



Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

“Estudio estructural de metabolitos secundarios aislados de organismos marinos y terrestres del estado de Veracruz”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias en Alimentos

PRESENTA:

M.C. Araceli Ortiz Celiseo

ASESORES:

Dr. Gerardo Valerio Alfaro

Dra. Rosa María Oliart Ros

Dr. Francisco Abelardo Cen Pacheco

H. Veracruz, Ver.

Febrero 2019

“Estudio estructural de metabolitos secundarios aislados de organismos marinos y terrestres del estado de Veracruz”

Por

M.C. Araceli Ortiz Celiseo

Tesis propuesta a la

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN ALIMENTOS DEL INSTITUTO
TECNOLÓGICO DE VERACRUZ

Como requerimiento parcial para obtener el grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

Febrero, 2019

Este trabajo es el resultado de la suma de muchos esfuerzos, el mío es solo una pequeña parte de ellos. Llegar a esta etapa de mi vida no habría sido posible sin el apoyo de una lista interminable de personas, es por eso que dedico esta tesis con todo cariño y agradecimiento

A DIOS:

Porque nunca me has dejado sola, porque éste logro es por ti y para ti Señor, gracias porque me das sabiduría y fortaleza para enfrentar cualquier obstáculo de la vida, por toda la luz que has proyectado en mi camino y por todas las grandes personas que siempre has puesto en mi camino. Gracias por levantarme en mis fracasos y aprender de ellos y permitirme realizar un sueño más en mi vida.

A MIS PADRES:

Carlos Ortiz y Celia Celiseo

Por su gran apoyo que siempre me han demostrado, por su amor, cariño y comprensión en los momentos más difíciles y alegres de mi vida, gracias Papi porque siempre has estado para cuidarme y protegerme, agradezco tu paciencia, confianza y apoyo en mis innumerables proyectos. A ti Mamita, pues es la realización de todo tu amor, dedicación e incansables esfuerzos, siéntete orgullosa de tu gran trabajo como madre, porque eres la mejor mamá del mundo. Gracias por tu escucha constante, por tu apoyo incondicional y sobre todo por tu amor.

A MIS FAMILIARES:

A mis hermanos: Carlos, Javier, Heriberto, Oscar y Zayra, por siempre motivarme y ser pilares en mi vida, por su confianza y por estar siempre conmigo. A Nohemi, Eli y Luis, por su cariño y apoyo. Como no dedicártelo a ti Laura, gracias por ser un pilar en mi vida, por todas las palabras que siempre tienes para mí y por tu cariño, a mis sobrinos y sobrinas: Julio, Jose Manuel, Aby, Faty, Vale, Víctor, Erick, Misael y claro a Zaray por el apoyo, por escucharme y por tu compañía

A MIS AMIGOS:

A mis amigos incondicionales: Rocío, Escarlet, Faby, Jus, Diego, Javier, Eduardo, Alejandro, Omar, Mayra, Pedro, Gregorio, Nestor, Susana, con cada uno, una historia especial, gracias por estar siempre que los he necesitado, con este trabajo cerramos con broche de oro un gran ciclo. Y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en mi formación.

A TI JUAN:

Gracias por tus consejos y alegrías, gracias por estar a mi lado en estos momentos y en esta última etapa de mi formación, por tu paciencia y apoyo, por tu comprensión y por las inolvidables experiencias que hemos vivido. Sin lugar a dudas el inicio de muchos sueños por realizar y el inicio de una nueva etapa.

RECONOCIMIENTOS

A mis asesores, Dr. Gerardo Valerio Alfaro, Dra. Rosa María Oliart Ros por su confianza, por todo su tiempo y apoyo brindados durante la realización de este trabajo y por supuesto a mi asesor, el Dr. Francisco A. Cen Pacheco por su presencia incondicional, por sus críticas, aportes, por sus conocimientos, por su orientación, por su manera de trabajar y sobre todo por su persistencia y motivación las cuales han sido fundamentales en el desarrollo de esta investigación y en mi formación.

A los miembros de mi comité revisor, Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga, Dra. Guadalupe del C. Rodríguez Jimenes, Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz y Dr. Oscar González Ríos, por el tiempo dedicado a la revisión y sugerencias que enriquecieron a este trabajo.

A todos los profesores investigadores de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, que participaron en mi formación académica, a todas las personas del laboratorio de Bioprocesos, que me aceptaron y recibieron en su momento como parte de su grupo de trabajo, cada uno de ellos aportando conocimiento enriquecedor en mi formación.

A la Universidad Veracruzana, Facultad de Bioanálisis, por permitió realizar gran parte de este proyecto en sus instalaciones y todos los chicos que me apoyaron y que estuvieron presentes en este tiempo: Mayra, Omar, Nino, Alejandro, José, Eduardo, Javier, Fabiola, Martín.

RESUMEN

Araceli Ortiz Celiseo D. en C. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. “Estudio estructural de metabolitos secundarios aislados de organismos marinos y terrestres del estado de Veracruz”. Asesores: Dr. Gerardo Valerio Alfaro, Dra. Rosa María Oliart Ros y Dr. Francisco Abelardo Cen Pacheco.

El hombre ha hecho uso de los beneficios provenientes de la naturaleza, utilizando plantas terrestres y especies marinas para el tratamiento de sus enfermedades. Esta información ha permitido encontrar una gran cantidad de principios activos con estructuras novedosas, dando lugar a una gran cantidad de los fármacos que se usan en la actualidad. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue extraer, purificar y elucidar la estructura de metabolitos secundarios de la planta *Azadirachta indica* y de las esponjas *Ectyoplasia ferox* y *Amphimedon compressa*, recolectados en el estado de Veracruz. La metodología para la obtención de los metabolitos secundarios consistió en: i) extraer el material biológico por maceración en frío; ii) fraccionamiento de los extractos de cada una de las especies mediante el método de Kupchan; iii) Se aislaron y purificaron los metabolitos secundarios presentes en estas fracciones, utilizando diferentes tipos de cromatografías, para las purificaciones finales se utilizó HPLC semipreparativo. Los fraccionamientos se siguieron por cromatografía en CCF y RMN ¹H.

Como resultado de este trabajo se han obtenido dos nuevos metabolitos, 3-*O*-butil(-)-epicatequina (**63**) y 3-*O*-butil(-)-epigalocatequina (**64**), además de seis compuestos ya reportados en la literatura, que se aislaron de la corteza de *Azadirachta indica*. Las estructuras de todos los compuestos, nuevos y ya reportados, se establecieron mediante análisis de técnicas espectroscópicas antes mencionadas y mediante ESI-HRMS. Es importante destacar que las estructuras de los nuevos metabolitos **63** y **64**, representan uno de los pocos ejemplos de compuestos naturales con un grupo *n*-butil éter en la naturaleza. De la esponja marina *Ectyoplasia ferox*, se aisló el compuesto estigmast-5-en-3-ol (**71**) y el ciclopeptido ectioplasina (**72**). El compuesto **71** también conocido como β-sitosterol, ya había sido aislado por Gauvin *et al.* (1988) de la esponja marina *Petrosia spheroida*. Sin embargo, ectioplasina (**72**) es un nuevo ciclopeptido que no ha sido reportado previamente en la literatura. En el caso de la esponja *Amphimedon compressa*, sólo se realizaron fraccionamientos preliminares y no se obtuvieron compuestos puros ya que la cantidad no era la suficiente para seguir purificando

ABSTRACT

Araceli Ortiz Celiseo D. en C. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. “Estudio estructural de metabolitos secundarios aislados de organismos marinos y terrestres del estado de Veracruz”. Asesores: Dr. Gerardo Valerio Alfaro, Dra. Rosa María Oliart Ros y Dr. Francisco Abelardo Cen Pacheco.

Man has made use of the benefits of nature, using terrestrial plants and marine species for the treatment of their diseases. This information has allowed us to find a large number of active ingredients with novel structures, giving rise to a large number of drugs currently used. For this reason, the objective of this work was to extract, purify and elucidate the structure of secondary metabolites of the plant *Azadirachta indica* and sponges *Ectyoplasia ferox* and *Amphimedon compressa*, collected in the state of Veracruz. The methodology for obtaining the secondary metabolites consisted of: i) extracting the biological material by cold maceration; ii) fractionation of the extracts of each of the species by the Kupchan method; iii) Secondary metabolites present in these fractions were isolated and purified, using different types of chromatographies, semipreparative HPLC was used for the final purifications. The fractions were followed by chromatography on TLC and ^1H NMR.

As a result of this work we have obtained two new metabolites, 3-O-butyl(-)-epicatechin (**63**) and 3-O-butyl(-)-epigallocatechin (**64**), in addition to six compounds already reported in the Literature, which were isolated from the bark of *Azadirachta indica*. The structures of all the compounds, new and already reported, were established by means of analysis of the aforementioned spectroscopic techniques and by means of ESI-HRMS. It is important to note that the structures of the new metabolites **63** and **64** represent one of the few examples of natural compounds with a n-butyl ether group in nature. From the marine sponge *Ectyoplasia ferox*, the compound stigmast-5-en-3-ol (**71**) and the cyclopeptide ectioplasin (**72**) were isolated. Compound **71** also known as β -sitosterol, had already been isolated by Gauvin *et al.* (1988) of the marine sponge *Petrosia spheroida*. However, ectioplasin (**72**) is a new cyclopeptide that has not been previously reported in the literature. In the case of the *Amphimedon compressa* sponge, only preliminary fractions were carried out and no pure compounds were obtained since the quantity was not enough to continue purifying.

CONTENIDO

Resumen	iii
Abstract	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE SIMBOLOS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. <i>Medicina tradicional</i>	3
2.1.1 La medicina tradicional en el mundo.....	4
2.2. <i>Fuentes vegetales</i>	5
2.3. <i>Extractos naturales de origen marino</i>	7
2.4. <i>Productos Naturales</i>	10
2.4.1. Purificación biodirigida	10
2.4.2. Purificación mediante análisis estructural.....	11
2.5. <i>Metabolitos primarios y secundarios</i>	13
2.6. <i>Azadirachta indica A. Juss</i>	14
2.6.1. Usos tradicionales de <i>Azadirachta indica</i>	15
2.6.2. Actividades observadas en <i>Azadirachta indica</i>	16
2.6.3. Metabolitos secundarios aislados de <i>Azadirachta indica</i>	17
2.6.4. Efecto acaricida de la semilla del árbol de “neem” sobre garrapatas <i>Rhipicephalus microplus</i>	25
2.7. <i>Esponja Ectyoplasia ferox</i>	26
2.7.1. Actividad biológica de <i>Ectyoplasia ferox</i>	26
2.7.2. Metabolitos aislados de <i>Exctyoplasia ferox</i>	27
2.8. <i>Esponja Amphimedon compressa</i>	30
2.8.1 Actividad biológica de <i>Amphimedon compressa</i>	31
2.8.2 Metabolitos aislados de <i>Amphimedon compressa</i>	31
3. OBJETIVOS	36
3.1 <i>Objetivo General</i>	36
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	36
4. MATERIALES Y METODOS	37
4.1. <i>Recolección de los especímenes</i>	37
4.2. <i>Maceración de los especímenes</i>	38
4.3. <i>Extracción y partición de los especímenes</i>	39
4.4 <i>Técnicas cromatográficas</i>	41

