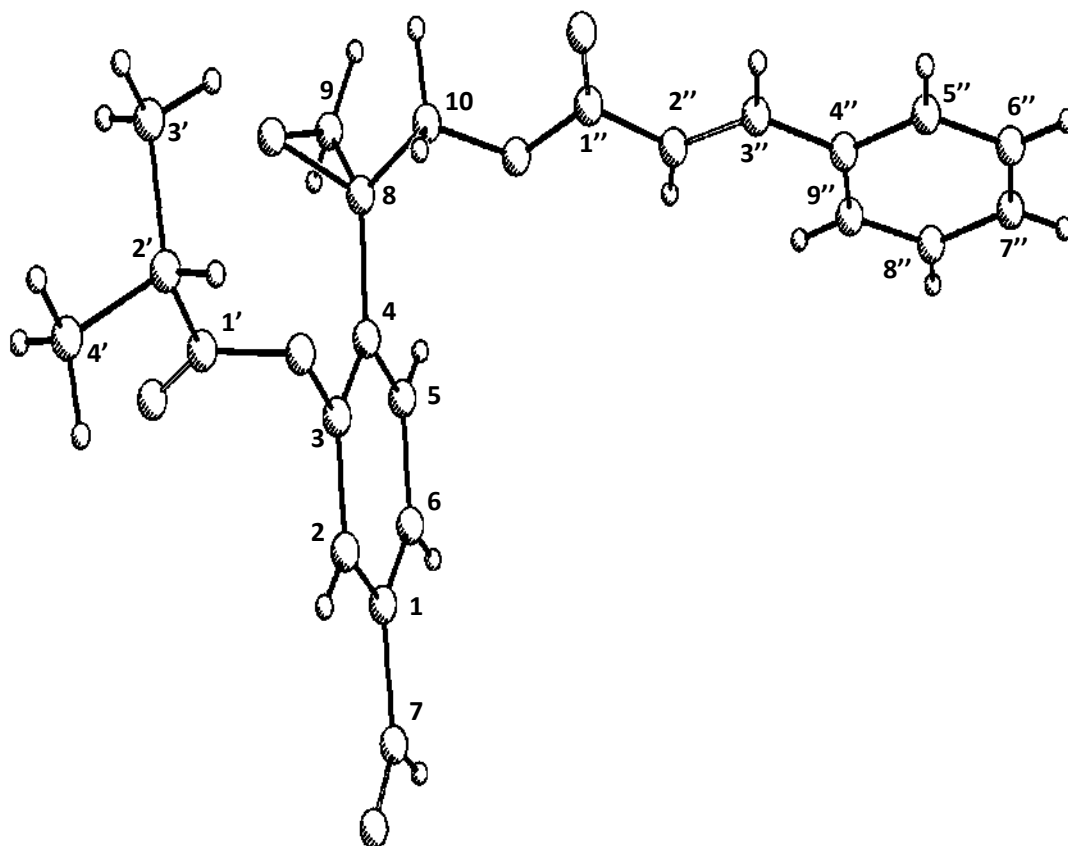
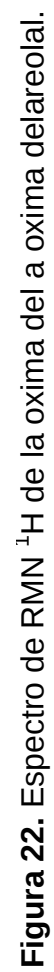


Figura 21. Estructura obtenida por difracción de rayos X del areolal.

4.2. Asignación de la oxima del areolal.

Una vez obtenido el areolal de forma pura se procedió a realizar la preparación de la oxima correspondiente empleando clorhidrato de hidroxilamina en medio básico, piridina; el producto de reacción se purificó mediante cromatografía en columna obteniendo de las fracciones eluidas con Hexano-CH₂Cl₂ (9:1) una miel color verde claro. En su espectro de RMN de ¹H a 400 MHz (Figura 22), la oxima mostró el corrimiento de la señal simple de 10.00 ppm (aldehído) a 8.10 ppm, ahora señal simple correspondiente al protón H-7 del carbono del grupo imino, en 7.66 ppm se observó la señal doble con constante de acoplamiento de 15.8 Hz correspondiente al protón vinílico H-3" del cinamoilo, también la señal doble correspondiente al protón H-2" en 6.40 ppm presentó una constante de acoplamiento de 15.8 Hz, ambas señales del sistema AX de la molécula; en 4.69 y 4.40 ppm presento dos señales dobles ($J = 12.3$ Hz) del sistema AB originado por los protones del metileno base de éster, en 3.12 y 2.88 ppm se observó el otro sistema AB con constantes de acoplamiento de 5.3 Hz de los protones del metileno del epóxido. En 2.90 ppm, como era esperado se observó la señal séptuple con constante de acoplamiento de 7.0 Hz para el protón H-2' del metino del isobutirato, finalmente en 1.35 ppm se localizó la señal doble con constante de acoplamiento de 7.0 Hz de los metilos del isobutirato, (Tabla 2).



Su espectro de RMN de ^{13}C a 100 Mz (Figura 23) exhibió 2 señales para carbonilos, una en 175.1 ppm correspondiente a C-1' del isobutirato, y la del cinamato en 166.3; otra señal interesante fue la que se observó en 149.0 ppm, esta señal se deba al corrimiento del protón H-7 del grupo imino con respecto al de la materia prima. Del mismo modo se presentaron las 12 señales correspondientes a los carbonos aromáticos (Figura 24). En 145.7 y 117 ppm se localizaron las señales de los carbonos C-3" y C-2" que corresponden al sistema AX, en 65.3 ppm se observó la señal del carbono C-10 base de cinamato, en 56.9 ppm se observó la señal para el carbono cuaternario C-8. Asimismo, en 51.0 ppm se apreció la señal que corresponde al carbono metilénico del anillo de oxirano; para finalizar con las señales de los metilos del isobutirato en 18.9 y 18.8 ppm, (Tabla 3).

En su espectro de correlación homonuclear (COSY) Figura 25 se observó el acoplamiento de la señal doble de 1.35 ppm que integra para seis protones con la señal séptuple de 2.90 ppm del isobutirato. También se presentó la correlación existente entre las señales dobles del sistema AB que corresponde a los hidrógenos del metileno base de cinamato. Así como la correlación entre los protones del sistema AB debido al metileno del anillo de oxirano.

