



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

TESIS:

**ESTUDIO QUÍMICO Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DEL DURAMEN DE
MADERAS FINAS Y COMPARACIÓN CON LA ACTIVIDAD DE DERIVADOS DE
MEDICARPINA**

QUE PRESENTA:

Q.F.B LIRENNY QUEVEDO TINOCO

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS.

ASESOR: DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS RAFAEL HERRERA BUCIO

COASESOR: DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS PABLO LÓPEZ ALBARRÁN

MORELIA, MICHOACÁN

ENERO DEL 2015

“Esfuérzate y se valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios estará contigo en donde quiera que vayas”

Josué 1:7

DEDICATORIA

A mi familia que siempre me han dado su apoyo incondicional en todo lo que he necesitado, por confiar en mis decisiones y por enseñarme que la familia siempre está ante todo en primer lugar.

A mi mamá Mayra Tinoco Alfaro, por haberme regalado la vida y por instruirme en el buen camino. A mi papá Lino Quevedo Farías Q.E.P.D. A pesar de que no ya no estas presente físicamente, sigo llevándote en cada logro y meta cumplida.

A mis hermanos P'bell, Mayralín y Lino por ser mis compañeros de vida, mis amigos, mi ejemplo y mi motivación. Porque cada peculiaridad que tiene cada uno hace mi vida plena y feliz.

A una persona muy especial en mi vida, Q.F.B. Lucio Hernández de la Paz, por ser más que un amigo, más que un colega, por compartir el mismo sentir por la ciencia, por estar ahí en los malos ratos y por regalarme muchos buenos momentos.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero dar gracias a Dios, porque siempre me ha bendecido, por permitirme alcanzar mis metas, establecer nuevos objetivos y porque ha traído a mi vida más de lo que haya podido pedir.

Agradezco a mi asesor y coasesor de Tesis: **D.C. Rafael Herrera Bucio** y **D.C. Pablo López Albarrán**, una vez más me dieron la oportunidad y la confianza de permitirme desarrollar un proyecto de investigación, por enseñarme que, más que un grado por alcanzar, es un estilo de vida por desarrollar.

Al **D.C. Hugo Alejandro García Gutiérrez** y **D.C. Luis Chacón García**, así como al **D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado**, por formar parte de mi comité tutorial, por haber sido parte de mi formación durante el programa, por haber tenido la accesibilidad para poder acércame cuando tuve cuestionamientos y porque este trabajo es mejor gracias a sus observaciones y correcciones.

Al cuerpo académico de la Maestría en Ciencias Químicas, que con sus enseñanzas nos llevaron a poder alcanzar el grado con calidad y eficiencia.

A mis compañeros y amigos: **Armando, Alejandro, Andrés, Julio** y **Josué**, chicos el tiempo pasó volando con su compañía, de verdad los aprecio mucho y sé que nos ira más que excelente en cada nueva etapa de nuestras vidas.

A mis compañeros del Laboratorio de Síntesis Orgánica y Química Computacional, en especial a **Angy, Mary** y **Fredy**, por ser más que buenos compañeros, por los buenos momentos, por el apoyo y trabajo que en conjunto llegamos a desarrollar.

Al laboratorio de Microbiología del programa de Maestría en Ciencias en Tecnología de la Madera, en especial al **D.C. Crisanto Velázquez Becerra**, por la atención prestada y disposición brindada.

Al laboratorio de Recombinación Genómica Bacteriana por ayudarme con la identificación del hongo que utilicé en las pruebas, en especial a la **D.C. Carmen Orozco** por su paciencia y disposición para enseñarme nuevas técnicas y al **D.C. Eduardo Valencia** por permitirme el acceso al laboratorio.

Al **D.C. Zurisaddai Hernández** por el apoyo para la interpretación de resultados de la parte biológica, por atender mis dudas y por aportarme nuevas perspectivas.



Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el otorgamiento del apoyo con número de registro: 278567. Para la realización de la Maestría en Ciencias Químicas ofertada por el Instituto de Investigación Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.



Un agradecimiento especial al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas y al laboratorio de Síntesis Orgánica y Química Computacional por haberme permitido realizar el presente proyecto y por la formación que se me dio para lograr obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas.

Parte de este trabajo se presentó en los siguientes eventos académicos:

- “Evaluación antifúngica de dos derivados de Medicarpina”, 8º Congreso Estatal de Ciencia y Tecnología e Innovación. Morelia, Michoacán. 7 y 8 de Noviembre 2013.

- “Evaluación antifúngica de tres derivados de Medicarpina”, 10ª. Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Mérida, Yucatán. 21 – 24 de Mayo 2014.

- “Aislamiento de la Medicarpina de *Andira inermis* y evaluación antifúngica de sus derivados”, 31º Congreso Latinoamericano de Química, XXVII Congreso Peruano de Química. Lima, Perú. 14-17 Octubre 2014.

- “Análisis de la Medicarpina obtenida de *Dalbergia congestiflora* P. y *Andira inermis*, así como sus derivados con actividad antifúngica, mediante RMN”, 9º Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación. Morelia, Michoacán. 16 y 17 de Octubre 2014.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS..... | 1 |
| RESUMEN..... | 3 |
| ABSTRACT..... | 5 |
| | |
| I. INTRODUCCIÓN | 7 |
| 1.1 Tipos de Bosques del Estado de Michoacán | 7 |
| 1.2 Clasificación de la Madera | 10 |
| 1.3 Metabolitos secundarios de plantas | 11 |
| 1.2 Fitoalexinas | 13 |
| 1.3 Flavonoides | 14 |
| | |
| II. ANTECEDENTES | 16 |
| 2.2 Medicarpina..... | 18 |
| 2.3 <i>Lysiloma acapulcensis</i> | 20 |
| 2.4 <i>Eysenhardtia polystachya</i> | 22 |
| 2.4 Relación estructura actividad | 25 |
| | |
| III. JUSTIFICACIÓN | 27 |
| | |
| IV. OBJETIVOS | 28 |
| | |
| V. METODOLOGÍA..... | 29 |
| 5.1 Obtención de extraíbles | 29 |
| 5.2 Determinación de la actividad biológica de los extractos crudos..... | 29 |
| 5.3 Separación de los componentes mayoritarios de los extractos con actividad biológica..... | 30 |
| 5.4 Obtención de Medicarpina..... | 31 |
| 5.4.1 Preparación de derivados de Medicarpina | 32 |

| | |
|---|-----------|
| VI. RESULTADOS | 33 |
| 6. Estudio del duramen de las dos especies forestales y evaluación antifúngica..... | 33 |
| 6.1 <i>Lysiloma acapulcensis</i> | 33 |
| 6.2 <i>Eysenhardtia polystachya</i> | 44 |
| 6.3 Evaluación de la actividad antifúngica de la Amorfaquinona..... | 56 |
| 6.4 Estudio del extracto obtenido con THF del duramen de palo dulce. | 63 |
| 6.5 Derivados funcionalizados de Medicarpina | 71 |
| 6.5a) Derivado <i>p</i> -nitrobenzoato de Medicarpina..... | 71 |
| 6.5b) Derivado <i>p</i> -metoxibenzoato de Medicarpina | 76 |
| 6.5c) Derivado benzoato de Medicarpina | 78 |
| 6.6 Comparación de la actividad antifúngica de los compuestos evaluados | 81 |
| | |
| VII. CONCLUSIONES | 83 |
| | |
| VIII. BIBLIOGRAFÍA | 86 |

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

| | |
|---------------------------------|--|
| Ac ₂ O | Anhídrido acético |
| Acetona-D | Acetona deuterada |
| AcOEt | Acetato de etilo |
| ASTM | American Society for Testing and Materials |
| BHT | Butilhidroxitolueno |
| CC | Cromatografía en columna |
| CCF | Cromatografía en Capa fina |
| CDCl ₃ | Cloroformo deuterado |
| CH ₂ Cl ₂ | Cloruro de metileno |
| cm | Centímetros |
| DL50 | Dosis letal cincuenta |
| g | Gramos |
| h | Horas |
| Hz | Hertz |
| IR | Infrarrojo |
| J | Constante de acoplamiento |
| m | Metros |
| Med | Medicarpina |
| MHz | Mega Hertz |

| | |
|---------------------------|------------------------------|
| mg/L | Miligramos por litro |
| mL | Mililitros |
| mm | Milímetros |
| µg/mL | Microgramos por mililitro |
| <i>p</i> -OMe | <i>para</i> -metoxi |
| p.f. | Punto de Fusión |
| ppm | Partes por millón |
| <i>p</i> -NO ₂ | <i>para</i> -nitro |
| RCOCl | Cloruro de ácido |
| RMN | Resonancia Magnética Nuclear |
| THF | Tetrahidrofurano |

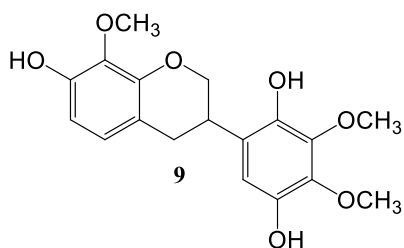
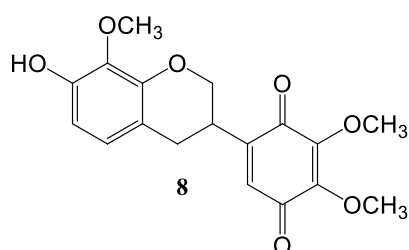
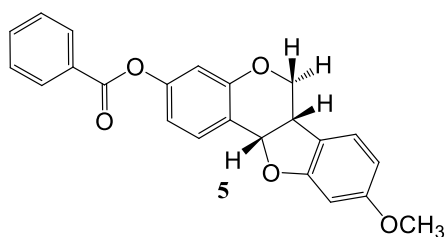
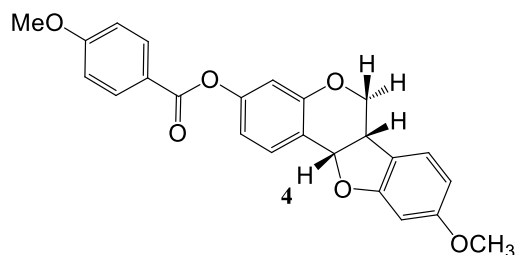
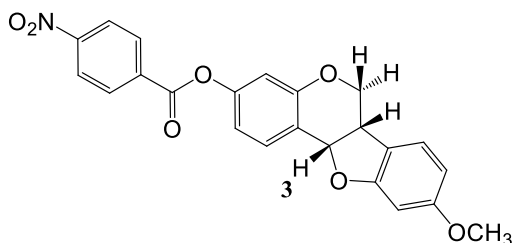
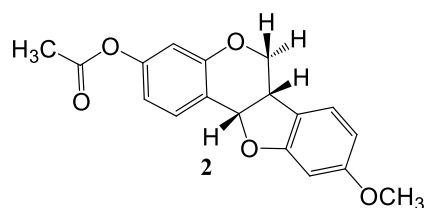
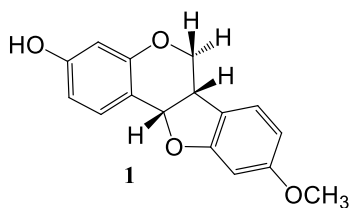
RESUMEN

En el estado de Michoacán se encuentra una gran diversidad de especies forestales que se han clasificado como maderas finas; esto debido a que poseen una gran durabilidad a la degradación ambiental y a la vez son apreciadas por la belleza de su madera. La durabilidad que presentan estas maderas está relacionada a la presencia de compuestos provenientes del metabolismo secundario, los cuales son compuestos prometedores a usarse como agentes protectores contra los ataques de fitopatógenos.

A partir del duramen de dos especies forestales encontradas en Michoacán, Tepehuaje (*Lysiloma acapulcense*) y Palo dulce (*Eysenhardtia polystachya*), se obtuvieron tres extractos: hexánico, THF y acetato de etilo. A cada extracto se le evaluó su capacidad para inhibir al hongo *Trametes versicolor* a concentraciones de 250 y 500 mg/L, donde solo los extractos hexánico y THF obtenidos del árbol Palo dulce presentaron mediana inhibición contra el hongo, debido a esto se realizaron purificaciones mediante cromatografía en columna para la obtención de los compuestos que estuvieran implicados en dicha actividad. A partir de ambos extractos se aisló un compuesto mayoritario, la isoflavanquinona, Amorfaquinona (**8**), la cual inhibió el 100% del crecimiento fúngico a la concentración de 500 mg/L.

En nuestro grupo de trabajo se ha reportado el aislamiento de otro compuesto natural importante; la Medicarpina (**1**) la cual ha sido aislada del duramen de los árboles *Darbergia congestiflora* P. y *Andira inermis* ambas especies reconocidas en el estado por su alta durabilidad natural; este metabolito secundario ha presentado actividad antifúngica contra *T. versicolor* a la concentración de 150 mg/L. En trabajos previos, se preparó el derivado acetilado de la Medicarpina (**2**), al cual se le evaluó su actividad antifúngica contra el hongo antes mencionado y la concentración requerida para inhibirlo fue menor que la presentada por la Medicarpina, siendo esta de 100 mg/L. En base a este antecedente, se propuso preparar tres nuevos ésteres derivados de la Medicarpina y evaluar el efecto de los nuevos derivados frente al hongo, a concentraciones de 50, 100 y 150 mg/L.

Los nuevos derivados: **3** (*p*-nitrobenzoato), **4** (*p*-metoxibenzoato) y **5** (benzoato), presentaron mediana actividad inhibitoria, el derivado **3** fue el que presentó el menor porcentaje de inhibición de los 3. El derivado **4** por su parte presentó el mayor porcentaje de inhibición a la concentración de 150 mg/L (77%), mientras que el efecto antifúngico del derivado **5** predominó sobre los otros dos en las concentraciones de 50 y 100 mg/L. Sin embargo ninguno de estos tres nuevos derivados alcanzó el 100% de inhibición contra *Trametes versicolor* a las concentraciones ensayadas, a diferencia de la materia prima (Medicarpina) ya que esta logra la total inhibición a 150 mg/L.



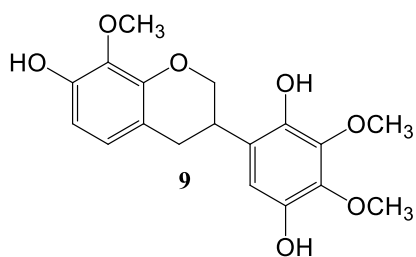
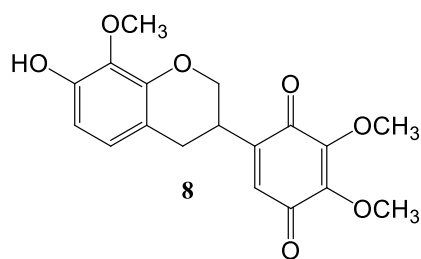
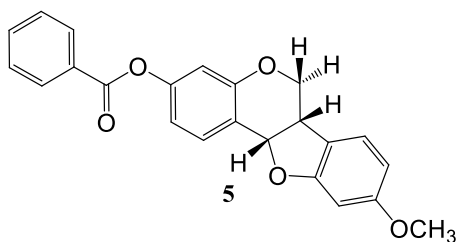
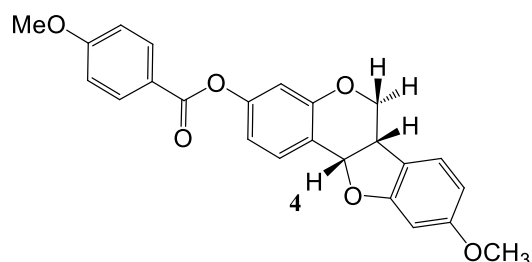
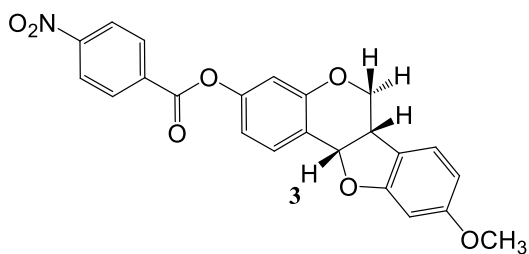
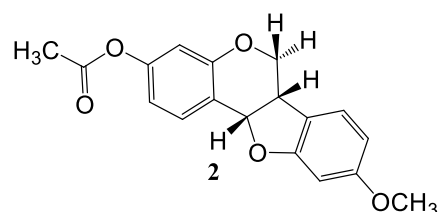
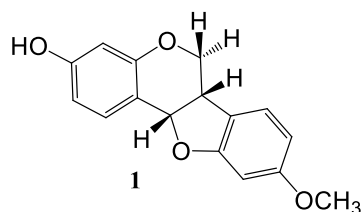
ABSTRACT

In the state of Michoacán it has found a great diversity of forest species that are classified as fine woods because they have good durability against the environmental decay and in the same time they are appreciated due to the beauty of their timber. The durability that these woods have is related to the presence of compounds from the secondary metabolism and these compounds are promising to use as protective agents against phytopathogen attacks.

From the heartwood of two forests species found in Michoacán, “Tepehuaje” (*Lysiloma acapulcense*) and “Palo dulce” (*Eysenhardtia polystachya*), three extracts were obtained using the following solvents: hexane, THF and ethyl acetate. Each extract was evaluated against *Trametes versicolor* at concentrations of 250 and 500 mg/L. Only the extracts obtained with hexane and THF from “Palo dulce” showed some percentage of fungal inhibition, due this column chromatographic purifications were performed to obtain the compounds that showed the activity. One majoritarian compound was isolated from both extracts, the isoflavanquinone, Amorphaquinone (**8**), which inhibited the 100% of fungal growth at 500 mg/L.

In our working group it has reported the isolation of another important natural compound; Medicarpin (**1**), which has been isolated from the heartwood of *Darbergia congestiflora* P. and *Andira inermis*, both are recognized species in the state due their high natural durability; this natural compound has shown antifungal activity against *T. versicolor* at concentration of 150 mg/L. In previous works, it was prepared the acetylated derivative of Medicarpin (**2**), and its antifungal activity was tested against the fungus above mentioned; the required concentration to inhibit it was lower than the medicarpin shown, this being of 100 mg/L. Due this was proposed to prepare three new ester derivatives from medicarpin and to test these new compounds against the fungus at concentrations of 50, 100 and 150 mg/L.

The three new derivatives: **3** (*p*-nitrobenzoate), **4** (*p*-methoxybenzoate) and **5** (benzoate) of medicarpin, showed some inhibition percentages, the derivative **3** was the less active of all. **4** showed the highest inhibition percentage at the concentration of 150 mg/L (77%), while the antifungal effect of **5** predominated over the other two at the concentrations of 50 and 100 mg/L. Nevertheless none of these three new derivatives achieved the 100% of *Trametes versicolor* inhibition at the tested concentrations, at differences of the Medicarpin, wich is able to achieve the total inhibition at 150 mg/L.



I. INTRODUCCIÓN

El Estado de Michoacán presenta una amplia diversidad de especies forestales que se caracterizan por su durabilidad y resistencia al ataque de organismos, como ejemplo de algunas de ellas tenemos las especies que se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1. Algunas maderas finas encontradas en la región.

| Nombre Científico | Nombre Común |
|--|---------------------|
| <i>Dalbergia congestiflora</i> Pittier | Campincerán |
| <i>Andira inermis</i> | Almendro de río |
| <i>Lysiloma acapulcense</i> | Tepehuaje |
| <i>Cochlospermum vitifolium</i> | Rosa amarilla |
| <i>Olneya tesota</i> | Palo fierro |
| <i>Eysenhardtia polystachya</i> | Palo dulce |
| <i>Dalbergia granadillo</i> | Sangalicua |
| <i>Cordia elaeagnoides</i> | Cueramo |

1.1 Tipos de bosques del Estado de Michoacán.

La distribución de la vegetación está relacionada con el relieve, suelo, clima e hidrología. En el territorio michoacano se encuentran casi todos los tipos de vegetación que existen en nuestro País gracias a su variedad de relieves y climas. Dentro de los principales en Michoacán se destacan:

- Bosque de pino – encino

Son comunidades siempre verdes, dominadas por árboles del grupo de las coníferas. El estrato más importante es el arbóreo, que presenta alturas características entre 15 y 25 m; sus especies dominantes pertenecen a los géneros *Pinus* y *Quercus* (**Conabio**). Entre los encinos más representativos podemos citar al “aguacatillo”, “laurelillo”, “tocuz”, “encino prieto”, “encino colorado” y “encino blanco”, localizadas en Mil Cumbres al oriente del estado y del sistema Volcánico al noroeste (**Geografía de Michoacán**).

- Bosque de encino

Este tipo de bosque puede encontrarse en el sur y en algunas zonas en la parte norte del Estado. El estrato más importante en el sur es el arbóreo, que presenta alturas de 6 a 8 m. Sus especies dominantes pertenecen al género *Quercus*. Las copas de los árboles "cubren" el 70% de la superficie.

En la zona norte la fisonomía del bosque es diferente; se caracteriza por presentar dos estratos, el arbóreo y el herbáceo, siendo el más importante el arbóreo, con alturas de 4 a 6 m. La especie dominante pertenece al género *Quercus*. Las copas de los árboles "cubren" el 50% de la superficie (**Conabio**).

- Bosque tropical caducifolio.

Conocido también como selva baja caducifolia, se localiza en climas cálidos, subhúmedo, seco semicálido, seco cálido y seco muy cálido (**La Biodiversidad en Michoacán**), desde Tepalcatepec hasta Huetamo y en los declives norte-sur de la Sierra Madre del Sur. Pero la mayor área de localización es en la Depresión del Balsas. Se caracteriza por presentar tres estratos: arbóreo, arbustivo y herbáceo; el estrato más importante es el arbóreo, con una altura de 3 m. Las especies más comunes son "copales", "papelillos", "pochote", "tepehuaje" y varias especies de leguminosas como "campincerán", "cueramo" y cactáceas como los "pitayos", "pachón", "tepamo", "pitiris" y otras (**Geografía de Michoacán**).

- Matorral subtropical.

Se localiza en áreas donde el clima cambia de templado a tropical, se distribuye en la porción centro-norte del Estado (**La Biodiversidad de Michoacán**). Son árboles de 3 a 8 metros de altura. Las especies más comunes son; "copal", "chilillo", "papelillo", "zapote blanco", "cázahuate", "pochote", "tepehuaje", "palo dulce", "nogalillo" y "capulín blanco".

- Bosque Tropical Espinoso.

Lo forman árboles y arbustos con espinas, de poca altura y con frutos en forma de vaina. Se encuentran en algunos valles con suelos profundos, de color claro, textura gruesa y relieves planos, en climas tropicales o secos, en donde la temperatura, media alcanza los 30 grados Celsius. Se distribuye, hacia el suroeste del Estado, en las planicies costeras y, en las partes más bajas y planas de Tierra Caliente. En este bosque predominan los árboles pequeños y espinosos como el "mezquite", "huizache" y "pinzán" (**Geografía de Michoacán**).

- Bosque Tropical Subcaducifolio.

Presenta árboles de 15 a 30 metros de altura, que durante la época más seca del año pierde la mitad o más de sus hojas. Se localiza a manera de pequeños parajes a lo largo de la costa, principalmente en las cañadas de los declives norte y sur de la Sierra Madre del Sur; en suelos profundos arenosos o arcillosos (**Conabio**). Las especies más importantes son el “guapinol”, “parota”, “primavera”, “capiñ”, “cuirinda”, “uje”, “anona”, “coyoácate”, “sangalicua”, “almendro de río” y “palo maría”. En estas regiones se encuentran muchas especies de árboles llamados “maderas finas” (**La Biodiversidad de Michoacán**).

1.2 Clasificación de la madera.

Las maderas pueden ser clasificadas en dos grandes grupos (**Capuz, 2005**):

- Resinosas o coníferas: Son maderas procedentes de los árboles que pertenecen al grupo biológico de las gimnospermas. Son usadas en carpintería de taller y de armar, las que más destacan son: pino, abeto, alerce, cedro, fresno.
- Frondosas: Son maderas procedentes de árboles o arbustos que pertenecen al grupo de las angiospermas, la cuales a su vez se subdividen en:

-Duras

-Blandas

-Finas

-Exóticas

Las maderas finas deben su nombre a su amplia durabilidad y a su belleza. La durabilidad natural de las maderas, está definida por los estándares de la AWWPA (**American Wood Protection Association**) norma EN350. La cual se define como la resistencia natural que presenta la madera frente al ataque de las distintas patologías: hongos cromógenos, hongos de pudrición, carcomas y termitas. La mayor o menor durabilidad de una especie depende de su densidad y del mayor o menor contenido de resinas, taninos, aceites, entre otros, que impregnan sus tejidos. El duramen contiene más sustancias protectoras que la albura, por lo que es más resistente. Así la variación de la durabilidad entre especies se debe a la proporción de albura y duramen, así como la cantidad y tipo de extractivos presentes (**Honorato, 2001**). En hábitats naturales, las plantas están rodeadas por un gran número de enemigos potenciales. Casi todos los ecosistemas contienen una amplia variedad de bacterias, virus, hongos, nematodos, insectos, mamíferos y otros animales. Debido a la naturaleza de las plantas, no pueden escapar a estos patógenos por lo que deben protegerse de otras formas, una manera de protección es mediante la producción de metabolitos secundarios (**Taiz, 2006**).

1.3. Metabolitos secundarios de plantas.

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos presentes en todas las plantas; denominados metabolitos primarios (**Ávalos, 2009**).

Las plantas producen una gran cantidad y diversidad de compuestos orgánicos que no parecen tener una función directa en el crecimiento y desarrollo. Estas sustancias se conocen con el nombre de metabolitos o productos secundarios. Estos metabolitos no tienen función reconocida o directa en los procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, diferenciación o formación de carbohidratos (**Taiz, 2006**).

Los metabolitos secundarios también difieren de los metabolitos primarios en que tienen una distribución restringida en el reino vegetal (Taiz, 2006), es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades, estando su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia o a una especie (Ávalos, 2009). Su función en la planta normalmente se desconoce, aunque en ocasiones está relacionada con sistemas defensivos o de excreción. En general, este tipo de compuestos son responsables del olor, sabor y del color de las plantas y también de sus propiedades medicinales (Castillo y col. 2007).

La clasificación de los metabolitos secundarios puede hacerse en base a sus estructuras, a su bioformación, a la fuente de producción o a su acción biológica. Uno de los criterios más acertado de clasificación es aquel que utiliza la biosíntesis (Figura 1.3) (Marcano, 2002).

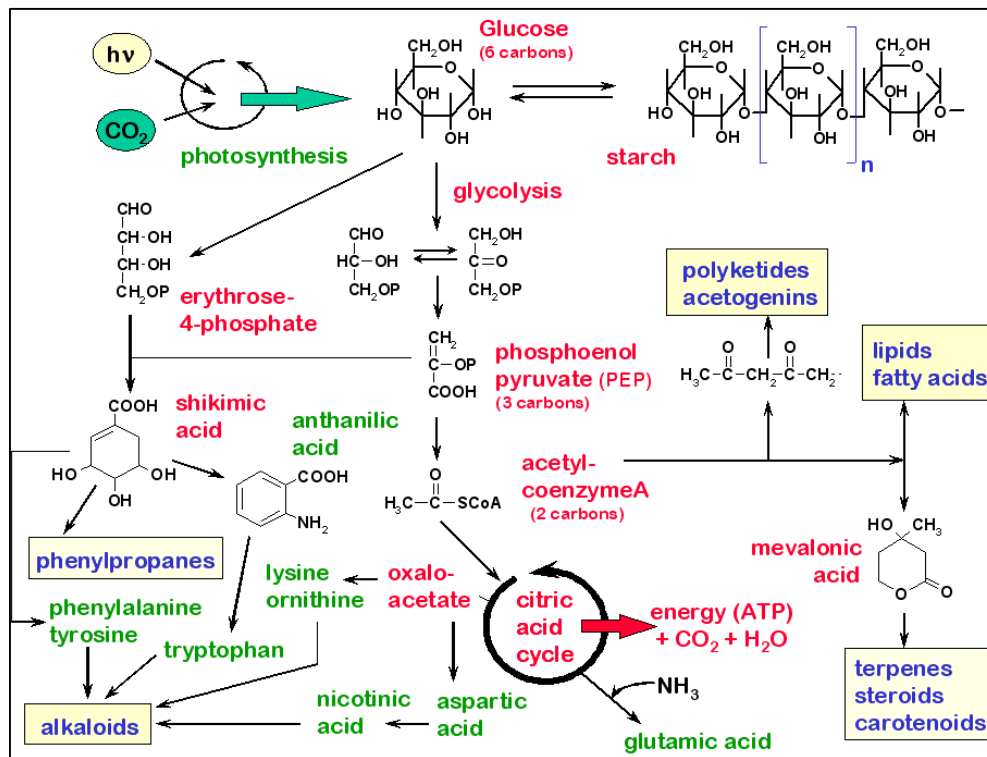


Figura 1.3. Ruta metabólica de metabolitos secundarios.

Todos los metabolitos se sintetizan a partir de una vía. Si un metabolito se sintetiza exclusivamente a través de una vía se denomina puro, y si en su biosíntesis participa más de una vía se denomina mixto (**Castillo y col. 2007**).

Se ha descrito que los metabolitos secundarios juegan un papel importante en la defensa que presentan los vegetales, esta resistencia que poseen frente a organismos fitopatógenos es el resultado de múltiples reacciones de defensa, comprendiendo barreras constitutivas e inducibles. Uno de los mecanismos de defensa es la acumulación de fitoalexinas (**Jeandet y col. 2002**).

1.4 Fitoalexinas.

Son metabolitos secundarios de naturaleza química diversa, principalmente flavonoides, de bajo peso molecular, que se sintetizan en los vegetales después de una infección microbiana. La síntesis se puede disparar por la acción de factores como elicitores o inductores, tanto exógenos, producidos por patógenos, agentes químicos, daños mecánicos; como endógenos, producidos por las plantas en respuesta a determinadas situaciones de estrés (**García, 2003**).

