

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
QUÍMICO BIOLÓGICAS**



DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

TESIS

**“ESTUDIO QUÍMICO-BIOLÓGICO DE EXTRAÍBLES DEL
DURAMEN Y CORTEZA DE MADERAS DURABLES”**

QUE PRESENTA:

M.C. FREDY GEOVANNINI MORALES PALACIOS

DIRECTORES:

D.C. RAFAEL HERRERA BUCIO

D.C. PEDRO NAVARRO SANTOS

MORELIA, MICH. JUNIO DE 2020.

El destino se muestra en signos e indicios que parecen insignificantes pero que luego reconocemos como decisivos. Así, en la vida uno muchas veces cree andar perdido, cuando en realidad siempre caminamos con un rumbo fijo, en ocasiones determinado por nuestra voluntad más visible, pero en otras, quizá más decisivas para nuestra existencia, por una voluntad desconocida aun para nosotros mismos, pero no obstante poderosa e inmanejable, que nos va haciendo marchar hacia los lugares en que debemos encontrarnos con seres o cosas que, de una manera o de otra, son, o han sido, o van a ser primordiales para nuestro destino, favoreciendo o estorbando nuestros deseos aparentes, ayudando u obstaculizando nuestras ansiedades, y, a veces, lo que resulta todavía más asombroso, demostrando a la larga estar más despiertos que nuestra voluntad consciente.

Ernesto Sábato – La resistencia

Nunca te quejes de nadie, ni de nada, porque fundamentalmente tú has hecho lo que querías en tu vida. Acepta la dificultad de edificarte a ti mismo y el valor de empezar corrigiéndote. El triunfo del verdadero hombre surge de las cenizas de su error.

No te amargues de tu propio fracaso ni se lo cargues a otro, acéptate ahora o seguirás justificándote como un niño. Recuerda que cualquier momento es bueno para comenzar y que ninguno es tan terrible para claudicar.

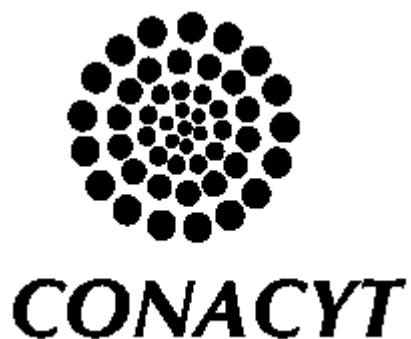
No olvides que la causa de tu presente es tu pasado así como la causa de tu futuro será tu presente.

Aprende de los audaces, de los fuertes, de quien no acepta situaciones, de quien vivirá a pesar de todo, piensa menos en tus problemas y más en tu trabajo y tus problemas sin eliminarlos morirán.

Aprende a nacer desde el dolor y a ser más grande que el más grande de los obstáculos, mírate en el espejo de ti mismo y serás libre y fuerte y dejarás de ser un títere de las circunstancias porque tú mismo eres tu destino.

Levántate y mira el sol por las mañanas y respira la luz del amanecer. Tú eres parte de la fuerza de tu vida, ahora despiértate, lucha, camina, decídete y triunfarás en la vida; nunca pienses en la suerte, porque la suerte es: el pretexto de los fracasados.

Pablo Neruda - No culpes a nadie



Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el otorgamiento del apoyo con número de registro: 598637. Para la realización del Doctorado en Ciencias Químicas, ofertado por la División de Estudios de Posgrado del Instituto de Investigaciones 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 utilizar las instalaciones y realizar el presente trabajo, el cual fue parte importante de mi formación.

ÍNDICE

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Pudrición de la madera	3
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Actividad antifúngica sobre <i>Trametes versicolor</i>	4
2.2. Actividad antioxidante	6
2.3. Detección de genotóxicos mediante prueba de micronúcleos	8
2.4. Diabetes Mellitus	10
2.5. Métodos computacionales: Estudios de simulación	12
2.6. Maderas propuestas para estudio	14
2.6.1. <i>Comocladia engleriana</i>	14
2.6.2. <i>Cochlospermum vitifolium</i> (Willd.) Spreng	14
2.6.3. <i>Mimosa aculeaticarpa</i>	15
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVO GENERAL	17
4.1. Objetivos Específicos	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS	18
5.1 Determinación de la actividad inhibitoria de los extraíbles sobre <i>Trametes versicolor</i>	18
5.2. Determinación de la actividad antioxidante mediante el método de DPPH	19
5.3. Evaluación de la actividad antibacteriana	19
5.4. Evaluación de la actividad genoprotectora <i>in vivo</i>	20
5.5. Evaluación de la actividad hipoglucemiante en un modelo de diabetes en ratones	20
5.6. Preparación de derivados funcionalizados de medicarpina	21
5.7. Modelado molecular y simulación	22
6. RESULTADOS	24
6.1. Análisis de extractos crudos	24
6.1.1. Obtención de extraíbles de <i>Cochlospermum vitifolium</i> (Willd.) Spreng.	24
6.1.2. Análisis de los extractos de <i>Cochlospermum vitifolium</i> mediante RMN- ¹ H	24
6.1.3. Obtención de extraíbles de <i>Mimosa aculeaticarpa</i>	26
6.1.4. Análisis de los extractos de <i>Mimosa aculeaticarpa</i> mediante RMN- ¹ H.	26

6.1.5. Obtención de extraíbles de <i>Comocladia engleriana</i>	28
6.1.6. Análisis de los extractos de <i>Comocladia engleriana</i> mediante RMN- ¹ H	28
6.2. Ensayos antifúngicos de los extractos crudos sobre <i>Trametes versicolor</i>	30
6.2.1. Actividad inhibitoria de los extractos de <i>Cochlospermum vitifolium</i>	30
6.2.2. Actividad inhibitoria de los extractos de <i>Mimosa aculeaticarpa</i>	30
6.2.3. Actividad inhibitoria de los extractos de <i>Comocladia engleriana</i>	31
6.3. Ensayos de la actividad antioxidante de los extractos mediante el método del radical DPPH	32
6.3.1. Ensayo de la actividad antioxidante de los extractos de <i>Cochlospermum vitifolium</i>	32
6.3.2. Ensayo de la actividad antioxidante de los extractos de <i>Mimosa aculeaticarpa</i>	35
6.3.3. Ensayo de la actividad antioxidante de los extractos de <i>Comocladia engleriana</i>	37
6.4. Ensayos de la actividad genoprotectora <i>in vivo</i> de los extractos	39
6.5. Ensayos de la actividad hipoglucemiante de los extractos	40
6.6. Aislamiento de compuestos mediante cromatografía en columna cromatográfica de los extractos crudos	42
6.6.1. Cromatografía en columna del extracto de THF de <i>Mimosa aculeaticarpa</i>	42
6.6.2. Cromatografía en columna del extracto de THF de <i>Cochlospermum vitifolium</i>	43
6.6.3. Cromatografía en columna del extracto de duramen de THF de <i>Comocladia engleriana</i>	46
6.6.3.1. Derivado acetilado de 3,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-croman-4-ona	48
6.6.4. Cromatografía en columna del extracto de corteza de THF de <i>Comocladia engleriana</i>	51
6.7. Evaluación de la actividad inhibitoria de los compuestos aislados sobre <i>Trametes versicolor</i>	55
6.8. Evaluación de la actividad antibacteriana con los compuestos aislados	56
6.9. Evaluación de la actividad reductora del radical DPPH de los compuestos aislados	57
6.10. Obtención de medicarpina a partir del extracto de AcOEt de <i>Andira inermis</i>	59
6.10.1. Obtención de derivados éster alifáticos de medicarpina	59
6.10.2. Obtención de derivados éter de medicarpina	65
6.11. Evaluación inhibitoria de los derivados de medicarpina sobre <i>Trametes versicolor</i>	70
6.12. Análisis conformacional de los compuestos aislados y los derivados de medicarpina	71
6.13. Estudio de simulación interacción enzima-ligando	73
7.- CONCLUSIONES	83
8. PARTE EXPERIMENTAL	85

8.1. <i>Cochlospermum vitifolium</i> : Naringenina o 5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-croman-4-ona	85
8.2. <i>Comocladia engleriana</i> (corteza); Chalcona o 1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(3,4-dihidroxifenil)-1-propanona	86
8.3. <i>Comocladia engleriana</i> (duramen); Flavanonol o 3,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-croman-4-ona	87
8.3.1. Derivado triacetilado del flavanonol	88
8.4. <i>Andira inermis</i> (duramen); Medicarpina o 3-hidroxi-9-metoxipterocarpan	89
8.4.1. Derivado acetilado de medicarpina	90
8.4.2. Derivado butirato de medicarpina	91
8.4.3. Derivado 2-etilbutirato de medicarpina	92
8.4.4. Derivado isobutirato de medicarpina	93
8.4.5. Derivado dietilcarbamato de medicarpina	94
8.4.6. Derivado metil éter de medicarpina	95
8.4.7. Derivado etil éter de medicarpina	96
8.4.8. Derivado bencil éter de medicarpina	97
9. APÉNDICE DE ESPECTROS	98
10. APÉNDICE DE IMAGENES	111
11. APÉNDICE DE GRAFICAS	116
11. BIBLIOGRAFÍA	118

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

δ	Desplazamiento químico
AcOEt	Acetato de etilo
ASTM	American Society for Testing and Materials
cm^{-1}	Inverso de la longitud de onda
CDCl_3	Cloroformo deuterado
$\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$	Acetona deuterada
COSY	COrrrelation Spectroscopy
DM	Diabetes mellitus
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DL50	Dosis letal media
DL100	Dosis letal absoluta
EPC	Eritrocito policromático
EPCMN	Eritrocito policromático micronucleado
ENC	Eritrocito normocromático
HETCOR	Heteronuclear Correlation Spectroscopy
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
mg/L	Miligramo por litro
mg/Kg	Miligramo por kilogramo
mg/dL	Miligramo por decilitro
MHz	Mega Hertz
MN	Micronúcleos
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO_3	Bicarbonato de sodio
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN de ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN de ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono trece
s	Señal simple
t	Señal triple
d	Señal doble
dd	Señal doble de doble
ddd	Señal doble de dobles de dobles
m	Señal múltiple
STZ	Estreptozotocina
i.p.	Vía intraperitoneal
i.g.	Vía intragástrica
THF	Tetrahidrofurano
TEA	Trietilamina
TMS	Tetrametilsilano

RESUMEN

En el presente trabajo se reporta el estudio de los extractos de hexano, THF y AcOEt de duramen y corteza de las maderas: *Comocladia engleriana*, *Cochlospermum vitifolium* y *Mimosa aculeaticarpa*. Las pruebas realizadas con los extractos, evaluaron la capacidad de inhibición sobre el hongo de pudrición *Trametes versicolor* (principal degradador de la madera, por lo cual las normas americanas lo recomiendan para realizar pruebas de durabilidad en laboratorio) y su poder de reducción del radical DPPH, con la finalidad de probar su durabilidad y su poder antioxidante. Siendo los extractos de THF los que obtuvieron mejores resultados en las pruebas anteriores, estos extractos se emplearon para realizar pruebas de genotoxicidad e hipoglucemiante *in vivo* en modelos empleando ratones. Con lo anterior, se probó que la madera *C. engleriana* considerada toxica, no presento actividad genotóxica, ni hipoglucemiante. Y Las maderas de *C. vitifolium* y *M. aculeaticarpa* consideradas maderas medicinales presentaron actividad genoprotectora, y en el caso de su efecto hipoglucemiante estos causaron una disminución considerable en los niveles de glucosa.

Los extractos de THF fueron llevados a purificación en columna cromatográfica, con la finalidad de aislar alguno de sus componentes. De lo cual se logró aislar del duramen de *C. vitifolium* el compuesto naringenina (5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-croman-4-ona), del duramen de *C. engleriana* un flavanonol (3,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-croman-4-ona), que al reaccionar con anhídrido acético se obtuvo su derivado acetilado, en tanto que, de la corteza de *C. engleriana* se aisló una chalcona (1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(3,4-dihidroxifenil)-1-propanona).

En nuestro grupo de trabajo se ha aislado la medicarpina de la madera de *Andira inermis*, este compuesto es de gran interés debido a que se ha demostrado su actividad inhibitoria sobre *Trametes versicolor*, en este proyecto se prepararon siete derivados de este compuesto, para observar el efecto que presenta la modificación de un grupo funcional en su actividad biológica, preparando cuatro ésteres alifáticos y tres éteres (dos alifáticos, un aromático). Con los derivados de medicarpina y los compuestos aislados se realizaron pruebas de inhibición sobre el hongo *Trametes versicolor*, de estos, solo la naringenina y la chalcona presentaron actividad inhibitoria sobre el hongo.

ABSTRACT

In the present work, the study of the extracts of hexane, THF and AcOEt of heartwood and the bark of the woods is reported: *Comocladia engleriana*, *Cochlospermum vitifolium* and *Mimosa aculeaticarpa*. The extracts tests were carried out by evaluating inhibitory capacity of the rot fungus *Trametes versicolor* (main wood degrader, which is why the American standards recommend it for carrying out laboratory durability tests) and its power to reduce DPPH radical, in order to test its durability and its antioxidant power. Being the THF extracts the ones that obtained better results in the previous tests, these extracts were used to carry out genotoxicity and hypoglycemic tests in vivo in models using mice. With the above, it was proved that *C. engleriana* wood considered toxic, did not present genotoxic or hypoglycemic activity. And the woods of *C. vitifolium* and *M. aculeaticarpa* considered medicinal woods presented unproductive activity, and in the case of their hypoglycemic effect they caused a considerable decrease in glucose levels.

The THF extracts were taken to purification on a chromatographic column, in order to isolate some of its components. From this, the compound naringenin (5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-chroman-4-one) was isolated from the heartwood of *C. vitifolium*, a flavanonol (3,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-chroman-4-one) was isolated from *C. engleriana*, that when reacting with acetic anhydride its acetylated derivative was obtained, whereas, from the bark of *C. engleriana* was isolated a chalcone (1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-propanone).

In our working group, medicarpine has been isolated from the wood of *Andira inermis*, this compound is of great interest because its inhibitory activity on *Trametes versicolor* has been demonstrated, in this project seven derivatives of this compound were prepared, to observe the effect of modifying a functional group on its biological activity, preparing four aliphatic esters and three ethers (two aliphatic, one aromatic). Inhibition tests on the fungus *Trametes versicolor* were carried out with the medicarpine derivatives and the isolated compounds, of these, only naringenin and chalcone showed inhibitory activity on the fungus.

1. INTRODUCCIÓN

Se llama madera al conjunto de tejidos del xilema que forman el tronco, las raíces y las ramas de los árboles o arbustos. La composición química de la madera no es posible establecerla con precisión para una especie de madera, esto debido a que la composición varía dependiendo de la parte del árbol (raíz, tallo o rama), zona del tronco, así como también tiene influencia la zona geográfica, el clima y las condiciones del suelo (**Zabel y Morrell, 1992**). A grandes rasgos, la madera está constituida por celulosa (40 a 45%), lignina (18 a 35%), hemicelulosas (15 a 25%), metabolitos secundarios (4 a 10%) y cenizas (0.2 a 1.0%) (**Browning, 1963; Pettersen, 1984; Salcedo et al., 2012**). La madera no es un material homogéneo, sino que está formado por un conjunto de células especializadas en tejidos que llevan a cabo las funciones fundamentales del árbol o arbusto como son: La conducción de la savia, la transformación y almacenamiento de los productos vitales así como sostén del árbol (**García et al., 2003**).

Durante su crecimiento, el árbol produce cada año un cierto volumen de madera. En la mayoría de los árboles la parte interna del leño cesa en su actividad conductora y sus células vivas (parénquima y fibras) mueren. Los cambios principales que sufre el leño son: emigración de las sustancias de reserva; reforzamiento de la pared con más lignina; acumulación en el lumen o impregnación de las paredes con sustancias orgánicas o inorgánicas como: taninos, aceites, gomas, resinas, colorantes, compuestos aromáticos; bloqueo de vasos (**Murace y Spavento, 2014**). El leño que ha sufrido estos cambios se le conoce como duramen, el cual es la parte inactiva y por lo general más oscura. El desarrollo del color es un proceso lento, que depende de la oxidación de fenoles precedida por la desaparición de almidón (**Capuz, 2005**). En cambio la porción clara, externa, activa con células vivas se le conoce como albura. En algunos árboles con formación tardía de duramen (roble, fresno, castaño), la albura tiene dos partes: una conductora y otros de reserva cuyos vasos están obstruidos por tilosis cumpliendo solo la función de sostén (**García et al., 2003**). Uno de los principales aportes de la duraminización, son las acumulaciones y modificaciones de compuestos los cuales suelen resultar tóxicos para los organismos biodegradadores de la madera. Por ello, muchas veces se puede relacionar el cambio del color, que produce la duraminización, con el aumento de durabilidad natural (**Díaz, 2003**). A la albura se le considera con menor durabilidad natural, debido a que en ella suelen encontrarse sustancias de reserva como azúcares y almidones que lo hacen especialmente preferible para hongos e insectos xilófagos (**Tuset y Durán, 1979; Darrell, 1989**). La proporción albura-duramen varía en diferentes especies, así como el grado de diferenciación entre ambas. Además en los

árboles que presentan duramen, este puede variar la cantidad y la coloración (**CONAFOR, 2007**).

La corteza del árbol por lo general se refiere a todos los tejidos externos y que rodean el cambium vascular. Ocupa un volumen mucho más pequeño que la madera de un tallo de árbol maduro porque se producen menos células de corteza que las de madera y porque las células de corteza más externas se descartan continuamente en la mayoría de las especies arbóreas, mientras que las células de madera se retienen y se acumulan a medida que el árbol crece (**Thirakul, 1998**). La corteza se divide en dos capas; corteza externa, es la capa exterior y está formada por células muertas que protegen el árbol del daño físico y de cambios climáticos; y corteza interna, también llamada floema y tiene la función de conducir en forma descendente la savia (productos de la fotosíntesis) elaborada por las hojas. En general, la corteza contiene muchos más extractivos, un poco menos de lignina y cantidades más pequeñas de holocelulosa en comparación con la madera del mismo árbol (**Hon y Shiraishi, 2001**).

El término “durabilidad” de las maderas, hace referencia a la capacidad sin tratamiento del material leñoso para resistir el ataque de los hongos xilófagos, las bacterias, los insectos y perforadores marinos como también el desgaste químico y mecánico (**Zabel y Morrell, 1992; Gonzales, 2012**). Este tipo de resistencia a la degradación, esta atribuida a la presencia de sustancias químicas activas en las paredes celulares de la madera, conocidos como extraíbles a los cuales se les atribuye características como la durabilidad, el color, el olor, la permeabilidad y la reducción en contracción e hinchamiento de cada especie maderera (**Ávila, 2012**). **Flores (2003)** afirma que los extraíbles que se encuentran en los tejidos vegetales son sustancias tales como terpenos, fenoles, taninos, azúcares, hidrocarburos alifáticos y aromáticos, aceites esenciales, ácidos grasos, resinas, grasas, minerales entre otros.

Como característica de los extraíbles al ser externos a la madera pueden ser separados mediante un disolvente adecuado o por la destilación al vapor, sin afectar la composición de la pared celular (**García et al., 2003**), además pueden ser específicos de cada género o especie, haciendo posible su uso como esquema taxonómico basado en su composición química (**Goldstein, 1991**).

Los extraíbles también son conocidos como metabolitos secundarios, esto debido a que no se encuentran involucrados en los metabolismos primarios, es decir, que no poseen roles reconocidos en los procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos (**Taiz y Zeiger, 2002**).

1.1. Pudrición de la madera

Entre los numerosos agentes de biodegradación de la madera, los hongos xilófagos (los Basidiomicetos responsables de las pudriciones blancas y castañas) producen el tipo de deterioro más frecuente y agresivo de la madera en uso y, a causa de ello, es común asociar la durabilidad con la resistencia a la degradación fúngica (**Wolff, 1989; Highley et al., 1994**). La degradación fúngica resulta de la despolimerización enzimática de los principales componentes de la pared celular: celulosa, hemicelulosa y lignina, descomposición que provoca la alteración de las propiedades físicas y mecánicas del leño (**Santander, 2007**). Dichas alteraciones son de diferente magnitud en función de la actividad enzimática del hongo responsable del deterioro (determinante del tipo de pudrición), de las características químico-anatómicas del leño como también de la colonización fúngica al atravesar los obstáculos/barreras que ofrecen las maderas, como son de su estructura y composición química (**Zabel y Morrell, 1992; Schwarze et al., 2000**).

Debido a que frecuentemente la durabilidad de las maderas es asociada con la resistencia a la degradación fúngica, esta puede ser estimada mediante métodos de laboratorio o pruebas aceleradas, denominadas así por su corta duración, como lo es el método denominado difusión en placa, en el cual se cultiva una cepa xilófaga en un medio artificial (agar extracto de malta) dispensado en cajas Petri, al cual se le aplica los extractos o metabolitos secundarios a distintas concentraciones y se basa en la medición del área de crecimiento del hongo en el medio de control en relación con el crecimiento con el medio con extractos (**Mori et al., 1995; Rutiaga et al., 1995**).

2. ANTECEDENTES

La base fisiológica y bioquímica de la resistencia de plantas al ataque de patógenos, hongos y bacterias; se encuentra relacionado con la biosíntesis de compuestos extraíbles implicados en los procesos infecciosos, algunos con actividad antimicrobiana, antifúngica y antioxidante, y otros como precursores de otros compuestos extraíbles que se forman hasta el momento de ser atacadas por algún microorganismo (**Rowell et al., 2005; Sepúlveda et al., 2003**).

A través del tiempo, el hombre ha hecho uso de los metabolitos secundarios con diversos propósitos, entre los que pueden mencionarse el uso como saborizantes, colorantes, fragancias, insecticidas, drogas medicinales y adictivas, cosméticos, etc. (**Salisbury y Ross, 1992; Sierra et al., 2018**).

2.1. Actividad antifúngica sobre *Trametes versicolor*

Los hongos de pudrición blanca son capaces de descomponer la lignina y/o simultáneamente degradar todos los componentes de la madera a CO₂ y H₂O. Su nombre proviene debido a que al degradar la lignina, solo queda acumulados los carbohidratos y se observa una coloración blanquecina (**Crawford, 1981; Gonzales et al., 1986; Arana et al., 2002**). Estos hongos también se denominan ligninolíticos por su capacidad de mineralizar la lignina basados en la producción de radicales libres, principalmente por medio de las enzimas extracelulares lignino peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y la lacasa (**Quintero, 2006**).

El hongo *Trametes versicolor* es un hongo de pudrición blanca, el cual desarrolla cuerpos fructíferos o setas (basidiomas) por todo el árbol y presenta anillos concéntricos de varios colores que van del pardo al blanco y del marrón al ocre, a veces con iridiscencias dependiendo del grado de humedad presente en el ambiente (**Menéndez, 2006**).

El hongo *Trametes versicolor* es uno de los más importantes degradadores de la madera esto debido a que puede degradar y metabolizar la lignina y los carbohidratos aproximadamente a la misma velocidad (**Liese, 1970; Collins y Dobson, 1997; Dávila y Vázquez, 2006**). Por estas razones la norma Annual Book of Estándar (**ASTM, 1994**) recomienda a este hongo para los ensayos de durabilidad. Este tipo de degradación se debe principalmente a la enzima extracelular oxidativa denominada lacasa, la cual es una glicoproteína extracelular con peso molecular entre 60 y 80 kDa (**Thurston, 1994; Shah y Nerud, 2002**), el mecanismo de degradación se da al reducir una molécula de oxígeno a dos moléculas de agua, oxidando simultáneamente la lignina y carbohidratos (**Von et al., 1986; Kunamneni et al., 2007**)

Se ha comprobado la inhibición del hongo *Trametes versicolor* con distintos extractos de maderas: como lo son los extractos acetónicos y etanólicos de las maderas de *Tabebuia serratifolia*, *Peltogyne porphyrocardia*, *Hymenaea courbaril* y *Centrolubium paraense* (**Velásquez et al., 2006**). Además, las fracciones etanol-agua obtenidas de *Dalbergia granadillo* y *Enterolobium cyclocarpum* presentaron inhibición micelial del hongo (**Rutiaga et al., 1995**).

En nuestro grupo de trabajo (**Quevedo, 2012**), se aisló del duramen de *A. inermis* la medicarpina (1) (**Figura 2**), un compuesto perteneciente a la familia de los isoflavonoides, específicamente a la subdivisión de los pterocarpanos. Además este compuesto fue aislado del duramen de *Dalbergia congestiflora* Pittier por **Martínez (2012)**, la cual probó su efecto antifúngico sobre el hongo *Trametes versicolor* al obtener un porcentaje de

inhibición del 100% a una concentración de 150 mg/L. La actividad antifúngica que presentó la medicarpina se le atribuyó a su anclaje molecular en la enzima lacasa del hongo; mediante un estudio de Docking empleando el software AutoDock, se observó el acoplamiento de la medicarpina en una cavidad cercana al sitio T2/T3 de la enzima (**Figura 1**), 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 (**Martínez, 2015**).

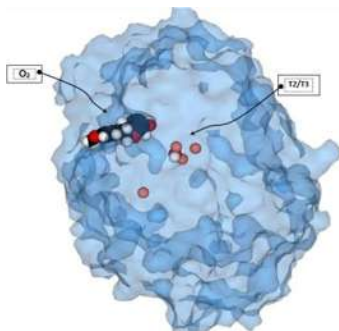


Figura 1. Acoplamiento entre la enzima lacasa y la medicarpina.

En últimos trabajos de nuestro grupo (**Quevedo, 2015; Morales, 2016**), se preparó un derivado acetilado y tres derivados de tipo éster aromático de la medicarpina (**Figura 2**), de los cuales el acetil-medicaarpina (**1a**) inhibió al hongo *Trametes versicolor* en un 100% a una concentración de 100 mg/L, concentración menor que la que necesita la medicarpina sin acetilar. Y los derivados **1b** y **1c** presentaron una inhibición de 75% y el derivado **1d** solo un 20% a una concentración de 150 mg/L, concentración a la que inhibe la medicarpina totalmente al hongo.

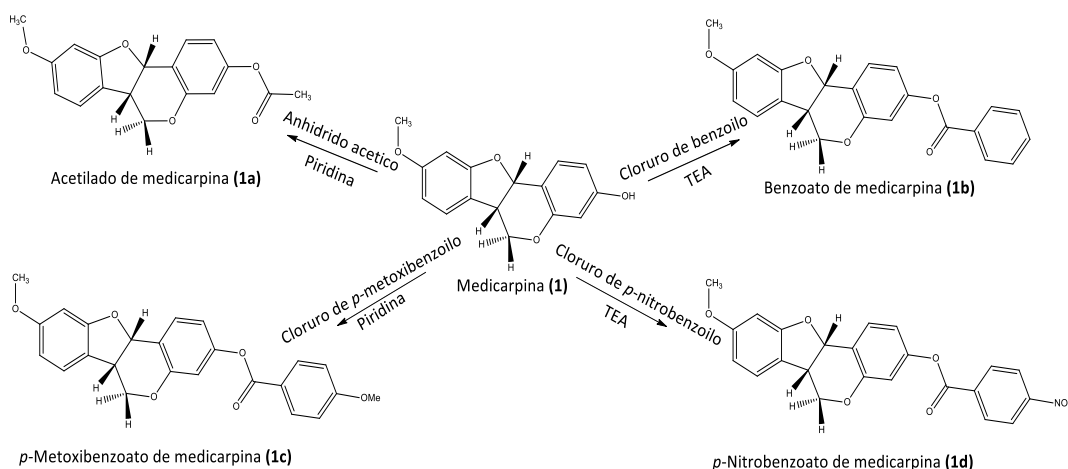


Figura 2. Derivados de la medicarpina

2.2. Actividad antioxidante

Los radicales libres son aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo. Son altamente reactivos y clave para formar otros radicales libres en cadena, además por la vida media que es de microsegundos, ocurre una rápida propagación con moléculas aledañas y mayor daño potencial. De hecho un radical libre puede afectar 1 millón de moléculas durante la reacción en cadena. Los compuestos en cuestión forman parte de los llamados especies reactivas del oxígeno (ERO) o ROS (**Coronado *et al.*, 2015**). El estrés oxidativo es un término asociado a las células y a la acción de un radical libre que le afecta, en condiciones normales se da un equilibrio entre la producción de radicales libres u otras especies reactivas con los mecanismos antioxidantes (exógeno y endógeno). Este equilibrio permite que la toxicidad por oxidación sea menor y con menos daño celular. Cuando se rompe el equilibrio, éste se podrá asociar con un déficit en el sistema antioxidante o por la proliferación descontrolada de los radicales libres (**Venereo, 2002; Núñez, 2011**). Por esta razón han sido implicados directamente como mediadores de enfermedades crónicas degenerativas y autoinmunes, como son la diabetes, enfermedades vasculares e hipertensión, cáncer, hiperplasias, formación de cataratas, enfisema, artritis, esclerosis múltiple, debilitación del sistema inmunológico así como también procesos de envejecimiento (**Mosquera *et al.*, 2009; Fereidoon y Ying, 2015**).

Ante el estrés oxidativo generado por los radicales libres el organismo responde con la defensa antioxidante, que es por definición toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones, con respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. El antioxidante al reaccionar con los radicales libres le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un radical libre débil, con escasos o nulos efectos tóxicos y que en algunos casos pueden regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes (**Avello y Suwalsky, 2006, Coronado *et al.*, 2015**).

Los agentes antioxidantes se pueden clasificar como endógenos, los cuales los produce la célula para anular y/o inhibir la generación de radicales libres, esto es mediante la generación de enzimas como lo son: superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa. Y antioxidantes exógenos que provienen de la dieta, y dentro de este grupo se incluyen la vitamina E, la vitamina C y los carotenoides (**Li *et al.*, 2009, Delgado *et al.*, 2010**).

El uso de la medicina tradicional está muy extendido en México y las plantas son de hecho la primera fuente para preparar remedios en esta forma de medicina alternativa. La

búsqueda de fuentes naturales de medicamentos para la prevención y cura de ciertas enfermedades ha sido atribuida en parte a las propiedades antioxidantes (**Khalaf et al., 2007; Singh et al., 2009**). La mayor parte de la capacidad antioxidante de los vegetales puede ser debida a los polifenoles que poseen características biológicas extensas y, particularmente, a su propiedad de secuestro de radicales libres (**Aquino et al., 2001, Quiñones et al., 2012**). Una gran cantidad de estudios han establecido que los compuestos fenólicos de las plantas incluyendo los flavonoides son antioxidantes potentes con efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos (**Gilgun et al., 2002; Prasad y Cole, 2002, D'Andrea, 2005**). La actividad antioxidante de los polifenoles es la propiedad de mayor interés, ya que ha sido blanco de un sin número de estudios; este efecto se debe a que contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos, los cuales reaccionan con los radicales libres. El número de polifenoles naturales se ha estimado en casi más de un millón, porque aparecen generalmente como glicósidos, y las diferentes especies de azúcares y sus diferentes formas de enlaces generan una gran variedad. Sin embargo, la bioactividad se atribuye al fragmento aglicona no al azúcar (**Sakakibara et al., 2003, Guo et al., 2015**).

La forma más extendida de evaluar la actividad antioxidante de una sustancia es mediante métodos espectrofotométricos *in vitro*. Los principales métodos son ORAC, FRAP, TEAC y DPPH (**Gutiérrez et al., 2007; Pisoschi y Negulescu, 2011**). El método ORAC se considera relevante para los sistemas biológicos, ya que mide el radical peroxilo, que es el más abundante de los radicales libres. El ensayo FRAP mide la capacidad de los antioxidantes para reducir el complejo férrico tripiridil triazina. La principal limitación de este método es que la capacidad de reducción no refleja necesariamente la actividad antioxidante, dado que el método no proporciona un sustrato oxidable. Por su facilidad de operación, los ensayos DPPH y TEAC son los más extendidos. Por otro lado, el método TEAC se basa en la capacidad de los antioxidantes para captar el radical 2,20-azonobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) más conocido como ABTS+; sin embargo este radical no se encuentra en los sistemas biológicos, por lo que el ensayo TEAC ha sido criticado por usar un radical no fisiológico. El ensayo de DPPH se basa en la detección del radical cromógeno DPPH. El inconveniente principal de este ensayo es que este radical, que es un radical de nitrógeno estable, no tiene ninguna similitud con los radicales altamente reactivos y transitorios formados en la peroxidación de lípidos (**Nur et al., 2012; Vázquez, 2015**).

2.3. Detección de genotóxicos mediante prueba de micronúcleos

Diversas actividades realizadas por el ser humano, así como también algunos eventos naturales contaminan el medio ambiente; debido a la liberación de agentes potencialmente tóxicos y genotóxicos (Córdoba, 2000; Klaassen y Watkins, 2001). Dentro de los múltiples efectos de los contaminantes se encuentra el efecto genotóxico, expresado en sus diversas formas, como por ejemplo: teratogénesis, mutagénesis y cancerogénesis. Por lo tanto, un agente genotóxico es todo aquel ente capaz de lesionar la integridad del material genético y/o sus componentes asociados. Entonces, bajo este término se incluyen los agentes que interaccionan directa o indirectamente con el ADN, provocando el aumento de mutaciones (mutagénesis); también los que interfieren en algunos procesos enzimáticos, así como en la reparación o en la génesis del material proteico involucrado en la segregación cromosómica (Lodish *et al.*, 2002; García y Carreras, 2008), lo anterior puede inducir enfermedades cardiacas, influir en procesos de envejecimiento y generar mutaciones en células somáticas, todo lo cual puede contribuir al desarrollo de cáncer (Gómez y Zúñiga, 2007).

Por lo anterior, es importante detectar las sustancias mutágenas, estas se pueden detectar en pruebas *in vivo* o *in vitro*, con micro o macro organismos. Entre estas se encuentran una variedad de pruebas, entre las que existen algunas muy económicas y rápidas; pero también las hay sumamente costosas: Entre ellas tenemos el cariotipo, el intercambio de cromátides hermanas, el índice mitótico, la prueba realizada en *Salmonella typhimurium* o prueba de Ames y la prueba de micronúcleos (Griffiths *et al.*, 2000).

La prueba de micronúcleos (MN), es un método ampliamente utilizado para la detección del daño genotóxico, producido por diferentes sustancias químicas y agentes físicos. La prueba de MN se puede realizar en gran número de especies, ya que la condición esencial es que el tejido se divida. Dado que la presencia de MN se traduce en el ámbito celular como pérdida de ADN, esta técnica es entonces una alternativa muy eficaz para el monitoreo de genotóxicos de manera fácil, sencilla, rápida y con resultados contundentes, debido a que no deja duda del daño producido en el ADN, ya que es claro que los MN aumentan cuando los organismos son expuestos a genotóxicos con acción micronucleogénica (Torres y Ramos, 2013). Esta prueba se realiza en tejido con rápida proliferación celular, sin embargo, la manera más sencilla es utilizando una gota de sangre, cuando esto es factible (Zuñiga *et al.*, 2001).

Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos, que espontáneamente o por causa de agentes genotóxicos, quedan fuera del núcleo durante

la división celular. En hematología, los micronúcleos se conocen como cuerpos de Howell-Jolly, su forma es generalmente redonda o almendrada y alcanza un diámetro entre 0.4 a 1.6 micras (**Heddle y Col., 1991; Fuic y Mijic, 1999, Cedano et al., 2012**). La prueba de MN permite detectar agentes clastogénicos y aneunogénicos (**Figura 3**). Los agentes aneunogénicos, se caracterizan por bloquear la polimerización de microtúbulos durante la formación del huso mitótico; originando de esta manera el rezago de cromosomas completos, que no se incluyen en los núcleos hijos. Mientras que los agentes clastogénicos, como son las radiaciones y algunos medicamentos antineoplásicos, actúan como análogos de base. Por lo tanto se intercalan en el ADN, e inhiben su síntesis y ocasionan posteriormente un debilitamiento de enlace entre las bases, lo que termina por producir una fractura cromosómica. Los compuestos aneunogénicos causan MN más grandes que los causados por los agentes clastogénicos (**Hatanaka et al., 1992; Bañales, 2009**).

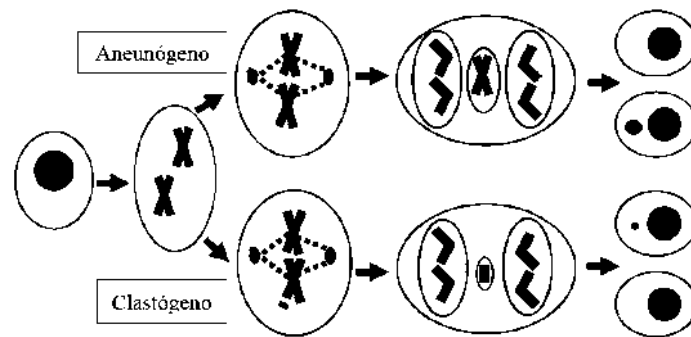


Figura 3. Formación de MN a partir de cromosomas o fragmentos cromosómicos por acción de agentes aneunogénicos o clastogénicos

La prueba de MN es de las más empleadas por su rapidez, debido a que al exponerse a un tóxico se pueden tener resultados a 24 y 48 h de la exposición. Debido a que los eritrocitos policromáticos (EPC) aparecen en la circulación en este tiempo; su aparición o presencia indica la certeza de que los eritrocitos policromáticos micronucleados (EPC-MN) son originados por la exposición al agente probado. Los eritrocitos policromáticos son los eritrocitos jóvenes que posteriormente maduran a eritrocitos normocromáticos (ENC), y por esta razón cuando son expuestos a genotóxicos en forma continua, es notable el incremento de eritrocitos micronucleados, por su acumulación (**Zúñiga et al., 1998; Lodish, 2002**). Por lo tanto la prueba de MN se basa en el conteo de los eritrocitos policromáticos micronucleados (EPC-MN) y los eritrocitos normocromáticos micronucleados (ENC-MN), ya que estos reflejan el daño producido por el agente tóxico en corto plazo (**Arencibia et al., 2009**).

En los diferentes sistemas de medicina tradicional del mundo, desde la antigüedad se usan plantas para tratar y prevenir distintos tipos de cáncer (**U.S. Congress Office of Technology, 1990; Sumner, 2001**). Desde 1950 se empezaron a evaluar las propiedades citotóxicas de los extractos de plantas, lo que ha dado como resultado el hallazgo de medicamentos como los alcaloides vinblastina y vincristina, obtenidos de *Catharanthus roseus* L. (Apocynaceae), que se usan para tratar leucemia infantil, así como el taxol, aislado de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), que es empleado para el cáncer de seno, cerebro y ovarios entre otras sustancias (**Lee, 2004**). En México se encontró que los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol de *Cuphea aequipetala* Cav. (Lythraceae), una de las llamadas “hierbas del cáncer”, mostraron citotoxicidad ligera en la línea de células de cáncer de cérvix y nula en la de carcinoma nasofaríngeo y la de colon (**Waizel-Bucay et al., 2003**), mientras que las fracciones de un extracto acetona-agua presentaron actividad sobre la línea DU-145 de carcinoma de próstata (**Ávila et al., 2004**).

2.4. Diabetes mellitus

Cuando las células beta (en los islotes de Langerhans del páncreas) no producen insulina, se origina la diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) o tipo I; en tanto que si los receptores de insulina de las células del cuerpo no funcionan, se genera la diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID) o tipo II (**Murillo et al., 2006**). En cualquier caso, la glucosa no puede penetrar en las células del cuerpo y utilizarse eficazmente; se produce entonces un desbalance entre la elaboración de especies reactivas de oxígeno (EROS) y la capacidad de defensa antioxidante del cuerpo; desbalance conocido como estrés oxidativo (**Halliwell et al., 1992, Lazalde et al., 2016**).

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad crónica degenerativa caracterizada por altos niveles de azúcar en la sangre (hiperglucemia), principalmente debido a defectos de secreción y/o acción de la insulina. El trastorno está asociado con un desequilibrio del índice glucémico y la intolerancia a la glucosa. Las complicaciones de la diabetes, afecta especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (**Okoli, 2018**). El paciente diabético presenta un riesgo 40 veces mayor de amputación de sus miembros inferiores, 25 veces mayor de insuficiencia renal terminal, 20 veces mayor de ceguera, 2 a 5 veces mayor de accidentes cerebro-vasculares y entre 2 y 3 veces mayor de infarto agudo de miocardio (**Mann, 2002**). Asimismo, tiene mayor predisposición de desarrollar hipertensión, dislipidemia y obesidad (**Klein et al., 2002**).

La DM2 es un grave problema de salud pública. Según la Organización Mundial de la Salud, más de 422 millones de personas en todo el mundo están afectadas (**World Health Organization, 2017**). Su prevalencia está aumentando rápidamente, y se estima que el número de afectados se duplicará para 2040. La diabetes es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. En 2015, cinco millones de personas murieron por complicaciones de la diabetes, lo que hace que la enfermedad y sus complicaciones sean la principal causa de muerte en la mayoría de los países. En México, alrededor del 10% de la población padece diabetes mellitus y se estima que el 90% de los casos son de tipo II (**Esquivel et al., 2012**). Se presenta con mayor frecuencia en adultos mayores y en personas obesas, por lo que se ha convertido en la principal causa de muerte con el 12% del total de defunciones (**Cabrera-Pivaral et al., 2008**).

En nuestro país y en otros países con un nivel socioeconómico semejante, un sector amplio de la población no tiene acceso a modernos esquemas de tratamiento, por las limitaciones económicas y culturales, surgiendo entonces la fitoterapia o medicina natural como una alternativa de igual efectividad, pero con menores efectos secundarios típicos de las drogas sintéticas y con la ventaja de ser más económica (**Hunt et al., 2000**).

Las plantas medicinales o sus extractos pueden optimizar el metabolismo de la glucosa y la condición integral de los diabéticos, no sólo por sus efectos hipoglucemiantes sino también al mejorar el perfil lipídico, el estado antioxidante y la función capilar. A nivel mundial se han reportado más de 400 productos que se comercializan para el tratamiento de la diabetes (**Yeh, 2003**). En México, existe una gran diversidad de plantas medicinales, **Andrade et al. (1995)**, informo sobre 306 especies de plantas mexicanas utilizadas como agentes hipoglucemiantes. A pesar de la gran cantidad de plantas que se han reportado por su uso empírico como antidiabéticos, solo un pequeño porcentaje de estas plantas se ha estudiado de manera sistemática, y las moléculas responsables de la actividad biológica de la mayoría de ellas son desconocidas (**Alarcón et al., 2008**).

La diabetes puede ser inducida por manipulaciones farmacológicas, quirúrgicas o genéticas en varias especies de animales. La mayoría de los experimentos en diabetes se llevan a cabo en roedores. Ningún modelo único presenta la fisiopatología completa de DM2. Sin embargo, hay modelos de roedores disponibles que presentan una o ambas de las dos características patogénicas principales de la DM2: la resistencia a la insulina y, posteriormente, el desarrollo de la disfunción de las células beta pancreáticas (**Arias y Balibrea, 2007**).

La inducción de diabetes experimental en la rata usando productos químicos que destruyen selectivamente las células β pancreáticas es muy conveniente y simple de usar.

Las sustancias más usuales para inducir diabetes en ratones son alloxan y estreptozotocina, estas sustancias químicas diabetogénicas son las más prominentes en la investigación de la diabetes. Ambos son análogos de glucosa citotóxica. Aunque su citotoxicidad se logra a través de diferentes vías, sus mecanismos de acción selectiva de células beta son idénticos (**Szkudelski, 2001, Lenzen, 2008**). Estos modelos son de gran importancia y necesarios para ensayos pre-clínicos controlados, los resultados de los trabajos durante los últimos años han mostrado resultados positivos, por la eficacia que se desprende de ellos y por la escasa toxicidad a las dosis recomendadas, por lo que podrían utilizarse durante largos períodos (**López, 2006**).

Como es el caso de *Musa paradisiaca* donde se ha establecido el efecto hipoglucemiante (**Nahar et al., 2000**), así como de *Guazuma ulmifolia* (**Alonso y Salazar, 2008**) y *Deguelia rufescen* (**Pereira et al., 2012**). Los extractos acuosos de *Passiflora suberosa* L (**Sudasinghe y Peiris, 2018**). Ensayos preclínica y estudio de estabilidad de los extractos acuosos e hidroalcoholicos a partir de *Momordica charantia* Lin (**Lagarto et al., 2014**). Ensayos preclínica de teuhetenona aislada de *Turnera diffusa* (**Parra et al., 2017**).

2.5. Métodos computacionales: Estudios de simulación

Cualquier acción farmacológica tiene su inicio en la formación de un complejo entre la molécula de fármaco y su sitio receptor en una macromolécula biológica. Por lo tanto, la especificidad de la respuesta a un fármaco dado viene determinada en gran medida por la capacidad de los distintos receptores celulares para reconocerlo como agonista o antagonista y evocar o no una respuesta (**García et al., 2004**). La mayoría de los procesos biológicos dependen de las interacciones de los receptores moleculares y sus ligandos, por lo que el reconocimiento molecular juega un papel clave en los eventos biomoleculares tales como: interacciones enzima-sustrato, proteína-inhibidor y ácido nucleico-inhibidor (**Mohan et al., 2005**).

Anteriormente, la búsqueda de nuevos compuestos con efectos terapéuticos implicaba la síntesis a través de varias rutas de los supuestos compuestos con la propiedad buscada o el cribado de productos naturales, esfuerzos que pueden ser categorizados como exploraciones aleatorias o al azar, en lugar de orientaciones racionales, en el mejor de los casos, estaban guiadas por el estudio más o menos cuantitativo del efecto que diversas modificaciones introducidas en la estructura de distintos fármacos o ligandos endógenos conocidos ejercían sobre una determinada acción farmacológica (**Reddy, 2007**). En los últimos años se han dado a conocer una serie de grandes avances en los cálculos teóricos

que han favorecido el uso y la popularidad de los estudios *in silico* (computacionales) para el análisis de moléculas de interés biológico; ello se ha convertido en parte integral de la investigación industrial y académica dirigida al diseño y descubrimiento de fármacos (Velásquez *et al.*, 2013)

Los métodos que relacionan la estructura química con la actividad biológica pueden dividirse en dos grandes categorías: métodos topológicos/estadísticos y métodos de modelado molecular. En la aproximación topológica se utilizan técnicas estadísticas o de reconocimiento de patrones para encontrar la relación de la estructura química con un proceso definido como lo es la actividad biológica, estos métodos son conocidos como relación cuantitativa estructura-actividad (Quantitative structure-activity relationship, o QSAR) (Soutelo *et al.*, 2016). En cambio en los métodos de modelado, se consideran las propiedades de las moléculas tomando en cuenta, un análisis conformacional mediante mecánica cuántica y/o clásica, campos de fuerzas, la termodinámica estadística, y los gráficos moleculares interactivos. Estos últimos permiten la representación y manipulación de las moléculas en tres dimensiones, lo que proporciona una información espacial que es esencial para comparar moléculas y para estudiar la interacción entre ligandos y receptores macromoleculares (Huang *et al.*, 2010).

Dentro de las herramientas de modelado molecular se encuentra el acoplamiento molecular (docking), técnica de gran utilidad para predecir la estructura de los complejos intermoleculares que se establecen entre dos o más moléculas. Uno de los casos más estudiados es la interacción proteína–ligando, cuyo objetivo principal es predecir energías y modos de enlace, y que suele hacerse previamente a un estudio experimental (Kumar y Nidhi, 2016). En estudios donde se aplica el acoplamiento molecular, el procedimiento en general es: generar un modo de unión o postura (cada modo de unión es una determinada posición y orientación del ligando en el sitio activo), se considera el mejor modo de unión que reporta la menor energía de unión. Alternativamente, puede ser seleccionada del sitio más poblado entre los sitios obtenidos después del acoplamiento molecular (Mahmood y Mir, 2017).

La identificación de las conformaciones de unión más probables requiere dos pasos: (1) exploración de un gran espacio conformacional que representa varios métodos de unión potenciales; (2) predicción precisa de la energía de interacción asociada con cada una de las conformaciones de unión prevista (Rao *et al.*, 2009). Los programas de acoplamiento molecular realizan estas tareas a través de un proceso cíclico, en el que la conformación del ligando se evalúa mediante funciones de puntuación específicas. Este proceso se realiza de forma recursiva hasta converger en una solución de mínima energía (Durrant y McCammon, 2010)

2.6. Maderas propuestas para estudio

El estado de Michoacán presenta casi todos los tipos de vegetación que existen en nuestro país gracias a su variedad de relieves y climas. En los bosques de este estado se encuentra una gran diversidad de especies forestales, a las que se les conoce una gran variedad de propiedades y usos, como son las especies:

2.6.1. *Comocladia engleriana*

Es un árbol de la familia *Anacardiaceae*, de nombre común “Tetlatia” (cosa que quema, en lengua náhuatl), lo anterior debido a que causa una severa dermatitis la cual es atribuida a las flores y hojas, sin embargo no se ha comprobado lo anterior. De los pocos estudios de este árbol, **Ruiz et al. (2008)**, comprobó el gran contenido fenólico y una buena actividad antioxidante de la parte aérea. Al ser un árbol considerado tóxico, la descripción de este árbol es casi nula, así como la bibliografía.

2.6.2. *Cochlospermum vitifolium* (Willd.) Spreng.

Es un árbol robusto perteneciente a la familia *Chochlospermaceae*, de tres a 15 m de altura con un diámetro a la altura del pecho de hasta 70 cm.; ramas gruesas con apariencia desgarrable; tiene corteza lisa ligeramente fisurada; los frutos son cápsulas globosas u ovoides, en forma de pera, de color verde rojizas a moreno rojizas, pubescentes, valvadas, de 5 a 10 cm de largo (**Croat, 1978**). Se distribuye en la vertiente del Pacífico, desde Sonora hasta Chiapas y en la vertiente del Golfo, desde el sur de Tamaulipas y San Luis Potosí hasta Yucatán. Crece silvestre en el bosque tropical perennifolio, bosque tropical subcaducifolio y bosque tropical subperennifolio; en una altitud de cero a 1,200 msnm.

En Morelos (Sierra de Huautla) se emplea en medicina tradicional, en decocción para el tratamiento de varios trastornos como presión arterial alta, hepatitis, ictericia e hiperglucemia. Las flores en infusión se emplean para bajar la temperatura y para la gripe, para la piel se recomienda para la sarna y quemaduras. En algunos lugares la reportan que se emplea contra mordeduras de víboras (**Cedano y Villaseñor, 2004; Monroy y Castillo, 2007**)

En estudios en ratas de los extractos hexánicos de la corteza han comprobado su efecto hipoglucemiante (**Sánchez et al., 2007**), así como **Ortiz et al. (2009)**, aseguran que es un

importante agente antidiabético y puede ser una alternativa para el control de la DM. Además, también se ha probado el efecto antihipertensivo en ratas de los extractos metanólicos de corteza (**Sánchez et al., 2010**).

2.6.3. *Mimosa aculeaticarpa*

Es una especie de arbusto de la familia de las *Fabaceae*, que puede alcanzar hasta 2 m de altura, tiene hojas con pecíolos de 1 a 3 cm de largo, con 3 a 9 pares de pinas, sus flores son blancas o blanco-rosáceas, reunidas en cabezuelas axilares de 1 cm de diámetro; fruto en forma de vaina de color café, en forma linear, curvada o recta, glabra o pubescente (**Rzedowski y Rzedowski, 2001**). Es de gran importancia por su capacidad para establecer asociaciones micorrízicas, nodulación bacteriana para fijación biológica de nitrógeno, formar bancos de semillas, amplia cobertura y ser una especie abundante en las zonas semiáridas del centro de México (**García-Sánchez, 2005**).

De los extractos clorofórmicos de hojas y metanólicos de tallos se han obtenido compuestos como taxifolina y quercetina, los cuales presentan una diversidad de actividades biológicas (**Cabrera, 2006**).

3. HIPÓTESIS

Que la resistencia a la degradación natural de las maderas durables está asociada con el tipo de metabolitos secundarios contenidos en estas maderas, la actividad biológica de estos metabolitos puede aumentar o disminuir al realizar transformaciones estructurales mediante la funcionalización de sus grupos.

4. OBJETIVO GENERAL

Aislamiento y caracterización estructural por métodos espectroscópicos de los extraíbles contenidos en la corteza y duramen de al menos tres árboles y que presenten actividad biológica, demostrada esta actividad preparar nuevos derivados funcionalizados para evaluar el efecto del grupo funcional en la actividad del compuesto. Realizar estudios de simulación estructura reactividad mediante dinámica molecular tanto de los compuestos aislados como a los derivados funcionalizados con el objeto de dar una interpretación teórica de las interacciones biológicas de las moléculas en estudio.

4.1. Objetivos específicos

- Obtener los extraíbles crudos de la corteza y duramen de los árboles a estudiar con disolventes orgánicos como hexano, tetrahidrofurano (THF), y acetato de etilo (AcOEt) empleando un equipo Soxhlet.
- Evaluar la actividad biológica inhibitoria sobre *Trametes versicolor* de los extraíbles crudos obtenidos con hexano, THF y AcOEt.
- Fraccionar los extraíbles crudos que presenten actividad biológica mediante cromatografía en columna empleando mezclas de disolventes en polaridad creciente.
- Aislar el o los compuestos que presenten actividad mediante cromatografía en columna, capa fina (TLC) o HPLC de las fracciones.
- Caracterización estructural del compuesto mediante métodos espectroscópicos como RMN, y sus experimentos COSY, NOESY, HETCOR, HMBC, HMQC, IR y Masa.
- Preparar nuevos derivados funcionalizados a partir de los compuestos aislados y de la medicarpina para evaluar el efecto del grupo funcional en la actividad biológica.
- Realizar estudios de acoplamiento de simulación estructura reactividad mediante LAMP y Autodock tanto de los compuestos aislados como de los derivados funcionalizados.
- Evaluar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos y los compuestos aislados.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

De la muestra de cada madera se tomó el duramen y la corteza, los cuales fueron reducidos de tamaño con formón y martillo en forma de astillas, para poder llevar a un molino pulverizador (marca IPHARMACHINE YF3-1 con capacidad de 5 kg/h) y obtener harina de duramen y corteza, las cuales se dejaron expuesta al aire libre para pérdida humedad.