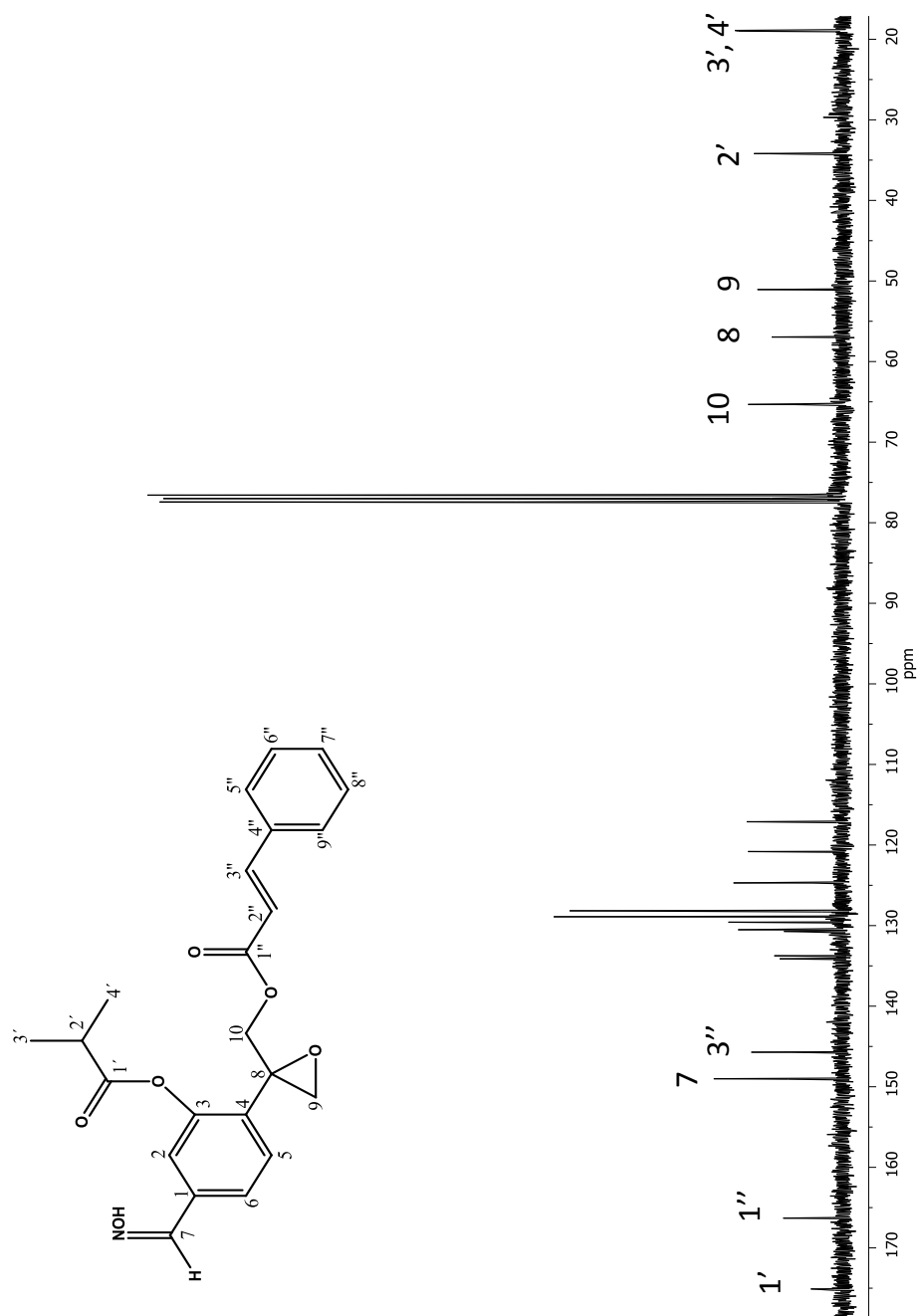


Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C de la oxima del areolal.

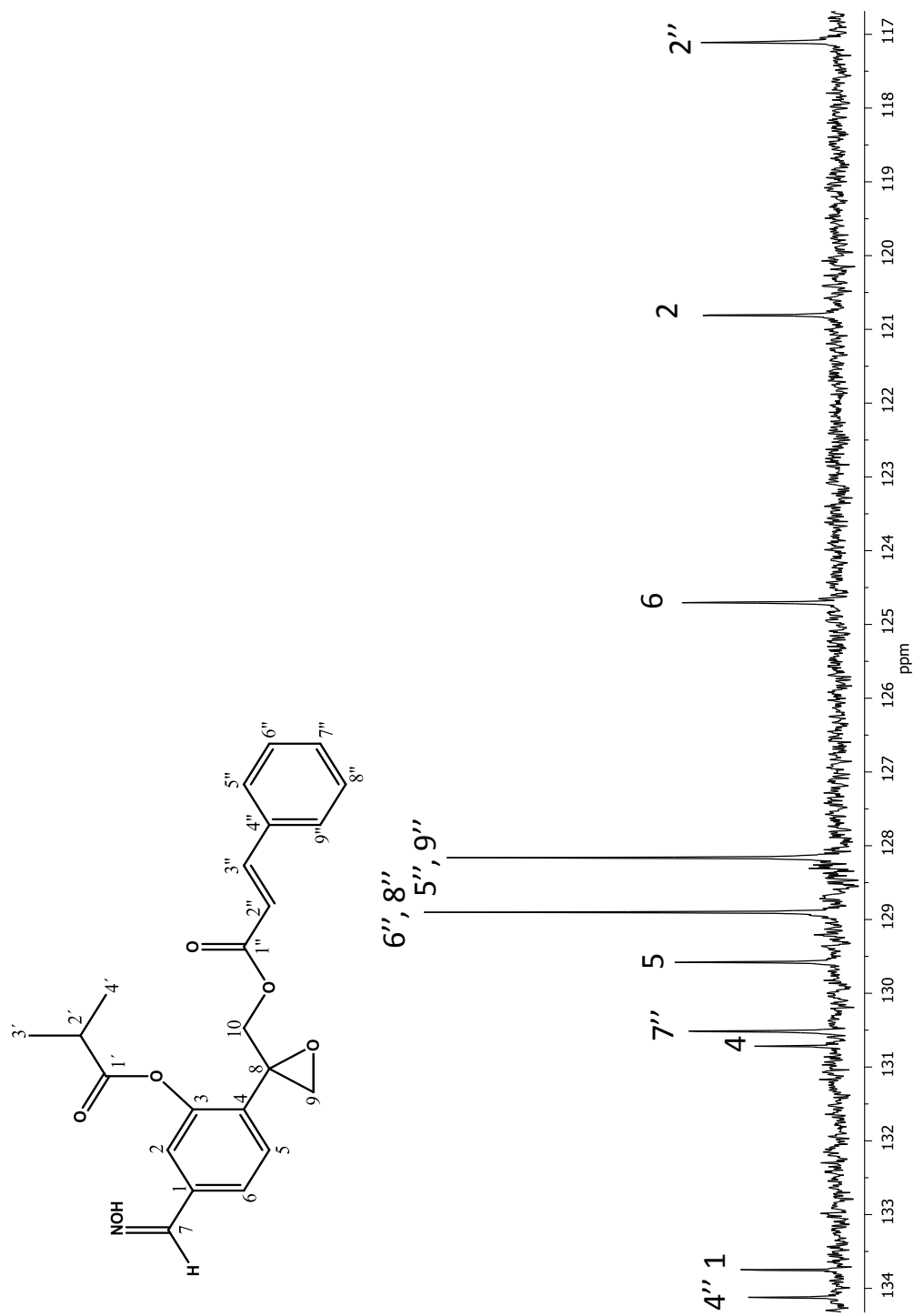


Figura 24. Ampliación del espectro de RMN ^{13}C de la oxima del areolal en la región 134.0 a 117.0 ppm.