Los primeros reportes sobre la presencia de estos metabolitos fueron descritos por Muller y Borger, mostraron fuertes evidencias de la resistencia de las plantas a enfermedades al observar la resistencia de la papa al hongo *Phytophthora infestans* causada por la producción de compuestos fungitóxicos por la planta hospedera (**Kuc, 1995**).

La mayoría de las fitoalexinas son menos fitotóxicas que los fungicidas sintéticos, estas pueden acumularse en grandes cantidades en los tejidos de las plantas (**Harborne, 1999**) y son sintetizadas en las células sanas adyacentes a las células dañadas. Muchos tipos de inductores de fitoalexinas se han identificado: hongos, bacterias, virus y otros patógenos que liberan o producen inductores de diversa naturaleza química como sales inorgánicas, carbohidratos complejos, lípidos, ácidos grasos, oligómeros del tipo quitosanos, polipéptidos y etileno (**García, 2003**).

Como se ha mencionado, muchos compuestos catalogados como fitoalexinas, también pertenecen al grupo de los flavonoides, los cuales en la actualidad son de gran interés debido a su amplia gama de actividades biológicas benéficas para el ser humano.

1.5. Flavonoides.

El término “Flavonoide” es generalmente utilizado para describir una amplia colección de productos naturales que presentan un núcleo fenil-benzopirano funcionalizado. Dependiendo de la posición donde se encuentre sustituido el anillo aromático en el benzopirano (cromano), se pueden dividir en tres clases: flavonoides (2-fenilbenzopiranos), isoflavonoides (3-benzopiranos), y en neoflavonoides (4-benzopiranos) (**Figura 1.5.1**) (**Grotewold, 2006**).

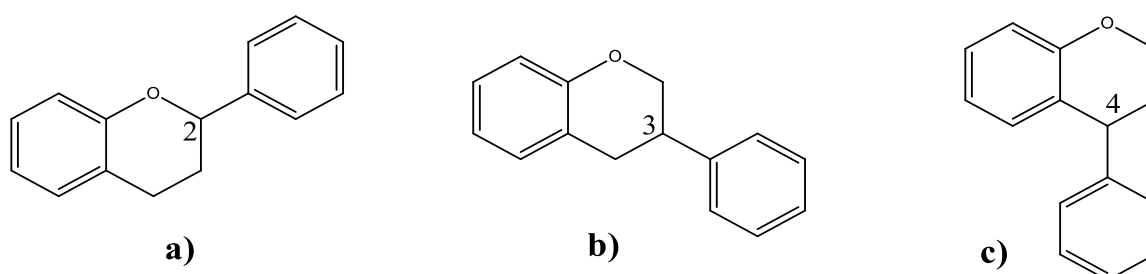


Figura 1.5.1 Clasificación de los flavonoides de acuerdo a la sustitución del grupo fenilo. **a)** Flavonoides, **b)** isoflavonoides y **c)** neoflavonoides.

Los anillos que forman parte del núcleo de los flavonoides son denominados A, B y C; los átomos de carbono individuales son referidos por un sistema numérico, el cual utiliza números ordinarios para los anillos A y C y números primos para el anillo B (**Figura 1.5.2.**)(**Cartaya, 2001**).

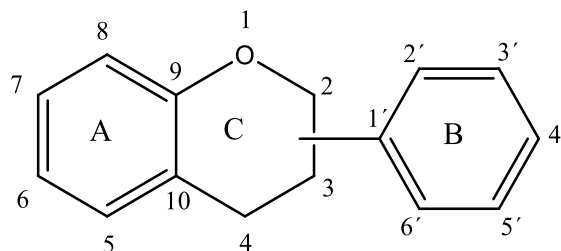


Figura 1.5.2. Numeración del núcleo fenil-benzopiránico.

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas verdes (especialmente las angiospermas), y sólo algunos pocos se han detectado en hongos y algas. Se han encontrado en las diferentes partes de las plantas, especialmente en las partes aéreas; y se les encuentra en forma libre (también llamados agliconas flavonoides), como glicósidos, como sulfatos y algunas veces como dímeros y polímeros (**He, 1996**). Los glicósidos pueden ser de dos clases: con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal) es decir como O-glicósidos; o con los carbohidratos ligados a través de enlaces C-C, es decir como C-glicósidos (**Martínez, 2005**).

Estos compuestos son muy importantes para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas, ya que actúan como atrayentes de animales en la ovoposición, como agentes protectores contra la luz UV o contra la infección por organismos fitopatógenos; además, estos compuestos presentan propiedades relacionadas con la salud humana, lo cual está basado en su actividad antioxidante (**Cartaya, 2001**).

II. ANTECEDENTES

El reino vegetal ha despertado interés debido a la diversidad de compuestos que presenta, sin embargo, este es susceptible al ataque de organismos. Un ejemplo de ello es la madera, la cual es un material muy susceptible de alteración por agentes biológicos y microbiológicos. El ataque biológico ocurre en diferentes partes de la pared celular, dependiendo del tipo de organismo agresor y de sus características metabólicas. Generalmente la madera es atacada por organismos entre los que se destacan, hongos, bacterias, insectos y algunos vertebrados (**Zanni, 2008**).

Los agentes xilófagos son organismos que degradan la madera; la palabra xilófago proviene del griego “xilo” que significa madera y “fago” alimentación. Al alimentarse de los componentes de la madera, el agente xilófago provoca su degradación, disminuyendo sus propiedades físico-mecánicas (**Peraza, 2001**).

Los hongos xilófagos son responsables de grandes pérdidas económicas por la destrucción de grandes cantidades de madera, principalmente aquellas destinadas a la construcción (**Bobadilla, 2004**). El uso de la madera depende principalmente de sus propiedades físicas y mecánicas. Estas propiedades son modificadas en mayor o menor escala, por las alteraciones que sufre la madera. Entre las causas que provocan estas alteraciones, los agentes biológicos ocupan un papel importante. Estos organismos se encuentran asociados principalmente a la pudrición blanca y pudrición marrón, ejemplo de ellos son *Trametes versicolor* y *Gloeophyllum trabeum*, usados en las pruebas de durabilidad a nivel internacional de acuerdo con las normas A.S.T.M. D: 2017-81 (**Holmquist y col. 2007**).

En estados avanzados de pudrición, la madera pierde peso y presenta poca consistencia, a tal punto que se puede partir y resquebrajar bajo la menor presión ejercida (**Bobadilla, 2004**), lo que provoca que ya no pueda ser utilizada para fines de construcción, ebanistería, o cuya función requiera que sus propiedades físico-mecánicas estén intactas.

En el 2011 Martínez aisló la Medicarpina del duramen del árbol *Dalbergia congestiflora* y demostró su efecto antifúngico contra el hongo *T. versicolor*. Al obtener un porcentaje de inhibición del 100% a concentraciones de 150 mg/L. La actividad antifúngica que presentó la Medicarpina se le atribuyó a su anclaje molecular en la enzima Lacasa del hongo (**Figura 2.1.1**); mediante un estudio de Docking usando el programa AutoDock, se observó el acoplamiento de la Medicarpina en una cavidad cercana al sitio T2/T3 de la enzima (**Figura 2.1.2**), lo que provoca el bloqueo de entrada de oxígeno, que a su vez interrumpe la transferencia de electrones, como consecuencia de esto no se lleva a cabo la degradación del sustrato.

Las enzimas de tipo lacasa son miembros de la familia de Cu-oxidasas azules y catalizan la oxidación de compuestos fenólicos y aminas aromáticas con la correspondiente reducción de oxígeno molecular a agua (**Gold, 1993**). La oxidación de los compuestos fenólicos y polifenólicos se lleva a cabo mediante la abstracción de un electrón para dar radicales, lo que conlleva a una reacción en cadena para llevar a cabo la degradación de los sustratos (**Higuchi, 1989**).

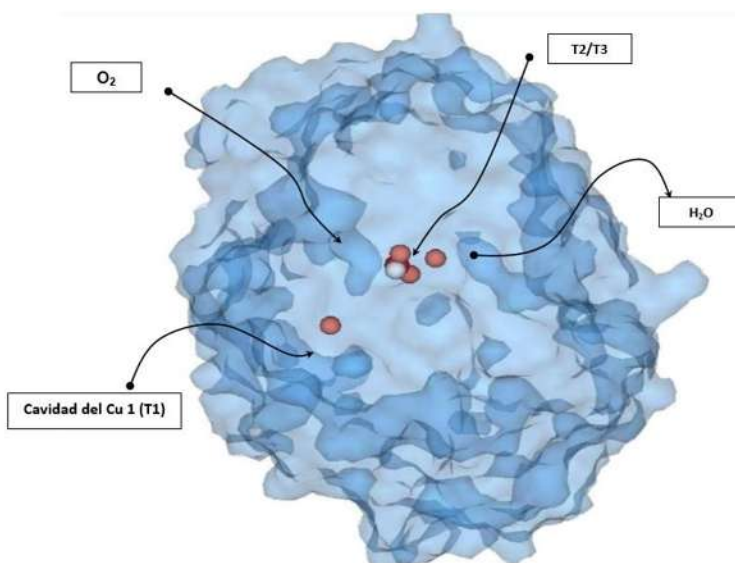


Figura 2.1.1. Enzima Lacasa del hongo *Trametes versicolor*.

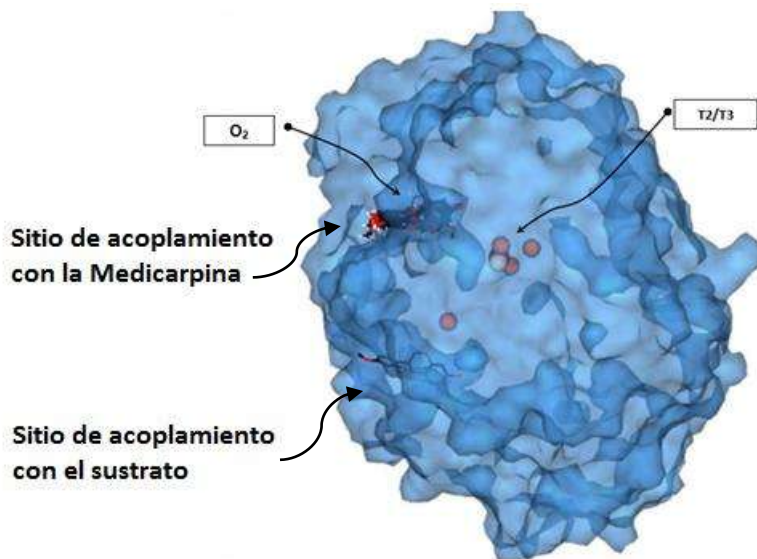


Figura 2.1.2. Acoplamiento entre la enzima Lacasa y la Medicarpina.

2.2 Medicarpina.

3-hidroxi-9-metoxipterocarpano, es un compuesto perteneciente a la familia de los isoflavonoides, específicamente a la subdivisión de los pterocarpanos cuya fórmula condensada es C₁₆H₁₄O₄.

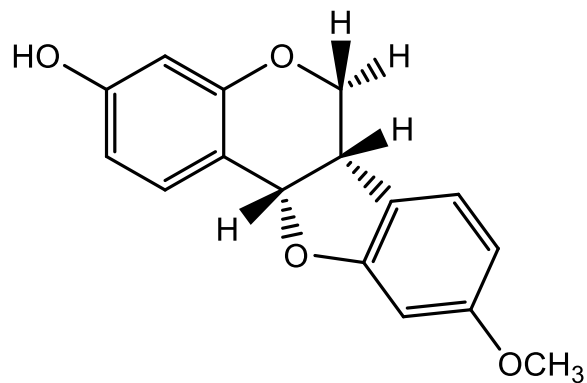


Figura 2.2.1. Estructura Química de la (+)-Medicarpina.

La Medicarpina se ha reportado su obtención de los géneros *Lathyrus*, *Medicago*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Andira* y *Dalbergia* especies (*Leguminosae*) (**Harborne, 1999**). Algunas de estas especies se consideran maderas finas y son nativas de los bosques del Estado de Michoacán, como es el caso de *Dalbergia spp* y *Andira inermis*.

Estudios anteriores han demostrado que la Medicarpina estimula la diferenciación de osteoblastos y mineralización a concentraciones menores a 10^{-10} M. Estas investigaciones arrojaron el resultado de que este compuesto produce un aumento de la formación de células osteoprogenitoras en la médula ósea y la formación de osteoide (superficie de mineralización, las tasas de formación de aposición mineral/hueso), por lo que este isoflavonoide puede ser un potencial agente osteogénico (**Bhargavan, 2012**).

Este isoflavonoide ha mostrado actividad nematicida contra *Caenorhabditis elegans*, presentando una DL50 de 25 $\mu\text{g/mL}$. Ensayos con extractos de raíz de *Taverniera abyssinica* A. Rich (*Leguminosae*), presentaron esta actividad y a partir de estos, se aisló la Medicarpina como la responsable de la actividad (**Stadler, 1994**).

Liu y colaboradores (**2002**) demostraron que la Medicarpina presenta inducción de la apoptosis en células mononucleares de sangre periférica a concentraciones de 10 $\mu\text{g/mL}$, además de presentar también efecto inductivo de la apoptosis en fibroblastos de pulmón humano.

En nuestro grupo de trabajo se realizaron ensayos con el duramen del árbol *Andira inermis*; tanto los extractos hexánico y de acetato de etilo obtenidos del árbol presentaron un porcentaje de inhibición del 100% frente al hongo de pudrición blanca *Trametes versicolor* a concentraciones de 250 y 500 mg/L , de estos extractos se aisló la Medicarpina y a partir de esta se preparó su derivado acetilado el cual inhibió el hongo totalmente a la concentración de 100 mg/L (**Quevedo, 2012**).

Dentro de las especies enlistadas (**Tabla 1**), se resaltan los árboles Tepehuaje (*Lysiloma acapulcense*) y Palo dulce (*Eysenhardtia polystachya*), ya que son las especies que se estudiaron en este proyecto, debido a que ambos son reconocidos por parte de los habitantes de la comunidad donde se recolectaron (Taretán, Michoacán), por ser árboles muy resistentes a la degradación.

2.3 *Lysiloma acapulcense*

Conocido como Tepehuaje, es un árbol de hasta 20 metros de altura, con copa redondeada, cuyo tronco llega a tener un diámetro de 75 cm (**Figura 2.3.1**).



Figura 2.3.1. Árbol *Lysiloma acapulcense* conocido como Tepehuaje.

Sinonimia: *Acacia acapulcensis* Kunth; *Acacia desmostachys* Benth; *Lysiloma cuneata* Britton y Rose; *L. desmostachya*; *L. jorullensis*; *L. platycarpa*; *L. purpusii*.

Nombres comunes: Tepehuaje, wayal, wayal te'.

Esta especie se encuentra distribuida desde el centro y sur de México (**Figura 2.3.2**) por toda Centro América y en las Antillas, desde la selva baja y mediana caducifolias (bosque seco caducifolio) en suelos pobres y rocosos (**Árboles de Centro América**).



Figura 2.3.2. Distribución geográfica de *Lysiloma acapulcensis* en la República Mexicana (**Pennington, 2005**).

USOS

Su madera se usa para construcciones y como poste en cerca debido a su durabilidad y resistencia a la degradación.

Su principal uso medicinal es para tratar la diarrea, en Guerrero y Jalisco se emplea el cocimiento de la corteza. En Sonora se menciona útil para curar heridas y ampollas.

En la corteza del tallo de *Lysiloma acapulcensis* se ha demostrado la presencia de taninos y del esteroil beta-sitosterol (**Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009**).

En el año de 1995, Reyes y colaboradores evaluaron la resistencia de la madera de *Lysiloma acapulcensis* frente al ataque de termitas *Heterotermes sp.* Se evaluó la durabilidad de tabloncillos de 2.5 x 2.5 x 5 cm de esta especie, los cuales fueron expuestos por 15 meses al ataque de las termitas, donde se obtuvo como resultado que esta especie de árbol se clasificó como resistente al ataque por termitas del género *Heterotermes*.

Navarro y colaboradores en el año 2003 realizaron ensayos para probar la actividad antifúngica de los extractos hexánicos y metanólicos obtenidos de esta especie, los cuales se probaron contra hongos que provocan micosis en humanos como: *Aspergillus niger*, *Trychophyton mentagrophytes*, *Trychophyton rubrum* y *Candida albicans*. Donde se reporta que sólo los extractos metanólicos presentaron actividad antifúngica contra los 4 hongos mencionados.

Se han realizado estudios de las propiedades físico-mecánicas de la madera de Tepehuaje, donde el valor promedio de la densidad de la madera que se determinó fue de 0.76 g/cm³ correspondiendo a la clasificación de muy alta. Así, una alta densidad de la madera influye en alta resistencia mecánica lo que podría influir en la alta durabilidad de la especie frente la degradación (**Mondragón, 2010**).

2.4 *Eysenhardtia polystachya*

Arbusto o árbol perteneciente a la familia de las Leguminosas, mide de 2 a 8 metros de altura (**Figura 2.4.1**) cuyas ramas jóvenes se recubren con pelos finos, sus hojas son divididas con apariencia plumosa, presenta flores blancas, olorosas, agrupadas en racimos apretados y verticales. Los frutos son unas vainas café pálido, lisas y puntiagudas. La madera de color café rojizo es muy dura.



Figura 2.4.1. Árbol *Eysenhardtia polystachya*.

Nombres comunes:

Chiquiliche, coatillo, palo cuate, palo dulce, rosilla, taray, vara dulce, varaduz. Distrito Federal: ursa, Guerrero: yitu bishi, coatli, Nayarit: bisasa; Oaxaca: 'ma soo; San Luis Potosí: chilab te', tsakam wayal (**Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009**).

Abundante en zonas semicálidas, con temperaturas entre 12 y 19 °C y una precipitación anual de 300 a 1800 mm. Se encuentra ampliamente distribuido en los estados de Colima, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, D.F., Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas.

A este árbol se le atribuyen propiedades medicinales, se usa en problemas renales incluyendo los cálculos y como desinflamatorio. En el remedio se utilizan las hojas y tallos en cocimiento. En algunos casos es usado como desinfectante de ojos, para lavar heridas y contra la diabetes. Popularmente se le atribuyen propiedades diuréticas y anticonceptivas.

En el tallo de *E. polystachya* se han identificado los flavonoides dimetoxi-metilendioxi-pterocarpano y dehidrorotenona, el esteroil beta-sitosterol. En la corteza del tallo se han detectado los mismos componentes además del triterpeno beta-amirina. En el duramen el flavonoide hidrox-trimetoxi-isoflavona, y en la madera del tronco, los flavonoides coatline A y B y la cumarina flemichaparín C (**Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009**).

Álvarez y colaboradores (**1998**) reportan el aislamiento de dos isoflavonoides de la corteza de este árbol; (3S)-7-hidroxi-2',3',4',5',8-pentametoxisoflavonoide (**6**) y el (3S)- 3',7-dihidroxi-2',4',5',8-tetrametoxisoflavonoide (**7**) (**Figura 2.4.2**), además de estigmasterol, isoduartin (7,2'-dihidroxi-8,3',4'-trimetoxisoflavonoide) y cuneatin.

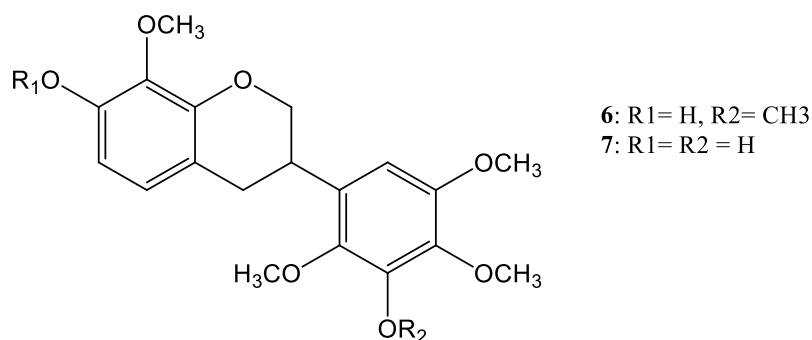


Figura 2.4.2. Estructura de los dos flavonoides reportados por Álvarez y col. 1998.

Pérez (2002) reportó el aislamiento de dos isoflavonoides 7-hidroxi-2',4',5'-trimetoxiisoflavona (**11**) y 7-hidroxi-4'-etoxiisoflavona (**12**) (Figura 2.4.3), aislados de la madera de palo dulce, los cuales presentaron un efecto inhibitorio en la formación y crecimiento de cristales de oxalato y fosfato de calcio en orina humana, reduciendo el grado de agregación y el tamaño de la partícula precipitada.

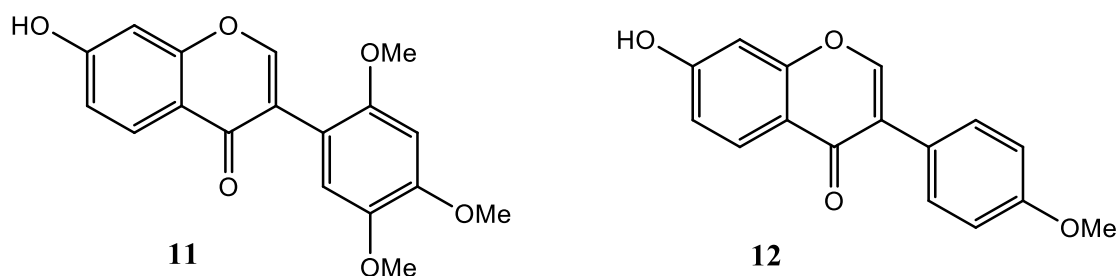


Figura 2.4.3. Isoflavonoides con actividad inhibitoria en la formación y crecimiento de cristales de oxalato, aislados de *Eysenhardtia polystachya*.

Pablo (2009), reportó en un estudio fitoquímico que los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios que se exhiben habitualmente en el palo dulce. Estudios posteriores de este autor demostraron que las fracciones ricas en flavonoides de *Eysenhardtia polystachya* indujeron actividad antiinflamatoria y no provocaron alteraciones morfológicas ni histológicas en ratas tratadas con fracciones obtenidas del extracto etanólico de corteza del árbol.

Si bien la búsqueda de compuestos activos de origen natural puede darnos una infinidad de estructuras clave con actividad biológica definida, la funcionalización de compuestos que ya se tiene reportado que son activos, puede darnos mejor respuesta o potencializar algún efecto. Además la modificación de los productos naturales mediante distintos procesos de síntesis ha proporcionado fármacos semi-sintéticos útiles (Remington, 2000).

2.5. Relación estructura actividad.

La optimización de la potencia y el perfil farmacológico de un determinado compuesto químico con actividad biológica, se puede llevar a cabo mediante síntesis de análogos, isómeros o la modificación de grupos funcionales o del sistema de anillos de la molécula (Gabils, 2004).

La actividad de un compuesto depende del tamaño, la forma y el grado de ionización de la molécula, ya que estos parámetros determinan si se realiza o no la unión fármaco-receptor. Estos parámetros se estudian creando análogos o introduciendo modificaciones en la molécula original (Remington, 2000). Por ende estos cambios pueden aumentar o disminuir de forma notoria las afinidades de los compuestos nuevos para las diferentes clases de receptores, con la consiguiente modificación de sus efectos (Katzung, 1991). Así, los compuestos que tienen mayor número de sitios de interacción (Grupos funcionales) con su receptor permanecen mayormente unidos a él, que aquellos compuestos que tienen pocos sitios de interacción, lo que se traduce en la potencialización de la actividad (Patrick, 2008).

Se ha observado que la afinidad lipofílica de algunos compuestos incrementa su actividad, como es el caso de los pterocarpanos, cuya actividad antifúngica se favorece con el incremento de la lipofilicidad, debido a que esto permite que los compuestos puedan penetrar a través de la membrana de los hongos (**Harborne, 1978**). Con el fin de aumentar la lipofilicidad, Tempesti y colaboradores (**2012**) prepararon un nuevo derivado de la quercetina con la adición de un grupo CF_3 , este nuevo derivado mostró mayor efectividad que su compuesto de partida contra *Candida albicans*.

Hirano y colaboradores (**1967**) calcularon la densidad electrónica de los orbitales nucleofílicos de frontera en bactericidas derivados del nitrofurano verificando que los átomos de nitrógeno y oxígeno del grupo nitro constituyen sitios que aceptan electrones y que su actividad bactericida se debe a esta propiedad.

III. JUSTIFICACIÓN

Las maderas finas nativas de nuestro Estado son conocidas por su resistencia a la degradación fúngica, dado que los metabolitos secundarios de las plantas juegan un papel muy importante en su protección contra agentes patógenos, ha llevado al interés por descubrir cuáles son los compuestos que están participando en dicho efecto.

Uno de los metabolitos es la Medicarpina cuya actividad antifúngica ha sido evaluada con anterioridad (**Martínez, 2011**), y su derivado acetilado se ha demostrado que presenta efecto antifúngico a menor concentración que la presentada por la Medicarpina (**Quevedo, 2012**), por lo cual al sintetizar otros derivados de este compuesto se pondrá en manifiesto el efecto que muestra sobre su actividad antifúngica.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la actividad antifúngica del duramen de dos maderas finas (*Lysiloma acapulcense* y *Eysenhardtia polystachya*) e identificar el o los compuestos que están involucrados en dicho efecto, el cual se comparará con los derivados funcionalizados de Medicarpina.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Obtener extraíbles del duramen de *L. acapulcense* y *E. polystachya* y ensayar su actividad inhibitoria frente al hongo *Trametes versicolor*.
- Purificar los extractos que presenten actividad antifúngica y analizarlos por RMN, IR y Masas para la elucidación estructural de los compuestos responsables de esta actividad.
- Preparar derivados funcionalizados de Medicarpina (**Figura 5.4.1**) y evaluar su actividad antifúngica contra *Trametes versicolor*.
- Realizar estudio comparativo de la actividad antifúngica de los derivados funcionalizados de la medicarpina con los extraíbles del duramen de maderas finas, mediante las pruebas de inhibición del hongo *T. versicolor*.

V. METODOLOGÍA

5.1 Obtención de extraíbles.

El duramen de las maderas en estudio (*Lysiloma acapulcensis* y *Eysenhardtia polystachya*) se astillaron y molieron hasta obtener un polvo fino como harina, la cual se tamizó con malla número 40, esta harina se compactó en dedal de celulosa y colocó en equipo Soxhlet con 150 mL de solvente para posterior reflujo de 4 horas.

Se realizaron extracciones sucesivas, aumentando la polaridad de los solventes utilizados, los cuales se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 5.1. Solventes utilizados para la obtención de extractos a partir del duramen de las especies en estudio.

| Solvente | Cantidad mL |
|------------------|-------------|
| Hexano | 150 |
| THF | |
| Acetato de etilo | |

Posterior al tiempo de reflujo se concentró y se obtuvieron los extractos totales.

5.2 Determinación de la actividad biológica de los extractos crudos.

Los extractos obtenidos de cada madera se probaron para ver si presentaban actividad antifúngica, esto se realizó por medio de la prueba de difusión en placa de los extractos y posterior inoculación del micelio del hongo.

Se prepararon placas de agar papa-dextrosa y se les incorporaron los extractos para tener una concentración de 250 y 500 mg/L de cada uno. De igual manera se desarrolló un control, el cual consistió en el agar sin tratamiento; un control positivo, en el cual se usó la Medicarpina a la concentración de 150 mg/L y un control con acetona, ya que esta se utilizó para disolver los extractos previos a la incorporación al agar. Una vez solidificado el agar, se inoculó con micelio del hongo y se incubaron por 7 días a 28 ± 2 °C y posterior a este tiempo, se determinó el porcentaje de inhibición que presentaron los extractos con la fórmula siguiente (**Rutiaga, 2001; Martínez, 2011**).

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

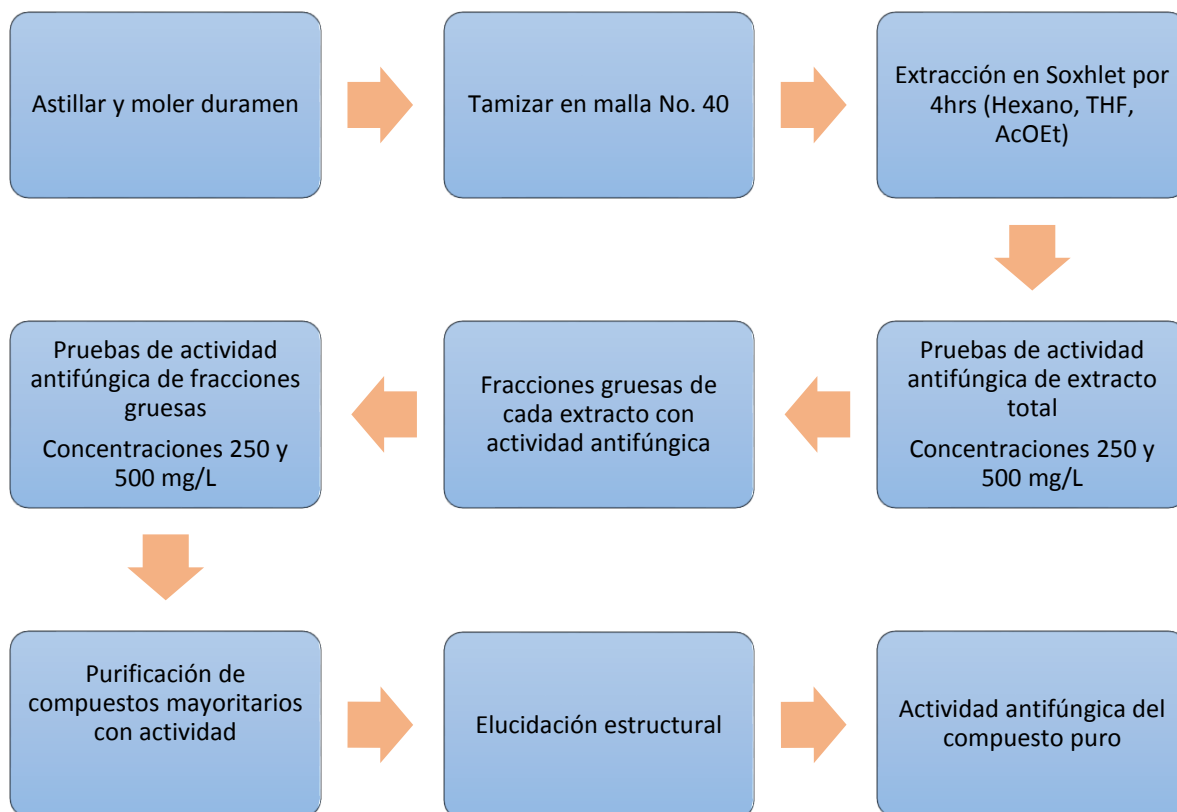
Los extractos que presentaron actividad biológica se seleccionaron para posterior purificación por cromatografía en columna.