Posteriormente la harina fue sometida a extracciones en un equipo Soxhlet por 4 horas por cada disolvente, empleándolos en polaridad creciente: hexano, tetrahidrofurano (THF) y acetato de etilo. Los extractos obtenidos fueron llevados a evaporación mediante un rotavapor, con lo cual se obtuvieron los extractos crudos.

5.1 Determinación de la actividad inhibitoria de los extraíbles sobre *Trametes versicolor*.

Las pruebas fueron preparadas en cajas Petri, empleando como medio de cultivo agar papa-dextrosa, este fue sometido a un proceso de esterilización en autoclave, al término de este proceso se incorporaron los extractos de corteza y duramen a concentraciones de 250 y 500 mg/L de cada uno de los árboles de estudio. Una vez solidificado el agar se inoculó con el micelio del hongo *Trametes versicolor* y se incubó por 7 días a 28 ± 2 °C, realizándose por triplicado cada prueba. De igual manera se preparó un control el cual consistió en el agar sin tratamiento. Posteriormente transcurrido el tiempo de incubación, se determinó el porcentaje de inhibición que presentaron los extractos con la siguiente formula (Rutiaga, 2001; Martínez, 2012):

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

Los compuestos aislados de los extractos, se probaron a distintas concentraciones debido a que presentaron distinta actividad inhibitoria.

En el caso de las pruebas con los derivados éster y éter de la medicarpina, se emplearon concentraciones de 100, 150 y 200 mg/L, con la finalidad de observar el aumento o disminución de la actividad inhibitoria sobre el hongo de estudio con respecto a la reportada por la medicarpina.

5.2. Determinación de la actividad antioxidante mediante el método de DPPH.

Este método fue desarrollado por **Brand-Willams *et al.* (1995)**; se basa en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH• por antioxidantes. Esta metodología fue modificada por **KIM *et al.* (2002)**, la cual se basa en la medida de la absorbancia del radical DPPH• disuelto en metanol, a la longitud de onda de 517 nm.

Para realizar este ensayo se preparó una solución de DPPH disuelto en metanol, la cual se mantuvo en refrigeración y posteriormente fue utilizada para obtener una curva de calibración, además, para la preparación de las muestras. El ácido ascórbico fue empleado como captador de radicales libres estándar y la actividad de los extracto se comparó con esta. Las muestras fueron preparadas empleando 1850 µL de metanol, 10 µL de extracto y 140 µL de DPPH, estas diluciones fueron preparadas en celdas de cuarzo, realizándose por duplicado, para continuar con su medición a una absorbancia de 517 nm. Se realizó una medición anterior a agregar la muestra (A₀) y posterior de agregarla, se continuo con las mediciones a los tiempos 5, 10, 15, 30, 60 y 90 minutos (A_f). La actividad antioxidante “% de inhibición” de la muestra se calcula a partir de:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{\text{Abs (DPPH t=0)} - \text{Abs (Muestra t=o)}}{\text{Abs (DPPH t=0)}} \times 100$$

5.3. Evaluación de la actividad antibacteriana

Las cepas de *Escherichia coli* (ATCC ER2523) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 2754) se obtuvieron del cepario del Módulo 3, del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB) de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

Previo a la realización de los ensayos, las bacterias fueron cultivadas por 24 h en 10 mL de caldo nutritivo (CN) líquido a 28 °C. Para los ensayos se utilizó el método Kirby-Bauer, el cual consiste en aplicar 50 µL de cada suspensión bacteriana en la caja Petri para realizar un estriado masivo sobre toda la superficie del agar, para estos ensayos se empleó el agar Muller-Hilton. Posteriormente al estriado, se colocaron discos de 5 mm de diámetro, los cuales fueron impregnados con los compuestos de estudio a diferentes concentraciones. Como control positivo se utilizó el antibiótico ampicilina, aplicando 10 µL a una concentración de 10 mg/mL; el control negativo fue DMSO 5% aplicando un volumen de 50 µL. Los halos de inhibición se determinaron a las 24 y/o 48 horas, con estos datos se obtuvo los porcentajes de inhibición y a su vez, la concentración mínima inhibitoria (CMI), la CL₅₀ y CL₁₀₀ (**Rojas *et al.*, 2005**).

5.4. Evaluación de la actividad genoprotectora *in vivo*.

La evaluación de la actividad genotóxica *in vivo*, se realizó administrando antraceno como agente genotóxico en ratones y se evaluó la formación de micronúcleos en sangre periférica de ratón (frotis sanguíneos) como una forma indirecta de evidenciar daño al ADN, pues en un eritrocito maduro no debe haber núcleo, pero si el animal está ante un agente tóxico que altere los procesos de duplicación del material genético, entonces esto podría reflejarse con la aparición de restos de cromatina en donde no debe haberlos (micronúcleos). Esto se comparó con ratones administrados con antraceno y con los extractos del producto natural con la finalidad de observar una protección ante el genotóxico, siendo esto la ausencia de micronúcleos (genoprotección).

La evaluación genoprotectora se realizó mediante la técnica de micronúcleos (MN) en sangre periférica, en la cual se emplearon ratones albinos de la cepa NIH machos (25 - 30 g de peso corporal). Inicialmente los ratones fueron pesados (administración por peso), para continuar con la administración del antraceno (tóxico) a una dosis de 10 mg/kg empleando aceite como vehículo por vía intragástrica y posteriormente se administraron los extractos de THF obtenidos de los diferentes árboles por la misma vía, en dosis de 250 y 500 mg/kg utilizando como vehículo solución salina a pH entre 7-8.

Anterior a la administración del tóxico y los extractos, y en el transcurso de las semanas de administración, se cortó aproximadamente 1 mm del extremo terminal de la cola de cada animal para obtener una gota de sangre, la cual se colocó directamente en un portaobjetos para realizar un frotis sanguíneo. Cada laminilla se fijó con metanol absoluto por 6 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se tiñó durante 30 minutos con una solución de Giemsa diluida en solución buffer fosfato (pH 6.8). Después, las laminillas fueron sumergidas en agua, secadas a temperatura ambiente y observadas en el microscopio. El potencial genotóxico y citotóxico se determinó por el conteo del número de eritrocitos policromáticos micronucleados en 1000 eritrocitos policromáticos (EPMN/EP) y la proporción de eritrocitos policromáticos en 1000 eritrocitos normocromáticos, en diez campos observados al microscopio por ratón respectivamente (Schmid W., 1975; McGregor *et al.*, 1980).

5.5. Evaluación de la actividad hipoglucemiante en un modelo de diabetes en ratones

Para este estudio se utilizaran ratones machos cepa NIH (25-35g). Se formaran lotes con un n=6, los cuales se dejaron en ayuno por un periodo de 12-18 h, a cada uno se les midió peso corporal y los niveles de glucosa en sangre periférica basales, realizando un corte del

extremo distal de la cola mediante un dispositivo comercial (Optium Freestyle, Abbott). Posteriormente, se aplicaron tratamientos diferentes con los lotes formados como son:

I.- Lote control o normoglucémico; Se administró agua destilada, vía intragástrica cada dos días, y se le midió glucosa sanguínea y peso corporal semanalmente (con ayuno previo de 12 – 18 h), durante 6 semanas.

II.- Control diabético; Después de la primera medición de peso y glucosa, se procedió a diabetizar a los ratones, administrando estreptozotocina (STZ; solubilizada en buffer de citratos 0.1 M, pH=4.5) vía intraperitoneal (120 mg/kg); una semana después se midió el peso y glucosa, tomando en consideración que el criterio de hiperglucemia en ratón es ≥ 150 mg/dL. Los ratones diabéticos fueron administrados vía intragástrica cada dos días, y se midió glucosa sanguínea y peso corporal semanalmente, durante 6 semanas.

III. Diabético + Extractos; Después de la primera medición de peso y glucosa, se procedió a diabetizar los ratones, administrando estreptozotocina (STZ; solubilizada en buffer de citratos 0.1 M, pH=4.5; dosis de 120 mg/kg, vía i.p.), una semana después se midió peso y glucosa. Los ratones diabéticos fueron administrados con los extracto de THF de los árboles resuspendidos en un vehículo a una dosis de 500 mg/kg (vía i.g.) cada dos días, y se midió glucosa sanguínea y peso corporal semanalmente, durante 6 semanas.

Con los datos de peso y glucosa generados durante las 6 semanas de tratamiento, estos se sometieron en un software estadístico (Sigma stat 3.5) y se empleó la prueba de ANOVA bifactorial de medidas repetidas y la prueba de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls cuando fue necesario. En todos los casos se empleó un nivel $\alpha = 0.05$, como criterio de decisión para establecer diferencias significativas entre las comparaciones.

5.6. Preparación de derivados funcionalizados de medicarpina

La Medicarpina (**1**) fue obtenida del duramen de *Andira inermis*, mediante maceración en AcOEt por 7 días, posteriormente se evaporó el disolvente para obtener el extracto crudo. El extracto se purificó mediante columna cromatográfica y su obtención se corroboró mediante RMN-¹H.

Empleando **1** se prepararon distintos derivados como son (**Figura 4**); cuatro derivados éster de tipo alifático, empleando los cloruros de ácido butírico (**2**), ácido 2-dietilbutírico (**3**), ácido isobutírico (**4**) y ácido dietilcarbomoi (**5**). Y tres éteres dos de tipo alifático y un aromático, empleando los haluros de alquilo yoduro de metilo (**6**), bromuro de etilo (**7**), bromuro de bencilo (**8**). Lo anterior con la finalidad de probar el aumento o disminución

de la actividad inhibitoria sobre el hongo *Trametes versicolor* de los derivados, respecto a la actividad inhibitoria reportada de la medicarpina sobre el hongo (150 mg/L).

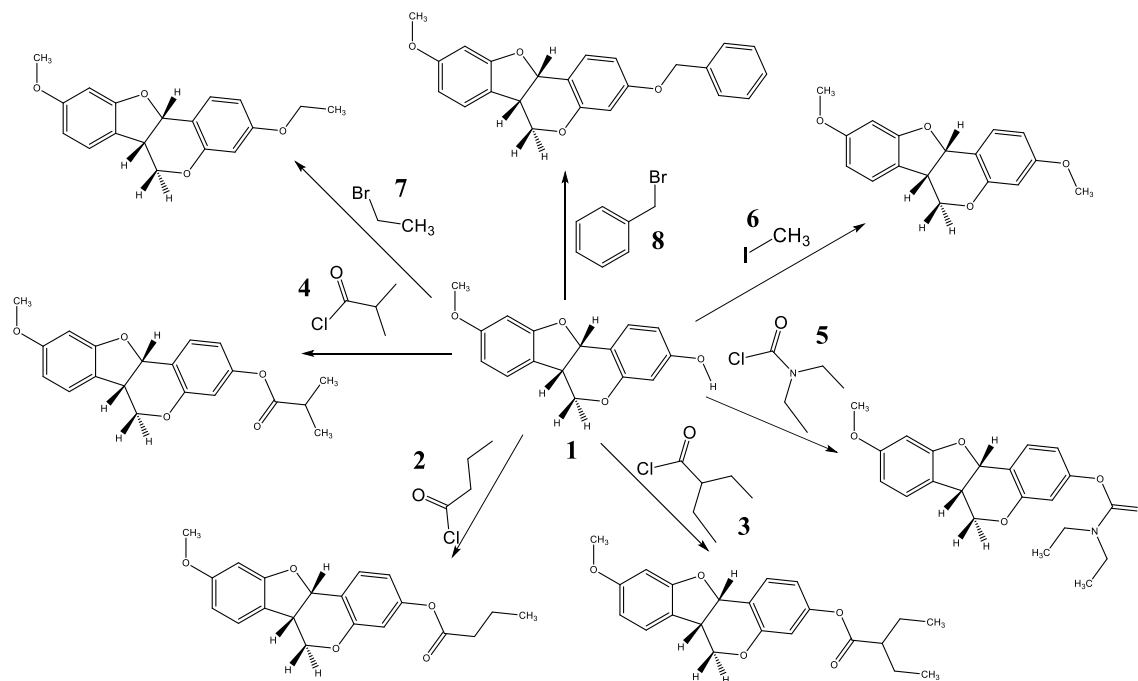


Figura 4. Preparación de cuatro derivados éster (empleando cloruros de ácido) y tres derivados éter (empleando haluros de alquilo) de medicarpina

5.7. Modelado molecular y simulación

El modelado molecular es una herramienta que nos ayuda a predecir la interacción de una macromolécula con un ligando, por lo que se empleó en el análisis de la interacción que existe entre la enzima lacasa del hongo *Trametes versicolor* con la medicarpina y los derivados funcionalizados que han sido preparados. Lo anterior con la finalidad de dar una explicación a la actividad inhibitoria de la medicarpina y los derivados sobre *Trametes versicolor*.

Para la preparación de las estructuras de medicarpina y los derivados, se empleó un análisis conformacional mediante métodos computacionales, esto se llevó a cabo al aplicar el método teoría de funcionales de la densidad (DFT) empleando el funcional híbrido B3LYP, con un conjunto de funciones de base 6-311G**, con el cual se obtuvo el conformero de mayor estabilidad (menor energía). Este análisis estructural se basó

principalmente en un comparativo con el diagrama de rayos X reportada para la medicarpina (**Deesamer et al., 2009**).

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

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

6. RESULTADOS

6.1. Análisis de extractos crudos

6.1.1. Obtención de extraíbles de *Cochlospermum vitifolium* (Willd.) Spreng.

Al someter a Soxhlet tanto la corteza y duramen de *C. vitifolium* se obtuvieron los extractos crudos correspondientes, los cuales presentaron una consistencia mielosa y una coloración oscura, a excepción del extracto de duramen de hexano, que presentó una coloración rojiza, además de obtener los siguientes resultados (**Tabla 1**).

Tabla 1. Obtención de extractos de *C. vitifolium* de lotes de 14 g, en Soxhlet por 4 h.

	Disolvente	Peso de extracto (g)	%	% Total de extraíbles
Duramen	Hexano	0.125	0.90	7.15
	THF	0.468	3.35	
	AcOEt	0.406	2.9	
Corteza	Hexano	0.203	1.45	13.12
	THF	0.857	6.12	
	AcOEt	0.777	5.55	

6.1.2. Análisis de los extractos de *Cochlospermum vitifolium* mediante RMN-¹H.

Los espectros de los extractos de hexano de corteza y duramen se obtuvieron en cloroformo deuterado (**Figura 4 y 5**), en los cuales se observan señales a campo bajo de 1.0 a 2.5 ppm y aproximadamente a 5.5 ppm, estos hidrógenos de tipo alifático que indican compuestos de tipo ácidos grasos, este conjunto de compuestos no fueron de interés para este proyecto.

Los espectros de THF y AcOEt del duramen y corteza se obtuvieron en acetona deuterada, en los espectros del duramen tanto THF y AcOEt (**Figura 5**), se pueden observar señales a campo bajo de 6.5 a 7.5 ppm que indican la presencia de hidrógenos aromáticos, y a campo alto de 1.0 a 3.0 ppm hidrógenos alifáticos, así como de 3.0 a 5.5 ppm para hidrógenos alílicos y heteroátomos.

En los espectros de la corteza (**Figura 6**), en el de THF se observan señales muy similares en todo el espectro con las descritas en los espectros del duramen, y en el espectros de AcOEt solo se observan señales definidas de 3.0 a 4.0 ppm.

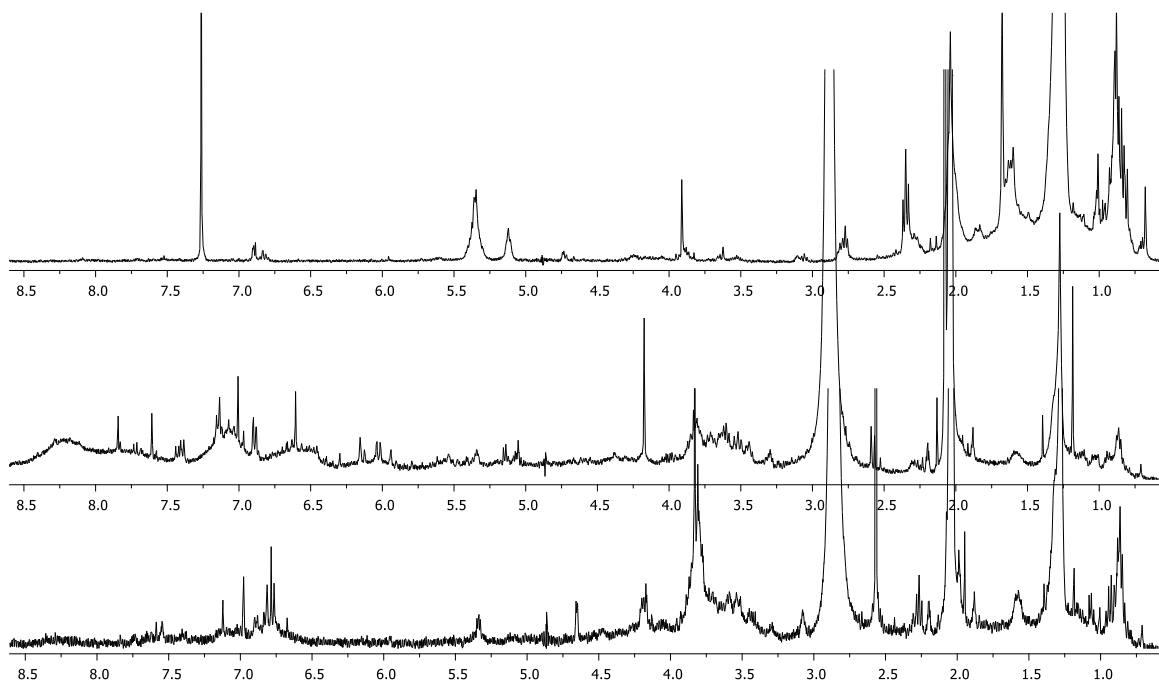


Figura 5. Espectros de RMN-¹H de los extractos del duramen de *Cochlospermum vitifolium*

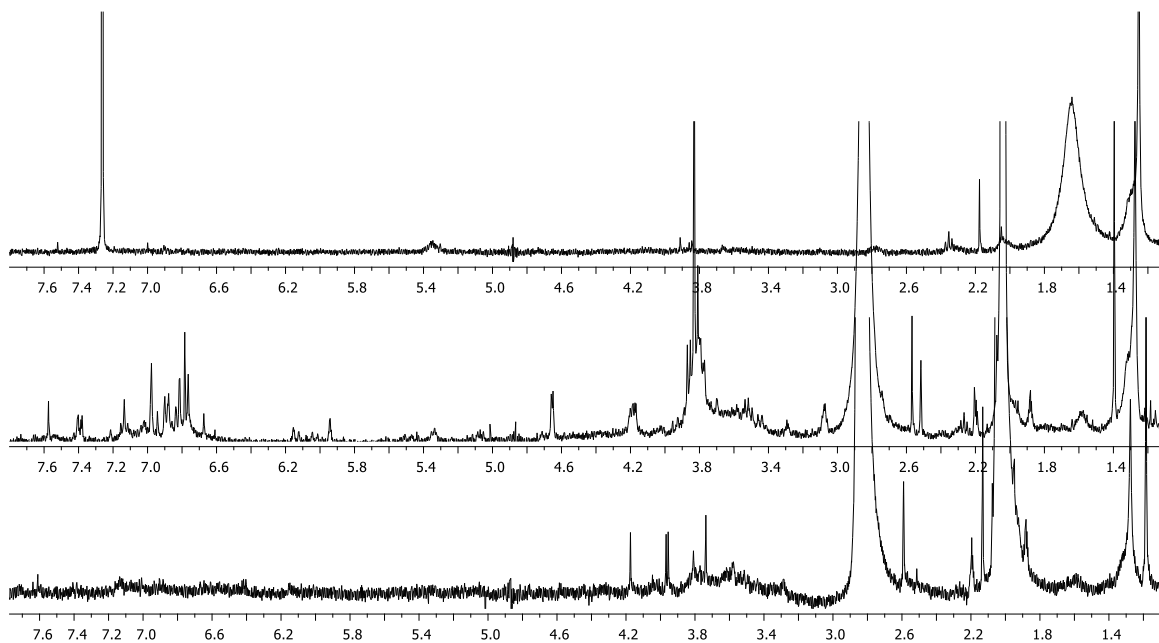


Figura 6. Espectros de RMN-¹H de los extractos de la corteza de *Cochlospermum vitifolium*

6.1.3. Obtención de extraíbles de *Mimosa aculeaticarpa*

Los extractos de *Mimosa aculeaticarpa* obtenidos mostraron distintas características como fueron; los extractos de hexano de corteza y duramen presentaron una consistencia mielosa de color negro, mientras que los extractos de THF y AcOEt tanto de la corteza como de duramen se obtuvieron unos solidos amorfos de una coloración rojiza, de los cuales se obtuvieron en las siguientes cantidades (**Tabla 2**).

Tabla 2. Obtención de extractos crudos de *M. aculeaticarpa* mediante lotes de 18 gr, en Soxhlet por 4 hrs.

	Disolvente	Peso de extracto (g)	%	% Total de extraíbles
Duramen	Hexano	0.107	0.59	11.57
	THF	1.855	10.3	
	AcOEt	0.122	0.68	
Corteza	Hexano	0.103	0.57	9.83
	THF	1.561	8.6	
	AcOEt	0.119	0.66	

6.1.4. Análisis de los extractos de *Mimosa aculeaticarpa* mediante RMN-¹H.

De los extractos antes mencionados se obtuvieron sus espectros de RMN-¹H, de los cuales los de hexano de corteza y duramen (**Figura 7 y 8**) se obtuvieron en cloroformo deuterado, en estos espectros se observan señales de 1.0 a 3.0 ppm y de 5.0 a 5.5 ppm, como se mencionó estas señales son características de compuestos de tipo alifáticos.

Los extractos de THF y AcOEt se obtuvieron en acetona deuterada, de los cuales los del duramen presentaron señales de 3.5 a 5.0 ppm característicos para hidrógenos alílicos y de heteroátomos, además de observarse señales que van de 6.0 a 8.0 ppm lo que indica la presencia de hidrógenos de tipo aromático (**Figura 7**). Y en los espectros de corteza se observan señales a campo alto que van de 0.5 a 2.5 ppm las cuales indican la presencia de hidrógenos de tipo alifático, así como señales de hidrógenos alílicos que van de 3.5 a 5.0 ppm y de 6.0 a un poco más de 8.0 ppm característicos de hidrógenos alifáticos. (**Figura 8**).

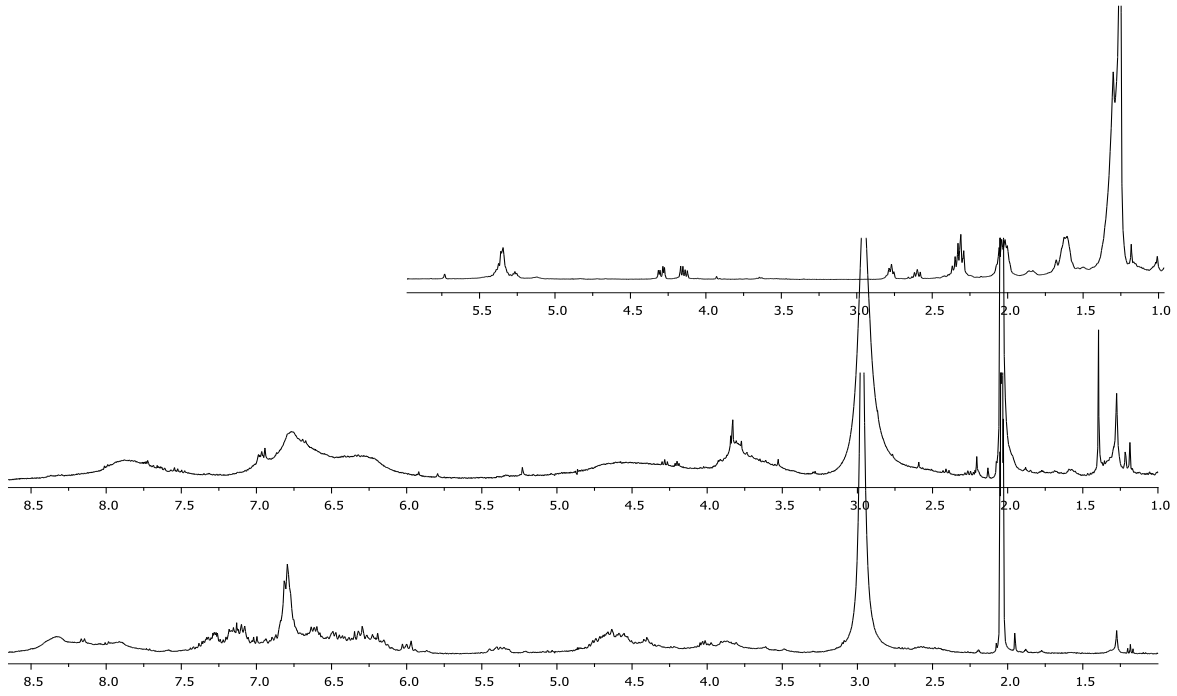


Figura 7. Espectros de RMN-¹H de los extractos del duramen de *Mimosa aculeaticarpa*

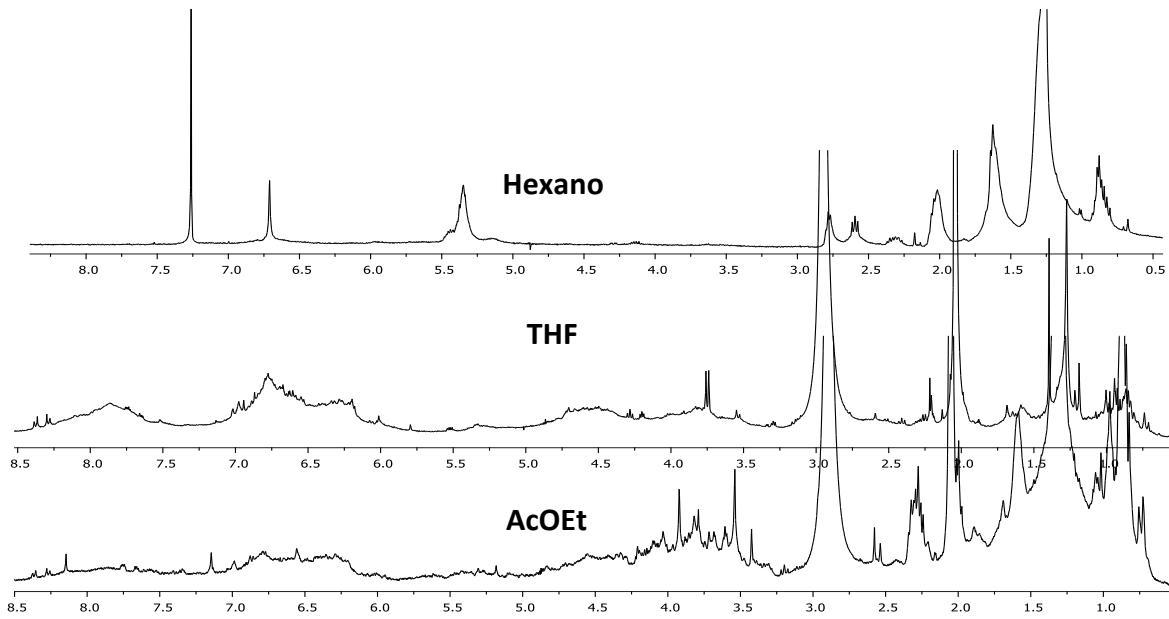


Figura 8. Espectros de RMN-¹H de los extractos de la corteza de *Mimosa aculeaticarpa*

6.1.5. Obtención de extraíbles de *Comocladia engleriana*

De los extractos obtenidos del duramen de *C. engleriana*, el de hexano presentó una consistencia mielosa de color blanco, y los extractos de THF y AcOEt se obtuvieron en forma sólida con una coloración naranja. En el caso de los extractos de corteza, todos presentaron una consistencia mielosa de una coloración negra. Como se muestra a continuación la mejor extracción se obtuvo con los extractos de THF (**Tabla 3**).

Tabla 3. Obtención de extraíbles de *C. engleriana* mediante lotes de 20 gr, en Soxhlet por 4 hrs.

	Disolvente	Peso de extracto (g)	%	% Total de extraíbles
Duramen	Hexano	0.042	0.21	25.9
	THF	3.15	15.8	
	AcOEt	1.975	9.9	
Corteza	Hexano	0.226	1.1	6.7
	THF	0.91	4.6	
	AcOEt	0.218	1	

6.1.6. Análisis de los extractos de *Comocladia engleriana* mediante RMN-¹H

Como en los extractos de los dos árboles antes mencionados, los espectros de RMN-¹H de hexano se obtuvieron en cloroformo deuterado y los espectros de THF y AcOEt se obtuvieron en acetona deuterada. Como se puede observar en los espectros de hexano de corteza y duramen se observan señales de hidrógenos tipo alifáticos a campo alto de 1.5 a 2.5 ppm y señales de hidrógenos alílicos de 3.5 a 5.5 ppm (**Figura 9 y 10**).

En los extractos de THF y AcOEt del duramen (**Figura 9**), se observan la similitud de señales a campo bajo de 6.0 a 8.5 ppm, característico para hidrógenos de tipo aromático, al igual que las señales de 3.5 a 5.5 ppm para hidrógenos de tipo alílicos, y la poca presencia de hidrógenos a campo alto de 3.0 a 1.2 ppm. En los extractos de THF y AcOEt de la corteza (**Figura 10**), se observan nuevamente la similitud de señales a campo alto de 6.0 a 8.0 ppm, y en aproximadamente en 13 ppm una señal simple que indica la presencia

de puentes de hidrogeno, al igual que las señales que van de 3.5 a 4.5 ppm y de 3.5 a 2.0 ppm.

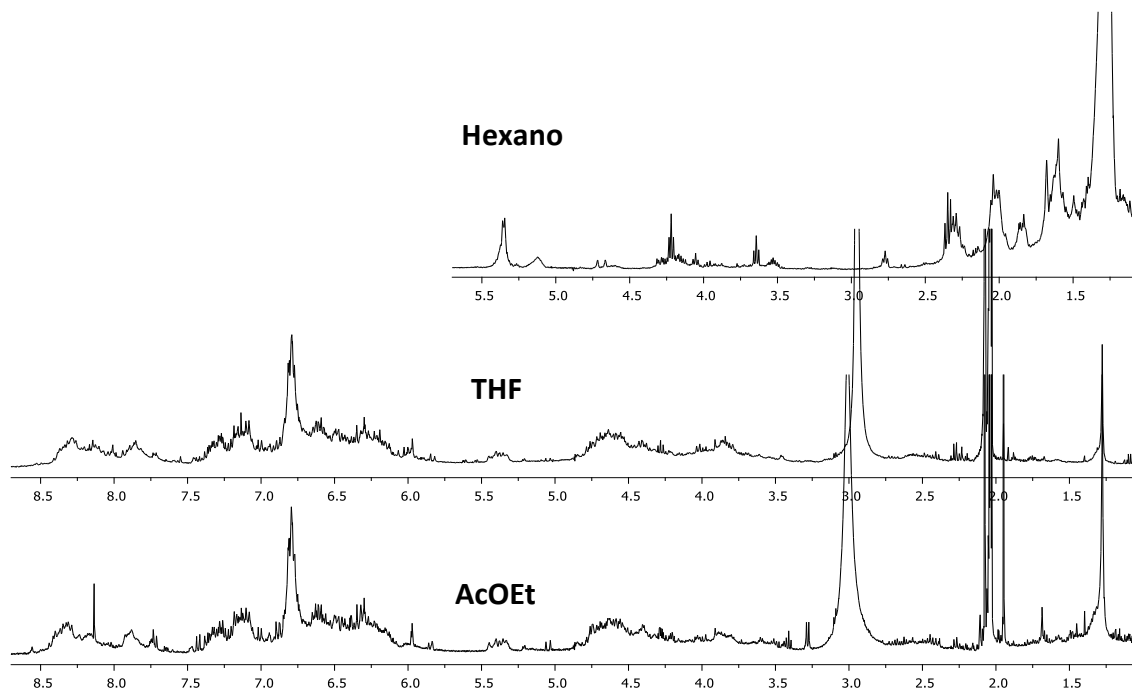


Figura 9. Espectros de RMN-¹H de los extractos del Duramen de *Comocladia engleriana*.

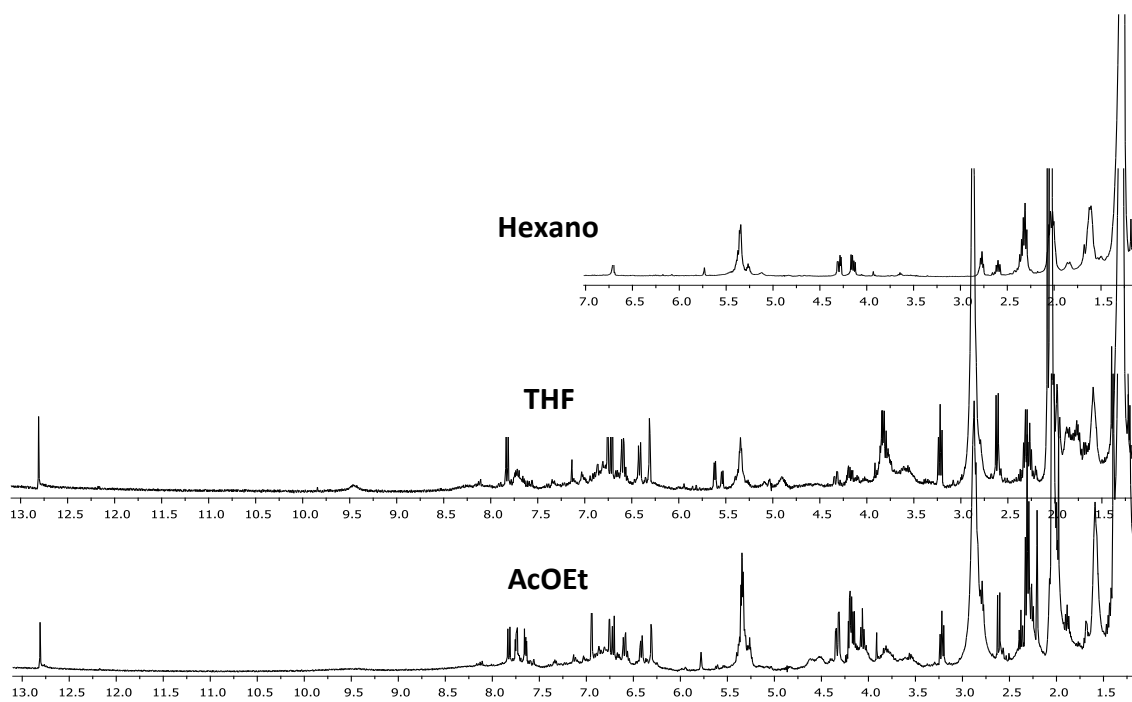
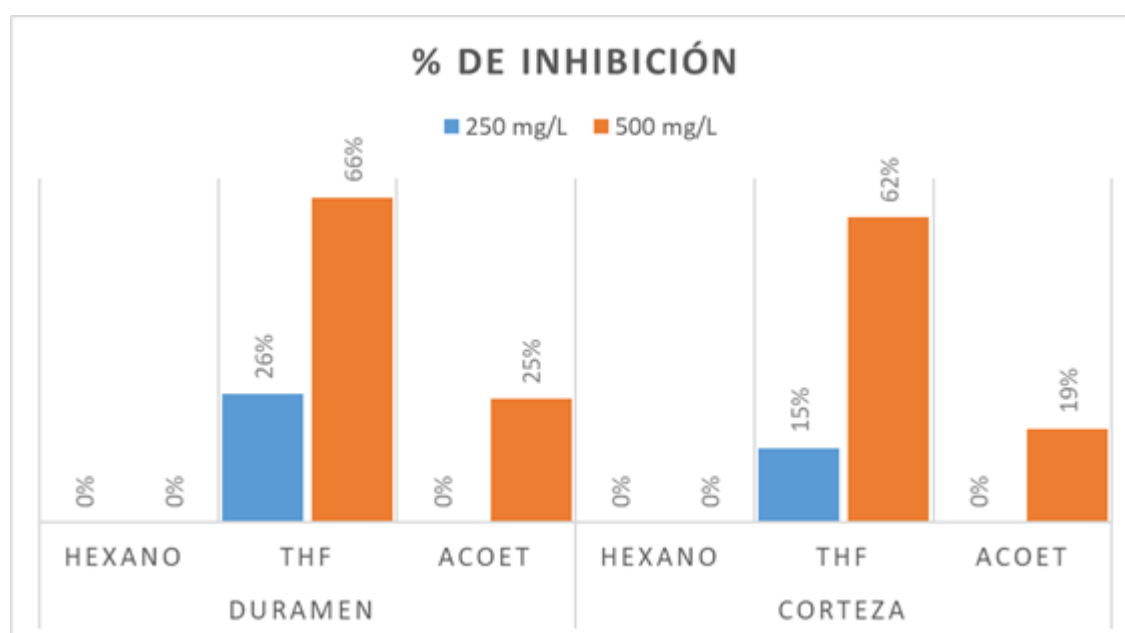


Figura 10. Espectros de RMN-¹H de los extractos de la corteza de *Comocladia engleriana*.

6.2. Ensayos antifúngicos de los extractos crudos sobre *Trametes versicolor*

6.2.1. Actividad inhibitoria de los extractos de *Cochlospermum vitifolium*

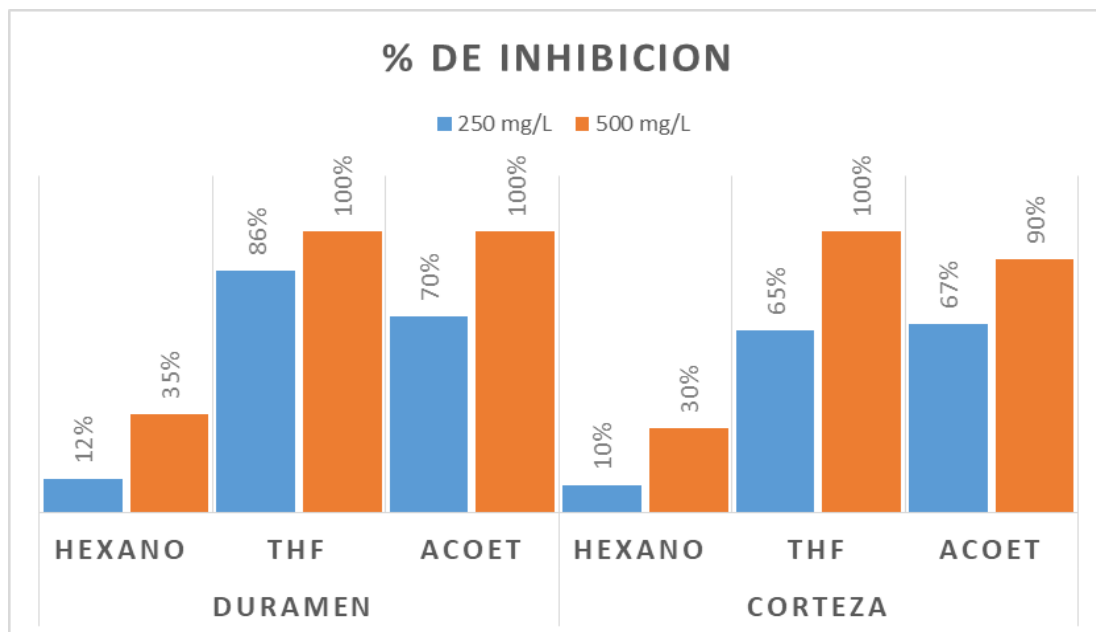
Los extractos de corteza y duramen obtenidos de *Cochlospermum vitifolium* se emplearon en los ensayos de inhibición sobre *Trametes versicolor*, los cuales mostraron los siguientes resultados: los extractos de hexano no presentaron actividad inhibitoria por lo cual fueron descartados para otras pruebas, y los extractos de AcOEt presentaron poca actividad a concentraciones altas (500 mg/L), sin embargo los extractos de THF presentaron más del 60% de inhibición a concentraciones altas, la cual se puede considerar una actividad regular (**Gráfica 1**).



Gráfica 1. Porcentaje de inhibición de los extractos obtenidos del duramen y corteza de *Cochlospermum vitifolium* sobre el hongo *Trametes versicolor*

6.2.2. Actividad inhibitoria de los extractos de *Mimosa aculeaticarpa*

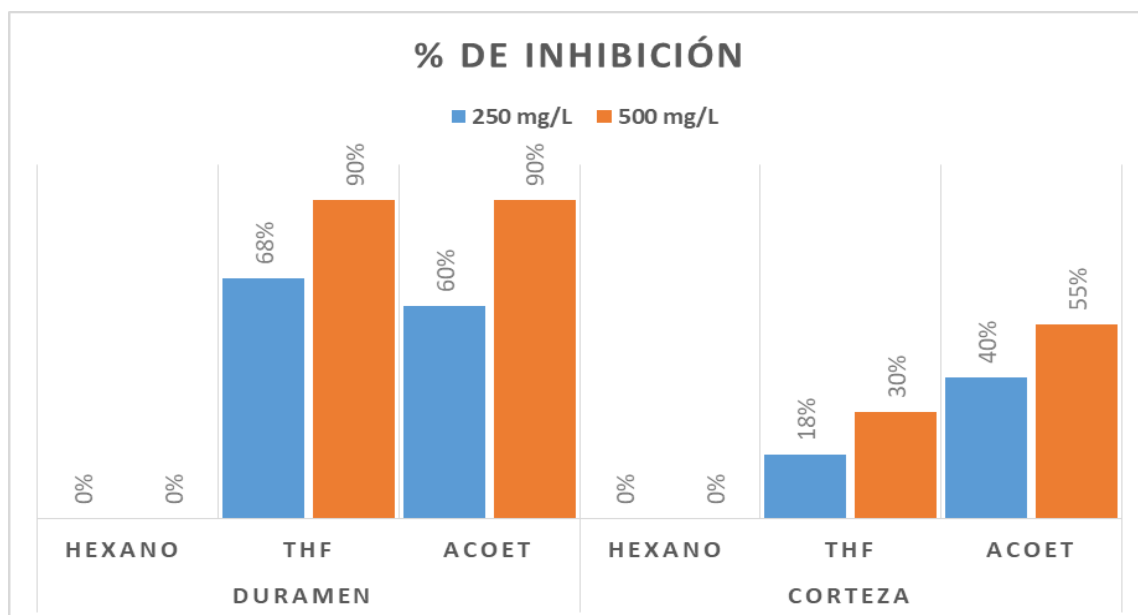
Los extractos obtenidos de *Mimosa aculeaticarpa*, presentaron los siguientes resultados; los extractos de THF y AcOEt tanto del duramen como de corteza presentaron el 100% de la inhibición a la concentración de 500 mg/L, y en 250 mg/L se observaron porcentajes de más del 60% de inhibición del crecimiento del hongo, los extractos de hexano fueron los porcentos más bajos al obtener un 30% de la actividad a 500 mg/mL, por lo que se sugiere el descarte de estos extracto en pruebas siguientes (**Gráfica 2**).



Gráfica 2. Porcentaje de inhibición de los extractos obtenidos del duramen y corteza de *Mimosa aculeaticarpa* sobre el hongo *Trametes versicolor*.

6.2.3. Actividad inhibitoria de los extractos de *Comocladia engleriana*

Los extractos obtenidos de *C. engleriana*, demostraron las siguientes actividades; los mayores porcentos de inhibición se obtuvieron con los extractos del duramen los cuales mostraron 90% de inhibición a concentraciones de 500 mg/L, además, de más del 50% de la inhibición a 250 mg/L. La mayor actividad que demostraron los extractos de la corteza se obtuvo con el extracto de AcOEt a 500 mg/L. Los extractos de hexano no presentaron ninguna actividad inhibitoria, y al no presentar la actividad buscada estos extractos fueron descartados para pruebas siguientes (**Gráfica 3**).



Gráfica 3. Porcentaje de inhibición de los extractos obtenidos del duramen y corteza de *Comocladia engleriana* sobre el hongo *Trametes versicolor*.

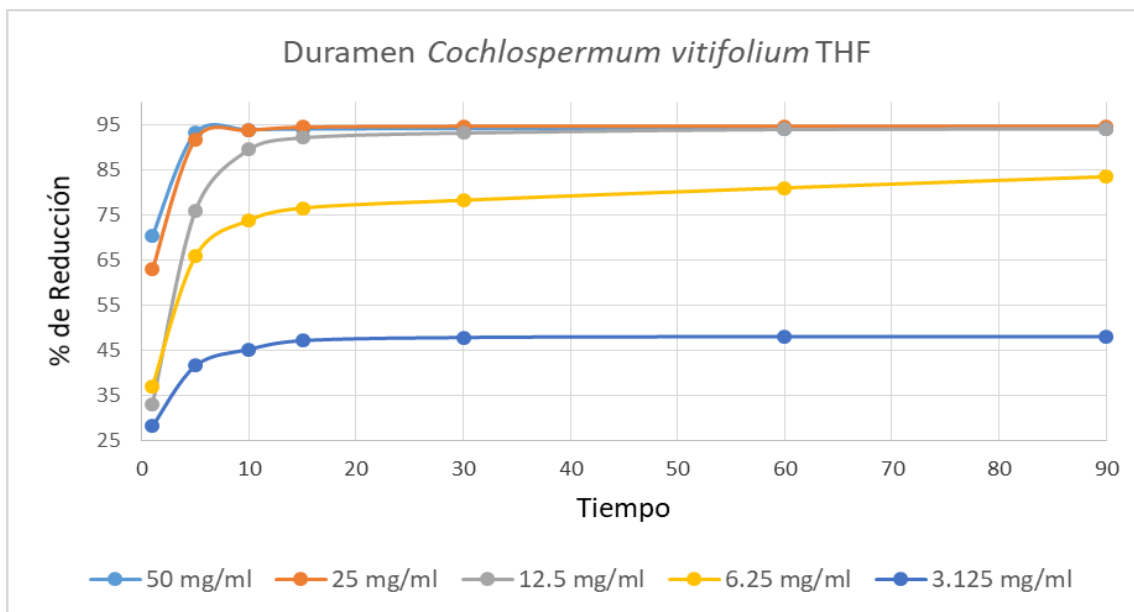
6.3. Ensayos de la actividad antioxidante de los extractos mediante el método del radical DPPH

Como se mencionó en los espectros de RMN-¹H de cada uno de los extractos de hexano de las diferentes maderas, tanto de duramen como de corteza, estos presentan compuestos de tipo alifático (ácidos grasos) los cuales no son de interés para este proyecto. Además, como se demostró en las pruebas de inhibición sobre *Trametes versicolor* estos extractos fueron los que presentaron nula o poca actividad, por lo que todos los extractos de hexano fueron descartados para las pruebas que a continuación se mencionan.

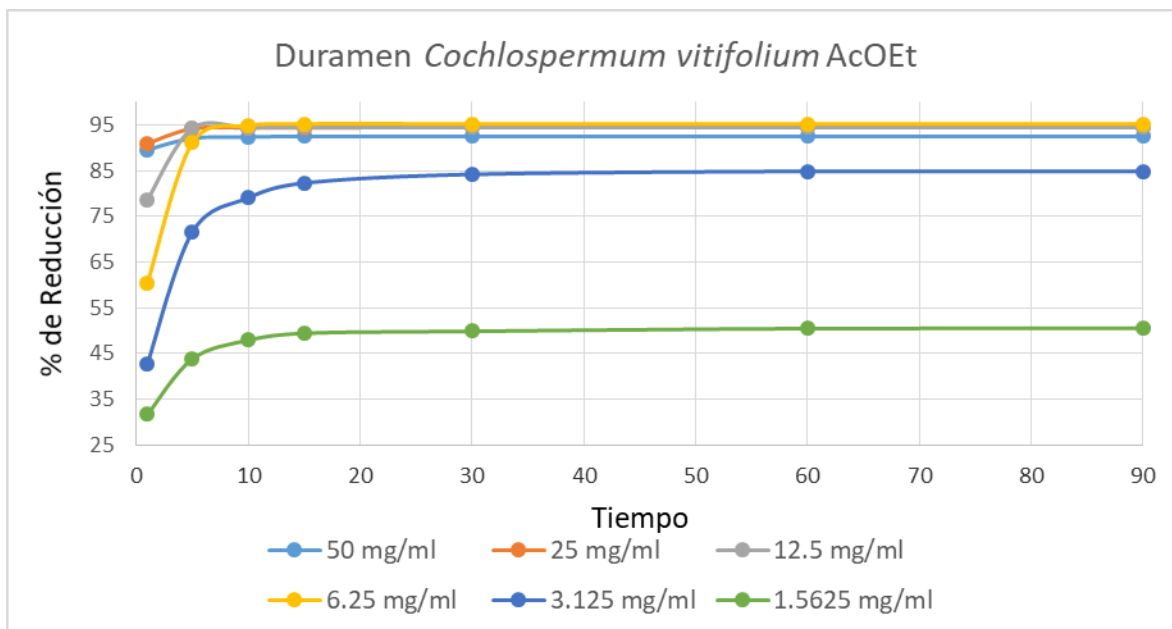
6.3.1. Ensayo de la actividad antioxidante de los extractos de *Cochlospermum vitifolium*

Los ensayos de la actividad antioxidante de los extractos de *C. vitifolium* presentaron resultados que se consideran de regulares a buenos, esto debido, a que en el extracto de THF de duramen se obtuvo un 80% de actividad reductora a una concentración de 6.25 mg/mL (**Gráfica 5**), y con el extracto de AcOEt se obtuvo el mejor resultado en estos extractos al obtener un 85% de reducción a una concentración de 3.125 mg/mL, a partir de estas concentraciones comenzó a decaer la actividad de estos extractos (**Gráfica 6**). Con los extractos de la corteza se obtuvieron mejores resultados con el extracto de THF,

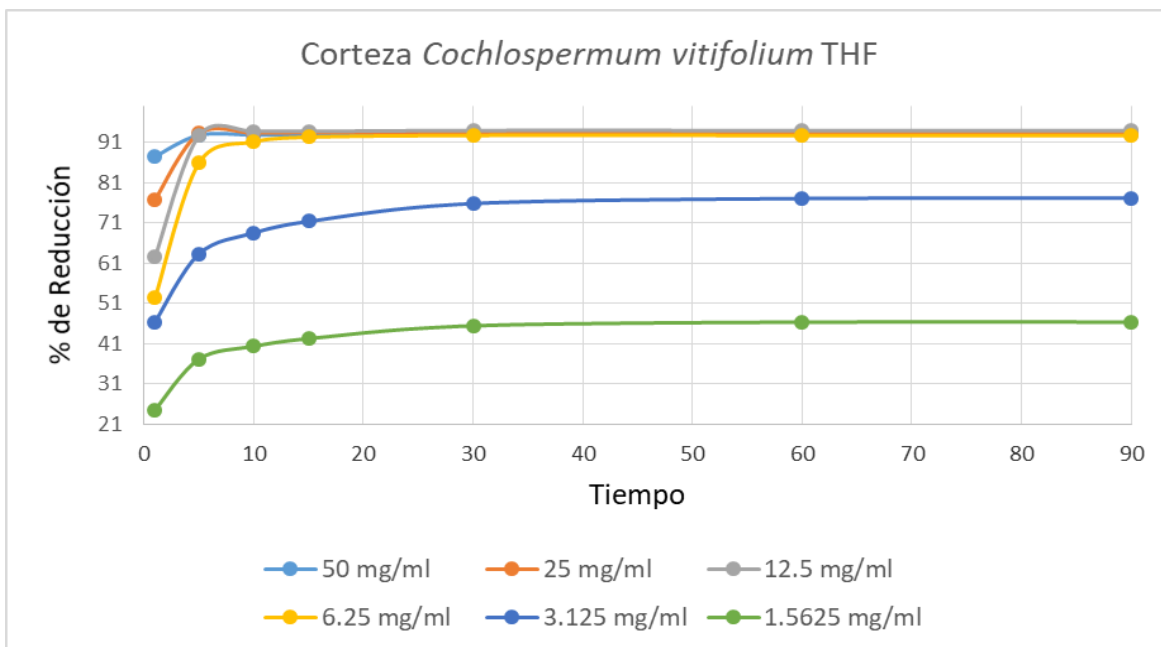
esto debido a que presento una reducción del 77% a 3.125 mg/mL (**Gráfica 7**), y en el extracto de AcOEt se observa un actividad regular al reducir en un 80% a la concentración de 6.25 mg/mL a partir de la cual disminuye la actividad (**Gráfica 8**).