4.4.1. Cromatografía de exclusión	42
4.4.2. Cromatografía de fase normal.....	42
4.4.3. Cromatografía en columnas de media presión	42
4.4.4. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	43
4.5. <i>Técnicas Espectroscópicas</i>	43
4.5.1. Resonancia Magnética Nuclear.....	43
4.5.2. Espectroscopia Infrarroja.....	44
4.5.3. Espectrometría de Masas	45
4.5.4. Rotación óptica	45
4.5.5. Espectroscopía de absorción en el Ultravioleta-Visible.....	45
4.6. <i>Actividad acaricida de fracciones y compuestos puros in vitro</i>	45
4.6.1. Colección de garrapatas	45
4.6.2. Actividad acaricida de compuestos puros <i>in vitro</i>	46
4.6.3. Análisis estadístico de mortalidad acaricida	47
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
5.1. <i>Metabolitos aislados de la corteza de Azadirachta indica</i>	49
5.1.1 Obtención de 3- <i>O</i> -butil(-)-epicatequina	49
5.1.2 Obtención de 3- <i>O</i> -butil(-)-epigallocatequina.....	52
5.1.3 Obtención de (-)-epicatequina, (+)-galocatequina y (-)-epigallocatequina	55
5.1.4 Obtención de azadiractina, trilinoleina y ácido octadecanoico-tetrahidrofurano-3,4-diil éster.....	59
5.2. <i>Metabolitos aislados de las semillas de Azadirachta indica</i>	62
5.2.1 Obtención del octadecanoil-tetrahidrofurano-3,4-diil éster	62
5.3 <i>Estudio de elucidación estructural de los compuestos aislados de corteza</i>	65
5.3.1. Estudio de elucidación estructural de 3- <i>O</i> -butil(-)-epicatequina (compuesto nuevo).....	65
5.3.2. Estudio de elucidación estructural de 3- <i>O</i> -butil(-)-epigallocatequina (compuesto nuevo).....	75
5.3.3. Estudio de elucidación estructural de compuestos ya reportados	86
5.4. <i>Actividad acaricida de los compuestos aislados de corteza de Azadirachta indica</i>	97
5.5. <i>Metabolitos aislados de la esponja Ectyoplasia ferox</i>	98
5.5.1 Obtención de β -sitosterol.....	98
5.5.2 Obtención de Ectyoplasin	99
5.6 <i>Estudio de elucidación estructural de los compuestos aislados de Ectyoplasia ferox</i>	101
5.6.1. Estudio de elucidación estructural de β -Sitosterol (compuesto reportado).....	101
5.6.1. Estudio de elucidación estructural de Ectyoplasin (compuesto nuevo)	108
5.7. <i>Metabolitos aislados de la esponja Amphimedon compressa</i>	116
5.7.1 Metabolitos aislados de la esponja <i>Amphimedon compressa</i>	116
5.8. <i>Estudio de elucidación estructural de los compuestos aislados de Amphimedon compressa</i>	116
6. CONCLUSIONES	120
7. BIBLIOGRAFIA	121

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1	Compuestos aislados usados directamente como fármacos.....	6
FIGURA 2.2	Ejemplo de compuestos precursores de fármacos.....	6
FIGURA 2.3	Fármacos de origen marino.....	9
FIGURA 2.4	Proceso de purificación biodirigida para el aislamiento de compuestos bactericidas.....	11
FIGURA 2.5	Esquema de una purificación desde el punto de vista estructural.....	12
FIGURA 2.6	Ontogenia: cannabidiol (8) Vs tetrahidrocannabinol (9).....	14
FIGURA 2.7	Arriba: distribución mundial del árbol del “neem”. Abajo: frutos y semillas de <i>A. indica</i>	15
FIGURA 2.8	Estructura de compuestos aislados de <i>A. indica</i>	15
FIGURA 2.9	Principales compuestos bioactivos de <i>Azadirachta indica</i>	18
FIGURA 2.10	Compuestos volátiles de la semilla de <i>Azadirachta indica</i>	20
FIGURA 2.11	Compuestos aislados de la corteza de <i>Azadirachta indica</i>	22
FIGURA 2.12	Esponja <i>Ectyoplasia ferox</i>	26
FIGURA 2.13	Algunos compuestos aislados de <i>Ectyoplasia ferox</i>	28
FIGURA 2.14	Saponinas terpenoides aisladas de <i>Ectyoplasia ferox</i>	29
FIGURA 2.15	Primer glicoesfingolípido natural aislado de <i>Ectyoplasia ferox</i>	29
FIGURA 2.16	Triterpenoides glicosídicos aislados de <i>E. ferox</i>	30
FIGURA 2.17	Esponja <i>Amphimedon compressa</i>	31
FIGURA 2.18	Aldehídos fosfolípidos y fosfolípidos de ácidos grasos aislados de <i>A. compressa</i>	32
FIGURA 2.19	Alcaloide piridinio aislado de <i>Amphimedon compressa</i>	33
FIGURA 2.20	Ácido graso aislado de <i>Amphimedon compressa</i>	33
FIGURA 2.21	Nuevo compuesto antibacteriano, aislado de <i>Amphimedon compressa</i>	34
FIGURA 2.22	Compuestos con grupos de ceramidas, aislado de <i>Amphimedon compressa</i>	34
FIGURA 2.23	Compuestos con grupos de ceramidas, aislado de <i>Amphimedon compressa</i>	35
FIGURA 4.1	Esquema general del procedimiento para la extracción y elucidación de metabolitos secundarios de las especies.....	37
FIGURA 4.2	Recolección (A), secado de las semillas (B), maceración (C), agitación (D), evaporación rotatoria bajo presión (E), obtención del extracto metanólico (F).....	39
FIGURA 4.3	Esquema del fraccionamiento del extracto metanólico por el método de Kupchan, ejemplo de las semillas de <i>A. indica</i>	40
FIGURA 4.4	Cromatografía en capa fina. a) Aplicación de muestra, b) Elución de placa cromatográfica, c) Aplicación del revelador, d) Calentamiento de la placa, e) Patrón de desplazamiento de la placa cromatográfica.....	43
FIGURA 4.5	Muestras preparadas para análisis de RMN.....	44
FIGURA 4.6	Izquierda: Ovoposición de teleóginas en caja de cultivo. Derecha: Huevos contenidos en viales de vidrio para su transporte.....	46
FIGURA 4.7	Izquierda: larvas vivas. Derecha: larvas muertas.....	47
FIGURA 5.1	Diagrama de obtención del compuesto 3- <i>O</i> -butil(-)-epicatequina (63).....	51
FIGURA 5.2	Diagrama de obtención del compuesto 3- <i>O</i> -butil(-)-epigalocatequina (64).....	54
FIGURA 5.3	Diagrama de obtención de (-)-epicatequina, (+)-galocatequina y (-)-epigalocatequina.....	58
FIGURA 5.4	Diagrama de obtención de azadiractina, trilinoleina y ácido octadecanoico-tetrahidrofurano-3,4-diil éster.....	61
FIGURA 5.5	Diagrama de obtención del octadecanoil-tetrahidrofurano-3,4-diil éster (70).....	64
FIGURA 5.6	Estructura de 3- <i>O</i> -butil(-)-epicatequina (63).....	66
FIGURA 5.7	Correlaciones observadas derivadas de la RMN para 3- <i>O</i> -butil- (-) - epicatequina (63).....	66
FIGURA 5.8	¹ H-NMR espectro de 3- <i>O</i> -butyl(-)-epicatequina (63) en D ₂ O a 298 K, 600 MHz.....	68
FIGURA 5.9	¹³ C NMR espectro de 3- <i>O</i> -butyl(-)-epicatequina (63) en D ₂ O a 298 K, 150 MHz.....	69
FIGURA 5.10	COSY espectro de 3- <i>O</i> -butyl(-)-epicatequina (63) en D ₂ O a 298 K, 600 MHz.....	70
FIGURA 5.11	HSQC espectro de 3- <i>O</i> -butyl(-)-epicatequina (63) en D ₂ O a 298 K, 600 MHz.....	71

FIGURA 5.12 HMBC espectro de 3- <i>O</i> -butil(-)-epicatequina (63) en D ₂ O a 298 K, 600 MHz.....	72
FIGURA 5.13 HRMS espectro de 3- <i>O</i> -butil(-)-epicatequina (63).....	73
FIGURA 5.14 IR espectro de 3- <i>O</i> -butil(-)-epicatequina (63).....	74
FIGURA 5.15 Estructura de 3- <i>O</i> -butil(-)-epigalocatequina (64).....	76
FIGURA 5.16 Correlaciones derivadas de la RMN para 3- <i>O</i> -butil(-)- epigalocatequina (64).....	76
FIGURA 5.17 Correlaciones observadas derivadas de RMN para los compuestos 3- <i>O</i> -butil(-)-epicatequina (63) (D ₂ O) y 3- <i>O</i> -butil(-)-epigalocatequina (64) (MeOD).....	78
FIGURA 5.18 ¹ H-NMR espectro de 3- <i>O</i> -butil(-)-epigalocatequina (64) en MeOD a 298 K, 600 MHz.....	79
FIGURA 5.19 ¹³ C NMR espectro de 3- <i>O</i> -butil(-)-epigalocatequina (64) en MeOD a 298 K, 150 MHz.....	80
FIGURA 5.20 COSY espectro de 3- <i>O</i> -butil(-)-epigalocatequina (64) en MeOD a 298 K, 600 MHz.....	81
FIGURA 5.21 HSQC espectro de 3- <i>O</i> -butil(-)-epigalocatequina (64) en MeOD a 298 K, 600 MHz.....	82
FIGURA 5.22 HMBC espectro de 3- <i>O</i> -butil(-)-epigalocatequina (64) en MeOD a 298 K, 600 MHz.....	83
FIGURA 5.23 HRMS espectro de 3- <i>O</i> -butil(-)-epigalocatequina (64).....	84
FIGURA 5.24 IR espectro de 3- <i>O</i> -butil(-)-epigalocatequina (64).....	85
FIGURA 5.25 Compuestos reportados en la literatura de <i>A. indica</i> , (-)-epicatequina (65), (+)-galocatequina (66), (-)-epigalocatequina (67), azadiractina A (68), trilinoleina (69) y ácido octadecanoico-tetrahidrofuran-3,4-diil éster (70).....	87
FIGURA 5.26 Desplazamientos químicos de ¹ H-RMN de compuestos químicos ya reportados de <i>A. indica</i>	90
FIGURA 5.27 ¹ H-NMR espectro de (-)-epicatequina (65) en MeOD a 298 K, 600 MHz.....	91
FIGURA 5.28 ¹³ C NMR espectro de (-)-epicatequina (65) en MeOD a 298 K, 150 MHz.....	91
FIGURA 5.29 ¹ H-NMR espectro de (+)-galocatequina (66) en MeOD a 298 K, 600 MHz.....	92
FIGURA 5.30 ¹³ C NMR espectro de (+)-galocatequina (66) en MeOD a 298 K, 150 MHz.....	92
FIGURA 5.31 ¹ H-NMR espectro de epigalocatequina (67) en MeOD a 298 K, 600 MHz.....	93
FIGURA 5.32 ¹³ C NMR espectro de epigalocatequina (67) en MeOD a 298 K, 150 MHz.....	93
FIGURA 5.33 ¹ H-NMR espectro de azadiractina A (68) en CDCl ₃ a 298 K, 600 MHz.....	94
FIGURA 5.34 ¹ H-NMR espectro de trilinoleina (69) en CDCl ₃ a 298 K, 600 MHz.....	95
FIGURA 5.35 ¹³ C NMR espectro de trilinoleina (69) en CDCl ₃ a 298 K, 150 MHz.....	95
FIGURA 5.36 ¹ H-NMR espectro de ácido-octadecanoico tetrahidrofuran-3, 4-diil éster (70) en CDCl ₃ a 298 K, 600 MHz.....	96
FIGURA 5.37 ¹³ C NMR espectro de ácido octadecanoic tetrahidrofuran-3, 4-diil éster (70) en CDCl ₃ a 298 K, 150 MHz.....	96
FIGURA 5.38 Diagrama de obtención del compuesto <i>β</i> -Sitosterol.....	100
FIGURA 5.39 Espectro de RMN ¹ H de <i>β</i> -sitosterol (71).....	103
FIGURA 5.40 Espectro de RMN ¹³ C de <i>β</i> -sitosterol (71).....	104
FIGURA 5.41 Espectro COSY de <i>β</i> -sitosterol (71).....	105
FIGURA 5.42 Espectro HSQC de <i>β</i> -sitosterol (71).....	106
FIGURA 5.43 Estructura plana del compuesto <i>β</i> -sitosterol (71). En negritas se representa los fragmentos establecidos por el experimento COSY y con las flechas en azul se muestran las conectividades HMBC.....	107
FIGURA 5.44 A la izquierda se muestran los desplazamientos químicos de ¹³ C asignados por la literatura. A la derecha se muestran los desplazamientos químicos experimentales de ¹³ C asignados por RMN.....	108
FIGURA 5.45 Estructura de Ectyoplasin (72).....	108
FIGURA 5.46 Espectro de RMN ¹ H de Ectyoplasin (72).....	111
FIGURA 5.47 Espectro de COSY de Ectyoplasin (72).....	112
FIGURA 5.48 Espectro de HSQC de Ectyoplasin (72).....	113
FIGURA 5.49 Espectro de HMBC de Ectyoplasin (72).....	114
FIGURA 5.50 Espectro de HRMS de Ectyoplasin (72).....	115
FIGURA 5.51 Marcha cromatográfica de la fracción hexánica ACM-1A de la esponja <i>A. compressa</i>	117
FIGURA 5.52 Compuestos aislados de <i>A. indica</i> : 3- <i>O</i> -butil (-)-epicatequina (63) y 3- <i>O</i> -butil(-)-epigalocatequina (64), (-)-epicatequina (65), (+)-galocatequina (66), (-)-epigalocatequina (67), azadiractina A (68), trilinoleina (69) y ácido octadecanoico-tetrahidrofuran-3,4-diil éster (70). Compuestos aislados de <i>Ectyoplasia ferox</i> : <i>β</i> -sitosterol (71) y ectyoplasin (72).....	119