5.3 Separación de los componentes mayoritarios de los extractos con actividad biológica.

Cada extracto se purificó por cromatografía en columna, utilizando como fase estacionaria gel de sílice (70-230 malla) y como fase móvil mezcla de solventes de polaridades crecientes.

Los compuestos mayoritarios separados, se utilizaron para realizar una nueva prueba de actividad antifúngica siguiendo la metodología de la sección 5.2. Aquellos que presentaron actividad, se procedió su elucidación estructural por métodos espectroscópicos, y se compararon con la bibliografía.

La metodología se resume en el esquema 5.



Esquema 5. Metodología para el estudio químico y evaluación antifúngica del duramen de maderas finas.

5.4 Obtención de Medicarpina.

Partiendo del duramen del árbol *Andira inermis* se obtuvo un extracto mediante maceración de las astillas con mezcla de hexano-cloruro de metileno 3:2. El extracto se purificó por medio de columna cromatográfica usando mezcla de hexano-acetato de etilo 4:1 para así obtener los cristales de Medicarpina. Se corroboró la obtención de la misma mediante RMN de ^1H y por comparación con los datos de la bibliografía (Martínez, 2011).

5.4.1 Preparación de derivados de Medicarpina.

Los cristales de Medicarpina se sometieron a las condiciones de reacción pertinentes para obtener los derivados deseados (**Figura 5.4.1**), una vez obtenidos, se evaluó la actividad antifúngica de los nuevos derivados a concentraciones de 50,100 y 150 mg/L.

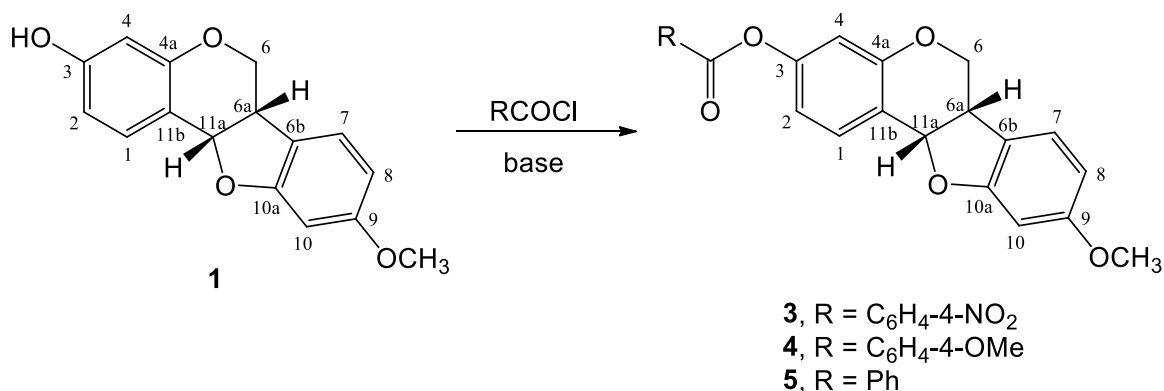


Figura 5.4.1. Condiciones de reacción para la obtención de derivados funcionalizados de Medicarpina.

Los sustituyentes escogidos serán para determinar el efecto de la demanda electrónica de los grupos en la actividad biológica que presente la molécula.

VI. RESULTADOS

6. Estudio del duramen de las dos especies forestales y evaluación antifúngica.

6.1. *Lysiloma acapulcense*

El duramen del árbol *Lysiloma acapulcense* conocido como Tepehuaje, se astilló y molió hasta obtener una harina fina la cual se tamizó en malla número 40 (equivalente a 40 orificios por pulgada). La harina obtenida se colocó en dedal de celulosa y se montó en equipo soxhlet para posterior extracción con solventes. Los resultados se presentan en la Tabla 6.1.1.

Tabla 6.1.1. Porcentaje de extraíbles obtenidos del árbol *Lysiloma acapulcense* (Tepehuaje), mediante reflujo en equipo soxhlet por 4 horas, lote de 16.156 g de harina del duramen.

| Solvente | Peso extractos (g) | % | % Total extraíbles |
|------------------|--------------------|-------|--------------------|
| Hexano | 0.017 | 0.10 | 20.23 |
| THF | 2.971 | 18.38 | |
| Acetato de etilo | 0.283 | 1.75 | |

Los extractos presentaron una consistencia de miel y de coloración que va del amarillo claro hasta marrón (**Figura 6.1.1**).



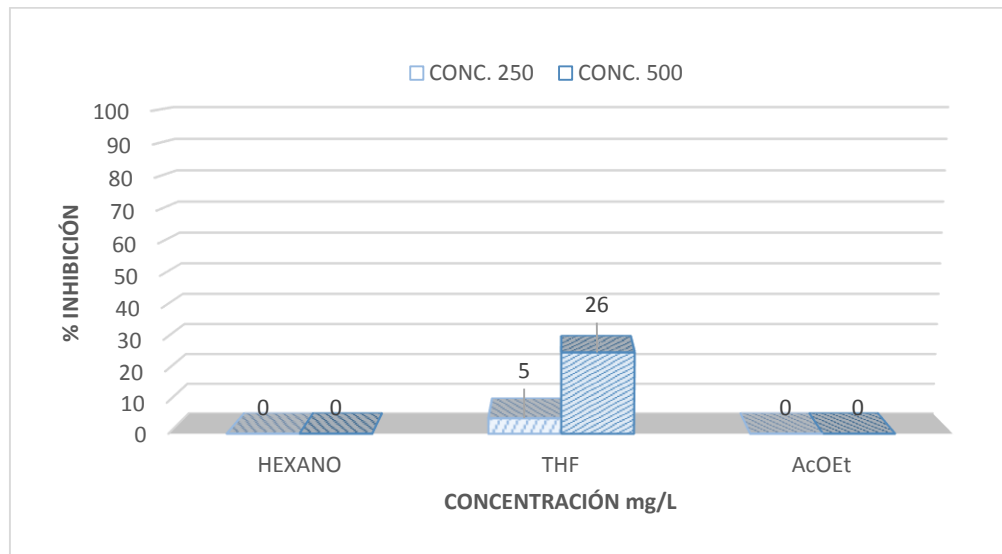
Figura 6.1.1. Aspecto de los extractos obtenidos del duramen de Tepehuaje.

El extracto hexánico presentó una coloración amarillo claro con presencia de pequeñas partículas sólidas.

El extracto obtenido con THF, el cual fue el que presentó mayor cantidad en peso de extraíbles, este extracto presentó una coloración marrón-rojiza y aspecto mieloso, mientras que el extracto obtenido con acetato de etilo, presentó un color marrón oscuro.

De cada extracto se obtuvo el espectro de RMN de ^1H correspondiente y se utilizaron para realizar pruebas de actividad antifúngica (**Gráfica 6.1.1**). Cada extracto se disolvió en 0.5 mL de acetona, para incorporarse al agar papa dextrosa a concentraciones de 250 y 500 mg/L. Se realizó un ensayo con agar sin tratamiento como control negativo y un ensayo con 0.5 mL de acetona incorporada en el agar, esto con el fin de ver si la cantidad de acetona usada para disolver los extractos interfería en la prueba.

Una vez solidificado el agar se cortaron cubitos de 3 por 3 mm del micelio del hongo *T. versicolor* y se inocularon las placas de agar con el micelio, las cuales se incubaron a 28 ± 2 °C durante 7 días debido a que son los días necesarios para que el hongo control crezca lo suficiente para hacer la medición y comparación del crecimiento respecto del hongo inoculado en los agares tratados.



Gráfica 6.1.1. Porcentaje de inhibición de los extractos obtenidos del duramen de Tepehuaje contra el hongo *Trametes versicolor*.

El único extracto que presentó actividad contra el hongo fue el obtenido con THF y se observó que la cantidad de acetona que se utilizó para disolver los extractos no afectó el crecimiento del hongo, ya que no hubo diferencia del crecimiento respecto al control, por lo que se continuó usando la acetona para disolver los extractos previos a incorporarlos al agar.

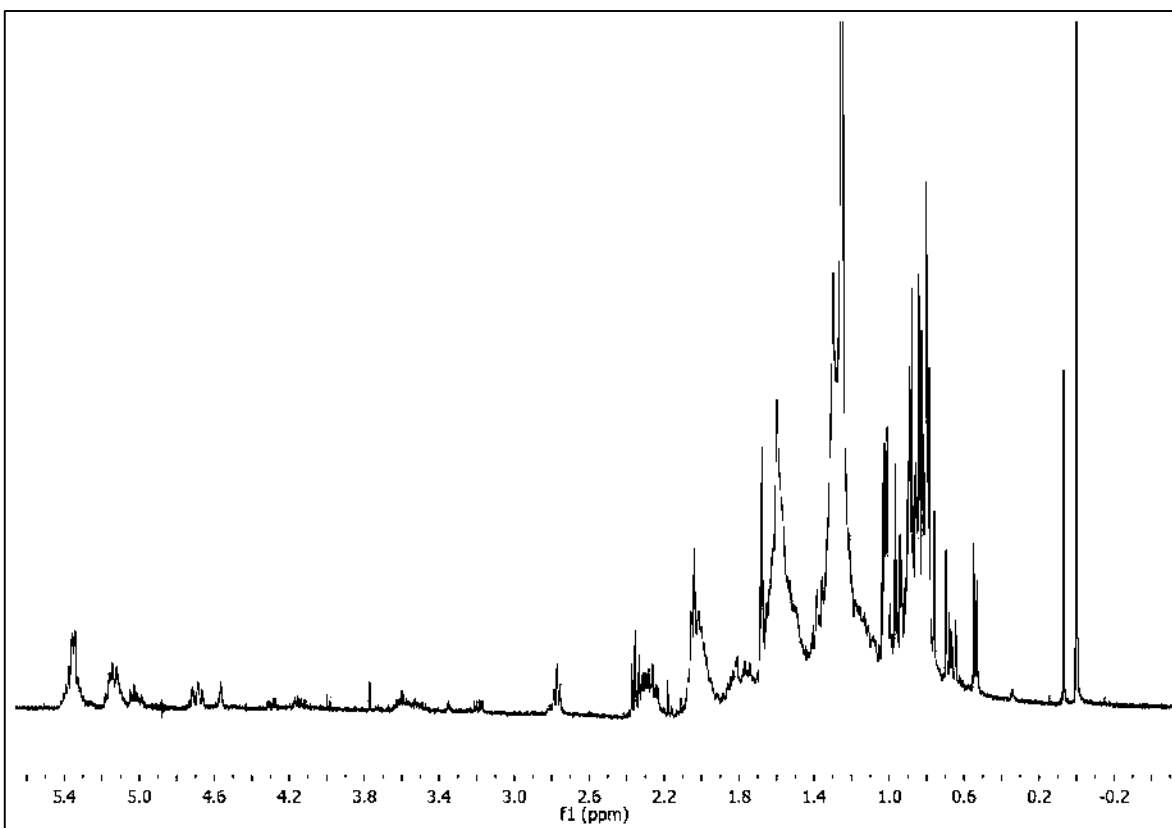


Figura 6.1.2. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz, en CDCl_3) de extracto obtenido con hexano a partir de duramen de Tepehuaje.

En el extracto hexánico se observan señales a campo alto, correspondientes a hidrógenos alifáticos, los cuales los encontramos en el rango de 0.5 a 2.0 ppm, además se observan hidrógenos bases de heteroátomo en el rango de 3.0 a 4.5 ppm.

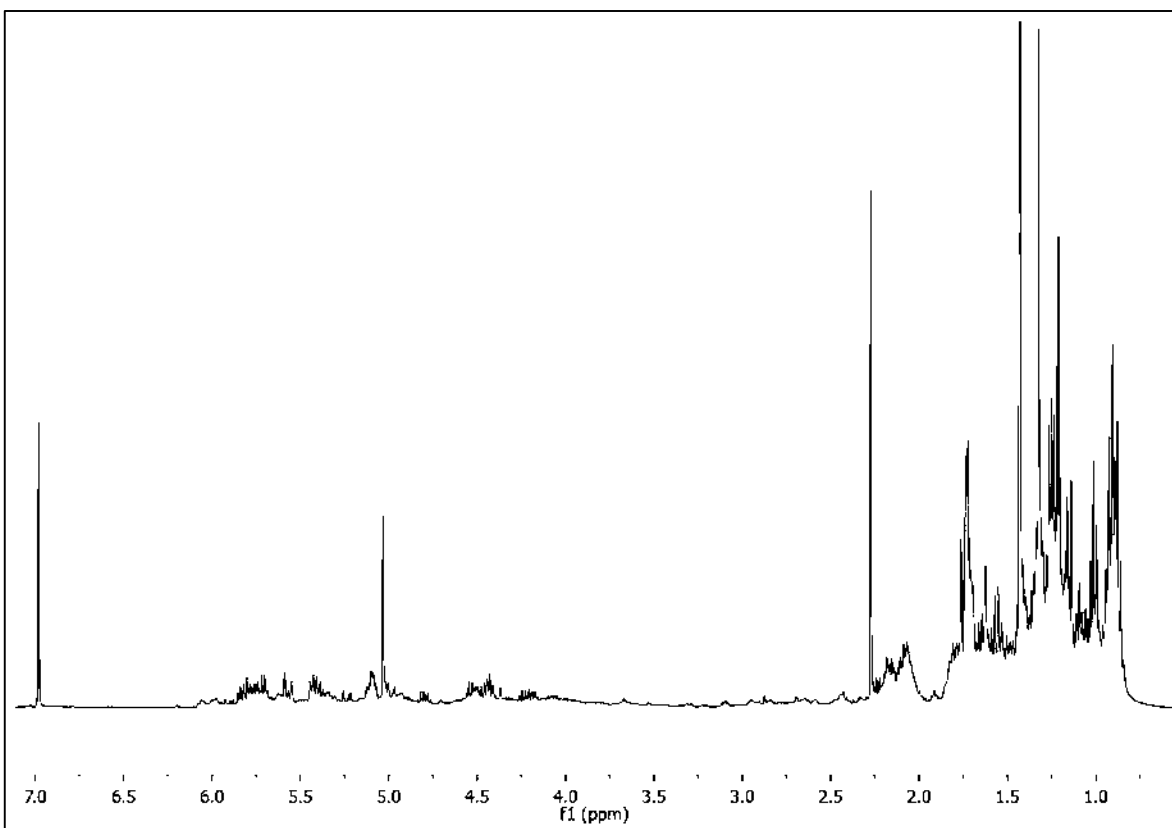


Figura 6.1.3. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz, en acetona-D) de extracto obtenido con THF del duramen de Tepehuaje.

En el espectro del extracto obtenido con THF se siguen observando señales a campo alto correspondientes a hidrógenos alifáticos y aparecen señales en la región de los hidrógenos vinílicos que aparecen desde 4.0 a 7.0 ppm.

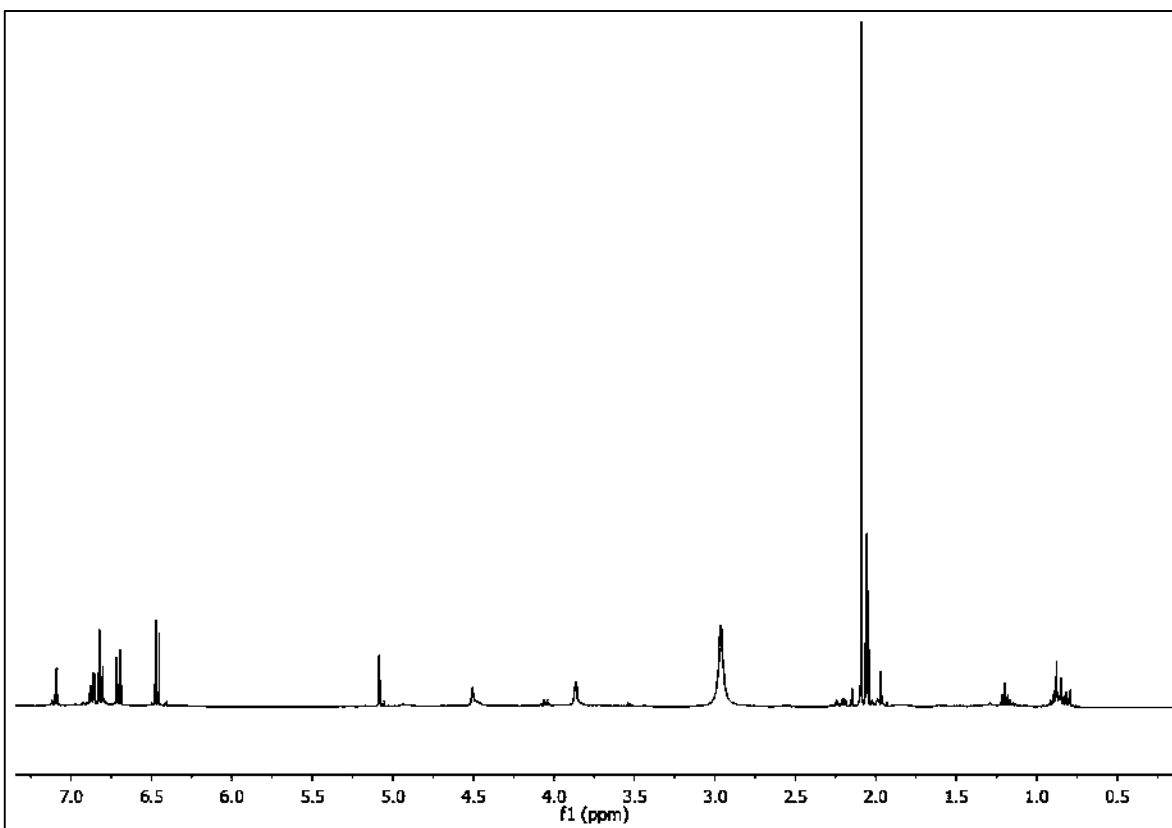


Figura 6.1.4. Espectro de RMN-¹H (400 MHz, en acetona-D) de extracto obtenido con acetato de etilo a partir del duramen de Tepehuaje.

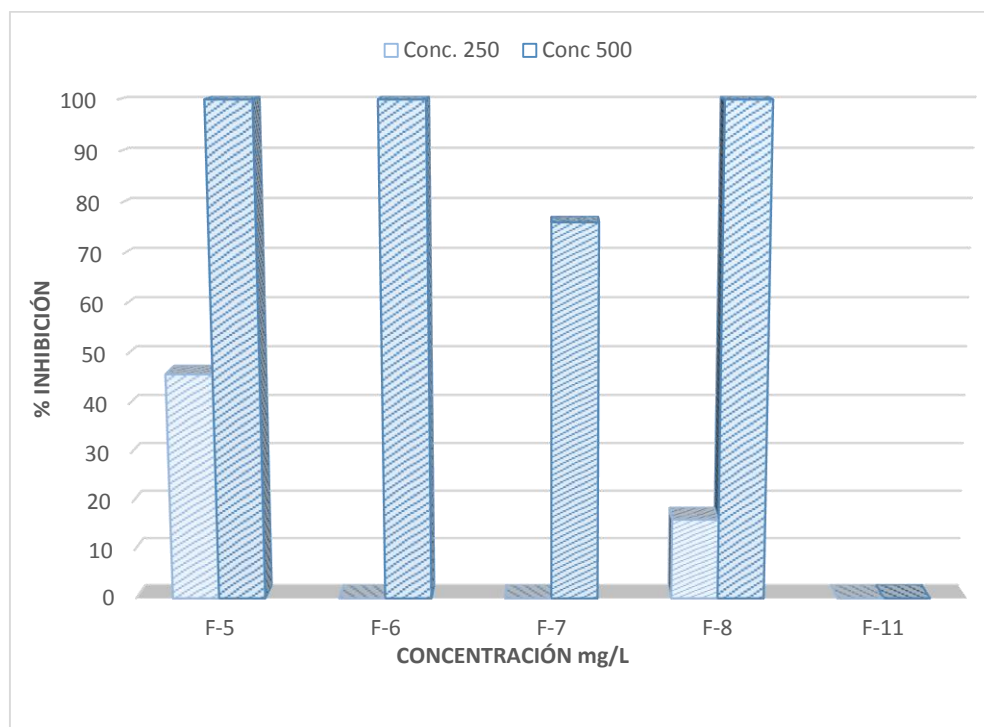
El extracto obtenido con acetato de etilo se observa como una mezcla menos compleja en comparación con los dos extractos anteriores; muestra señales entre 0.50 a 1.30 ppm correspondientes a hidrógenos alifáticos, cerca de 2.00 ppm se observan señales simples que pueden corresponder a hidrógenos de acetilo, además se observan señales a campo bajo correspondientes a hidrógenos aromáticos. No se identificó el o los compuestos contenidos en este extracto debido a que no presentó actividad inhibitoria contra *T. versicolor*.

Se continuó el análisis del extracto activo (THF), del cual se obtuvieron 9 fracciones gruesas (de la fracción 1 a 3 no se obtuvo extracto), de 150 mL cada una, las cuales se resumen en la Tabla 6.1.2.

Tabla. 6.1.2. Fracciones gruesas de extracto obtenido con THF del duramen de Tepehuaje.

| Fracción | Polaridad |
|-----------------|---------------------|
| 1 | Hexano |
| 2 | hexano:AcOEt (19:1) |
| 3 | hexano:AcOEt (9:1) |
| 4 | hexano:AcOEt (17:3) |
| 5 | hexano:AcOEt (4:1) |
| 6 | hexano:AcOEt (7:3) |
| 7 | hexano:AcOEt (3:2) |
| 8 | hexano:AcOEt (1:1) |
| 9 | AcOEt:Hexano (3:2) |
| 10 | AcOEt:Hexano (7:3) |
| 11 | Acetato de etilo |
| 12 | Metanol |

A cada una de las fracciones gruesas obtenidas se les evaluó su actividad antifúngica a concentraciones de 250 y 500 mg/L. Las fracciones que presentaron un espectro de RMN-¹H similar se juntaron, como fue el caso de fracciones 4 con 5, y fracciones 8 a 10. Los resultados se esquematizan en la Gráfica 6.1.2.



Gráfica 6.1.2. Evaluación de la actividad antifúngica de las fracciones gruesas obtenidas del extracto de THF del duramen de Tepehuaje.

La mayoría de las fracciones presentaron inhibición contra el hongo *T. versicolor*, a la concentración de 500 mg/L, mientras que a la concentración 250 mg/L sólo las fracciones 5 y 8 presentaron el 46 y 16.4% de inhibición respectivamente (**Gráfica 6.1.2**). Algo que se resalta, es que de la fracción 4 hasta la 10 se observa la presencia de un compuesto cuyo patrón de señales en RMN de ^1H es a 1.43 ppm (18 H, s), 2.27 ppm (3H, s), 5.01 ppm (1H, s) y 6.98 ppm (2H, s) (**Figura 6.1.5**).

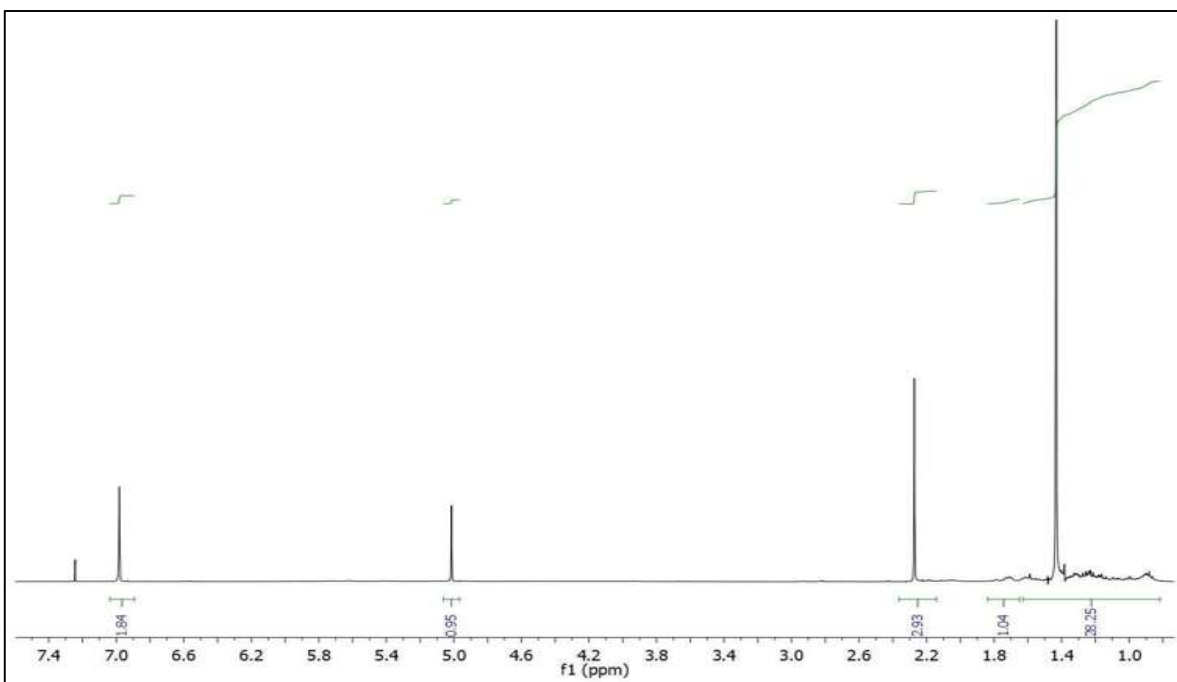


Figura 6.1.5. Espectro de RMN-¹H (400 MHz, en CDCl₃) fracciones 4 y 5, extracto obtenido con THF a partir del duramen de Tepehuaje.

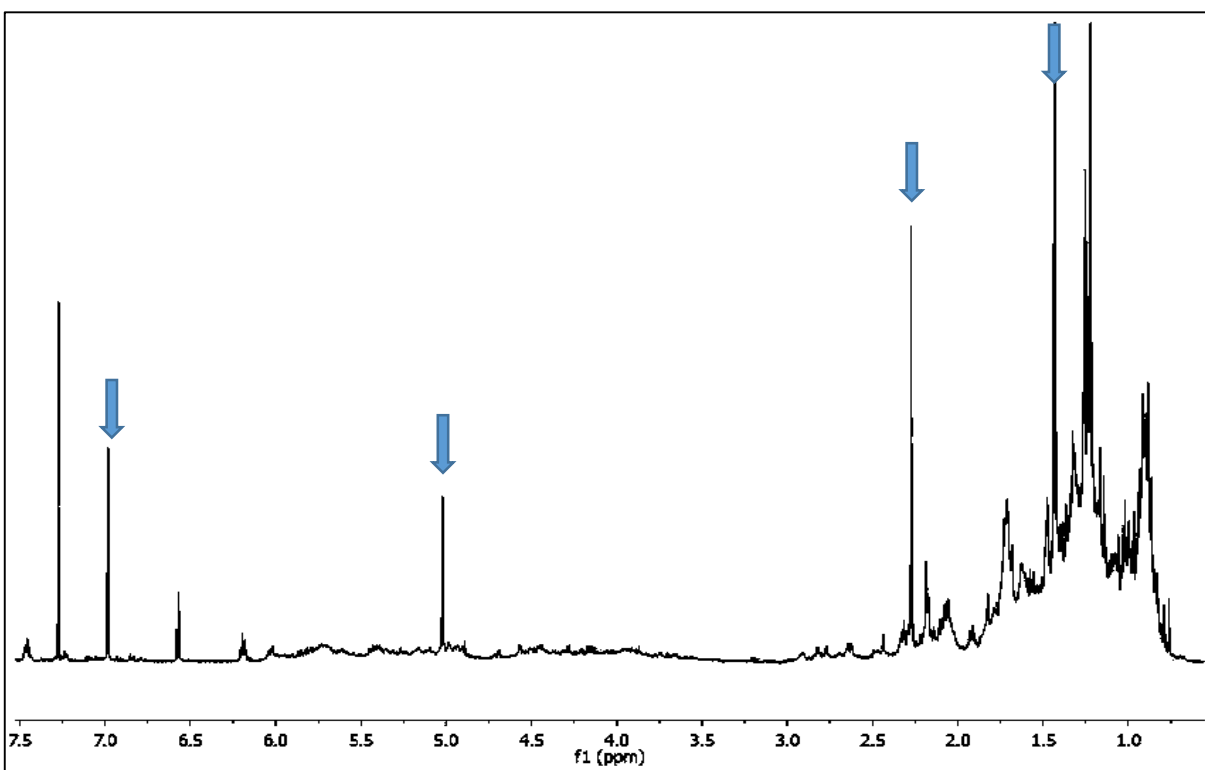


Figura 6.1.6. Espectro de RMN-¹H (400 MHz, en CDCl₃) fracción 6, extracto obtenido con THF a partir del duramen de Tepehuaje.