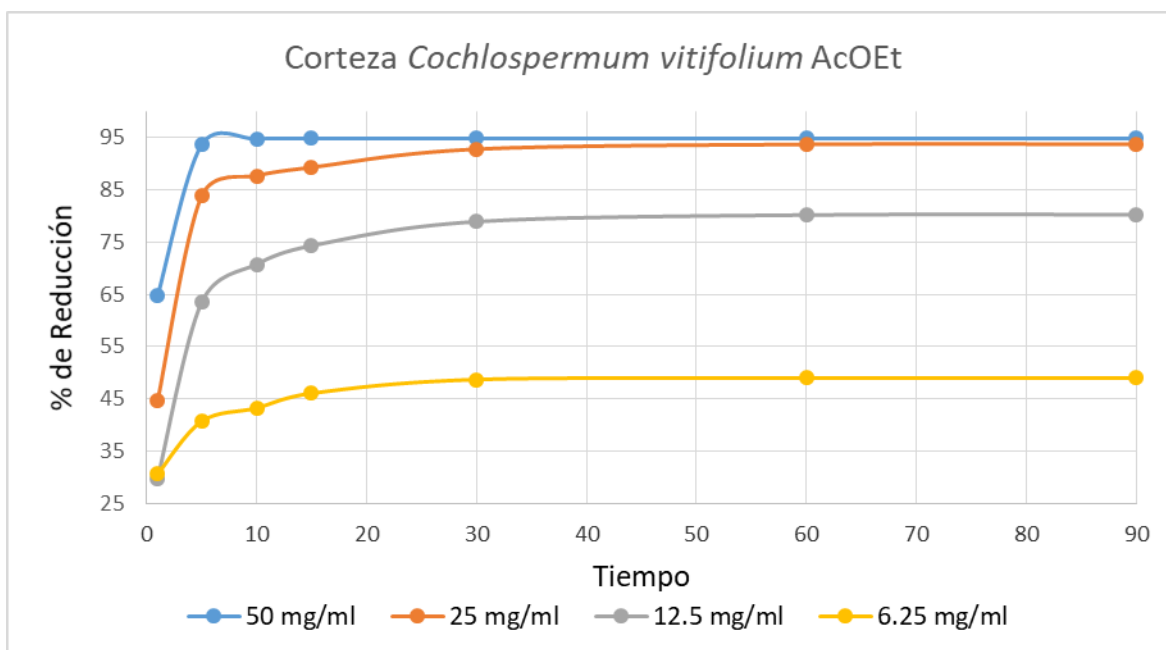
Gráfica 5. Porcentaje de reducción del radical DPPH del extracto de duramen de *Cochlospermum vitifolium* con THF.



Gráfica 6. Porcentaje de reducción del radical DPPH del extracto de duramen de *Cochlospermum vitifolium* con AcOEt.



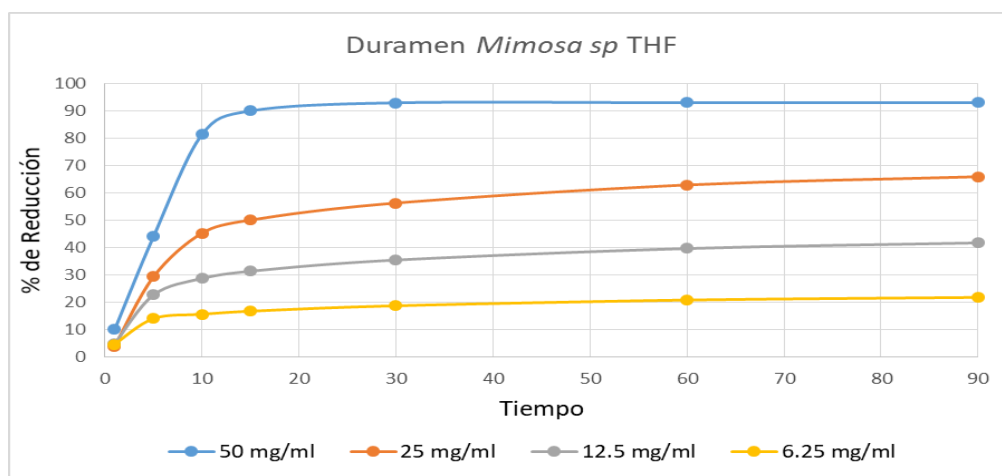
Gráfica 7. Porcentaje de reducción del radical DPPH del extracto de corteza de *Cochlospermum vitifolium* con THF.



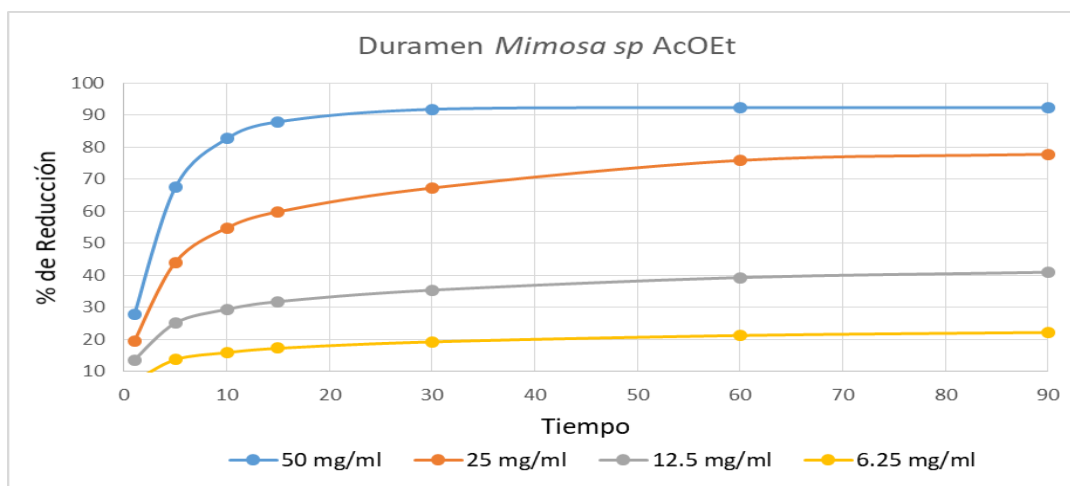
Gráfica 8. Porcentaje de reducción del radical DPPH del extracto de corteza de *Cochlospermum vitifolium* con AcOEt.

6.3.2. Ensayo de la actividad antioxidante de los extractos de *Mimosa aculeaticarpa*

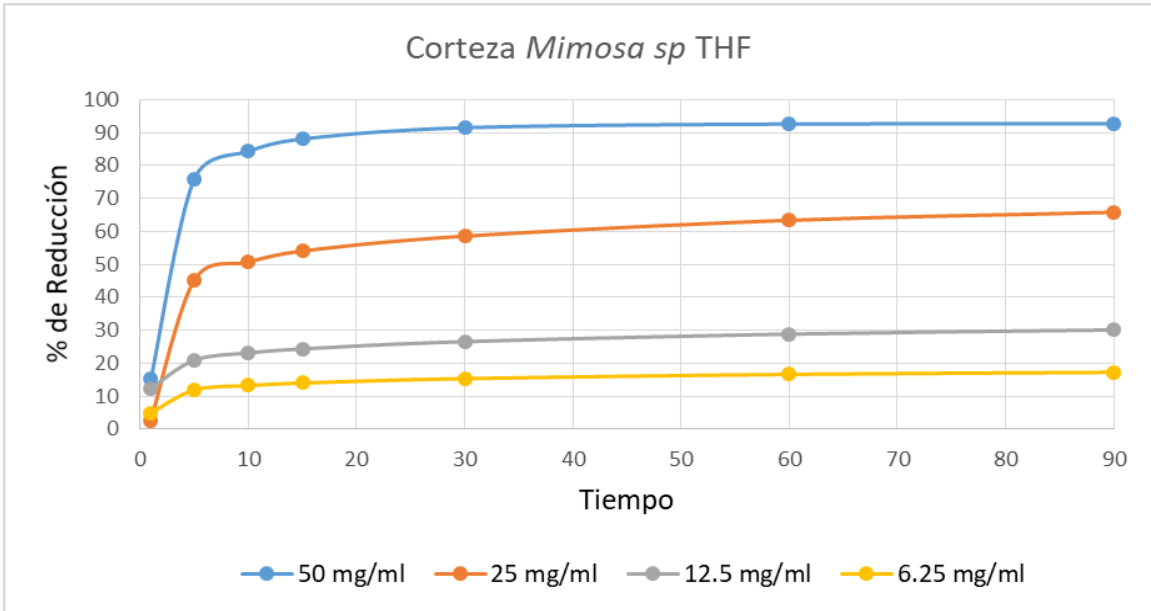
De las pruebas antioxidantes realizadas con los extractos de *Mimosa aculeaticarpa* tanto de duramen como de corteza de los extractos de THF y AcOEt, se observaron actividades antioxidantes muy bajas (**Gráficas 9-12**), esto debido a que los extractos presentaron un 90% de reducción a una concentración de 50 mg/mL, la cual se considera una concentración muy elevada, y a partir de esta concentración comenzó a decaer la actividad. Además, el extracto de corteza de AcOEt mostró que a concentraciones de 25 y 12.5 mg/mL se obtuvo más de un 90 % de reducción, sin embargo, aún estas concentraciones son consideradas muy elevadas por lo que la actividad antioxidante es muy baja (**Gráfica 12**).



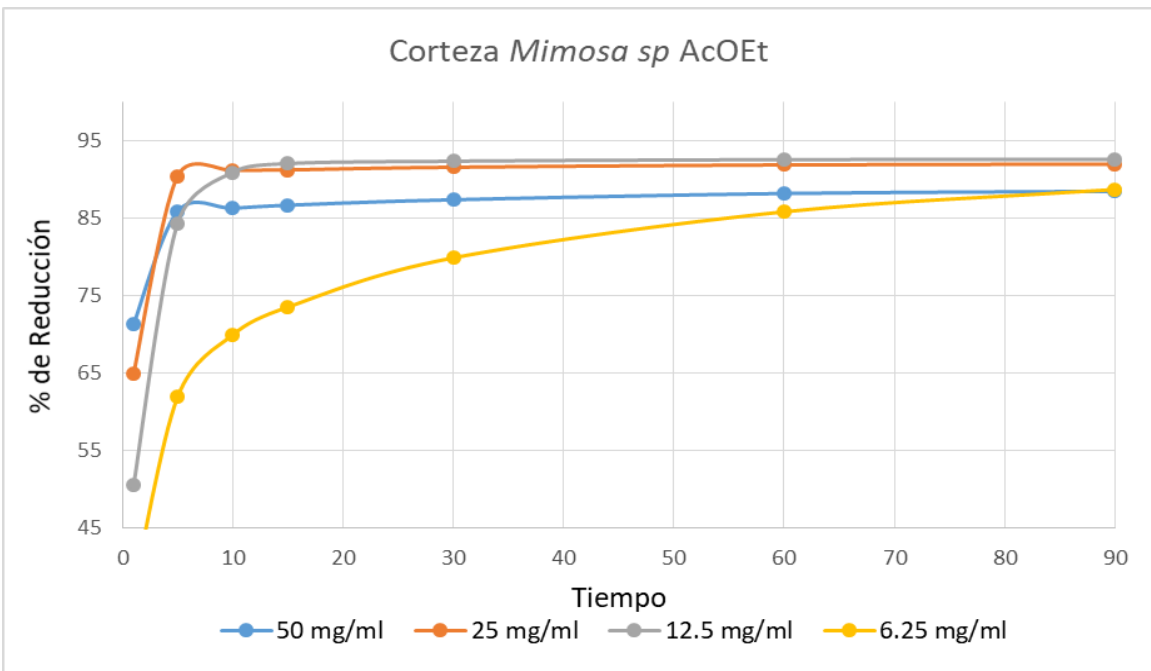
Gráfica 9. Porcentaje de reducción del radical DPPH del extracto de duramen de *Mimosa aculeaticarpa* con THF.



Gráfica 10. Porcentaje de reducción del radical DPPH del extracto de duramen de *Mimosa aculeaticarpa* de AcOEt.



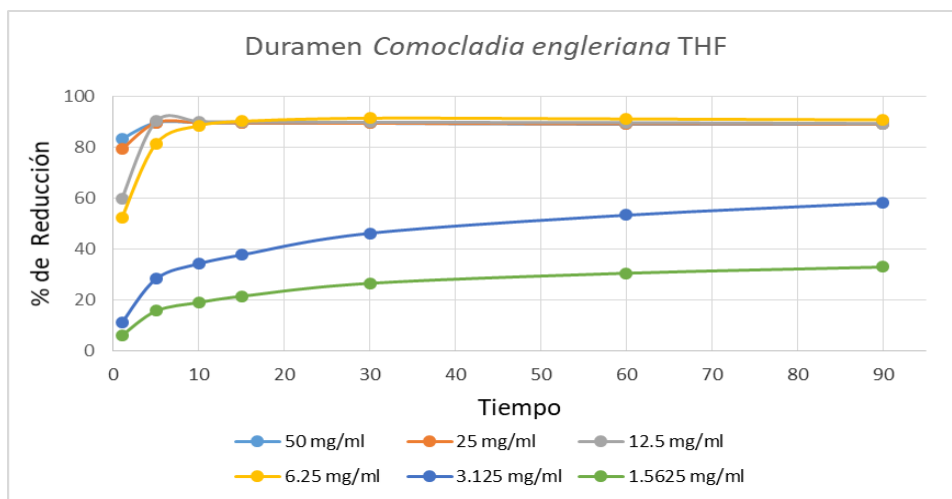
Gráfica 11. Porcentaje de reducción del radical DPPH del extracto de corteza de *Mimosa aculeaticarpa* con THF.



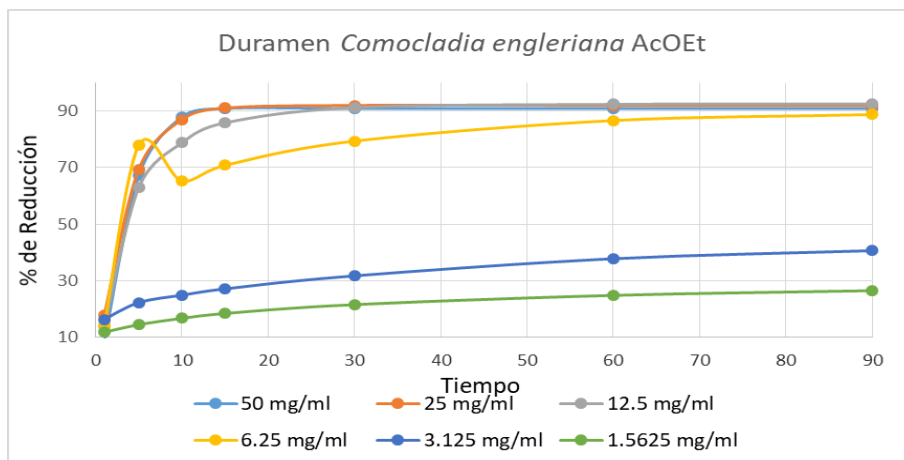
Gráfica 12. Porcentaje de reducción del radical DPPH del extracto de corteza de *Mimosa aculeaticarpa* con AcOEt.

6.3.3. Ensayo de la actividad antioxidante de los extractos de *Comocladia engleriana*

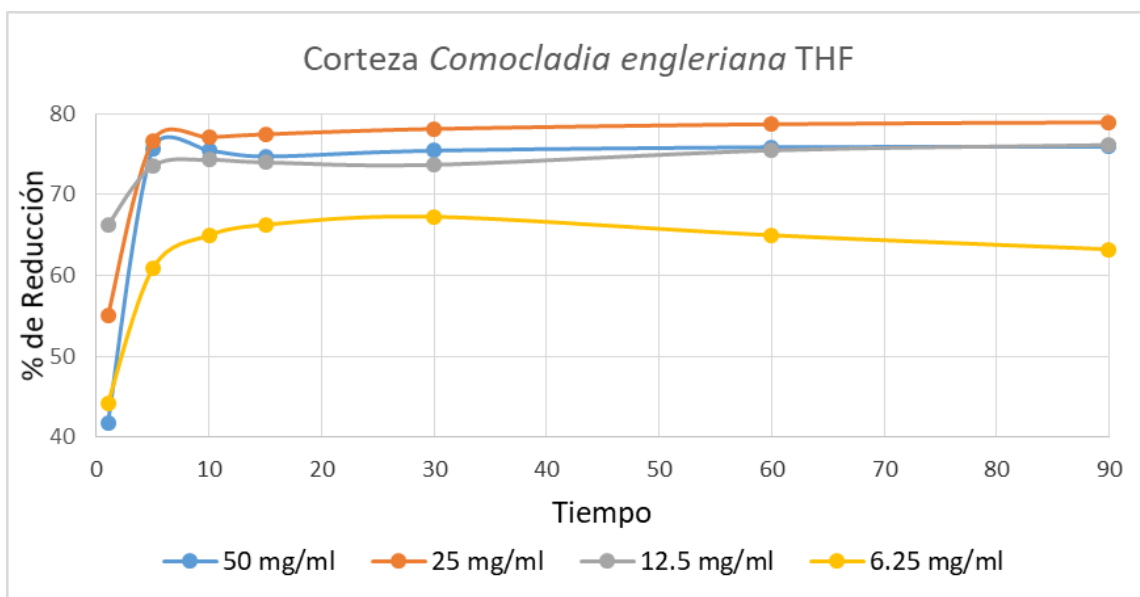
De los extractos del duramen, con el de THF se obtuvo su mejor porcentaje de reducción (90%) a una concentración de 6.25 mg/mL considerada una actividad de buena a regular (**Gráfica 13**). Para el crudo de AcOEt su mejor porcentaje fue de 12.5 mg/LI y a concentraciones más bajas decae esta actividad (**Gráficas 14**). Para los extractos de la corteza, con el de THF se obtuvo un 80% de reducción a una concentración de 25 mg/LI (**Gráfica 15**), y para el extracto de AcOEt se obtuvo un 91% de reducción a una concentración de 12.5 mg/mL (**Gráficas 16**), los resultados anteriores demuestran una actividad que se considera baja.



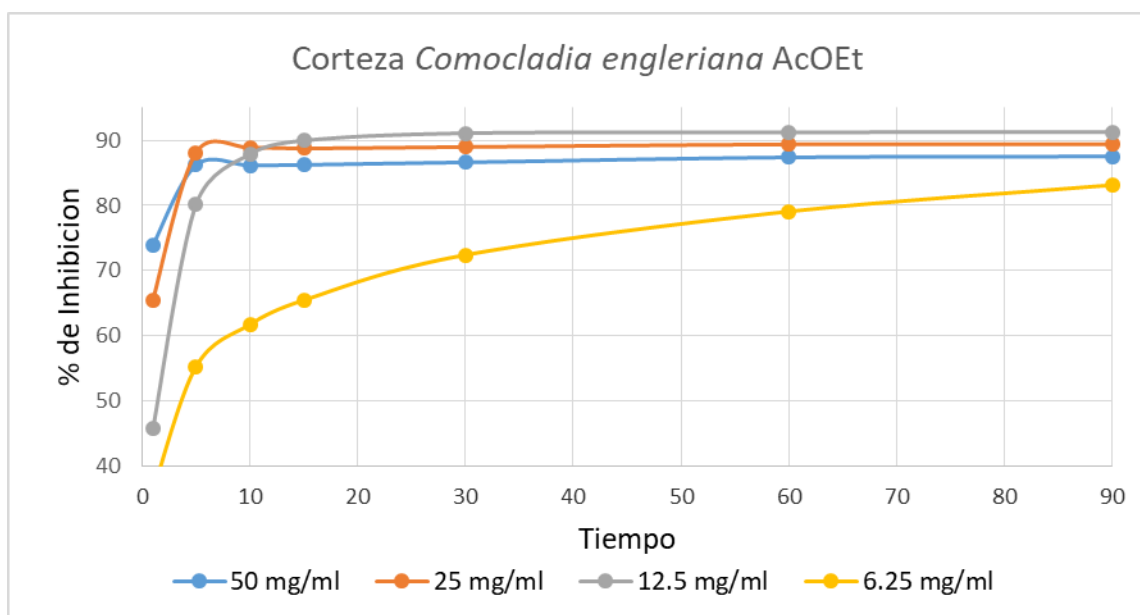
Gráfica 13. Porcentaje de reducción del radical DPPH del extracto de duramen de *Comocladia engleriana* con THF.



Gráfica 14. Porcentaje de reducción del radical DPPH del extracto de duramen de *Comocladia engleriana* con AcOEt.



Gráfica 15. Por ciento de reducción del radical DPPH del extracto de corteza de *Comocladia engleriana* con THF.



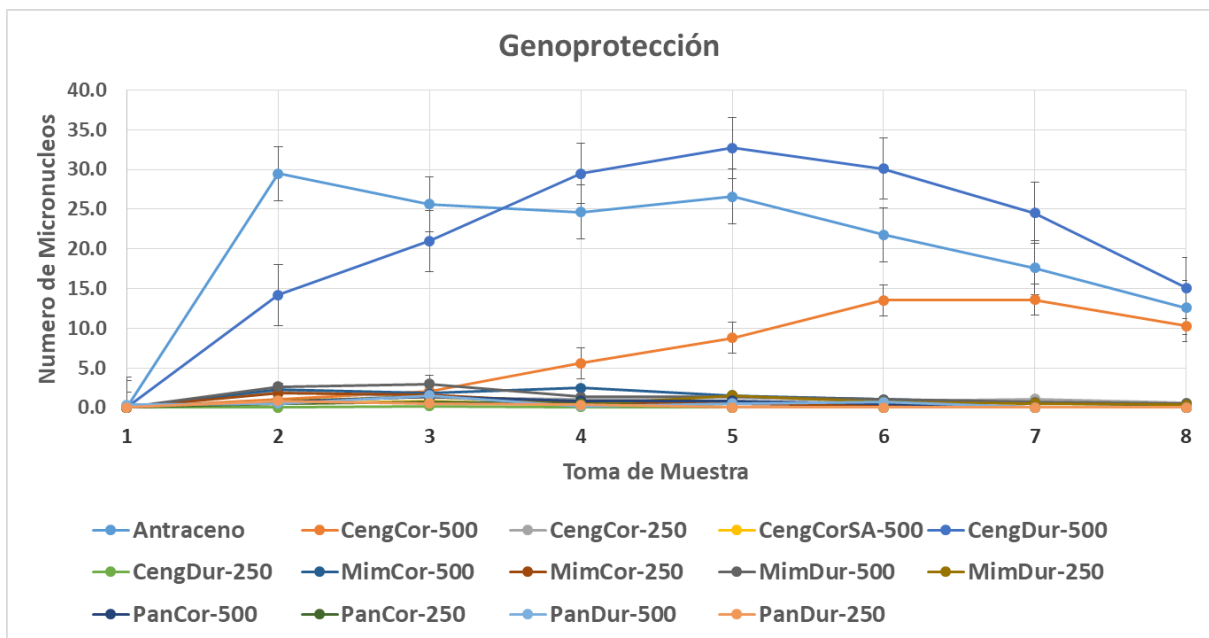
Gráfica 16. Por ciento de reducción del radical DPPH del extracto de corteza de *Comocladia engleriana* con AcOEt.

6.4. Ensayos de la actividad genoprotectora *in vivo* de los extractos

Para las pruebas de genoprotección solo se emplearon los extractos de THF de cada una de las maderas de estudio, esto debido a la semejanza entre los extractos de THF y AcOEt observadas en las pruebas antioxidantes y en sus espectros de RMN-¹H de cada una de las maderas, además de que los extractos de THF se obtienen en mayor proporción, lo cual es de importancia debido a la continua administración que se realizó de los extractos.

Para las pruebas de genoprotección, los extractos de duramen y corteza de *C. engleriana*, se probaron a una dosis de 500 mg/kg sin la administración del tóxico (antraceno), esto debido a que el árbol de *C. engleriana* se considera tóxico, por lo que se requería comprobar si los extractos generaban un tipo de genotoxicidad, sin embargo, como se muestra en la **Gráfica 17**, se comprobó que los extractos no generaban una formación significativa de micronúcleos. Por lo que se probó una dosis de 500 mg/kg con los dos extractos, con lo que se demostró que el extracto de duramen generó un aumento considerable de micronúcleos y mediante un análisis estadístico se comprobó que no existía una diferencia significativa con los resultados obtenidos del tratamiento con antraceno, lo cual sugiere que este extracto no genera ningún tipo de actividad esto debido a los resultados con la administración solo del extracto (ni genoprotección ni genotoxicidad); en cambio el extracto de corteza a una dosis de 500 mg/kg mostró una inhibición en la formación de micronúcleos en los días de administración, sin embargo se observó un aumento en los días posteriores lo que dejó dudas de la actividad de este extracto, por lo que se realizó otro tratamiento, el cual fue administrar el extracto a una dosis de 250 mg/kg, con lo cual no se observó una formación significativa de micronúcleos, lo cual sugiere que el extracto presenta una actividad de genoprotección a dosis bajas (**Gráfica 17**).

A diferencia del árbol anterior, los árboles de *M. aculeaticarpa* y de *C. vitifolium* son considerados árboles medicinales por sus diversas actividades descritas en la etnobotánica. Por esta razón no se realizaron pruebas de genotoxicidad de sus extractos. De estos árboles sus extractos fueron probados a dosis de 500 y 250 mg/kg frente al antraceno en pruebas de genoprotección. En estas pruebas los extractos presentaron una formación no significativa de micronúcleos a las dos dosis anteriores, lo cual sugiere una actividad de genoprotección a bajas y altas concentraciones, frente al antraceno (**Gráfica 17**).



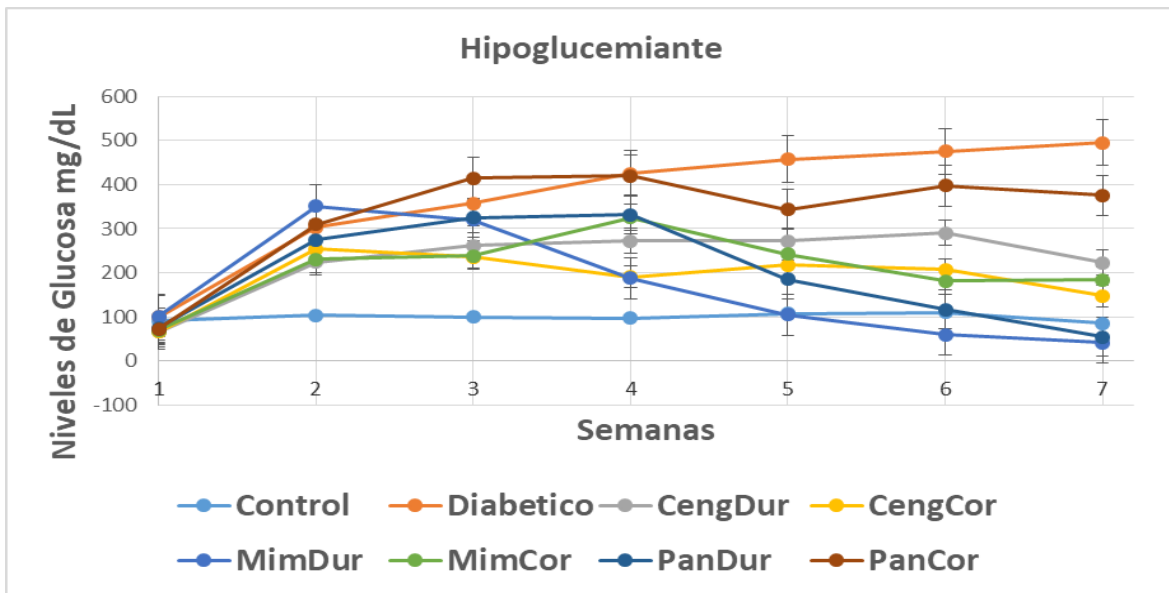
Grafica 17. Actividad genoprotectora de los extractos de THF de *C. engleriana*, *M. aculeaticarpa* y *C. vitifolium* de duramen y corteza.

6.5. Ensayos de la actividad hipoglucemiante de los extractos

Para las pruebas de la actividad hipoglucemiante se empleó el extracto de THF a dosis de 500 mg/kg de cada uno de los árboles de estudio. Para esta actividad se realizaron dos controles; uno negativo, en el cual se administró agua destilada a ratones y se midió sus niveles de glucosa, el cual mostro en promedio niveles normales de 100 mg/dL ; y un control positivo o diabético el cual presento niveles elevados de glucosa de 500 mg/dL.

Posterior a la diabetización de los ratones (o alcanzar niveles ≥ 150 mg/dL) se procedió a la administra de los diferentes extractos. Los extractos de *C. engleriana* tanto duramen y corteza, así como el extracto de Mimosa de corteza no presentaron una gran variación en sus valores de glucosa, esto sugiere que estos extractos no presentan una actividad como hipoglucemiante, sin embargo no permiten elevar los niveles de glucosa por lo que se puede decir que estabiliza estos niveles al no aumentarlos. En el caso del extracto de *C. vitifolium* corteza, se observó un aumento similar al presentado por el control y mediante un análisis estadístico este no presentó diferencia significativa con el control, por lo que se sugiere que este extracto no presenta ninguna actividad como hipoglucemiante. En cambio, los extractos de duramen de *M. aculeaticarpa* y *C. vitifolium* duramen presentaron una disminución en los niveles de glucosa, sin embargo estos extractos

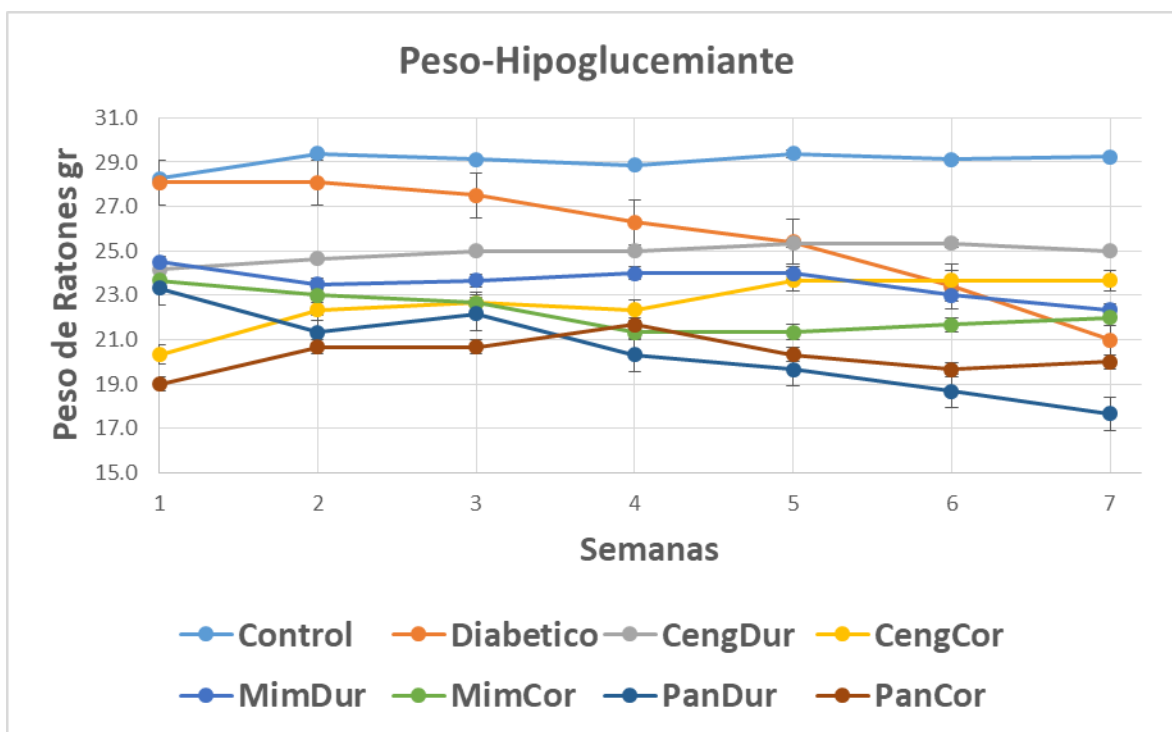
mostraron una disminución de estos niveles por debajo de los valores normales, lo que sugiere que una administración prolongada podría causar hipoglucemia a un grado crónico o el deceso de los ratones (**Gráfica 18**).



Gráfica 18. Actividad hipoglucemiante de los extractos de THF de *C. englerian*, *M. aculeaticarpa* y *C. vitifolium* de corteza y duramen.

Para las pruebas hipoglucemiante, el peso es de interés debido a que al administrar la STZ, esta genera una pérdida de peso en los ratones. Lo que llevo a observar si en la administración de los extractos estos pueden reducir esta pérdida o mantener pesos estables.

Como se puede observar en los resultados obtenidos, los ratones diabéticos (administrados con STZ) presentaron una pérdida significativa de peso. Sin embargo, los ratones administrados con STZ y la posterior administración de los extractos mantuvieron los pesos con poca variación entre las semanas de administración, sugiriendo que los extractos no tienen ningún efecto sobre la pérdida de peso. Lo anterior, a excepción del extracto de *C. vitifolium* duramen (PanDur) en el cual se observa una disminución de los pesos a un grado considerable, esto puede ser por lo observado en la actividad hipoglucemiante, donde la administración del extracto por periodos largos puede tener efectos negativos y llegar al deceso de los ratones (**Gráfica 19**).



Gráfica 19. Medición de peso en la actividad hipoglucemiante de los extractos de THF de corteza y duramen de *C. englerian*, *M. aculeaticarpa* y *C. vitifolium*, de corteza y duramen.

6.6. Aislamiento de compuestos mediante cromatografía en columna cromatográfica de los extractos crudos

Como se ha hecho mención en el análisis espectroscópico y las distintas pruebas con los extractos crudos, los extractos de THF fueron los que resultaron de mayor interés, debido a los resultados ya mencionado en cada uno de sus ensayos. Por esta razón los extractos de THF de cada uno de los arboles fueron los únicos en someterse a columna cromatográfica, con la finalidad de aislar uno o varios de sus componentes.

6.6.1. Cromatografía en columna del extracto de THF de *Mimosa aculeaticarpa*

Los extractos de THF de corteza y duramen de *Mimosa aculeaticarpa*, se obtuvieron en forma sólida como se hizo mención, los cuales presentaron una solubilidad parcial en diclorometano y AcOEt, y en acetona y metanol una solubilidad total. Esto se hace mención debido a que al someterse a columna cromatográfica en polaridad creciente hexano:AcOEt (Hex, 9:1, 8:2, etc.), se llegaron a obtener fracciones gruesas las cuales se analizaron mediante RMN-¹H y cromatografía de placa fina, con la finalidad de observar

algún compuesto mayoritario. Sin embargo, se observaron una gran variedad de compuestos con poca intensidad, que al someterse nuevamente a columna cromatográfica no se detectaban en cromatografía de capa fina ni en RMN-¹H. Lo que sugiere una posible descomposición en la columna cromatográfica, o en el ambiente, y/o la posibilidad de que los compuestos sean volátiles. Por lo anterior, del árbol de *M. aculeaticarpa* no se logró el aislamiento de ninguno de sus componentes.

6.6.2. Cromatografía en columna del extracto de THF de *Cochlospermum vitifolium*

Después de someter a purificaciones en columna cromatográfica 3 g del crudo de duramen con mezclas de hexano y AcOEt, en una polaridad 8:2 hexano:AcOEt, se logró aislar una miel de color blanco. De la cual se obtuvo su espectro de RMN-¹H en acetona deuterada, el cual mostro los siguientes desplazamientos químicos (**Figura 11**); a campo alto en 2.72 y 3.18 ppm se observan dos señales doble de dobles que integran para un hidrogeno cada una, con una $J=17.1, 3.0$ Hz y $J=17.1, 12.9$ Hz asignadas como H-3 α y H-3 β respectivamente, y a 5.45 ppm se observa una señal doble de dobles con una $J=12.9, 2.8$ Hz que integra para un hidrogeno asignada como H-2, estas señales conforman el anillo C de un flavonoide. También se observó una señal doble a 5.94 ppm que integra para dos hidrógenos, en esta señal los hidrógenos correspondientes son los asignados como H-7 y H-9 que conforman el anillo A del flavonoide. Y un poco más a campo bajo, a 6.89 ppm y 7.39 ppm se observaron dos señales dobles, con $J=8.4$ Hz y $J=8.6$ Hz que integran para dos hidrógenos cada una de ellas, las cuales generan un sistema aromático *para* que conforman el anillo B del flavonoide y que fueron asignadas como H-3', H-5' y H-2', H-6' respectivamente. Y por último se observó una señal simple a 12.8 ppm la cual sugiere un puente de hidrógeno entre el hidroxilo del anillo A con la cetona del anillo C.

El espectro de dos dimensiones COSY, nos sirvió para corroborar la asignación de señales del anillo C, esto debido a que se demostró una correlación de la señal asignada como H-2 con las señales asignadas como H-3 α y H-3 β . Y también se corroboró la asignación de las señales del anillo B al correlacionarse, las cuales fueron asignadas como H-2', H-6' y H-3', H-5' (**Figura 12**).

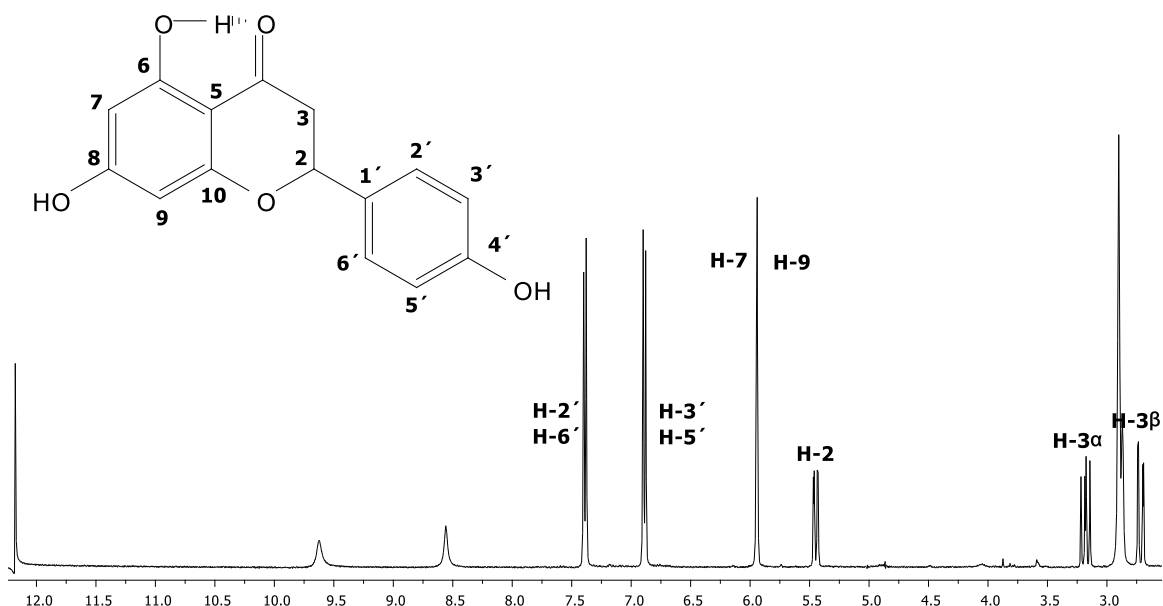


Figura 11. Espectro de RMN-¹H del compuesto aislado del duramen de *C. vitifolium*

En el espectro de RMN-¹³C del compuesto aislado, se observaron 13 de las 15 señales que conforman el flavonoide propuesto, esto debido a que las señales observadas a 116.7 ppm y 130.1 ppm integran para dos carbonos, siendo estos los que conforman el anillo B del flavonoide propuesto y asignados como C-3', 5' y C-2', 6'. Además, se observa una señal a 197.2 ppm que se asignó al carbono de la cetona (C=O) del anillo C, y las señales a 43.4 ppm y 79.9 ppm que fueron asignadas como C-3 y C-2 que conforman el anillo C del flavonoide (**Figura 13**). Con la obtención de los espectros de RMN, y realizando una búsqueda bibliográfica se llegó a la conclusión de que el compuesto aislado es la flavanona naringenina o 5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-croman-4-ona, la cual ha sido identificada debido a que es muy abundante en las frutas cítricas y el tomate (**Salehi et al., 2019**). Además de ser un compuesto ampliamente estudiado por sus diversas actividades farmacológicas comprobadas, esto debido a que es un buen antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno (distintas líneas celulares) y antimutagénico (**Patel et al., 2019**).

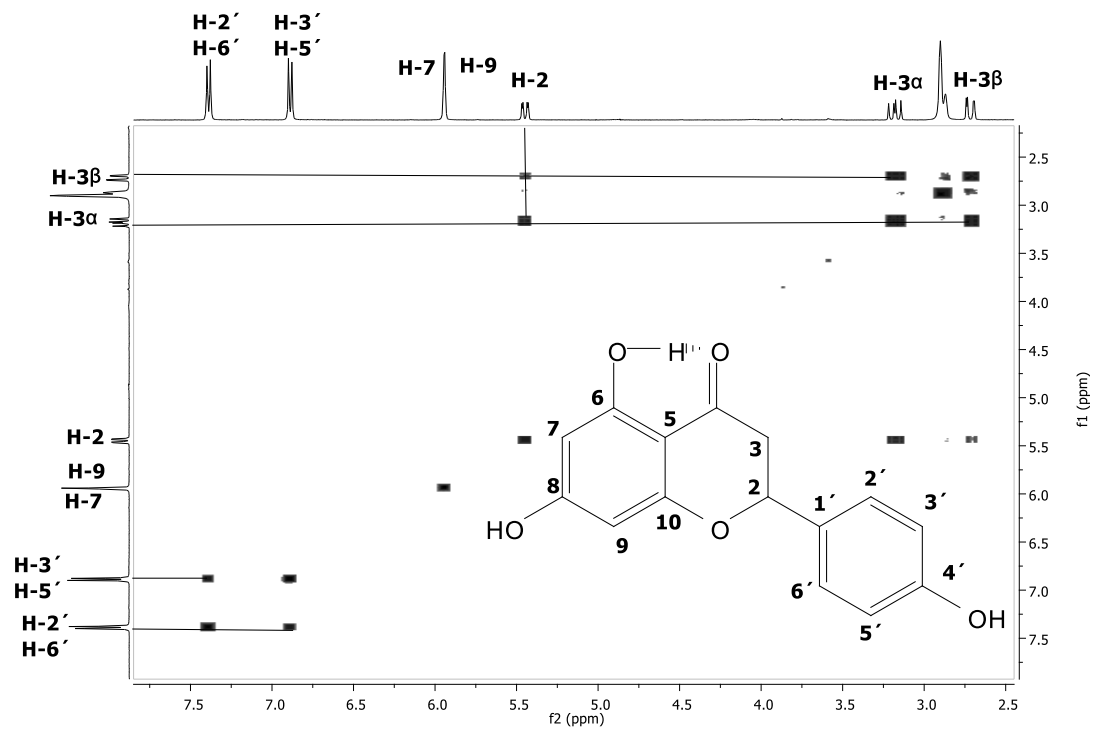


Figura 12. Espectro COSY del compuesto aislado del duramen de *C. vitifolium*.

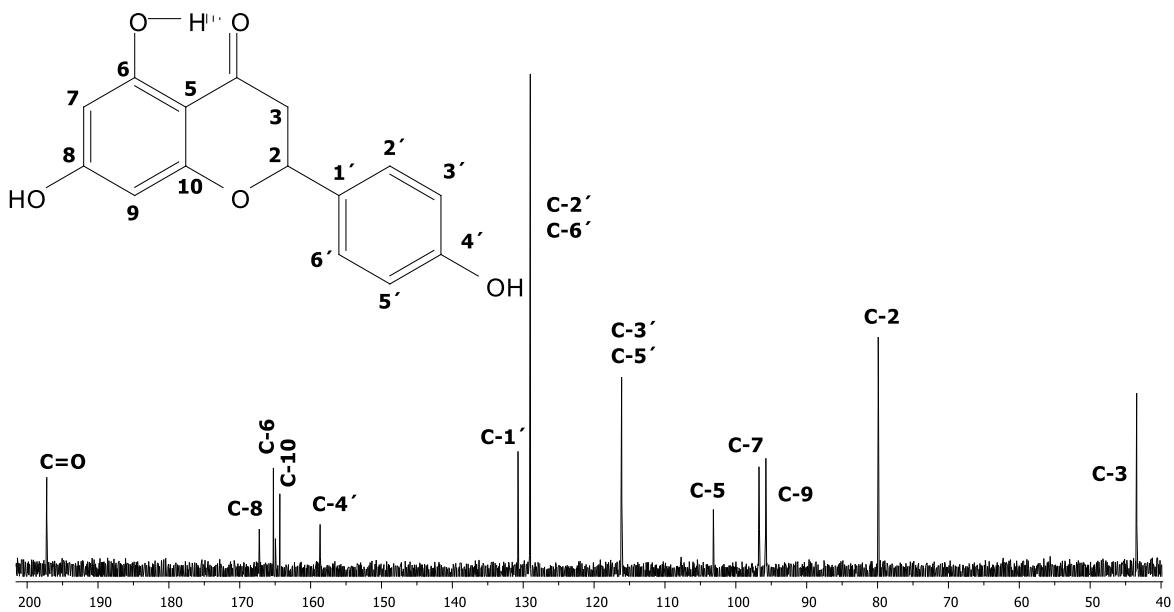


Figura 13. Espectro de RMN-¹³C del compuesto aislado del duramen de *C. vitifolium*.

6.6.3. Cromatografía en columna del extracto de duramen de THF de *Comocladia engleriana*

Después de someter a purificaciones en columna cromatográfica 3 g del crudo de duramen con mezclas de hexano y AcOEt, en una polaridad 85:15 hexano:AcOEt, se logró aislar un sólido amorfo de color blanco con un punto de fusión de 147-149 °C, el cual presentó fluorescencia. De este sólido se obtuvo su espectro de RMN-¹H en acetona deuterada, el cual mostró los siguientes desplazamientos (**Figura 14**); en campo bajo, a 7.72 ppm se observa una señal doble con una $J= 8.7$ Hz que integra para un hidrogeno asignada como H-6, así como una señal doble de dobles que integra para un hidrogeno con una $J= 8.7, 2.2$ Hz observada a 6.62 ppm asignada a H-7 y la señal doble que integra para un hidrogeno a 6.39 ppm con una $J=2.2$ Hz asignada como H-9, las cuales pertenecen al anillo A del flavanonol propuesto. También se observan dos señales dobles a 7.43 y 6.89 ppm que integran para dos hidrogeno cada una con $J=8.5$ y 8.6 Hz respectivamente asignadas como H-2', H-6' y H-3', H-5', las cuales pertenecen al anillo B del flavanonol. Y a 5.05 y 4.57 ppm se observan dos señales dobles asignadas como H-3 y H-2, pertenecientes a los hidrógenos del anillo C, las cuales integran para un hidrogeno cada una, con una $J=12.0$ y 11.9 Hz respectivamente.

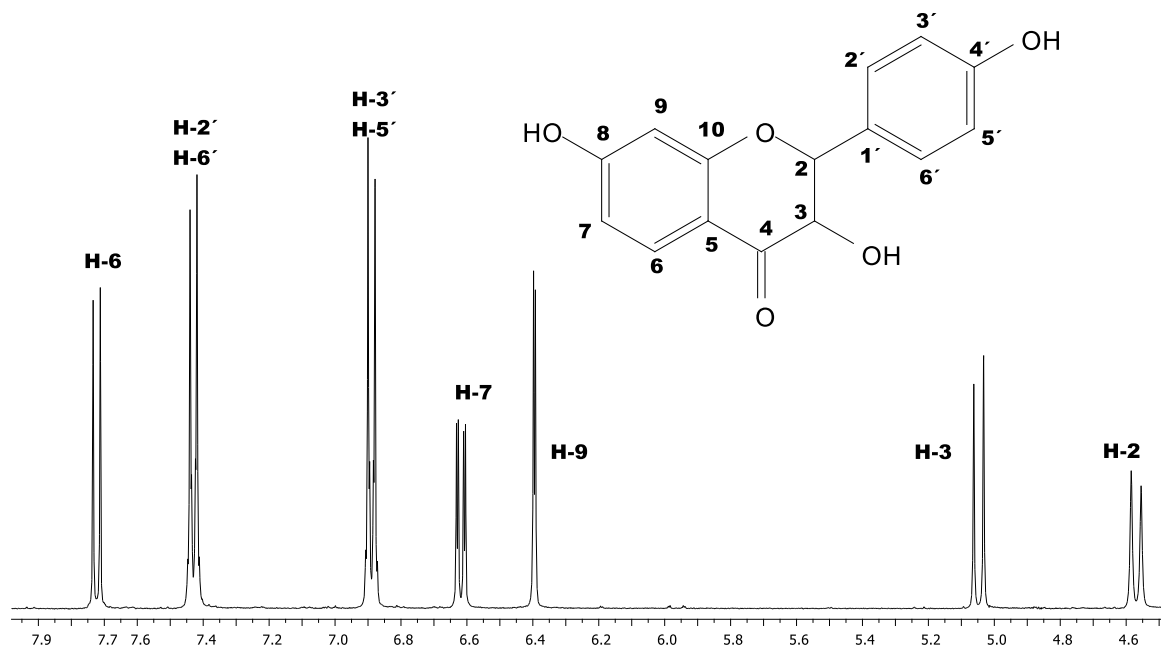


Figura 14. Espectro de RMN-¹H del compuesto aislado del duramen de *C. engleriana*.

El experimento COSY, fue de gran ayuda para asignar protones vecinos que correlacionan debido a su cercanía, en este caso la señal asignada como H-6 a 7.72 ppm que correlaciona con la señal a 6.62 ppm asignada como H-7 en el anillo A, y también se observó la correlación de las señal asignadas como H-3', 5' y H-2', 6' del anillo B (**Figura 15**).

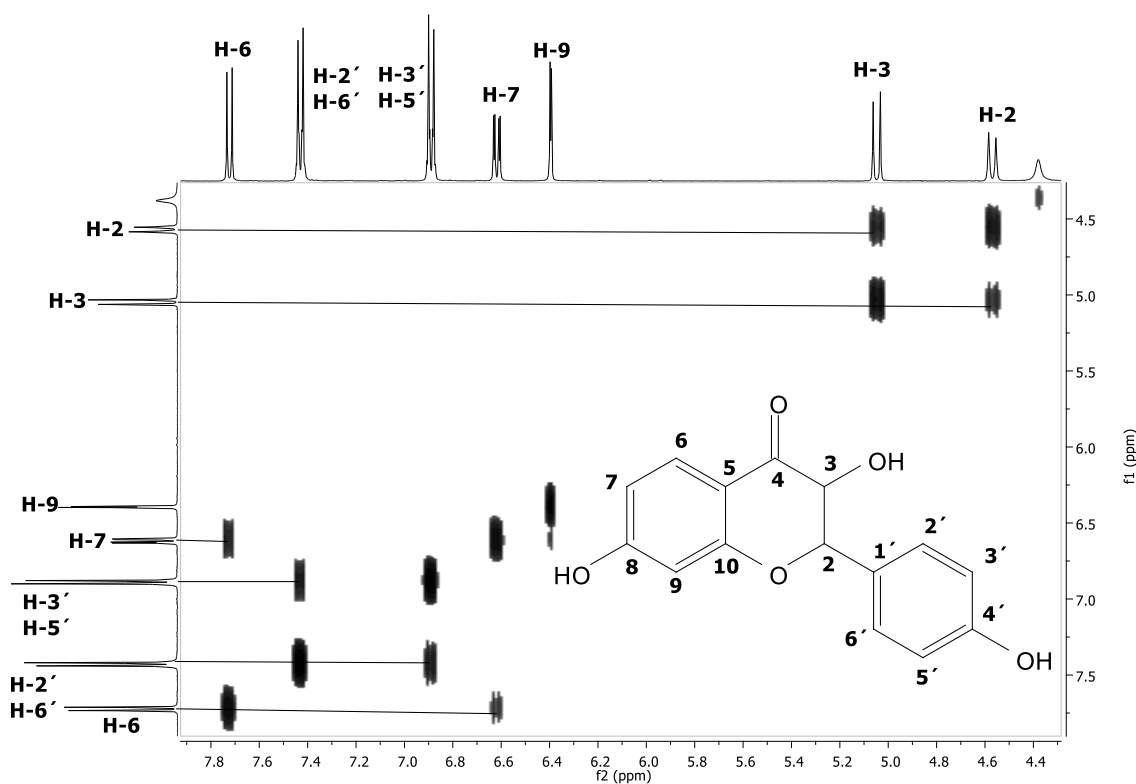


Figura 15. Espectro COSY del compuesto aislado del duramen de *C. engleriana*

De igual manera se obtuvo su espectro de RMN-¹³C (**Figura 16**), en el cual se observan 13 señales de carbono de las 15 que conforman la estructura del flavanone propuesto, esto debido a que las señales a 130.2 y 115.7 ppm se encuentran integradas por dos carbonos cada una, asignadas como C-2', H-6' y C-3', H-5' respectivamente, las cuales conforman el anillo B del flavanone. Además de observarse a 193.1 ppm una señal asignada como C-4 para el carbonilo de acetona del anillo C, y las demás señales que se observan en el espectro complementan la estructura propuesta. Con la obtención de los espectros de RMN, y realizando una búsqueda bibliográfica se llegó a la conclusión de que el compuesto aislado es el 3,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-croman-4-ona, el cual fue aislado de un caldo de fermentación de la bacteria *Micromonospora sp.* P1068 (**Gutiérrez et al., 2005**).

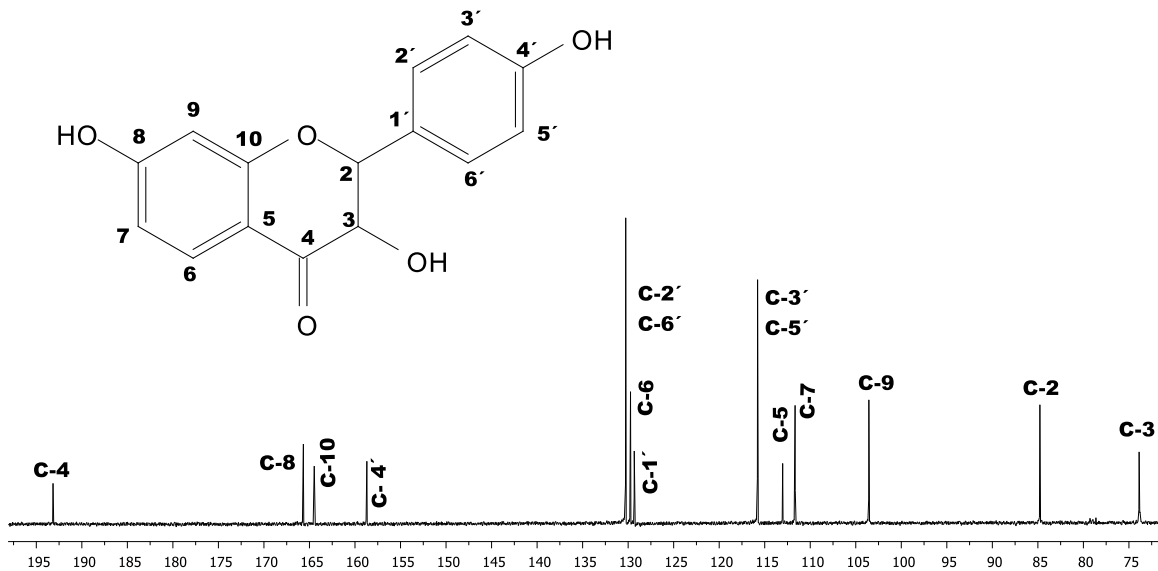


Figura 16. Espectro de RMN-¹³C del compuesto aislado del duramen de *C. engleriana*.