LISTA DE TABLAS

TABLA 2.1 Compuestos de origen vegetal utilizados en medicina (Lahlou, 2013).....	7
TABLA 2.2 Fármacos o derivados marinos de uso comercial (Montaser y Luesch, 2012).....	9
TABLA 2.3 Compuestos aislados de las partes de <i>A. indica</i> (Saleem <i>et al.</i> , 2018; Lokeshwar <i>et al.</i> , 2012).	23
TABLA 4.1 Fracciones obtenidas de la partición por el método de Kupchan de <i>A. indica</i> , <i>E. ferox</i> y <i>A. compressa</i>	41
TABLA 5.1 Datos de desplazamiento de RMN para 3- <i>O</i> -butil(-)- epicatequina (63) en D ₂ O.	67
TABLA 5.2 Datos de desplazamiento de RMN para 3- <i>O</i> -butil(-)-epigallocatequina (64) en MeOD.	77
TABLA 5.3 Datos de desplazamiento de RMN para 63 y 64 (600 MHz; 125 MHz).	78
TABLA 5.4 Actividad acaricida para los compuestos 63-70 contra larvas de <i>R. microplus</i>	98
TABLA 5.5 Datos de RMN para β -sitosterol en MeOD.	102

LISTA DE SIMBOLOS

ACM	<i>Amphimedon compressa</i> Marino
AcOEt	Acetato de etilo
AIC	<i>Azadiracta indica</i> Corteza
AIS	<i>Azadiracta indica</i> Semilla
BuOH	Butanol
CaLo	Cáncer cervicouterino
CCF	Cromatografía de Capa Fina
CG-EM	Cromatografía de Gases -Espectrometría de Masas
CGL	Cromatografía de Gases-Líquidos
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano o Cloruro de metileno
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
COSY	Correlation Spectroscopy
d	Doblete
dd	doble doblete
DMSO	Dimetil Sulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EFM	<i>Ectyoplasia Ferox</i> Marino
EI	Impacto electrónico
ESI	Método por electrospray
EtOH	Etanol
FAB	Bombardamiento de átomos de sodio
GC-MS	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
Glc	Glucosa
Gly	Glicerol
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HSQMBC	Heteronuclear Single Quantum Multiple-Bond Correlation
HS-SPME	Microextracción en fase sólida por espacio de cabeza
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria del 50%
IR	Infrarrojo
LD ₅₀	Dosis Letal al 50%
LD ₉₀	Dosis Letal al 90%
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
m/z	Relación masa/carga
Me	Metilo
MEOH	Metanol
MS	Espectrometría de Masas
MIC	Concentración de Mínima Inhibición
MTT	Reducción metabólica del Bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>

NOE	Efecto Nuclear Overhauser
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NSI	Instituto Nacional del Cáncer
OMe	Metoxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
PMN	Neutrófilos Polimorfonucleares Humanos activados
RMN-1D	Resonancia Magnética Nuclear monodimensional
RMN-2D	Resonancia Magnética Nuclear bidimensional
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
SPE	Extracción en fase sólida
Δ	Desplazamiento químico
δ C	Desplazamiento químico de carbono
δ H	Desplazamiento químico de hidrógeno
UV	Ultravioleta

1. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, el hombre ha hecho uso de diversos organismos con el fin de aliviar o tratar sus males, así se han reportado el uso de hongos, plantas y organismos marinos. Actualmente se conoce que el efecto terapéutico de dichos organismos es causado por los metabolitos presentes en ellos. México es uno de los países con mayor biodiversidad del mundo tanto en animales, plantas y especies marinas (Martínez *et al.*, 2014), la importancia del estudio de los productos naturales radica en que son considerados una de las fuentes más importantes de compuestos que dan lugar al desarrollo de nuevos fármacos. Tradicionalmente las plantas y, desde el descubrimiento de las penicilinas, los microorganismos de origen terrestre, fueron las primeras fuentes utilizadas por el ser humano para la curación de graves dolencias. En este sentido, *Azadirachta indica* posee metabolitos secundarios con diferentes usos, entre los cuales se encuentran; su aplicación en el control de plagas de cultivos debido a una alta concentración del metabolito azadiractina y derivados de este, a los que se le atribuye dicha actividad. Por otro lado, el grado de conocimiento acerca de organismos terrestres es mayor, respecto del que se tienen de invertebrados marinos como las esponjas, que han sido poco estudiados a pesar de ser uno de los grupos más biodiversos y abundantes de los ecosistemas acuáticos en el mundo, debido a su difícil accesibilidad (Soest *et al.*, 2012; Estrada *et al.*, 2013; Cragg y Newman, 2016; Magaña, 2010).

Los organismos de origen marino son una fuente importante de metabolitos secundarios; la mayoría de ellos exhiben importantes actividades biológicas, que han sido explotadas para el descubrimiento de potenciales compuestos terapéuticos. De hecho, ya existe en el mercado los primeros medicamentos antitumorales de origen marino como son Yondelis[®] (p.a. trabectedina) y Halaven[®] (p.a. mesilato de eribulina) y el analgésico Prialt[®] (p.a. ziconotide) (Martins *et al.* 2014). Lo anterior se pudo conseguir, por el desarrollo de técnicas espectroscópicas como Resonancia Magnética Nuclear, Infrarroja, IR, Ultravioleta, UV y Espectrometría de Masas (EM), ya que son fundamentales para la elucidación estructural de un compuesto, después de su aislamiento y purificación del material biológico. En países desarrollados como España, USA y Japón, consideran a los productos naturales marinos como una fuente prolífica de nuevos fármacos; sin embargo, en México son muy pocos los estudios

realizados sobre organismos marinos, lo cual representa un déficit de suma importancia en la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas.

Así pues, la investigación en productos naturales es uno de los medios principales para descubrir compuestos bioactivos, ya sea para aplicaciones farmacéuticas o agroquímicas.

Debido a que en ocasiones se desconoce la etiología de muchas patologías, resulta difícil diseñar moléculas potencialmente activas para su tratamiento, por lo cual es evidente el interés de obtener nuevos compuestos químicos que tengan mejores propiedades farmacológicas (menos tóxicos y/o más activos), ya sea que tengan actividad antifúngica, anticancerígena, antibacteriana, entre otras. No obstante, son insuficientes las investigaciones en ésta área, si tomamos en cuenta la amplia biodiversidad, lo que a su vez nos indica que existe una gran cantidad de metabolitos que no han sido descubiertos.

Así, el objetivo del presente trabajo fue extraer, purificar y elucidar la estructura de metabolitos secundarios de la planta *Azadirachta indica* y de las esponjas *Ectyoplasia ferox* y *Amphimedon compressa*, recolectados en el estado de Veracruz.

2. ANTECEDENTES

2.1. Medicina tradicional

Desde la antigüedad, el ser humano ha usado diversos organismos vivos como una fuente para curar sus diversos males. El conocimiento de las propiedades medicinales de estos organismos está basado en la observación, la experiencia y el conocimiento profundo del entorno y es transmitido de generación en generación, formando parte del patrimonio cultural de cada país (Soest *et al.*, 2012).

Esta información conocida como etnobotánica, fue destacando en los últimos siglos debido a su gran potencial para el desarrollo de nuevos fármacos. En efecto, a finales del siglo XX, ocurrieron acontecimientos que produjeron cambios en la opinión sobre los productos naturales, tanto en la población como de los científicos. En primer lugar, se descubrió la utilidad de la droga completa, o hierbas, como se llamaba comúnmente, lo que junto con la insatisfacción por la efectividad y el costo de la medicina moderna, condujeron a un incremento en la demanda de los productos naturales. Esto motivó que millones de personas alrededor del mundo ganaran un gran aprecio por el uso de las drogas vegetales clásicas para el tratamiento de múltiples enfermedades (Cragg y Newman, 2016).

Las principales industrias farmacéuticas han reconocido que la medicina tradicional es una fuente de nuevos fármacos y por tanto están recurriendo cada vez más a esta información. Sin embargo, la desaparición de culturas indígenas conlleva a que los conocimientos etnobotánicos empíricos adquiridos a lo largo de miles de años están desapareciendo y por ende muchos posibles candidatos a drogas (Grabley y Thiericke, 2000).

Los organismos marinos y terrestres constituyen un valioso recurso en los sistemas de salud de las sociedades en desarrollo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que más del 80% de la población mundial utiliza de modo rutinario la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de estos tratamientos tradicionales implican el uso de plantas, sus extractos o sus principios activos; así mismo, a finales de los años 70's, la OMS definió a una planta medicinal como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos

principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (OMS, 1979) y por tanto se ha promovido el estudio de las mismas como fuente de medicamentos, abriendo la puerta al diálogo entre la medicina tradicional y la moderna (Harborne *et al.*, 2001; Bermúdez y Oliveira, 2005).