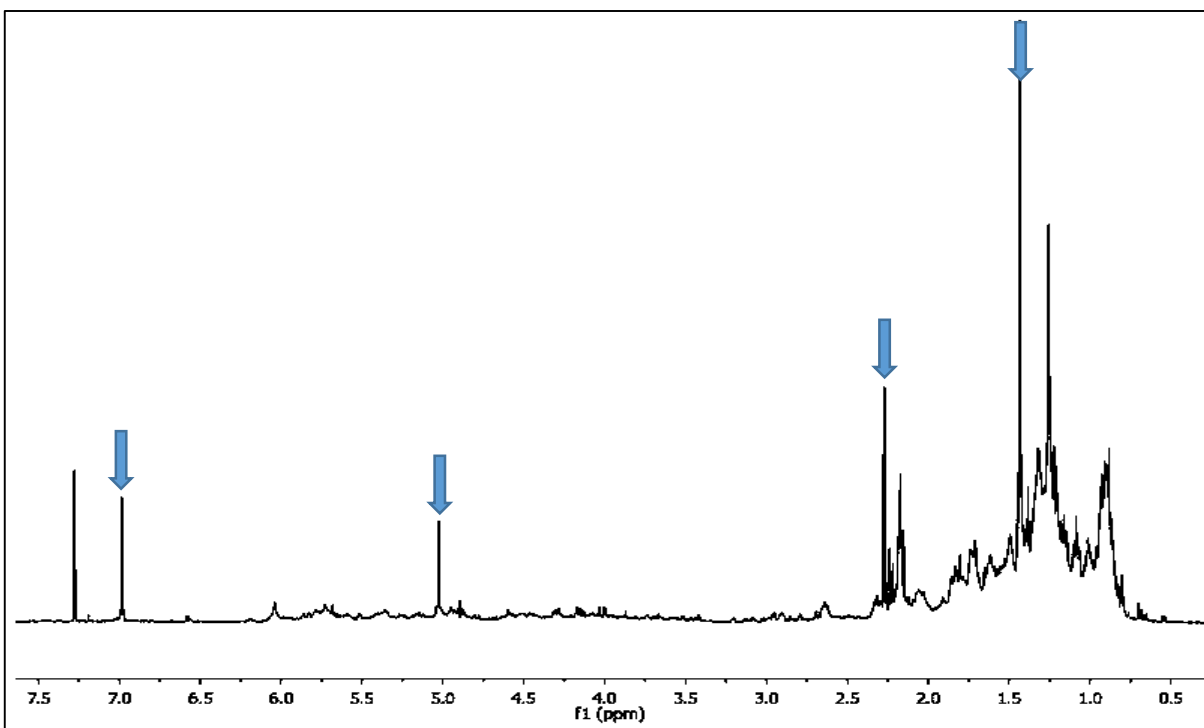


Figura 6.1.7. Espectro de RMN-¹H (400 MHz, en acetona-D) fracción 7, extracto obtenido con THF a partir del duramen de Tepehuaje.

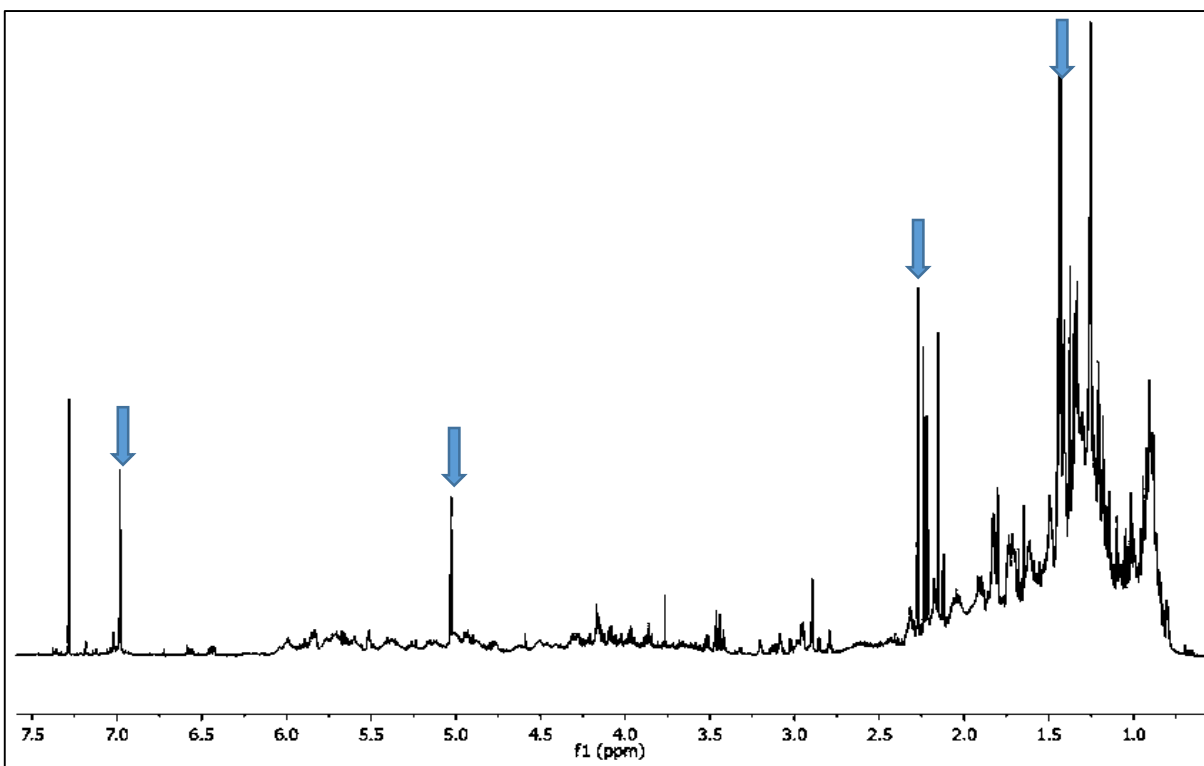


Figura 6.1.8. Espectro de RMN-¹H (400 MHz, en acetona-D) fracciones 8 a 10, extracto obtenido con THF a partir del duramen de Tepehuaje.

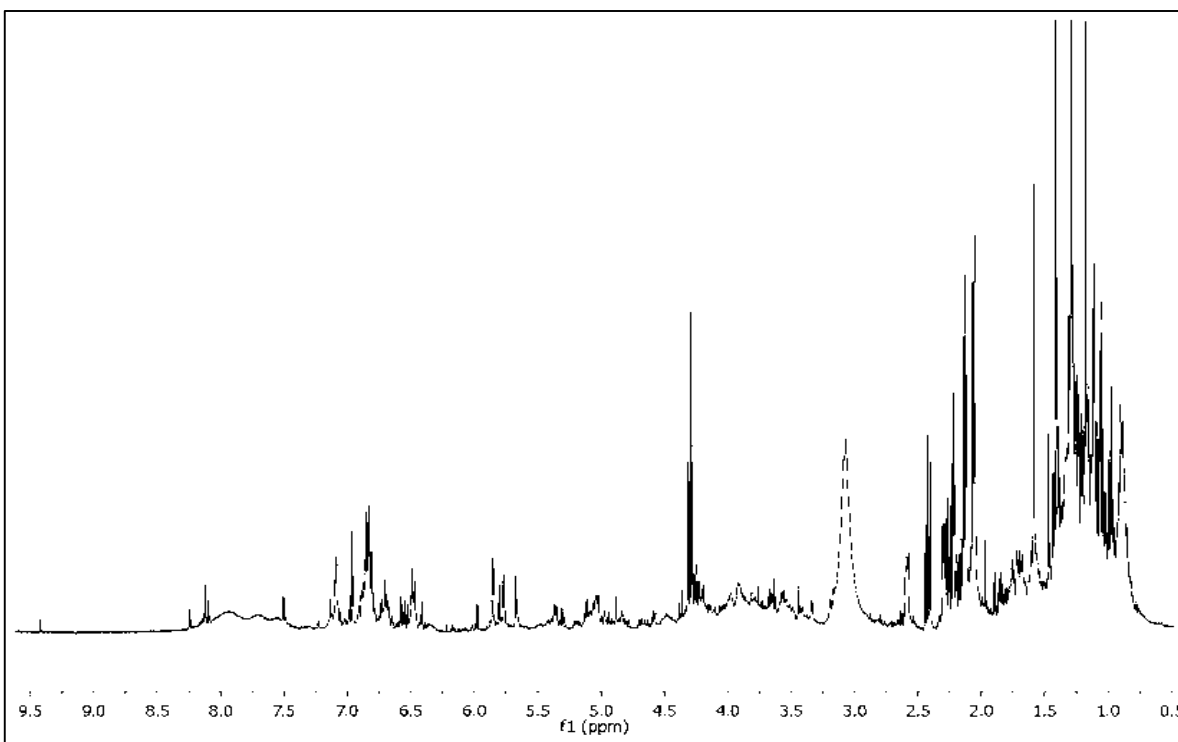


Figura 6.1.9. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz, en acetona-D) fracción 11, extracto obtenido con THF a partir del duramen de Tepehuaje.

De acuerdo con los resultados de la Gráfica 6.1.2 y comparándolos con los espectros de RMN de ^1H , todas las fracciones que tuvieron actividad contra el hongo (Fracciones 4 a 10) presentan un compuesto en común, a diferencia de la fracción 11, donde no se presenta este compuesto (**Figura 6.1.9**), la cual no presentó actividad por lo que se infirió que el compuesto presente en el espectro de RMN de ^1H de la Figura 6.1.5 está implicado en la actividad antifúngica que presentaron los extractos que lo contienen.

Continuando con el estudio de las maderas finas, se presentan los resultados del árbol *Eysenhardtia polystachya*, con el cual se siguió la misma metodología de estudio químico y evaluación antifúngica (**Esquema 5**) que se llevó a cabo con el árbol *Lysiloma acapulcensis*.

6.2. *Eysenhardtia polystachya*

Los resultados de los extracto totales obtenidos del duramen de Palo dulce se presentan en la tabla siguiente.

Tabla 6.2.1. Porcentaje de extraíbles obtenidos del árbol Palo dulce mediante reflujo de 4 horas en equipo Soxhlet, lote de 25.095 g de harina del duramen.

| Solvente | Peso extractos (g) | % | % Total extraíbles |
|------------------|--------------------|-------|--------------------|
| Hexano | 0.093 | 0.37 | 25.95 |
| THF | 6.197 | 24.70 | |
| Acetato de etilo | 0.221 | 0.88 | |

Los extractos obtenidos de la madera de Palo dulce presentaron un aspecto mieloso, el extracto hexánico se observó de un color amarillo-anaranjado; el extracto de acetato de etilo presentó coloración café oscuro y ambos se obtuvieron en menor porcentaje respecto al extracto de THF del cual se obtuvo en mayor proporción y presentó coloración café (**Figura 6.2.1**).

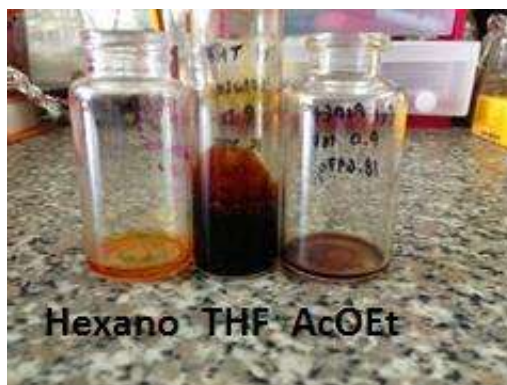
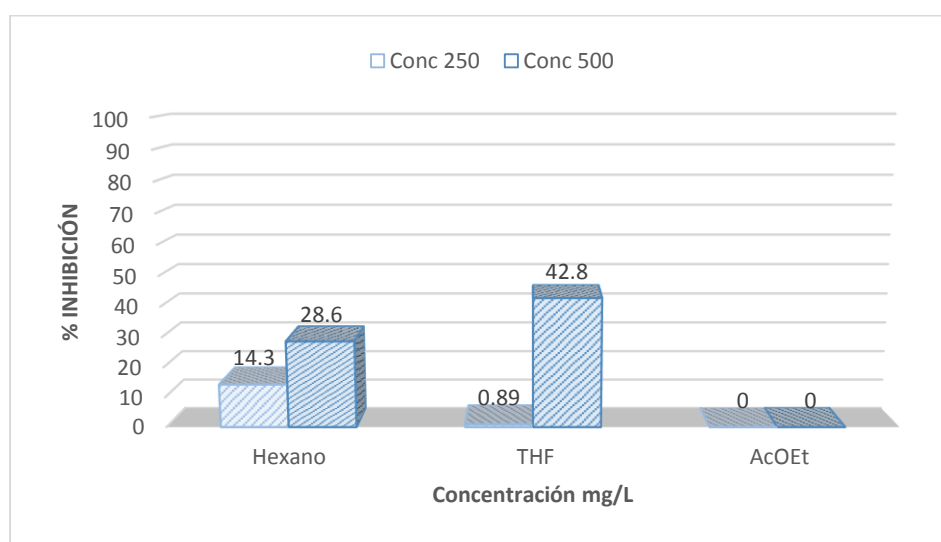


Figura 6.2.1. Extractos del duramen de Palo dulce.

De cada extracto se realizó la prueba de actividad antifúngica contra el hongo *T. versicolor*. Cada uno se probó a concentraciones de 250 y 500 mg/L (**Gráfica 6.2.1**).



Gráfica 6.2.1. Porcentaje de inhibición de extractos obtenidos del duramen de palo dulce contra *T. versicolor*.

El extracto hexánico presentó a ambas concentraciones cierto porcentaje de inhibición; el extracto obtenido con THF presentó el mayor porcentaje de inhibición del 42.8 % a la concentración mayor que se ensayó (500 mg/L); mientras que el extracto obtenido a partir de acetato de etilo, no presentó efecto inhibitorio contra el hongo (**Gráfica 6.2.1**).

Los espectros de RMN de ^1H de los extractos totales se muestran de las Figuras 6.2.2 a la 6.2.4.

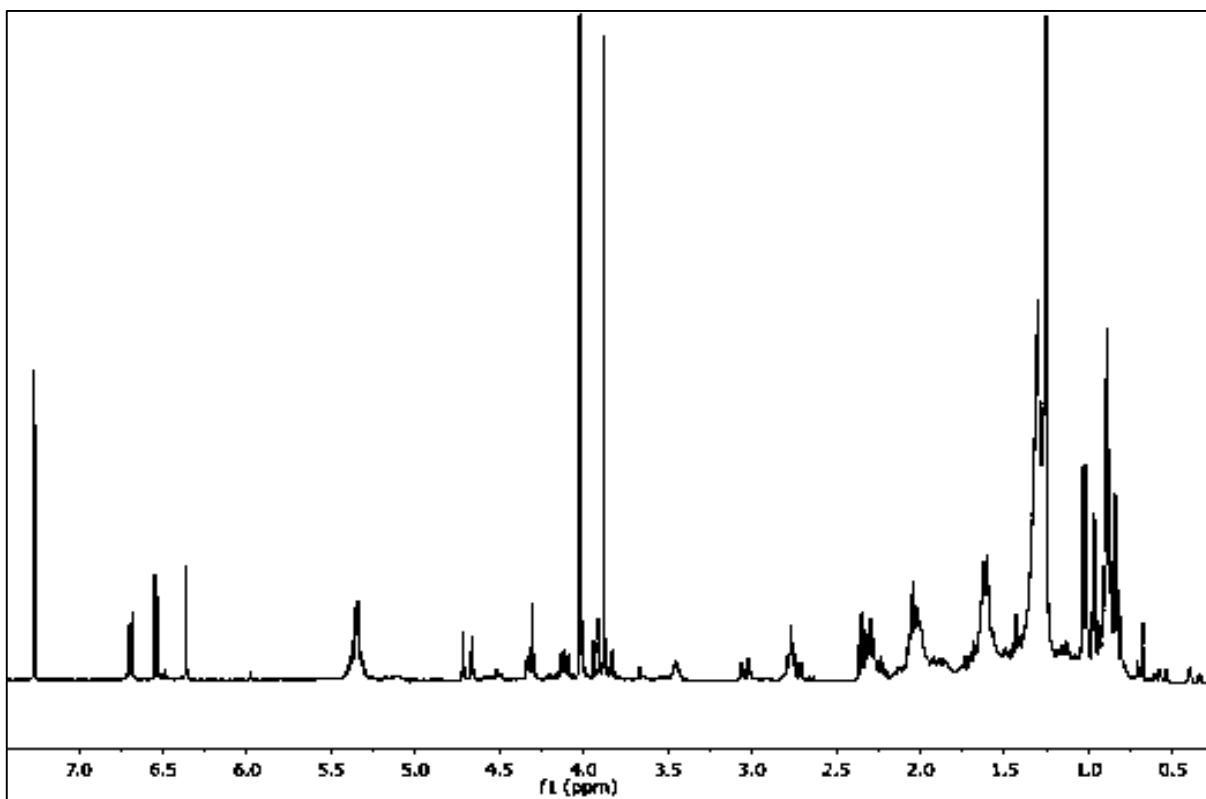


Figura 6.2.2. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz, en CDCl_3) de extracto hexánico del duramen de Palo dulce.

En el extracto hexánico podemos observar señales de hidrógenos alifáticos desde 0.5 a 2.0 ppm, cerca de 4.0 ppm se observan señales simples que pueden corresponder a metoxilos y entre 6.5 y 7.0 ppm (región de hidrógenos aromáticos) se observan tres señales, las cuales integran para un hidrógeno cada una.

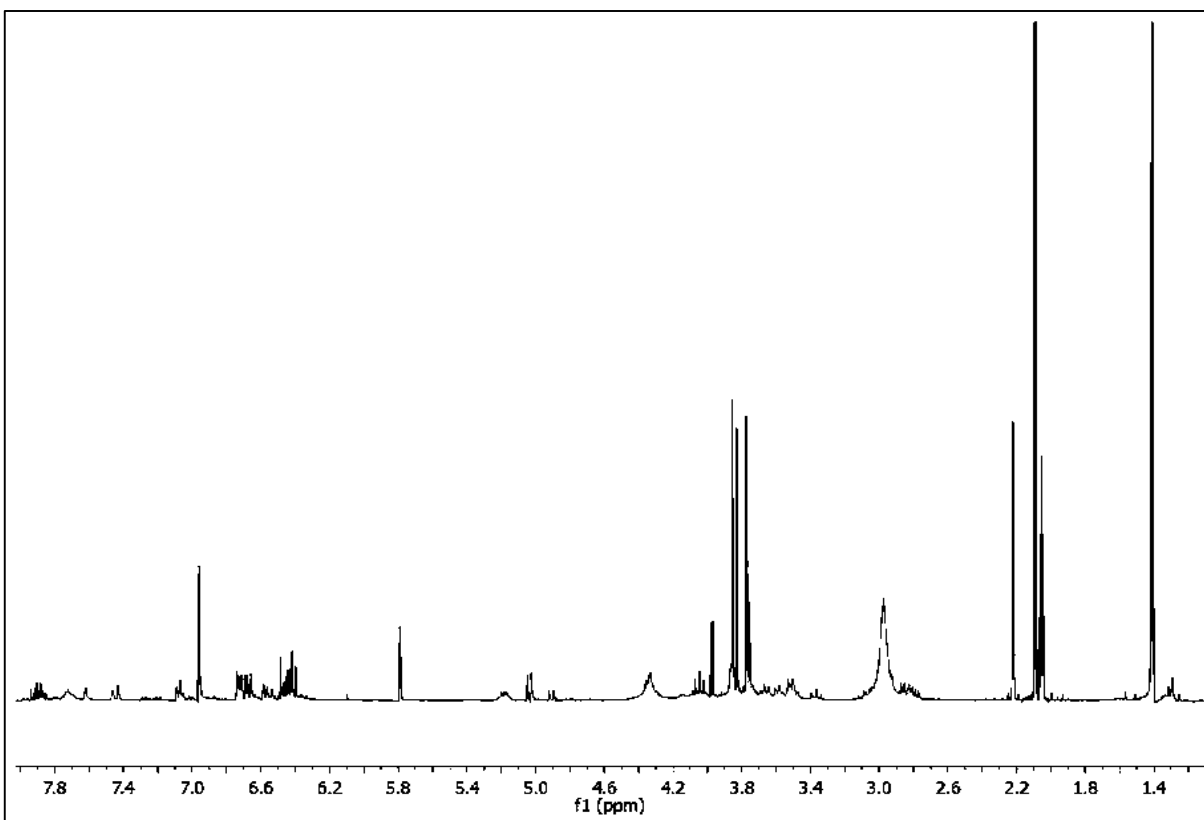


Figura 6.2.3. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz, en acetona-D) de extracto obtenido con THF a partir del duramen de Palo dulce.

En el espectro superior se observa casi nula la presencia de los hidrógenos alifáticos y aparecen nuevos grupos de señales a campo más bajo correspondientes a hidrógenos aromáticos.

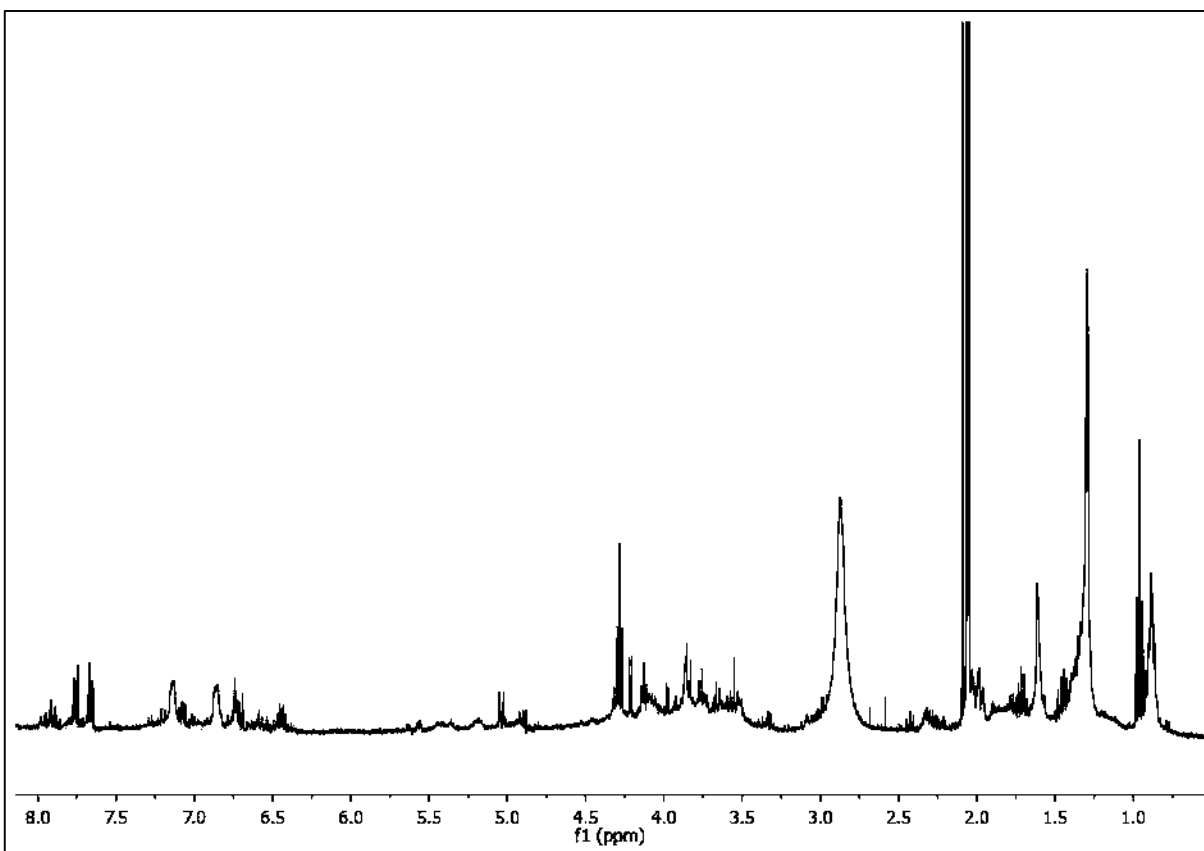


Figura 6.2.4. Espectro de RMN-¹H (400 MHz, en acetona-D) de extracto obtenido con acetato de etilo a partir del duramen de Palo dulce.

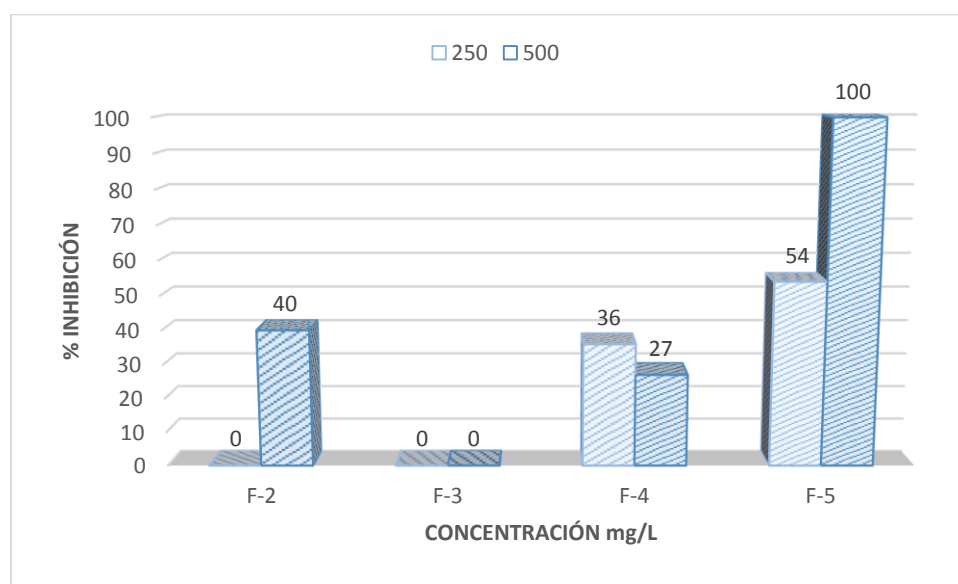
El extracto obtenido con acetato de etilo se observa como una mezcla más compleja en comparación con el obtenido con THF, sin embargo al no presentar actividad inhibitoria contra el hongo, se descartó para pruebas posteriores, solo los extractos tanto el hexánico como el obtenido con THF se procesaron debido a la actividad mostrada; se dividió cada extracto en fracciones gruesas para determinar que compuesto o compuestos estaban interviniendo en la inhibición del hongo.

Se comenzó con el extracto menos polar (hexánico), el cual se dividió en 6 fracciones gruesas de 150 mL cada una, cuyos detalles se presentan en la Tabla 6.2.2.

Tabla 6.2.2. Fracciones gruesas del extracto hexánico del duramen de Palo dulce.

| Fracción | Polaridad |
|----------|---------------------|
| 1 | Hexano |
| 2 | hexano:AcOEt (97:3) |
| 3 | hexano:AcOEt (19:1) |
| 4 | hexano:AcOEt (9:1) |
| 5 | hexano:AcOEt (17:3) |
| 6 | hexano:AcOEt (4:1) |

Una vez obtenidas las fracciones se prosiguió a evaluarlas contra el hongo, los resultados se presentan en la Gráfica 6.2.2.



Gráfica 6.2.2. Porcentaje de inhibición de fracciones gruesas del extracto hexánico obtenido a partir del duramen de Palo dulce.

A continuación se presentan los espectros de RMN-¹H de las fracciones que se evaluaron.

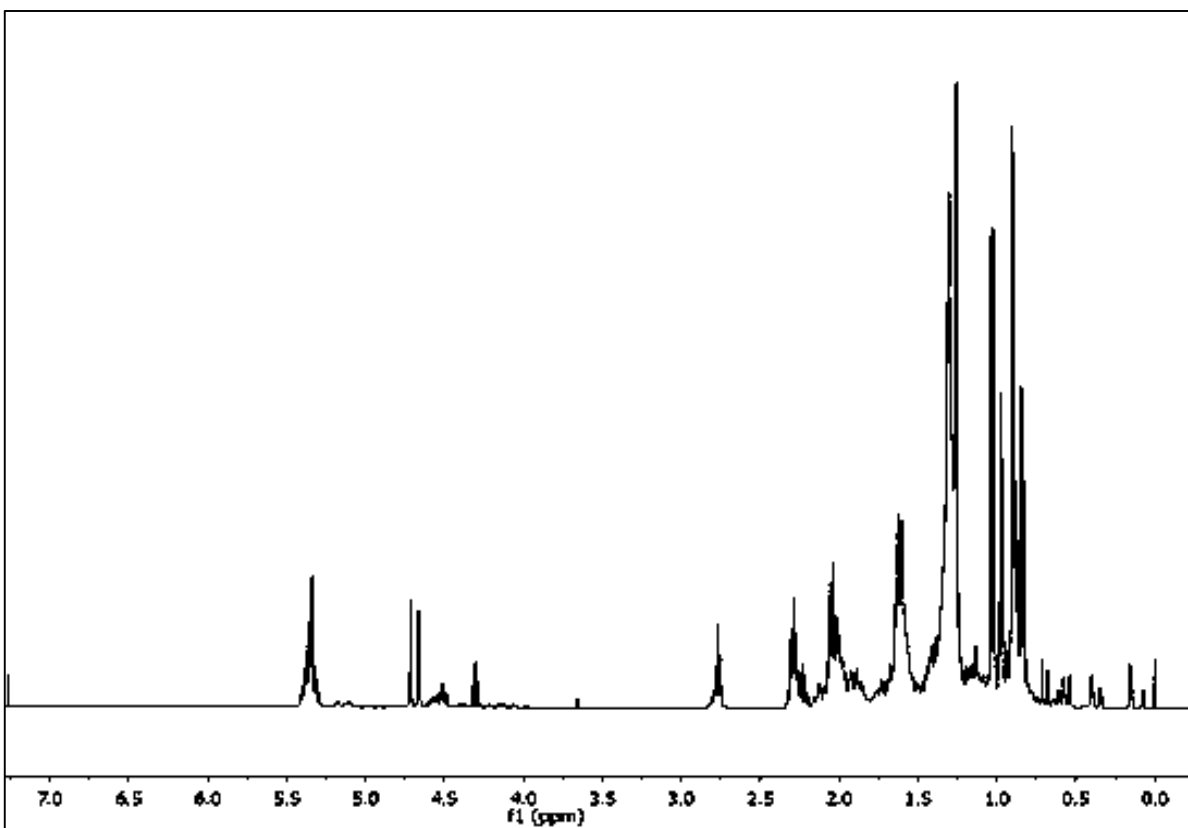


Figura 6.2.5. Espectro de RMN-¹H (400 MHz, en CDCl₃) de fracción 2 obtenida del extracto hexánico del duramen de Palo dulce.