6.6.3.1. Derivado acetilado de 3,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-croman-4-ona

Previo a la identificación del flavanona, y con la finalidad de comprobar si la estructura presentaba grupos hidroxilos, se realizó una reacción de acetilación, con lo cual se obtuvo el derivado triacetilado de flavanona (**1a**). La reacción se realizó empleando el flavanona (30 mg), dejando reaccionar con anhídrido acético y piridina como base a temperatura ambiente por 24 horas. Al término de reacción, se extrajo con acetato de etilo, y se lavó con solución de HCl (10%), solución de NaHCO₃ (Saturado) y solución de NaCl (Saturado), para posteriormente evaporar el disolvente y obtener el crudo de reacción. El crudo de la reacción fue purificado mediante cromatografía en columna con una polaridad 9:1 Hex:AcOEt, obtenido un sólido de color blanco (15 mg) con un punto de fusión de 110-111 °C, de este compuesto se obtuvo sus espectros de RMN de ¹H y ¹³C en cloroformo deuterado.

En el espectro de RMN-¹H del derivado acetilado, se observa a campo alto la aparición de dos señales, una señal simple a 2.04 ppm que integra para tres hidrógenos los cuales fueron asignados como Me-9' correspondientes a un grupo aceto en el anillo C y otra señal a 2.32 ppm que integra para seis hidrógenos, correspondientes a dos grupos acetos en los anillos A y B del derivado de flavanona asignados como Me-7' y Me-8' respectivamente. Con lo cual sugerimos que el derivado formado es el triacetilado. Las demás señales observadas en el espectro corresponden a las antes mencionadas para la estructura del flavanona (**Figura 17**).

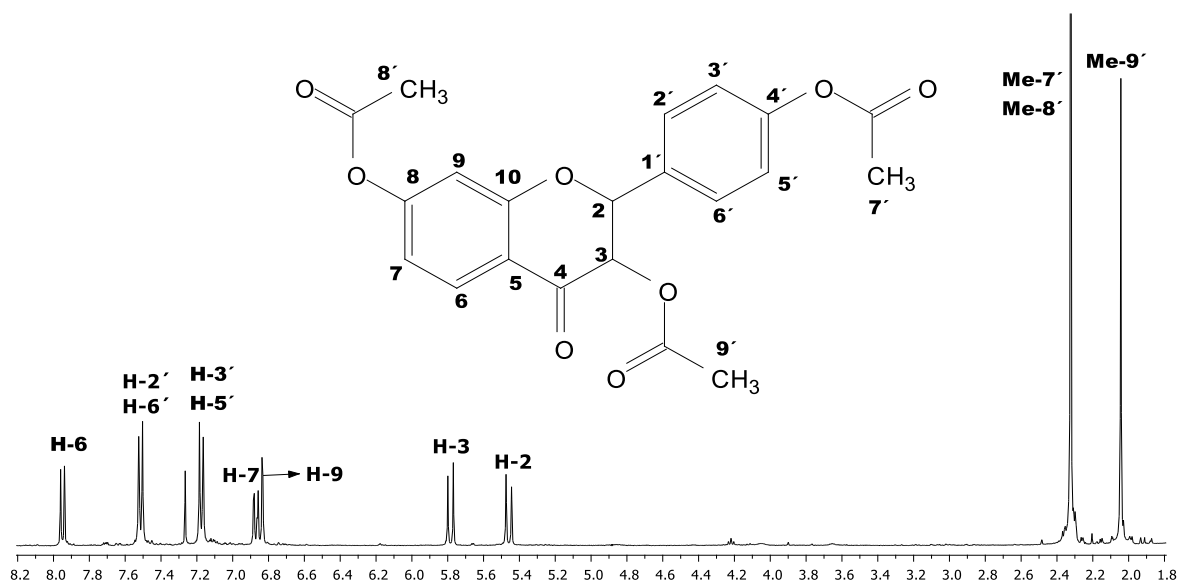


Figura 17. Espectro de RMN-¹H del derivado acetilado del flavanono.

También en el espectro de RMN-¹³C, se observan nuevas señales que aportan evidencia para sugerir la formación del derivado triacetilado. Las cuales son, la señal a 20.4 ppm asignada al metilo Me-9' perteneciente a un grupo aceto en el anillo C, así como la señal a 21.1 ppm la cual está integrada para dos carbonos los cuales se asignaron para los metilos Me-7' y Me-8' de los grupos acetilos en los anillos A y B respectivamente, además de observarse a 169.1 ppm una señal la cual integra para dos carbonos asignados como C-7' y C-8', y también se observó la señal a 168.4 ppm asignado como C-9' siendo estos los carbonos de carbonilo de los tres grupos acetilos. Las demás señales corresponden a la estructura del derivado triacetilado del flavanono (**Figura 18**).

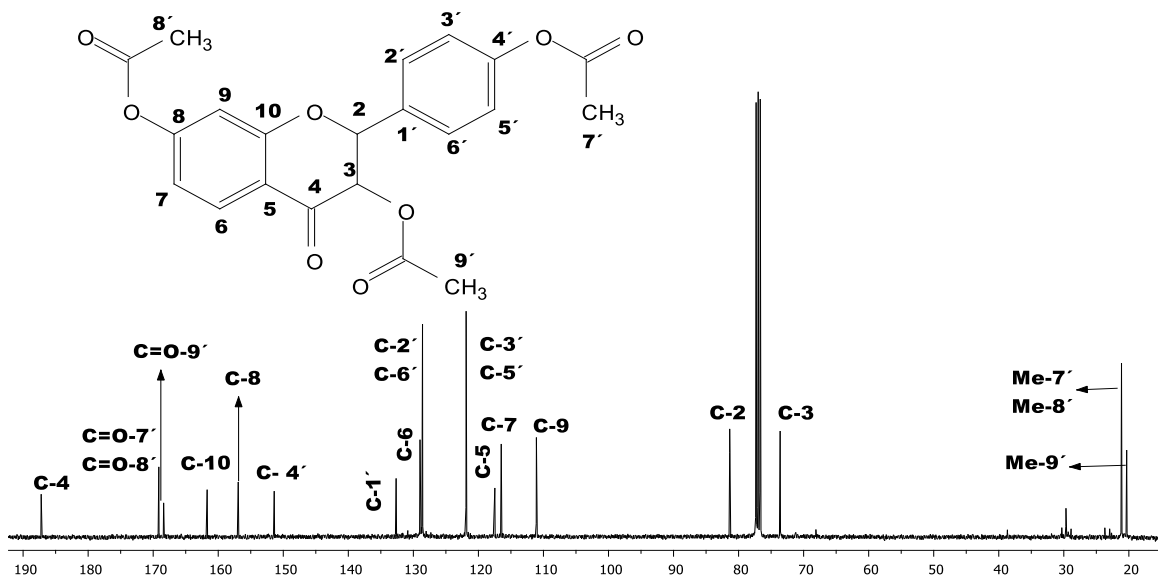


Figura 18. Espectro de RMN-¹³C del derivado acetilado del flavanonol.

Debido a que la reacción de acetilación procedió a condiciones normales, se propuso la idea de preparar otros derivados. De los derivados propuestos para su preparación fueron los derivados *p*-nitrobenzoato y el derivado benzoato, esto al ser estructuras voluminosas y con la finalidad de obtener cristales que fueran óptimos para la obtención de difracción de rayos X y así comprobar la estructura propuesta. Otros derivados propuestos fueron los éteres de metilo y bencilo.

Por lo que el flavanonol se sometió a reacción con los cloruros de *p*-nitrobenzoilo y benzoílo. Las condiciones empleadas fueron, utilizando piridina como base, THF como disolvente y bajo atmósferas de nitrógeno, a temperatura ambiente por 24 horas y a reflujo por 3 horas, con cada uno de los cloruros de ácido. Sin embargo ninguna de las reacciones procedió. Las condiciones para los derivados éter fueron, empleando hidróxido de sodio como base, metanol como disolvente, a temperatura ambiente por 24 horas, con yoduro de metilo y bromuro de bencilo respectivamente. Sin embargo ninguna de estas reacciones procedió (**Tabla 4**).

Tabla 4. Condiciones de reacción empleadas para obtener derivados de flavanonol.

Flavanonol	Reactivo	Base	Disolvente		Atm	Temperatura		Tiempo (h)	
20 mg	Cloruro de <i>p</i> -Nitrobenzoílo	Piridina	THF	S/D	N ₂	Ambiente	Ref	24	3
20 mg	Cloruro de Benzoílo	Piridina	THF	S/D	N ₂	Ambiente	Ref	24	3
20 mg	Yoduro de Metilo	NaOH	Metanol			Ambiente		24	
20 mg	Bromuro de Bencilo	NaOH	Metanol			Ambiente		24	

6.6.4. Cromatografía en columna del extracto de corteza de THF de *Comocladia engleriana*

Después de someter a purificación en columna cromatográfica 2 g del crudo de corteza con mezclas de hexano y AcOEt, en una polaridad 6:4 hexano:AcOEt, se aisló un polvo de color amarillo, el cual al ser disuelto en metanol o acetona presenta fluorescencia. De este polvo se obtuvo su espectro de RMN-¹H en acetona deuterada, del cual se observaron los siguientes desplazamientos (**Figura 19**); a campo alto se observan dos señales triples, una a 2.85 ppm que integra para dos hidrógenos con una $J=9.5$ Hz y otra a 3.22 ppm que integra para dos hidrógenos con una $J=9.8$ Hz las cuales fueron asignadas como H-3 y H-2 respectivamente, así como también se observa, la señal doble a 6.31 ppm con una $J=2.4$ Hz que integra para un hidrogeno asignada como H-3', la señal doble de dobles a 6.41 ppm que integra para un hidrogeno con una $J=8.8, 2.4$ Hz asignada como H-5' y la señal doble a 7.82 ppm asignada como H-6' que integra para un hidrogeno con una $J=8.8$ Hz, siendo estas las señales que conforman el anillo A de una chalcona. Además se observaron las señales, doble de dobles a 6.59 ppm con una $J=8.0, 2.1$ Hz que integra para un hidrogeno asignada como H-9, la señal doble que integra para un hidrogeno con una $J=8.0$ Hz asignada como H-8 a 6.71 ppm y la señal doble a 6.75 ppm asignada como H-5 con una $J=2.0$ Hz que integra para un hidrogeno, estas señales conforman el anillo B de la chalcona. Y a campo bajo en 12.81 ppm se observa una señal simple la cual es un puente de hidrogeno entre el hidrogeno del grupo hidroxilo del anillo A y el oxígeno de la cetona de la cadena alifática de la chalcona.

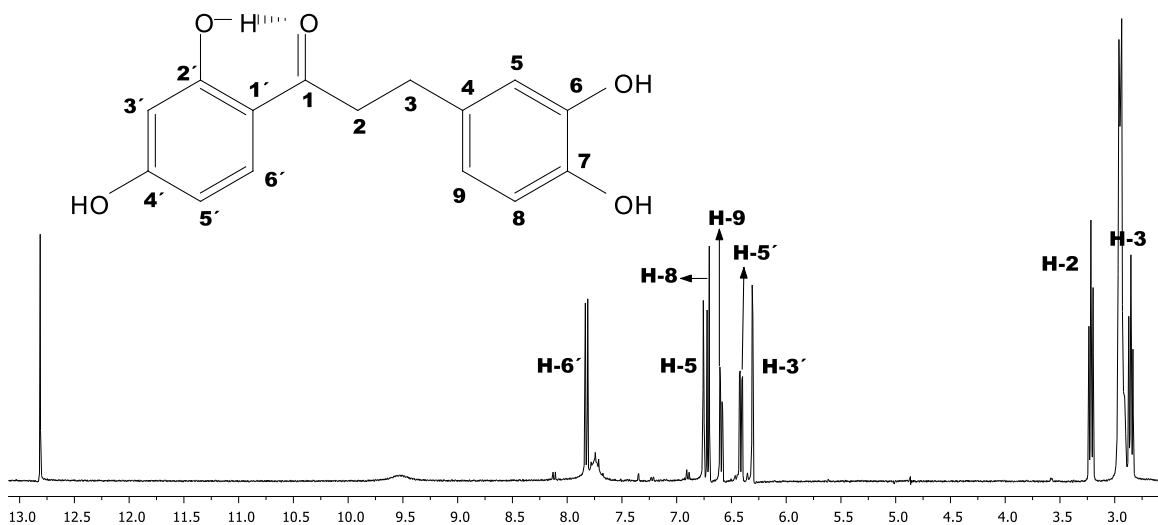


Figura 19. Espectro de RMN-¹H del compuesto aislado de la corteza de *C. engleriana*.

Mediante el espectro de dos dimensiones COSY, se asignó las señales correspondientes a los anillos aromáticos, esto debido a su correlación con sus protones vecinos. Como es el caso de la señal del anillo A asignada como H-5' observada a 6.41 ppm que correlaciona, con la señal asignada como H-3' y la señal asignada como H-6'. Para el anillo B de la chalcona, la señal a 6.59 ppm asignada como H-9 correlaciona con los hidrógenos que fueron asignados como H-5 y H-8 (**Figura 20**).

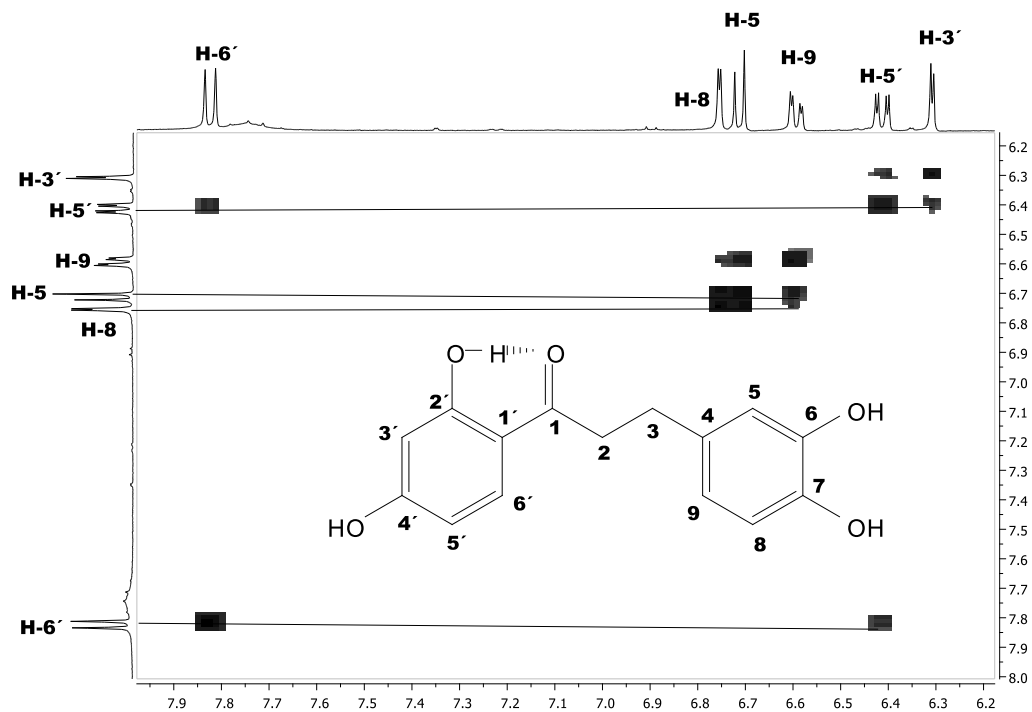


Figura 20. Espectro COSY del compuesto aislado de la corteza de *C. engleriana*

Del compuesto aislado de corteza también se obtuvo su espectro de RMN- ^{13}C (**Figura 21**), en el cual se observa una señal a 205.0 ppm la cual fue asignada al carbono del carbonilo de la cetona, además en 133.62 y 133.66 se observan las señales asignadas a C-6' y C-4 respectivamente las cuales casi se traslapan en el espectro sin embargo estas se pueden distinguir, y a campo bajo se observan las señales de la cadena alifática de la chalcona, como es la señal a 40.3 ppm asignada al carbono alfa a la cetona C-2 y en 29.8 ppm se traslapo la señal del carbono beta a la cetona C-3, con las señales del disolvente empleado para obtener el espectro de resonancia. Las demás señales observadas complementan la estructura propuesta de la chalcona.

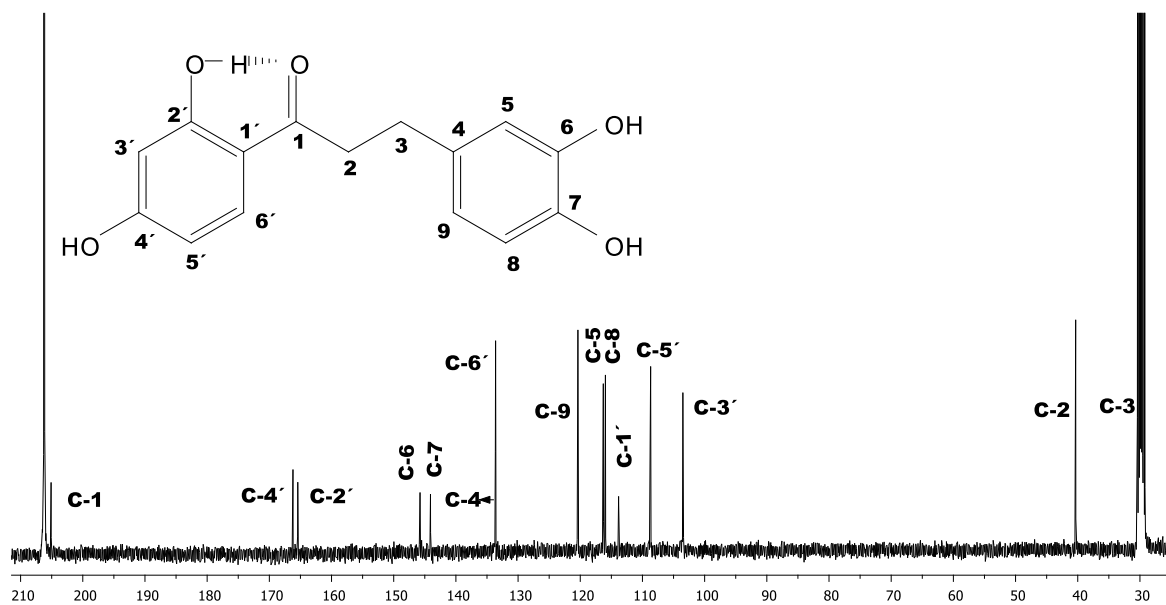


Figura 21. Espectro de RMN-¹³C del compuesto aislado de la corteza de *C. engleriana*.

Con la obtención de los espectros de resonancia, se realizó una búsqueda bibliográfica con la finalidad de identificar el compuesto aislado de la corteza de *C. engleriana*, de lo cual se identificó como el compuesto 1-(2,4-dihydroxyfenil)-3-(3,4-dihydroxyfenil)-1-propanona el cual fue sintetizado por **Komazawa *et al.* (1992)** con fines de fungir como medicamento antiulceroso, **Ohnogi *et al.* (2007)** lo sintetizaron y emplearon en pruebas sobre la enfermedad de Alzheimer y **Hilmer *et al.* (2016)** produjo la reducción de flavanonas empleando microorganismo con lo cual obtuvo diversas chalconas así como la antes mencionada.

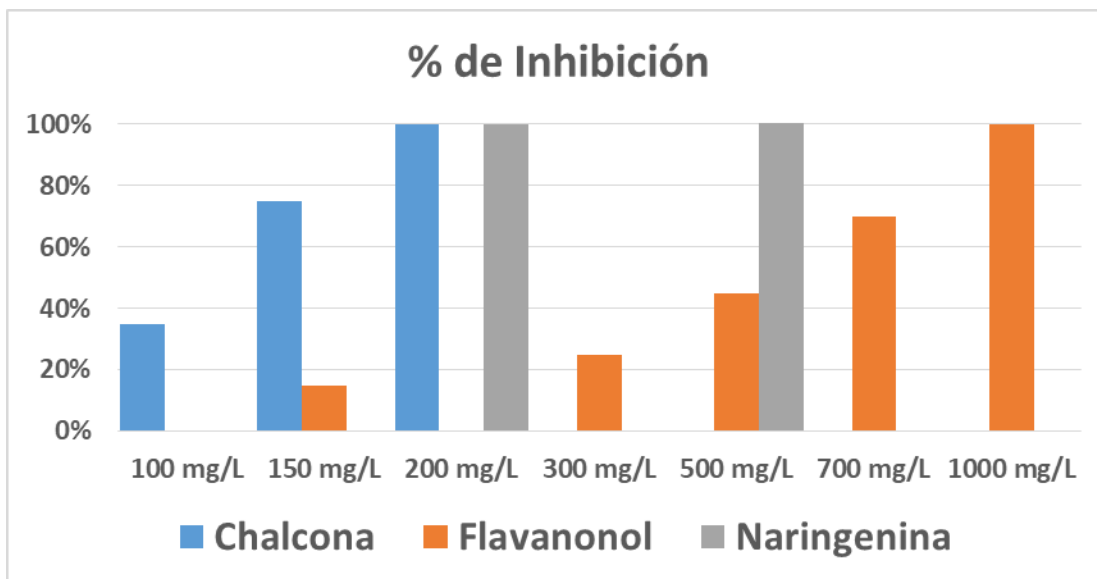
Previo a la identificación de la chalcona obtenida de la corteza, se realizaron dos reacciones, una con la finalidad de comprobar si la molécula presentaba grupos hidroxilos y otra con la finalidad de comprobar la presencia de un grupo cetona en la estructura de la molécula. Por lo que se realizó una reacción de acetilación, empleando anhídrido acético y piridina a temperatura ambiente y en reflujo, sin embargo la reacción no procedió. También se sometió a reacción con borohidruro de sodio (NaBH₄) y metanol a temperatura ambiente, lo cual tampoco procedió, esto posiblemente al puente de hidrogeno que presenta la molécula, lo cual pudo impedir que se llevara a cabo la reducción de la cetona a alcohol secundario. Con la finalidad de probar si los alcoholes de la molécula reaccionaban, se sometió a reacción con el cloruro de ácido *p*-nitrobenzoílo, yoduro de metilo y bromuro de bencilo, de lo cual a ninguna de las condiciones a las que se sometió y a los distintos reactivos, la reacción procedió (**Tabla 5**).

Tabla 5. Condiciones de reacción empleadas para obtener derivados de la chalcona.

Chalcona	Reactivo	Base	Disolvente		Atm	Temperatura		Tiempo (h)	
						Ambiente	Ref	24	3
20 mg	Anhídrido acético	Piridina	S/D			Ambiente	Ref	24	3
20 mg	Borohidruro de Sodio		Metanol	Etanol		Ambiente			
20 mg	Cloruro de <i>p</i> -Nitrobenzoílo	Piridina	THF	S/D	N ₂	Ambiente	Ref	24	3
20 mg	Yoduro de Metilo	NaOH	Metanol			Ambiente		24	
20 mg	Bromuro de Benzoílo	NaOH	Metanol			Ambiente		24	

6.7. Evaluación de la actividad inhibitoria de los compuestos aislados sobre *Trametes versicolor*

Las pruebas de inhibición se realizaron por el método de difusión en placa el cual fue antes descrito, estas pruebas se llevaron a cabo con los compuestos obtenidos de corteza y duramen de *C. engleriana*, y la naringenina. Las concentraciones que se empleó con el compuesto chalcona fueron a 100, 150 y 200 mg/L, esto debido a que en esta última concentración se obtuvo el 100% de la inhibición del hongo. En cambio con el compuesto flavanonol se realizaron un mayor número de concentraciones esto debido a que presento baja actividad inhibitoria sobre *Trametes versicolor*, de lo cual se obtuvo la inhibición del hongo a una concentración de 1000 mg/L siendo esta una concentración demasiado elevada y por lo tanto demuestra la poca actividad de este compuesto. Con el compuesto naringenina se obtuvo una inhibición del 100% sobre el hongo a una concentración de 200 mg/L (**Grafica 20**).



Grafica 20. Porcentos de inhibición de los compuestos chalcona, flavanonol y naringenina, sobre *Trametes versicolor*.

6.8. Evaluación de la actividad antibacteriana con los compuestos aislados

Las pruebas antibacterianas solo se realizaron con la chalcona y el flavanonol, en este caso la naringenina fue excluida debido a que existen reportes de este compuesto sobre diversas bacterias, entre las cuales se encuentran las empleadas en este trabajo.

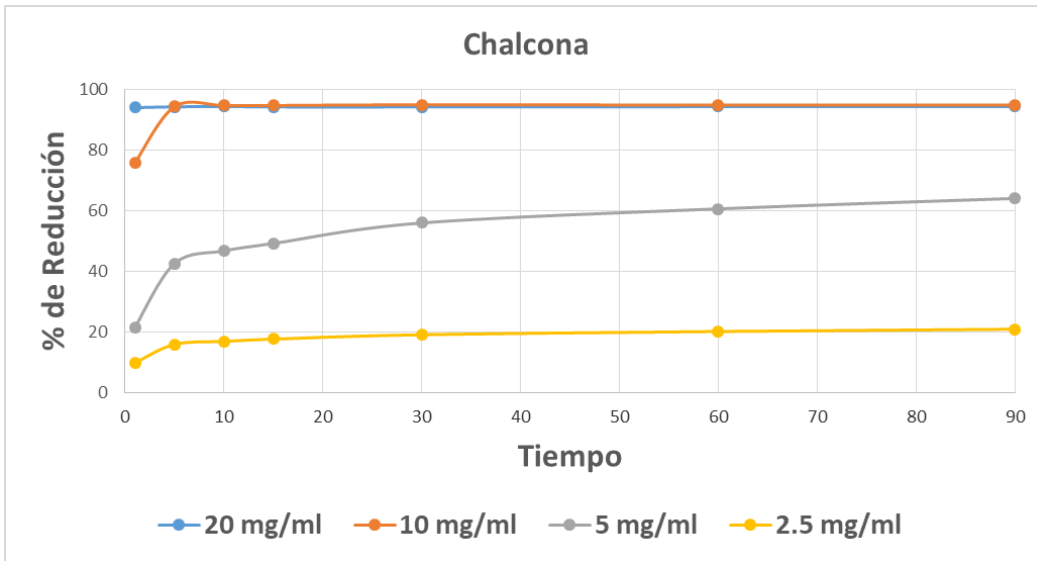
Como se mencionó para los ensayos sobre bacterias se probaron distintas concentraciones, con las cuales se obtuvo los porcentajes de inhibición, estos porcentajes fueron utilizados para realizar curvas mediante las cuales se obtuvieron las CMI, CL50 y CL100 para cada compuesto y cada bacteria (**Apéndice F1, F2 y F3**) Los resultados obtenidos muestran mayor efecto por la chalcona sobre las dos bacterias que el flavanonol esto al inhibirlas a una menor concentración. Además el flavanonol no presentó efecto sobre *S. aureus*. Sin embargo, las concentraciones de inhibición se consideran buenas (**Tabla 6**).

Tabla 6. Concentraciones CMI, CL₅₀ y CL₁₀₀ de inhibición con la chalcona y el flavanonol, sobre *E. coli* y *S. aureus*.

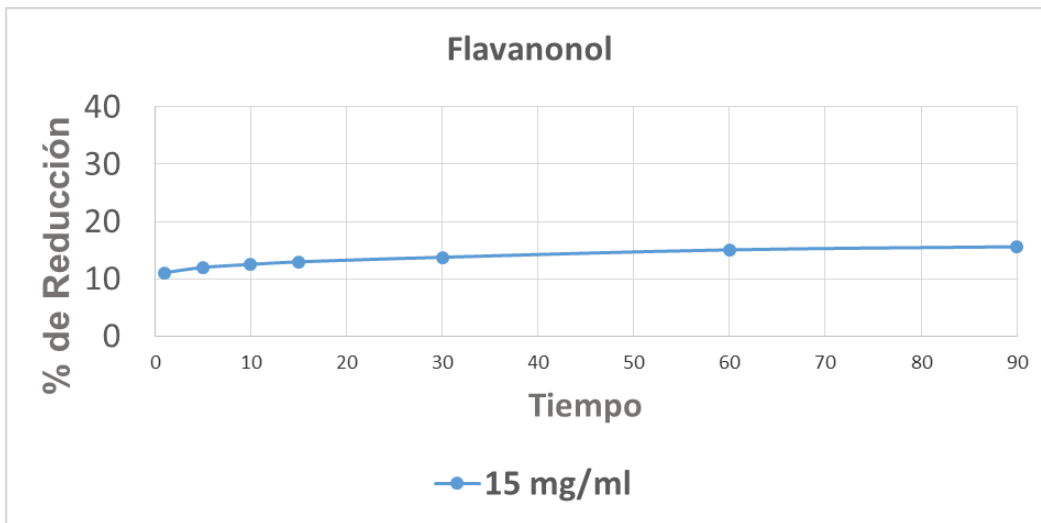
Bacteria	Chalcona			Flavanonol		
	CMI	CL ₅₀	CL ₁₀₀	CMI	CL ₅₀	CL ₁₀₀
	mg/ml					
<i>Escherichia coli</i>	0.01	0.16	0.67	0.05	0.33	0.86
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.01	0.36	1.06	Sin Efecto		

6.9. Evaluación de la actividad reductora del radical DPPH de los compuestos aislados

De las pruebas antioxidantes, mediante el método de reducción del radical DPPH los mejores resultados los presento la chalcona, esto debido a que a concentraciones de 20 y 10 mg/ml se observó más del 90% de la reducción del radical DPPH, y a 5 mg/ml esta actividad decae reduciendo solo un 60%, por lo que estos resultados son considerados regulares (**Gráfica 21**). En cambio con el flavanonol se obtuvieron malos porcentos de reducción, esto debido a que a una concentración de 15 mg/ml solo se obtuvo un 15% de la reducción del radical (**Gráfica 22**). Debido a que existe en la bibliografía una gran cantidad de estudios referentes al compuesto naringenina y su actividad como antioxidante, y al no contar con gran cantidad del compuesto no se realizaron en este trabajo las pruebas antioxidantes.



Gráfica 21. Por ciento de reducción del radical DPPH con el compuesto chalcona.



Gráfica 22. Por ciento de reducción del radical DPPH con el compuesto flavanonol.

6.10. Obtención de medicarpina a partir del extracto de AcOEt de *Andira inermis*

1 g de extracto de acetato de etilo se sometió a purificación en columna cromatográfica, eluyendo con hexano y mezclas de hexano-acetato de etilo 9:1. De lo anterior se observa la formación de cristales de una coloración amarillo claro, de los cuales se obtuvo su espectro de RMN de ^1H con la finalidad de comprobar la obtención de la medicarpina (Figura 22).

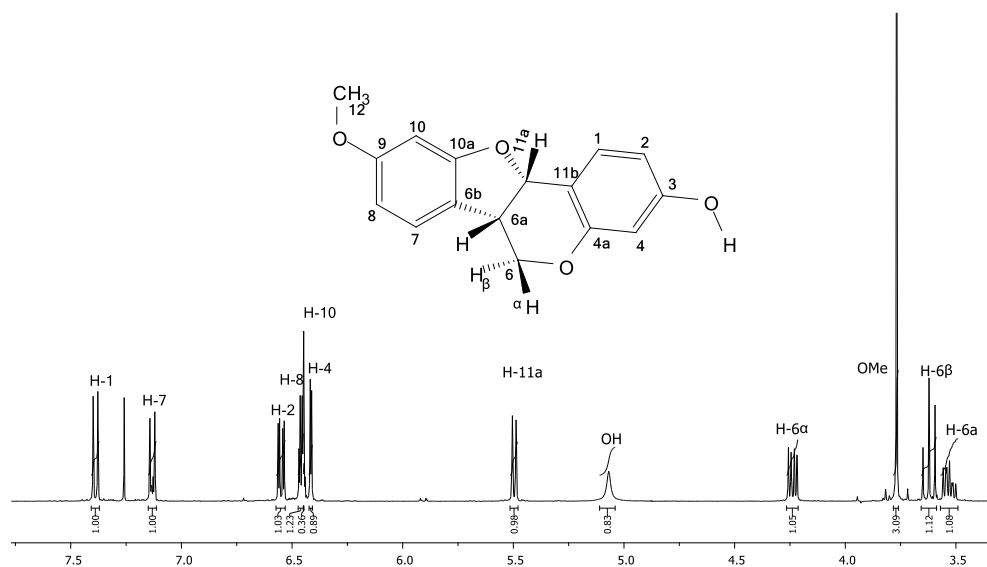


Figura 22. Espectro de RMN de ^1H de los cristales obtenidos en la fracción 9:1 hexano-acetato de etilo de *Andira inermis*.

6.10.1. Obtención de derivados éster alifáticos de medicarpina

La medicarpina se empleó para la obtención de los derivados, por lo que se probaron diferentes condiciones de reacción para obtener los ésteres alifáticos, empleando los cloruros de ácido (butírico, 2-etilbutírico, isobutírico y dietilcarbomiloil), bajo atmósferas de nitrógeno a diferentes temperaturas, tiempos y empleando piridina y TEA (trietilamina) como base y disolvente (Tabla 6).

De las condiciones probadas los mejores resultados para obtener los derivados éster fueron; empleando 30 mg de medicarpina, 0.1 ml de cloruro de ácido, 2 mL de piridina empleados como base y disolvente, a condiciones de reflujo, bajo atmósferas de nitrógenos durante 3 horas. Trascurrido el tiempo de reacción, se realizaron extracciones con acetato de etilo, y lavados con solución de ácido HCl (10 %), solución de NaHCO_3 (Saturado) y con solución de NaCl (Saturado). Los crudos de reacción fueron sometidos a

purificación en columna cromatográfica empleando una polaridad 95:5 de hexano:AcOEt, con la finalidad de obtener sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C .

Tabla 6. Condiciones de reacciones para la obtención de los derivados de medicarpina

Medicarpina (mg)	Cloruro de ácido	T/°C	Atm	Base		Tiempo
30	30 mg	4°	N ₂	Pyr	TEA	24 h
30	30 mg	T.A	N ₂	Pyr	TEA	24 h
30	30 mg	30°	N ₂		TEA	4 h
30	45 mg	70°	N ₂	Pyr		2 h
30	0.1 ml	Ref	N ₂	Pyr		3 h

De los derivados éster de medicarpina obtenidos caben destacar las siguientes características y desplazamientos con los cuales se comprobó la obtención de cada uno de estos derivados.

El derivado butirato se obtuvo en una consistencia mielosa, con un fuerte aroma a queso, y los desplazamientos de identificación fueron, una señal triple a 2.53 ppm (H-1'), una señal séxtuple a 1.78 ppm (H-2') y una señal triple a 1.04 ppm (H-3') (**Figura 23**).

El derivado 2-etilbutirato se obtuvo en una miel trasparente con una aroma frutal, y las señales de identificación fueron, una múltiple a 2.44 ppm (H-1'), dos señales múltiples a 1.76 ppm y a 1.65 ppm respectivamente (H-2') y una señal triple a 1.01 ppm (H-3') (**Figura 24**).

Del derivado isobutirato se obtuvieron cristales en forma de aguja de color blanco, con un punto de fusión de 70-72 °C, las señales de identificación fueron, una seña doble a 1.31 ppm (H-2') y un séptuple a 2.79 ppm (H-1') (**Figura 25**).

Del derivado dietilcarbamato se obtuvieron cristales amorfos de color blanco, con una aroma a menta, y se identificó por las señales, una a 1.22 ppm (H-2') y otra a 3.40 ppm (H-1') (**Figura 26**).

Con la finalidad de ser más descriptivos se crearon tablas de los desplazamientos químicos de RMN- ^1H (**Tabla 7**) y RMN- ^{13}C de cada derivado (**Tabla 8**).

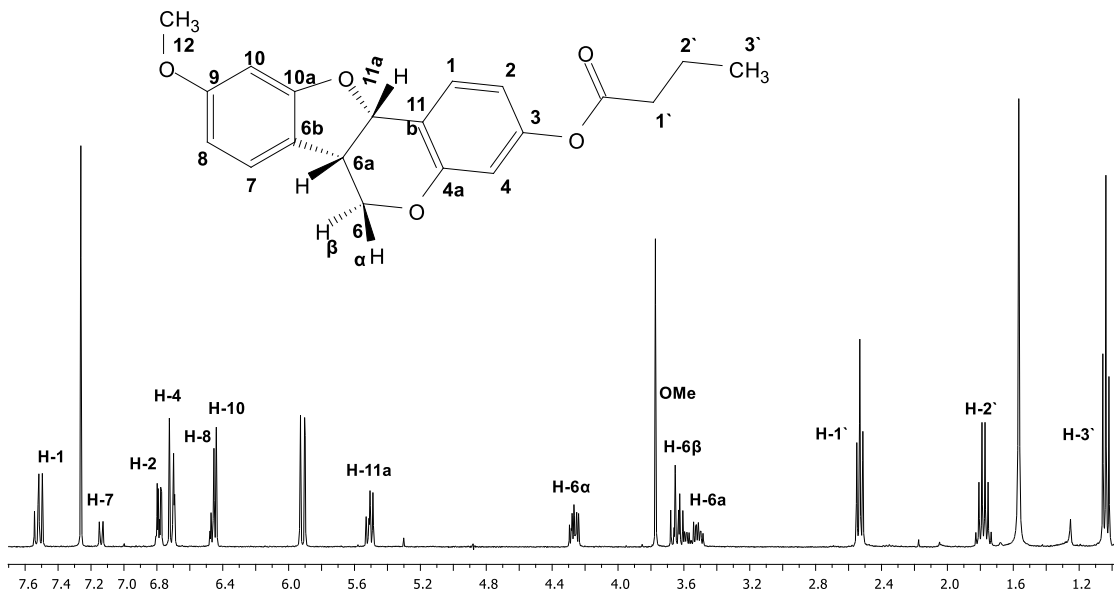


Figura 23. Espectro de RMN-¹H del derivado butirato de medicarpina.

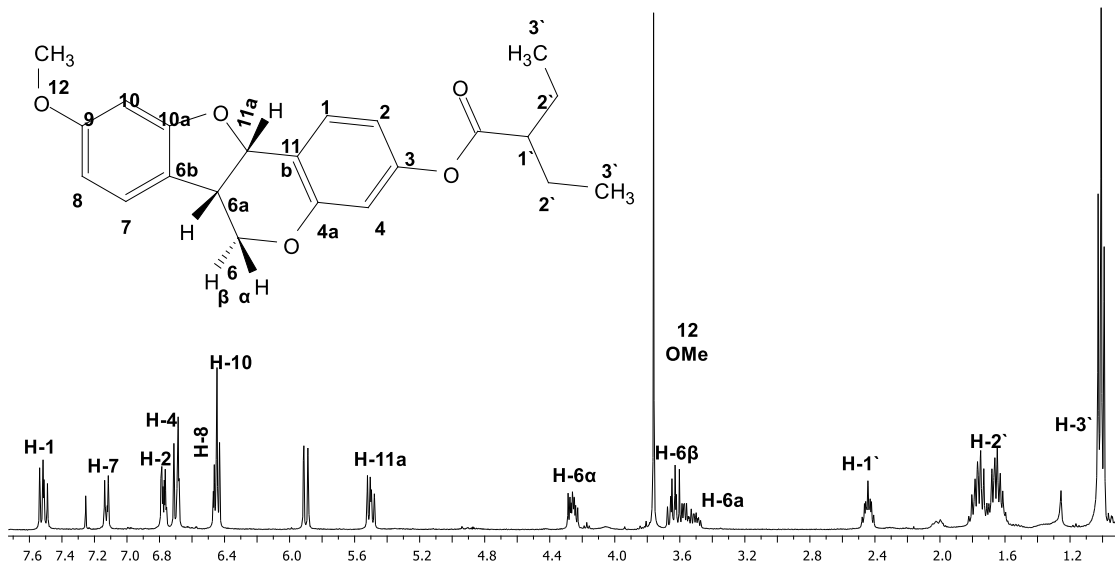


Figura 24. Espectro de RMN-¹H del derivado 2-etilbutirato de medicarpina.

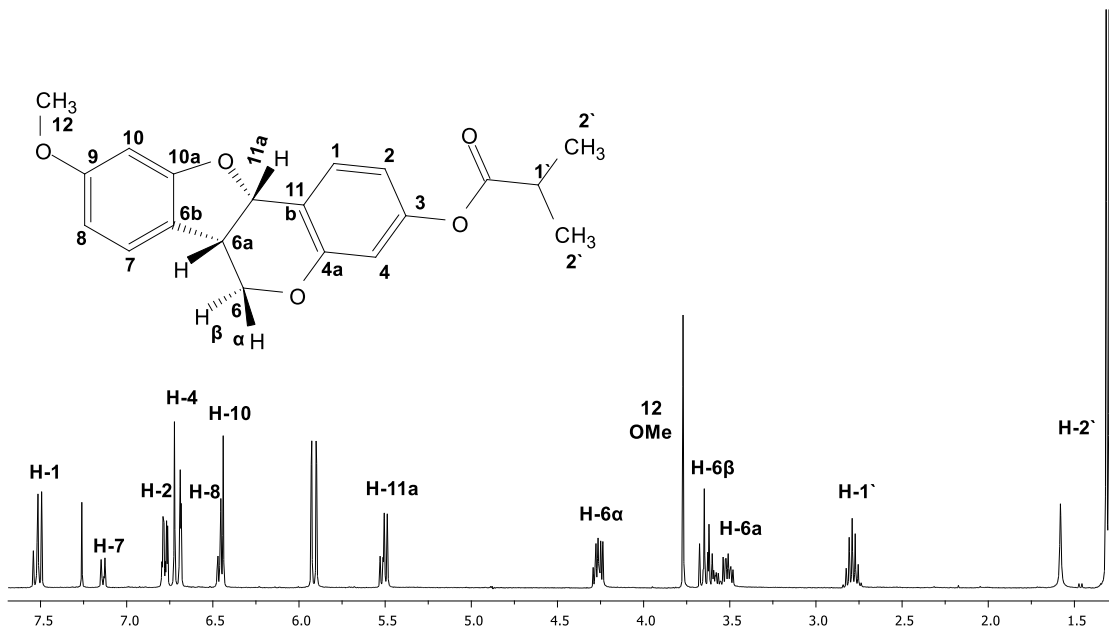


Figura 25. Espectro de RMN-¹H del derivado isobutirato de medicarpina.

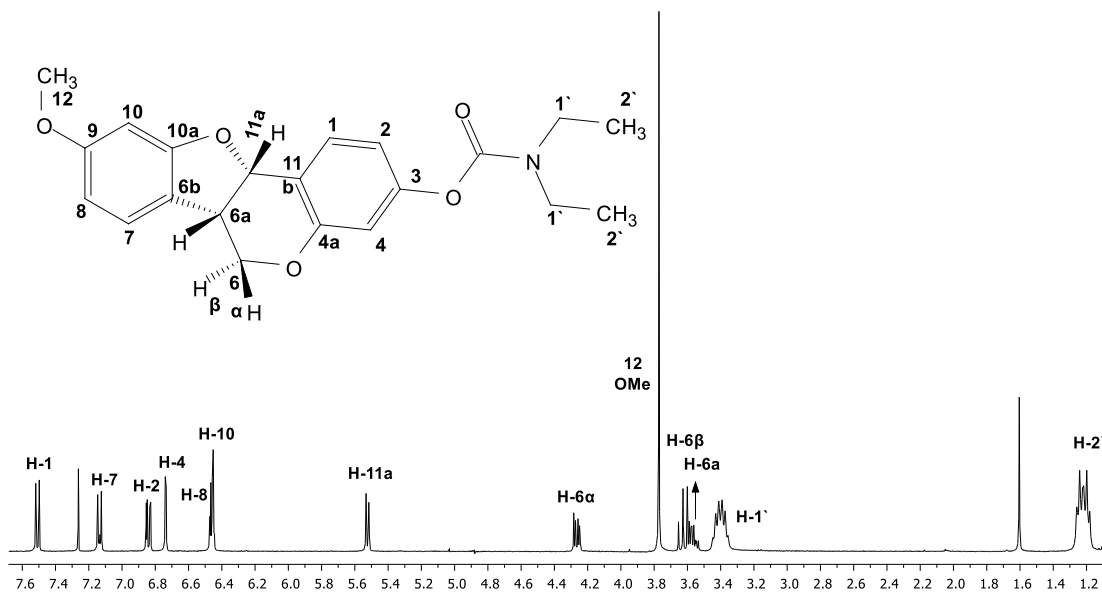


Figura 26. Espectro de RMN-¹H del derivado dietilcarbamato de medicarpina.

Tabla 7. Desplazamientos químicos de RMN-¹H de los derivados éster de medicarpina.

Medicarpina Experimental	Butirato de Medicarpina	2-Etilbutirato de Medicarpina	Isobutirato de Medicarpina	Dietilcarbamato de Medicarpina
-----	1.04 (t, J = 7.4 Hz, 3H, H-3')	1.01 (t, J = 7.4 Hz, 6H, H-3')	-----	-----
-----	1.78 (h, J = 7.5 Hz, 2H, H-2'),	1.65 (m, 2H, H-2') 1.76 (m, 2H, H-2')	1.31 (d, J = 7.0 Hz, 6H, H-2')	1.22 (m (a), 6H, H-2')
-----	2.53 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H-1')	2.44 (m, 1H, H-1')	2.79 (hept, J = 7.0 Hz, 1H, H-1')	3.40 (m (a), 4H, H-1')
3.53 (ddd, J = 11.0, 6.7, 5.0 Hz, 1H, H-6a)	3.54 (m, 1H, H-6a)	3.53 (m, 1H, H-6a)	3.54 (m, 1H, H-6a)	3.56 (m, 1H, H-6a)
3.62 (t, J = 11.0 Hz, 1H, H-6β)	3.65 (t, J = 10.9 Hz, 1H, H-6 β α)	3.64 (m, 1H, H-6β)	3.65 (t, J = 10.9 Hz, 1H, H-6β)	3.63 (m, 1H, H-6β)
3.77 (s, 3H, OMe)	3.77 (s, 3H, OMe)	3.76 (s, 3H, OMe)	3.77 (s, 3H, OMe)	3.77 (s, 3H, OMe)
4.24 (dd, J = 11.0, 5.0, 1H, H-6α)	4.26 (dd, J = 11.2, 4.6 Hz, 1H, H-6α)	4.26 (m, 1H, H-6α),	4.26 (dd, J = 11.1, 4.9 Hz, 1H, H-6α)	4.27 (dd, J = 10.6, 4.6 Hz, 1H, H-6α)
5.27 (a, 1H, OH)	-----	-----	-----	-----
5.50 (d, J = 6.7 Hz, 1H, H-11a)	5.50 (d, J = 7.0 Hz, 1H, H-11a)	5.51 (d, J = 6.8 Hz, 1H, H-11a)	5.50 (d, J = 7.0 Hz, 1H, H-11a)	5.52 (d, J = 6.5 Hz, 1H, H-11a)
6.41 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H-4)	6.71 (d, J = 10.3 Hz, 1H, H-4)	6.70 (d, J = 10.5 Hz, 1H, H-4)	6.71 (d, J = 13.5 Hz, 1H, H-4)	6.74 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-4)
6.45 (s, 1H, H-10)	6.44 (s, 1H, H-10)	6.43 (s, 1H, H-10)	6.44 (s, 1H, H-10)	6.45 (s, 1H, H-10)
6.46 (dd, J = 5.8, 2.2 Hz, 1H, H-8)	6.46 (dd, J = 7.4, 1.9 Hz, 1H, H-8)	6.46 (dd, J = 6.8, 2.2 Hz, 1H, H-8)	6.46 (dd, J = 6.8, 2.1 Hz, 1H, H-8)	6.46 (dd, J = 5.7, 2.3 Hz, 1H, H-8)
6.55 (dd, J = 8.4, 2.5 Hz, 1H, H-2)	6.78 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H, H-2)	6.77 (dd, J = 5.7, 2.6 Hz, 1H, H-2)	6.78 (dd, J = 8.4, 2.5 Hz, 1H, H-2)	6.84 (dd, J = 8.4, 2.3 Hz, 1H, H-2)
7.13 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-7)	7.14 (d, J = 9.1 Hz, 1H, H-7)	7.13 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H-7)	7.14 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-7)	7.14 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-7)
7.37 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-1)	7.51 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-1)	7.53 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-1)	7.50 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-1)	7.51 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-1)

Tabla 8. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C de los derivados éster de medicarpina.

Medicarpina Experimental	Butirato de medicarpina	2-Etilbutirato de medicarpina	Isobutirato de medicarpina	Dietilcarbamato de medicarpina
-----	13.5 (C-3')	11.7 (C-3')	-----	-----
-----	18.3 (C-2')	25.0 (C-2')	18.8 (C-2')	13.3, 14.1 (C-2')
-----	36.1 (C-1')	48.8 (C-1')	34.1 (C-1')	41.8, 42.2 (C-1')
39.4 (C-6a)	40.1 (C-6a)	40.1 (C-6a)	39.8 (C-6a)	39.5 (C-6a)
55.4 (MeO)	55.4 (MeO)	55.4 (MeO)	55.4 (MeO)	55.4 (MeO)
66.4 (C-6)	66.5 (C-6)	66.4 (C-6)	66.5 (C-6)	66.5 (C-6)
78.5 (C-11a)	78.0 (C-11a)	77.9 (C-11a)	78.0 (C-11a)	78.1 (C-11a)
96.8 (C-10)	93.7 (C-10)	93.7 (C-10)	93.8 (C-10)	96.8 (C-10)
103.6 (C-4)	110.6 (C-4)	110.7 (C-4)	110.6 (C-4)	110.6 (C-4)
106.3 (C-8)	104.6 (C-8)	104.6 (C-8)	104.6 (C-8)	106.4 (C-8)
109.7 (C-2)	115.3 (C-2)	115.3 (C-2)	115.2 (C-2)	115.5 (C-2)
112.5 (C-11b)	117.6 (C-11b)	117.5 (C-11b)	117.5 (C-11b)	116.9 (C-11b)
119.1 (C-6b)	118.7 (C-6b)	118.7 (C-6b)	118.7 (C-6b)	118.8 (C-6b)
124.7 (C-7)	124.7 (C-7)	124.7 (C-7)	124.7 (C-7)	124.7 (C-7)
132.1 (C-1)	131.6 (C-1)	131.6 (C-1)	131.6 (C-1)	131.4 (C-1)
156.5 (C-10a)	151.6 (C-10a)	151.7 (C-10a)	151.8 (C-10a)	152.5 (C-10a)
157.0 (C-9)	156.1 (C-9)	156.1 (C-9)	156.1 (C-9)	156.0 (C-9)
160.5 (C-4a)	160.5 (C-4a)	160.5 (C-4a)	160.5 (C-4a)	160.5 (C-4a)
161.0 (C-3)	161.1 (C-3)	161.1 (C-3)	161.1 (C-3)	161.0 (C-3)
-----	171.8 (C=O)	174.3 (C=O)	175.3 (C=O)	153.7 (C=O)

6.10.2. Obtención de derivados éter de medicarpina

Para la preparación de los derivados éter, se emplearon haluros de alquilo, dos de ellos alifáticos (yoduro de metilo, bromuro de etilo) y un haluro aromático (bromuro de bencilo). Las condiciones de reacción que se emplearon para la preparación de los éteres fueron iguales para los tres derivados las cuales fueron, empleando medicarpina (30 mg), hidróxido de sodio empleado como base (100 mg), THF como disolvente (2 mL) y el haluro de alquilo correspondiente (0.1 mL), lo anterior a temperatura ambiente por 24 horas. Trascurrido el tiempo de reacción, se realizó extracciones con acetato de etilo, y lavados con solución de ácido HCl (10 %) y solución de NaHCO₃ (Saturado). Los crudos de reacción fueron sometidos a purificación en columna cromatografía empleando una polaridad 98:2 de hexano: AcOEt, de cada uno de los derivados se obtuvo su espectro de RMN de ¹H y ¹³C, con la finalidad de comprobar la formación de estos.

En cada uno de los derivados se observan las señales de medicarpina y como se mencionó cada uno de los derivados mostro señales con las cuales se identificaron, y características que a continuación se mencionan.

El derivado metil éter de medicarpina se obtuvo en forma de cristales amorfos de color blanco, con un punto de fusión de 131-132 °C. Y la señal con la cual se identificó su obtención fue la señal simple observada a 3.79 ppm asignada como H-1' (**Figura 27**).

El derivado etil éter de medicarpina se obtuvo en forma de láminas cristalinas transparentes, con un punto de fusión de 113-115 °C. Las señales de identificación fueron, una señal cuádruple a 4.01 ppm asignada a H-1' y la señal triple a 1.40 ppm asignada como H-2' (**Figura 28**).

El derivado bencil éter de medicarpina se obtuvo en forma de cristales amorfos de un color blanco, con un punto de fusión de 100-101 °C. Las señales de identificación del derivado fueron, una señal simple a 5.05 ppm asignada como H-1' y la señal múltiple a 7.40 ppm que integra para cinco hidrógenos, correspondientes al anillo aromático (**Figura 29**).