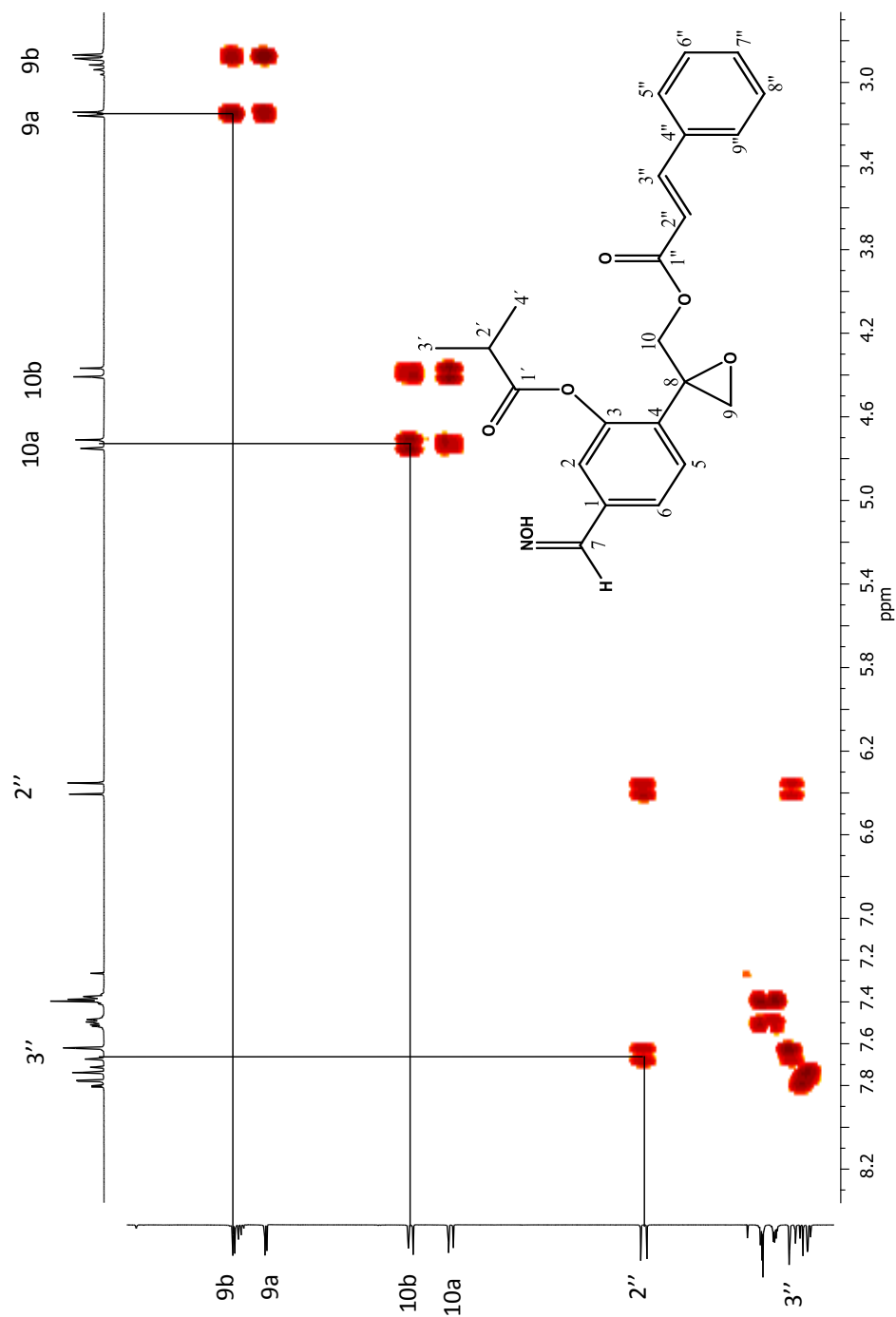


Figura 25. Ampliación del espectro COSY de la oxima del areolal en la región 8.20 a 3.00 ppm.

Tabla 2. Comparación de datos espectroscópicos de RMN de ^1H de areolal con respecto a los reportados en la literatura.

H	Experimental	Literatura ²²	Oxima
2	7.63, m	7.3-7.6* m	7.30 m
5	7.73, m	7.3-7.6* m	7.56 m
6	7.80, m	7.3-7.6* m	7.47 m
7	10.00 s	10.03 s	8.10 s
9a	3.15, d, $J = 5.1$ Hz	3.14, d, $J = 5$ Hz	3.12, d, $J = 5.3$ Hz
9b	2.88, d, $J = 5.1$ Hz	2.87, d, $J = 5$ Hz	2.87, d, $J = 5.3$ Hz
10a	4.73, d, $J = 12.3$ Hz	4.73, d, $J = 12$ Hz	4.69, d, $J = 12.3$ Hz
10b	4.39, d, $J = 12.3$ Hz	4.40, d, $J = 12$ Hz	4.40, d, $J = 12.3$ Hz
2'	2.92, heptet, $J = 7.2$ Hz	2.90, heptet, $J = 7$ Hz	2.90, heptet, $J = 7.0$ Hz
3'	1.37, d, $J = 7.2$ Hz	1.36, d, $J = 7$ Hz	1.35, d, $J = 7.0$ Hz
4'	1.37, d, $J = 7.2$ Hz	1.36, d, $J = 7$ Hz	1.35, d, $J = 7.0$ Hz
2''	6.38, d, $J = 16.4$ Hz	6.37, d, $J = 16$ Hz	6.40, d, $J = 15.8$ Hz
3''	7.65, d, $J = 16.4$ Hz	7.65, d, $J = 16$ Hz	7.66, d, $J = 15.8$ Hz
5''	7.50 m	7.3-7.6* m	7.50 m
6''	7.27 m	7.3-7.6* m	7.40 m
7''	7.39 m	7.3-7.6* m	7.40 m
8''	7.27 m	7.3-7.6* m	7.40 m
9''	7.50 m	7.3-7.6* m	7.50 m

* Reportados traslapados dentro del rango de 7.3-7.6 ppm.

Tabla 3. Comparación de datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C de areolal con respecto a los reportados en la literatura.

C	Experimental	Literatura²²	Oxima
1	137.5	137.2	133.7
2	123.3	122.9	128.8
3	149.4	149.1	149.0
4	135.6	132.5	130.7
5	130.0	129.6	129.5
6	127.2	126.7	124.7
7	190.7	190.2	149.0
8	57.0	56.8	56.9
9	51.1	50.7	51.0
10	65.3	65.9	65.3
1'	175.0	174.4	175.1
2'	34.2	33.9	34.1
3'	19.0	18.6	18.9
4'	18.9	18.6	18.8
1''	166.2	165.5	166.3
2''	116.9	116.6	117.0
3''	145.8	145.3	145.7
4''	134.0	133.6	134.1
5''	128.2*	128.5	128.1*
6''	128.9*	127.7	128.9*
7''	130.6	133.6	130.5
8''	128.9*	127.7	128.9*
9''	128.2*	128.5	128.1*

* Señales sobrepuestas.

4.3. Actividad antimicrobiana.

Por otro lado, se determinó la actividad antimicrobiana por triplicado en cajas Petri empleando medio de cultivo agar Mueller Hinton, las cuales fueron inoculadas mediante un hisopo con la suspensión del mo de prueba, repitiendo la inoculación tres veces, además de rotar la placa con el fin de obtener una dispersión uniforme del inóculo en toda la superficie para obtener una capa homogénea de bacterias, posteriormente se dejó secar el inóculo de 3 a 5 min.



Figura 26.Siembra del microorganismo.

Los sensidiscos fueron impregnados de acuerdo con las técnicas descritas en la literatura³⁹ con 140 μ L de la solución de 150 mg/mL de areolal los sensidiscos se colocaron sobre el agar utilizando pinzas estériles oprimiéndolos suavemente para asegurar un buen contacto con el medio de cultivo cuidando que su distancia a la pared de la placa fuera de 15 mm y entre ellos de 30 mm, posteriormente se incubaron a 37 °C durante 24 h.



Figura 27. Areolal y timol empleados en el ensayo antimicrobiano.

Al terminar la incubación fue medida la zona de inhibición en mm producida por el areolal (Tabla 4) considerándose positivos los que presentaron un diámetro mayor a 6 mm y negativos los que no presentaron halo de inhibición. Con el objetivo de comparar el efecto antimicrobiano del areolal se decidió utilizar timol J.T.Baker grado reactivo dentro de los ensayos de actividad ya que es conocido por su poder desinfectante y fungicida, los antibióticos empleados como controles positivos de inhibición fueron la amoxicilina con ácido clavulánico (AMC) para *Staphylococcus aureus*, ceftriaxona (CRO) para *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* y *Shigella sonnei*, y fosfomicina (FOS) para *Escherichia coli*. En el estudio se pudo observar que el areolal presentó una elevada sensibilidad contra *Shigella sonnei*, esto se corrobora con la dimensión de el halo de inhibición, en cambio contra la bacteria *Klebsiella oxytoca* el halo de inhibición fue de menor proporción, sin embargo fue un resultado significativo.

Tabla 4. Ensayo antimicrobiano del areolal empleando la técnica de antibiograma, inhibición en mm.

Microorganismo	Areolal	Timol	CRO	FOS	AMC
<i>Escherichia coli</i>	13	25	–	25	–
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	30	17	–	–
<i>Klebsiella oxytoca</i>	10	22	22	–	–
<i>Shigella sonnei</i>	20	25	29	–	–
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	25	–	–	20

5. CONCLUSIÓN.

Se aisló el areolal de la raíz de *Piptotrix areolare*, siendo la primera vez que este producto natural se logra obtener en forma de cristales blancos de p.f. 50-52 °C adecuados para su estudio por difracción de rayos X, por lo cual fue posible conocer la distribución espacial de los átomos de la molécula. Otro dato interesante fue la preparación de la oxima del areolal, ya que si se parte de cristales la purificación por cromatografía en columna prácticamente no es necesaria. Sin embargo, si se utiliza el areolal en forma de miel, el producto no se puede obtener de forma satisfactoria con rendimientos similares cuando se emplean cristales para su preparación. Por otro lado, la actividad antimicrobiana del areolal quedo manifiesta aunque su potencia fue menor a la del timol. (Tabla 4)

6. PERSPECTIVAS.

- Las oximas son precursores en rearrreglos de Beckman por lo cual se podría realizar una síntesis de oxazoles, y otros heterociclos ya que son excelentes sintones para posteriores reacciones con imidazoles; debido a que estos tienen un potencial uso como agentes antibacterianos y como agentes antimicóticos.
- Debido a que el antibiograma se realizó de forma preliminar, se debe realizar el estudio rigurosamente para determinar su concentración mínima inhibitoria (MIC), ya que esta se relaciona inversamente con la zona de inhibición.
- Realizar modificaciones químicas puntuales al areolal con el afán de aumentar su actividad biológica.