El espectro de la fracción 2 del extracto hexánico presenta señales a campo alto, las cuales corresponden a hidrógenos alifáticos, hidrógenos base de heteroátomos y señales que pueden corresponder a hidrógenos vinílicos (4 a 7 ppm).

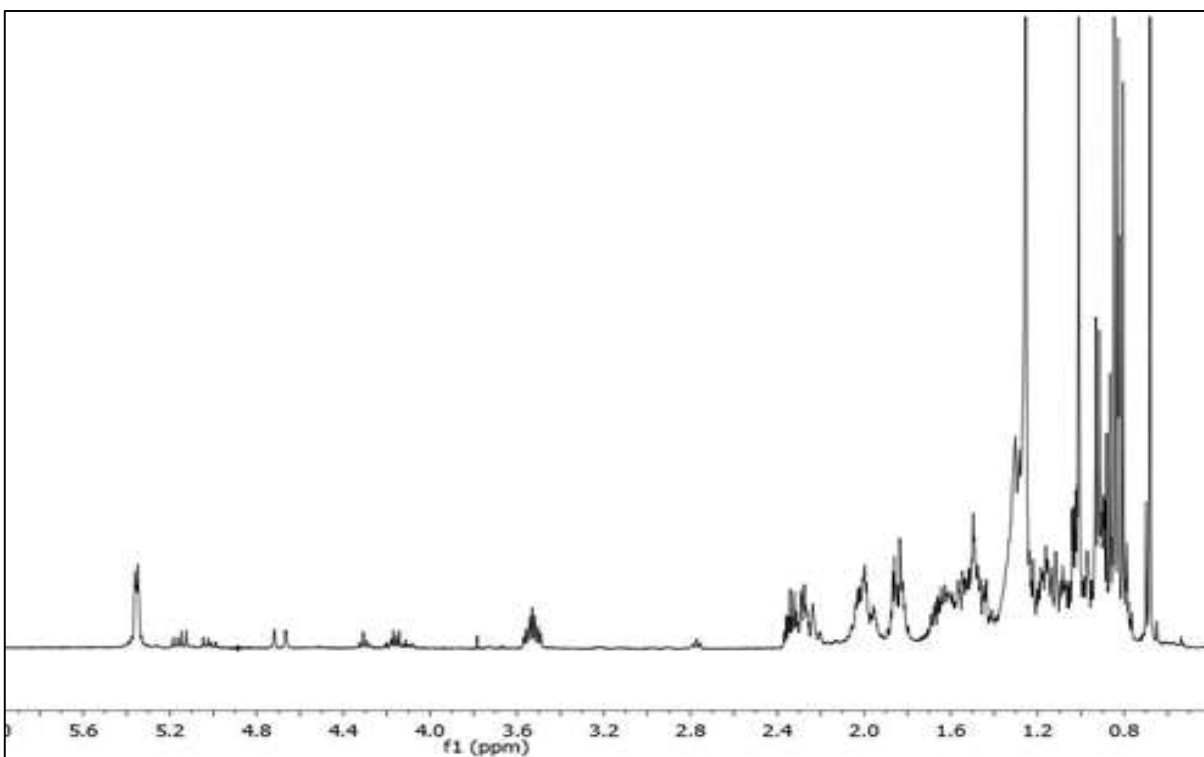


Figura 6.2.6. Espectro de RMN-¹H (400 MHz, en CDCl₃) de fracción 3 obtenida del extracto hexánico del duramen de Palo dulce.

La fracción 3 obtenida del extracto hexánico presentó señales características que de acuerdo a la literatura corresponden a una mezcla de estigmasterol y β -sitosterol, sin embargo esta mezcla de esteroides no presentó actividad inhibitoria contra *T. versicolor*, por lo que la purificación de ambos compuestos fue descartada.

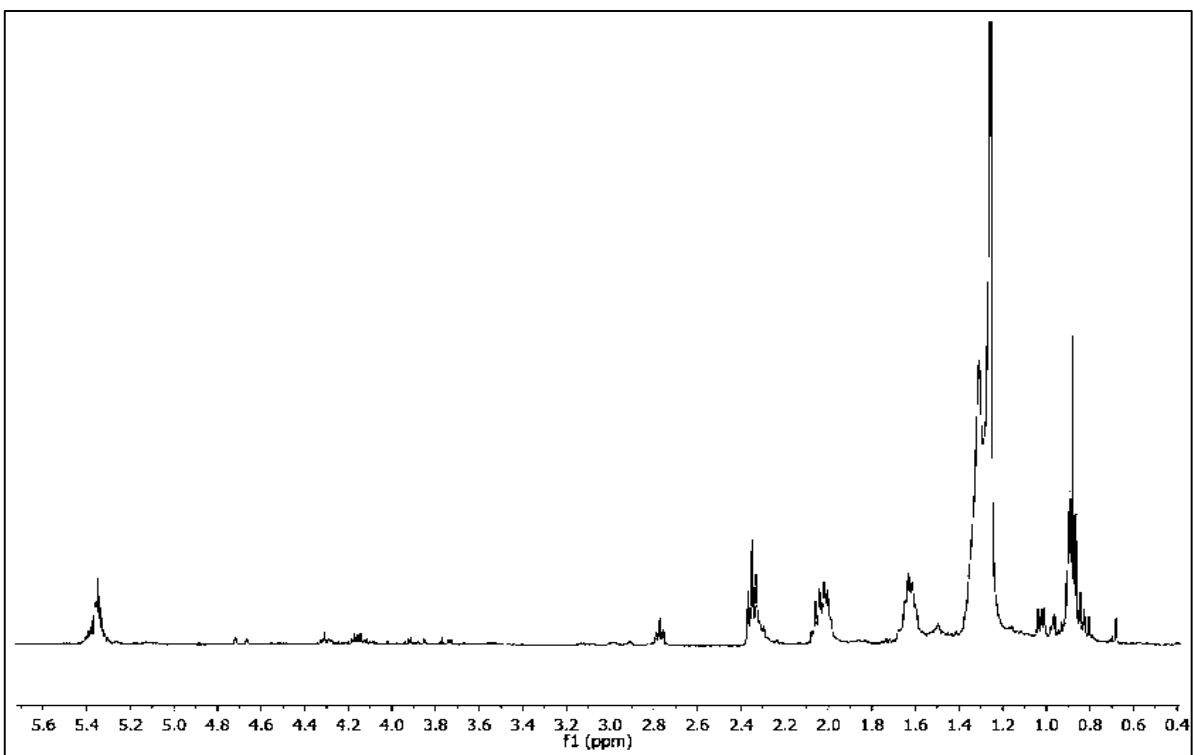


Figura 6.2.7. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz, en CDCl_3) de fracción 4 obtenida del extracto hexánico del duramen de Palo dulce.

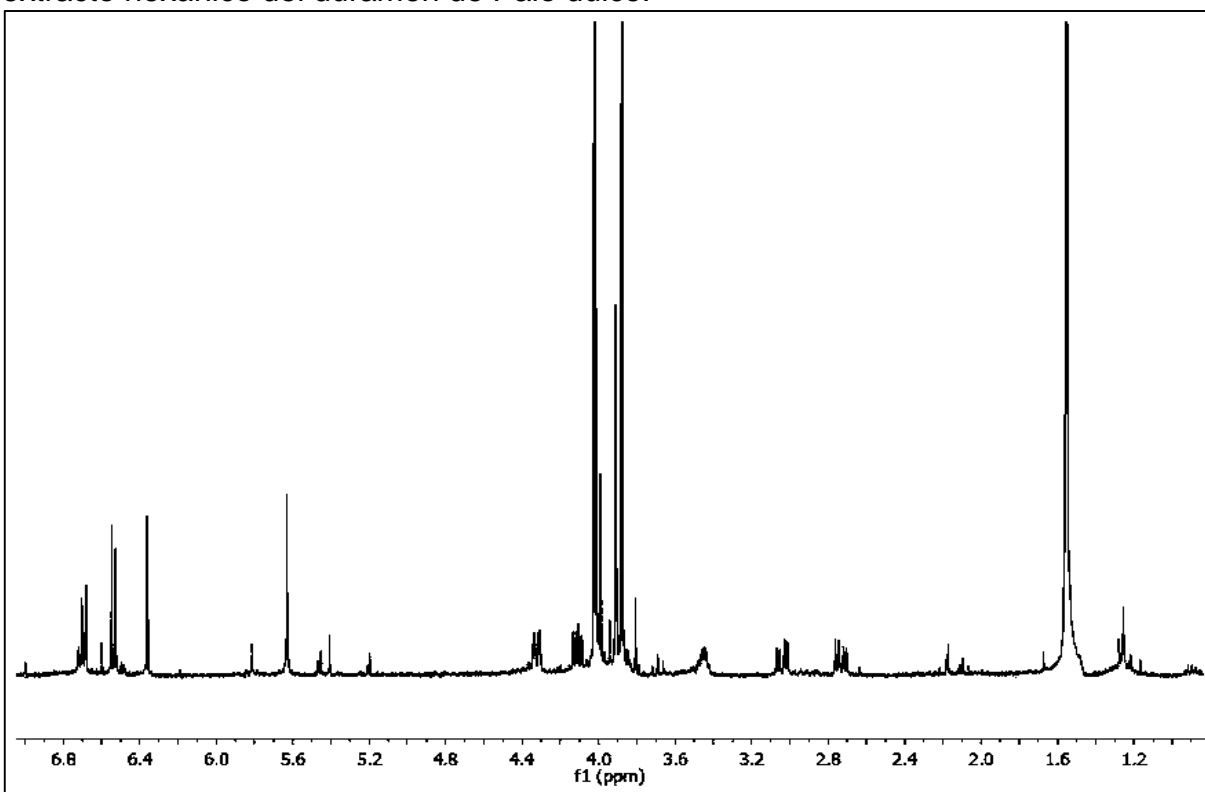


Figura 6.2.8. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz, en CDCl_3) de fracción 5 y 6 obtenida del extracto hexánico del duramen de Palo dulce.

A partir de las fracciones 5 y 6 (**Figura 6.2.8**) del extracto hexánico obtenido del duramen del árbol *Eysenhardtia polystachya*, se obtuvo un compuesto puro, cuya apariencia física fue de un sólido granular color naranja, su espectro de RMN de ^1H y ^{13}C se presentan en las Figuras 6.2.9 y 6.2.10.

En el espectro de RMN de H^1 se observa una señal en 2.74 ppm con una multiplicidad de doble de dobles ($J= 7, 16 \text{ Hz}, 1\text{H}$), en 3.04 encontramos otra señal doble de dobles ($J= 7, 16 \text{ Hz}, 1\text{H}$); en 3.44 ppm se encuentra una señal múltiple que integra para un hidrógeno, en 4.12 ppm se observa una señal doble de doble de dobles ($J= 0.9, 6.4, 10.6 \text{ Hz}, 1\text{H}$), en 4.32 se observa una señal doble de doble de dobles ($J= 0.9, 3.1, 10.6 \text{ Hz}, 1\text{H}$) en 5.68 ppm se observa una señal simple ancha que integra para un hidrógeno; en 3.87, 4.01 y 4.02 ppm se observan tres señales simples que integran para 3 hidrógenos cada una, a campo bajo se ubica en 6.36 ppm una señal doble ($J= 1.2 \text{ Hz}, 1\text{H}$), en 6.54 ppm se observa otra señal doble ($J= 8.4 \text{ Hz}, 1\text{H}$) y finalmente se observa otra señal doble en 6.70 ppm ($J=8.4 \text{ Hz}, 1\text{H}$).

El espectro de RMN de C^{13} nos determinó que la molécula estaba formada por 18 átomos carbonos y que presentaba dos carbonos de carbonilos en aproximadamente 185 ppm. Con la ayuda del espectro de masas de alta resolución se obtuvo el valor del ion molecular $[\text{M}]^+$ de 346.0995 m/z, calculado para 346.1008 m/z ($\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_7$).

El espectro de infrarrojo arrojó bandas características; ν máx, cm^{-1} : 3439 (OH), 2944.30, 2840.78 (C-H), 1651.30 (C=O), 1496.97 (Aromáticos).

Tras una búsqueda en la literatura, se encontró la isoflavanquinona 7-hidroxi-8,3',4'-trimetoxisoflavanquinona conocida como Amorfaquinona. Cuyos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C y los datos de masas e IR, concuerdan con el compuesto obtenido de la fracción 5 y 6 del extracto hexánico de este árbol, al cual denotamos como compuesto **8** y del cual no hay reportes de su presencia en el duramen de este. En base a la literatura, se asignaron las señales que se presentan en las Figuras 6.2.9 y 6.2.10.

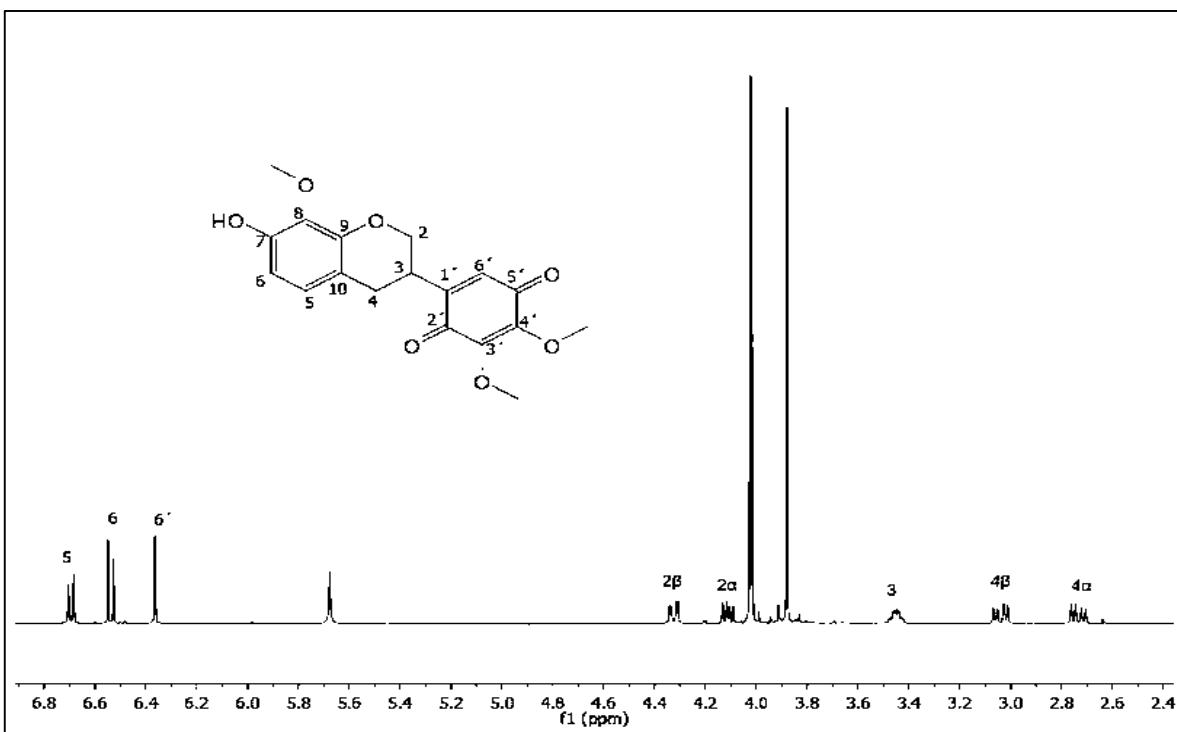


Figura 6.2.9. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, en CDCl_3) del compuesto **8** obtenido del extracto hexánico del duramen de Palo dulce.

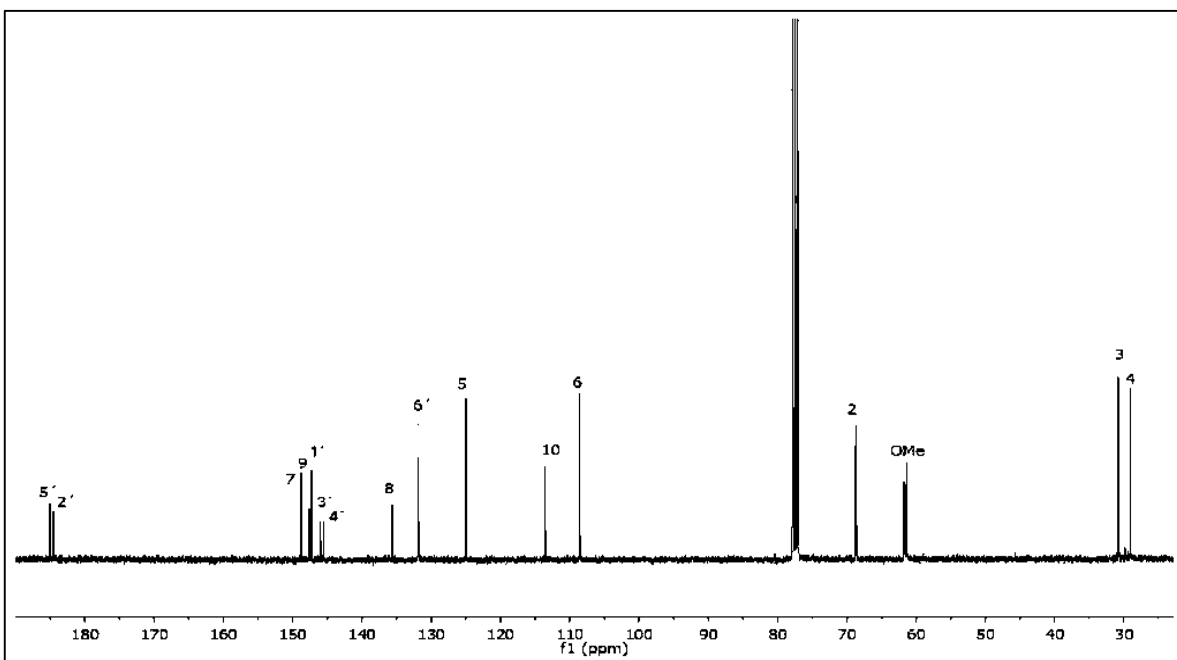


Figura 6.2.10. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, en CDCl_3) del compuesto **8** obtenido del extracto hexánico del duramen de Palo dulce.

De los datos espectroscópicos reportados por Rahman, 2011, se compararon los datos de ^{13}C de la amorfaquinona y los datos obtenidos del compuesto **8** (Tabla 6.2.3) para confirmar la identidad del compuesto obtenido.

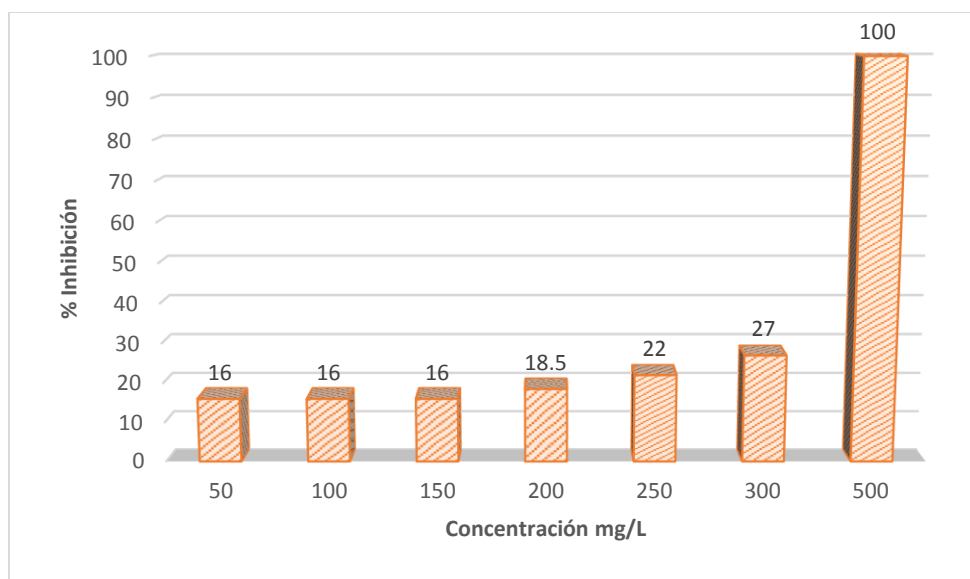
Tabla 6.2.3. Comparación de los espectros de ^{13}C la 7-hidroxi-8,3',4'-trimetoxiisoflavanquinona (Amorfaquinona) y del compuesto **8** obtenido de la fracción 6 del extracto hexánico, ambos espectros fueron adquiridos en CDCl_3 a 100 MHz.

| Carbono | Rahman (2011) | Experimental compuesto 8 |
|---------|---------------|---------------------------------|
| 2 | 68.2 | 68.6 |
| 3 | 30.7 | 30.8 |
| 4 | 28.9 | 29.0 |
| 5 | 124.1 | 124.9 |
| 6 | 108.3 | 108.5 |
| 7 | 148.0 | 148.7 |
| 8 | 135.1 | 135.6 |
| 9 | 146.9 | 147.6 |
| 10 | 112.7 | 113.6 |
| 1' | 146.4 | 147.2 |
| 2' | 183.4 | 184.4 |
| 3' | 145.0 | 145.9 |
| 4' | 144.5 | 145.5 |
| 5' | 184.0 | 185.0 |
| 6' | 130.9 | 131.6 |
| MeO-C3' | 61.3 | 61.7 |
| MeO-C4' | 61.2 | 61.6 |
| MeO-C8 | 60.9 | 61.3 |

La Amorfaquinona es un isoflavonoide que fue aislado por primera vez de *Amorpha fruticosa* (Shibata, 1978). Además ha sido aislada de los extractos etanólicos de *Abrus schimperi* y ha presentado actividad contra promastigotes de *Leishmania donovani* y actividad antiplasmódica contra *Plasmodium falciparum* (Rahman, 2011).

6.3. Evaluación de la actividad antifúngica de la Amorfaquinona.

Una vez obtenido el compuesto puro se realizó el ensayo antifúngico, se probaron diferentes concentraciones (**Gráfica 6.3.1**) y se comparó con los resultados de inhibición que presentó el extracto hexánico total.



Gráfica 6.3.1. Evaluación antifúngica de la Amorfaquinona.

La isoflavanquinona conocida como amorfaquinona inhibió el 100% del crecimiento del hongo a la concentración de 500 mg/L. Haciendo un comparativo con el porcentaje de inhibición que presentó el extracto hexánico total, donde está presente este isoflavonoide, podemos proponer que gran parte de la actividad que presentó, se debió a la presencia de **8** en este extracto.

Cabe mencionar, que durante las purificaciones en columna cromatográfica para el aislamiento de **8**, se obtenían pocas fracciones puras de este compuesto, y varias fracciones donde se observaba una banda adicional en la cromatoplaaca con un Rf muy cercano pero menor al de **8**; por lo que se optó por el método de purificación en placa preparativa, utilizando un sistema de solventes con hexano-cloruro de metileno-metanol en proporción 6:4:1 se logró la separación de los dos compuestos, la amorfaquinona y una miel naranja-amarillenta (**9**) que mediante RMN-¹H (**Figura 6.3.1**), se intuyó que se trataba de la forma hidroquinona de **8**, debido a la similitud en el patrón de señales de ambos y por la aparición de dos señales simples que integran para un hidrógeno cada una, en 5.21 y 5.45 ppm correspondientes a OH.

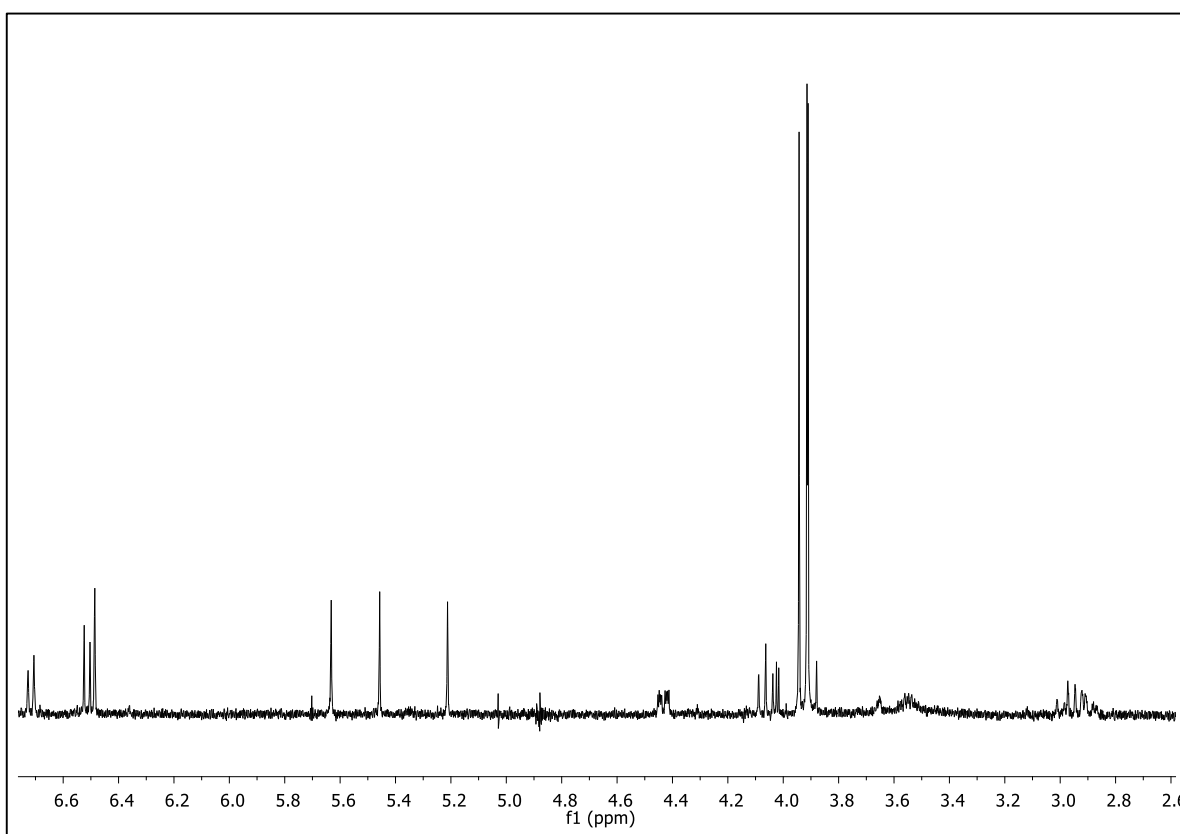


Figura 6.3.1. Espectro de RMN-¹H (400 MHz, en CDCl₃) del compuesto (**9**).

Este derivado del isoflavonoide se obtuvo posterior a la purificación en columna cromatográfica, por lo que su formación pudo deberse a la acidez de la sílice empleada, ya que en el extracto total hexánico no se observa su presencia (**Figura 6.2.2**). Este tipo de transformaciones se ha reportado anteriormente por Grosvenor (1996), al aislar la colutequinona (**13**) y la colutehidroquinona (**14**) (**Figura 6.3.2**) a partir de la corteza de *Colutea arborescens*. Experimentos revelaron que **14** se trataba de la forma hidroquinona de **13**; para confirmarlo, se realizó la reducción de la colutequinona con ditionita de sodio en CHCl_3 la cual dio como producto el compuesto **14**, a su vez la colutehidroquinona se colocó en solución de MeOH en contacto con el aire y se observó que este compuesto se oxidaba para formar el compuesto **13**.

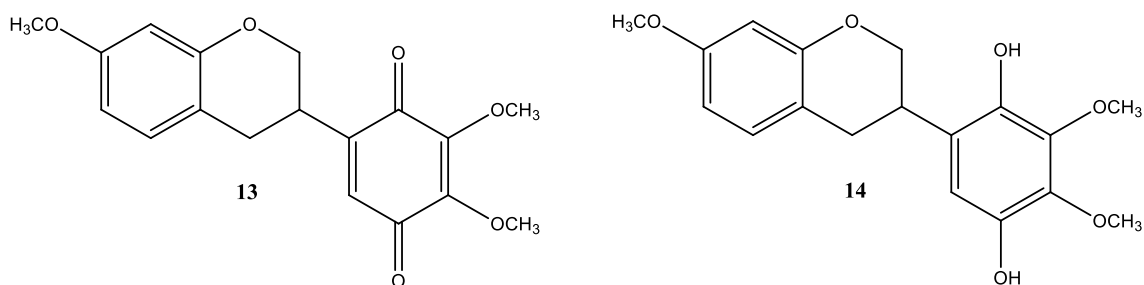


Figura 6.3.2. Cloutequinona y colutehidroquinona reportadas por Grosvenor.

Para comprobar que el compuesto **9** se trataba de la forma hidroquinona de la amorfaquinona, se prosiguió a realizar reacción de acetilación (**Figura 6.3.3**) en condiciones estándar (anhídrido acético/piridina) a temperatura ambiente. La reacción se llevó a cabo por 5 horas y posterior a esto se extrajo con acetato de etilo. Se realizaron lavados con solución de HCl al 2% (40 mL) para eliminar el exceso de piridina y lavados con solución de NaHCO_3 (40 mL), finalmente se realizaron lavados con agua (40 mL), la fase acuosa se desechó y a la fase orgánica se le eliminó el exceso de humedad con sulfato de sodio anhidro.

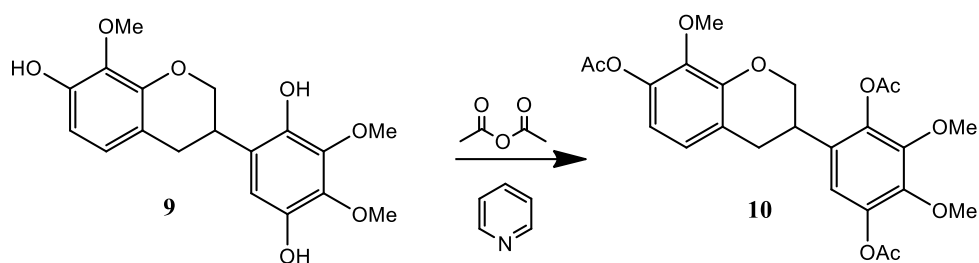


Figura 6.3.3. Reacción de acetilación del compuesto **9**.