De igual manera que en los derivados éster y con la finalidad de ser más descriptivos se crearon tablas de los desplazamientos químicos de RMN-¹H (**Tabla 9**) y RMN-¹³C de cada derivado éter de medicarpina (**Tabla 10**).

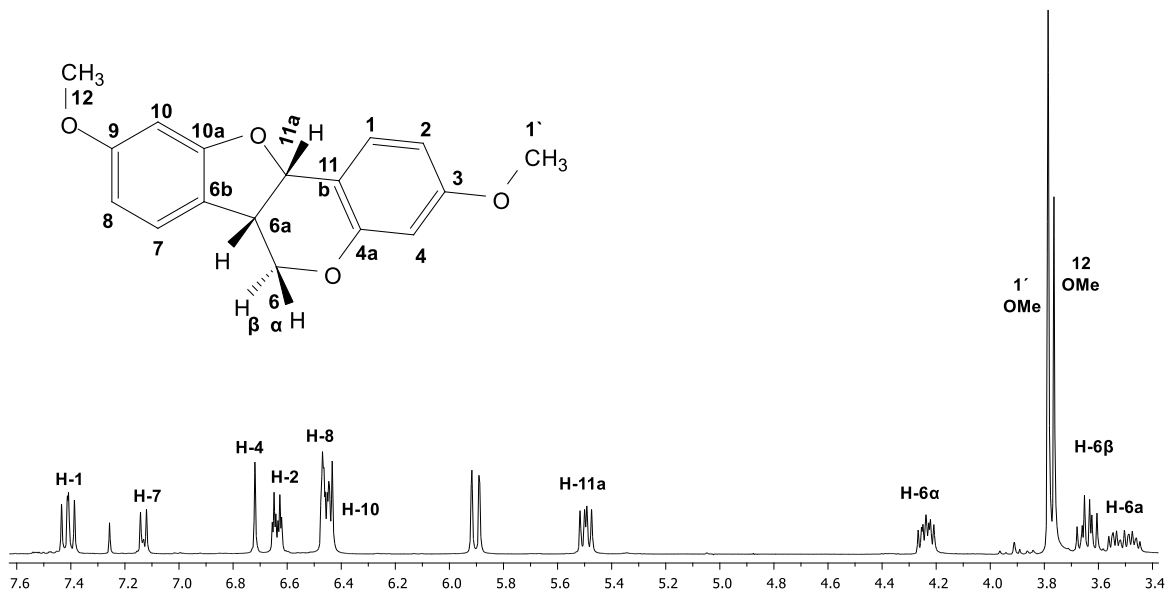


Figura 27. Espectro de RMN- ^1H del derivado metil éter de medicarpina.

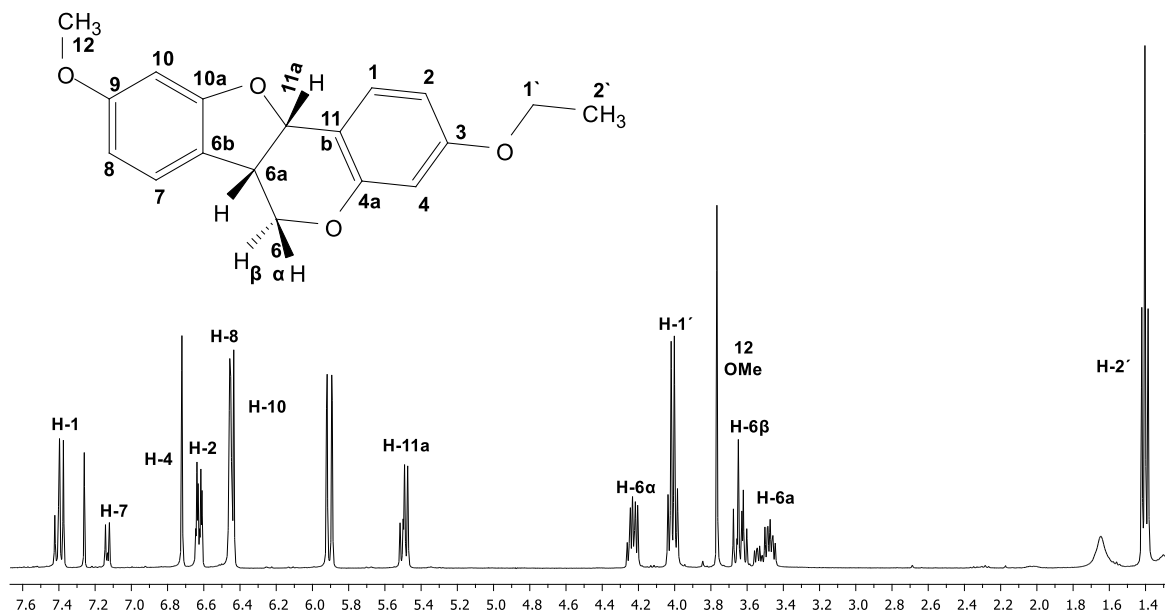


Figura 28. Espectro de RMN- ^1H del derivado etil éter de medicarpina.

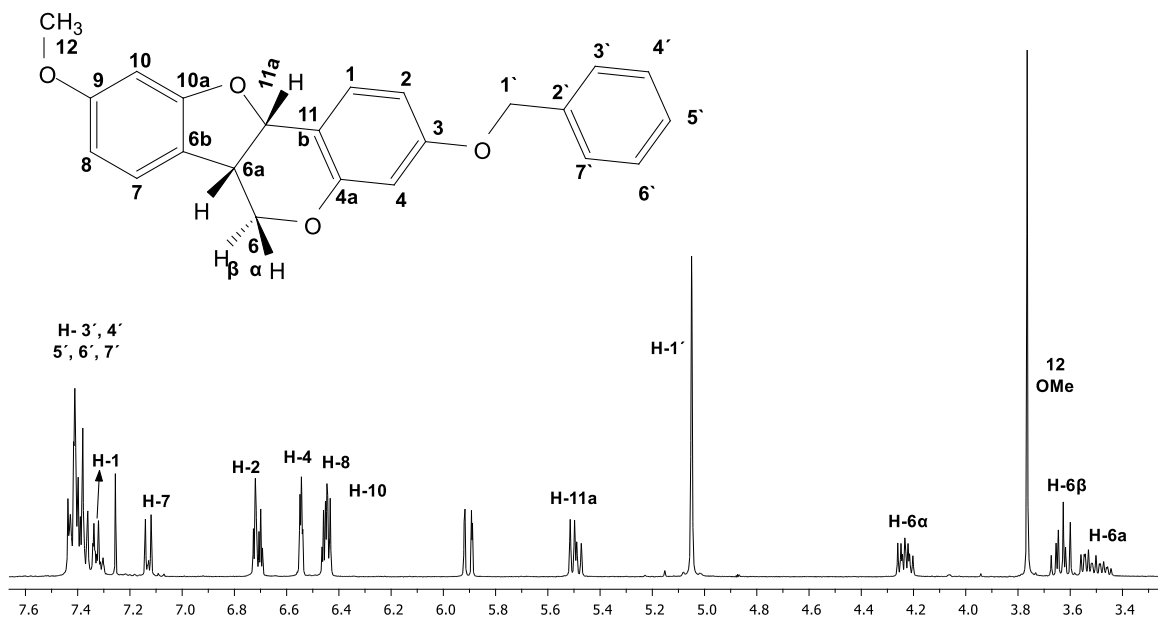


Figura 29. Espectro de RMN- ^1H del derivado bencil éter de medicarpina.

Tabla 9. Desplazamientos químicos de RMN-¹H de los derivados éter de medicarpina

Medicarpina Experimental	Metil éter de Medicarpina	Etil éter de Medicarpina	Bencil éter de Medicarpina
-----	-----	1.40 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H-2').	-----
3.53 (ddd, $J = 11.0, 6.7, 5.0$ Hz, 1H, H-6a)	3.50 (m, 1H, H-6a)	3.50 (m, 1H, H-6a),	3.50 (m, 1H, H-6a)
3.62 (t, $J = 11.0$ Hz, 1H, H-6 β)	3.64 (m, 1H, H-6 β)	3.63 (m, 1H, H-6 β)	3.63 (m, 1H, H-6 β)
3.77 (s, 3H, OMe)	3.76 (s, 3H, OMe)	3.77 (s, 3H, OMe)	3.76 (s, 3H, OMe)
-----	3.79 (s, 3H, OMe')	4.01 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-1')	-----
4.24 (dd, $J = 11.0, 5.0$, 1H, H-6 α)	4.23 (m, 1H, H-6 α)	4.24 (m, 1H, H-6 α)	4.23 (m, 1H, H-6 α)
5.27 (a, 1H, OH)	-----	-----	5.05 (s, 2H, H-1')
5.50 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, H-11a)	5.48 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-11a)	5.48 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-11a)	5.51 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, H-11a)
6.41 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-4)	6.72 (s, 1H, H-4)	6.72 (s, 1H, H-4)	6.71 (dd, $J = 8.1, 3.1$ Hz, 1H, H-4)
6.45 (s, 1H, H-10)	6.43 (s, 1H, H-10)	6.43 (s, 1H, H-10)	6.43 (s, 1H, H-10)
6.46 (dd, $J = 5.8, 2.2$ Hz, 1H, H-8)	6.45 (dd, $J = 6.8, 1.7$ Hz, 1H, H-8),	6.45 (m, 1H, H-8)	6.45 (dd, $J = 4.3, 2.1$ Hz, 1H, H-8)
6.55 (dd, $J = 8.4, 2.5$ Hz, 1H, H-2)	6.63 (dd, $J = 8.5, 2.6$ Hz, 1H, H-2)	6.62 (dd, $J = 8.5, 2.6$ Hz, 1H, H-2)	6.55 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-2)
7.13 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-7)	7.13 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-7),	7.13 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-7)	7.13 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-7)
7.37 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-1)	7.40 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-1),	7.39 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-1)	7.33 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-1)
-----	-----	-----	7.40 (m, 5H, H-3', 4', 5', 6', 7')

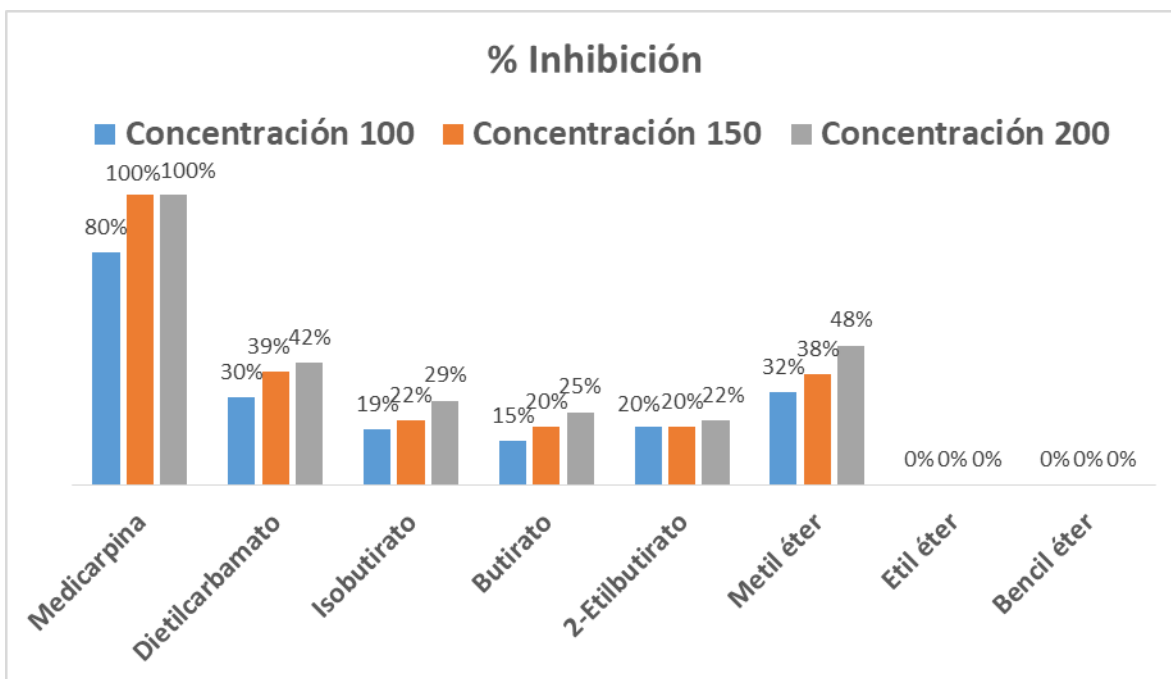
Tabla 10. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C de los derivados éter de medicarpina

Medicarpina Experimental	Metil éter de medicarpina	Etil éter de medicarpina	Bencil éter de medicarpina
-----	-----	14.7 (C-2')	-----
39.4 (C-6a)	39.5 (C-6a)	40.1 (C-6a)	39.5 (C-6a)
55.4 (MeO)	55.4 (MeO)	55.4 (MeO)	55.4 (MeO)
-----	55.3 (Me'O)	63.5 (C-1')	66.5 (C-1')
66.4 (C-6)	66.5 (C-6)	66.4 (C-6)	70.0 (C-6)
78.5 (C-11a)	78.4 (C-11a)	78.5 (C-11a)	78.5 (C-11a)
96.8 (C-10)	93.7 (C-10)	93.7 (C-10)	93.8 (C-10)
103.6 (C-4)	104.6 (C-4)	104.6 (C-4)	104.6 (C-4)
106.3 (C-8)	106.3 (C-8)	106.3 (C-8)	106.3 (C-8)
109.7 (C-2)	109.2 (C-2)	109.6 (C-2)	109.8 (C-2)
112.5 (C-11b)	112.3 (C-11b)	112.4 (C-11b)	112.6 (C-11b)
119.1 (C-6b)	117.8 (C-6b)	117.9 (C-6b)	117.8 (C-6b)
124.7 (C-7)	124.6 (C-7)	124.7 (C-7)	124.7 (C-7)
-----	-----	-----	127.4 (C-3', 7')
-----	-----	-----	127.9 (C-5')
-----	-----	-----	128.5 (C-4', 6')
132.1 (C-1)	131.7 (C-1)	131.6 (C-1)	131.8 (C-1)
-----	-----	-----	136.6 (C-2')
156.5 (C-10a)	148.0 (C-10a)	148.0 (C-10a)	148.0 (C-10a)
157.0 (C-9)	156.5 (C-9)	156.4 (C-9)	156.5 (C-9)
160.5 (C-4a)	160.6 (C-4a)	160.3 (C-4a)	160.1 (C-4a)
161.0 (C-3)	160.9 (C-3)	161.9 (C-3)	160.6 (C-3)

6.11. Evaluación inhibitoria de los derivados de medicarpina sobre *Trametes versicolor*

Las pruebas de inhibición se realizaron por el método de difusión en placa el cual fue antes descrito, estas pruebas se llevaron a cabo con los derivados alifáticos de medicarpina, las concentraciones que se emplearon para estas pruebas fueron a 100, 150 y 200 mg/L, esto debido a que se ha reportado que la medicarpina presenta un 100% de la inhibición del hongo a una concentración de 150 mg/L, el principio de estas pruebas es observar si los derivados éster y éter presentan una disminución o un aumento en la concentración para inhibir a *Trametes versicolor*, con respecto a la medicarpina.

Los resultados obtenidos de las pruebas de inhibición con los diferentes derivados, mostraron una disminución considerable de la actividad inhibitoria sobre *T. versicolor*, como en el caso de los derivados etil y bencil éter los cuales no presentaron actividad, y los mejores resultados se obtuvieron con los derivados dietilcarbamato y metil éter de medicarpina obteniendo un 40% de la actividad inhibitoria a una concentración de 200 mg/L, sin embargo estos resultados no se acercan a la actividad presentada por la medicarpina (**Gráfica 23**).



Gráfica 23. Porcientos de inhibición de los derivados éster y éter de medicarpina sobre *Trametes versicolor*.

6.12. Análisis conformacional de los compuestos aislados y los derivados de medicarpina

Previo a llevar a cabo un análisis computacional de la interacción molécula-ligando, se contruyeron las estructuras a emplear de los compuestos aislados como son el flavanonol, la chalcona y naringenina mediante un análisis conformacional (**Figura 30**), además se constuyeron las estructuras de los derivados de la medicarpina antes obtenidos como son los ésteres alifáticos (**Figura 31**) y éteres de medicarpina (**Figura 32**), y los reportados por nuestro grupo de trabajo, derivado acetilado y los derivados éster aromáticos *p*-metoxibenzoato, *p*-nitrobenzoato y benzoato de medicarpina (**Figura 33**), de los cuales se obtuvo el conformero de menor energía, con el funcional híbrido B3LYP y un conjunto de base 6-311G** de cada uno de los derivados.

Se eligió el funcional B3LYP al llevarse a cabo un comparativo entre las distancias de la estructura de rayos X de la medicarpina, y las distancias de las estructuras optimizadas con los funcionales, Hartree-Fock (HF), B3LYP y MP2 con un conjunto de base 6-311G**, de los cuales el método B3LYP (6-311G**) reprodujo los datos más cercanos a los obtenidos mediante rayos X, obteniendo una $R^2 = 0.9$, mientras que el método MP2 obtuvo una $R^2 = 0.87$ y HF obtuvo una $R^2 = 0.83$. En cuestiones energéticas, con el funcional MP2 se obtuvieron mejores resultados que empleando B3LYP, sin embargo como se acaba de demostrar los resultados más semejantes a la parte práctica fueron reflejados mediante el funcional B3LYP y con la finalidad de reflejar mejores resultados se tomó este funcional y el conjunto de base antes mencionado.

Elegido el funcional y el conjunto de base, se llevó a cabo el análisis conformacional de cada uno de los derivados y de los compuestos obtenidos de las maderas de estudio, de los cuales se contruyeron diferentes conformeros y de estos se eligió el conformero de mayor estabilidad (menor energía).

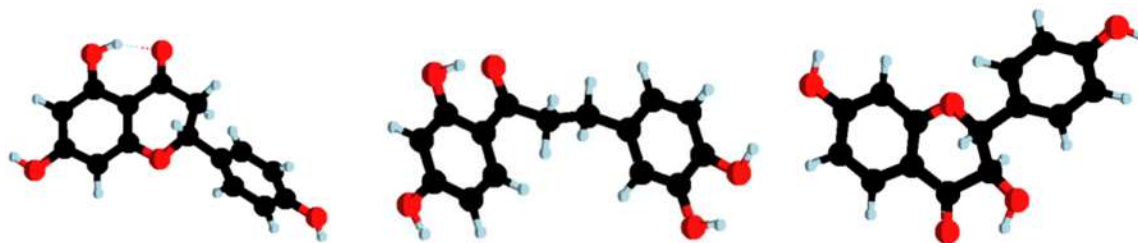


Figura 30. Conformeros de menor energía Naringenina (Izq), Chalcona (Cen), Flavanonol (Der).

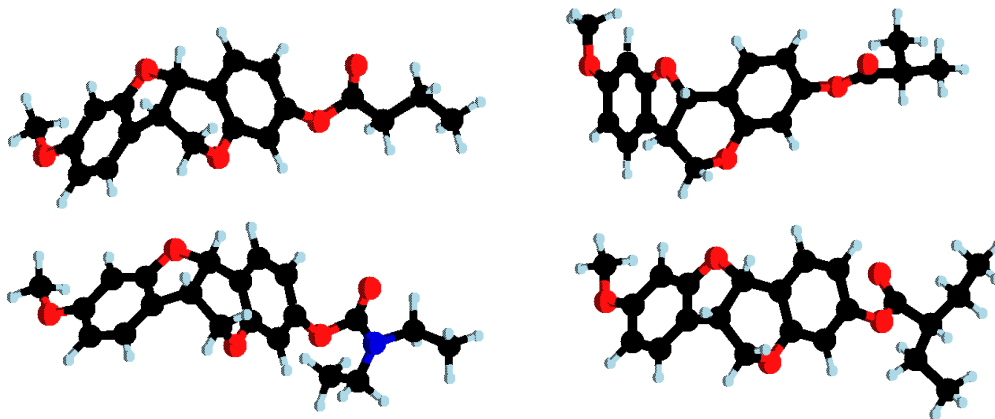


Figura 31. Confórmeros de menor energia Butirato (Izq Sup), Isobutirato (Der Sup), Dietil-carbamato (Izq Inf), 2-Etilbutirato (Der Inf).



Figura 33. Confórmeros de menor energia Etil-eter (Izq), Metil-eter (Cen), Bencil-eter de medicarpina (Der).

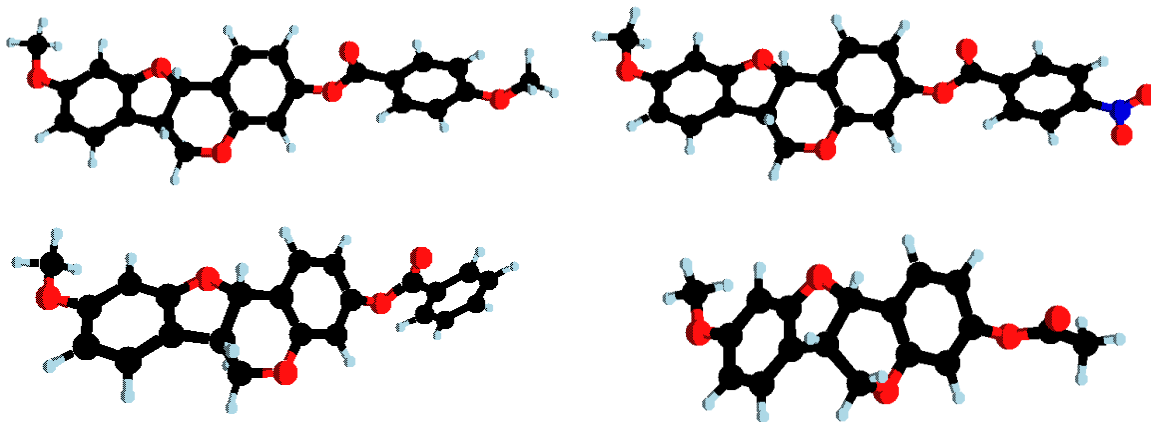


Figura 32. Confórmeros de menor energia *p*-metoxibenzoato (Izq Sup), *p*-nitrobenzoato (Der Sup), Benzoato (Izq Inf), Acetilado de medicarpina (Der Inf).

6.13. Estudio de simulación interacción enzima-ligando

El estudio de simulación se realizó con la finalidad de explicar los resultados obtenidos de las pruebas de inhibición sobre el hongo *Trametes versicolor*, con los compuestos aislados flavanonol, chalcona y naringenina, además de los derivados de medicarpina obtenidos en este trabajo (derivados éster y éter) y los reportados por nuestro grupo de trabajo (acetilado, benzoato, *p*-nitrobenzoato y *p*-metoxibenzoato). Las simulaciones enzima-ligando, se llevaron a cabo empleando la enzima lacasa (debido a que es la principal enzima degradadora que produce *T. versicolor* para obtener nutrientes, esto al degradar los principales componentes de la madera) y como ligando los compuestos antes mencionados.

El software empleado fue AutoDock, en el cual se realizó una estrategia de búsqueda, lo cual es un análisis de todos los modos posibles de unión entre ligando y receptor, empleando un grid total de la enzima con 800 poses por cada compuesto, con la finalidad de tener un número representativo de cada simulación y observar los sitios de mayor frecuencia y afinidad. La estructura tridimensional de la enzima lacasa se obtuvo de la base de datos Protein Data Bank (PDB), con la clave 1GYC.

La base principal de la discusión de los resultados obtenidos en este trabajo se basa en la descripción bibliográfica existente de la enzima lacasa; la cual es una enzima oxidorreductasa que produce agua mediante reducción de oxígeno, esto gracias a que presenta 4 átomos de cobre, que están clasificados en tres tipos (1, 2 y 3) con diferentes propiedades. De los cuales el cobre tipo 1 (T1), es el responsable de la oxidación de sustratos. Los cobres T2 y T3 forman un cluster trinuclear (TNC) que es el lugar donde se reduce el oxígeno (**Thurston, 1994; Gochev y Krastanov, 2007**). El mecanismo de este proceso se da, en el cobre T1 al ser el primer aceptor de electrones de los sustratos. Después los electrones se transfieren secuencialmente al centro T2-T3 que al recibir cuatro electrones reducen una molécula de oxígeno a agua (**Solomon *et al.*, 2008; Götze y Bühl, 2016**) (**Figura 34**). Por lo que esta enzima presenta una amplia especificidad de sustratos ya que cataliza la oxidación de difenoles, aminofenoles, ácidos metoxifenólicos, iones orgánicos, diaminas, aril aminas, aminas aromáticas, dímeros de lignina fenólicos e incluso no fenólicos (**Madhavi y Lele, 2009; Stoilova *et al.*, 2010**).

En algunos de los estudios que han presentado inhibición sobre la lacasa, sugieren que los compuestos inhibidores son moléculas pequeñas que son capaces de unirse a los iones de Cu del TNC, interrumpiendo así el proceso interno de transferencia de electrones. Los inhibidores que han presentado esta actividad son: azida sódica (**Johannes y Majcherczyk, 2000**) haluros pequeños, metales pesados y EDTA (**Xu, 1996**).

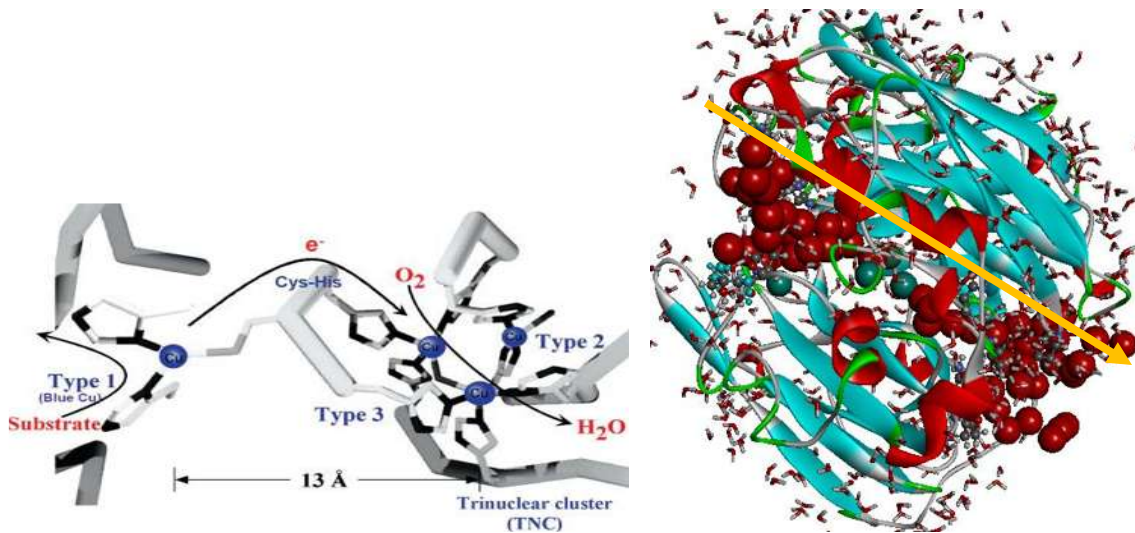


Figura 34. Mecanismo de óxido-reducción de la lacasa (Der) y flujo de agua (flecha amarilla) del Cu-T1 al TNC y su salida (Izq) representado en bolas rojas.

Sin embargo, los compuestos orgánicos voluminosos, tales como la medicarpina (**Martínez, 2015**), también han demostrado inhibir la actividad de la lacasa. En el trabajo de Martínez se sugiere que el efecto inhibitor, se debe al bloqueo de la entrada del sustrato (oxígeno) hacia el TNC por la medicarpina, siendo este lugar donde se llevó a cabo el mejor acoplamiento (menor energía de unión) de este estudio de simulación (**Figura 35**).

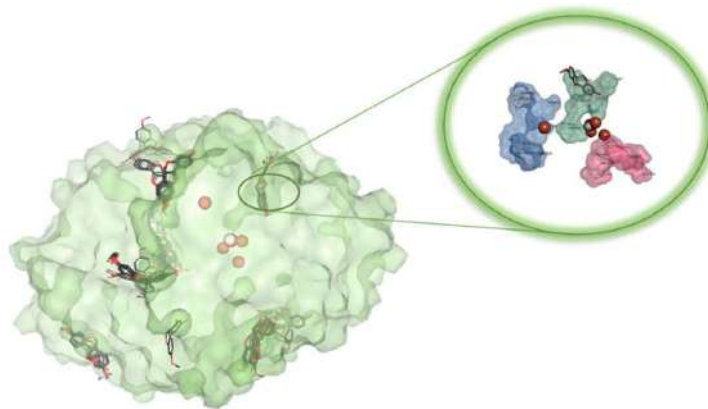


Figura 35. Efecto inhibitor de la medicarpina bloqueo de unión de sustrato.

El análisis de resultados que a continuación se realiza es en base a lo descrito en la bibliografía, lo cual señala que el bloqueo del sitio de unión del sustrato, es el que lleva a cabo la inhibición de la enzima lacasa, por lo tanto los resultados obtenidos en este trabajo se basan en la descripción de la interacción de cada compuesto en este sitio de unión. Los resultados de las simulaciones se muestran en la **Tabla 11**, los cuales describen la unión de la enzima lacasa con cada uno de los compuestos antes mencionados, la energía de unión (binding), la energía intermolecular (intermol), la energía de Van der Waals (vdw) y los aminoácidos específicos que interaccionan con cada derivado en el sitio de unión, proporcionados por el software Autodock.

Tabla 11. Interacción de los derivados de medicarpina con la lacasa, en el sitio de unión del sustrato.

Complejo	Binding kcal/mol	Intermol	vdw	Docking Flexible Vina kcal/mol	Interacción de AA en el sitio de unión de sustrato
Medicarpina	-8.31	-8.9	-8.66	-11.032	ALA80, HIS111, SER113, ASN336, PRO346, LEU459, GLU460
Benzoato	-8.34	-9.53	-9.42	-9.2	PHE81, SER113, PRO346, PHE450, LEU459, GLN499, GLU460,ALA80, TYR491
Butirato	-6.83	-8.32	-8.11	-8.3	PRO346, GLU460, PHE81, LEU459, HIS11, PHE344, PHE450
Acetilado	-6.63	-7.52	-7.74	-7.9	ALA80, SER110, SER113, ARG157, PRO346, ASP456, LEU459, GLU460
<i>p</i> -MeO	-8.18	-9.67	-9.64	-9.0	ALA80, PHE81, HIS111, PRO346, LEU459, GLU460
<i>p</i> -NO ₂	-7.94	-9.43	-9.23	-9.2	ALA80, HIS111, PHE344, THR345, PRO346, LEU459, GLU460
Bencil éter	-8.25	-9.45	-9.46	-9.0	ALA80, PRO346, PRO347, PHE450, LEU459, GLU460
Metil éter	-6.40	-7.0	-7.26	-7.8	ALA80, HIS111, SER113, PRO346, ASP456, LEU459
Dietilcarbamato	-7.29	-8.78	-8.81	-8.2	HIS111, SER113, PHE344, PRO346, PHE450, LEU459, GLU460, VAL82
2-Etilbutirato	-7.51	-9.3	-9.2	-8.8	PHE81, HIS111, PHE344, PRO346, PHE450, LEU459, GLU460
Etil éter	-7.15	-8.05	-8.06	-7.9	HIS109, HIS111, SER113, TYR116, PRO346, ASP456, LEU459, GLU460, ALA80
Isobutirato	-7.43	-8.62	-8.54	-8.3	HIS111, LEU112, PHE344, PRO346, THR348, PHE450, LEU459, PHE81
Flavanonol	-7.76	-8.95	-8.82	-9.0	GLU460, PRO346, ALA80, HIS11, LEU459, PHE344, GLY462
Chalcona	-7.70	-10.09	-9.58	-7.9	LEU549, GLY462, PRO346, GLU460, HIS111, SER113, LEU112
Naringenina	-7.62	-8.82	-8.48	-8.7	ARG157, PRO346, LEU459, ALA80, HIS111, SER113, GLU460

En el sitio de unión del sustrato, el que obtiene un mayor número de confórmeros en este sitio es la medicarpina el cual presenta un aproximado de 180 confórmeros, lo cual representa un 20% de los confórmeros del análisis, recordando que para este análisis se realizó con un total de 800 confórmeros. Los derivados de la medicarpina llegan a presentar una gran variación en el número de confórmeros que se unen en este sitio, como son; acetilado 30 confórmeros, metil éter 25 confórmeros, etilbutirato 60 confórmeros, dietilbutirato 140 confórmeros, butirato 65 confórmeros, isobutirato 190 confórmeros, dietilcarbamato 110 confórmeros, *p*-metoxibenzoato 20 confórmeros, *p*-nitrobenzoato 30 confórmeros, benzoato 30 confórmeros, bencil éter 85 confórmeros, chalcona 65 confórmeros, flavanonol 130 confórmeros y naringenina 160 confórmeros, en general se considera un número bajo de confórmeros que se anclan en este sitio, y que no nos proporciona datos de relevancia para fundamentar la diferencia de la inhibición de observada en las pruebas de inhibición sobre *T. versicolor*.

Para este estudio de simulación, la energía de unión es uno de los resultados más interesantes, ya que nos proporciona información de la estabilidad de unión entre el ligando y la enzima en este sitio, lo cual se referiría a una menor energía. Sin embargo, como se muestra en la **Tabla 11** los valores no proporcionan este tipo de información contundente o que se esperaría conforme a la inhibición presentada por cada derivado en los estudios de inhibición sobre *T. versicolor*, esto se demuestra al presentar menores energías de unión por todos los derivados de medicarpina y los compuestos aislados, sobre el derivado acetilado siendo este el menos estable en el sitio de estudio, pero el cual presento los mejores resultados en las pruebas de inhibición sobre *T. versicolor*. Además se puede observar menores energías entre los derivados de medicarpina más voluminosos (aromáticos), sin embargo el derivado bencil éter en las pruebas de inhibición no presenta actividad, y los números de confórmeros de aromáticos son los más bajos para el sitio de unión.

Con la finalidad de mejorar la energía de unión, se realizó un análisis Docking Flexible, el cual es un análisis que permite al ligando sea más flexible (móvil) en el sitio de unión, lo cual mejora las interacciones y por consiguiente las energías de unión, con este análisis se esperaba una mejor correlación de la energía de unión (menor energía) con respecto a los derivados con mayor actividad inhibitoria, sin embargo los resultados continúan con el patrón descrito de los resultados obtenidos inicialmente (**Tabla 11**).

Otro estudio de simulación que se realizó para llevar a cabo un comparativo energético, fue mediante dinámica molecular empleando el programa LAMMPS, con un campo de fuerza reactivo (ReaxFF), este potencial empírico emplea química cuántica y permite calcular interacciones interatómicas en sistemas complejos, el cual es dependiente de la

formación y/o ruptura de las interacciones en un sistema, con lo cual se puede calcular la energía del sistema en función de las posiciones atómicas e interacciones. Lo anterior, se realizó empleando la forma más sencilla de dinámica molecular, que es la colectividad microcanónica (NVE), la cual es física estadística empleada en el estudio de sistemas macroscópicos aislados en equilibrio, con un volumen determinado, en los que la energía permanece constante, al no existir intercambio con el medio exterior, lo cual genera un conjunto de microestados y una energía potencial mediante las atracciones y repulsiones entre los átomos o moléculas, debido al tipo de enlace, las interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, entre otro.

El análisis mediante ReaxFF, implicó el cálculo de cada una de las energías del sistema enzima-ligando, las cuales fueron; la enzima lacasa (proteína), cada uno de los compuestos y derivados obtenidos (ligando), y el complejo enzima-ligando, recordando que cada sistema fue obtenido del análisis docking realizado en el software Autodock. La diferencia energética de cada sistema se obtuvo con la siguiente ecuación, la cual nos dice que al restarle la energía del complejo, la suma de la energía de la proteína y de la energía del ligando por separado, da como resultado la energía interatómica o energía de unión del complejo enzima-ligando (**Tabla 12**).

$$E_{int} = E_{complex} - (E_{protein} + E_{lig})$$

Los resultados obtenidos con ReaxFF, mostraron menores energías de unión en todos los complejos. Sin embargo, se muestra una mayor variabilidad energética en estos resultados, esto debido a que las energías obtenidas por los derivados y compuestos van de los -8 a los -90 kcal/mol. La enorme variabilidad energética de estos resultados nuevamente no ayuda a dar una explicación de la actividad inhibitoria que presenta cada compuesto, además de que no se observa entre compuesto similares algún tipo de similitud de energía, haciendo referencia a los derivados aromáticos o alifáticos, ni los derivados de tipo flavonoide como son el flavanonol, la chalcona y la naringenina. Tampoco se observa una similitud entre los compuestos que presentaron la mejor actividad que son la medicarpina (-62.4) y el derivado acetilado (-28.5), en cambio se observa una diferencia muy grande de energía (**Tabla 12**).

Tabla 12. Análisis de energía mediante dinámica molecular, empleando ReaxFF y NVE en kcal/mol.

	Proteína	Ligando	Complejo	Protein+Lig	E_{int}
Medicarpina	-729841.31	-3898.5438	-733802.29	-733739.85	-62.436
Benzoato		-5398.7398	-735291.51	-735240.05	-51.460
<i>p</i>-MeO		-5793.8071	-735664.2	-735635.12	-29.083
<i>p</i>-NO₂		-5552.0493	-735401.83	-735393.36	-8.471
Bencil éter		-5435.5185	-735309.15	-735276.83	-32.321
Butirato		-5030.6032	-734962.01	-734871.91	-90.097
Acetilado		-4457.5203	-734327.37	-734298.83	-28.540
Metil éter		-4193.0094	-734098.75	-734034.32	-64.431
Dietilcarbam		-5535.6405	-735431.84	-735376.95	-54.889
2-Etilbutirato		-5590.7168	-735511.77	-735432.03	-79.743
Etil éter		-4475.103	-734377.09	-734316.41	-60.677
Isobutirato		-5030.4629	-734900.42	-734871.77	-28.647
Flavanonol		-3780.1611	-733643.9	-733621.47	-22.429
Chalcona		-3888.1085	-733741.82	-733729.42	-12.401
Naringenina		-3769.5023	-733639.41	-733610.81	-28.598

Debido a que ni las energías por los diferentes métodos empleados, ni el número de conformeros en el sitio de unión pudieron dar una explicación del porqué de las diferencias de la actividad de inhibición de los derivados y los compuestos aislados, así como tampoco se observó una similitud o lógica en los resultados entre los derivados de estructura similares, o los compuestos aislados, por esto se optó por una revisión más específica, la cual es la interacción de los aminoácidos con cada derivado respecto al sitio de unión. Como se puede observar en la **Tabla 11**, no existió una gran variación con el

número de aminoácidos que interactúan con cada derivado, esta variación va de los seis a los nueve aminoácidos. Sin embargo, las interacciones con aminoácidos similares entre derivados confirman que es el mismo sitio de unión en el que se lleva a cabo el anclaje.

Para este análisis se empleó el software BIOVIA - Discovery Studio Visualizer, el cual proporciona información de una gran variedad de interacciones, distancias y tipos de enlace que presenta cada aminoácido respecto al ligando.

En análisis realizado con la medicarpina mostro dos puentes de hidrogeno entre los aminoácidos ALA80 y HIS111 con el hidroxilo de la molécula, además de presentar interacciones no covalentes entre los anillos aromáticos con los aminoácidos SER113 y GLU460, interacciones covalentes con los aminoácidos PHE344 y ASN336 con los hidrógenos del grupo metilo e interacción consideradas débiles con los aminoácidos PRO346 y LEU459 (**Figura 36**).

El análisis con el derivado acetilado, también presenta dos puentes de hidrogeno entre los aminoácidos ARG157 y SER113 con el oxígeno del acetilo, además de interacciones covalentes con los aminoácidos ASP456, SER110 y ALA80 con hidrógenos de la molécula y la interacción covalente de GLU460 con el oxígeno del furano, e interacciones débiles con LEU459 y PRO346 con los anillos aromáticos (**Figura 37**).

Recordando que la medicarpina y el derivado acetilado presentaron las mejores actividades sobre *T. versicolor*, y los resultados en común que presentan en este análisis son las interacciones por puentes de hidrogeno de los aminoácidos, esto sucede de igual manera en análisis con los compuestos chalcona y naringenina, estos dos compuestos también presentaron actividad inhibitoria sobre del hongo. La chalcona presenta cuatro puentes de hidrogeno con los aminoácidos LEU459, SER113, HIS 11 y GLU460, además de interacciones no covalentes con los aminoácidos PRO346 y LEU112 (**Apéndice E1**). Y la naringenina presenta tres puentes de hidrogeno con los aminoácidos HIS11, ARG157 y GLU460, así como también interacciones no covalentes con los aminoácidos LEU459, PRO346 y SER 113 (**Apéndice E2**).

Tomando en cuenta lo antes mencionado, los puentes de hidrogeno son el común denominador entre los compuestos que presentaron actividad, lo cual queda demostrado con los resultados mostrados por los demás derivados de medicarpina los cuales no presentan este tipo de interacciones a excepción del derivado benzoato que presenta solo un puente de hidrogeno, sin embargo la actividad del derivado benzoato esta reportada en un 75% a una concentración de 200 mg/ml (concentración que requiere la chalcona y el naringenin para inhibir el 100%). Esto sugiere que la actividad está dada por los puentes

de hidrogeno generados entre el ligando y el sitio de unión, lo que podría conllevar un mejor anclaje en el sitio o que estas uniones impidieran la movilidad del ligando del sitio de unión, por lo tanto no permitirían la unión del sustrato (oxígeno) con el TNC, impidiendo así el mecanismo de degradación de la enzima y por consecuencia su inhibición.

Como se mencionó el derivado benzoato de medicarpina presenta un puente de hidrogeno con SER113, así como interacciones covalentes con PHE450 y PHE81 con los anillos aromáticos e interacciones no covalentes con los aminoácidos ALA80, LEU459, PRO346, GLU460, GLN499 y TYR491 (**Figura 38**).

En cambio el derivado bencil éter de medicarpina, no presenta puentes de hidrógenos, y solo presenta una interacción covalente con la PHE450 con el anillo aromático del bencilo, y las demás interacciones son no covalentes (débiles) con los aminoácidos LEU459, GLU460, PRO347, PRO346 y ALA80 (**Figura 39**).

El derivado *p*-nitrobenzoato, solo presentó una interacción covalente entre THR345 y el oxígeno del pirano, e interacciones no covalentes con los aminoácidos PRO346, GLU460, HIS111, ALA80, LEU459 y PHE344 (**Apéndice E11**). También el derivado *p*-metoxibenzoato, solo presenta una interacción covalente entre PHE81 y un anillo aromáticos y las de más interacciones no covalentes (**Apéndice E10**).

Los derivados metil éter, etil éter, isobutirato y dietilcarbamato, solo presentan interacciones no covalentes, en el caso de metil con seis aminoácidos (**Apéndice E8**), el etil con nueve aminoácidos (**Apéndice E9**), isobutirato con ocho aminoácidos (**Apéndice E6**) y el dietilcarbamato con siete aminoácidos (**Apéndice E7**).

En el caso del butirato, se observaron seis interacciones de Van der Waals (consideradas interacciones débiles) con los aminoácidos THR345, LEU112, HIS111, SER113, PHE344 y ARG157, además de la interacciones no covalentes con PRO346, ALA80 y GLU460 (**Apéndice E4**). El derivado 2-etilbutirato presento solo un enlace covalente entre GLU460 y un anillo aromático y seis interacciones no covalentes (**Apéndice E5**).

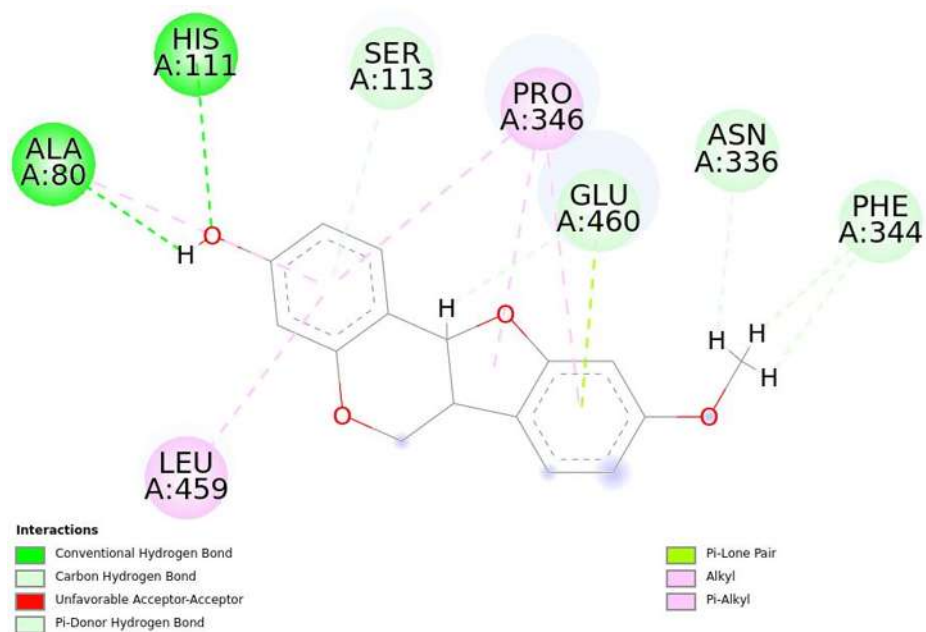


Figura 36. Interracciones de la medicarpina obtenidas con Discovery Studio

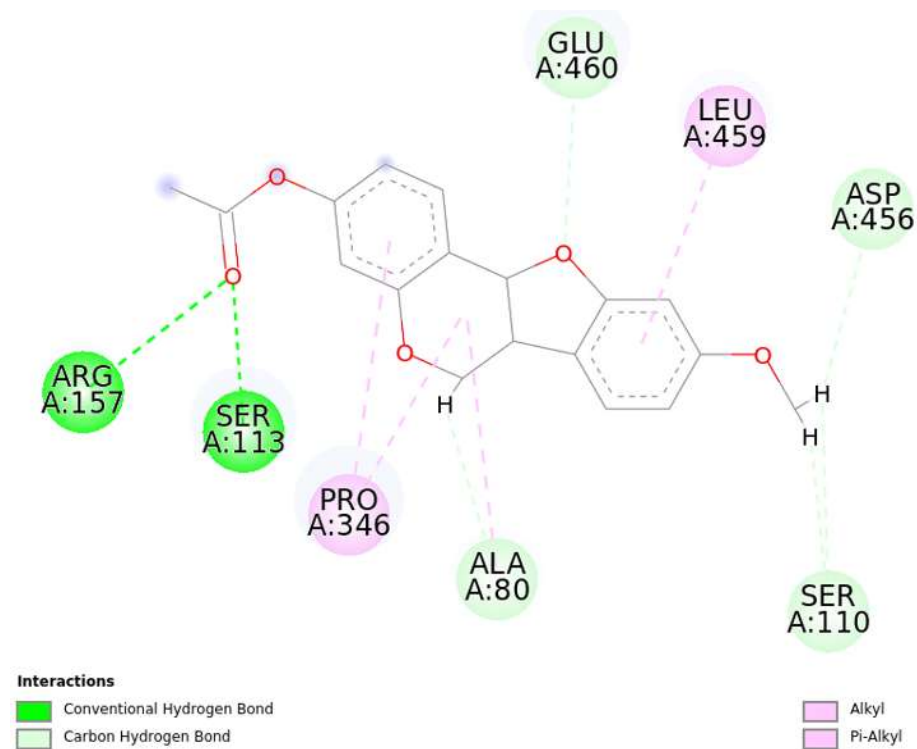


Figura 37. Interracciones del derivado acetilado de medicarpina obtenidas con Discovery Studio.

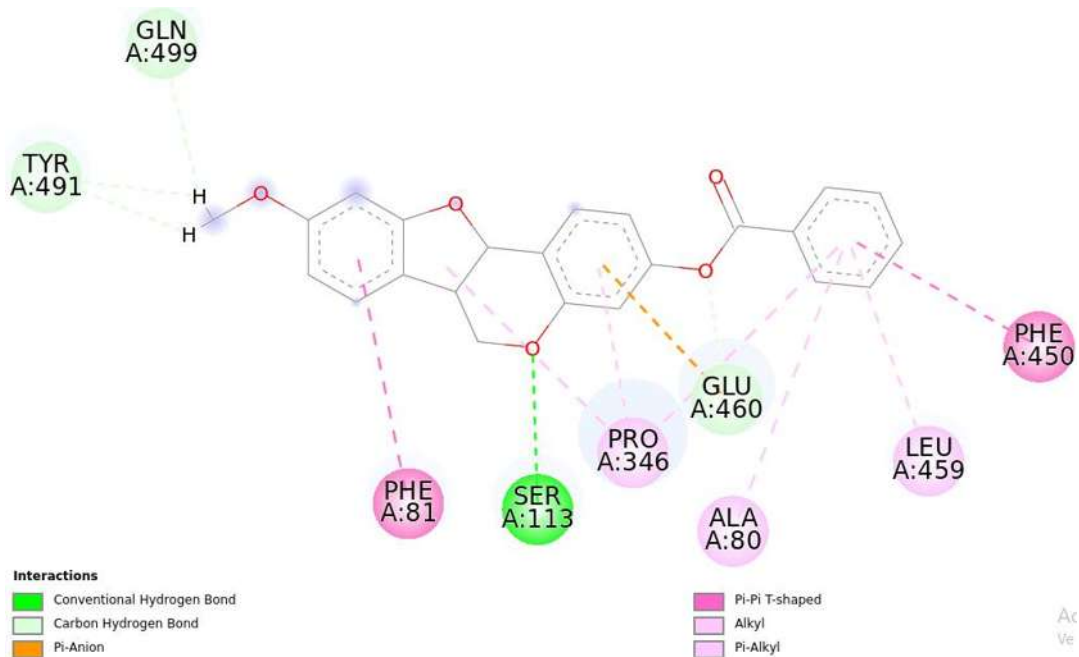


Figura 38. Interracciones del derivado benzoato de medicarpina obtenidas con Discovery Studio

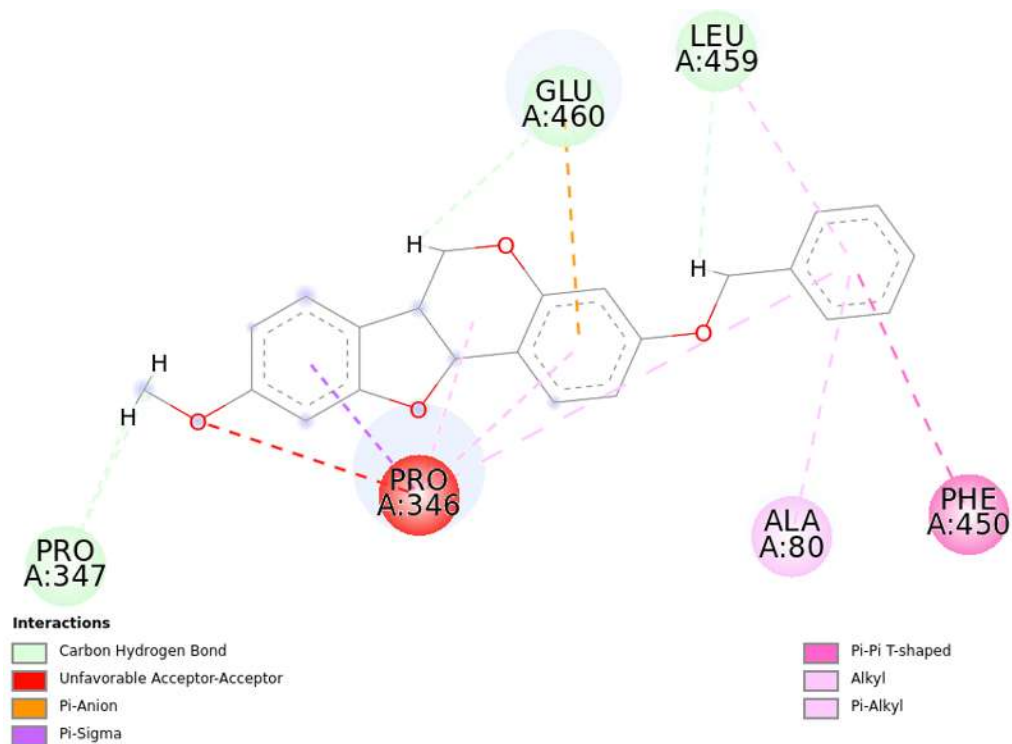


Figura 39. Interracciones del derivado bencil éter de medicarpina obtenidas con Discovery Studio

7. CONCLUSIONES

De los extractos de los tres arboles de estudio, mediante el análisis de RMN y las pruebas de inhibición se descartaron los extractos de hexano al no presentar compuestos de interés, en los extractos de THF y AcOEt se observaron semejanzas en sus señales (compuestos) de RMN. Con las pruebas antioxidantes estas semejanzas entre extractos fueron más notorias al observarse similares resultados, por esta razón y al obtenerse en mayor proporción, solo se emplearon los extractos de THF para las pruebas de genoprotección e hipoglucemiante. También cabe mencionar que solo estos extractos se emplearon para llevar a cabo columnas cromatográficas.

En la pruebas de inhibición los extractos de duramen de THF y AcOEt de *M. aculeaticarpa*, obtuvieron buenos porcentos de inhibición y los de corteza presentaron porcentos de inhibición bajos, mientras que los extractos de *C. engleriana* duramen obtuvieron porcentos de inhibición altos y los de corteza solo un 40% de esta inhibición, en cambio para *C. vitifolium* THF tanto para duramen como para corteza obtuvieron buenos porcentos de inhibición, y los demás extractos presentaron poca actividad. En general los extractos de hexano presentaron poca actividad inhibitoria, y como se ha mencionado fueron descartados para las pruebas antioxidantes.