7. PARTE EXPERIMENTAL.

Las separaciones cromatográficas se realizaron empleando gel de sílice Merck (70-230 mesh ASTM) y Alúmina neutra 90 Merck (70-230 mesh ASTM), para las cromatografías en placa se usó TLC sílica gel 60 F₂₇₄ de 20 cm.

El punto de fusión se determinó en un aparato de Fisher Johns y no esta corregido.

Los espectros de resonancia magnética nuclear a 400 MHz para ¹H y para ¹³C a 100 MHz, así como los experimentos bidimensionales se determinaron en el equipo Varian Mercury Plus 400 del IIQB-UMSNH. Los experimentos HMBC y HSQC se determinaron en un equipo Varian Mercury 300 en el Departamento de Química del CINVESTAV-IPN, dentro de los trabajos en colaboración que se realizan con el Dr. Carlos M. Cerda-García-Rojas y el Dr. Pedro Joseph-Nathan.

En todos los casos se empleó cloroformo deuterado como disolvente y tetrametilsilano como referencia interna.

El análisis por difracción de rayos X del producto natural que cristalizó de forma adecuada se llevó a cabo en un difractómetro Bruker Smart 6000 CCD a 298 K equipado con radiación de $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). Los datos colectados se resolvieron con el programa SHELXS-97.

7.1. Obtención del extracto.

130 g de raíz de *Piptotrix areolare* colectada en octubre de 2010 en la carretera Tiripetío-Nocupétaro a la altura del kilómetro 35, con coordenadas N $19^{\circ} 20.645'$, W $101^{\circ} 21.348'$ y 2509 m.s.n.m., previamente secada a la sombra se maceró durante ocho días a temperatura ambiente usando como disolvente 500 mL de hexano. El macerado se filtró y se concentró hasta sequedad en rotavapor, obteniéndose 2 g de extracto con un rendimiento de 1.5%. La extracción del extracto hexánico fue repetida en 3 ocasiones, posteriormente se realizó la extracción con CH_2Cl_2 y MeOH.

7.2. Aislamiento del areolal.

2 g de extracto hexánico se colocó en una columna de vidrio usando como fase estacionaria gel de sílice, fue eluída con Hx y Hx-AcOEt (19:1). Las fracciones se evaporaron a temperatura ambiente, y por medio de cromatografía en capa fina se determinó su semejanza por su factor de retención (R_f) empleando una mezcla de Hx-AcOEt (7:3), usando como reveladores luz ultravioleta y sulfato cérico amoniacal con lo que se identificó a las fracciones que contenían areolal un rendimiento del 43%. $[\alpha]_{589} +0.5$, $[\alpha]_{578} +0.5$, $[\alpha]_{546} +0.6$, $[\alpha]_{436} +2.6$ (c 2.17, CHCl_3); IR (CHCl_3) V_{max} 1759, 1704, 1637 y 1169 cm^{-1} .

El mismo procedimiento de aislamiento se realizó con los extractos de CH_2Cl_2 , ya que este también contenía areolal.

7.3. Obtención de la oxima del areolal.

300 mg de areolal se disolvieron en 1 mL de piridina y se adicionó 52.9 mg de clorhidrato de hidroxilamina, la mezcla se dejó reaccionar durante una hora en agitación a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo, la mezcla se vertió sobre hielo-agua y se extrajo con cloruro de metileno. La fase orgánica se lavó con ácido clorhídrico al 10%, agua, solución saturada de bicarbonato de sodio y agua; secándose sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. Obteniéndose 271 mg de la oxima de areolal en forma de miel color verde claro. El crudo de reacción se sometió a purificación mediante cromatografía en columna usando como fase estacionaria alúmina y fue eluída con mezclas de Hx-CH₂Cl₂ en forma creciente de polaridad, obteniéndose 240 mg en un rendimiento del 80%. $[\alpha]_{589} +0.7$, $[\alpha]_{578} +0.5$, $[\alpha]_{546} +0.5$, (c 0.9, CHCl₃); IR (CHCl₃) V_{max} 3574, 3379, 1756, 1712, 1637 y 1167 cm⁻¹.

7.4. Determinación de la actividad antimicrobiana.

Para la preparación del medio de cultivo se utilizaron 200 mL de agua destilada y 7.6 g de agar Mueller-Hinton, se hidrató de 10 a 15 min, posteriormente se calentó hasta ebullición de 1 a 2 min; a continuación se enfrió a 45-50 °C. En la preparación del caldo Mueller-Hinton se utilizaron 25 ml de agua destilada y 3 g de caldo, se hidrató de 10 a 15 min, posteriormente se calentó hasta ebullición de 1 a 2 min, a continuación se enfrió a 45-50 °C. Los sensidiscos se hicieron de papel filtro de poro medio de 6.5 mm de diámetro.

Asimismo, se esterilizó el material de vidrio, los sensidiscos, las puntas para micropipeta, el agar y caldo Mueller Hinton ya preparados, cubriéndolos con papel kraft en autoclave a temperatura de 121 °C y 15 libras de presión durante 20 minutos, se enfrió el caldo y se vertió en los tubos de ensaye con suficiente cantidad para obtener 5 cm de longitud posteriormente los tubos de ensaye se enfriaron durante 30 min y se taparon con algodón, todo esto en zona estéril. El

agar se vertió en las cajas de Petri con suficiente cantidad para obtener una capa de 4 mm de espesor dejándolas parcialmente cerradas para evitar la formación de humedad por condensación, se enfriaron y solidificaron durante 30 min, también en zona estéril.

Los compuestos a evaluar (150 mg/mL) se disolvieron en cloroformo fueron disueltos del areolal puro. Los sensidiscos fueron impregnados con 140 µL cada uno. Los sensidiscos comerciales utilizados fueron amoxicilina con ácido clavulánico (AMC) 30 µg, ceftriaxona (CRO) 30 µg, fosfomicina (FOS) 50 µg.

Los microorganismos seleccionados para la evaluación antimicrobiana fueron:

- *Escherichia coli*
- *Klebsiella oxytoca*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Shigella sonnei*
- *Staphylococcus aureus*

Al terminar la incubación fue medida la zona de inhibición en mm producida por los compuestos que la presentaron. (Tabla 4) Las cepas en forma pura fueron obtenidas de la clínica MexFam, además se contó con el apoyo técnico de la Q.F.B. Margarita Rodríguez.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Schlapfer, Loraine, Mendoza-Espinoza J. Alberto. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Asociación farmacéutica Mexicana*. **2010**, 41,18-27.
2. D. E. García. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. Pastos y forrajes. **2004**, 27,1.
3. OMS definiciones. Disponible en línea http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/oms.
4. García G., Del Río T. Rosa. E., Guzmán R.M., Martínez G.Ml., Thomas R. F. Scior. Estudios preliminares sobre el efecto analgésico del extracto de hojas de *Ageratina glabrata* en dos modelos térmicos de dolor agudo. *Asociación farmacéutica Mexicana*. **2011**, 42, 1,45-51.
5. Rzedowski, G. C.; Rzedowski, J. **2005**. *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2a. edición, Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, 1406.
6. Jacqueline, Sánchez, Jesús M. Feris. Antibiógramas: utilidad y Limitaciones. *arch dom ped*. **1998**.34,3.
7. Imagen el pueblo demanda salud. Diego Rivera. Tomado de: <http://armandoasis.files.wordpress.com/2011/04/mural-completo1.jpg>
8. A. G. Adolfo. P. U. C .Elena. Metabolismo secundario de plantas. Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid Reduca (Biología). *Serie Fisiología Vegetal*. **2009** 2, 3,119-145.
9. Estructura química del isopropeno. Modificado de: <http://temasdebioquimica.wordpress.com/2008/08/01/biosintesis-de-colesterol-iii/>
10. Estructura química del limoneno. Modificado de: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6422/04Capitulo2.pdf?sequence=4>.
11. Estructura química del mentol. Modificado de: http://es.123rf.com/photo_12416070_molecula-de-mentol-modelo-3d.html.
12. Estructura del sitosterol, estigmasterol. Modificado de: http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S021216112006000300013&script=sci_arttext.