El producto de reacción se purificó en columna cromatográfica usando gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil, un sistema de hexano-cloruro de metileno-metanol, a partir de la purificación se obtuvo una miel color amarillo claro, cuyo espectro de RMN de ^1H (**Figura 6.3.4**) muestra la aparición de 3 señales simples en 2.35 ppm aproximadamente, que corresponden a los metilos de acetilo y la desaparición de las señales simples en 5.21, 5.45 y 5.63 ppm que correspondían a los hidrógenos de OH, y en base a los antecedentes reportados por Grosvenor, se propuso la estructura del compuesto **9** como la forma hidroquinona de **8**.

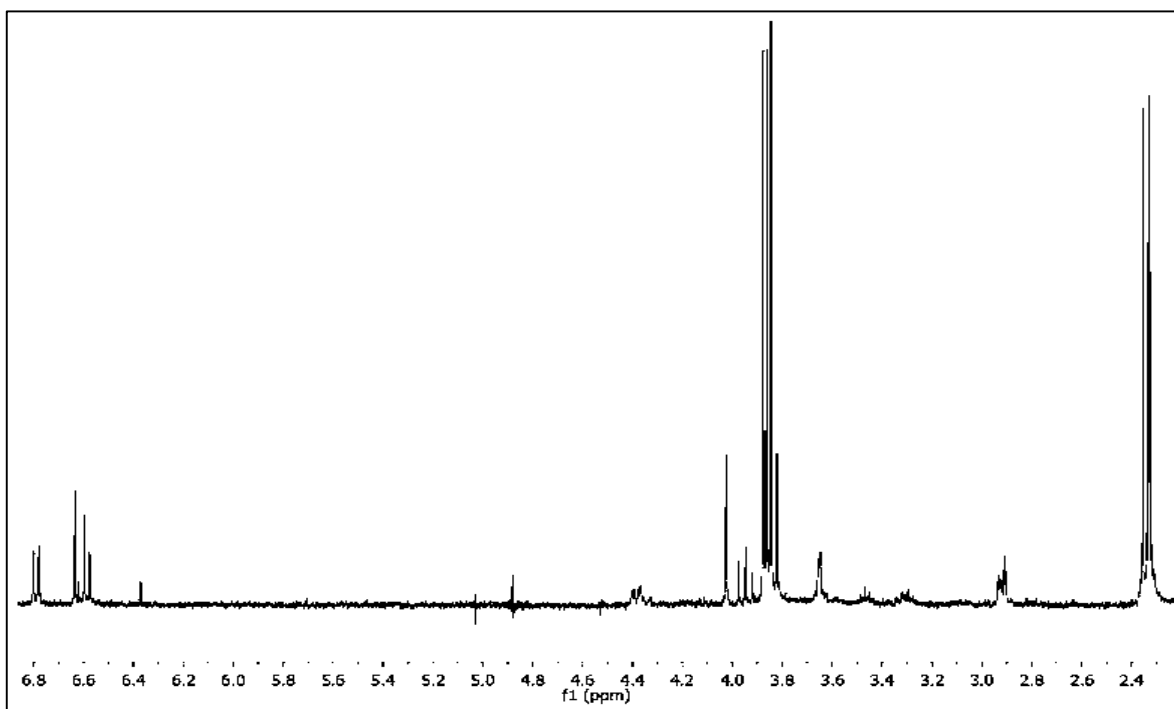


Figura 6.3.4. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz, en CDCl_3) del producto de reacción de acetilación del compuesto **9**.

Debido a que se obtenía la mezcla de **8** y **9** durante las purificaciones en columna cromatográfica del extracto hexánico, se realizó un ensayo de actividad antifúngica con esta mezcla, la cual primeramente se analizó por RMN de ^1H para determinar la proporción de los compuestos en base al valor de la integral (**Figura 6.3.5**). Las concentraciones empleadas para las pruebas fueron: 50, 100, 150 y 200 mg/L (**Gráfica 6.3.2**).

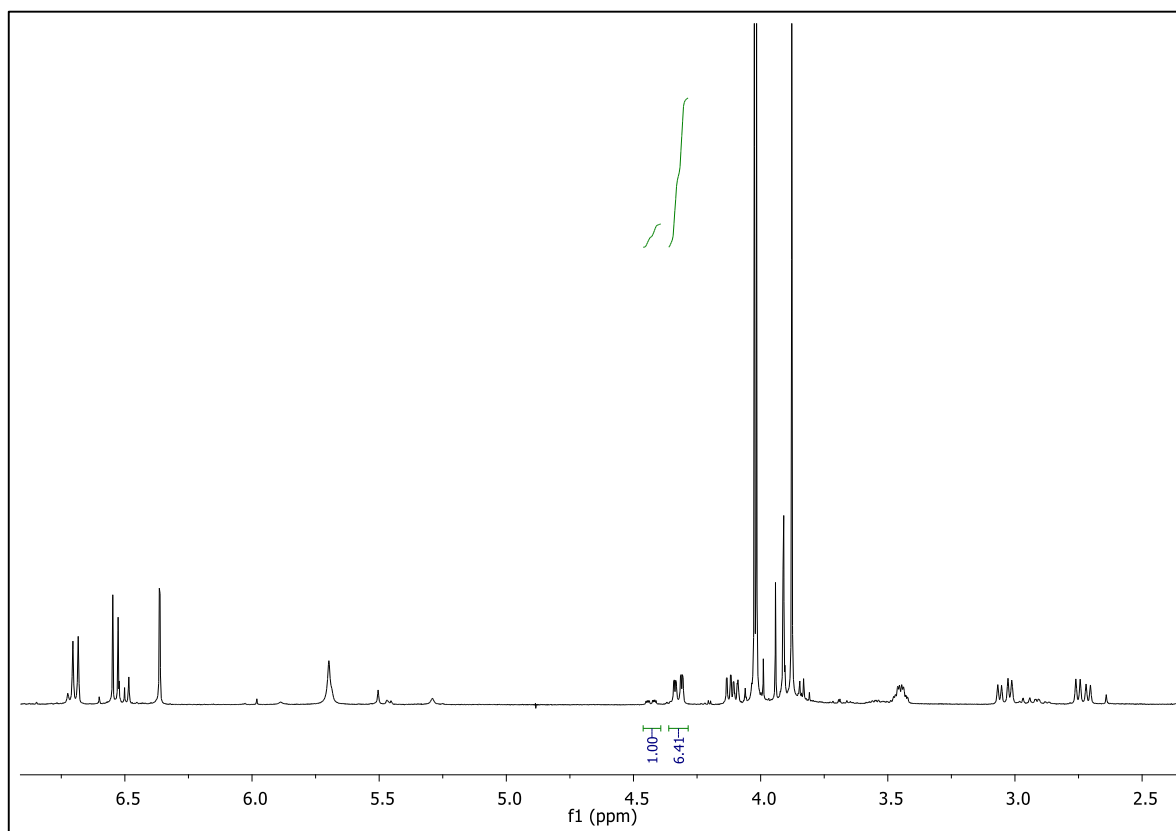
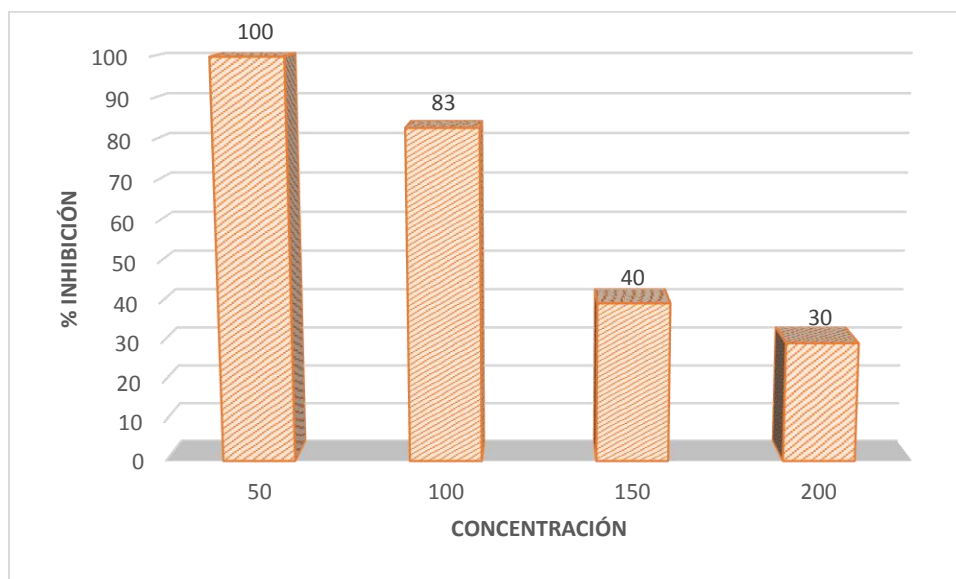


Figura 6.3.5. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz, en CDCl_3) de la mezcla de **8** y **9**, a la cual se le evaluó su efecto antifúngico.

A partir del espectro se obtuvo el porcentaje de cada especie. La especie más abundante fue la forma quinona la cual se encontró en un 86%. La forma hidroquinona por su parte sólo representó el 14 % restante de esta mezcla.



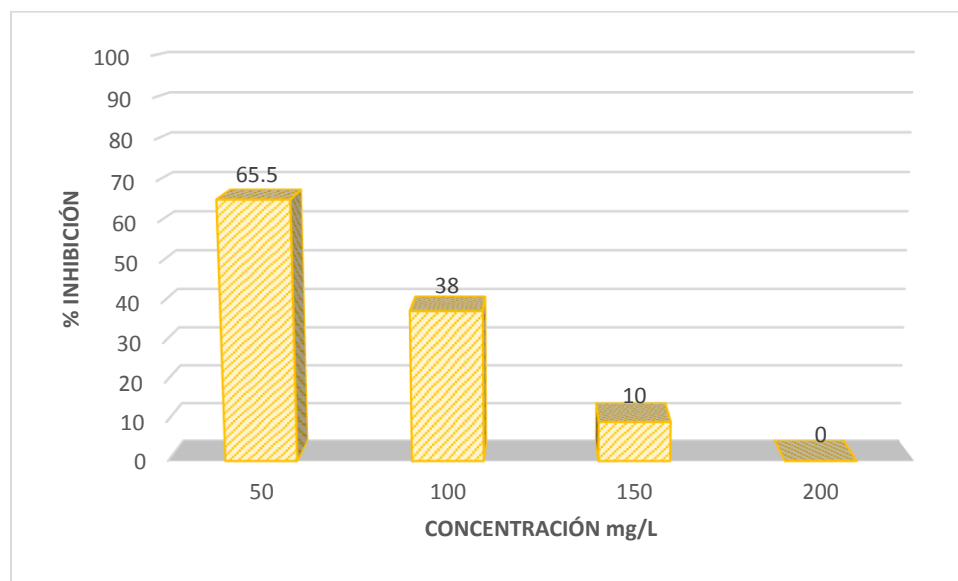
Gráfica 6.3.2. Evaluación antifúngica de la mezcla de la amorfina y la amorfadihidroquinona en proporción 86:14.

La Gráfica 6.3.2, nos muestra un comportamiento decreciente de la actividad conforme se aumenta la concentración de la muestra. A la concentración de 50 mg/L se logra inhibir el 100% del crecimiento del hongo., mientras que a la concentración mayor se obtuvo solo el 30% de la inhibición. Debido a este comportamiento, se propuso aislar el forma hidroquinona y probar su actividad frente al crecimiento del hongo, para así tener una idea más clara del efecto que se estaba presentando cuando se tenía la combinación de **8** y **9**.

Se probaron condiciones para transformar la forma quinona a la forma hidroquinona, esto con el fin de obtener mayor cantidad del compuesto para pruebas posteriores. Debido a que se daba este cambio durante las purificaciones en columna cromatográfica, se colocó a reflujo una cantidad del compuesto **8** puro, usando como disolvente CH_2Cl_2 y sílica gel para promover la formación de **9**. Después de 3 h de reflujo, se monitoreó la reacción por placa fina y se observó trazas de la formación de **9** además de formación de subproductos.

La reacción se llevó también a temperatura ambiente por 12 h aproximadamente y se monitoreo al finalizar este tiempo, observándose mayor formación de la hidroquinona. Sin embargo también se obtuvieron subproductos por lo que esta técnica se descartó ya que se perdía materia prima al convertirse en otros compuestos que no eran el deseado.

La obtención de **9** se realizó mediante placa preparativa de las fracciones que contenían la mezcla de **8** y **9**, ya que por medio de este método era fácil la separación y no había formación de subproductos. La mezcla de solventes utilizados fue hexano-CH₂Cl₂-MeOH en proporciones 6:4:1. Una vez obtenido el compuesto puro el cual se comparó su espectro con la Figura 6.3.1, se continuó con la evaluación de su actividad contra el hongo a las concentraciones de 50, 100, 150 y 200 mg/L (**Gráfica 6.3.3**).



Gráfica 6.3.3. Evaluación antifúngica de la amorfadihidroquinona contra *T. versicolor*.

Al analizar el resultado de la actividad inhibitoria de **9** frente al hongo se observó que conforme se aumentaba la concentración de este, la actividad antifúngica disminuía.

El efecto que presenta **9** se puede explicar debido a que la lacasa, la cual es la enzima del hongo encargada de degradar los sustratos, y es nuestra diana de inhibición, es afin a los compuestos fenólicos, como lo es **9**, el cual a bajas concentraciones está presentando un cierto grado de inhibición, mientras que a altas concentraciones no lo presenta, posiblemente debido a que el hongo incluso puede tomar este compuesto como sustrato, que en lugar de inhibir puede favorecer el crecimiento de *Trametes versicolor*.

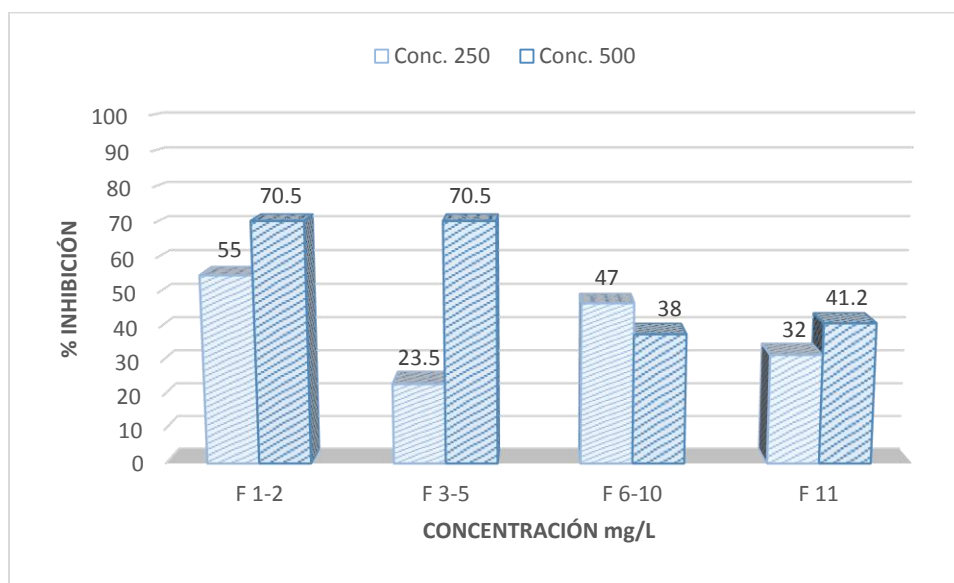
6.4. Estudio del extracto obtenido con THF a partir del duramen del Palo dulce.

Continuando con la búsqueda de compuestos de los extractos con actividad, se realizó la purificación en columna cromatográfica del extracto obtenido con THF, del cual se obtuvieron 11 fracciones gruesas de 150 mL cada una, a partir de las polaridades que se resumen en la tabla siguiente.

Tabla 6.4.1. Fracciones gruesas de extracto obtenido con THF del duramen de Palo dulce.

| Fracción | Polaridad |
|----------|--------------------|
| 1 | Hexano |
| 2 | hexano:AcOEt (9:1) |
| 3 | hexano:AcOEt (4:1) |
| 4 | hexano:AcOEt (7:3) |
| 5 | hexano:AcOEt (3:2) |
| 6 | hexano:AcOEt (1:1) |
| 7 | AcOEt:Hexano (3:2) |
| 8 | AcOEt:Hexano (7:3) |
| 9 | AcOEt:Hexano (4:1) |
| 10 | AcOEt:Hexano (9:1) |
| 11 | Acetato de etilo |

Una vez obtenidas las fracciones se compararon por cromatografía en placa y por medio de RMN de ^1H para así agrupar aquellas que presentaran un compuesto parecido. Una vez hecho esto se prosiguió a realizar los ensayos biológicos a las concentraciones de 250 y 500 mg/L (**Gráfica 6.4.1**).



Gráfica 6.4.1. Evaluación de la actividad antifúngica de las fracciones gruesas obtenidas del extracto de THF del duramen de Palo dulce.

De acuerdo a los resultados obtenidos (**Gráfica 6.4.1**), las fracciones 1-2 presentaron el mayor porcentaje de inhibición a ambas concentraciones ensayadas, las fracciones 3 a 5 presentaron el 70.5% de inhibición a la concentración de 500 mg/L. Para el caso de las fracciones 6 a 10 se observa un comportamiento de la inhibición descendiente conforme se incrementó la concentración.

La Amorfaquinona (**8**), además de estar presente en el extracto hexánico, también se encontró en el extracto obtenido con THF del árbol, esto se comprobó tanto por cromatografía en placa fina (CCF) (**Figura 6.4.1**) como por RMN de ^1H .

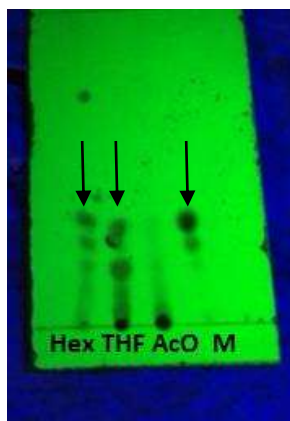


Figura 6.4.1. Cromatoplaaca donde se muestran los tres extractos obtenidos del duramen de palo dulce. Hex: extracto total hexánico; THF: extracto total de THF, AcO: extracto total obtenido con acetato de etilo; M: se refiere a la banda que corresponde a la amorfaquinona (banda superior).

Por CCF se determinó que **8** estaba presente en los extractos hexánico y THF, mientras que en extracto obtenido con AcOEt fue casi nula su presencia.

A continuación se muestran los espectros de RMN de ^1H de las fracciones a las cuales se les evaluó su actividad antifúngica y donde se observó la presencia de **8** desde la fracción 3 hasta la 11. (**Figuras 6.4.3 – 6.4.6**). Por lo que se le atribuye la actividad antifúngica presentada por este extracto, a la presencia de la Amorfaquinona como uno de los compuestos mayoritarios presentes.

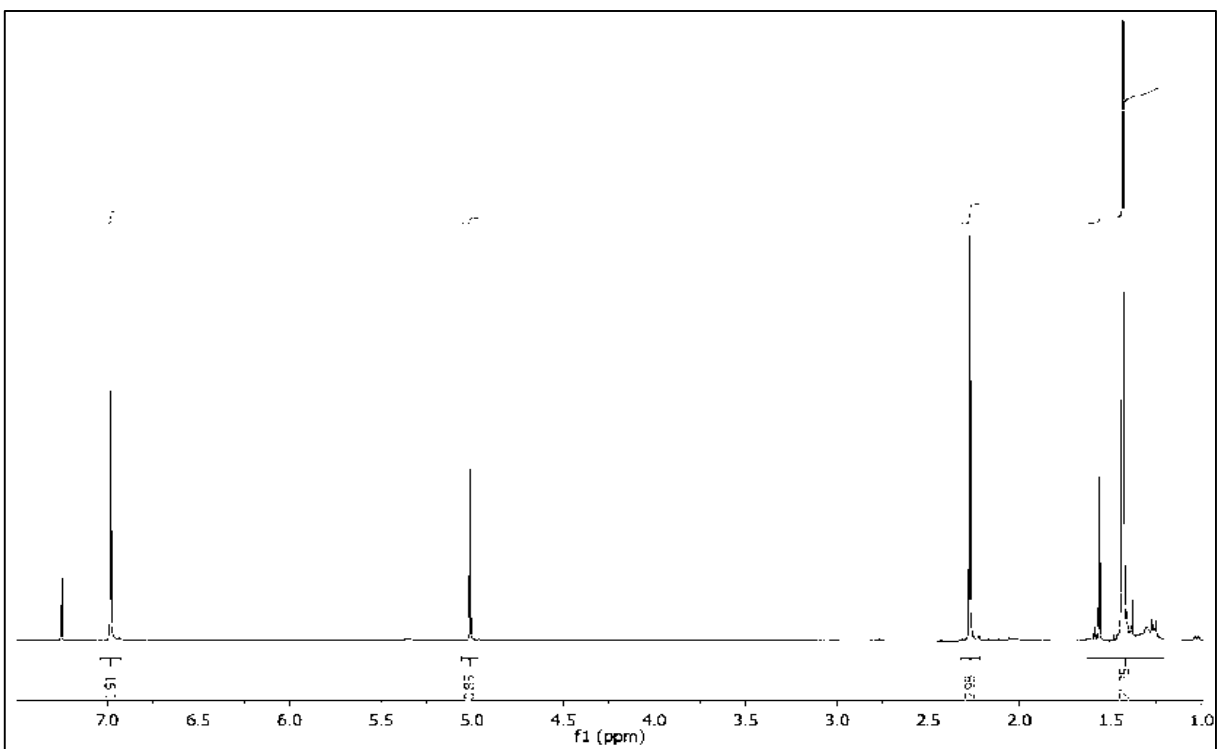


Figura 6.4.2. Espectro de RMN-¹H (400 MHz, en CDCl₃) fracción 2-THF del duramen de Palo dulce.

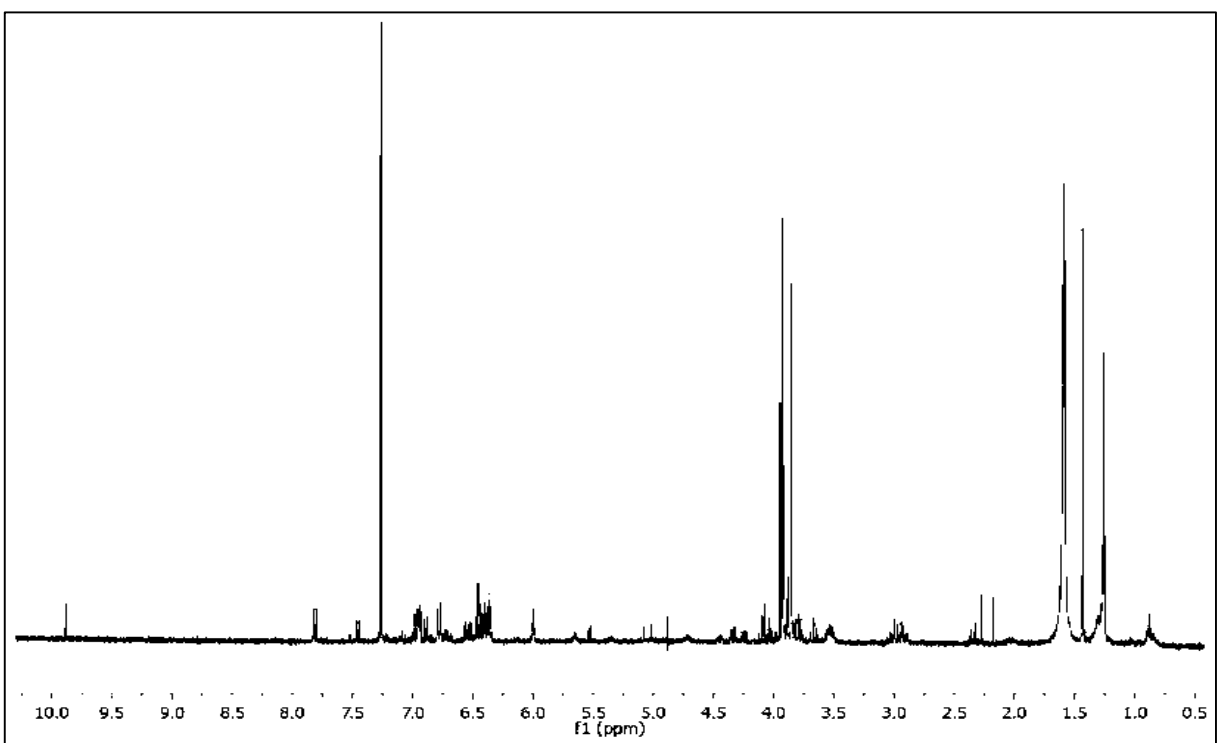


Figura 6.4.3. Espectro de RMN-¹H (400 MHz, en CDCl₃) fracciones 3 y 4-THF del duramen de Palo dulce.

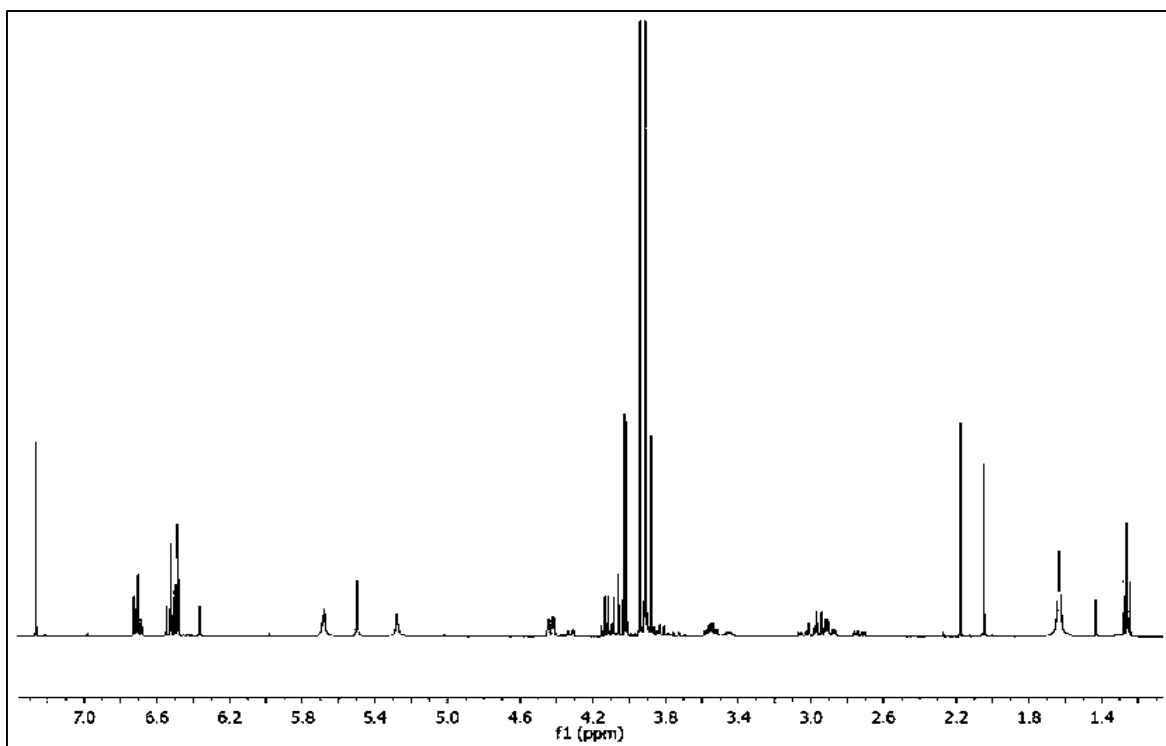


Figura 6.4.4. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz, en acetona-D) fracción 5-THF del duramen de Palo dulce.

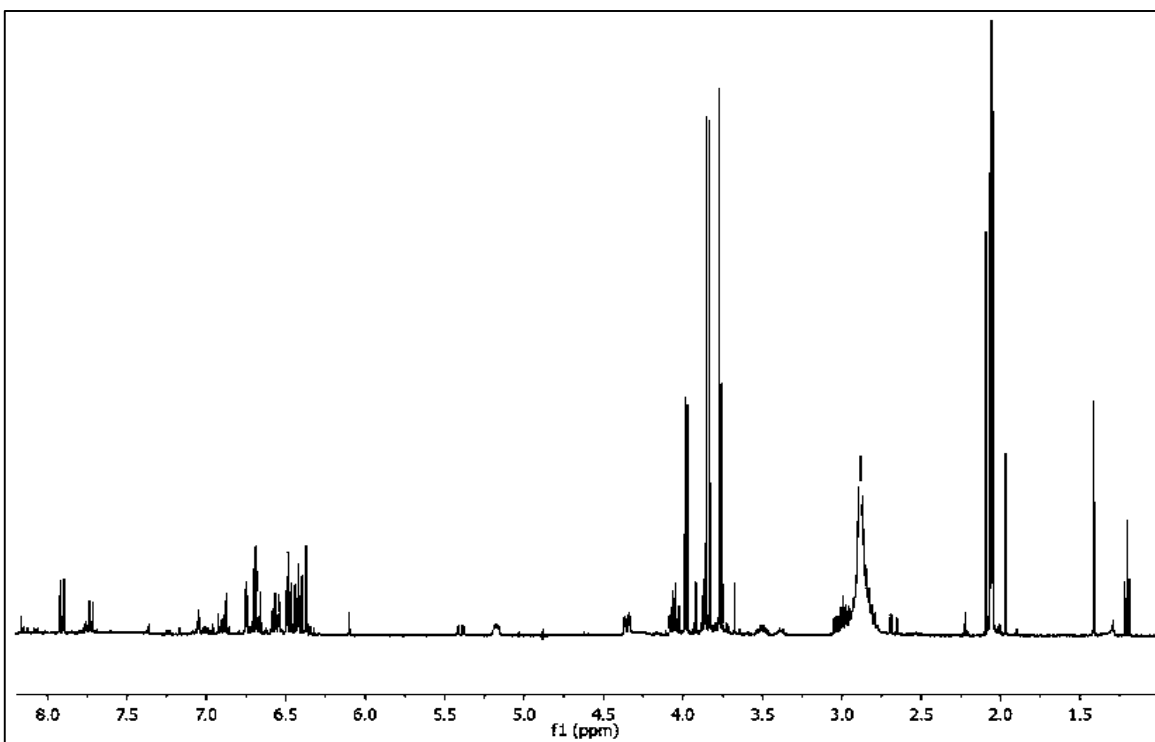


Figura 6.4.5. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz, en acetona-D) fracciones 6 a 10-THF del duramen de Palo dulce.