Para la actividad antioxidante, los extractos de *C. engleriana* y *C. vitifolium* obtuvieron resultados considerados de buenos a regulares al inhibir al radical DPPH, a concentraciones de 6.25 y 3.15 mg/ml. Sin embargo, los extractos de *M. aculeaticarpa* presentaron bajo poder de reducción, esto al reducir al radical a una concentración de 50 mg/ml, y el único que presento buen porcentaje de reducción fue el extracto de AcOEt de corteza (6.25 mg/ml).

Mediante las pruebas de genoprotección se comprobó que los extractos de *C. engleriana* no son genotóxicos a pesar de considerarse el árbol como toxico, y el extracto de corteza presento actividad de genoprotección a dosis bajas. Además, se comprobó que los extractos de *M. aculeaticarpa* y *C. vitifolium* tanto de duramen como de corteza presentaron una actividad de genoprotección a concentraciones altas y bajas.

Para la actividad hipoglucemiante, los extractos de *M. aculeaticarpa* duramen y *C. vitifolium* duramen presentaron una disminución por debajo de los niveles normales de glucosa, lo que sugiere que a dosis elevadas y por largos periodos de administración estos extractos puede causar hipoglucemia en un grado mortal para el modelo murino usado en este trabajo. En cambio, los extractos de *C. engleriana* de duramen y corteza, y *M. aculeaticarpa* corteza no presentaron actividad hipoglucemiante sin embargo se observó

que mantienen los niveles de glucosa (sin aumento o disminución). Y el extracto de *C. vitifolium* corteza no presentó actividad alguna para estas pruebas.

De someter a purificación en columna cromatográfica los extractos de THF de las 3 maderas, se aisló de *C. vitifolium* tanto de corteza como de duramen, un compuesto denominado naringenina el cual presentó actividad inhibitoria sobre *T. versicolor* (200mg/ml) y del cual existe una gran variedad de actividades biológicas comprobadas, entre ellas la de ser un buen antioxidante. Del extracto de *C. engleriana* duramen, se aisló un flavanonol sin actividad inhibitoria sobre *T. versicolor* y con una baja actividad antioxidante, además, de este compuesto se generó un derivado triacetilado. De la corteza de *C. engleriana* se aisló una chalcona la cual presentó actividad inhibitoria sobre *T. versicolor* (200mg/ml) y presentó una actividad antioxidante considerada como regular. Y de los extractos de *M. aculeaticarpa* no se logró el aislamiento de ningún compuesto.

Por otra parte, se logró la formación de 7 derivados de medicarpina, 4 ésteres alifáticos y 3 éteres (2 alifáticos, 1 aromático), los cuales fueron empleados para llevar a cabo pruebas de inhibición sobre *Trametes versicolor*, mostrando una disminución de esta actividad con respecto a la medicarpina sin modificar, y en el caso de los éteres esta actividad desapareció.

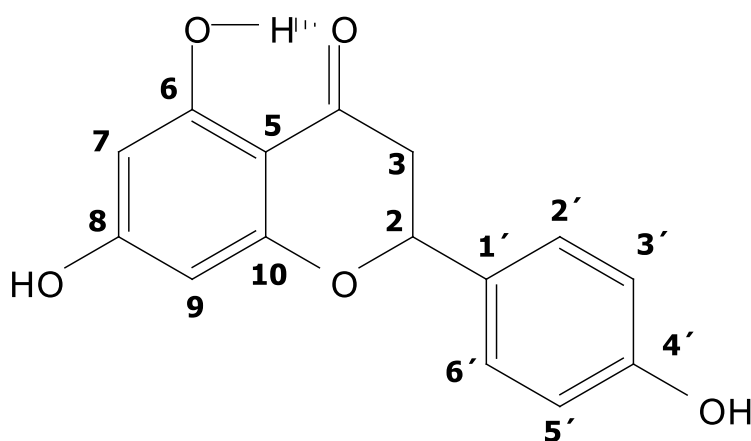
Con la finalidad de explicar los resultados obtenidos de la actividad inhibitoria sobre *T. versicolor* tanto de los compuestos aislados como de los derivados de medicarpina formados en este trabajo (7 derivados) como los realizados en nuestro grupo de trabajo (derivados PMT, PNT, benzoato y acetilado). Se realizó un estudio de simulación enzimática, generando inicialmente las estructuras mediante un análisis conformacional, para continuar con el estudio de simulación (docking) empleando el programa AutoDock.

Con los estudios de simulación de los compuestos obtenidos en este trabajo y lo reportado para la inhibición de la enzima lacasa, se planteó, que esta actividad es atribuida principalmente al bloqueo de la entrada del sustrato (oxígeno) al TNC, lo cual generaría la interrupción del mecanismo de reducción, mecanismo por el cual se lleva a cabo la degradación de los compuestos y por el que se genera nutrientes para la enzima, y por consiguiente se llevaría a cabo la inhibición del hongo *T. versicolor*.

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1. *Cochlospermum vitifolium*: Naringenina o 5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-croman-4-ona

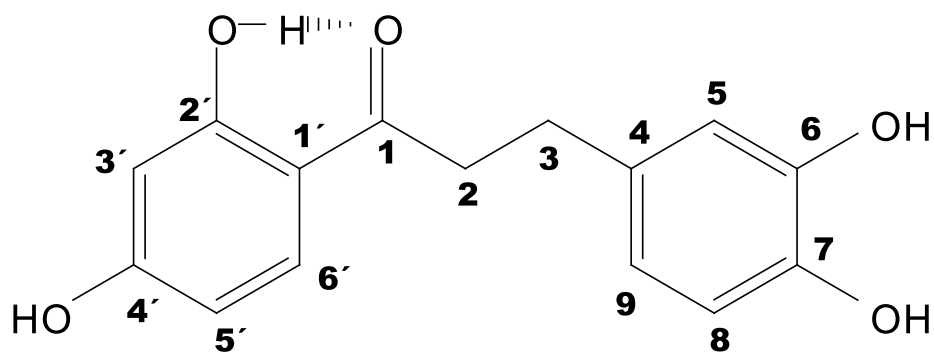
14 gr de harina de duramen y de corteza fueron colocados en un dedal para llevar a reflujo con 250 ml de THF, en un equipo Soxhlet por 4 horas para obtener los extractos crudos. Cada uno de los extractos obtenidos se sometió a purificación e columna cromatográfica utilizando gel de sílice (malla 70-230) como fase estacionaria y mezclas de Hex: AcOEt (8:2) como eluyente, con lo cual se obtuvo una miel de color blanco, la cual fue identificada como naringenin; $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, COCD_3) δ 12.18 (s, OH-H), 7.39 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-3',H-5'), 6.89 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-2',H-6'), 5.94 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H, H-7,H-9), 5.45 (dd, $J = 12.9, 2.8$ Hz, 1H, H-2), 3.18 (dd, $J = 17.1, 12.9$ Hz, 1HH-3 β), 2.72 (dd, $J = 17.1, 3.0$ Hz, 1H, H-3 α). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 197.24 (C=O), 167.25 (C-8), 165.25 (C-6), 164.34 (C-10), 158.66 (C-4'), 130.74 (C-1'), 129.00 (C-3', C-5'), 116.7 (C-2', C-6'), 103.17 (C-5), 96.73 (C-7), 95.76 (C-9), 79.90 (C-2), 43.46 (C-3). Rf: 0.32 (Hex: AcOEt, 6:4).



Naringenina

8.2. *Comocladia engleriana* (corteza): Chalcona o 1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(3,4-dihidroxifenil)-1-propanona

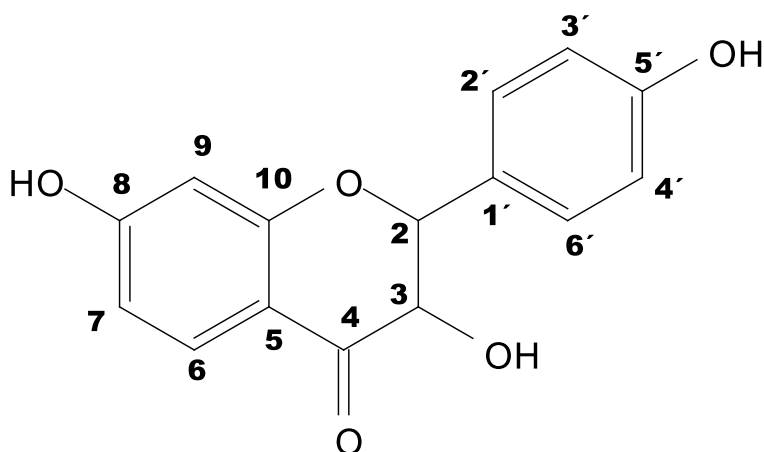
20 gr de harina de corteza fueron colocados en un dedal para llevar a reflujo con 250 ml de THF, en un equipo Soxhlet por 4 horas para obtener el extracto crudo. Este extracto obtenido, se sometió a purificación en columna cromatográfica utilizando gel de sílice (malla 70-230) como fase estacionaria y mezclas de Hex: AcOEt (6:4) como eluente, con lo cual se obtuvo un polvo de color amarillo, con el cual se identificó el compuesto siendo este una chalcona; $^1\text{H RMN (400 MHz, COCD}_3)$ δ 12.81 (s, HO-H), 7.82 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-6'), 6.75 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-5), 6.71 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-8), 6.59 (dd, $J = 8.0, 2.1$ Hz, 1H, H-9), 6.41 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H, H-5'), 6.31 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-3'), 3.22 (t, $J = 9.8$ Hz, 2H, H-2), 2.85 (t, $J = 9.5$ Hz, 2H, H-3). $^{13}\text{C RMN (101 MHz, CDCl}_3)$ δ 205.0 (C=O), 166.2 (C-4'), 165.4 (C-2'), 145.7 (C-6), 144.0 (C-7), 133.6 (C-4), 133.6 (C-6'), 120.3 (C-9), 116.3 (C-5), 115.9 (C-8), 113.8 (C-1), 108.6 (C-5'), 103.5 (C-3'), 40.3 (C-2), 29.8 (C-3). **Rf:** 0.4 (Hex: AcOEt, 6:4).



Chalcona

8.3. *Comocladia engleriana* (duramen): Flavanonol o 3,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-croman-4-ona

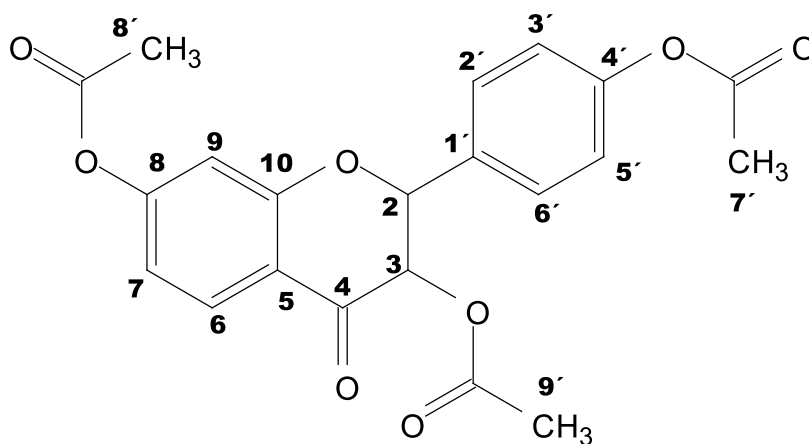
20 gr de harina de duramen fueron colocados en un dedal para llevar a reflujo con 250 ml de THF, en un equipo Soxhlet por 4 horas para obtener el extracto crudo. Este extracto obtenido, se sometió a purificación en columna cromatográfica utilizando gel de sílice (malla 70-230) como fase estacionaria y mezclas de Hex: AcOEt (85:15) como eluente, con lo cual se obtuvo un sólido amorfo de color blanco con un punto de fusión de 147-149 C, el cual se identificó como un compuesto de tipo flavanonol; $^1\text{H RMN (400 MHz, COCD}_3)$ δ 7.72 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-6), 7.43 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.89 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.62 (dd, $J = 8.7, 2.2$ Hz, 1H, H-7), 6.39 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-9), 5.05 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, H-3), 4.57 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, H-2). $^{13}\text{C RMN (101 MHz, CDCl}_3)$ δ 193.1 (C-4), 165.6 (C-8), 164.4 (C-10), 158.7 (C-4'), 130.2 (C-2', C-6'), 129.7 (C-6), 129.3 (C-1'), 115.7 (C-3', C-5'), 113.0 (C-5), 111.6 (C-7), 103.5 (C-9), 84.7 (C-2), 73.8 (C-3). Rf: 0.35 (Hex: AcOEt, 7:3).



Flavanonol

8.3.1. Derivado triacetilado del flavanonol

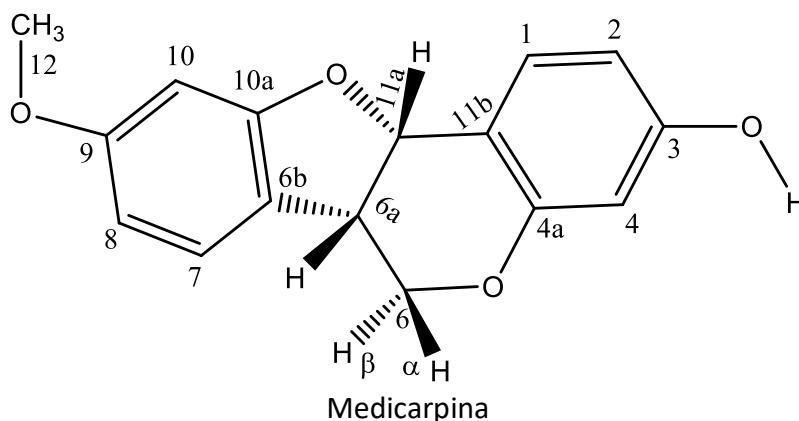
30 mg del flavanonol se sometieron a reaccionar con 0.4 ml de anhídrido acético y 0.4 ml de piridina como base, a temperatura ambiente por 24 horas. Al término de reacción, se realizaron lavados con acetato de etilo, una solución de HCl (10%), una solución de NaHCO₃ (Saturado) y una solución de NaCl (Saturado), para posteriormente evaporar el disolvente y obtener el crudo de reacción. El crudo de la reacción fue purificado mediante cromatografía en columna empleando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil Hex: AcOEt (9:1), obtenido un sólido de color blanco con un punto de fusión de 110-111°C, correspondiente al triacetilado del flavanonol; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.95 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H-6), 7.51 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.17 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.87 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H, H-7), 6.83 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H-9), 5.78 (d, J = 12.3 Hz, 1H, H-3), 5.46 (d, J = 12.3 Hz, 1H, H-2), 2.32 (s, Me-8', Me-7'), 2.04 (s, Me-9'). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 187.21 (C-4), 169.13 (C=O 7', 8'), 168.41 (C=O 9'), 161.70 (C-10), 156.92 (C-8), 151.39 (C-4'), 132.65 (C-1'), 128.98 (C-6), 128.59 (C-2', C-6'), 121.89 (C-3', C-5'), 117.47 (C-5), 116.49 (C-7), 111.08 (C-9), 81.36 (C-2), 73.61 (C-3), 21.13 (Me-8', Me-7'), 20.34 (Me-9'). Rf: 0.4 (Hex: AcOEt, 8:2).



Triacetilado del Flavanonol

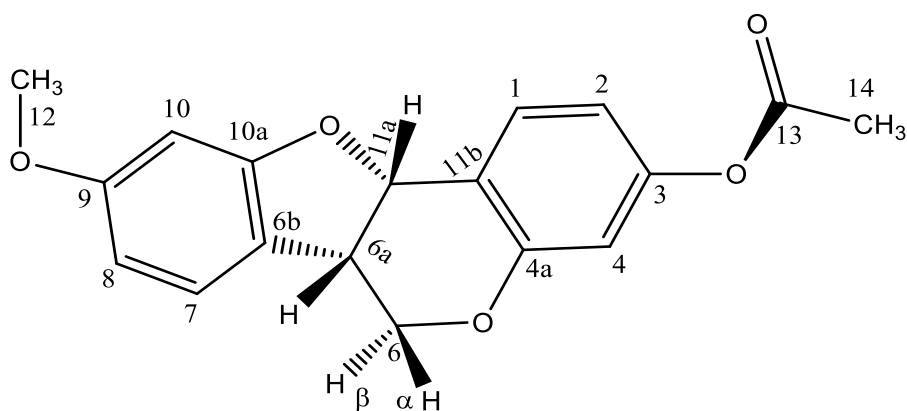
8.4. *Andira inermis* (Duramen): Medicarpina o 3-hidroxi-9-metoxipterocarpan

16 g de harina de duramen de *Andira inermis* fueron colocados en un dedal para llevar a reflujo con 200 ml de hexano y posteriormente con acetato de etilo, en un equipo Soxhlet por 4 horas para obtener los extractos crudos. El extracto de acetato de etilo se sometió a purificación en columna cromatográfica utilizando gel de sílice (malla 70-230 ASTM) como fase estacionaria, y mezclas de hexano: acetato de etilo (9:1) como eluyente, con lo cual se obtuvo 65 mg de cristales amorfos de un color amarillo-blanquecino con un punto de fusión de 117-118 °C, posteriormente identificados como medicarpina; $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 3.52 (ddd, $J = 10.2, 7.5, 4.1$ Hz, 1H, H-6a), 3.62 (t, $J = 10.9$ Hz, 1H, H-6 α), 3.77 (s, 3H, OMe), 4.24 (dd, $J = 10.9, 5.0$ Hz, 1H, H-6 β), 5.07 (s, 1H, OH), 5.50 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, H-11a), 6.41 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-4), 6.45 (s, 1H, H-10), 6.46 (dd, $J = 5.8, 2.1$ Hz, 1H, H-8), 6.55 (dd, $J = 8.4, 2.5$ Hz, 1H, H-2), 7.13 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-7), 7.39 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-1). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 39.4 (C-6a), 55.4 (MeO), 66.5 (C-6), 78.5 (C-11a), 96.8 (C-10), 103.6 (C-4), 106.3 (C-8), 109.7 (C-2), 112.6 (C-11b), 119.0 (C-6b), 124.7 (C-7), 132.1 (C-1), 156.6 (C-10a), 156.9 (C-9), 160.6 (C-4a), 161.0 (C-3). $\text{C} [\alpha]^{20}_{\text{D}} = +216.86$ ($\text{C} = 0.064, \text{CH}_2\text{Cl}_2$), Rf : 0.32 (Hex: AcOEt, 8:2), $\text{IR } U_{\text{max}} 3393 \text{ cm}^{-1}$ (O-H Amplio y fuerte), 3063 a 3012 (C-H del Aromático), 2958 a 2881 (C-H del Metilo), 1620, 1495 y 1472 (C=C estiramiento Aromático), EM (20 ev): m/z (int. Rel.): $[\text{M}^+]$ 270.0, 106 (3), 148 (20), 253 (30), calculado para 270 m/z ($\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$).



8.4.1. Derivado acetilado de medicarpina

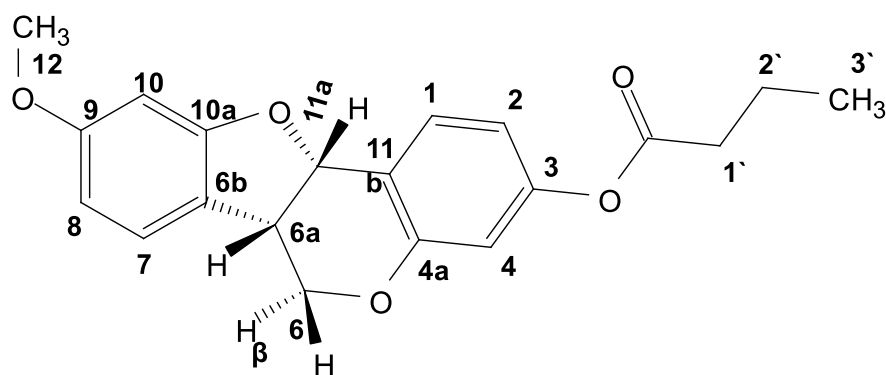
30 mg de medicarpina se sometieron a reaccionar con 0.4 ml de anhídrido acético y 0.4 ml de piridina como base, a temperatura ambiente por 24 horas. Al término de reacción, se realizaron lavados con acetato de etilo, una solución de HCl (10%), una solución de NaHCO₃ (Saturado) y una solución de NaCl (Saturado), para posteriormente evaporar el disolvente y obtener el crudo de reacción. El crudo de la reacción fue purificado mediante cromatografía en columna empleando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil Hex: AcOEt (9:1), obteniendo cristales blancos en forma de agujas con un punto de fusión de 105-106°C correspondientes al éster de medicarpina. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 2.30 (s, 3H, OAc), 3.56 (ddd, *J* = 10.2, 7.2, 3.8 Hz, 1H, H-6a), 3.63 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H, H-6β), 3.77 (s, 3H, OMe), 4.27 (dd, *J* = 10.7, 4.8 Hz, 1H, H-6α), 5.52 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-11a), 6.45 (s, 1H, H10), 6.47 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-8), 6.71 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-4), 6.80 (dd, *J* = 8.4, 2.3 Hz, 1H, H-2), 7.13 (dd, *J* = 8.6, 0.7 Hz, 1H, H-7), 7.54 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-1). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 21.0 (Me), 39.4 (C-6a), 55.4 (MeO), 66.5 (C-6), 78.0 (C-11a), 96.8 (C-10), 106.5 (C-8), 110.7 (C-4), 115.2 (C-2), 117.7 (C-11b), 118.7 (C-6b) 124.7 (C-7), 131.7 (C-1), 151.5 (C-10a), 156.1 (C-9), 160.5 (C-4a), 161.1 (C-3), 169.1 (C=O), C. [α]²⁰_D = +310.84 (c=0.048, CH₂Cl₂), Rf: 0.39 (Hexano: Acetato de etilo, 8:2), IR $\bar{\nu}_{max}$ 3070 cm⁻¹ (C-H del Aromático), 2969 a 2856 cm⁻¹ (C-H del Metilo tanto del acilo como del metoxi), 1743 cm⁻¹ (C=O del Acetilo), 1617, 1492 y 1429 cm⁻¹ (C=C estiramiento Aromático), 1194 cm⁻¹ (O=C-O del Acetilo), EM (20 eV) *m/z*; [M⁺] de 312.1, 43 (100), 148 (8), 253 (12), 270 (48) *m/z*, calculada para 312 (C₁₈H₁₆O₅).



Acetilado de Medicarpina

8.4.2. Derivado butirato de medicarpina

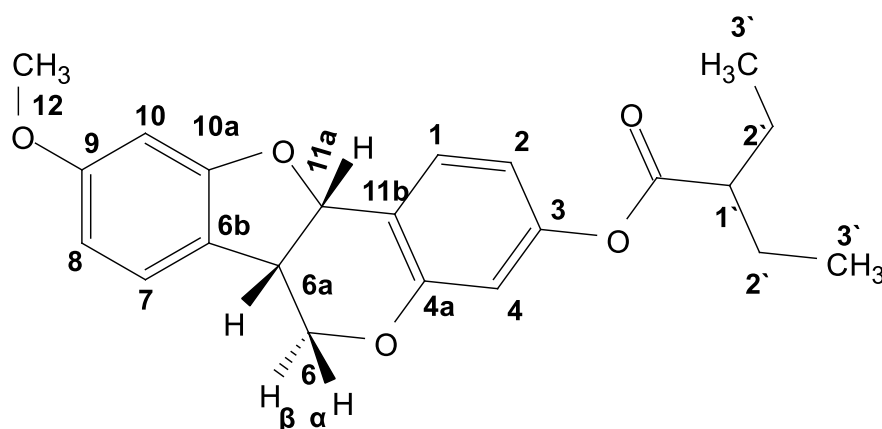
30 mg de medicarpina se sometieron a reacción con 0.1 ml de cloruro de ácido butírico, 2 ml de piridina empleados como base y disolvente, a condiciones de reflujo, bajo atmosferas de nitrógenos durante 3 horas. Trascurrido el tiempo de reacción se realizaron lavados con acetato de etilo, una solución de ácido HCl (10 %), una solución de NaHCO₃ (Saturado) y con una solución de NaCl (Saturado). El crudo de reacción fue sometido a purificación en columna cromatografía empleando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil Hex: AcOEt (95:5), obteniendo una miel de color amarillo, con aroma a queso, correspondiente al derivado éster butirato de medicarpina; **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ** 1.04 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, H-3'), 1.78 (h, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-2'), 2.53 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-1'), 3.54 (m, 1H, H-6a), 3.65 (t, *J* = 10.9 Hz, 1H, H-6 β α), 3.77 (s, 3H, OMe), 4.26 (dd, *J* = 11.2, 4.6 Hz, 1H, H-6α), 5.50 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-11a), 6.71 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H, H-4), 6.44 (s, 1H, H-10), 6.46 (dd, *J* = 7.4, 1.9 Hz, 1H, H-8), 6.78 (dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz, 1H, H-2), 7.14 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, H-7), 7.51(d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-1). **¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ** 13.5 (C-3'), 18.3 (C-2'), 36.1 (C-1'), 40.1 (C-6a), 55.4 (MeO), 66.5 (C-6), 78.0(C-11a), 93.7 (C-10), 110.6 (C-4), 104.6 (C-8), 115.3 (C-2), 117.6 (C-11b), 118.7 (C-6b), 124.7 (C-7), 131.6 (C-1), 151.6 (C-10a), 156.1 (C-9), 160.5 (C-4a), 161.1 (C-3), 171.8 (C=O). **IR U_{max}** 3067 (C-H de aromáticos), 2967 a 2877 (picos de mediana intensidad, C-H de metilo), 1750 (C=O de acilo), 1620, 1590 y 1496 (Picos de mediana intensidad, C=C estiramiento Aromático), 1496 a 1431 (Picos de intensidad media, C-CH). **EM [M⁺]** de 340.1 *m/z*, calculado para 340 *m/z* (C₂₀H₂₀O₅).



Butirado de Medicarpina

8.4.3. Derivado 2-etilbutirato de medicarpina

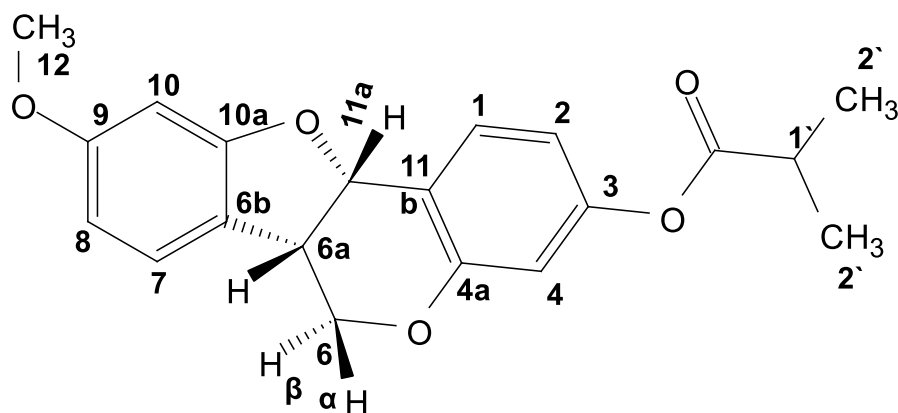
30 mg de medicarpina se sometieron a reacción con 0.1 ml de cloruro de ácido 2-etilbutírico, 2 ml de piridina empleados como base y disolvente, a condiciones de reflujo, bajo atmosferas de nitrógenos durante 3 horas. Trascurrido el tiempo de reacción se realizaron lavados con acetato de etilo, una solución de ácido HCl (10 %), una solución de NaHCO₃ (Saturado) y con una solución de NaCl (Saturado). El crudo de reacción fue sometido a purificación en columna cromatografía empleando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil Hex: AcOEt (95:5), obteniendo una miel trasparente con aroma frutal, correspondiente al éster 2-dietilbutirato de medicarpina; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 1.01 (t, J = 7.4 Hz, 6H, H-3'), 1.65 (m, 2H, H-2'), 1.76 (m, 2H, H-2'), 2.44 (m, 1H, H-1'), 3.53 (m, 1H, H-6a), 3.64 (m, 1H, H-6β), 3.76 (s, 3H, OMe), 4.26 (m, 1H, H-6α), 5.51 (d, J = 6.8 Hz, 1H, H-11a), 6.70 (d, J = 10.5 Hz, 1H, H-4), 6.43 (s, 1H, H-10), 6.46 (dd, J = 6.8, 2.2 Hz, 1H, H-8), 6.77 (dd, J = 5.7, 2.6 Hz, 1H, H-2), 7.13 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H-7), 7.53 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-1). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 11.7 (C-3'), 25.0 (C-2'), 48.8 (C-1'), 40.1 (C-6a), 55.4 (MeO), 66.4 (C-6), 77.9 (C-11a), 93.7 (C-10), 110.7 (C-4), 104.6 (C-8), 115.3 (C-2), 117.5 (C-11b), 118.7 (C-6b), 124.7 (C-7), 131.6 (C-1), 151.7 (C-10a), 156.1 (C-9), 160.5 (C-4a), 161.1 (C-3), 174.3 (C=O). IR *U*max 2964 a 2875 (picos de mediana intensidad, C-H de metilo), 1753 (C=O de acilo), 1617 y 1592 (Picos de mediana intensidad, C=C estiramiento Aromático), 1497, 1473, 1458 y 1432 (Picos de intensidad media, C-CH y C-CH₂). EM [M⁺] de 368.1 *m/z*, calculado para 368 *m/z* (C₂₂H₂₅O₅).



2-Etilbutirato de medicarpina

8.4.4. Derivado isobutirato de medicarpina

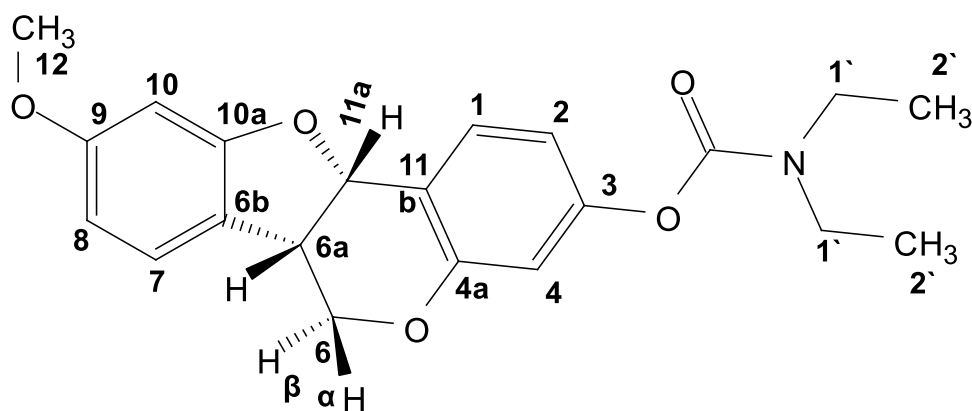
30 mg de medicarpina se sometieron a reacción con 0.1 ml de cloruro de ácido isobutírico, 2 ml de piridina empleados como base y disolvente, a condiciones de reflujo, bajo atmosferas de nitrógenos durante 3 horas. Trascurrido el tiempo de reacción se realizaron lavados con acetato de etilo, una solución de ácido HCl (10 %), una solución de NaHCO₃ (Saturado) y con una solución de NaCl (Saturado). El crudo de reacción fue sometido a purificación en columna cromatografía empleando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil Hex: AcOEt (95:5), obteniendo cristales en forma de aguja de color blanco, con un punto de fusión de 70-72°C, correspondientes al derivado éster isobutirato de medicarpina; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 1.31 (d, J = 7.0 Hz, 6H, H-2'), 2.79 (hept, J = 7.0 Hz, 1H, H-1'), 3.54 (m, 1H, H-6a), 3.65 (t, J = 10.9 Hz, 1H, H-6β), 3.77 (s, 3H, OMe), 4.26 (dd, J = 11.1, 4.9 Hz, 1H, H-6α), 5.50 (d, J = 7.0 Hz, 1H, H-11a), 6.71 (d, J = 13.5 Hz, 1H, H-4), 6.44 (s, 1H, H-10), 6.46 (dd, J = 6.8, 2.1 Hz, 1H, H-8), 6.78 (dd, J = 8.4, 2.5 Hz, 1H, H-2), 7.14 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-7), 7.50 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-1). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 18.8 (C-2'), 34.1 (C-1'), 39.8 (C-6a), 55.4 (MeO), 66.5 (C-6), 78.0 (C-11a), 93.8 (C-10), 110.6 (C-4), 104.6 (C-8), 115.2 (C-2), 117.5 (C-11b), 118.7 (C-6b), 124.7 (C-7), 131.6 (C-1), 151.8 (C-10a), 156.1 (C-9), 160.5 (C-4a), 161.1 (C-3), 175.3 (C=O). IR Umax 2974 a 2871 (picos de mediana intensidad, C-H de metilo), 1754 (C=O de acilo), 1614 y 1593 (Picos de mediana intensidad, C=C estiramiento Aromático), 1495, 1462 y 1432 (Picos de intensidad media, C-CH), 1380 (Pico de baja intensidad, CH-(CH₃)₂). EM [M⁺] de 340.1 m/z, calculado para 340 m/z (C₂₀H₂₀O₅).



Isobutirato de Medicarpina

8.4.5. Derivado dietilcarbamato de medicarpina

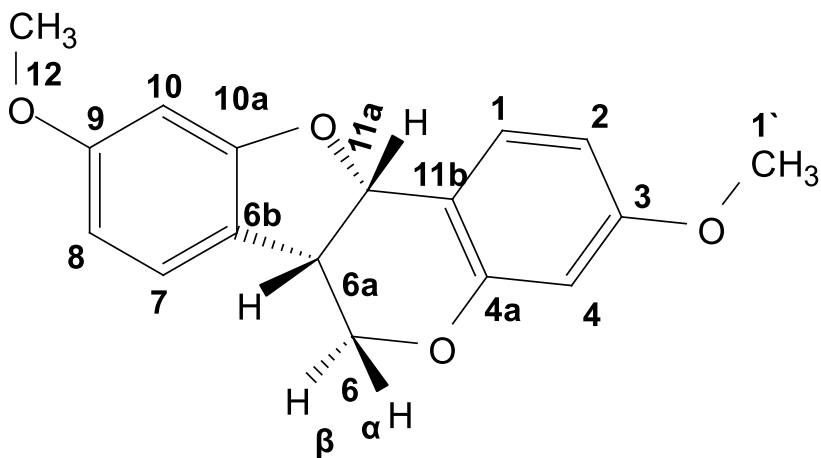
30 mg de medicarpina se sometieron a reacción con 0.1 ml de cloruro de ácido dietilcarbamoil, 2 ml de piridina empleados como base y disolvente, a condiciones de reflujo, bajo atmosferas de nitrógenos durante 3 horas. Trascurrido el tiempo de reacción se realizaron lavados con acetato de etilo, una solución de ácido HCl (10 %), una solución de NaHCO₃ (Saturado) y con una solución de NaCl (Saturado). El crudo de reacción fue sometido a purificación en columna cromatografía empleando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil Hex: AcOEt (95:5), obteniendo cristales amorfos de color blanco con un punto de fusión de 75-76°C, correspondientes al éster dietilcarbamato de medicarpina; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 1.22 (m (a), 6H, H-2'), 3.40 (m (a), 4H, H-1'), 3.56 (m, 1H, H-6a), 3.63 (m, 1H, H-6β), 3.77 (s, 3H, OMe), 4.27 (dd, J = 10.6, 4.6 Hz, 1H, H-6α), 5.52 (d, J = 6.5 Hz, 1H, H-11a), 6.74 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-4), 6.45 (s, 1H, H-10), 6.46 (dd, J = 5.7, 2.3 Hz, 1H, H-8), 6.84 (dd, J = 8.4, 2.3 Hz, 1H, H-2), 7.14 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-7), 7.51 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-1). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 13.3, 14.1 (C-2'), 41.8, 42.2 (C-1'), 39.5 (C-6a), 55.4 (MeO), 66.5 (C-6), 78.1 (C-11a), 96.8 (C-10), 110.6 (C-4), 106.4 (C-8), 115.5 (C-2), 116.9 (C-11b), 118.8 (C-6b), 124.7 (C-7), 131.4 (C-1), 152.5 (C-10a), 156.0 (C-9), 160.5 (C-4a), 161.0 (C-3) 153.7 (C=O). IR U_{max} 2974 a 2836 (picos de mediana intensidad, C-H de metilo), 1715 (C=O de acilo), 1617 y 1593 (Picos de mediana intensidad, C-N), 1494, 1459 y 1420 (Picos de intensidad media, C-CH). EM [M⁺] de 369.1 m/z, calculado para 369 m/z (C₂₁H₂₄O₅N₁).



Dietilcarbamato de Medicarpina

8.4.6. Derivado metil éter de medicarpina

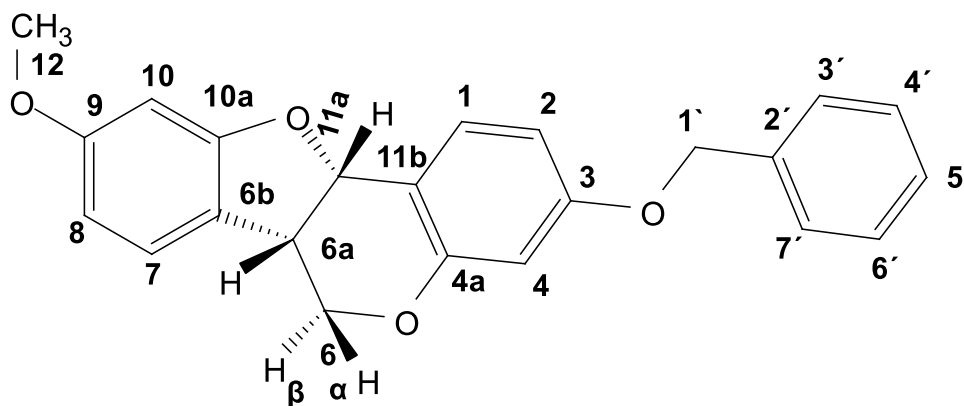
30 mg de medicarpina se sometieron a reacción con 100 mg de hidróxido de sodio empleado como base, 2 ml de THF como disolvente y 0.1 ml de yoduro de metilo, lo anterior a temperatura ambiente por 24 horas. Trascurrido el tiempo de reacción se realizó lavados con acetato de etilo, continuando con una solución de ácido HCl (10 %) y una solución de NaHCO₃ (Saturado). Los crudos de reacción fueron sometidos a purificación en columna cromatografía empleando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil Hex: AcOEt (98:2), obteniendo cristales amorfos de color blanco, con un punto de fusión de 131-132 °C, correspondiente al derivado metil éter de medicarpina; **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ** 3.50 (m, 1H, H-6a), 3.64 (m, 1H, H-6β), 3.76 (s, 3H, OMe), 3.79 (s, 3H, OMe'), 4.23 (m, 1H, H-6α), 5.48 (d, J = 7.0 Hz, 1H, H-11a), 6.72 (s, 1H, H-4), 6.43 (s, 1H, H-10), 6.45 (dd, J = 6.8, 1.7 Hz, 1H, H-8), 6.63 (dd, J = 8.5, 2.6 Hz, 1H, H-2), 7.13 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-7), 7.40 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-1). **¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ** 39.5 (C-6a), 55.4 (MeO), 55.3 (Me'O), 66.5 (C-6), 78.4 (C-11a), 93.7 (C-10), 104.6 (C-4), 106.3 (C-8), 109.2 (C-2), 112.3 (C-11b), 117.8 (C-6b), 124.6 (C-7), 131.7 (C-1), 148.0 (C-10a), 156.5 (C-9), 160.6 (C-4a), 160.9 (C-3).



Metil éter de Medicarpina

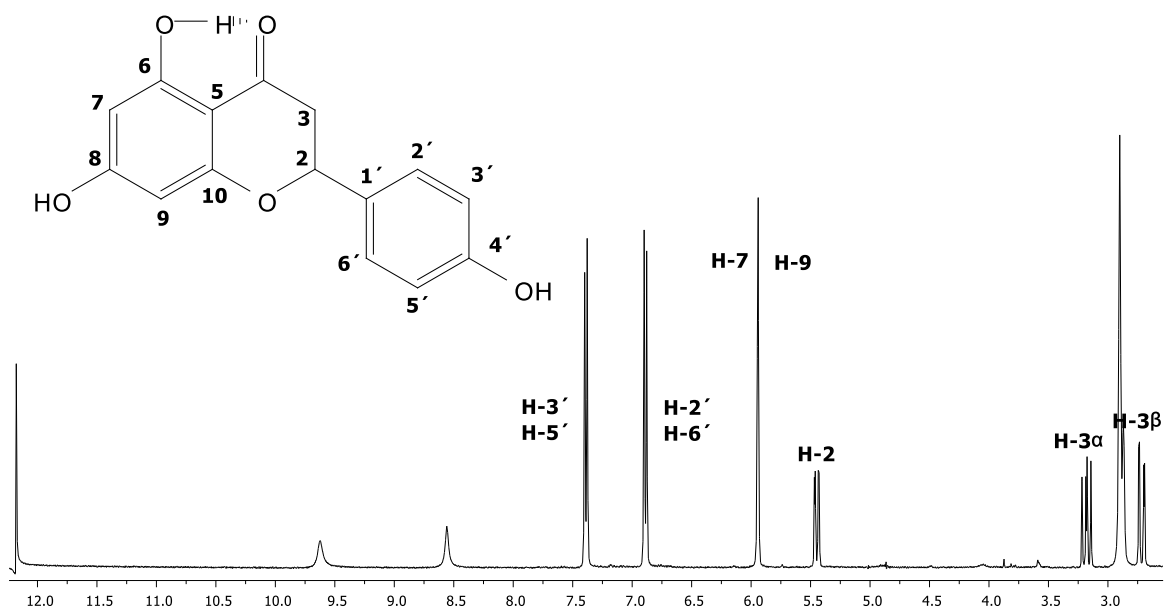
8.4.8. Derivado bencil éter de medicarpina

30 mg de medicarpina se sometieron a reacción con 100 mg de hidróxido de sodio empleado como base, 2 ml de THF como disolvente y 0.1 ml de bromuro de bencilo, lo anterior a temperatura ambiente por 24 horas. Trascurrido el tiempo de reacción se realizó lavados con acetato de etilo, continuando con una solución de ácido HCl (10 %) y una solución de NaHCO₃ (Saturado). Los crudos de reacción fueron sometidos a purificación en columna cromatografía empleando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil Hex: AcOEt (98:2), obteniendo cristales amorfos de color blanco con un punto de fusión de 100-101°C, correspondiente al bencil éter de medicarpina; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3.50 (m, 1H, H-6a), 3.63 (m, 1H, H-6β), 3.76 (s, 3H, OMe), 4.23 (m, 1H, H-6α), 5.05 (s, 2H, H-1'), 5.51 (d, J = 6.8 Hz, 1H, H-11a), 6.71 (dd, J = 8.1, 3.1 Hz, 1H, H-4), 6.43 (s, 1H, H-10), 6.45 (dd, J = 4.3, 2.1 Hz, 1H, H-8), 6.55 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-2), 7.13 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-7), 7.33 (d, J = 7.0 Hz, 1H, H-1), 7.40 (m, 5H, H-3', 4', 5', 6', 7'). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 39.5 (C-6a), 55.4 (MeO), 66.5 (C-1'), 70.0 (C-6), 78.5 (C-11a), 93.8 (C-10), 104.6 (C-4), 106.3 (C-8), 109.8 (C-2), 112.6 (C-11b), 117.8 (C-6b), 124.7 (C-7), 127.4 (C-3', 7'), 127.9 (C-5'), 128.5 (C-4', 6'), 131.8 (C-1), 136.6 (C-2'), 148.0 (C-10a), 156.5 (C-9), 160.1 (C-4a), 160.6 (C-3).

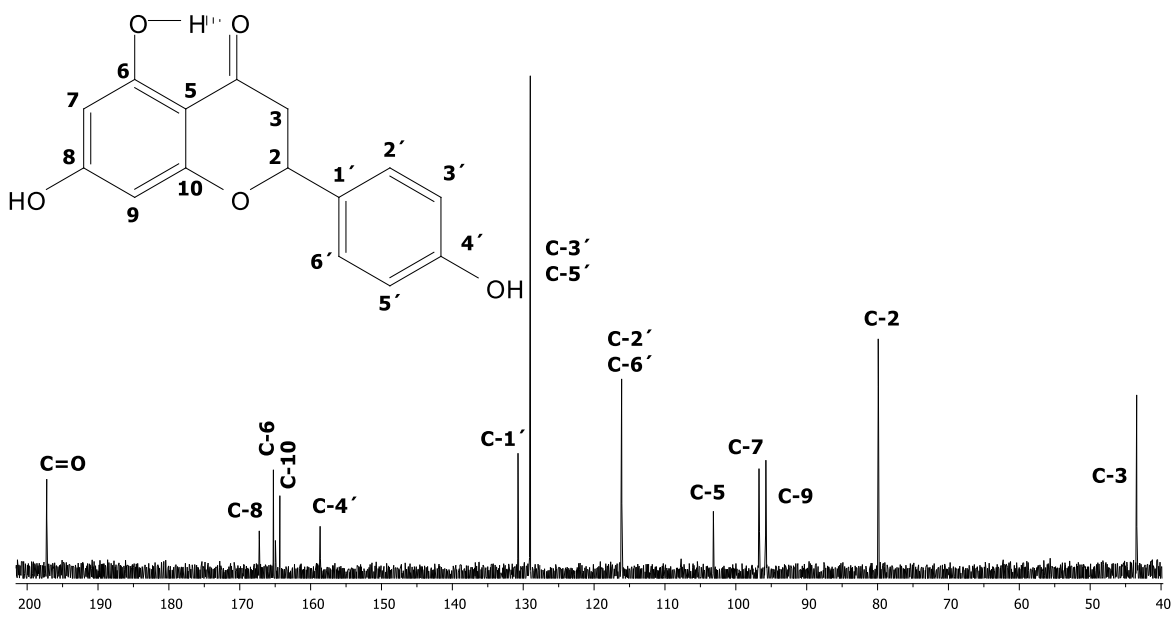


Bencil éter de Medicarpina

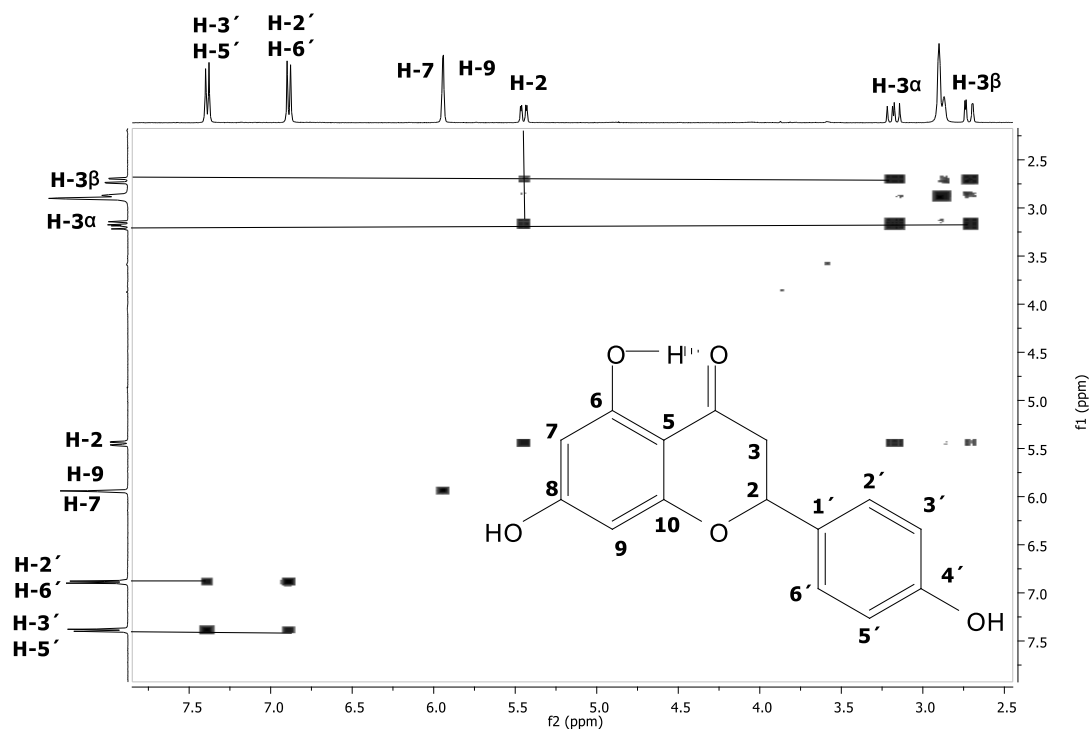
9. APÉNDICE DE ESPECTROS



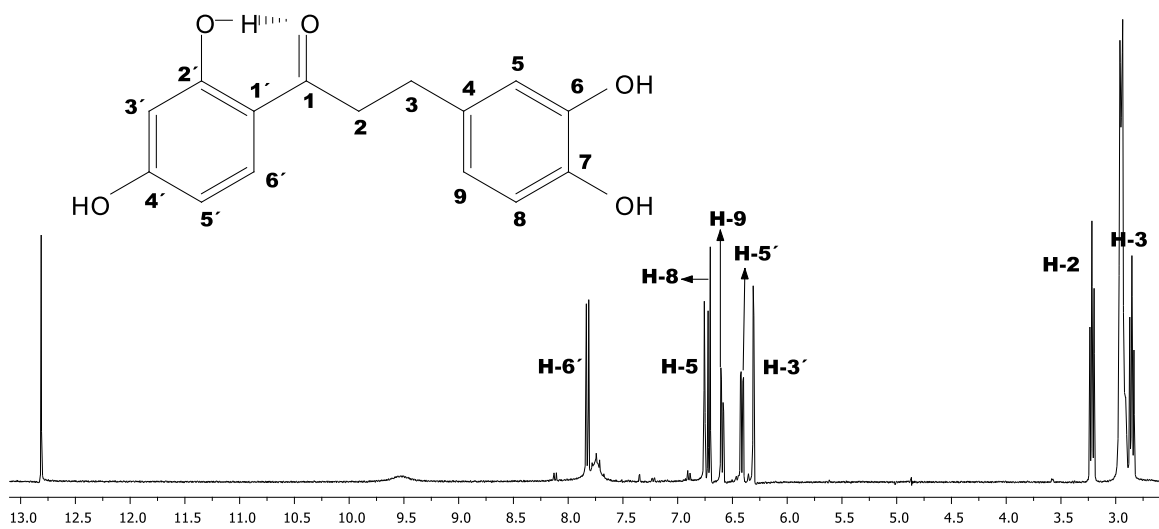
A1. Espectro de RMN de ^1H de naringenina



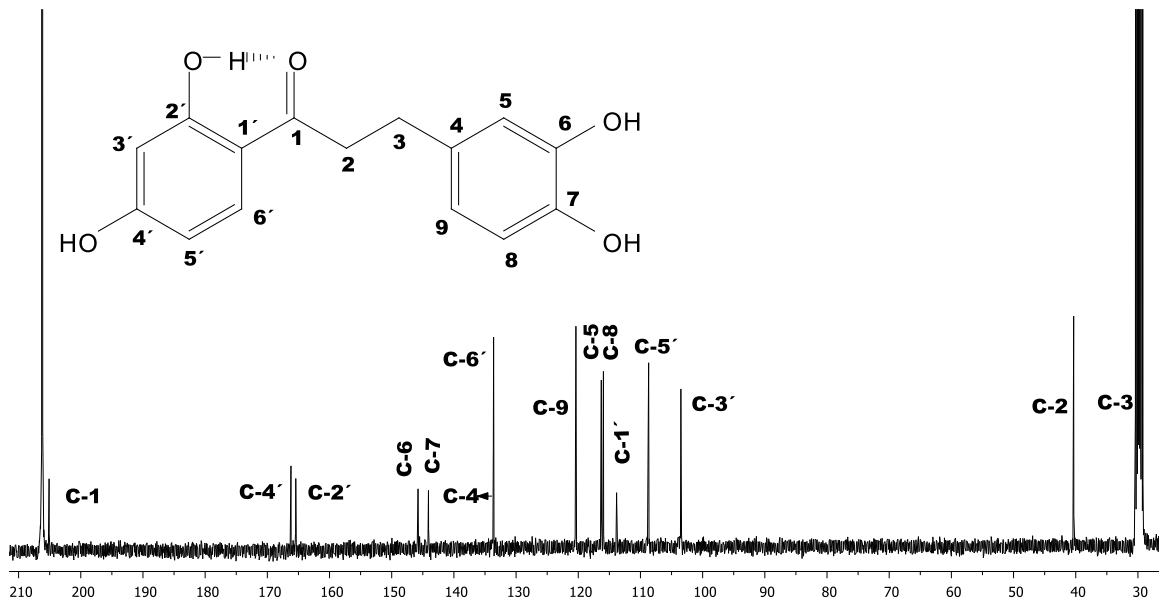
A2. Espectro de RMN de ^{13}C de naringenina



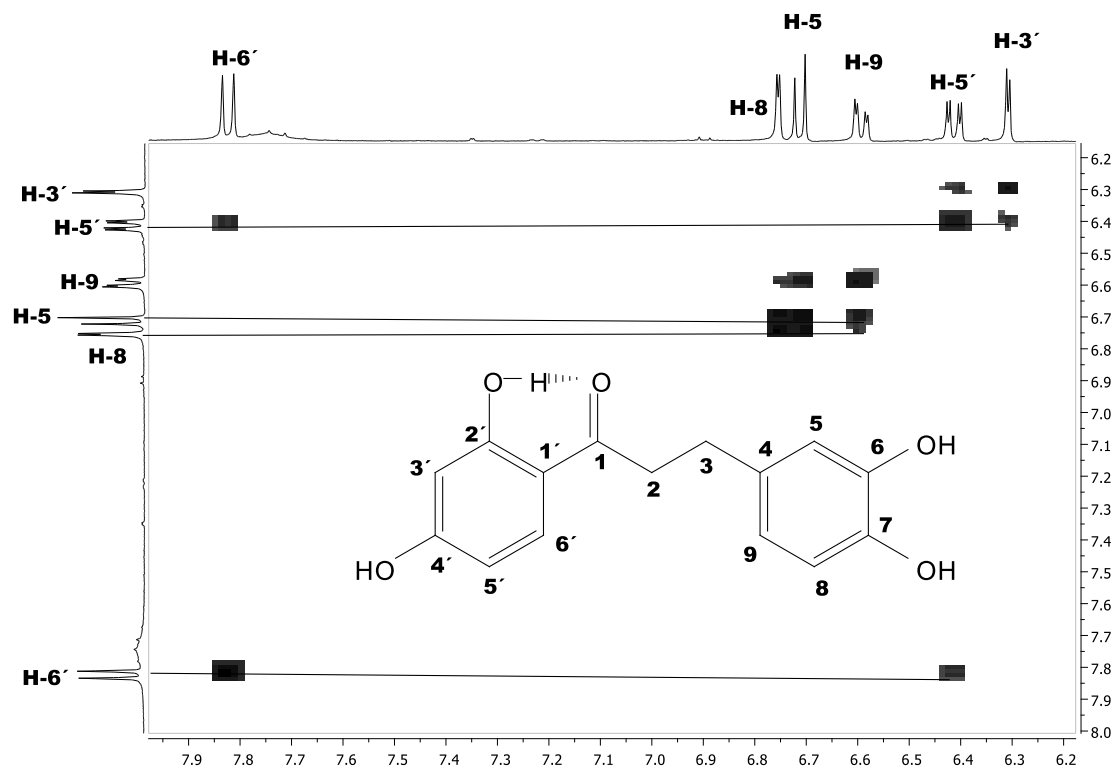
A3. Espectro COSY de naringenina



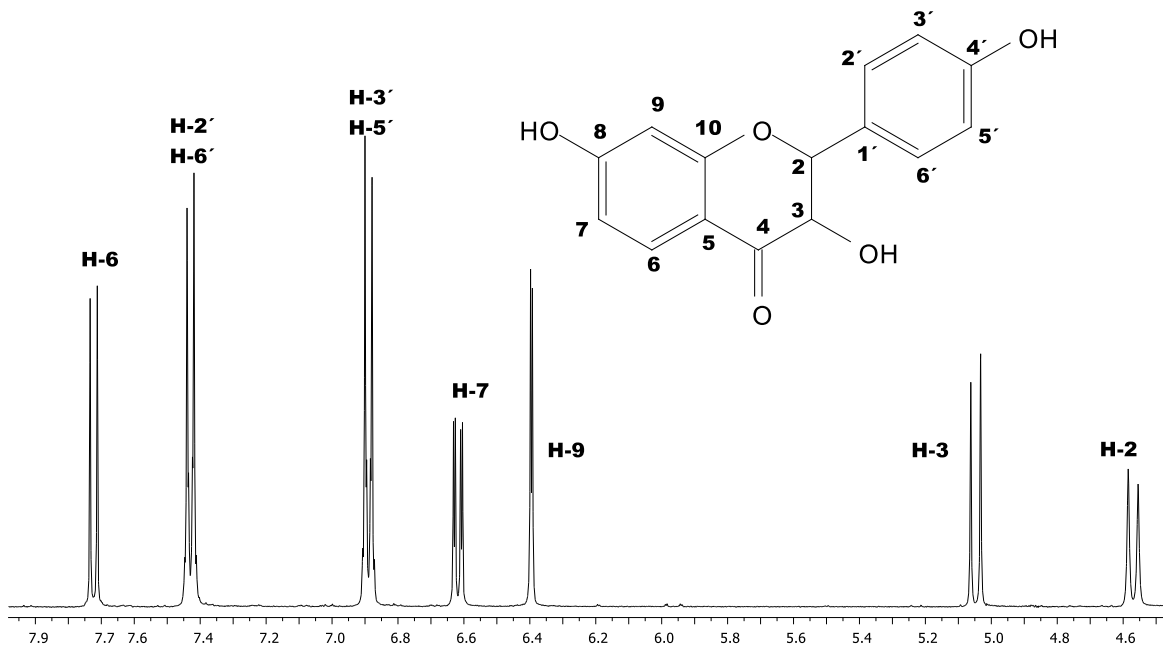
Apéndice B1. Espectro de RMN de ^1H de la chalcona.