13. Almaraz. A. N. Ávila. R. J. A. Delgado. A. E. A. Naranjo. J. N. Herrera. C. J. El metabolismo secundario de las plantas, un nuevo concepto. Fisiología vegetal. **2009**.
14. Lock. de. Ugaz. Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios. *Pontifica Universidad Católica del Perú. Fitoterapia*. **2010**.
15. Roque Flores Mariela., "Diterpenos del género *Eupatorium*"; Tesis de licenciatura, Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH **2008**.
16. Silva García Edna Milagros. "Actividad antiooxidante de parvifolina aislada de *Acourtia humboldtii*". Tesis de licenciatura, Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH **2012**.
17. Liliana Katinas, Diego G. Gutiérrez, Mariana A. Grossi y Jorge V. Crisci. Panorama de la familia Asteraceae en la república Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* **2007**.42, 1-2,113-129.
18. Enrique O. Bermudez, José L. Villaseñor, Oswaldo Téllez. La familia Asteraceae en el estado de Nayarit. *Acta botánica Mexicana*. **1988**, 44,25-57.
19. García Sánchez E. C B Ramirez Lopez, R. E. N, del Rio Torres, MM Martinez Pacheco. A revision of *Eupatorium* (Compositae: Eupatorieae) from Michoacan. *International journal of experimental botany*. **2011**, 80,139-146.
20. María A. De Jesús, Carlos A. Ortiz Solorio y Ma. Del C. Gutiérrez Castorena. Clasificación de los suelos de la meseta tarasca, Michoacán. *Terra Latinoamericana*, **2001**.19, 003,1-25.
21. Inegi.climasdemichoacán.Disponible en:<http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/mich/territorio/clima.aspx?tema=me&e=16>.
22. Hernández, J. D.; Román, L. U.; Rodríguez J. M.; Espiñeira J.; Joseph-Nathan, P. *Areolal, a thymol from Piptotrix areolare*. *Phytochemistry*, **1986**, 25, 1743-1744.
23. Enrique Martín López, Norman L. Allinger, Norma Llinger, M. P. Cava Química Orgânica. *Ed. Reverte*. **1984**, 813.
24. Kukushkin. V. Y, Pombeiro A. J. L, Coordin. *Chem Rev*. **1999**, 181, 147.
25. Ji-Tai Li, Xiao-Liang Li, Tong-Shuang Li. Ultrasonics sonochemistry. **2006**, 13, 200–202.
26. Federico Klages. Tratado de Química Orgánica sistemática *Ed. Reverte* **1968**.
27. Eduardo Primo Yúfera Química orgánica básica y aplicada. *Ed. Reverte*. **1996**.

28. Shargui H. Sarvari M. H. *Synlett*. **2001**, 99.
29. McMurry J. Química orgánica. *Ed Thomson*, **2001**, 770-772.
30. Hugo Alejandro García Gutiérrez. "Preparación de bases de schiff y reordenamiento de beckmann de derivados de longipinano". Tesis de licenciatura **2004**.
31. Pooja P. Bandekar, Keir Aleksei Roopnarine, Virali J. Parekh, Thomas R. Mitchell, Mark J. Novak, and Richard R. Sinden. Antimicrobial Activity of Tryptanthrins in *Escherichia coli*. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 3558–3565.
32. Montaña N, Sandoval A. Camargo S, Sánchez J. Los microorganismos: pequeños gigantes. *Elementos* **2010**, 77, 15-23.
33. José Molina López. Teresa. Uribarren Berrueta. Infecciones por *shigella* spp. *Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM*. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/shigella.html>. Última revisión 30 enero **2013**.
34. Luis Izquierdo Lázaro. "Biosíntesis del lipopolisacárido de *klebsiella pneumoniae*". Tesis doctoral **2003**.
35. Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica Mex* **2002**; 44:464-475.
36. Monica. Gil. de M. *Staphylococcus aureus*: *Microbiología*. **2000**:17,2:145-152.
37. Jhon J. Rojas, Aura M. García, Alvin J. López. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales*. **2005** 4, 2, 28-32.
38. Luis. Asencios. Solís. Neyda. Quispe.Torres. Lucy. Vásquez. Campos. Manual para el control de calidad externo de medios de cultivo para el diagnóstico Bacteriológico. Ministerio de Salud. *Instituto Nacional de Salud*. **2012**.
39. Efrain Peñaloza Ayala. Aislamiento y caracterización química de compuestos bioactivos del coral *muricea appressa* verill 1864. Tesis de maestria. **2004**.

9. ANEXO.

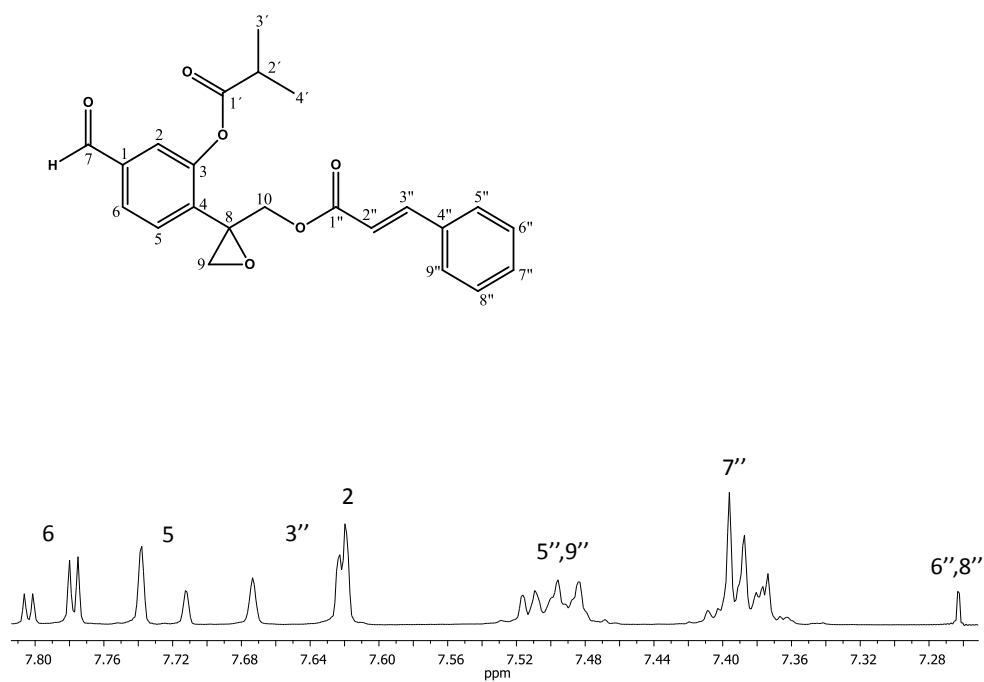


Figura 28. Ampliación del espectro de RMN de ^1H en la región de 7.80 a 7.28 ppm.

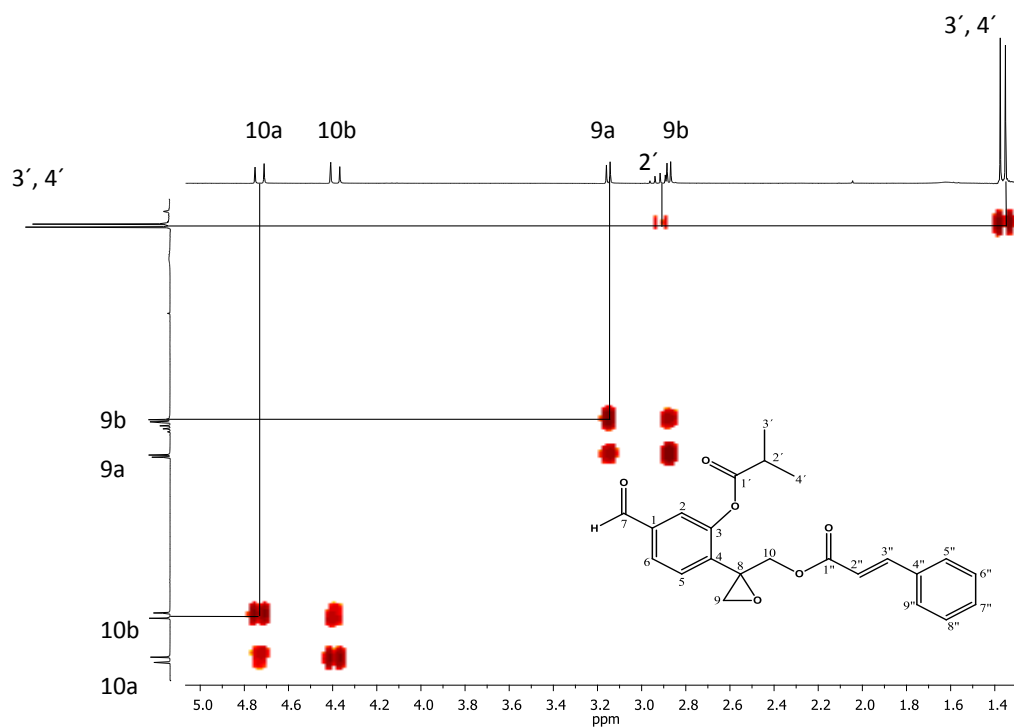


Figura 29. Ampliación del espectro COSY en la región 5.00 a 1.40 ppm.