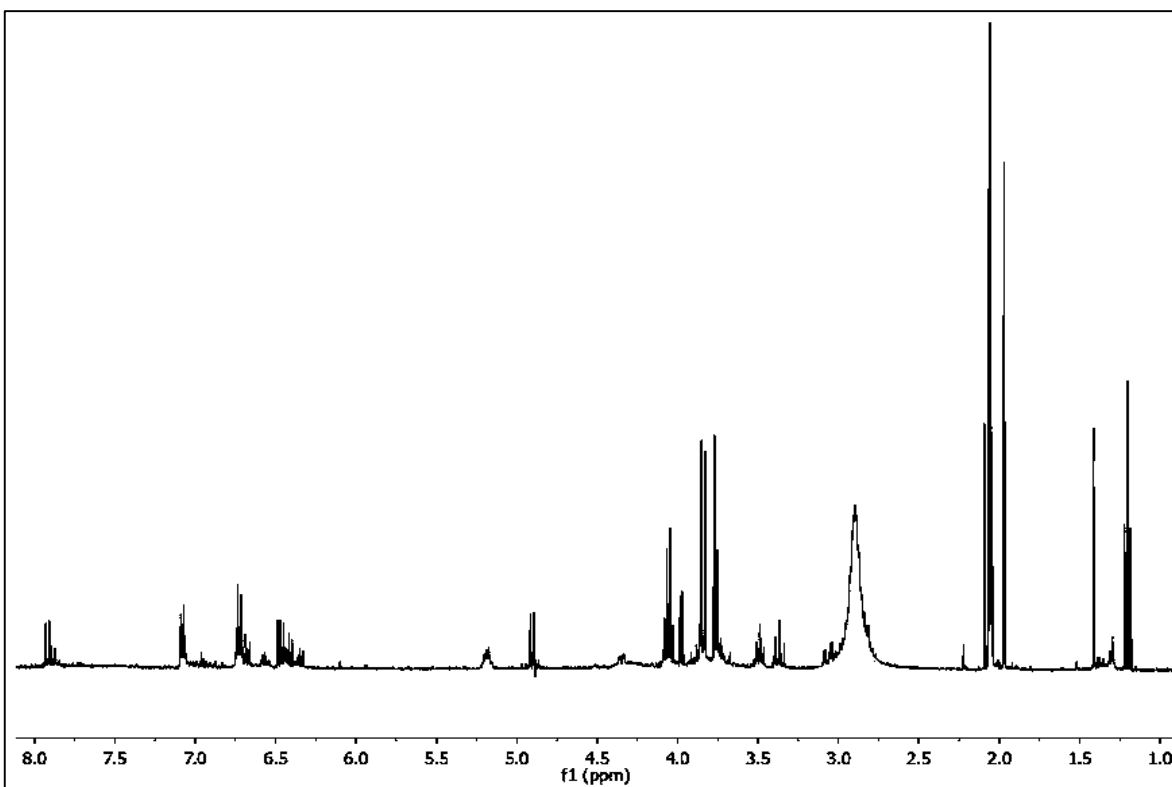


Figura 6.4.6. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz, en acetona-D) fracción 11-THF del duramen de Palo dulce.

Además de la presencia de la amorfaquinona, se observó que el compuesto presente en la fracción 2 obtenida del extracto de THF de Palo dulce (**Figura 6.4.2**) es el mismo que el compuesto presente en la fracción 4 obtenida del extracto de THF de Tepehuaje (**Figura 6.1.5**), ambas presentaron un porcentaje de inhibición frente al hongo ensayado, por lo que se le dio prioridad a la elucidación estructural del mismo.

Después de analizar el compuesto por métodos espectroscópicos se determinó que las señales encontradas a campo alto 1.43 y 2.27 ppm correspondieron a dos terbutilos y un metilo respectivamente, ambos aromáticos; mientras que las señales a campo bajo en 5.01 ppm a un OH y la señal a 6.98 ppm correspondió para dos hidrógenos aromáticos (**Figura 6.4.7**) correspondientes al compuesto 2,6-diter-butil-4-metilfenol ó Butilhidroxitolueno (BHT).

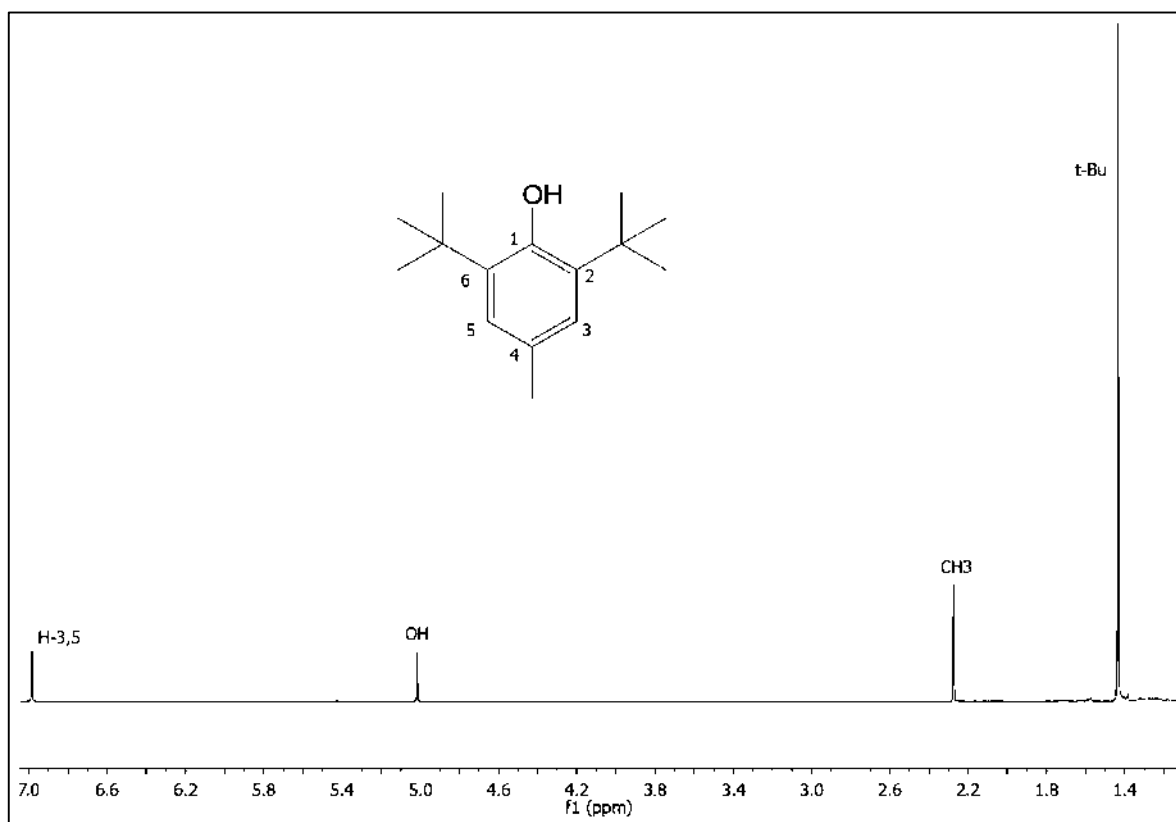


Figura 6.4.7. Espectro de RMN-¹H (400 MHz, en CDCl₃) del BHT.

El BHT es un antioxidante sintético, el cual, al revisar la ficha técnica del solvente tetrahidrofurano, se encontró que este antioxidante lo contiene el solvente como estabilizador y al momento de la extracción este antioxidante se mezcló con los extractos obtenidos con THF. Cabe resaltar que no se han encontrado reportes anteriores de la actividad de este contra hongos ligninolíticos como lo es *T. versicolor*.

Debido a que los extractos tanto de Palo dulce como de Tepehuaje obtenidos con THF presentaron actividad contra el hongo y que se encontró que parte de esta actividad era debida al BHT, se volvió a obtener ambos extractos pero utilizando THF destilado y cerciorándonos que no se volviera a presentar el butilhidroxitolueno en cada extracto, para así comprobar si la actividad antifúngica era debida al extracto total o debida a la presencia del antioxidante sintético.

Tabla 6.4.2. Actividad Antifúngica de los extractos obtenidos con THF libres de BHT.

| Extracto obtenido con THF | % Inhibición Concentración 250 mg/L | % Inhibición Concentración 500 mg/L |
|----------------------------------|--|--|
| Tepehuaje | 0% | 0% |
| Palo Dulce | 0% | 54% |

De acuerdo a la Tabla 6.4.2, el extracto de Tepehuaje obtenido con THF no presentó actividad, por lo que podemos concluir que la actividad que se reportó fue debida al BHT que presentaba el extracto, caso contrario con el extracto de palo dulce, el cual si presentó actividad por sí solo a la concentración de 500 mg/L. Esta actividad se la atribuimos a la presencia de la Amorfaquinona ya que de las 11 fracciones que se obtuvieron, se encontró presente en 10 de ellas.

6.5 Derivados funcionalizados de medicarpina.

Cumpliendo otro de los objetivos del proyecto, se prepararon los tres derivados propuesto de la Medicarpina (**Figura 6.5.1**).

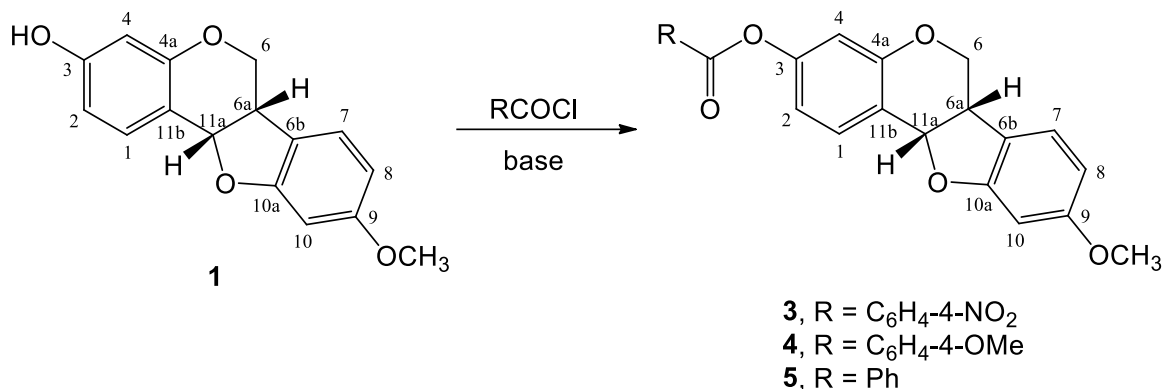


Figura 6.5.1. Derivados propuestos a obtener de la reacción de esterificación de la Medicarpina.

6. 5a) Derivado *p*-Nitrobenzoato de Medicarpina

Se preparó el derivado mediante la reacción de esterificación de la Medicarpina con el cloruro de *p*-nitrobenzoilo (**Figura 6.5a.1**). Primeramente se ensayó con lotes de 10 mg de Medicarpina, haciéndose reaccionar con el cloruro de ácido y usando trietil amina como base. La reacción se realizó con un exceso del cloruro de ácido y usando como disolvente THF anhidro. Esta se dejó durante 24 h a temperatura ambiente y con atmósfera de nitrógeno. Posterior al tiempo de reacción, se extrajo con acetato de etilo y se realizaron lavados con HCl al 5%, posteriormente con solución saturada de NaHCO₃ y finalmente lavados con agua. El crudo de reacción se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró para su purificación en columna cromatográfica.

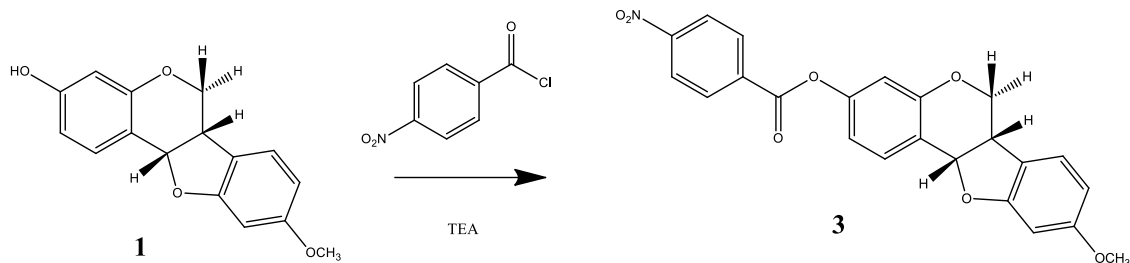


Figura 6.5a.1. Reacción de esterificación de Medicarpina con cloruro de *p*-nitrobenzoilo.

Previo a purificar el crudo de reacción se buscó el mejor sistema de disolventes por cromatografía en placa fina, el sistema más adecuado fue 17:3 hexano-acetato de etilo. Una vez establecido el sistema de disolventes a emplear, se montó columna cromatográfica usando sílica gel como fase estacionaria y el sistema de solventes como fase móvil. Se obtuvo un sólido de color amarillo claro con un punto de fusión de 149-150 °C (**Figura 6.5a.2**).



Figura 6.5a.2. Aspecto del compuesto *p*-nitrobenzoato de Medicarpina.

En la Tabla 6.5a se presenta el rendimiento obtenido de la reacción de esterificación. Nótese que el rendimiento difiere en los lotes corridos, cabe mencionar que en el lote 2, los lavados del crudo de reacción se realizaron con solución de HCl al 2% en lugar de al 5% como se había hecho con el lote 1. Esto nos indicó que el producto de reacción era sensible al pH ácido, ya que los rendimientos bajaban al hacer lavados con soluciones de mayor porcentaje de HCl.

Tabla 6.5a. Rendimiento de reacción de Medicarpina con cloruro de *p*-nitrobenzoilo.

| Base utilizada | N. Eq del cloruro de ácido/ Eq Medicarpina | % Rendimiento |
|-----------------------|---|----------------------|
| TEA | 2:1 | 53 (lote 1) |
| TEA | 2:1 | 90 (lote 2) |

Una vez estandarizado el método, se escaló la reacción con lotes de 40 mg de materia prima, dando resultados del 90% de rendimiento. Los espectros de RMN de ¹H del compuesto funcionalizado y de la Medicarpina, se presentan en las figuras siguientes.

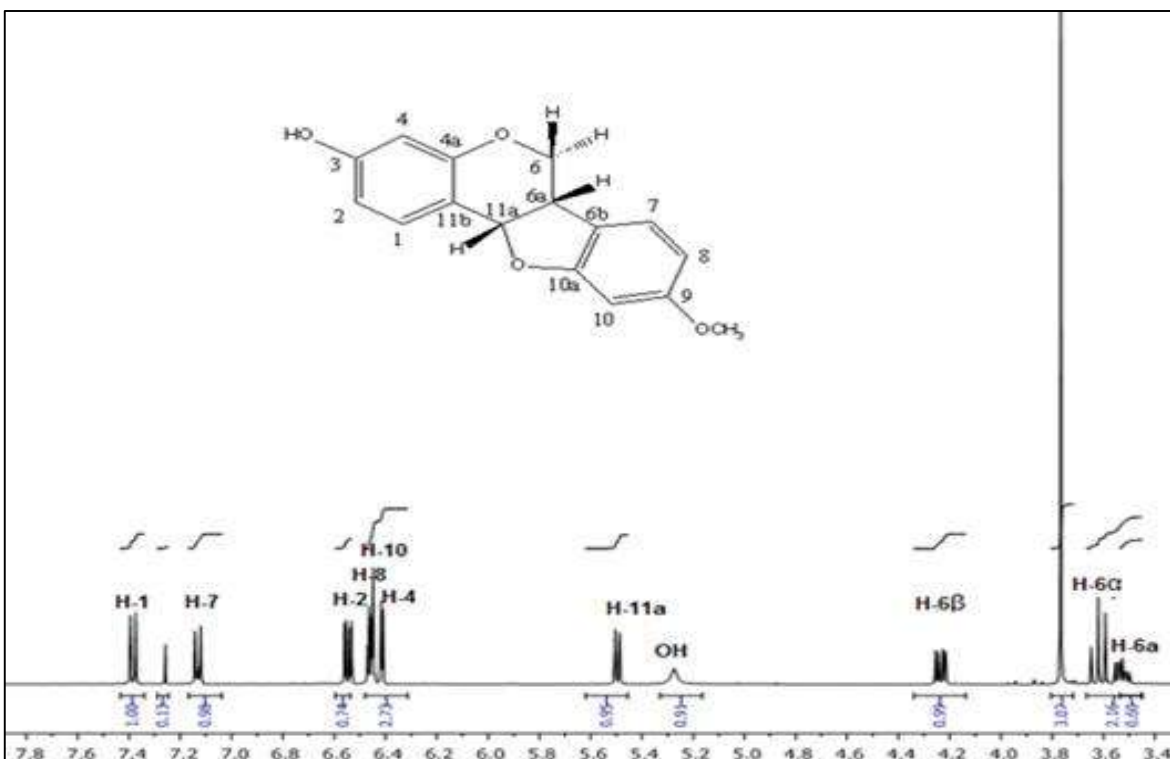


Figura 6.5a.3. Espectro de RMN-¹H (400 MHz, en CDCl₃) de Medicarpina aislada del duramen del árbol *Andira inermis* (Almendra de río).

La Medicarpina presenta señales en el espectro de RMN de ¹H, la cuales han sido descritas previamente (**Martínez, 2011**); en 3.53 ppm se encuentra la señal doble de doble de dobles del H-6a; en 3.62 ppm se ubica una señal triple que corresponde al H-6α, en 3.77 ppm encontramos la señal simple del metilo de metoxilo; en 3.62 ppm se observa la señal del H-6β la cual es una doble de dobles; en 5.27 ppm se observa la señal ancha característica del OH, en 5.50 ppm se encuentra la señal doble correspondiente al H-11a, a campo bajo encontramos las señales de los hidrógenos aromáticos como el H-4 ubicado a 6.41 ppm siendo una señal doble, el H-10 en 6.45 ppm como una señal simple, H-8 en 6.46 ppm como una señal doble de dobles, en 6.55 ppm se encuentra el H-2 como una señal doble de dobles, el H-7 se observa como una señal doble en 7.13 ppm y el H-1 se encuentra a 7.37 ppm como una señal doble.

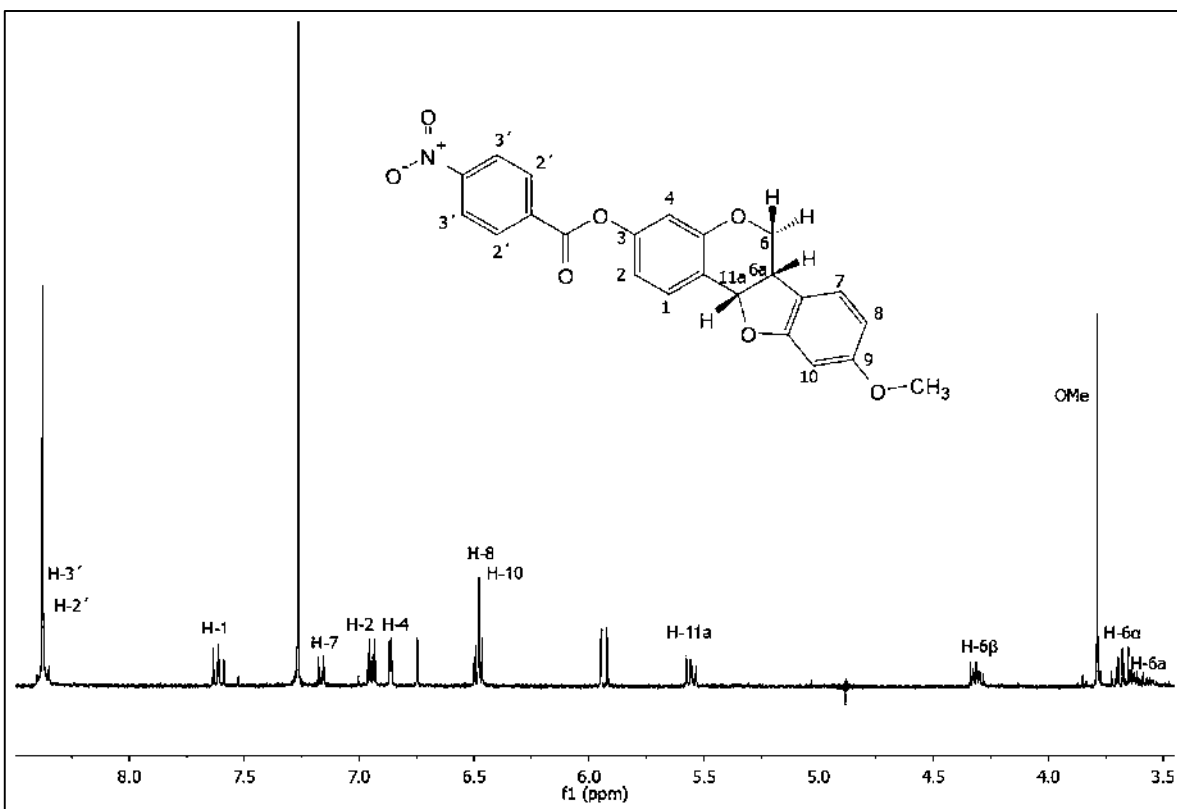


Figura 6.5a.4. Espectro de RMN-¹H (400 MHz, en CDCl₃) del derivado *p*-nitrobenzoato obtenido de la reacción de esterificación de la Medicarpina.

Como se puede observar, en la Figura 6.5a.4, aparece un nuevo grupo de señales a campo más bajo, alrededor de 8.37 ppm que integra para cuatro hidrógenos que corresponden al sistema *p*-nitrobenzoato. Nótese además, que las señales correspondientes a los hidrógenos 1, 2 y 4 se encuentran desplazadas a campo más bajo respecto a como se muestra en la figura 6.5a.3 (Espectro de Medicarpina) debido al efecto desprotector del grupo incorporado.

6. 5b) Derivado *p*-Metoxibenzoato de Medicarpina.

Se preparó el derivado por medio de la reacción entre la Medicarpina con el cloruro de *p*-metoxibenzoilo. Las condiciones de reacción ensayadas se resumen en la Tabla 6.5b. Donde el mejor rendimiento se obtuvo al utilizar piridina como base y el doble de equivalentes del cloruro de ácido por cada equivalente de Medicarpina.

Tabla 6.5b. Reacción de esterificación de la Medicarpina con el cloruro de *p*-metoxibenzoilo.

| Base utilizada | N. eq del cloruro de ácido/ Eq Medicarpina | % Rendimiento |
|----------------|--|---------------|
| Piridina | 1:1 | No Reaccionó |
| Piridina | 2:1 | 30 |
| TEA | 1:1 | 2 |
| TEA | 2:1 | 16 |

De la reacción de esterificación (**Figura 6.5b.1**) se obtuvieron cristales blancos y finos (**Figura 6.5b.2**), con un punto de fusión de 160-161 °C.

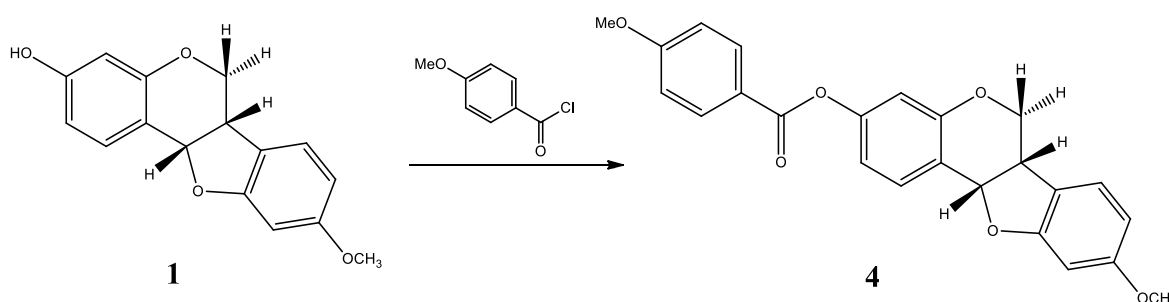


Figura 6.5b.1. Reacción de esterificación de la Medicarpina con el cloruro de *p*-metoxibenzoilo.



Figura 6.5b.2. Aspecto de los cristales del derivado *p*-metoxibenzoato.

Analizando el espectro de RMN-¹H del producto de reacción se corroboró que se obtuvo el compuesto **4** (**Figura 6.5b.3**), se aprecia la aparición de las señales en 6.99 y 8.15 ppm correspondientes al grupo *p*-metoxibenzoato y la nueva señal del metoxilo en 3.90 ppm.

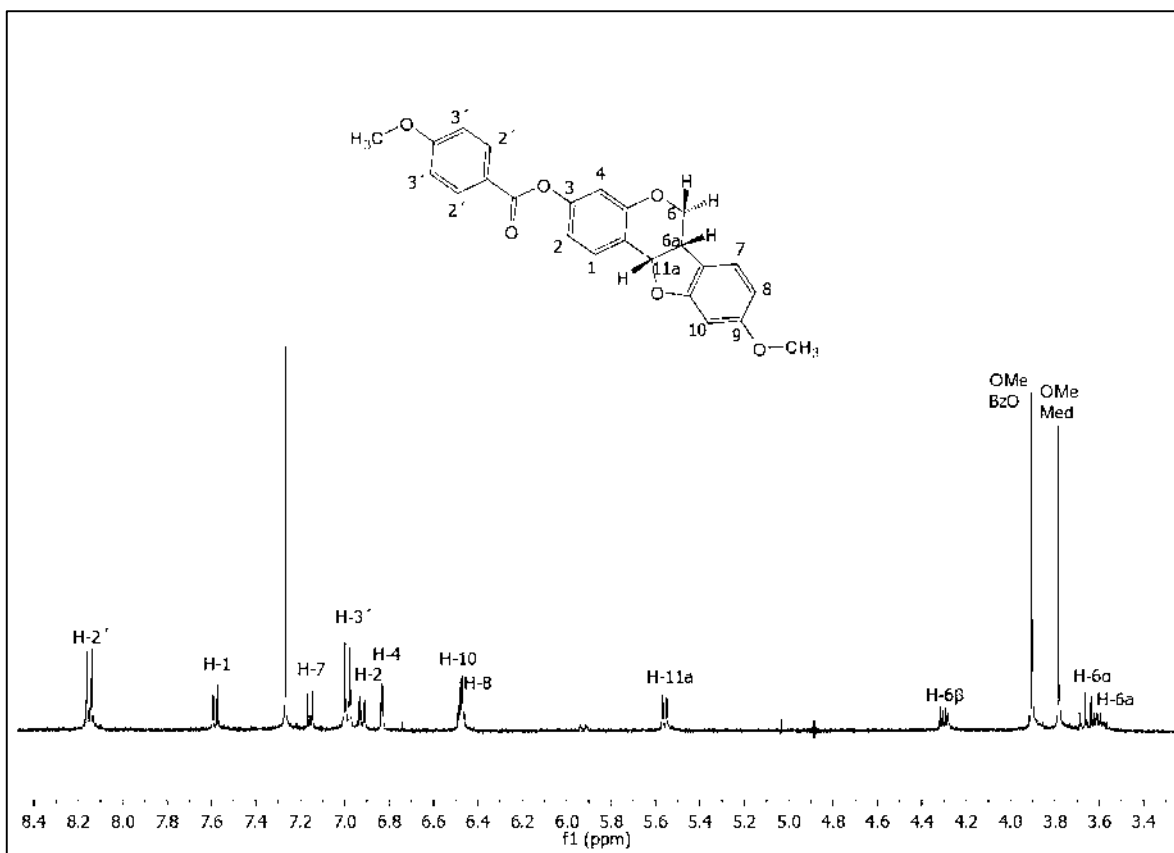


Figura 6.5b.3 Espectro de RMN-¹H (400 MHz, en CDCl₃) del *p*-metoxibenzoato de Medicarpina.

6.5c. Derivado benzoato de Medicarpina.

Para la obtención de último derivado propuesto se ensayaron condiciones de reacción para obtener el mejor rendimiento (**Tabla 6.5c**).

| Base utilizada | N. Eq del cloruro de ácido/ Eq Medicarpina | % Rendimiento |
|----------------|--|---------------|
| Piridina | 2:1 | No Reaccionó |
| TEA | 1:1 | 27 |
| TEA | 2:1 | 29 |

El rendimiento máximo obtenido en esta serie de condiciones fue de 29%, es posible que los rendimientos hayan sido abatidos debido a que para la obtención del producto puro se recromatografió en varias ocasiones el crudo de reacción, debido a que quedaban trazas de ácido benzoico proveniente del exceso de cloruro de ácido que no reaccionó, mientras que la materia prima se consumió casi totalmente y no hubo formación de subproductos, por lo que se intuye que fue debido a las purificaciones sucesivas que se obtuvieron los rendimientos reportados.

El producto de reacción (**Figura 6.5c.1**) puro se obtuvo en forma de cristales blancos (**Figura 6.5c.2**) con un punto de fusión de 138-140 °C y cuyo espectro de RMN-¹H se presenta en la Figura 6.5c.3.