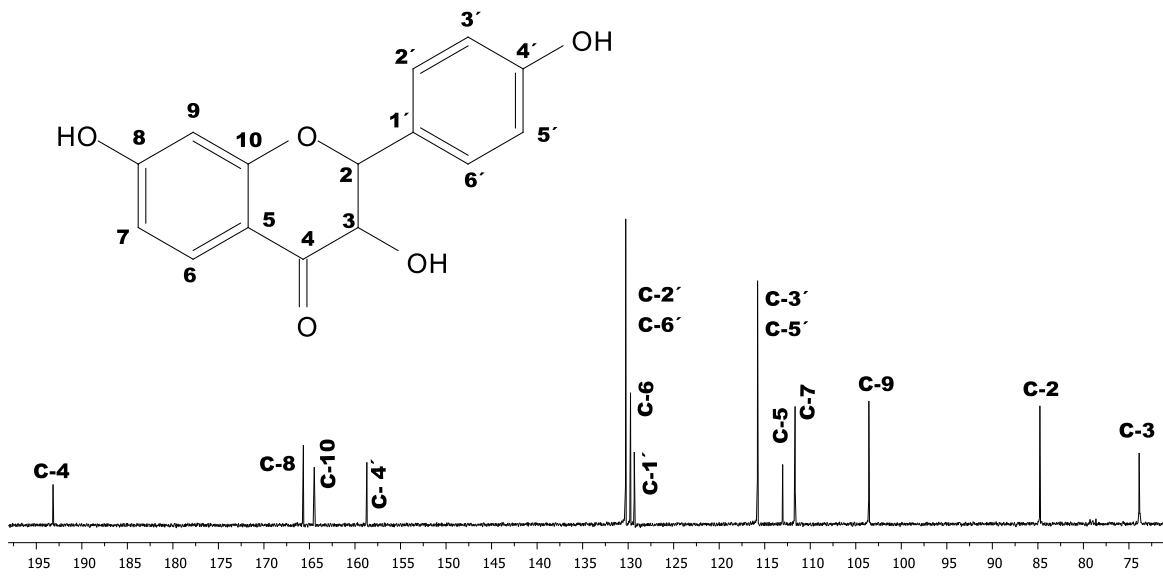
Apéndice B2. Espectro de RMN de ^{13}C de la chalcona



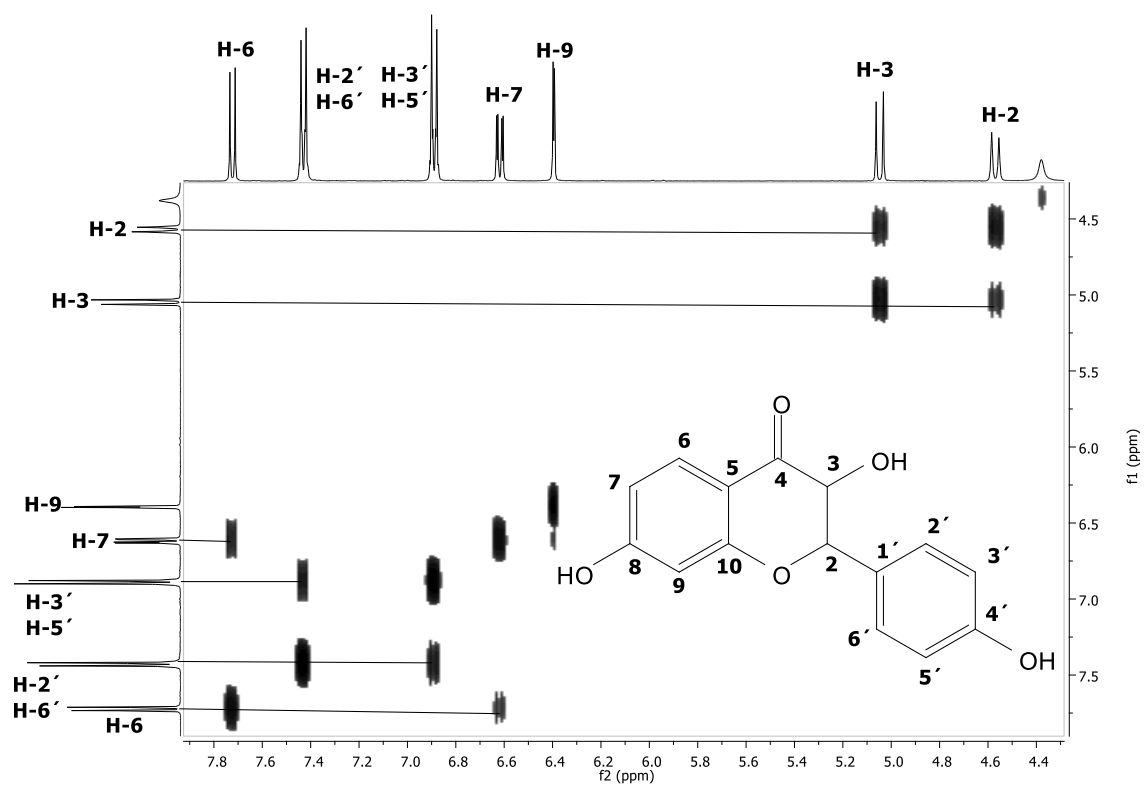
Apéndice B3. Espectro COSY de la chalcona.



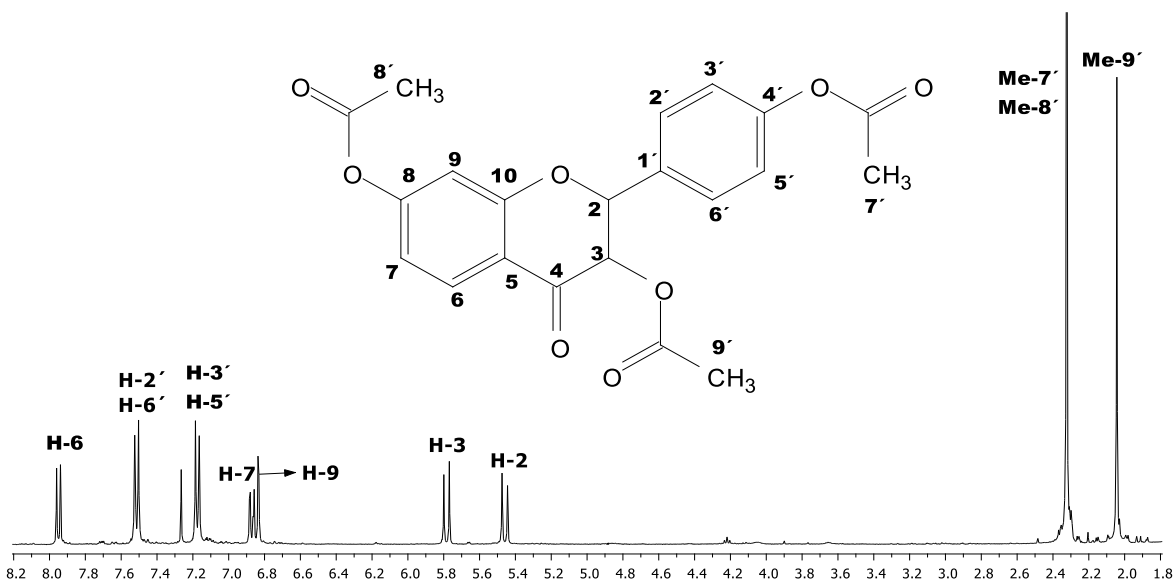
Apéndice C1. Espectro de RMN de ¹H del flavanone.



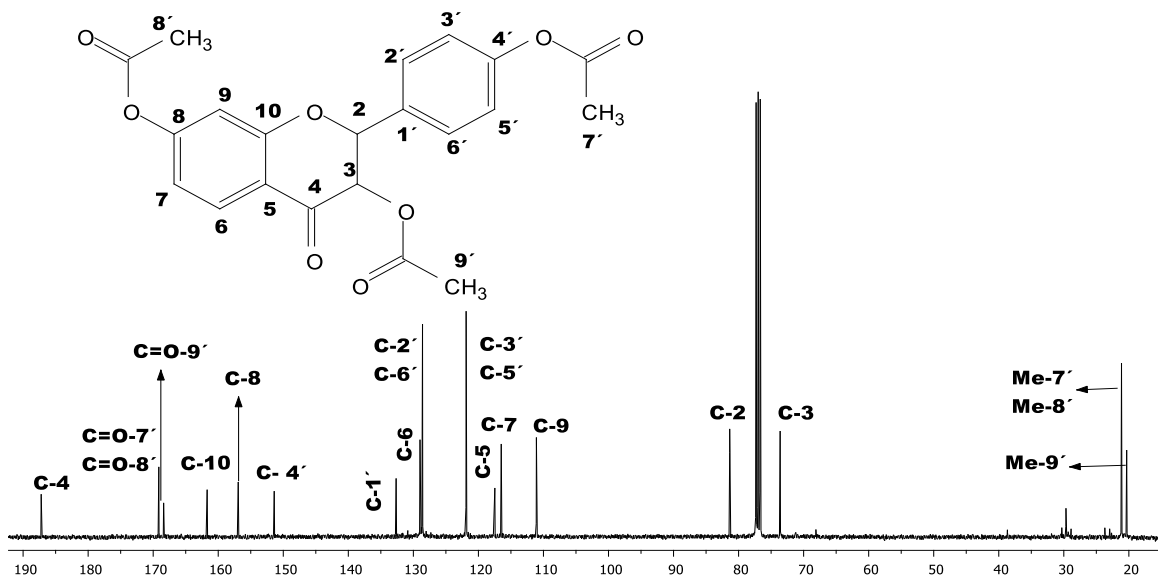
Apéndice C2. Espectro de RMN de ¹³C del flavanone.



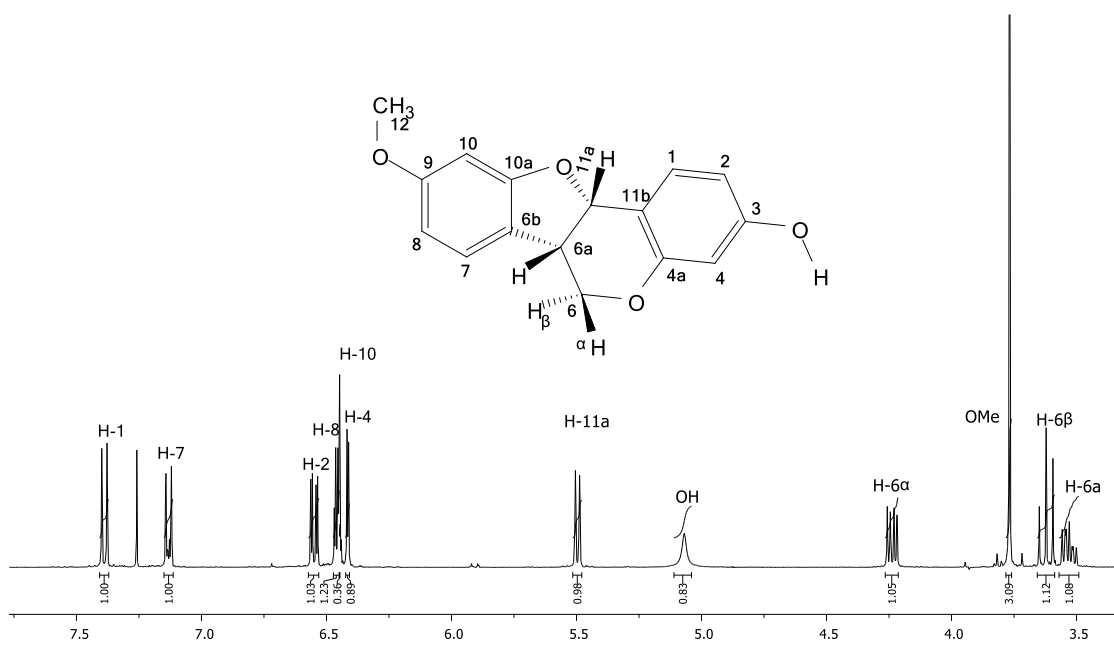
Apéndice C3. Espectro COSY del flavanone



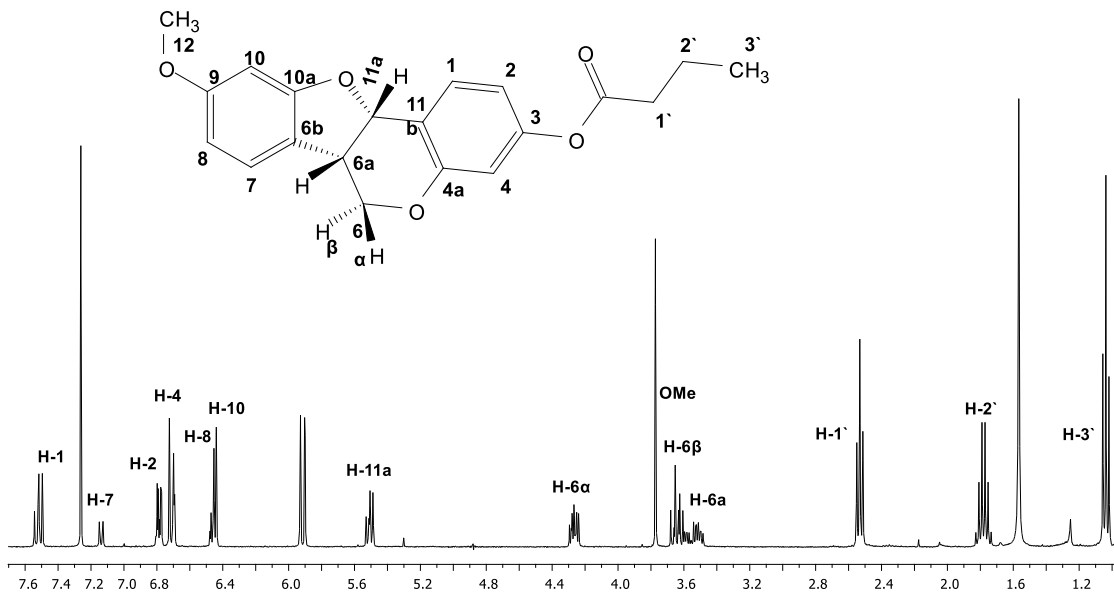
Apéndice C4. Espectro de RMN de ^1H del derivado triacetilado del flavanone.



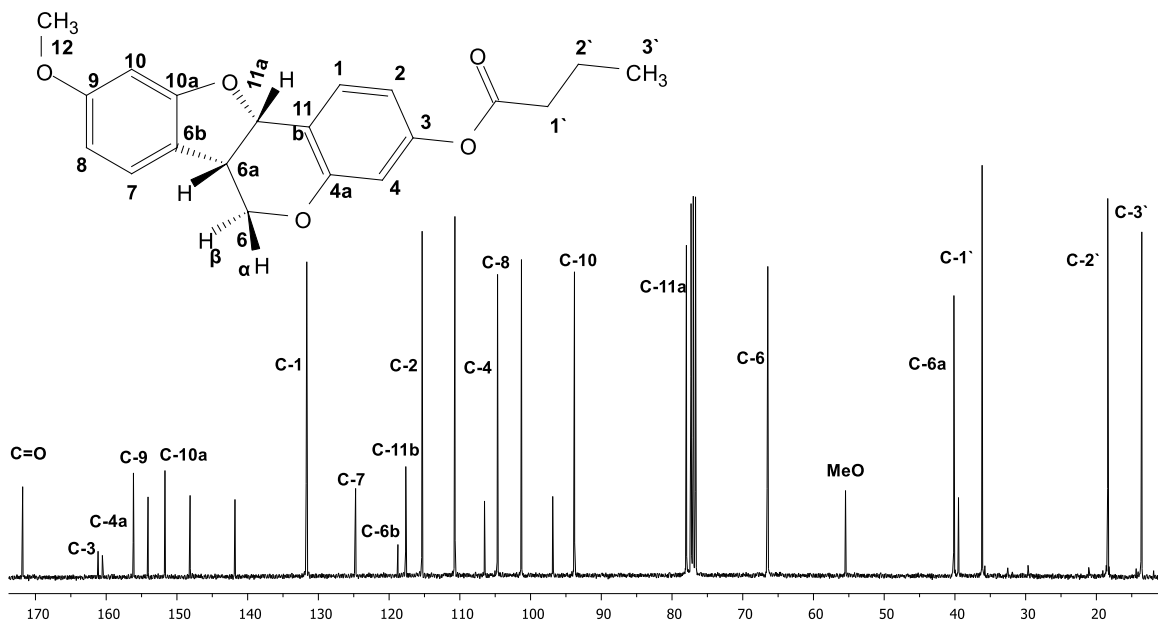
Apéndice C5. Espectro de RMN de ^{13}C del derivado triacetilado del flavanonol.



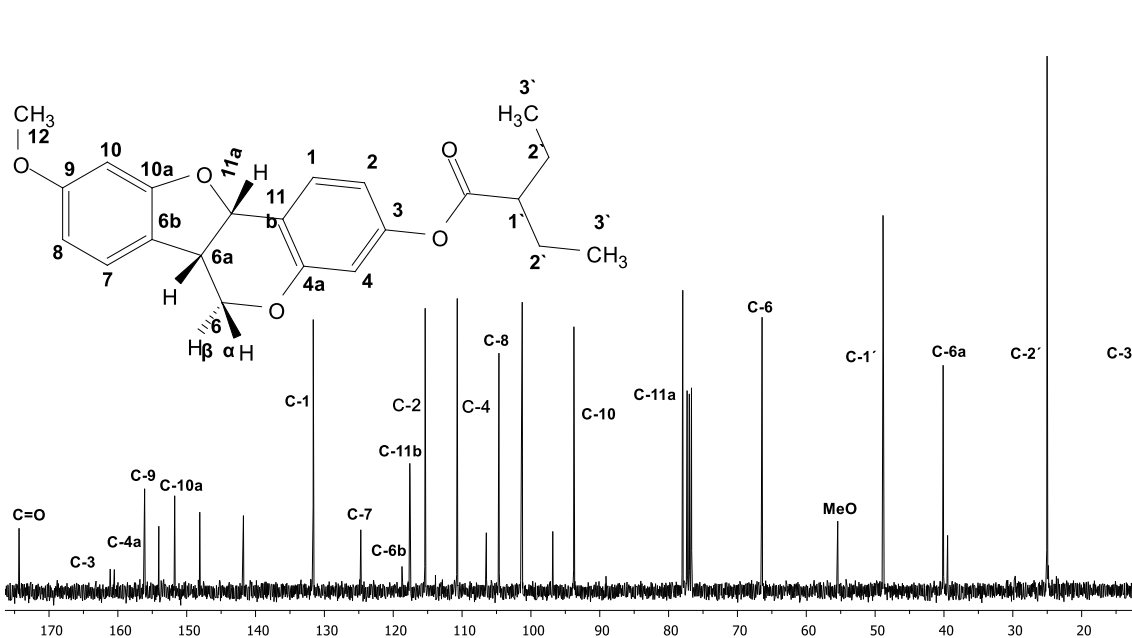
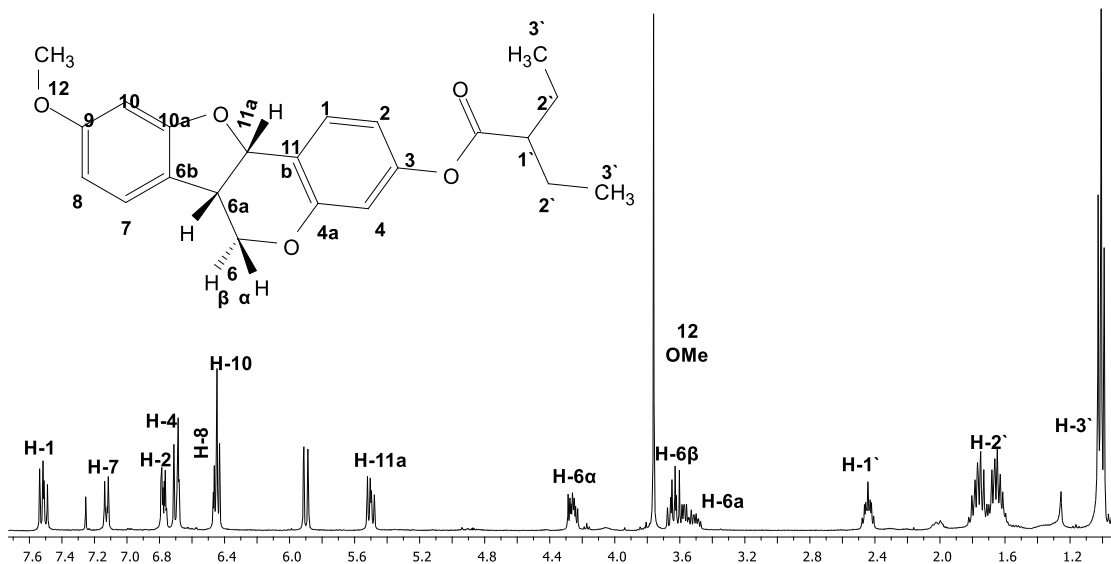
Apéndice D1. Espectro de RMN de ^1H de la medicarpina.

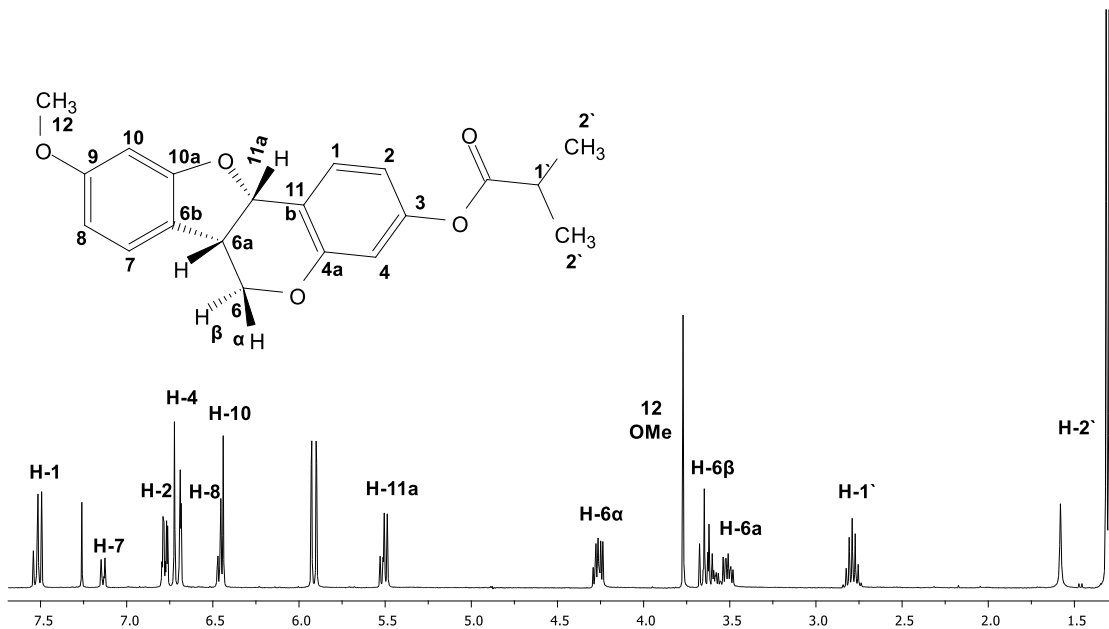


Apéndice D2. Espectro de RMN de ^1H del derivado butirato de medicarpina

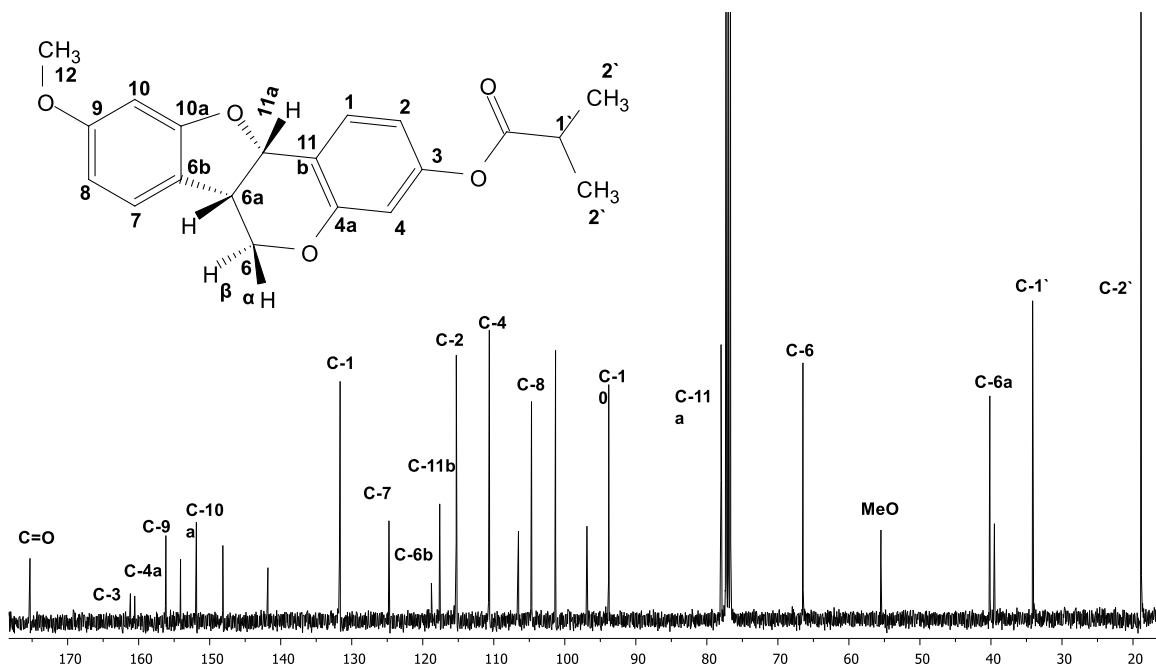


Apéndice D3. Espectro de RMN de ^{13}C del derivado butirato de medicarpina

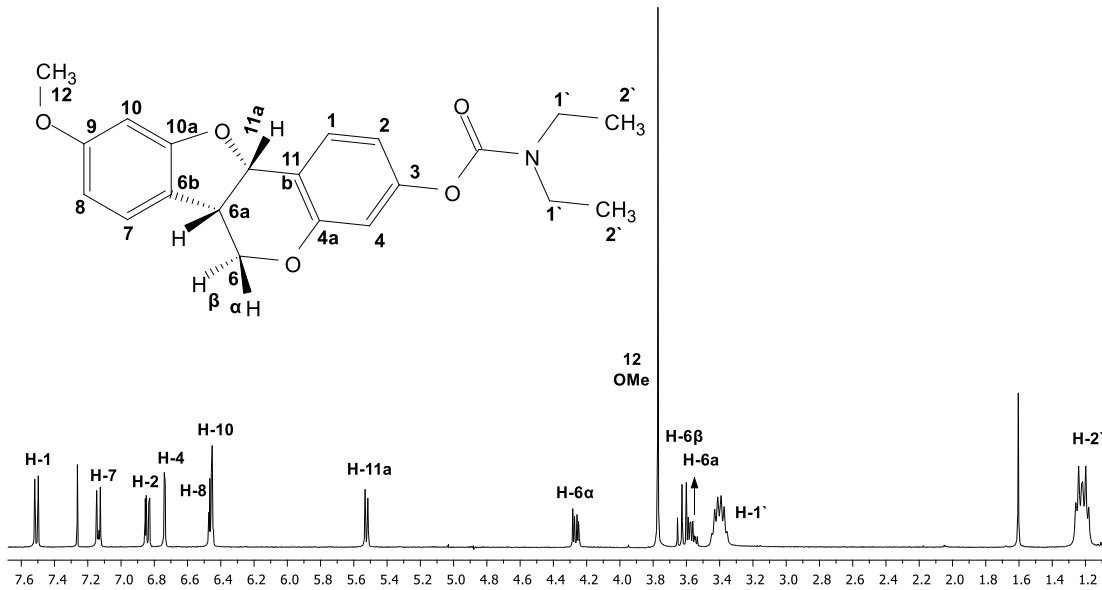




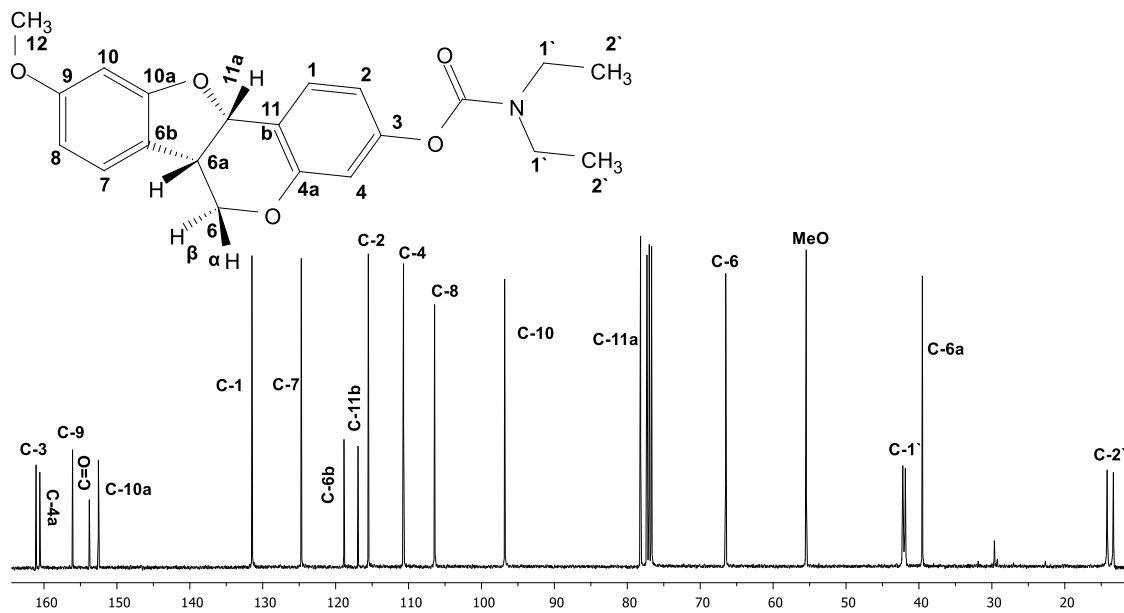
Apéndice D6. Espectro de RMN de ^1H del derivado isobutirato de medicarpina



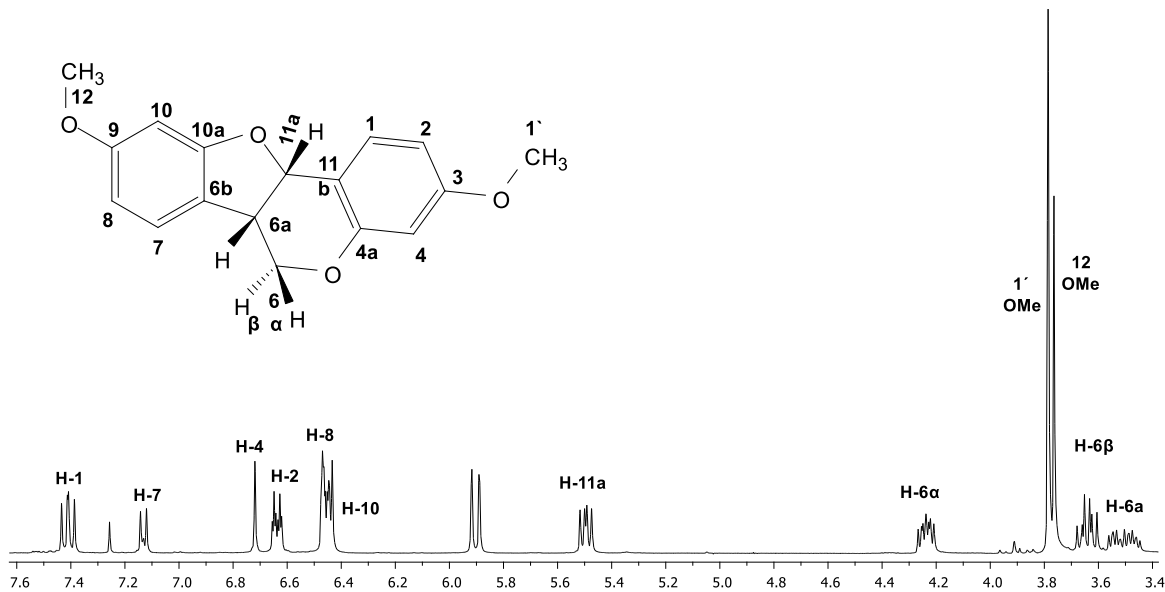
Apéndice D7. Espectro de RMN de ^{13}C del derivado isobutirato de medicarpina



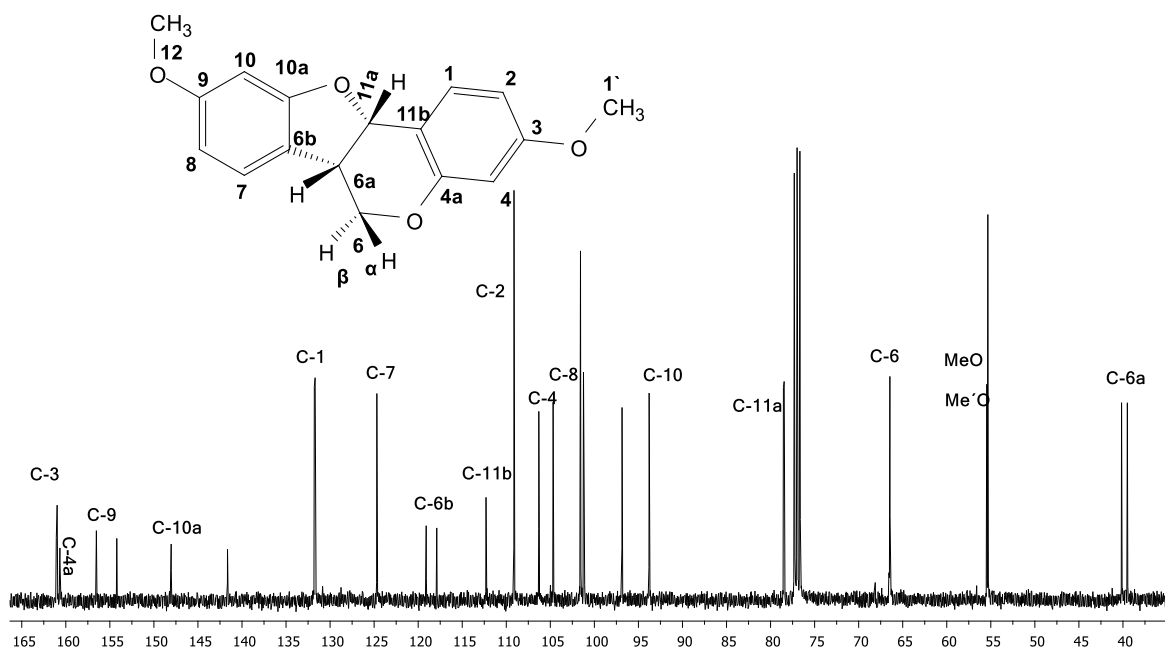
Apéndice D8. Espectro de RMN de ^1H del derivado dietilcarbamato de medicarpina



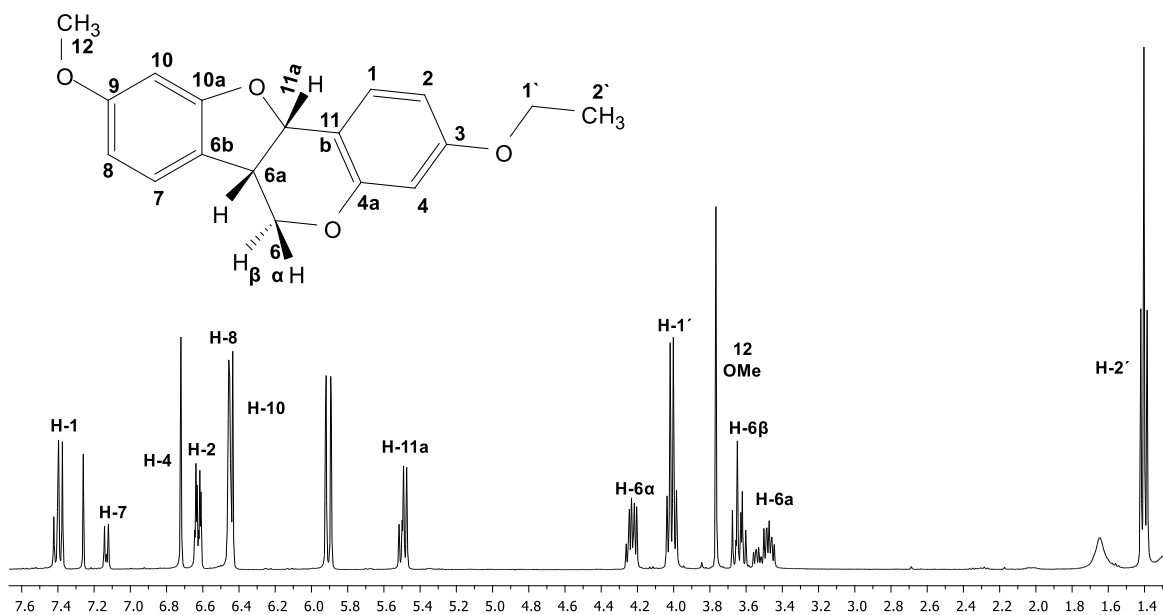
Apéndice D9. Espectro de RMN de ^{13}C del derivado dietilcarbamato de medicarpina



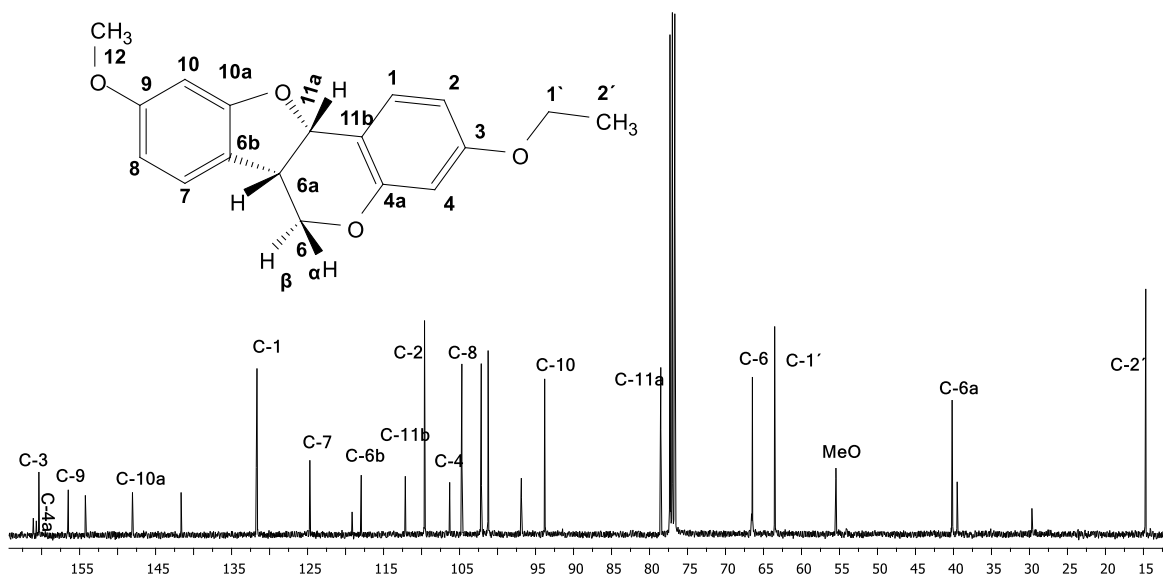
Apéndice D10. Espectro de RMN de ^1H del derivado metil éter de medicarpina



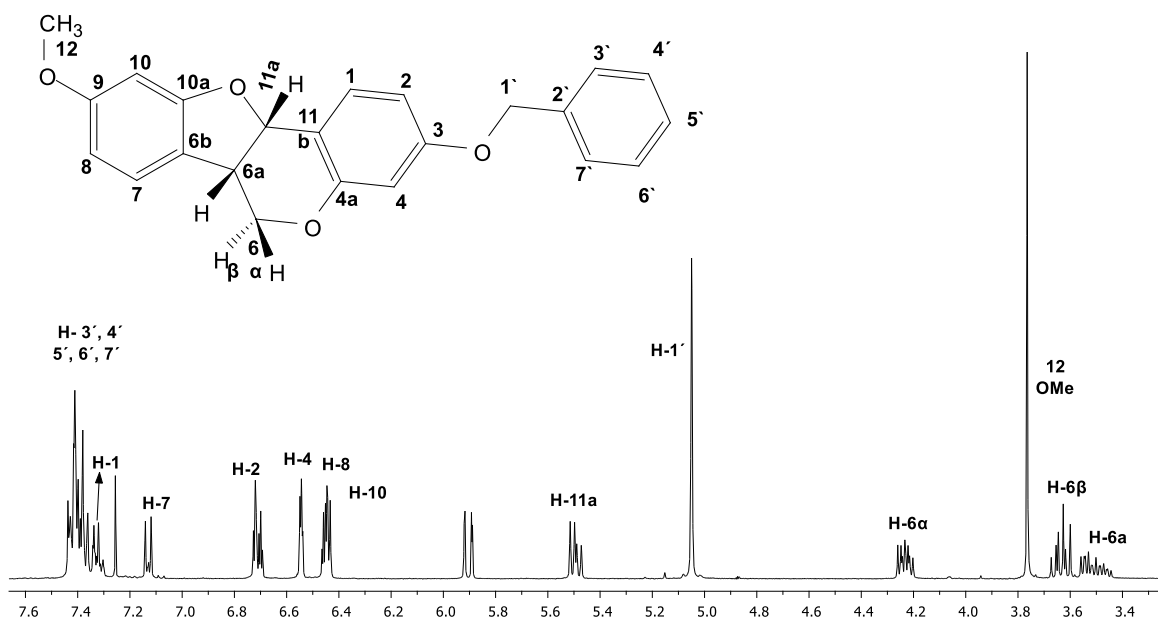
Apéndice 11. Espectro de RMN de ^{13}C del derivado metil éter de medicarpina



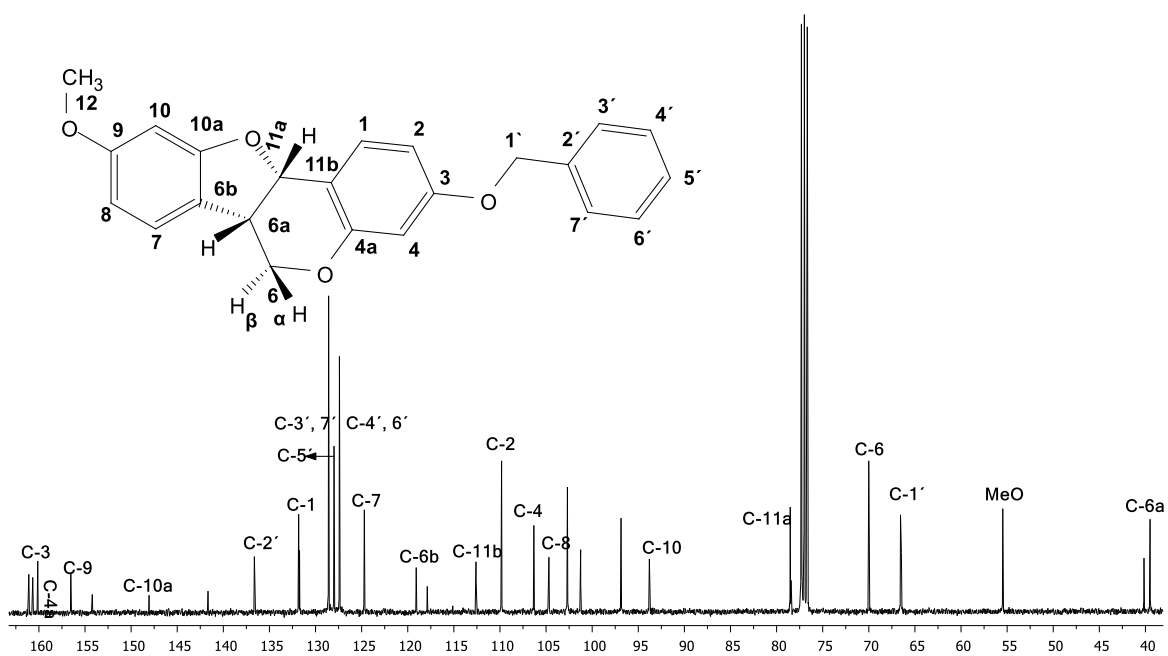
Apéndice D12. Espectro de RMN de ^1H del derivado etil éter de medicarpina



Apéndice D13. Espectro de RMN de ^{13}C del derivado etil éter de medicarpina

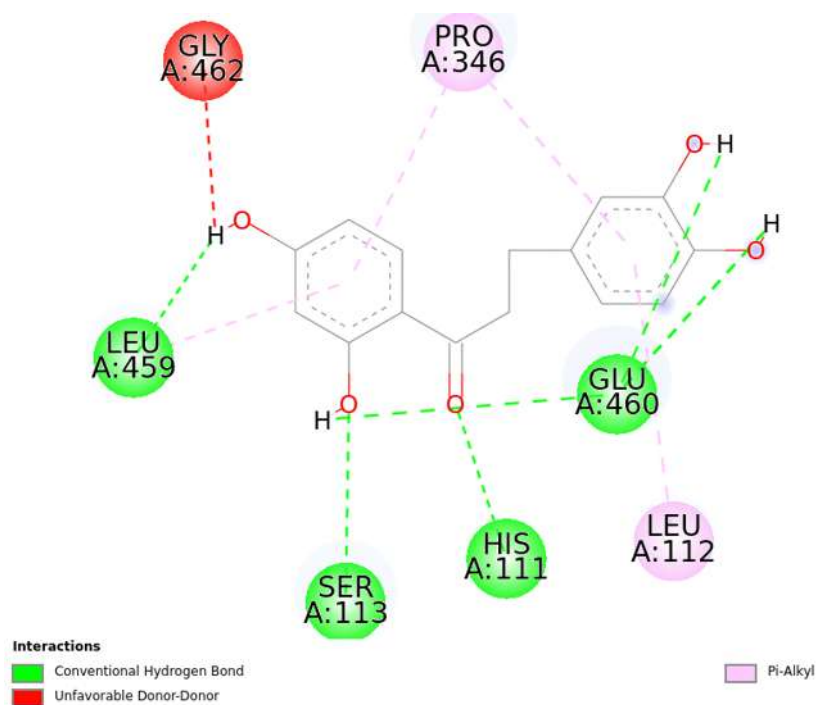


Apéndice D14. Espectro de RMN de ^1H del derivado bencil éter de medicarpina

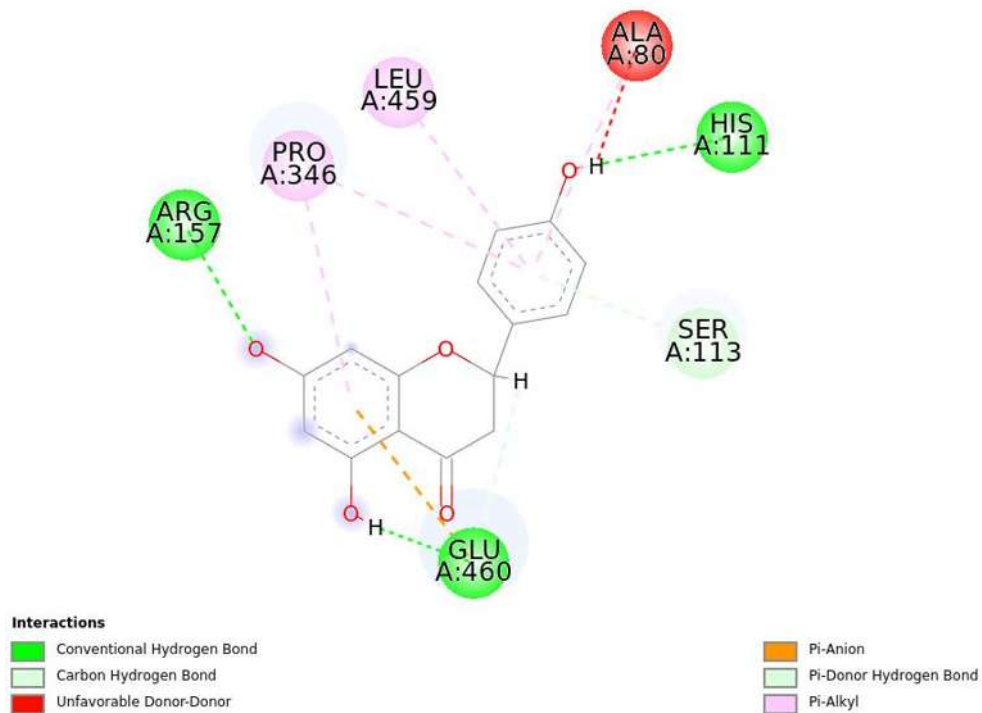


Apéndice D15. Espectro de RMN de ^{13}C del derivado bencil éter de medicarpina

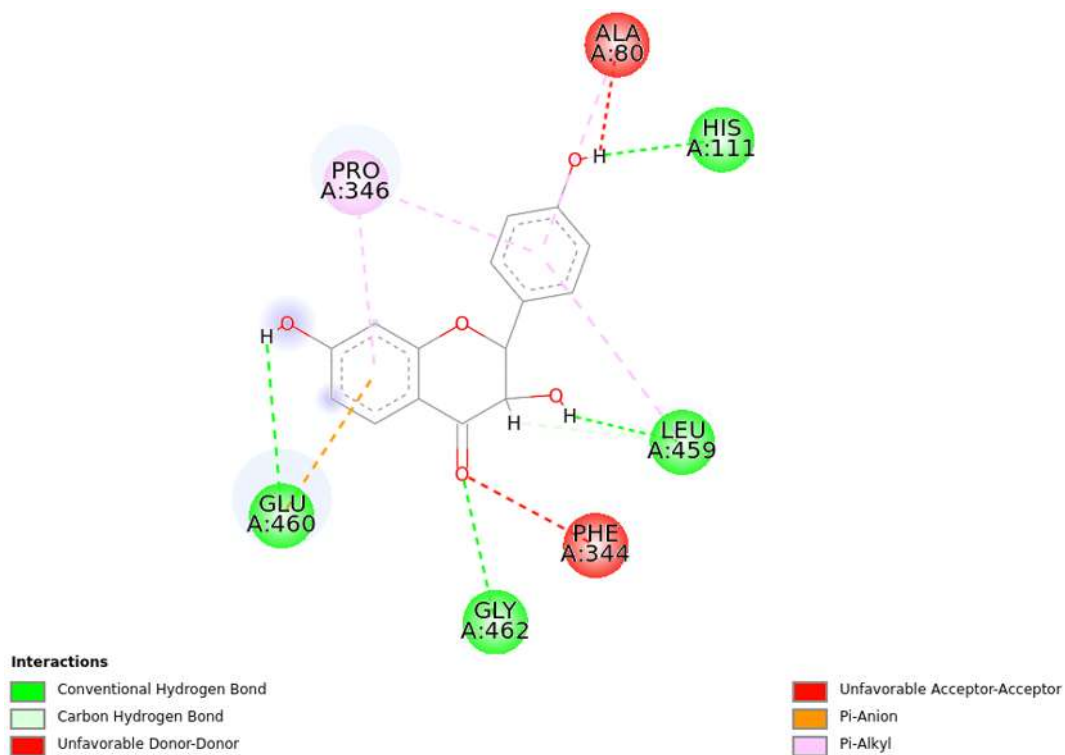
10. APÉNDICE DE IMÁGENES



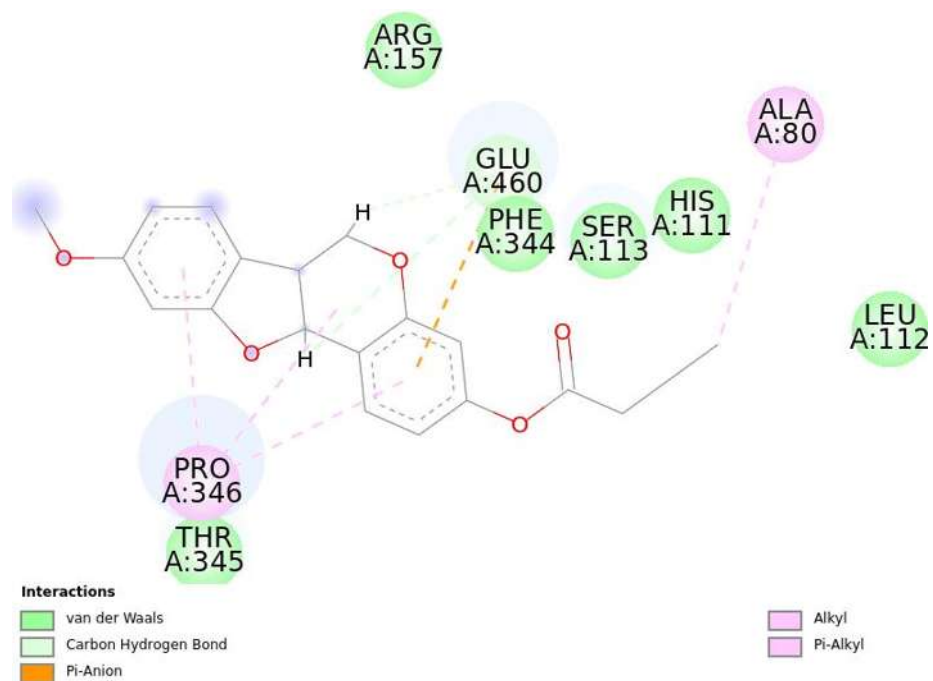
Apéndice E1. Interracciones de la chalcona obtenidas con Discovery Studio