2.1.1 La medicina tradicional en el mundo

La importancia de las plantas medicinales se hace más patente en los países en vías de desarrollo. Así, por ejemplo, en Pakistán se estima que un 80 % de las personas dependen de éstas para curarse y en China un 40 % (Bermúdez y Oliveira, 2005). En países tecnológicamente avanzados como los Estados Unidos de América, la población utiliza también plantas medicinales para combatir ciertas dolencias y en Japón hay más demanda de plantas medicinales que de medicinas de patente (Magaña *et al.*, 2010). México y los países centroamericanos, conforman una de las regiones bioculturalmente más ricas del mundo (Toledo, 2001), que cuenta con una de las floras y faunas más diversas del mundo, además se encuentran más de 100 culturas o pueblos autóctonos, la mayor parte de los cuales han heredado de forma directa el conocimiento etnobotánico de las antiguas civilizaciones.

Así, México es uno de los países de América con mayor tradición ancestral y riqueza en el uso de la herbolaria medicinal, donde se registran poco más de 7,000 especies que se emplean en remedios naturales. No obstante, las investigaciones en el uso y manejo de las plantas medicinales son insuficientes debido a la amplia biodiversidad, por tanto, existe una gran cantidad de metabolitos por descubrirse y que podrían sentar las bases para el desarrollo de nuevos fármacos (Gómez, 2012). Además, es evidente el creciente interés en la medicina alternativa para la cura de numerosos padecimientos y enfermedades que afectan a los seres humanos, y las investigaciones que tienen como objetivo el cultivo, estudio, procesamiento y purificación de compuestos en plantas medicinales con fines terapéuticos se consideran estrategias importantes para el desarrollo de principios activos líderes (Soto *et al.*, 2002). Muchos programas actualmente se centran en la búsqueda de compuestos de origen terrestre o marino que posean acción farmacológica, alimentaria, industrial, cosmética, entre otras.

2.2. Fuentes vegetales

Como ya se mencionó, los productos naturales, incluyendo organismos terrestres, marinos y minerales han sido la base del tratamiento de enfermedades humanas desde la antigüedad, este conocimiento que ha pasado de generación en generación, ha sido la base de la medicina moderna y permanece como una fuente de información importante de cara al futuro. Las plantas se han utilizado como recursos terapéuticos de varias maneras: infusiones de hierbas u otros remedios caseros, extractos crudos o "fracciones enriquecidas" en forma de preparados farmacéuticos, tales como extractos fluidos, polvos, píldoras y cápsulas; cuando son considerados como preparados fitosanitarios. La idea de que el efecto de un fármaco en el cuerpo humano está mediado por interacciones específicas de una o varios compuestos del extracto de una planta, llevó a la conclusión de que compuestos químicos presentes en los extractos son los responsables de la actividad biológica. Por ello, diversos organismos, especialmente las plantas, han sido sometidas a procedimientos de extracción y purificación sucesiva para aislar el o los compuestos de interés, que pueden por sí mismos ser activos y utilizarse directamente como un fármaco, ejemplo de estos son la quinina (**1**), la digoxina (**2**) y la ergotamina (**3**), cuyas estructuras se muestra en la **Figura 2.1** (haré referencia a las estructuras de los compuestos que se mencionan en este documento con numeración consecutiva, en paréntesis y en negrita), también pueden ser utilizados como precursores en procesos semisintéticos y/o modelos para la síntesis total, como la diosgenina (**4**) precursor de hormonas esteroideas, o incluso se han obtenido compuestos con actividad farmacológica bien definida y que mediante estudios de estructura actividad han permitido el desarrollo de una familia de drogas prototipo, el ejemplo mejor conocido es la penicilina (**5**) de la cual han derivado generaciones de antibióticos que utilizamos en la actualidad (**Figura 2.2**). Así, un importante porcentaje de los fármacos que se comercializan en la actualidad han sido generados directa o indirectamente a partir de los productos naturales (metabolitos secundarios), los cuales se obtuvieron de extractos crudos y semi-puros de plantas que usaba la población hasta el siglo XX para tratar enfermedades de humano y animales (Lahlou, 2013).

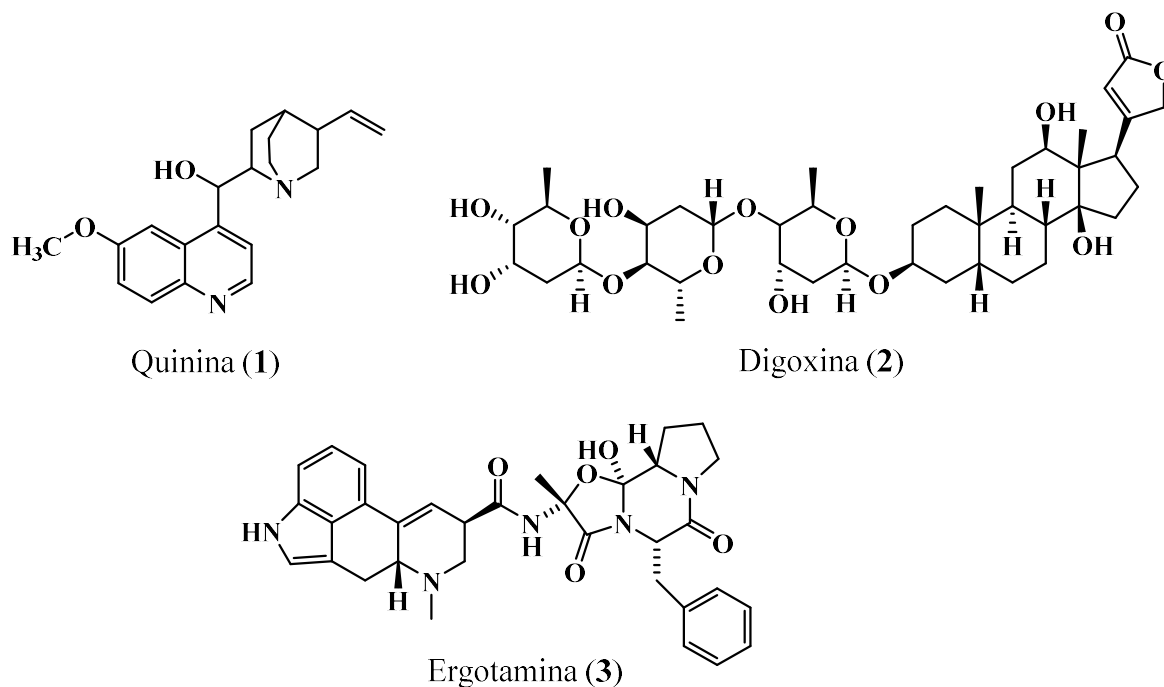


FIGURA 2.1 Compuestos aislados usados directamente como fármacos.

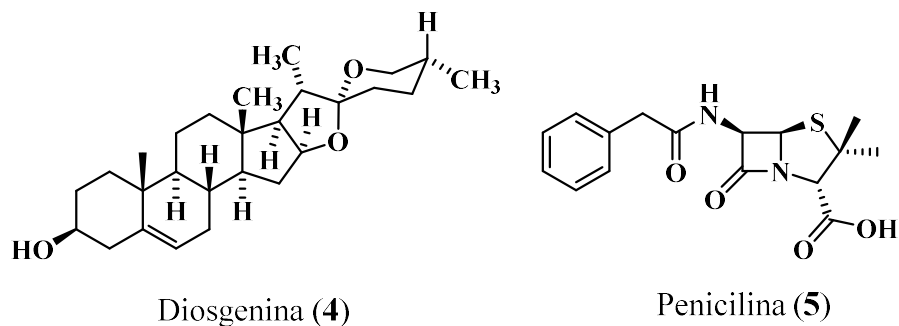


FIGURA 2.2 Ejemplo de compuestos precursores de fármacos.

Las propiedades medicinales de las plantas pueden provenir de cualquiera de sus partes: hojas, tallos, raíces, flores o semillas, ya que todas ellas producen sustancias químicas llamadas metabolitos secundarios o principios activos (Balandrin y Kinghorn, 1993). La biodiversidad del reino vegetal en el mundo se estima entre 400,000 y 500,000 especies de plantas superiores a las cuales solamente a un 10 % se les han realizado estudios fitoquímicos y un menor porcentaje se han sometido a pruebas farmacológicas (Lahlou, 2013). Algunos fármacos de importancia comercial se muestran el **Tabla 2.1**.

TABLA 2.1 Compuestos de origen vegetal utilizados en medicina (Lahlou, 2013).

Principio activo	Acción o uso clínico	Planta
Alantoína*	Cicatrizante	<i>Prunella vulgaris</i>
Atropina	Anticolinérgico	<i>Atropa belladonna</i>
Cafeína*	Estimulante	<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze
Cocaína	Anestésico local	<i>Erythroxylum coca</i> Lamk.
Codaína	analgésico, sedante	<i>Papaver somniferum</i> L.
Digoxina	Cardiotónico	<i>Digitalis lanata</i> Ehrh.
Efedrina*	Simpatomiméticos (estimulante)	<i>Ephedra sinica</i> Stapf.
Esteviósido	Edulcorante	<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni
Morfina	Analgésico	<i>Papaver somniferum</i> L.
Noscapina	Antitusivo	<i>Papaver somniferum</i> L.
Papaverina*	Antiespasmódico y vasodilatador.	<i>Papaver somniferum</i> L.
Paclitaxel (Taxol®)	Antitumoral	<i>Taxus brevifolia</i>
Pseudoefedrina*	Simpatomiméticos (descongestivo)	<i>Ephedra sinica</i> Stapf.
Quinina	Antipirético, antipalúdico	<i>Cinchona ledgeriana</i> Moens ex. Trimen
Rescinamina	Antihipertensivo, tranquilizante	<i>Rauwolfia serpentina</i> (L.) Benth ex. Kurz
Rotenona	Insecticida	<i>Lonchocarpus nicou</i> (Aubl.) DC
Salicina	Analgésico, anti-inflamatorio	<i>Salix alba</i> L.
* Se han sometido a pruebas farmacológicas.		

El número de plantas medicinales en México asciende aproximadamente a 4,500 especies de las cuales solo el 11 % se ha estudiado químicamente, el 2.6 % de forma biodirigida y solo el 1.9 % con estudios farmacológicos y toxicológicos. Esto significa que aún se tiene una enorme tarea para elucidar estructuralmente, los principios activos (Kakuko *et al.*, 2005).

2.3. Extractos naturales de origen marino

El medio marino constituye una importante fuente de productos con valor agregado y son usados como materias primas en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética, biología

molecular, como enzimas, agroquímicos, entre otros, algunos de estos metabolitos se encuentran en fases preclínica, clínica y otros, en proceso de síntesis o semi-síntesis (Amador *et al.*, 2003; Haefner, 2003; Cragg y Newman, 2016). El interés por parte de los químicos ha sido doble: por un lado los químicos de productos naturales han visto a los organismos marinos como fuente de moléculas orgánicas nuevas e inusuales, mientras que los químicos sintéticos han empleado estas estructuras para el desarrollo de análogos y nuevas metodologías y estrategias sintéticas (Fattorusso *et al.*, 2012).