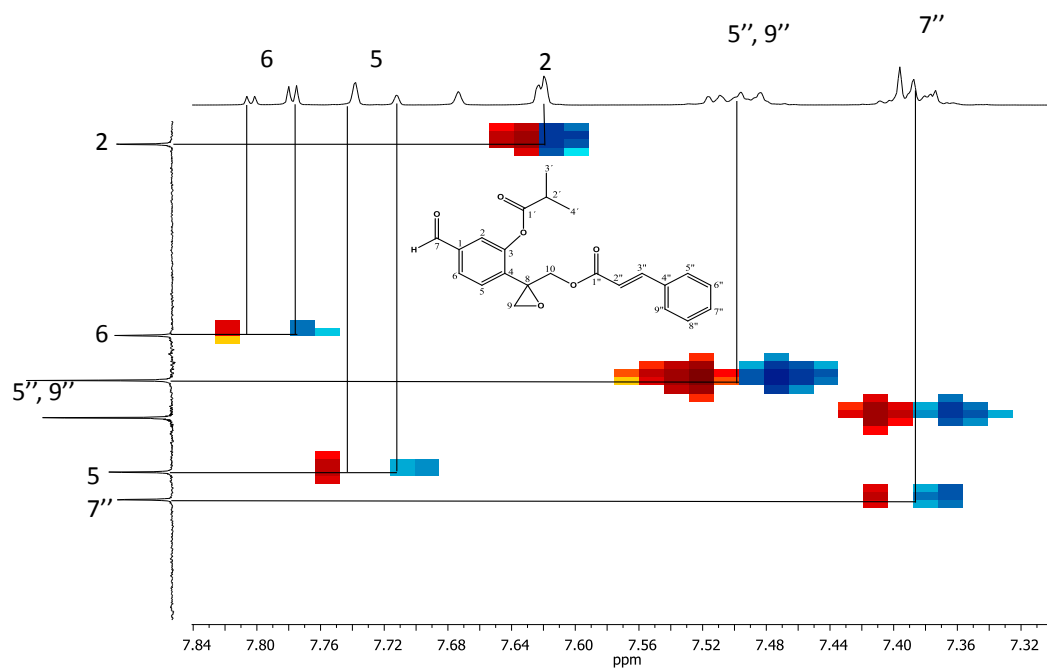


Figura 30. Ampliación del espectro HETCOR en la región de 7.84 a 7.32 ppm.

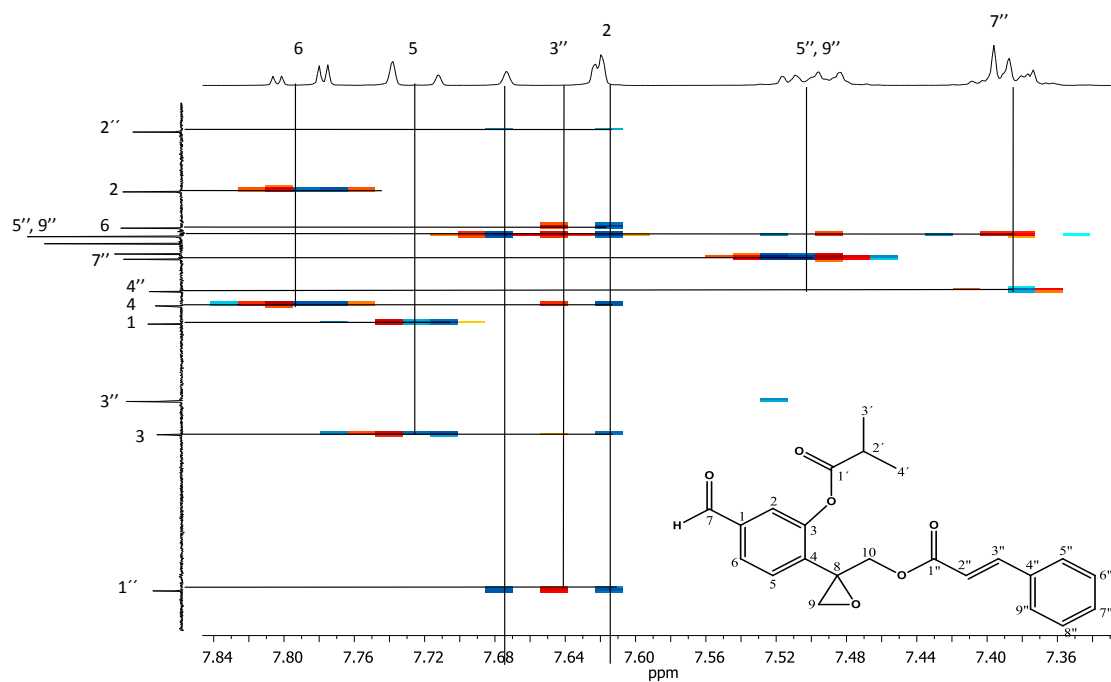


Figura 31. Ampliación del espectro HMBC del rango 7.84 a 7.36 ppm.

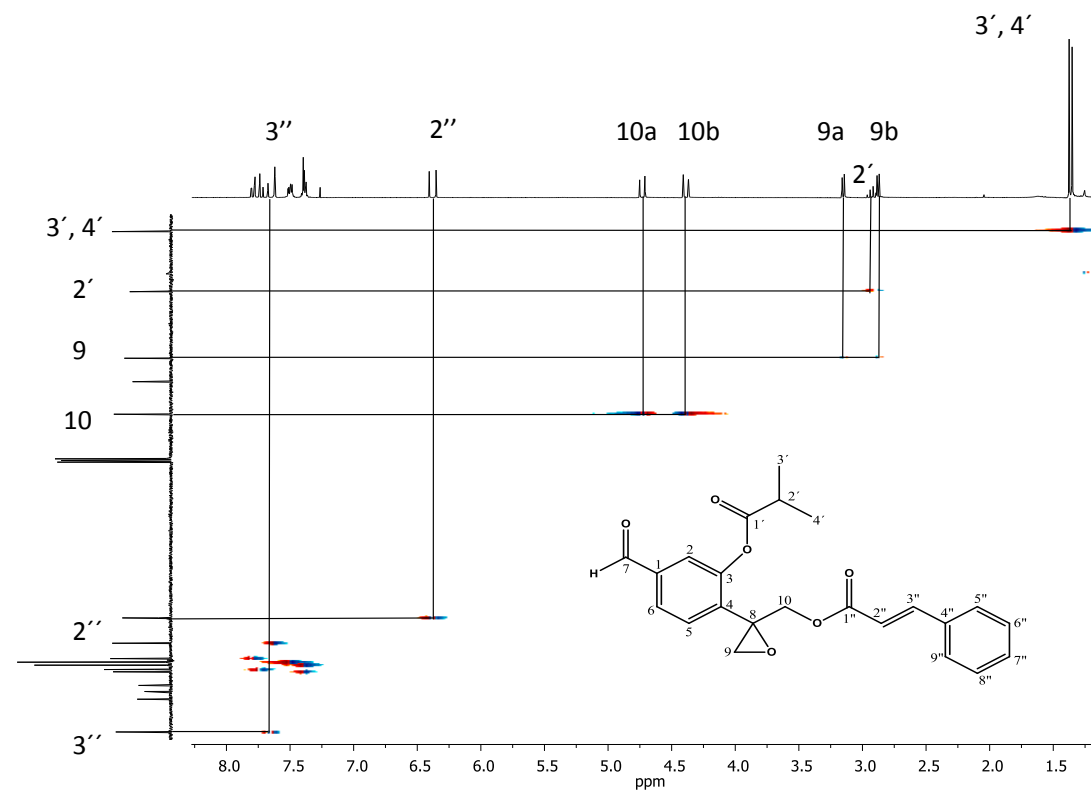


Figura 32. Ampliación del espectro HETCOR del rango de 8.00 a 1.50 ppm.