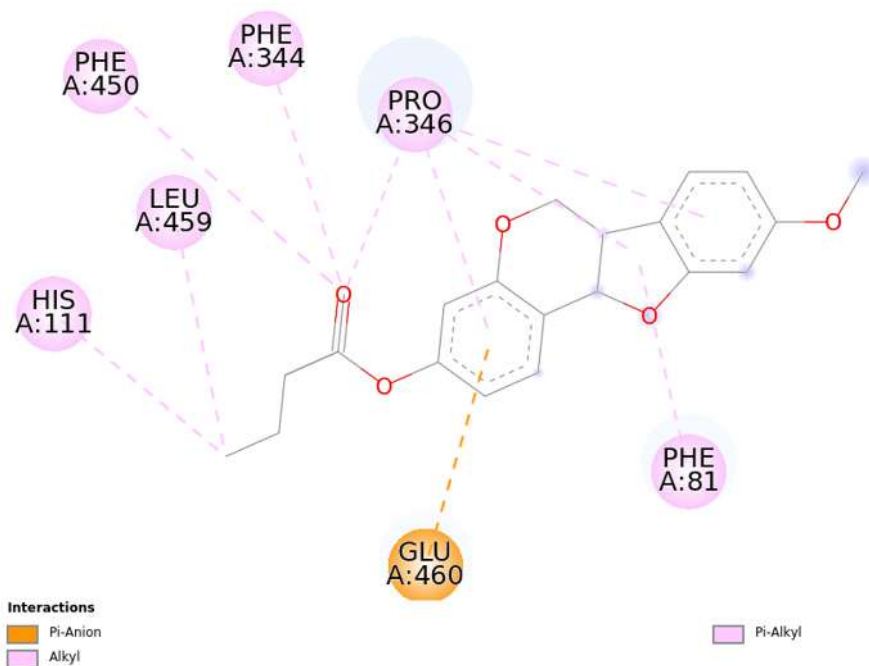
Apéndice E2. Interracciones de la naringenina obtenidas con Discovery Studio



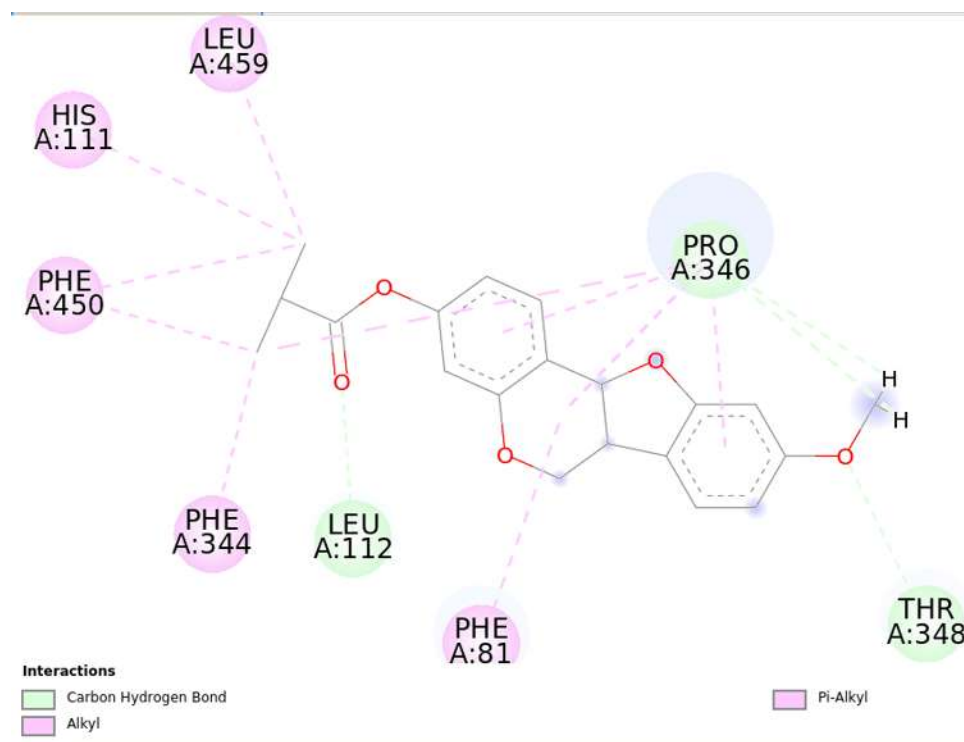
Apndice E3. Interracciones del flavanone obtenidas con Discovery Studio



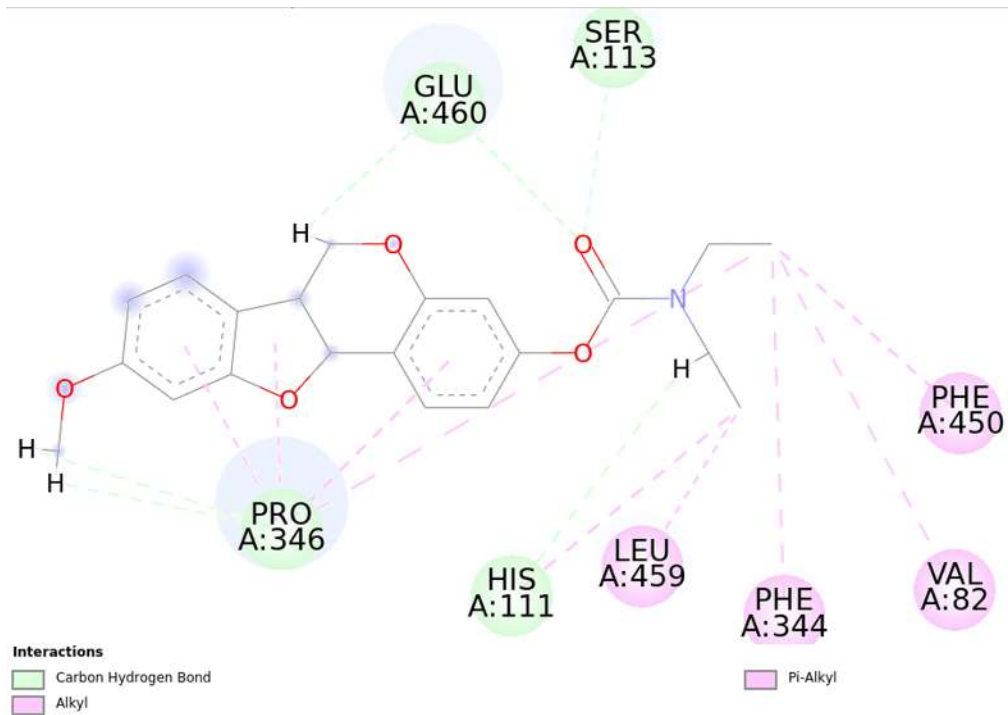
Apndice E4. Interracciones del derivado butirato de medicarpina obtenidas con Discovery Studio



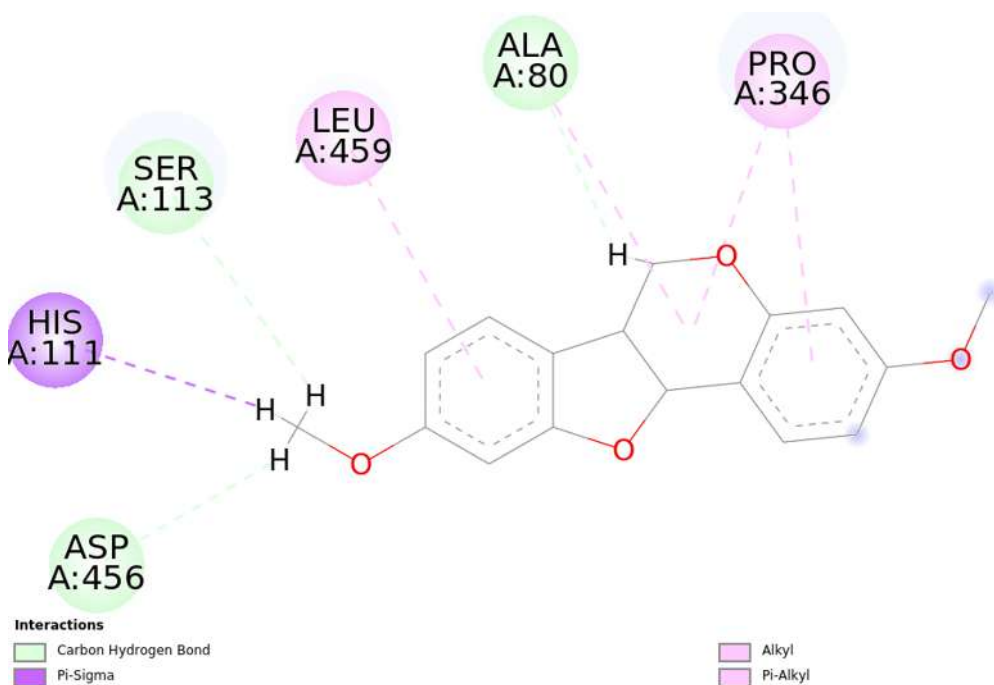
Apéndice E5. Interracciones del derivado 2-Etilbutirato de medicarpina obtenidas con Discovery Studio



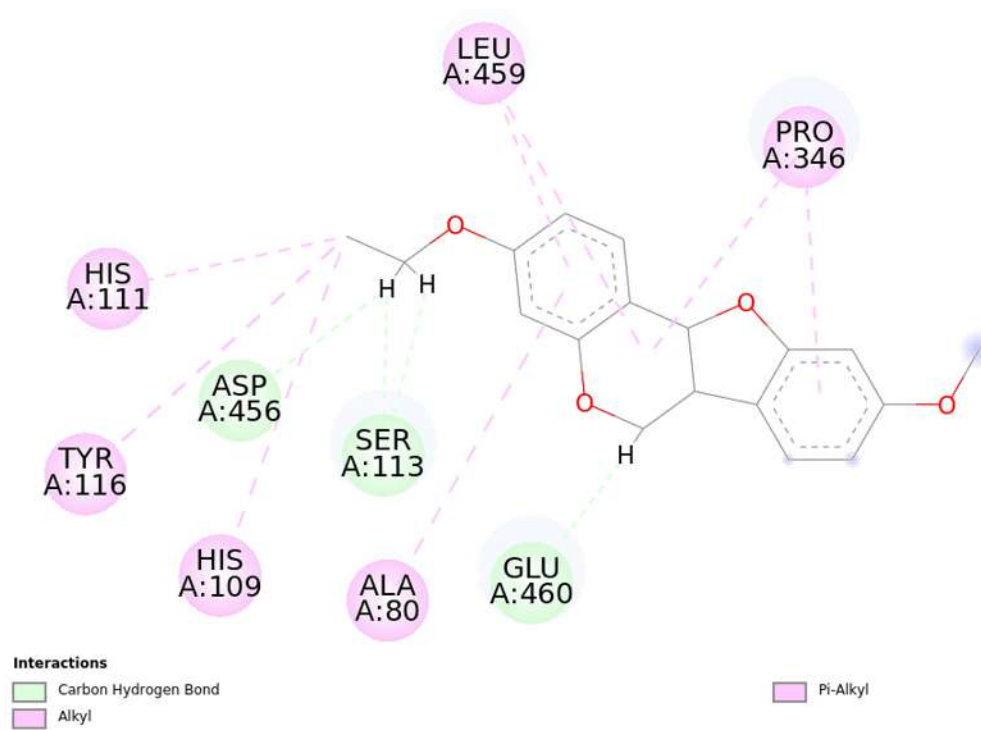
Apéndice E6. Interracciones del derivado Isobutirato de medicarpina obtenidas con Discovery Studio



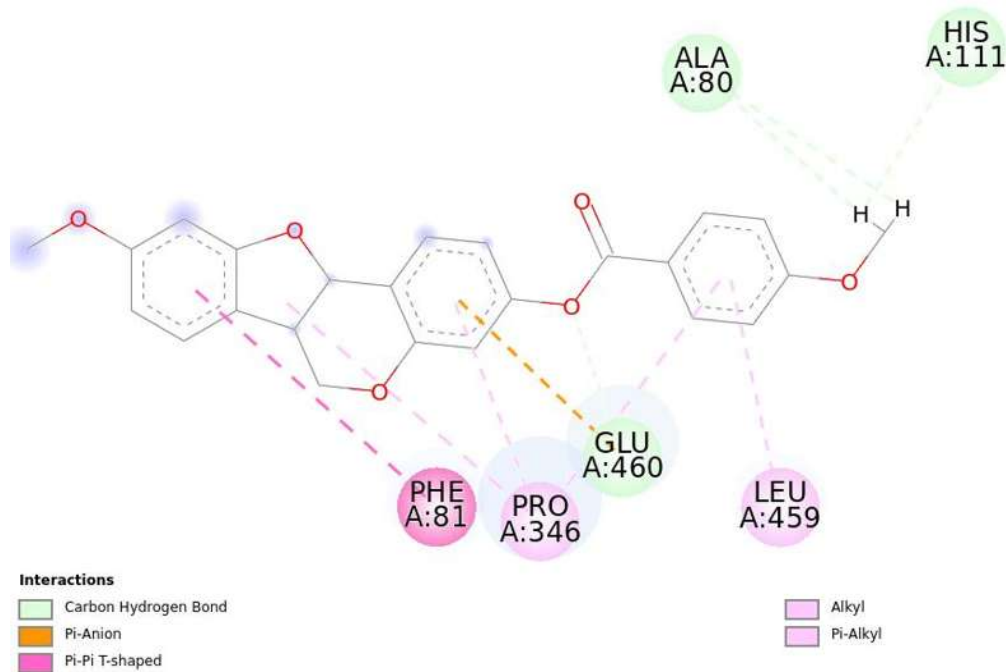
Apéndice E7. Interracciones del derivado Dietilcarbamato de medicarpina obtenidas con Discovery Studio



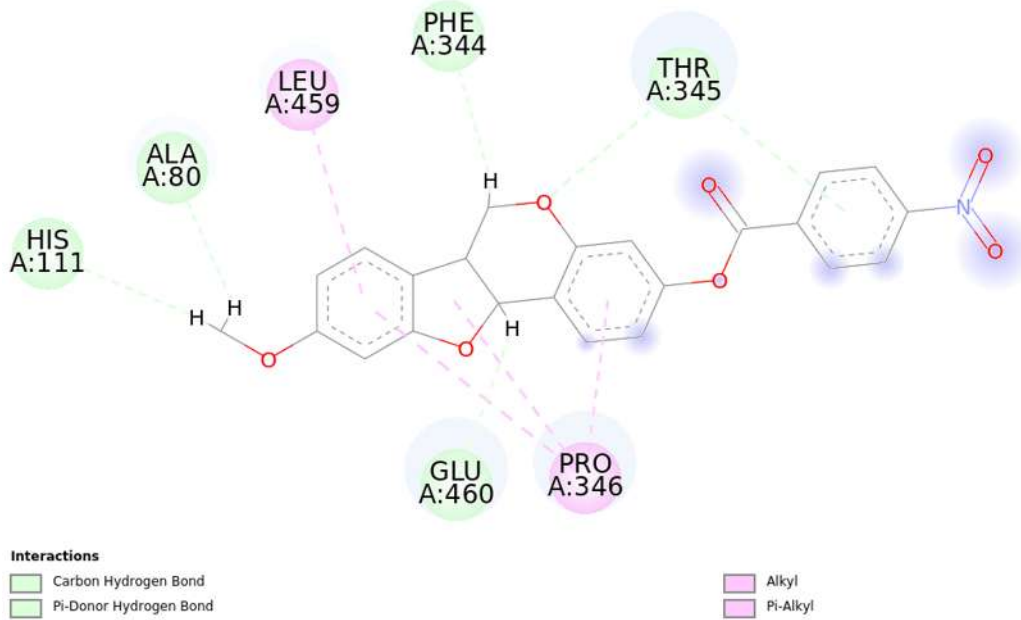
Apéndice E8. Interracciones del derivado Metil éter de medicarpina obtenidas con Discovery Studio



Apéndice E9. Interracciones del derivado Etil éter de medicarpina obtenidas con Discovery Studio



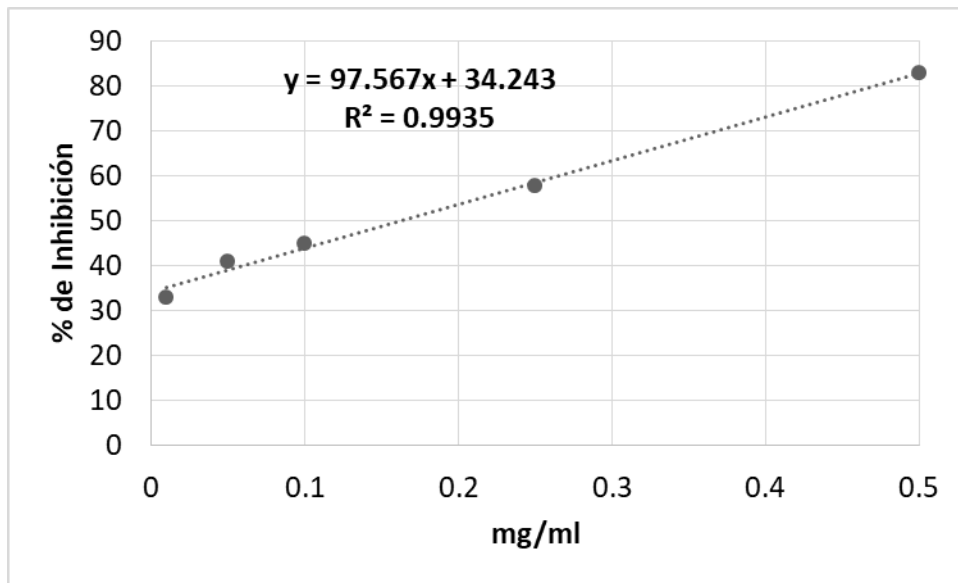
Apéndice E10. Interracciones del derivado *p*-Metoxibenzoato de medicarpina obtenidas con Discovery Studio



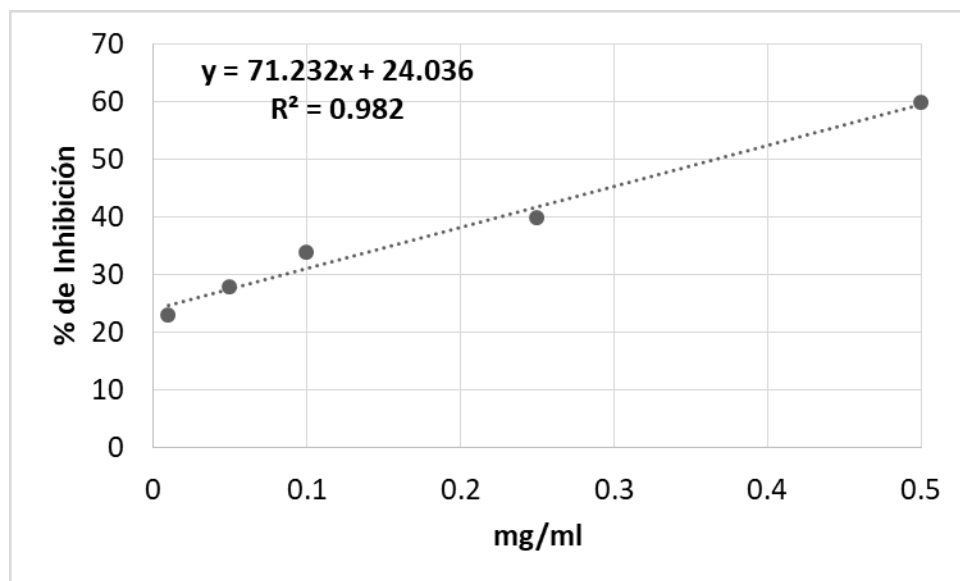
Apéndice E11. Interracciones del derivado *p*-Nitrobenzoato de medicarpina obtenidas con Discovery Studio

11. APÉNDICE DE GRÁFICAS

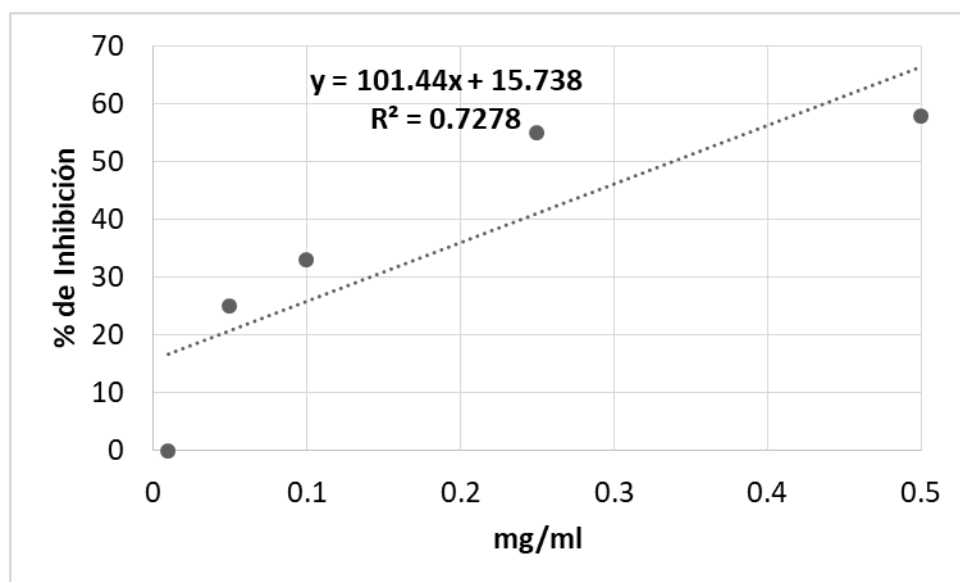
Apéndice F1. Curva de concentración de la chalcona, para calcular CL_{50} y CL_{100} de los porcentajes de inhibición sobre *E. coli*



Apéndice F2. Curva de concentración de chalcona, para calcular CL₅₀ y CL₁₀₀ de los porcentajes de inhibición sobre *S. aureus*.



Apéndice F3. Curva de concentración del flavanól, para calcular CL₅₀ y CL₁₀₀ de los porcentajes de inhibición sobre *S. aureus*.



12. BIBLIOGRAFÍA

Annual Book of Standard, ASTM, (1994). Designation D: 2017-81. Standard method of accelerated laboratory test of natural decay resistance of woods.

Alarcón Aguilar F.J., Hernández Galicia E., Román Ramos R., (2008). Diabetes mellitus y plantas medicinales en México. En Rivas- Vilchis JF (ed.), *Anuario de investigación en etnomedicina, medicinas complementarias y utilización de plantas medicinales*. Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa. pp. 27-39.

Alonso Castro A. J., Salazar Olivo L. A., (2008). The anti-diabetic properties of *Guazuma ulmifolia* Lam. are mediated by the stimulation of glucose uptake in normal and diabetic adipocytes without inducing adipogenesis. *J. Ethnopharmacol.* Vol. 118: pp.252-256

Aquino R., Morelli S., Lauro M.R., Abdo S., Saija A., Tomaino A., (2001). Phenolic Constituents and Antioxidant Activity of an Extract of *Anthurium versicolor* Leaves. *J. Nat. Prod.* 64, pp. 1019-1023.

Andrade Cetto A., (1995). Estudio Etnobotánico y Fitoquímico de plantas útiles en la región de Xochipala Guerrero para el tratamiento de la diabetes NID. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM, México, 93.

Arana A. (2002) Aplicaciones de la Biología Molecular: Identificación del basidiomiceto *Trametes* sp. I-62 y Expresión heteróloga del gen *cg/cc1* en *Kluyveromyces lactis* y *Yarrowia lipolytica*. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, España.

Arencibia D.F., Rosario L. A., Morffi J., Curveco D., (2009). Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. *Retel* 25(3): pp. 22-38.

Arias-Díaz J., Balibrea J., (2007). Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutr Hosp.*, Vol. 22(2): pp. 160-68

Avello M., Suwalsky M., (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepc.)* n.494. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-04622006000200010>

Ávila E. V., Aguilar R. T., Estrada M. j., Ortega M. L., Ramos R. R., (2004). "Cytotoxic activity of *Cuphea aequipetala*". *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, Vol. 47: pp. 129-33.

Ávila L. E., Herrera M. A. (2012). Efecto de los Extraíbles en Tres Propiedades de la Madera de *Enterolobium cyclocarpum* Procedente de Michoacán, México. *Bosque* Vol. 33 num 2, pp 227-232

Bañales Martínez L. R., (2009). Modelo experimental para evaluar la genotoxicidad trasferida por leche materna durante la lactancia. Tesis de Maestría de Ciencias Médicas. Colima, Colima.

Browning B. L. (1963). Composition and chemical reactions of Wood. B. L. Browning, ed. Interscience Publishers, New York. pp. 59

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

Cabrera Miranda C., (2006). Estudio químico de las hojas y tallos de Mimosa aculeaticarpa var. Biuncifera (Benth). Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca de Soto, Hidalgo.

Cabrera Pivaral C.E., Rivera Clara E., Balderas Peña L. M. A., Cabrera Centeno M., Alonso Reynoso C., (2008). Aptitud clínica del médico familiar ante pacientes con diabetes gestacional. Ginecol. Obstet. Mex. Vol. 76 (2): pp. 97-106

Cedano Díaz A., Martínez González S., Escalera Valente F., Salgado Moreno S., Carrillo Díaz F., Macías Coronel H., Peña Parra B., (2012). La prueba de Micronúcleos en Sangre como Bioindicador de Genotóxicos. Abanico Veterinario, Vol. 2 (2), pp. 43-54.

Collins P. J., Dobson A. D. W. (1997). Regulation of *Laccase* gene transcription in *Trametes versicolor*. Applied and Environmental Microb. Vol. 63 (9), pp. 3444-3450.

CONAFOR (2007) Elaboración de Fichas Técnicas sobre las Características Tecnológicas y Usos de Maderas Mexicanas de Interés para las Plantaciones Forestales Comerciales. www.conafor.gob.mx/conacyt-conafor

Córdoba D., (2000). Toxicología. 4ª ed. Colombia: Manual Moderno

Coronado H. M. Vega S., Gutiérrez T. L. R., Vázquez F., Radilla V. C., (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. Rev. Chil. Nutr. Vol. 42 (2), pp. 206-211.

Crawford D.L. (1981). Lignin biodegradation and transformation. Jhon Wiley and Son, New York.

D'Andrea G. M., (2005). Use of antioxidants during chemotherapy and radiotherapy should be avoided. Cancer J Clin. Vol. 55: pp. 319-21.

Darrel D. (1989). Wood Deterioration and its Prevention by Preservative treatments. New York, Syracuse University Press (1). pp 89-92

Dávila G., Vázquez-Duhalt R. (2006). Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales, Mensaje bioquímico, Vol. 30.

Delgado L., Betanzos G., Sumaya M., (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. Investigación y Ciencia. (50), pp. 10-15.

Díaz Vaz O. (2003). Anatomía de maderas. 1a Edición, Valdivia, Chile. pp. 42-43.

Durrant J. D., McCammon J. A., (2010). Computer-aided drug-discovery techniques that account for receptor flexibility. Curr. Opin. Pharmacol. Vol. 10, pp.770–774.

Escamilla Ch., Cuevas E., Guevara J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Rev Fac Med. UNAM. 52 (2): pp. 73-5.

Esquivel Gutiérrez E. R., Noriega Cisneros R., Bello González M. A., Saavedra Molina A., Salgado Garciglia R., (2012). Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. *Biológicas*, Vol. 14 (1): pp. 45 – 52

Flores, M. (2003) Curso de Botánica Sistemática: Apuntes Teóricos y Prácticos. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana – Departamento de Flora. Iquitos – Perú.

Fereidoon Shahidi, Ying Zhong, (2015). Measurement of antioxidant activity. Journal of Functional Foods. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>

Fuic A., Mijic A., (1999). In vitro and in vivo micronucleus tests in genotoxicity research. Arh Hig Rada Toksikol. Vol. 50: pp. 299-306.

García M. L., Pascual T. B., Fernández M. B., (2004). Estudio teórico del modo de unión entre CDK2 y butirolactona I. An. R Acad. Nac. Farm., Vol. 70: pp. 325-356.

García Esteban L., Guindeo Casasús A., Peraza Oramas C., De Palacios P., (2003). La Madera y su Anatomía. Anomalías y Defectos, Estructura Microscópica de Coníferas y Frondosas, Identificación de Maderas, Descripción de Especies y Pared Celular. Primera edición, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

García Ferreyra M. F., Carreras Arancibia H. A., (2008). Análisis de la Genotoxicidad de Material Particulado Recolectado en Dos Ciudades de la Provincia de Córdoba, Argentina, Mediante el Ensayo de Micronúcleos. Theoria, Vol. 17 (1): pp. 33-40

Gilgun Sherki Y., Rozenbaum Z., Relamed E., Offen D. (2002). Antioxidant therapy in Acute Central Nervous System Injury: Current State. Pharmacol Rev. Vol. 54: pp. 271-84.

Gochev V. K. and Krastanov A. (2007). Fungal laccases; review, Bulgarian Journal of Agricultural Science, vol. 13, pp. 75-83.

Goldstein I. S., (1991). Overview of the chemical composition of wood. In wood structure and composition. Lewin M., Goldstein I. S., Ney York, Marcel Dekker, Inc. pp. 1-6.

Gomez M., Zuñiga G., (2007). Genotoxicidad y potencial teratógeno. La Ciencia y el Hombre. 20 (3), pp. 57-62.

Gonzales G., (2012). Patologías bióticas de la maderas de los bosques templados de Chile, a la selva Atlántica de Misiones. Tesina.

Gonzales A. E., Grinbergs J. and Griva E. (1986). Biologische Umwandlung von Holz. Palo podrido Zentrblatt für Mikrobiologie, pp 181.186.

Götze J. P., Bühl M., (2016). Laccase Redox Potentials: pH Dependence and Mutants, a QM/MM Study. *J. Phys. Chem. B*, Vol. 120, pp. 9265–9276. DOI: [10.1021/acs.jpcc.6b04978](https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b04978)

Griffiths A., Miller J., Suzuki D., Lewontin R., Gelbart W. (2000). *An introduction to genetic analysis*. 7^a ed. USA: Freeman and company.

Guo X., Tresserra Rimbau A., Estruch R, Martínez González M. A., Medina Remón A., Castañer O., Corella D., Salas Salvadó J., Lamuela Raventós R. M., (2016). Effects of Polyphenol, Measured by a Biomarker of Total Polyphenols in Urine, on Cardiovascular Risk Factors After a Long-Term Follow-Up in the PREDIMED Study. *Barcelona, Spain. Hindawi. Pp. 11.*
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/2572606>.

Gutiérrez Lugo M. T., Woldemichaely G. M., Singh M. P., Suarez P. A., Maiese W. M., Montenegro G., Timmermann B. N., (2005). Isolation of three new naturally occurring compounds from the culture of *micromonospora* sp. p1068. *Natural Product Research*, Vol. 19 (7), pp. 645–652.

Gutiérrez Zavala Á., Ledesma Rivero L., García García I., Grajales Castillejos O., (2007). Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México *Revista Cubana de Salud Pública*, vol. 33, núm. 1.

Hatanaka Y., Kitagawa Y., Toyoda Y., Kawata T., Ando N., Kawabata Y., Iwai M., Arimura H., (1992). Micronucleus test with cyclophosphamide using mouse peripheral blood reticulocytes. *Mutat Res.* 278: pp. 99-101.

Heddle J., Cimino M., Hayashi M., Romagna F., Shelby M., Tucker J., McGregor J., (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ Mol Mutag.* Vol. 18: pp. 277-291.

Highley *et al.*, (1994). *Research on Biodeterioration of Wood, 1987-1992. I: Decay mechanisms and Biocontrol.* Pp. 20.

Hilmer *et al.* (2016). Method for biotechnological production of dihydrochalcones. U.S. Patent, N. 9, 359, 622B2.

Hon David N. S., Shiraishi Nobuo, (2001). *Wood and Cellulosic Chemistry. Second Edition, revised and Expanded.* New York, Basel, pp 243-268.

Huang S.Y., Grinter S. Z., Zou X., (2010). Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: Recent advances and future directions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* Vol. 12, pp. 12899–12908.

Hunt L. M., Arar N. H., Akana L. L., (2000). Herbs, prayer, and insulin: use of medicinal and alternative treatments by a group of Mexican American diabetes patients. *J. Fam. Pract.* Vol. 49: pp. 216-23.

Johannes C. and Majcherczyk A., (2000). Laccase activity test and laccase inhibitors. *J. Biotechnol*, 78(2), pp. 193–199.

Klaassen, C. D., Watkins J. B. (2001). *Manual de Toxicología*. 5ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana.

Klein S., Wadden T., Sugerman H. J., (2002). AGA technical review on obesity. *Gastroenterology* 123(3): pp. 882-932

Khalaf, N. A., Shakya, A. K., Al-Othman, A., El-Agbar, Z., Farah, H. (2008). Antioxidant activity of some common plants. *Turkish Journal of Biology*, 32, pp. 51-55.

Komazawa *et al.* (1992). Anti-ulcer agent comprising chalcone derivative as effective ingredient and novel chalcone derivative. U.S. Patent, N. 5,106, 871.

Kunamneni A., Ballesteros A., Plou F. J., Alcalde M., (2007). Fungal laccase a versatile enzyme for biotechnological applications. Departamento de biocatálisis, Instituto de catálisis y petroleoquímica, CSIC, 28049. Madrid, Spain.

Kumar Chaudhary K., Nidhi Mishra, (2016). A Review on Molecular Docking: Novel Tool for Drug Discovery. *JSM Chem Vol. 4 (3)*: pp. 1029.

Lagarto A., Sánchez E., Piloto J, Remigio A., Barzaga P., Rodríguez C., Carballo C., Couret M., Vega Y., López R., (2014). Evaluación preclínica y estudio de estabilidad de extractos a partir del follaje de *Momordica charantia* Lin. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.16, n.4, p.782-788.

Lazalde Ramos B. P., Quirarte Báez S. M., Zamora Pérez A. L., Báez Lozano B. R., Gutiérrez Hernández B., (2016). Efecto antimicronucleogénico y citoprotector del extracto acuoso de Romero (*Rosmarinus officinalis*) en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2. *CIMEL*, Vol. 21 (2), pp. 10-13.

Lee K. H., (2004). "Current development in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product leads". *J. Nat. Prod.*, Vol. 67: pp. 273-283.

Lenzen S., (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Institute of Clinical Biochemistry, Hannover Medical School, 30623 Hannover, Germany. *Diabetologia*, 51: 216–226. DOI 10.1007/s00125-007-0886-7

Li Y., Ambrosone Ch., Cullough Mc, Ahn M., Stevens J., Thun V., Hong M., (2009). Oxidative stress-related genotypes, fruit and vegetable consumption and breast cancer risk. *Carcinogenesis*. 2009; 30 (5): 777-84

Liese W., (1970). Ultrastructural aspect of woody tissue desintegration. *Annu. Rev. Phytopathol*, vol. 8, pp. 231-257.

Lodish H., Berk A, Zipursky S, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. (2002). *Biología Celular y Molecular*. 4ª ed. España: Médica Panamericana.

López Luengo M. T., (2006). Plantas medicinales con actividad hipoglucemiante; *Características, administración y efectos adversos*. *Ámbito-Farmacéutico, Fitoterapia*, Vol. 25 (5), pp. 82-88.

Madhavi and Lele (2009). Laccase Properties, Use. *BioResources*, vol. 4(4), pp. 1694-1717

Mahmood Dar A., Mir S., (2017). Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges. *J Anal. Bioanal. Tech.*, Vol. 8 (2). DOI: 10.4172/2155-9872.1000356

Mann J. I., (2002). Diet and risk of coronary heart disease and type 2 diabetes. *Lancet*. 360:783-789.

Martínez, M.C. (2012). Evaluación de la actividad antifúngica de diferentes extractos del duramen de *Dalbergia congestiflora* Pittier y aislamiento e identificación del componente con actividad biológica. Tesis Maestría en Ciencias y Tecnología de la Madera. UMSNH. Morelia Michoacán.

Martinez-Sotres C, Jose G. Rutiaga, Rafael Herrera, Marco Gallo and Pablo Lopez-Albarran (2015). Molecular docking studies on the inhibitory effect of medicarpin in a *Trametes versicolor* laccase has been submitted. *Molecular Simulation. Wood Sci Technol*. 49(4), pp. 857–868.

Menéndez Valderrey J. (2006). *Trametes versicolor* (L.). Pill Asturnatura.com

Mohan V., Gibbs A. C., cuminnings M. D., Jaeger E. P., Desjarlais R. L., (2005). Docking: Successes and Challenges. *Current Pharmaceutical Design*, Vol. 11, pp. 323-333

Morales P. F. G. (2016). Análisis espectroscópico de compuestos del duramen de maderas durables que inhiben a *Trametes versicolor*. Tesis Maestría en Ciencias y Tecnología de la Madera. UMSNH. Morelia, Michoacán.

Mosquera O. M., Corraera Y. M., Niño J., (2009). Antioxidant activity of plant extracts from Colombian flora. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19, pp. 382-387.

Mori M., Doi S., Kanetoshi A., Hayashi T., (1995). Atifungal activity of bark extracts of conifers. *Holz als roh-und Werkstoff*. Vol. 53, pp. 81-82.

Murace M., Spavento E., (2014). Curso Xilotecología; Durabilidad de las Maderas. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. UNLP. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Murillo E., Tique M. M., Ospina L. F., Lombo O., (2006). Evaluación preliminar de la actividad hipoglucemiante en ratones diabéticos por aloxano y capacidad antioxidante in vitro de extractos de *Bauhinia kalbreyeri* Harms. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm*. Vol. 35 (1), pp. 64-80.

Nahar N., Rokeya B., Ali L., Hassan Z., Nur-e-Alam M., Chowdhury N.S., Azad Khan A. K., Mosihuzzaman M., (2000). Effects of three medicinal plants on blood glucose levels of nondiabetic and diabetic model rats. *Diab. Res.* Vol. 35: pp. 41-49.

Núñez Sellés A., (2011). Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. *Rev Cubana Salud Pública.* Vol. 37 (suppl.): pp.644-60.

Nur Alam M., Jahan Bristi N., Rafiquzzaman M., (2012). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal.* Jahangirnagar University, Savar, Dhaka-1342, Bangladesh. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>

Ohnogi *et al.* (2007). *Remedies.* U.S. Patent, N. 7,268,160B2.

Okoli I. P., Osonwaw U. E., Ajaghaku D. L., Anwuchaepe A. U., (2018). Hypoglycemic effect of the methylene chloride-methanolic extract of the fresh and dried fruits of *Gongronema latifolium* in normoglycemic and alloxan-induced diabetic rats. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, BIOCHEMISTRY AND PHARMACOLOGY.* Vol. 7, (1), pp. 16–23. DOI: 10.5455/ajpbp.20180507124130

Ortiz Andradea R., Torres Piedra M., Sánchez Salgadoa J. C., García Jiménez S., Villalobos Molina R., Ibarra Barajas M., Gallardo Ortiz I., Estrada Sotoa S., (2009). Acute and sub-chronic effects of *cochlospermum vitifolium* in blood glucose levels in normoglycemic and stz-nicotinamide-induced diabetic rats. *Rev. latinoamer. Quím.* Vol. 37/2.

Parra Naranjo A., Delgado Montemayor C., Fraga López A., Castañeda Corral G., Salazar Aranda R., Acevedo Fernández J. J., Waksman N., (2017). Acute Hypoglycemic and Antidiabetic Effect of Teuhetenone A Isolated from *Turnera diffusa*. *Molecules* 2017, 22, 599; doi:10.3390/molecules22040599.

Patel K., Singh G. K., Patel D. K., (2014). A Review on Pharmacological and Analytical Aspects of Naringenin. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, Vol. 24 (7), pp. 551–560. doi:10.1007/s11655-014-1960-x

Pereira A. C., Arruda M. S. P., Da Silva E. A. S., Da Silva M. N., Lemos V. S., Cortes S. F., (2012). Inhibition of α -glucosidase and hypoglycemic effect of stilbenes from the Amazonian plant *Degueliarufescens* var. *Urucu* (Ducke) (Leguminosae). *Planta Med.* Vol. 78(1): pp. 36-38

Pettersen R.C. (1984). The chemical composition of wood. En: *The Chemistry of Solid Wood*, Rowell, R. M. (Ed.), *Advances in Chemistry Series 20*, American Chemical Society.

Piontek K., Antorini M., Choinowski T., (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J Biol Chem* 277(40), pp. 37663–37669.

Pisoschi M. A., Negulescu G. P., (2011). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochem & Anal Biochem*. Vol. 1:1. <http://dx.doi.org/10.4172/2161-1009.1000106>

Prasad K. N., Cole W. C., (2006). Antioxidants in chemotherapy. *J Clin Oncol*. Vol. 24(6): pp. 8-9.

Quevedo T. L. (2012). Evaluación de la Actividad Antifúngica de la Acetil-Medicarpina. Tesis para obtener el título de QFB. UMSNH. Morelia, Michoacán.

Quevedo T. L. (2015). Estudio químico y evaluación antifúngica del duramen de maderas finas y comparación con la actividad de derivados de medicarpina. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas. IIQB, UMSNH. Morelia, Michoacán.

Quintero J., Feijoo G., Lema J. (2006). Producción de Enzimas Ligninolíticas con Hongos Basidiomicetos Cultivados Sobre Materiales Lignocelulósicos. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Vol. 13 (2), pp 61-67.

Quiñones M., Miguel M., Alexandre A., (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp*. Vol. 27 (1): pp. 76-89.

Rao B., Subramanian C., Sharma S. D., (2009). Managing protein flexibility in docking and its applications. *Drug Discovery Today*, 14(7-8), 394–400. doi:10.1016/j.drudis.2009.01.003

Reddy, A. S., (2007), Virtual screening in drug discovery – a computational perspective. *Curr Protein Pept Sci*, Vol. 8 (4): pp. 329–51

Rowell R. M., Pettersen R., Han J. S., Tshabalala M. A. (2005). Cell wall chemistry, in handbook of chemistry and wood composites. Rowell R. M., (Ed) Boca Raton: Taylor & Francis Group, pp. 62-63.

Ruiz-Teran F., Medrano-Martinez A., Navarro-Ocaña A. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of plant extracts used in traditional medicine in Mexico. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 7 (12), pp. 1886-1893.

Rutiaga Q., Windeisen E. and Schumacher P. (1995). Antifungal activity of heartwood extracts *Dalbergia granadillo* and *Enterolobium cyclocarpum*. *Holz als Roh-und Werkstoff*. Vol. 53(5), pp. 308-309.

Rutiaga Quiñones J. (2001). Chemische und biologische Untersuchungen zum Verhalten dauerhafter Holzarten und ihrer Extrakte gegenüber holzabbauenden Pilzen. Buchverlag Gräfeffing. Germany. 201 S.

Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H., Kanazawa K., (2003). Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits, and Teas. *J. Agric. Food Chem*. 51, pp. 571-581.

Salcedo P. E., Hernández A. E., Vázquez G. A. J., Escoto G. T., Díaz E. N. (2012). Los recursos forestales del Occidente de México: Biodiversidad, manejo, producción, aprovechamiento y conservación. Tomo II. Primera Edición. México. Pp. 212.

Salehi B., Tsouh Fokou P. V., Sharifi Rad M., Zucca P., Pezzani R., Martins N., Sharifi Rad J., (2019). The Therapeutic Potential of Naringenin: A Review of Clinical Trials. *Pharmaceuticals* Vol. 12 (11); doi:10.3390/ph12010011

Salisbury F., Ross C., (1992). *Fisiología Vegetal*. México. D. F, México: Grupo Editorial Iberoamericano.

Sánchez Salgado J.C., Ortiz Andrade R.R., Aguirre Crespo F., Vergara Galicia J., León Rivera I., Montes S., Villalobos Molina R., Estrada Soto S., (2007). Hypoglycemic, vasorelaxant and hepatoprotective effects of *Cochlospermum vitifolium* (Willd.) Sprengel: A potential agent for the treatment of metabolic syndrome. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 109: pp. 400-405.

Sánchez Salgado J. C., Castillo España P., Ibarra Barajas M., Villalobos Molina R., Estrada Soto R., (2010). *Cochlospermum vitifolium* induces vasorelaxant and antihypertensive effects mainly by activation of NO/cGMP signaling pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.130, pp. 477–484.

Santander K., (2007). Durabilidad natural de *Acacia melanoxylon* R. Brown frente al ataque de hongos xilófagos. Tesis Licenciatura. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Forestales.

Schwarze F.W. M. R., Engels J., Mattheck C., (2000). *Fungal Strategies of Wood Decay in Trees*, Springer, Heidelberg.

Sepúlveda J., Porta D. y Rocha S., (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 21 (3), pp. 255-263.

Shah V., Nerud F., (2002). Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye Decolorization. *Can J. Microbiol*, vol. 48, pp. 857-870.

Sierra Sarmiento M. A., Barros Algarra R., Gómez Paternina D., Mejía Teran A., Suarez Rivero D., (2018). *Productos Naturales: Metabolitos Secundarios y Aceites Esenciales*. E-Book, UNIAGRARIA. Bogotá, Colombia. Pp. 9-12

Singh, R., Jain, S. C., & Jain, R., (2009). Antioxidant activity of some medicinally important arid zone plants. *Asian Journal of Experimental Science*, 23, pp. 215-221.

Soutelo Jiménez A., García López A., Rojas Vargas J., Hernández Molina Y., (2016). Obtención de modelos de relación cuantitativa estructura actividad (QSAR) para la predicción de actividad antibacteriana en series heterogéneas de compuestos. *Rev. Cubana Quím.* Vol. 28 (1)9, pp. 462-489.

Stoilova I., Krastanovi A., Stanchev V., (2010). Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, Vol. 1, pp. 208-215. doi:10.4236/abb.2010.13029.

Sudasinghe H. P., Peiris D. C., (2018). Hypoglycemic and hypolipidemic activity of aqueous leaf extract of *Passiflora suberosa* L. *Peer J.*, DOI 10.7717/peerj.4389

Sumner J., (2001). *The natural history of medicinal plants*. Timber Press. Portland. Pp. 235.

Szkudelski, T. (2001). The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic *Physiol. Res.* 50: 536-546

Taiz L., Zeiger E., (2002). *Plant Physiology*. Sunderland, United States: Editorial Sinauer Associates, Inc., Publishers.

Thirakul S., (1998). Manual de Dendrología para 146 Especies Forestales del Litoral Atlántico de Honduras 1. 2a Edición, Honduras. Pp. 9-16.

Thurston C. F., (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 40, 19-26.

Torres Bugarín O., Ramos Ibarra M. I., (2013). Utilidad de la prueba de micronúcleos y anormalidades nucleares en células exfoliadas de mucosa oral en la evaluación de daño genotóxico y citotóxico. *Int. J. Morphol.*, Vol. 31(2): pp. 650-657.

Tuset R., Durán F., (1979). Manual de Maderas Comerciales, Equipos y Procesos de Utilización. Editorial Hemisferio Sur. Montevideo, Uruguay.

U.S. Congress Office of Technology Assessment, (1990). Unconventional cancer treatments. U.S. Government Printing Office. Washington. Pp. 300.

Vázquez Rodríguez E., (2015). Actividades biológicas de extractos de plantas y de sus combinaciones. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid Facultad de Ciencias. Madrid.

Velásquez M., Drosos J., Gueto C., Márquez J., Vivas Reyes V., (2013). Método acoplado Autodock–PM6 para seleccionar la mejor pose en estudios de acoplamiento molecular. *Rev. Colomb. Quim.* Vol. 42 (1).

Venereo Gutiérrez J. R., (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cubana Med. Milit.* Vol. 31 (2), 1 pp. 26-33.

Von Hunolstein C., Valenti P., Visca P., Antonini G., Nicolini L., Orsi N., (1986). Production of laccases A and B by a mutant strain of *Trametes versicolor*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* Vol. 32, pp. 185–191.

Waizel Bucay J., Martínez Porcayo G., Villarreal Ortega M. L., Alonso Cortés D., Pliego Castañeda P., (2003). "Estudio preliminar etnobotánico, fitoquímico, de la actividad citotóxica y antimicrobiana de *Cuphea aequipetala* Cav. (Lythraceae)". Polibotánica, Vol. 15: pp. 99-108.

Wolff J., (1989). Utilización del Pino Oregón (*Pseudotsuga menziessi* (Mirb.) en la fabricación de tableros de partículas para el uso en exteriores. Tesis Universidad Austral de Chile.

World Health Organization Global Report on Diabetes. Available online: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf (Acceso 10 febrero 2017).

Xu F., (1996). Oxidation of Phenols, Anilines, and Benzenethiols by Fungal Laccases: Correlation between Activity and Redox Potentials as Well as Halide Inhibition. *Biochemistry*, Vol. 35 (23), pp. 7608–7614.

Yeh G., (2003). Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes. *Diabetes Care*, Vol. 26: pp. 1277-1294.

Zabel R. A. y Morrell J. J. (1992). Wood microbiology: Decay and its prevention. Academic Press, London. 476p.

Zúñiga G., Ramírez M. P., Torres O., Pérez J., Ramos A., Zamora A., Gallegos M. P., Sánchez J., (1998). Induction of micronuclei in the domestic cat (*felis domesticus*) peripheral blood by colchicine and cytosine-arabinoside. *Mutat Res.* 413: pp. 187-189.

Zúñiga G., Torres B., Zamora P., Gomez M., Ramos I., Martinez G., Gonzales R., Luna A., Ramos M., Ontiveros L., Gallegos A., (2001). Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans. Spontaneous micronuclei in 43 specie. *Mutat Res.* 494, pp. 161-167.