Los océanos abarcan el 70 % de la extensión de nuestro planeta y su diversidad biológica constituye el 95 % de toda la biosfera. Además, según el Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU. (NCI), la probabilidad de encontrar un compuesto bioactivo en una colección marina es mayor que en cualquier otra fuente, debido a las condiciones extremas en las que viven muchos de estas especies (Ferreira *et al.*, 2007). Por ello, esta área ha crecido extraordinariamente en los últimos años; así y a pesar de su reciente exploración se ha logrado reportar 30,000 nuevos productos de origen marino, en comparación de los 420,000 existentes de origen terrestre (Dias *et al.*, 2013; Khazir *et al.*, 2014). Estos estudios han comenzado a dar sus primeros frutos, con la comercialización de fármacos como el analgésico no opioide Prialt® (p.a. ziconotide (**6**)) y el antitumoral Yondelis® (p.a. trabectedina (**7**)). El ziconotide (**6**) es un equivalente sintético de un péptido de origen natural, aislado a partir del veneno del caracol marino *Conus magus*, se usa para el tratamiento del dolor crónico severo. La trabectedina (**7**) es un alcaloide aislado del tunicado marino *Ecteinascidia turbinata* el primer agente marino anticáncer y se utiliza para el tratamiento del sarcoma de tejidos blandos y cáncer de ovarios (**Figura 2.3**). Son muchos los organismos marinos que actualmente son considerados como las fuentes más importantes de sustancias bioactivas, destacando las esponjas.

Las esponjas son las especies más estudiadas, ya que se han caracterizado por producir una gran gama de compuestos bioactivos, producen una gran variedad de metabolitos secundarios química y biológicamente interesantes para el desarrollo y producción de nuevos compuestos de relevante importancia (León *et al.*, 2010). Se han aislado de ellas más de 2,000 compuestos con diferentes estructuras y actividad biológica (Faulkner, 2002) y varios de ellos se les han reportado un importante potencial antitumoral (Mora *et al.*, 2007).

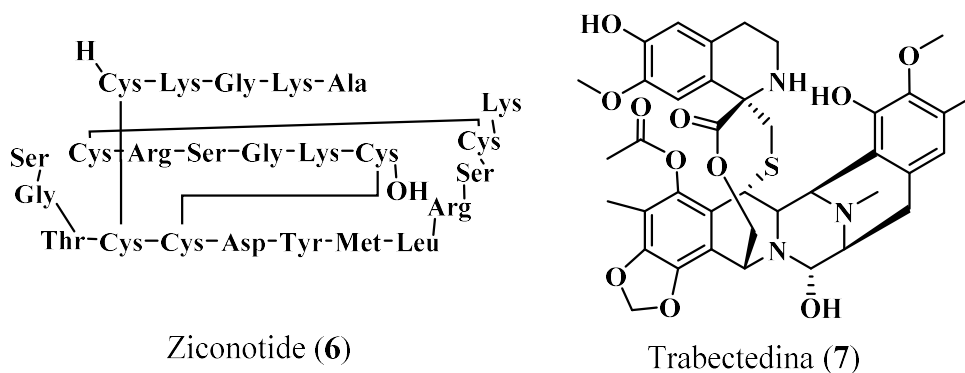


FIGURA 2.3 Fármacos de origen marino.

Es fácil de ver el gran potencial de los organismos marinos, si tomamos en cuenta que poseen un gran arsenal de nuevas y novedosas sustancias con una gran diversidad estructural, que pueden ser la fuente de inspiración para desarrollar productos útiles en la industria farmacéutica, alimentaria, agrícola, entre otras, tal y como se muestra en la **Tabla 2.2**.

TABLA 2.2 Fármacos o derivados marinos de uso comercial (Montaser y Luesch, 2012).

Principio activo	Acción o uso clínico	Organismo marino
Citarabina[®] (Ara-C)*	Anticancerígeno (Patente)	Esponja <i>Tethya cripta</i>
Vidarabina[®] (Ara-A)*	Agente antiviral (Patente)	Esponja <i>Tethya cripta</i>
Prialt[®] Ziconotide*	Dolor crónico severo (Patente)	Cono caracol <i>Conus magus</i>
Yondelis[®] Trabectedina	Anticancerígeno (Patente)	Tunicado <i>Ecteinascidia turbinata</i>
Halaven[®] Mesilato de eribulina	Cáncer de mama (Patente)	Esponja <i>Halichondria okadai</i>
Auristatina PE	Anticuerpo Fase II	Babosa marina <i>Dolabella auricularia</i>
Kahalalida A	Cáncer de próstata Fase II	Babosa marina <i>Elysia rufescens</i>
Espisulosina	Antitumoral Desarrollo	Almeja <i>Spisula polynimia</i>
* Producidos actualmente por síntesis química.		

2.4. Productos Naturales

El estudio químico de fuentes terrestres y marinas para purificar, elucidar la estructura y determinar la actividad biológica de los compuestos presentes en un extracto, ha avanzado de forma paralela al desarrollo de las técnicas biofísicas de elucidación estructural (MS, RMN y Rayos X principalmente); así como el perfeccionamiento de los ensayos biológicos. En este sentido los estudios se pueden clasificar en purificación biodirigida y estructural, como se muestra a continuación.

2.4.1. Purificación biodirigida

Zani *et al.* (1995), Hostettmann, (1997) y Alves *et al.* (2000), consideran que es necesario evaluar la actividad biológica de los organismos para descubrir nuevos compuestos activos que puedan en un futuro desarrollarse como nuevos fármacos. La purificación biodirigida es un enfoque en el cual el fraccionamiento cromatográfico depende de la actividad biológica, es decir la marcha cromatográfica se realiza solamente sobre la fracción o fracciones bioactivas según el bioensayo elegido (bactericida, citotóxico, pesticida, antiviral, entre otros). La finalidad de este tipo de estudios es obtener secuencialmente fracciones bioactivas hasta llegar a un compuesto puro con la actividad deseada (Navarro *et al.*, 1998) (**Figura 2.4**). El requisito principal de estos estudios es que se debe contar con bioensayos rápidos, sensibles y reproducibles para detectar sustancias activas presentes en los extractos en tiempos cortos, concentraciones bajas, al tiempo que se puedan probar un gran número de muestras con las réplicas necesarias para evaluarse estadísticamente. La principal ventaja es que se descarta que los compuestos puros resultantes sean inactivos (Rates, 2001). Sin embargo, tiene el inconveniente de que el compuesto obtenido puede ser una estructura conocida y cuya actividad ya ha sido reportada.

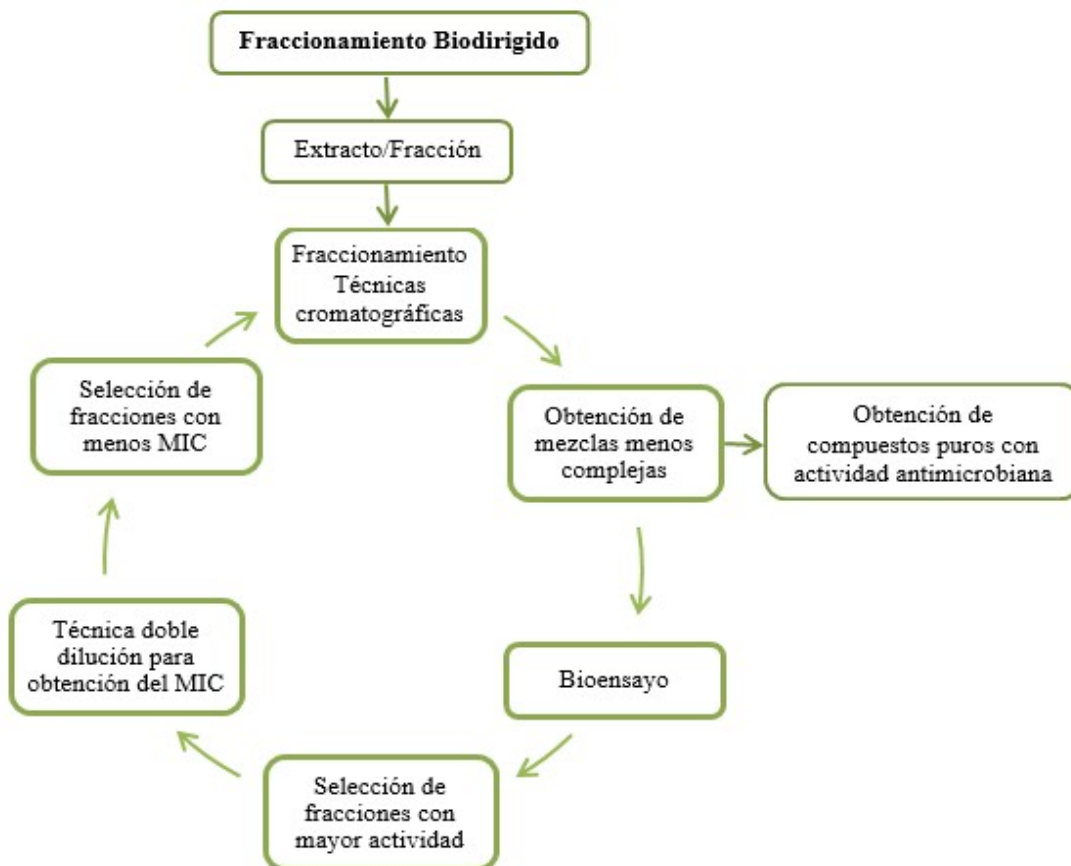


FIGURA 2.4 Proceso de purificación biodirigida para el aislamiento de compuestos bactericidas.

El reconocimiento de propiedades biológicas de muchos metabolitos secundarios ha alentado el desarrollo de este campo, no solamente para la búsqueda de nuevas drogas, nuevos antibióticos, insecticidas y herbicidas; sino que además, la creciente apreciación de los diversos efectos biológicos de los metabolitos secundarios ha llevado a reevaluar los diferentes roles que poseen en las plantas, especialmente en el contexto de las interacciones ecológicas. (Jasbbi, 2006).

2.4.2. Purificación mediante análisis estructural

Otro enfoque en la investigación de productos naturales es la búsqueda de metabolitos con estructuras novedosas y que posteriormente se evalué su eficacia farmacológica, en este punto el uso de metodologías que den indicios acerca de la estructura de los compuestos presentes en extractos crudos y fracciones es fundamental para el fraccionamiento cromatográfico. Así, se

utilizan técnicas espectroscópicas (RMN, IR, entre otras) y espectrométricas (MS) como pautas para la purificación del material biológico hasta la obtención de compuestos nuevos o incluso esqueletos químicos no reportados con anterioridad. La gran virtud de estos estudios es la obtención de compuestos con estructuras novedosas, en contrapartida existe cierta probabilidad de obtener sustancias inactivas, ya que después de determinar la estructura hay que ensayar los compuestos con diversos ensayos. Otra desventaja es que se debe poseer el equipamiento necesario para realizar rutinariamente espectros que den indicios acerca de la estructura de los compuestos presentes en el extracto crudo (**Figura 2.5**).