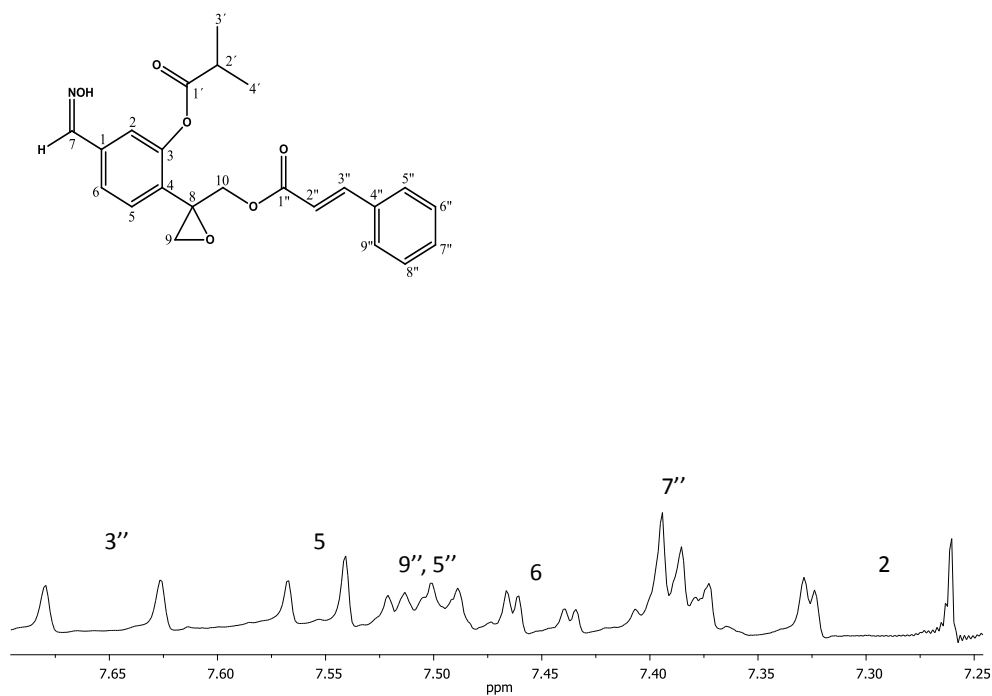


Figura 33. Ampliación del espectro de RMN ^1H de la oxima del areolal del rango de 7.65 a 7.25 ppm.

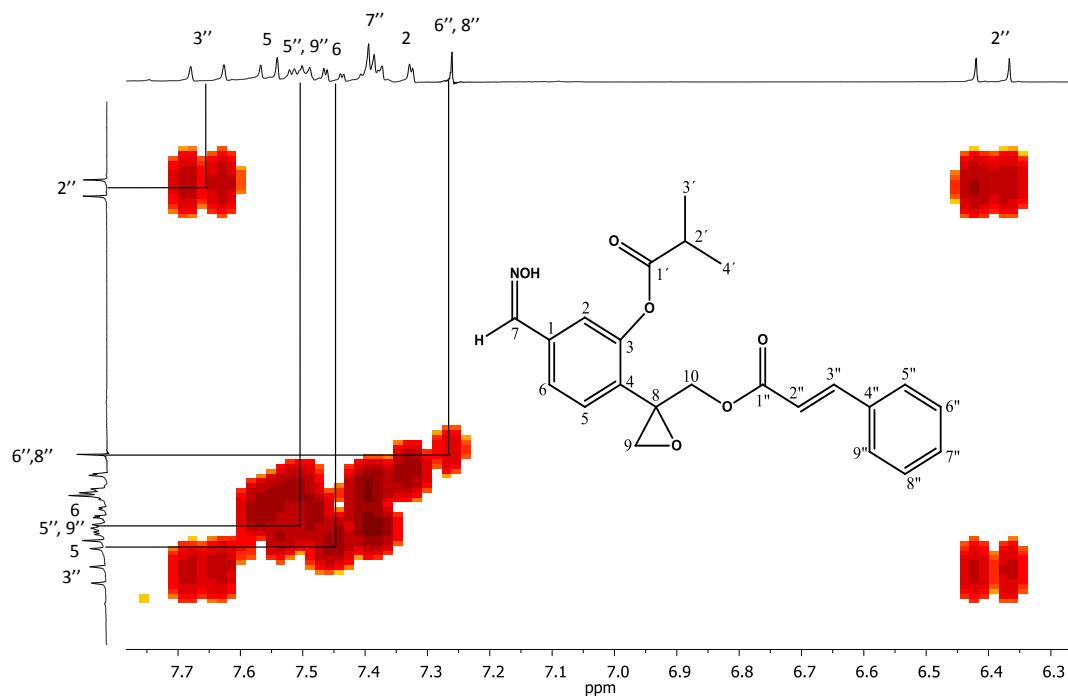


Figura 34. Ampliación del espectro COSY de la oxima del areolal en la región de 7.70 a 6.30 ppm.

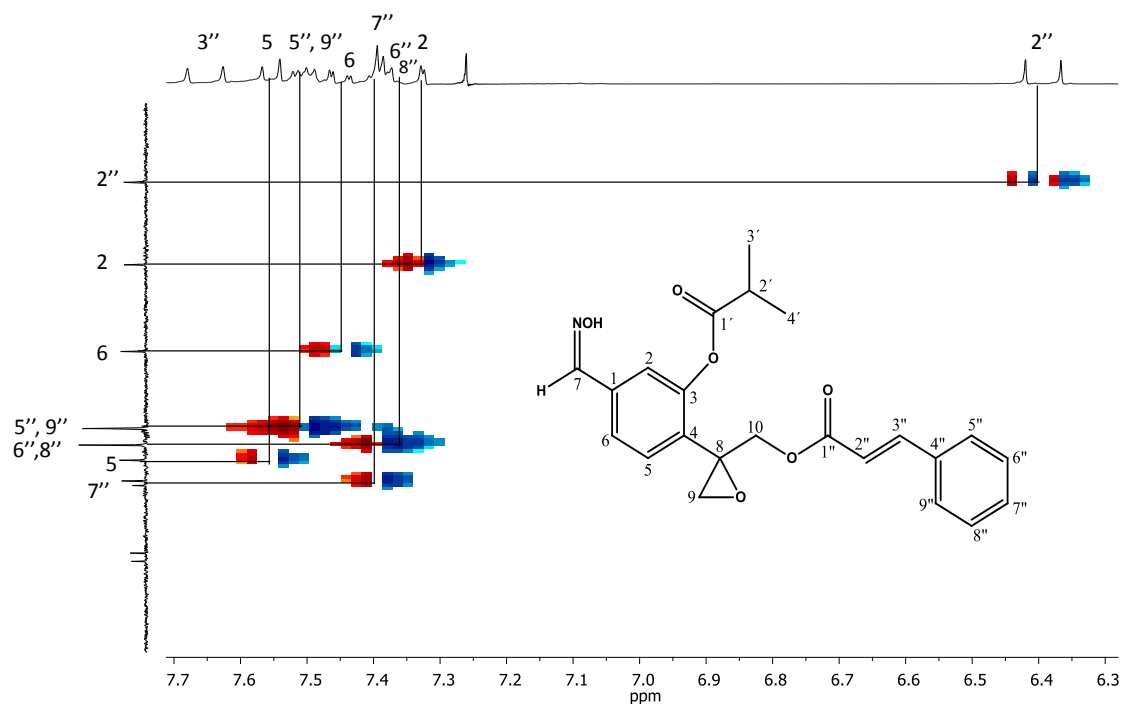


Figura 35. Ampliación del espectro HETCOR de la oxima del areolal del rango de 7.70 a 6.30 ppm.