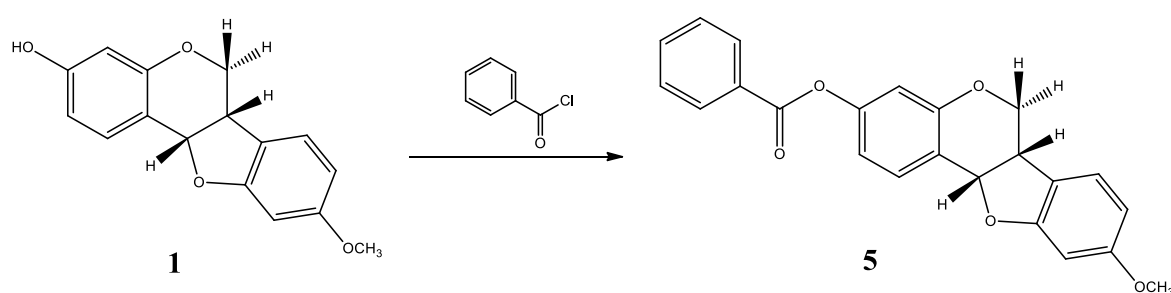


Figura 6.5c.1. Reacción de esterificación de la Medicarpina con el cloruro de benzoilo.



Figura 6.5c.2. Aspecto de los cristales del producto de esterificación de la Medicarpina con el cloruro de benzoilo.

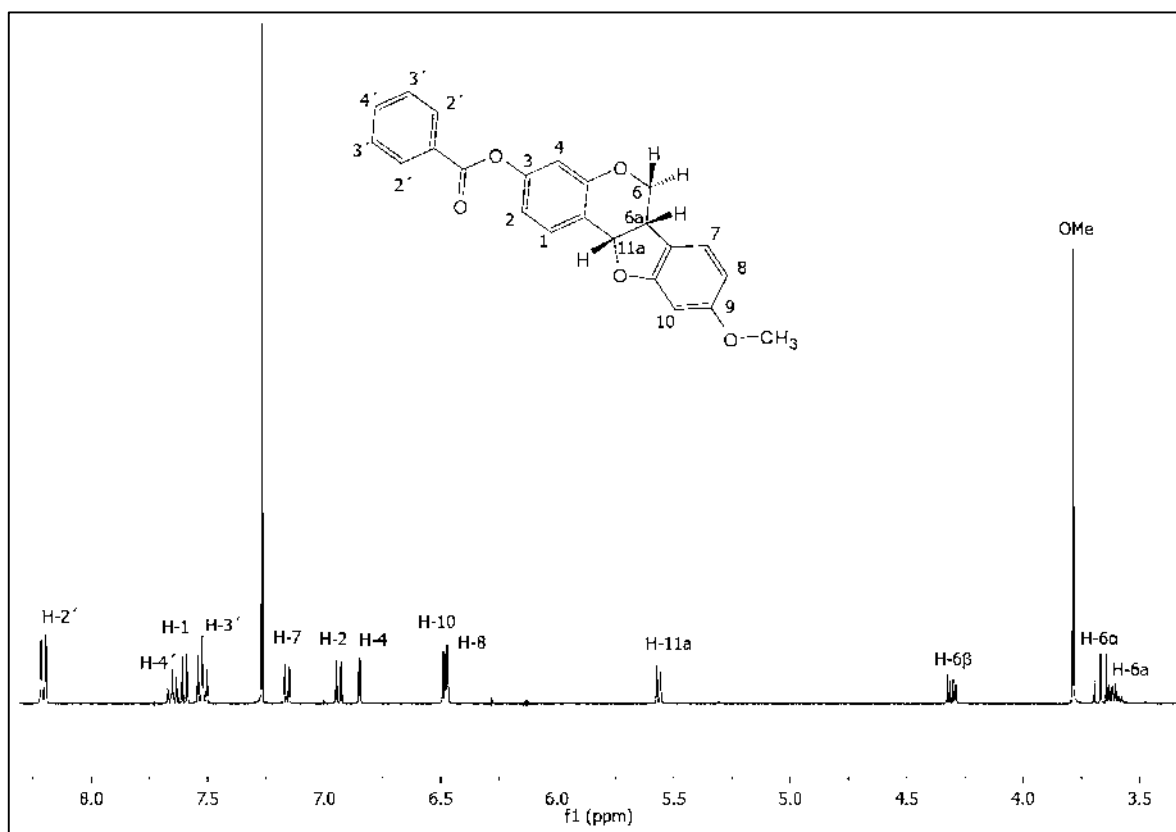
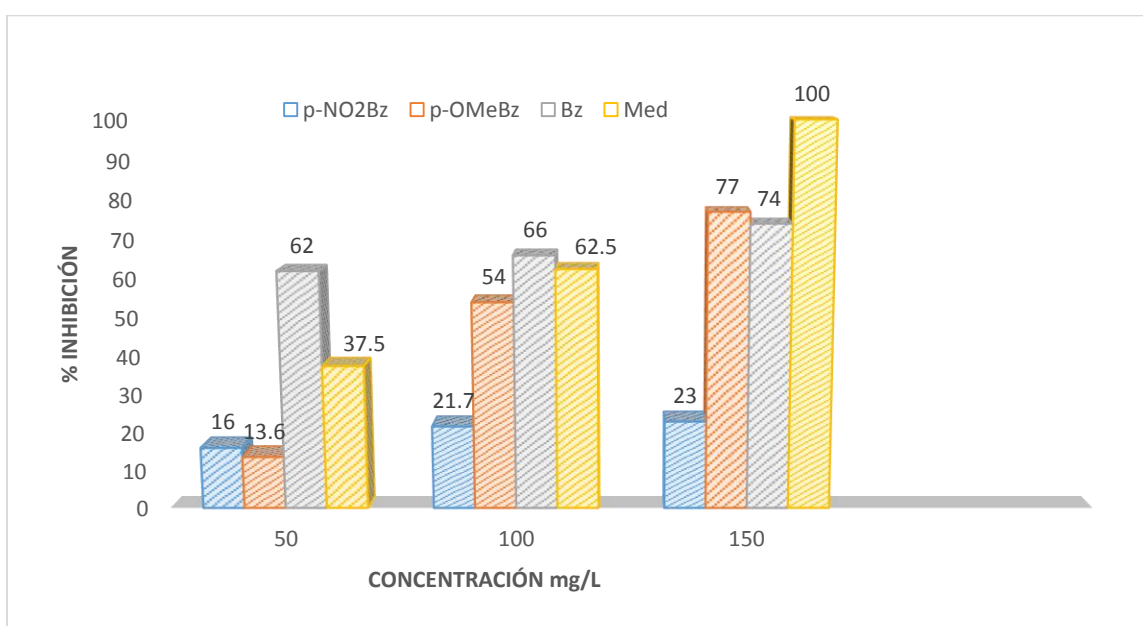


Figura 6.5c.3. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz, en CDCl_3) del benzoato de Medicarpina.

Como se ha venido observando con los derivados anteriores, el patrón de señales de la Medicarpina permanece en cada derivado, solo el desplazamiento químico de los hidrógenos 1, 2 y 4 se afecta, observándose estos a campo ligeramente más bajo y apareciendo las señales del nuevo grupo incorporado, en este caso se observan las nuevas señales a 7.52, 7.64 y 8.20 ppm correspondientes a los hidrógenos del grupo benzoato.

Una vez obtenidos los tres derivados de Medicarpina, se prosiguió a evaluar su actividad antifúngica contra el hongo *Trametes versicolor*, se probaron tres concentraciones de cada uno de los derivados, 50, 100 y 150 mg/L y se comparó su actividad contra la Medicarpina (**Gráfica 6.5**).

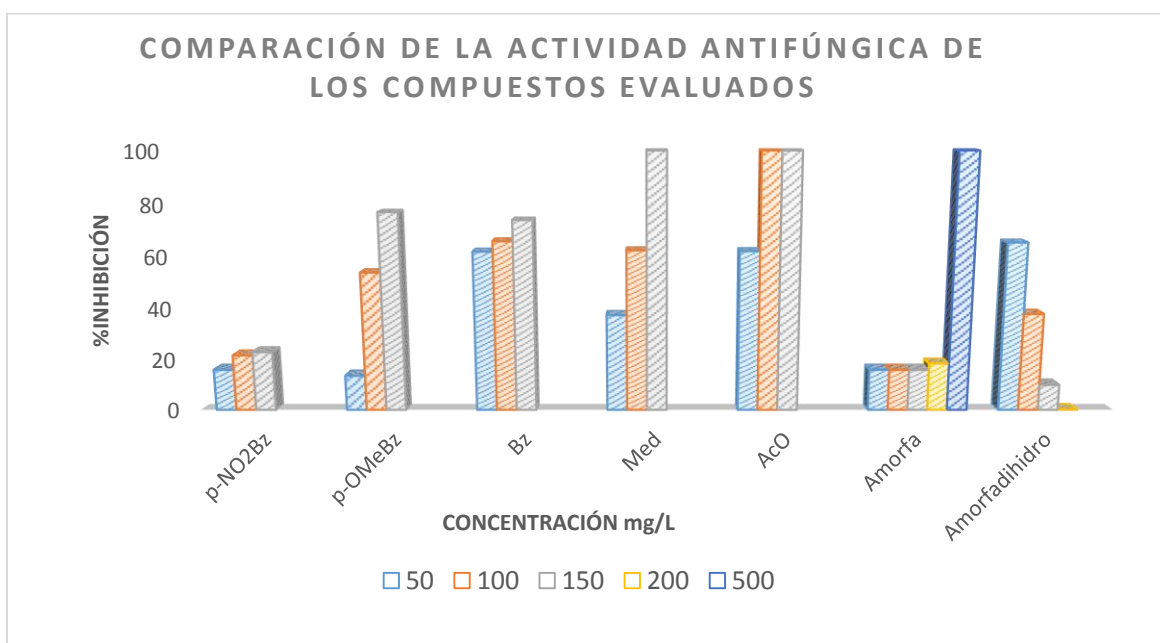


Gráfica 6.5. Evaluación antifúngica de los tres derivados funcionalizados de Medicarpina: *p*-NO₂Bz (*p*-nitrobenzoato de Medicarpina), *p*-OMeBz (*p*-metoxibenzoato de Medicarpina), Bz (Benzoato de Medicarpina), Med (Medicarpina).

La tendencia de inhibición se observó dependiente a la concentración, conforme se aumentó esta en cada derivado, el porcentaje de inhibición aumento también (**Gráfica 6.5**). El derivado con el grupo nitro fue el que presentó menor actividad, mientras que el derivado benzoato fue el de mayor efecto antifúngico en las concentraciones de 50 y 100 mg/L, sin embargo, a la concentración de 150 mg/L, el derivado con el grupo *p*-metoxibenzoato fue el que predominó con un 77% de inhibición del crecimiento fúngico.

6.6. Comparación de la actividad antifúngica de los compuestos evaluados.

En la Gráfica 6.6 se presenta resumida la actividad antifúngica que presentaron los compuestos; tanto los derivados funcionalizados de la Medicarpina, como los aislados del árbol: amorfaquinona (forma quinona e hidroquinona); como base de comparación se tomaron los resultados presentados por la Medicarpina y su derivado acetilado. La Figura 6.6 muestra un resumen de las estructuras químicas de los compuestos evaluados en la Gráfica 6.6.



Gráfica 6.6. Porcentaje de inhibición presentada por los compuestos evaluados.

De todos los compuestos evaluados en este proyecto, los derivados **4** y **5** los cuales son el resultado de la modificación de la estructura de la Medicarpina fueron los que a menor concentración tuvieron un mayor porcentaje de inhibición del hongo, mientras que **8** el cual es un compuesto de origen natural requiere una concentración mayor (500mg/L) para lograr la inhibición total.

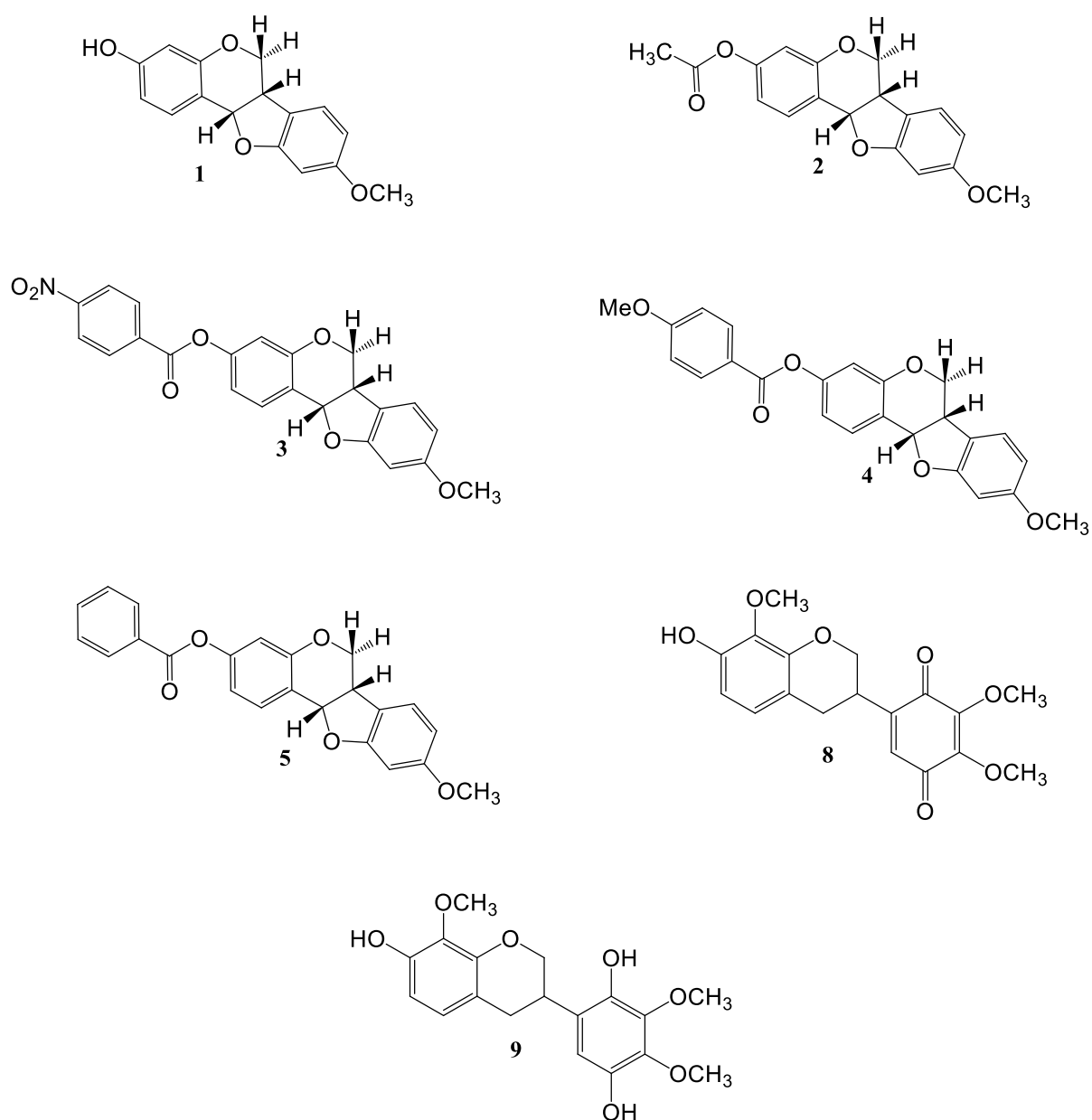


Figura 6.6. Estructuras químicas de los compuesto evaluados contra *Trametes versicolor*.

VII. CONCLUSIONES.

El árbol Palo dulce presentó 5.72% más de extraíbles totales que el árbol conocido como Tepehuaje. De los solventes utilizados para la extracción, el THF fue el que extrajo mayor porcentaje en ambos géneros.

Los extractos evaluados (hexánico, THF, acetato de etilo) del árbol *Lysiloma acapulcensis* conocido como Tepehuaje no presentaron actividad antifúngica contra *Trametes versicolor*. Sin embargo no se descarta la posibilidad de que este árbol presente metabolitos más polares que influyan en la durabilidad; aunado a esto la dureza y densidad que presenta la madera (**Mondragón, 2010**) puede ser otro factor que provea a este árbol su resistencia natural a la degradación.

Por otra parte los extractos hexánico y THF obtenidos del árbol Palo dulce (*Eysenhardtia polystachya*) presentaron moderados porcentajes de inhibición contra el hongo. Se obtuvo un compuesto mayoritario que es responsable en gran parte de la actividad que presentan ambos extractos, el cual mediante RMN-¹H y ¹³C, masas de alta resolución e IR y comparando los datos con la literatura se concluyó que se trataba de la isoflavanquinona: 7-hidroxi-8,3',4'-trimetoxiisoflavanquinona (Amorfaquinona), de la cual no hay reportes de haber sido aislada anteriormente del árbol estudiado; esta isoflavanquinona presentó inhibición completa del crecimiento de *T. versicolor* a una concentración de 500 mg/L.

Durante las purificaciones en columna cromatográfica para la obtención de la amorfaquinona, se obtuvo como subproducto un compuesto que se propuso ser la forma hidroquinona (**9**) de este compuesto, y que este producto se formó debido a la acidez de la sílice que se usó como fase estacionaria, se confirmó que se tenía la forma hidroquinona mediante reacción de acetilación, donde se obtuvo una miel amarillo claro, que mediante RMN-¹H se corroboró el producto acetilado.

Al compuesto **9** se le evaluó su actividad contra el hongo y se observó un comportamiento contrario a **8**, ya que a mayores concentraciones, la inhibición disminuía incluso al punto de que fue nula (concentración 200 mg/L). Se probó de igual manera la mezcla de **8** y **9** que se obtenía durante las purificaciones en CC, la cual se obtuvo en una proporción 43:7 respectivamente; de las concentraciones ensayadas se presentó un efecto sinérgico a la concentración de 50 mg/L, ya que a esta concentración se inhibió al 100% el hongo. Sin embargo este efecto se perdió en las demás concentraciones ya que al aumentar la concentración se disminuyó la actividad antifúngica.

Durante las extracciones con THF como solvente, se obtuvo el compuesto butilhidroxitolueno (BHT), el cual está presente como estabilizador en dicho solvente. Este compuesto presentó actividad inhibitoria del 100% del hongo a la concentración de 500 mg/L. La actividad que presentó puede deberse a que el mecanismo degradador de la enzima del hongo se realiza mediante reacciones de óxido-reducción y el BHT al ser un antioxidante, contrarresta este efecto degradador, por lo que el hongo no puede alimentarse y muere.

Muchas especies forestales deben su característica de ser maderas finas debido a la presencia de metabolitos que le proveen resistencia a la degradación de organismos, como lo es el caso de las dos especies estudiadas. Por lo que queda abierto el estudio de la amplia cantidad de árboles que presentan esta característica, lo cual nos puede conducir a la obtención de moléculas que presenten una actividad biológica importante como lo ha presentado la Medicarpina.

La funcionalización de compuestos de origen natural puede proveernos de nuevas moléculas con actividades importantes, en este proyecto se utilizó el núcleo de la Medicarpina como materia prima para obtener tres nuevos derivados ésteres de los cuales se obtuvieron rendimientos del 90% para el caso del derivado **3** (*p*-nitrobenzoato), 30% el derivado **4** (*p*-metoxibenzoato) y 29% para el derivado **5** (benzoato).

De acuerdo a los resultados obtenidos de la comparación de la actividad antifúngica (**Gráfica 6.6**); se llegó a la conclusión de que el núcleo de la Medicarpina con ciertas funcionalizaciones (derivados **4** y **5**) sigue siendo el más eficaz contra *Trametes versicolor* y la búsqueda de diferentes sustituyentes nos pueden conducir a tener moléculas más potentes como lo es **2** (acetato de Medicarpina), ya que de todos los compuestos que se han evaluado en nuestro grupo de trabajo, este sigue siendo el que a menor concentración inhibe totalmente el hongo, incluso más que la Medicarpina.

Con este trabajo se dio seguimiento a la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios los cuales pueden ser prometedores y puedan ser utilizados como agentes para tratar las maderas susceptibles al deterioro por agentes biológicos, además pueden ser materia de partida importante para la industria farmacéutica, ya que muchos metabolitos de origen natural han sido probados con eficacia contra numerosas enfermedades.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez L., Ríos M., Esquivel C., Chávez M., Delgado G., Aguilar M., Villarreal M., Navarro V. (1998) "Cytotoxic Isoflavans from *Eysenhardtia polystachya*" *J. Nat. Prod.* 61, 767-770.

American Society for Testing and Materials. Standard Method of Evaluating Wood Preservatives by Field Test with Stakes. ASTM D 1758. American Society for Testing and Materials, Vol. 04.09. Wood, pp. 280-286.

Árboles de Centro América. "*Lysiloma acapulcensis*". Consultado en línea el día 9 de Enero del 2013. URL: www.arbolesdecentroamerica.info/.../170.

Ávalos, A. Pérez, E. (2009). "Metabolismo secundario de plantas". Departamento de Biología Vegetal (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid. Consultado en línea el día 14 de Noviembre del 2012. URL: http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf

Barragán, B. Hernández, L. Quiroz, M. Cerezal, P. (1998). "Extracción y cuantificación del colorante púrpura presente en la madera de *Dalbergia congestiflora Pittier*". Instituto Politécnico Nacional, Escuela de Ciencias Biológicas.

Bhargavan, B., *et al.* (2012) "Medicarpin, a legume phytoalexin, stimulates osteoblast differentiation and promotes peak bone mass achievement in rats: evidence for estrogen receptor β -mediated osteogenic action of medicarpin" *The Journal of Nutritional Biochemistry* Volume 23, Issue 1 , Pages 27-38.

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009) "Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana". Consultado en línea el día 20 de Enero del 2013. URL: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Tepehuaje&id=7780>

Bobadilla, E. (2004) "Durabilidad Natural de la Madera de cinco especies aptas para la industria". Tesis para obtener el grado de Maestra en Tecnología de la Madera, celulosa y papel. Universidad de Misiones.

Capuz, R. (2005) *Materiales Orgánicos Maderas*. Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia.

Cartaya, O., Reynaldo, I. (2001) "Flavonoides: Características químicas y aplicaciones" *Cultivos Tropicales*, vol. 22, núm. 2, 2001, pp. 5-14 Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas La Habana, Cuba.

Castillo, E. Martínez, I. (2007). *Manual de fitoterapia*. Editorial Elsevier Masson. Barcelona, España.

Conabio. "Principales tipos de vegetación en Michoacán" consultado en línea el día 20 de Julio del 2014 URL: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/cambios_veg/doctos/tipos.html

Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. (2007) Fascículo 150. Consultado en línea el día 27 de Enero del 2013. URL: <http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOBA/Mimosoideae150.pdf>

Galbis J. (2004) *Panorama Actual de la Química Farmacéutica*. 2ª edición. Universidad de Sevilla.

García, M.; Pérez, L. (2003) "Fitoalexinas: Mecanismo de defensa de las plantas". *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, enero-junio, año/vol. 9, número 001. Universidad Autónoma de Chapingo México, pp 5-10.

Geografía de Michoacán, Instituto Nacional para la Educación de los Adultos. Consultado en línea, 1 Julio del 2014 URL: <http://bibliotecadigital.conevyt.org.mx/inea/frames.asp?page=36&id=149>.

Goel, A. Kumar, A. Raghuvanshi, A. (2012) "Synthesis, Stereochemistry, structural Classification, and Chemical Reactivity of Natural Pterocarpan". *Chemical Reviews*. CSIR- Central Drug Research Institute, Lucknow, India.

Gold, M., Allic, M. (1993). "Molecular Biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*". *Microb. Rew.* 57: p. 605-622.

González, G. (2012) "Patologías Bióticas de la Madera". Tesina para obtener el título de Magister en construcciones de Madera. Universidad de Bio-Concepción-Chile.

Grosvenor, P., Gray, D. (1996) "Colutequinone and colutehydroquinone, antifungal isoflavonoids from *Colutea arborescens*" *Phytochemistry*, Vol 43, No. 2, pp. 377-380.

Grotewold, E. (2006). *The Science of Flavonoids*. Edit. Springer. The Ohio State University, Columbus, Ohio, USA.

Harborne JB (1978) *Annual Proceedings of the Phyto-chemical Society of Europe*, No. 15: *Biochemical Aspects of Plant and Animal Coevolution*. Academic Press, London

Harborne J. Baxter H. (1999) *The Handbook of Natural Flavonoids*. Wiley.

He, K., *et al.* (1996) "A biflavonoid from *Dysoxylum lenticellare Gillespie*" *Phytochemistry* 42 (4) 1199-1201.

Higuchi, T. (1989) *Plant Cell Wall Polymers: Biosynthesis and Biodegradation* (Lewis, N.G. and Paice. H.G. eds) ACS Symposium Series 399, 488-502.

Hirano, K. y col. (1967) *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 40, 2229.

Holmquist, O., Cadenas, A., Pietrantonio, P., Piña, A. (2007) "Estudio de la durabilidad natural de maderas comunes en el bajo Apure de Venezuela". *Revista Forestal Latinoamericana*. V.22 n. 41 Mérida.

Honorato, A. Vazquez, L. Zamudio, F. (2001) "Durabilidad Natural de la Madera de cinco especies de *Quercus* del Estado de Puebla". *Polibotánica*, Diciembre, número 12. Instituto Politécnico Nacional. México. Pp 85-100.

Jeandet, P.; Douillet, A.; Bessis R. Debord S. Sbaghi M. Adrian M. (2002). "Phytoalexins from the *Vitaceae*: Biosynthesis, Phytoalexin Gene Expression in transgenic plants, Antifungal Activity, and Metabolism". *J. Agric. Food Chem.* 50, 2731-2741.

Jiménez L., Álvarez M., Muñoz M., Rodríguez I. (2008) "Pterocarpanes: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties" *Phytochem Rev* 7:125–154.

Katzung, B. (1991) *Farmacología Básica y Clínica*. Cuarta Edición. Editorial Manual Moderno. México, D.F.

Kuc, J. (1995) "Phytoalexins, Stress Metabolism, and Disease Resistance in Plants". *Annual Review Phytopathology*. 33: 273-297.

La Biodiversidad en Michoacán: Estudio de Estado. (2005) Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Secretaría de Urbanismo y Medio Ambiente. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México.

Lewis, G. P., Schrire, B., Mackinder, B., and Lock, M. (2005) *Legumes of the World*. Kew Royal Botanic Gardens, London.

Liu J, Li Y, Ren W, and Hu WX (2006) "Apoptosis of HL-60 cells induced by extracts from *Narcissus tazetta* var. *chinensis*". *Cancer Lett* 242, 133–140.

Marcano, D. Hasegawa, M. (2002) *Fitoquímica Orgánica*. Segunda Edición. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.

Martínez, A. (2005) "Flavonoides". Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Consultado en línea el día 20 de diciembre del 2012. URL: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>

Martínez, M.C. (2011) "Evaluación de la actividad antifúngica de diferentes extractos del duramen de *Dalbergia congestiflora* P. y aislamiento e identificación del componente con actividad biológica". Tesis Maestría en Ciencias y Tecnología de la Madera. UMSNH. Morelia Michoacán.

Mondragón V. S., Herrera M. A., Rutiaga J. G. (2010) "Descripción anatómica y propiedades físicas y mecánicas de la madera de *Lysiloma acapulcensis* (Kunth) Benth. (*Leguminosae*)" *Ciencia Nicolaita*. 52, 165-178.

Navarro V.M., González A., Fuentes M., Aviles M., Ríos M., Zepeda G., Rojas M. (2003) "Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants". *Journal of Ethnopharmacology*. 87, 85-87.

Pablo P. (2009). "Evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos acuosos y etanólico de *Eysenhardtia polystachya* (Ort.) Sarg. y separación de flavonoides". Tesis de Licenciatura del Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

Pennington, P. Sarukhán, J. (2005) Árboles Tropicales de México. Manual para la identificación de las principales especies. Tercera Edición. Ediciones Científicas Universitarias. México D.F. pp 118-120.

Peraza, F. (2001) Protección Preventiva de la Madera. Editorial aitim.

Pérez, R.M., Vargas, R., García, L.M., Dávila, L. (2002) "Efecto de isoflavonas aisladas de la corteza de *Eysenhardtia polystachya* sobre el crecimiento de cristales de oxalato y fosfato de calcio urinario" Boletín Mexicano de Urología A.C. Vol. 17, No. 3, pp 134-139.

Quevedo, L. (2012) "Evaluación de la actividad antifúngica de la acetil medicarpina" Tesis de Licenciatura, Facultad de Química Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.

Rahmana, A., Samoylenkoa, V., Jaina S., Tekwania, B., Khana, S., Jacoba, M., Midiwob, J., Hestera, J., Walkera, L., Muhammada, I. (2011) "Antiparasitic and Antimicrobial Isoflavanquinones from *Abrus schimperi*". *Nat Prod Commun.* 6(11): 1645–1650.

Remington Farmacia, (2000) 20ª edición, Editorial Panamericana.

Reyes R., Viveros N., Pérez V. (1995) "Resistencia natural de trece maderas mexicanas al ataque de termitas subterráneas". *Revista Madera y Bosques.* 1(1), 39-47.

Rutiaga, J., Windeisen, E., Shumacher, P. (2001) "Antifungal activity of heartwood extracts from *Dalbergia granadillo* and *Enterobium cyclocarpum*". *Holz als Roh-und Werkstoff.* 53(5): 308.

Shibata, H., Shimizu, S. (1978) "Amorphaquinone, a New Isoflavan-quinone from *Amorpha fruticosa* L." *Heterocycles.* Vol 10, No. 1, pp.85-86.

Stadler, M., Dagne, E., Anke, H. (1994) "Nematicidal activities of two phytoalexins from *Taverniera abyssinica*" *Planta Med.* Dec; 60 (6):550-2.

Stevens, P. (2001) Angiosperm Phylogeny Website. Consultado el día 27 de Enero del 2013. URL:<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>

Taiz, L; Zeiger, E. (2006) Fisiología Vegetal. Volumen 1. Publicaciones de la Universitat Jaume.

Tempesti, T., Alvarez, M., Araujo, M., Aragao, F., Carvalho, M., Durantini, E. (2012) "Antifungal activity of a novel quercetin derivative bearing a trifluoromethyl group on *Candida albicans*". *Med Chem Res* 21:2217–2222.

Zanni, E. (2008) Patología de la Madera, Degradación y Rehabilitación de estructura de madera. Segunda Edición. Editorial Brujas.