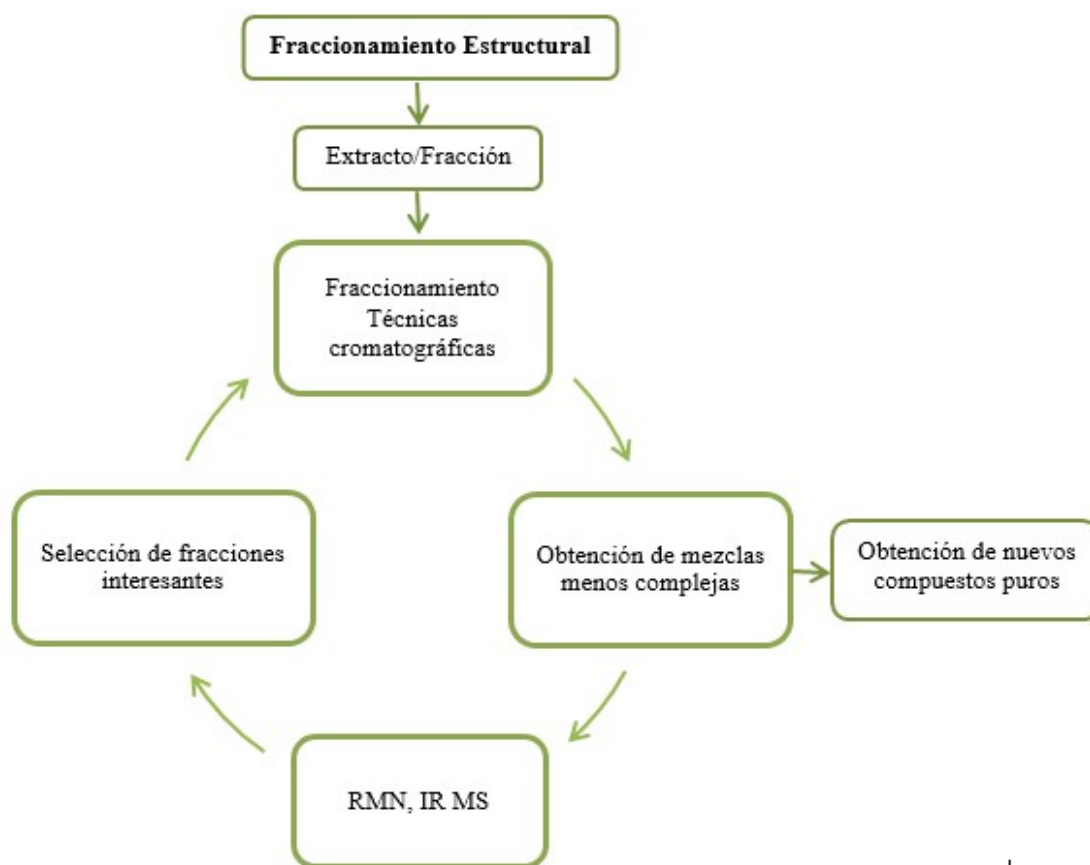


FIGURA 2.5 Esquema de una purificación desde el punto de vista estructural.

Sin embargo, la técnica de la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se considera la herramienta fundamental en la determinación estructural en el campo de los productos naturales (Blümich, 2005).

2.5. Metabolitos primarios y secundarios

El metabolismo primario comprende aquellos procesos bioquímicos que cada ser vivo debe llevar a cabo para su supervivencia, como son la fotosíntesis, la glicólisis, síntesis de aminoácidos y proteínas, síntesis de material genético, reproducción celular (crecimiento), entre otros. Los compuestos de este metabolismo, metabolitos primarios, se caracterizan por tener una función metabólica directa como compuestos esenciales en las vías catabólica y anabólica, se encuentran en la gran mayoría de los seres vivos.

El metabolismo secundario comprende aquellos procesos bioquímicos que son únicos para una familia, género o una especie particular, y aunque varias vías metabólicas son comunes para un número de familias o especies diferentes, la química de productos naturales suele ser diferente de una especie a otra. En la mayoría de los casos los llamados “metabolitos secundarios” no parecen ser necesarios para la supervivencia de los organismos vivos, no intervienen en los procesos de alimentación, crecimiento y reproducción, pero suponen una ventaja competitiva importante. Los metabolitos secundarios juegan un papel importante en la supervivencia del organismo en un ecosistema determinado, proporcionándole las sustancias de defensa contra depredadores, atrayente de insectos, protección a radiaciones UV u otras funciones fisiológicas de importancia, especialmente en aquellos organismos inmóviles. La producción de metabolitos secundarios está influenciada por tres factores: analogía estructural (quimiotaxonomía), ontogenia (estado de desarrollo) y factores ambientales (Elisabetsky *et al.*, 1997).

Quimiotaxonomía. Este factor establece que existen similitudes estructurales de los metabolitos secundarios de algunas plantas (la relación biológica se refleja en la relación química), ya que organismos relacionados deben tener genomas relacionados y en consecuencia hay una gran probabilidad de que algunos genes que codifican los metabolitos secundarios se mantengan (Vuorela *et al.*, 2004).

Ontogenia. Establece que la concentración de un metabolito secundario particular puede variar de acuerdo con la edad y madurez de la planta, estación del año, ciclo lunar, entre otras. Un ejemplo lo observamos en la planta *cannabis sativa* (**Figura 2.5**), cuya producción de cannabidiol (**8**) alcanza su pico máximo en la etapa de crecimiento y luego empieza a declinar,

aumentando entonces la producción de tetrahidrocannabinol (9) (Figura 2.6) y continúa así hasta que la planta alcanza la madurez (Verpoorte *et al.*, 2005).

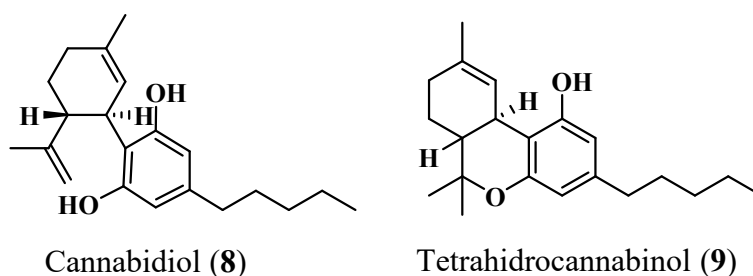


FIGURA 2.6 Ontogenia: cannabidiol (8) Vs tetrahidrocannabinol (9).

Factores ambientales. Los factores ambientales como el suelo, clima, flora y fauna asociada, métodos de cultivo, entre otros afectan la presencia y/o concentración de los metabolitos secundarios. Por ejemplo, muchas plantas productoras de alcaloides acumulan mayores concentraciones de estos componentes en suelos húmedos que en suelos áridos, lo que puede estar relacionado con la cantidad de nitrógeno, ya que los suelos áridos suelen ser pobres en este elemento. El hecho de que los organismos vivos sintetizan metabolitos secundarios para sus necesidades de adaptación al medio que los rodea, ha alentado a los investigadores para desarrollar a partir de estos compuestos, nuevas drogas, nutraceuticos, cosméticos, etc. (Croteau, 2008).

2.6. *Azadirachta indica* A. Juss

El árbol de “neem” (*Azadirachta indica* A. juss) pertenece a la familia *Meliaceae* (Bina *et al.*, 2004). En la actualidad se encuentra distribuido en más de 78 países en Asia, África, Oceanía, Centro y Sudamérica (Figura 2.7), (Cruz y Del Ángel, 2004). En América se encuentra en países como Trinidad y Tobago, Jamaica, Puerto Rico, Islas Vírgenes, Surinam, Guyana, Barbados, Cuba, República Dominicana, Haití, Guatemala, Nicaragua, Honduras, Bolivia, Ecuador, Argentina, Brasil y México (Angulo *et al.*, 2004). En México, el árbol de “neem” se encuentra en los estados de Yucatán, Oaxaca, Morelos, Chiapas, Guanajuato, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Durango, Baja California Sur, San Luis Potosí y Veracruz (Ramos *et al.*, 2004). Puede alcanzar una altura de 15 a 25 m, con un diámetro de tronco de 30 a 90 cm. La semilla que contiene el fruto es de forma alargada, con tamaño variable y de color blanco cuando está

seca (**Figura 2.7**) y es usada comúnmente para el control de plagas, ya que esta posee la mayor cantidad de azadiractina (**10**), la cual funciona como pesticida natural (**Figura 2.8**). Las hojas también contienen ingredientes pesticidas, pero son menos efectivos que los que se encuentran en la semilla (Oñate y Quintero, 2008).

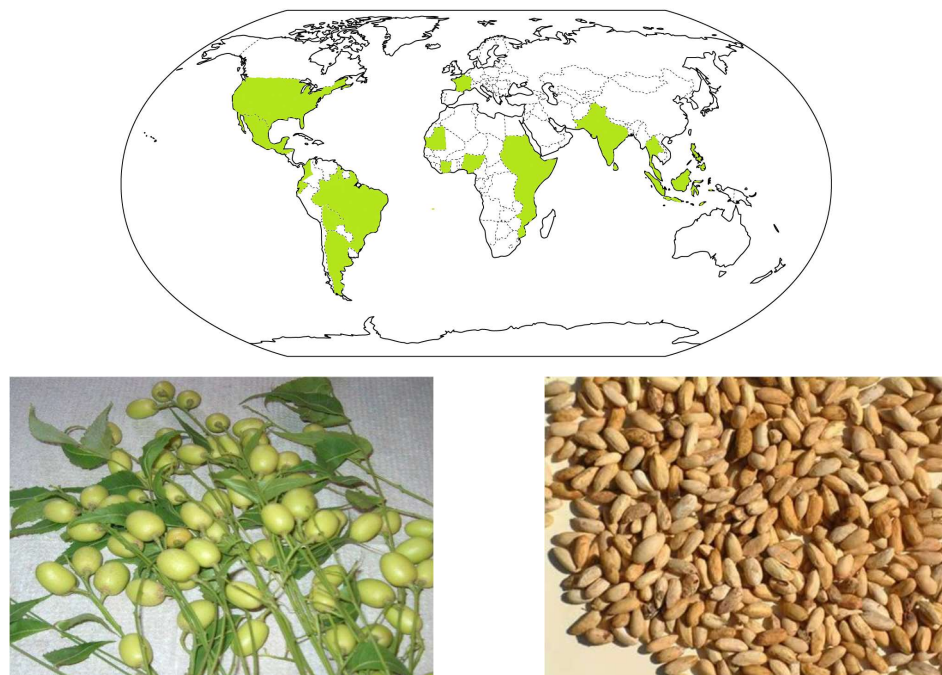


FIGURA 2.7 Arriba: distribución mundial del árbol del “neem”. Abajo: frutos y semillas de *A. indica*.

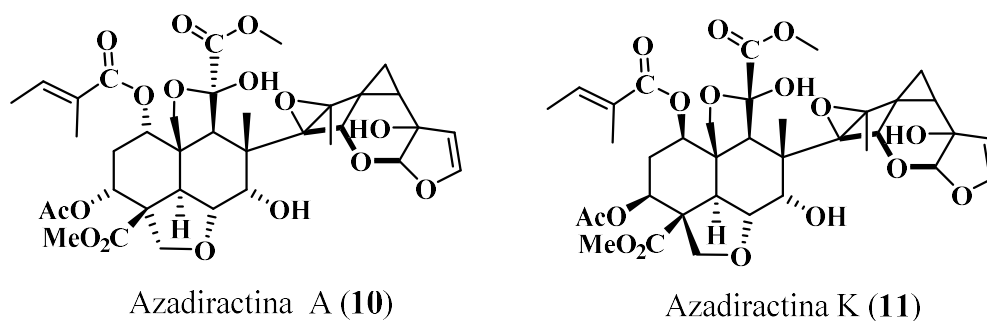


FIGURA 2.8 Estructura de compuestos aislados de *A. indica*.