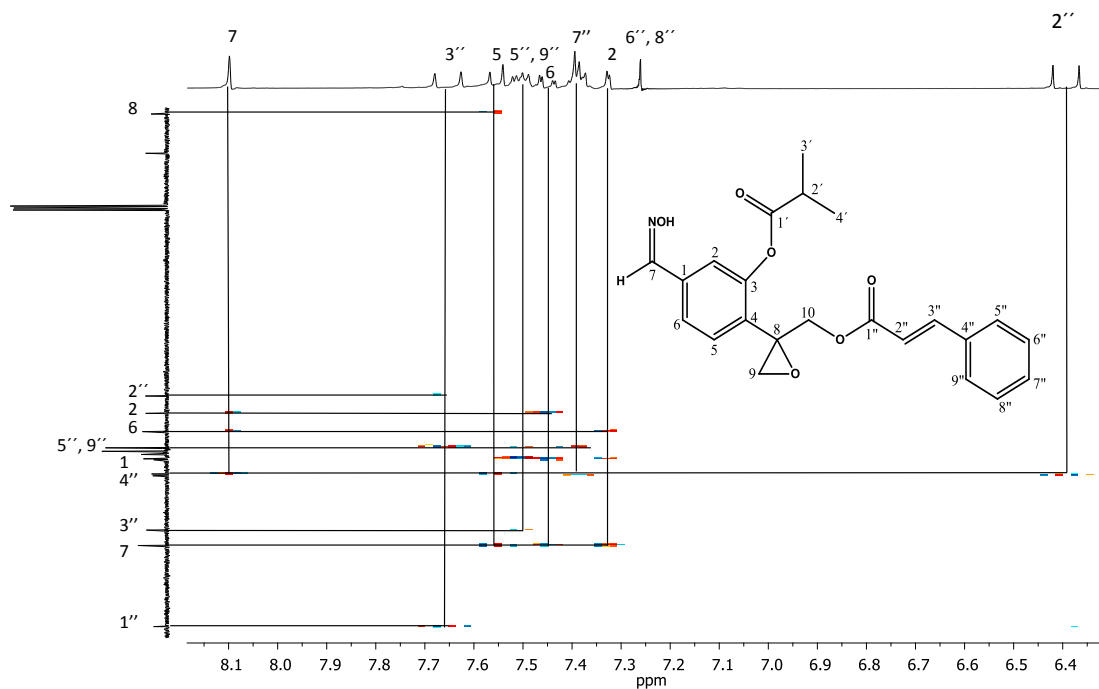


Figura 36. Ampliación del espectro de HMBC de la oxima del areolal en la región de 8.10 a 6.40 ppm.

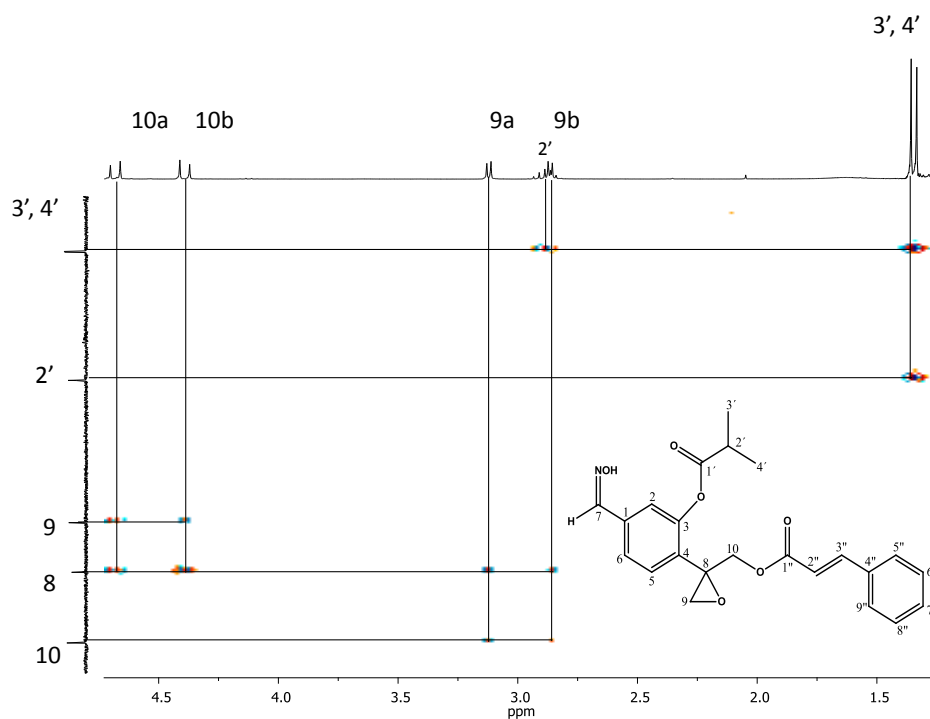


Figura 37. Ampliación del espectro de HMBC de la oxima del areolal en la región de 4.80 a 1.40 ppm.

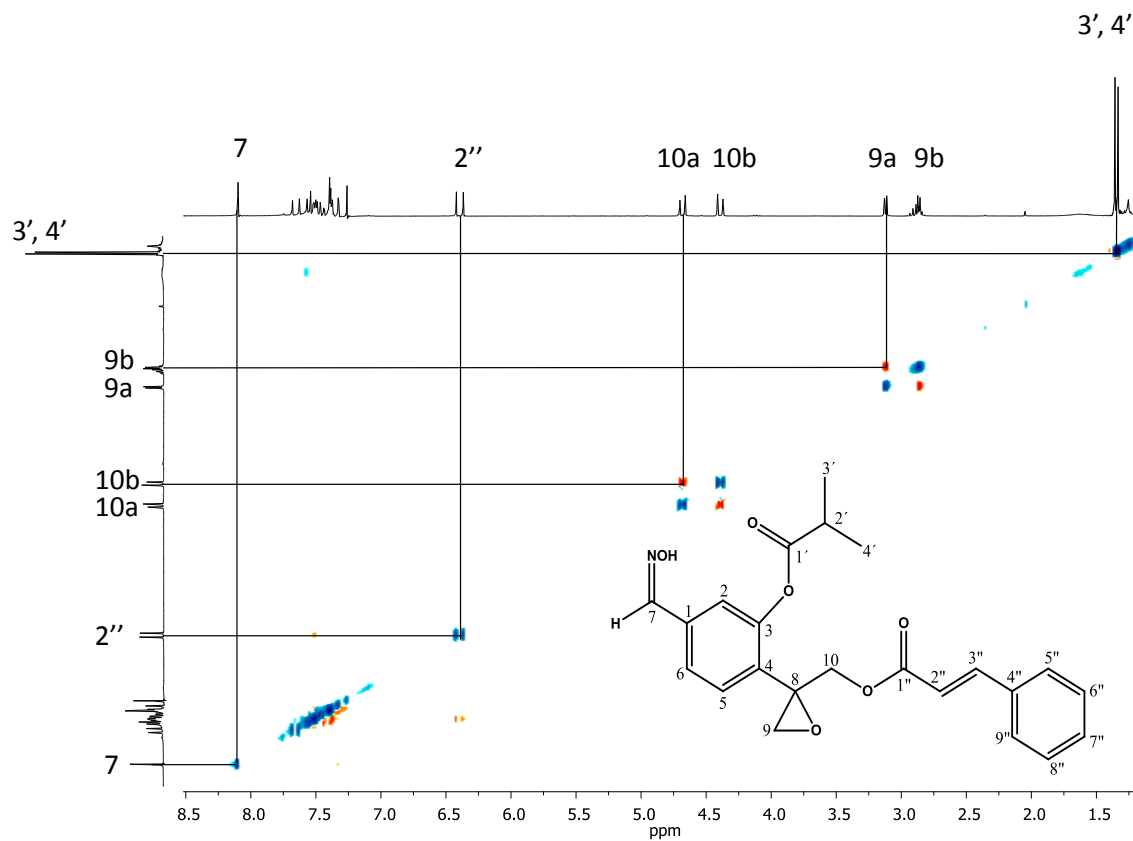


Figura 38. Ampliación del espectro NOESY de la oxima del areolal en la región de 8.50 a 1.50 ppm.