2.6.1. Usos tradicionales de *Azadirachta indica*

Las hojas, la corteza y las ramas de *Azadirachta indica* se usan contra las inflamaciones y para la cicatrización de heridas (Neem Foundation, 2006). Los extractos de corteza y ramas se usan

para tratar fiebres, anorexia, disentería, vómito y son antihelmínticos; mezclados con *Coriandrum sativum* (cilantro) y *Zingiber officinale* (jengibre) se utilizan para el tratamiento de la malaria (Brechelt y Fernández, 1995; Bandyopadhyay *et al.*, 2002). El aceite de la semilla es usado para curar la lepra, enfermedades de la piel y artritis (Neem Foundation, 2006). Las hojas son prescritas para ayudar al sistema digestivo, estimular el funcionamiento del hígado, combatir algunas afecciones pulmonares, disminuir los niveles de glucosa en la sangre de pacientes diabéticos, y para dolores de oído y de cabeza (Kintzios, 2006; Parmar *et al.*, 2004; Raveendra *et al.*, 2004). La pasta que se forma con la corteza del árbol o la que se obtiene como subproducto en la elaboración del aceite de las semillas, puede usarse como acondicionador y fertilizante del suelo, debido a que han mostrado tener efecto nematicida y disminuyen el contenido de patógenos en las plantas (Brechelt y Fernández, 1995; Stoney, 1997; Gajalakshmi y Abbasi, 2004; Neem Foundation, 2006). La corteza es considerada como un tónico amargo, astringente, y como útil para la fiebre, la sed, las náuseas, los vómitos, y enfermedad de la piel. Se ha encontrado que los polisacáridos aislados de la corteza de neem tienen fuertes antiinflamatorios y la antitumoral (Ara *et al.*, 1989).

2.6.2. Actividades observadas en *Azadiractha indica*

El “neem” ha sido usado por siglos como agente pesticida, ya que las sustancias producidas afectan a un número entre 400 y 500 especies de diferentes órdenes de insectos, diversos extractos de semillas de “neem”, en particular los que contienen el tetranotriterpenoide hidrofílico azadiractina (10) (Figura 2.9), se conoce que influyen en la conducta de alimentación, la metamorfosis, y fecundidad de algunos insectos (Carter *et al.*, 1992; Roland y Blouin, 1995). La azaridactina (10) es efectiva contra 200 especies de insectos, entre los cuales se incluyen especies de los géneros *Blattodea*, *Caelifers*, *Dermaptera*, *Diptera*, *Ensifera*, *Hetroptera*, *Hymenoptera*, *Isoptera*, *Lepidoptera*, *Phasmida*, *Phthiraptera*, *Siphonoptera* y *Thysanoptera* (Neem Foundation, 2006), no afecta a los mamíferos o a los animales que consumen estos insectos, ni tampoco a los insectos útiles para la polinización o que son benéficos para la planta (Dureja y Johnson, 2000), el modo de acción es dependiente de la dosis y de la especie (Huang *et al.*, 2004). Extractos etanólicos y acuosos de “neem” se reportan eficaces para el control del acaro *Boophilus microplus* (Rice, 1993.). Se demostró que los extractos de “neem” pueden ser aplicados para el control de plagas agrícolas en cultivos

polinizados por abejas, ya que no tiene efectos tóxicos sobre estas a concentraciones útiles para el control de otros insectos, además las abejas transportan cantidades mínimas del extracto de “neem” al interior de las colmenas (Naumann *et al.*, 1994; Naumann e Isman, 1996).

Los productos derivados del “neem” no sólo afectan a los insectos, se reporta también su uso como anticancerígeno, antiviral, antialérgico y antiséptico, además tienen efecto sobre algunas bacterias gram positivas, nemátodos, caracoles y hongos nocivos, incluyendo especies de *Aspergillus* spp. productores de aflatoxinas (Saxena, 2002; Neem Foundation, 2006).

Williams *et al.* (1998), y Coventry e Allan (2001), demostraron que extractos etanólicos de semillas de “neem”, inhibieron considerablemente el crecimiento de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Paenibacillus larvae* y *Nocardia* sp. Asimismo, Okemo *et al.* (2001), determinó la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de “neem” con cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, los resultados mostraron que el extracto mató a todas las células bacterianas de *S. aureus* a una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1 mg/ml en 8 h de exposición, y a las células de *C. albicans* a una CMI de 8 mg/ml en 24 h. Tanto *E. coli* y *P. aeruginosa* que fueron evaluadas a una CMI de 8 mg/ml no presentaron inhibición por el extracto incluso después de 24 h.

Salazar *et al.* (2014), demostraron que los extractos de “neem” poseen actividad antifúngica sobre *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* y posee actividad antiparasitaria contra la malaria causada por especies del género *Plasmodium* y otras parasitosis provocadas por *strongiloides* (Bazán *et al.*, 2011). Otras investigaciones reportaron actividad citotóxica con un Índice de Concentraciones Media (IC₅₀) de 22.03 µg/ml sobre la línea celular MCF7 (cáncer de mama) y 32.17 µg/ml sobre la línea CaLo (cáncer cervicouterino) (Cuadrado *et al.*, 2010).

2.6.3. Metabolitos secundarios aislados de *Azadirachta indica*

Actualmente se conoce la existencia de aproximadamente 100 terpenoides de *Azadirachta indica*, los más importantes son la familia de las azadiractinas, de las cuales se conocen de la azadiractina A (10) a la azadiractina K (11), como se muestra en la **Figura 2.8** (Angulo *et al.*, 2004; Damaria *et al.*, 2004, Ramos *et al.*, 2004, Sharma *et al.*, 2003, Govindachari *et al.*, 1992), de las cuales se ha reportado que tienen actividad contra el crecimiento de *Epilachna varivestis*

(conchuela del frijol), con LC₅₀ (Concentración Letal) en el rango de 0,3 a 2,8 ppm (Damaria, 2004). La azadiractina está contenida en cualquier parte anatómica del árbol; sin embargo, las semillas tienen la concentración más alta (Angulo *et al.*, 2004).

La quercetina (12) y β -sitosterol (13) (Figura 2.9), fueron los primeros flavonoides polifenólicos y esteroides, respectivamente, fueron extraídos a partir de hojas frescas de “neem” con MeOH, elucidados por RMN ¹H, ¹³C, DEPT, COSY y fueron conocidos por tener propiedades antibacterianas y antifúngicas (Govindachari *et al.*, 1998). También se han aislado constituyentes como: diterpenos, triperpenoides, polifenoles, compuestos sulfurosos, y derivados de poliacetatos (Kurose y Yatagai, 2005). Entre los principales compuestos bioactivos del “neem” se encuentran: azadiractina (10), tirucalol (14), salanina (15), nimbidina (16), 6-desacetilnimbinina (17), 3-desacetil-salanina (18), como se muestra en la Figura 2.9 (Williams y Pant, 2007).

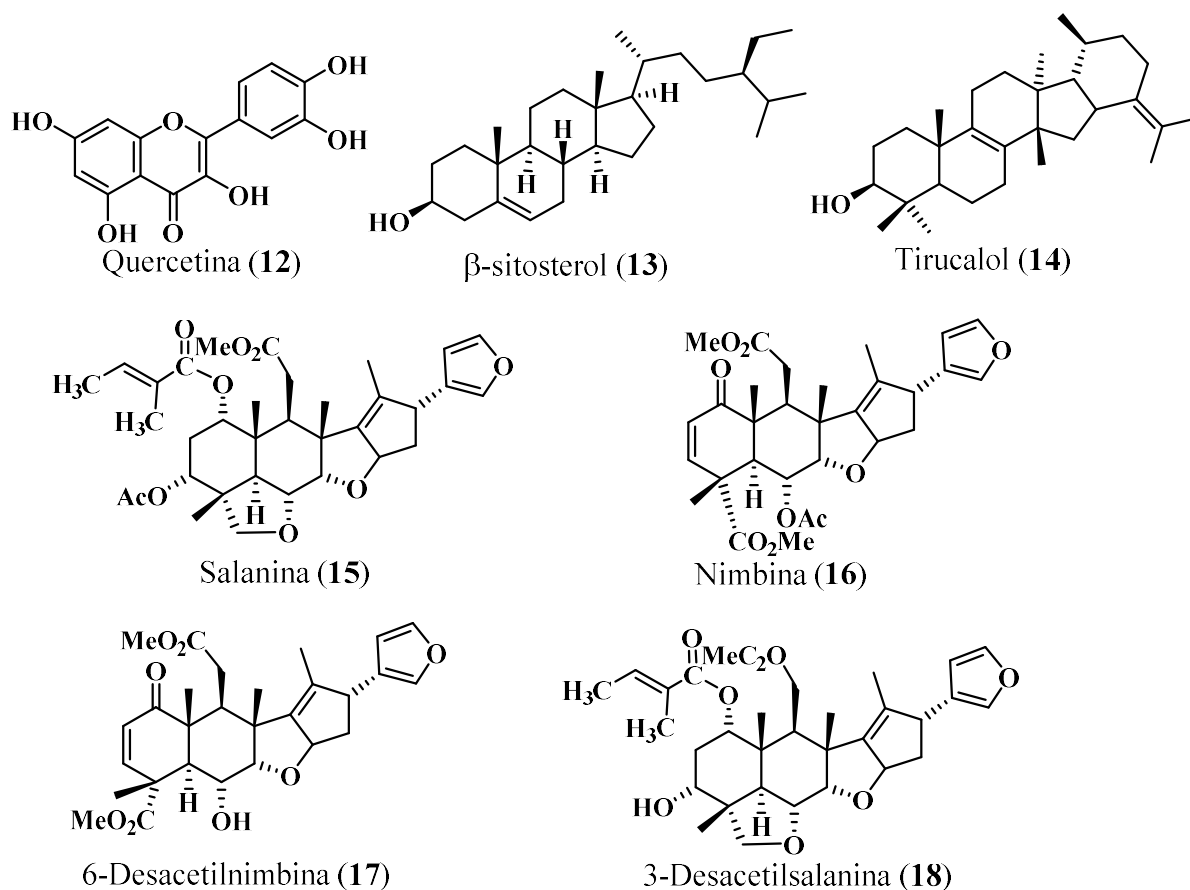


FIGURA 2.9 Principales compuestos bioactivos de *Azadirachta indica*.

Mahmoud *et al.* (2011), estudió el extracto de acetato de etilo de las hojas de “neem”, el cual mostró la presencia de nimonol (**19**) (**Figura 2.10**) como componente principal, fue extraído con agua, AcOEt, EtOH, caracterizado por HPLC y elucidado por RMN ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY y se evaluó sobre el crecimiento de patógenos humanos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Candida albicans* y *Microsporium gypseum*. Los resultados mostraron una inhibición de los patógenos en tanto la CMI iba en aumento (5, 10, 15 y 20 %).

Aunque se ha reportado en varias publicaciones los compuestos de la semilla de “neem”, existen pocos estudios sobre el perfil químico de los componentes volátiles de la semilla (Shivashankar *et al.*, 2012). Balandrin *et al.* (1988), identificaron 25 compuestos orgánicos volátiles de azufre, así mismo demostró que las propiedades larvicidas contra *Aedes aegypti* (portador del virus del dengue, fiebre amarilla, así como la chikunguña y la fiebre de Zika), *Heliothis virescens* (gusano del tabaco) y *Heliothis zea* (gusano de la mazorca de maíz) se debe al disulfuro de di-*n*-propilo (**20**) (**Figura 2.10**) identificado como el componente principal. Posteriormente, Shivashankar *et al.* (2012), analizaron la composición de volátiles emitidos por semilla de “neem” y la pasta obtenida después de la extracción de aceite, el análisis se realizó por microextracción en fase sólida por espacio de cabeza (HS-SPME) en combinación con cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS), identificaron 71 y 101 compuestos volátiles que representan 83,47 % y 85,62 % del total de los compuestos volátiles presentes en semillas y pasta, respectivamente. De los compuestos identificados, los ácidos grasos constituyen el grupo principal (24,82 %), seguida de aldehídos y cetonas (26,49 %) y compuestos azufrados (12,94 %). Los componentes “volátiles” más abundantes fueron (Z)-9,7- octadecadienal (**21**) y ácido palmítico (**22**), como se muestra en la **Figura 2.10**.

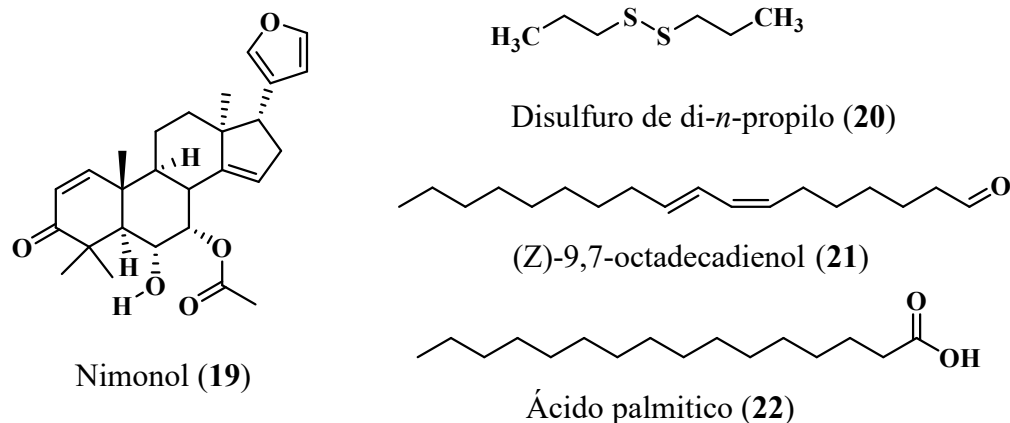


FIGURA 2.10 Compuestos volátiles de la semilla de *Azadirachta indica*.

Con respecto a los estudios realizados en la corteza de *Azadirachta indica*, se encuentran pocos estudios en la literatura. Sin embargo, Ara *et al.* (1989), aislaron tres nuevos diterpenoides tricíclico, que mostraron un efecto antibacteriano debido a la presencia de margolona (**23**), margolonona (**24**), isomargolonona (**25**), como se muestra en la **Figura 2.11**, cuyas estructuras han sido elucidadas como ácido 12-metil-7-oxopodocarpa-8,11,13-trieno-13-carboxílico, ácido-12-methyl-3,7-dioxopodocarpa-8,11,13-trieno-13-carboxílico y ácido-13-metil-3,7-dioxo podocarpa-8,11,13-trien-12-carboxílico, respectivamente. Los compuestos fueron aislados con EtOH y posteriormente en una partición entre AcOEt y H₂O, las técnicas que se emplearon para la elucidación fueron MS, IR y por RMN ¹H, ¹³C. Estos constituyentes fueron probados por su actividad antibacteriana contra diversos organismos grampositivos y gramnegativos. De estos ácidos carboxílicos, se encontró que **23** posee actividad antibacteriana contra *Klebsiella oxytoca*, **24** fue eficaz contra *Staphylococcus epidermidis*, *K. oxytoca* y *Serratia lutea*, mientras que **25** fue efectivo contra *K. oxytoca* y *S. lutea*.

Posteriormente Ara *et al.* (1990), aislaron otros tres nuevos diterpenoides nombrados margocina (**26**), margocinina (**27**) y margocilina (**28**) (**Figura 2.11**) y sus estructuras se establecieron como 8,11,13-abietatrien-3,7-diona, 8,11,13-abietatrien-12,16-dihidroxi-3,7-diona y 8,11,13-abietatrien-3 β ,12-dihidroxi-7-ona, respectivamente; fueron extraídos con éter de petróleo y posteriormente con acetato de etilo, las técnicas que se emplearon para la elucidación fueron MS y por RMN ¹H, ¹³C, DEPT, COSY, aunque no se reportó alguna actividad biológica. Van der Nat *et al.* (1991), probaron que el extracto acuoso de la corteza

de *A. indica* inhibe la generación de quimioluminiscencia por leucocitos polimorfonucleares humanos activados (PMN). En base a los resultados de esta actividad, los compuestos responsables se purificaron por extracción con diferentes disolventes orgánicos y HPLC, se aislaron e identificaron por medio de HPLC, CCF, MS, ¹H-RMN, UV obteniendo los siguientes taninos condensados: ácido gálico (**29**), (+) galocatequina (**30**), (-) epicatequina (**31**), (+) catequina (**32**) y epigalocatequina (**33**) (**Figura 2.11**), de los cuales **29**, **31** y **32** son los principales responsables de inhibir la generación de quimioluminiscencia por parte de neutrófilos polimorfonucleares humanos activados (PMN), lo que indica que estos compuestos inhiben la explosión oxidativa de PMN durante la inflamación (Grupta *et al.*, 2012; Lokeshwar *et al.*, 2012)

Otro estudio realizado por Van derNat *et al.* (1991), indicó que el extracto acuoso crudo de la corteza de *A. indica* posee actividad inhibidora, tanto en la ruta clásica (CP) como en la alternativa (activación del complemento humano). La purificación de los compuestos con base a la actividad inhibidora involucró la extracción con metanol, intercambio iónico y cromatografía de permeación de gel. Mediante esta de purificación, se obtuvieron dos polímeros, NB-I y NB-II, uno es un compuesto altamente activo, con un peso molecular relativamente bajo (NB-111) y el otro es un compuesto menos activo con un peso molecular alto (NB-II). Los polímeros se caracterizaron utilizando reacciones de color, CCF, CGL y HPLC y después de hidrólisis y cromatografía de permeación de gel fueron nombrados como peptidoglicanos.

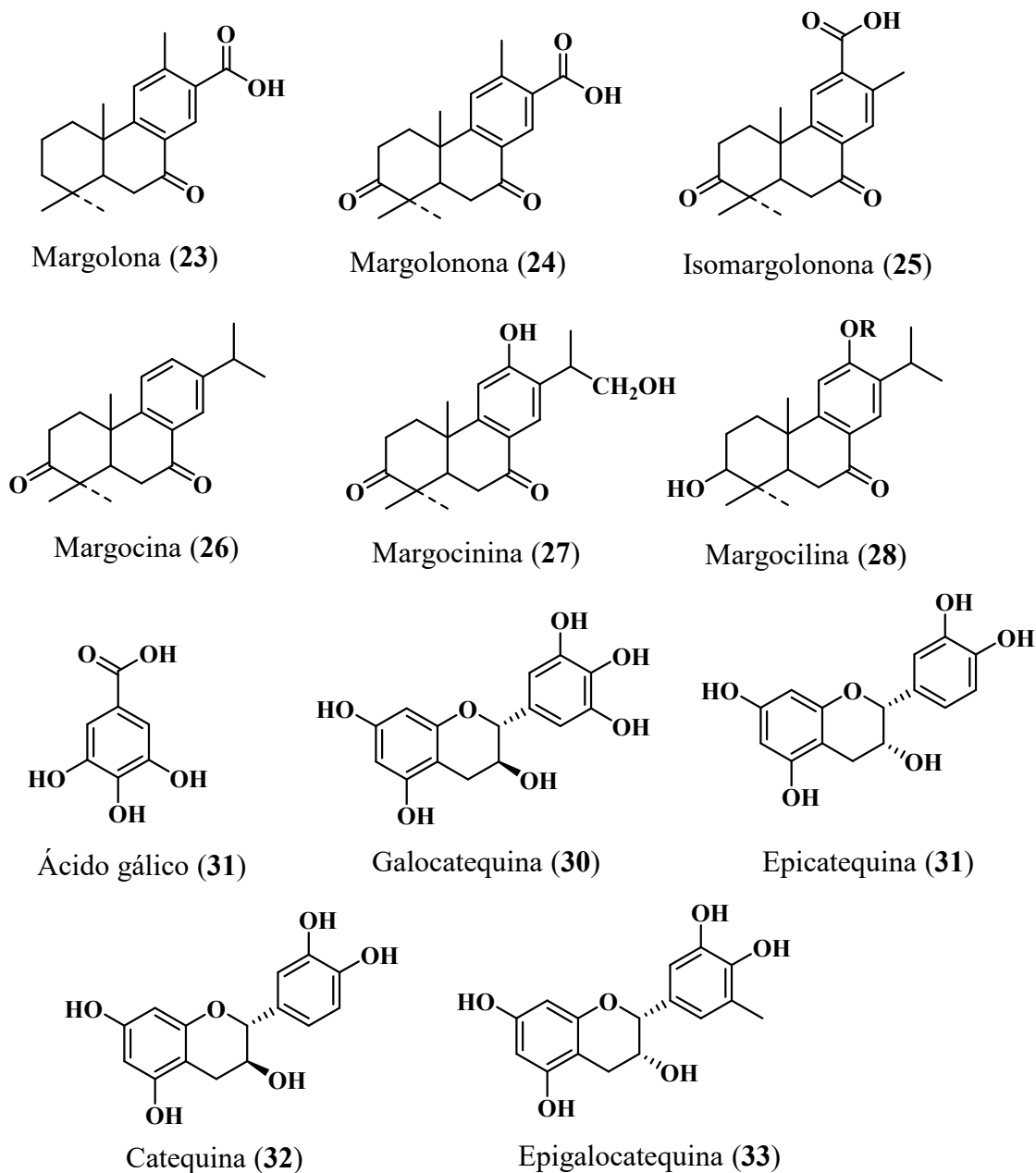


FIGURA 2.11 Compuestos aislados de la corteza de *Azadirachta indica*.

Saleem *et al.* (2018), y Lokeshwar *et al.* (2012), describen una serie de compuestos aislados de diferentes partes de la planta, como se muestra en la **Tabla 2.3**.

TABLA 2.3 Compuestos aislados de las partes de *A. indica* (Saleem *et al.*, 2018; Lokeshwar *et al.*, 2012).

Parte usada	Fitoquímico aislado	Naturaleza de extracto	Referencia
Hojas	Estigmasterol, terpinen-4-ol, sugiol, 4-cimeno, nimbiol, α -terpineno y vitamina E	Diclorometano y extracto metanólico.	Nand <i>et al.</i> , 2016.
	Esteroides, glucósidos, flavonoides, triterpenoides, carbohidratos, alcaloides y antequinona.	Cloroformo, extracto acuoso y metanólico	Rapheal, 2012; Prashanth y Krishnaiah, 2014.
	Zafaral, meliacinanhidrida, nimocinol, e isomeldenina	Extracto etanólico	Siddiqui, <i>et al.</i> , 2004.
	Nimonol	Extracto etanólico	Gopalakrishnan <i>et al.</i> , 2002.
	Nimbotalina y n-tridecil benzeno	Extracto etanólico	V. Sharma <i>et al.</i> , 1998.
	Isoprenoide, flavanona (8,3'-di-isoprenil-5,7-dihidroxil-4'-metoxiflavanona), nonisoprenoides y meliacina	Extracto etanólico fraccionado con cloroformo y n-butanol	Garg y Bhakuni, 1984.
	22,23-Dihidronimocinol y desfurano-6- α -hidroxiazadiradiona	Extracto metanólico	Siddiqui <i>et al.</i> , 2002.
	Meliatetraolenona y odoratona	Extracto metanólico	Siddiqui, <i>et al.</i> , 2003.
	Compuestos volátiles	Aceite extraído con vapor	El-Tantawy <i>et al.</i> , 2013.
	Triterpenos tetracíclicos	Extracto etanólico	Siddiqui y Faizi, 1984; Siddiqui <i>et al.</i> , 1986.
Raíces	α -ácido linoleico	Extracto <i>n</i> -hexano	Nair, Gopal, e Issac, 1997.
	Nimonol	Extracto metanólico	Suresh <i>et al.</i> , 1997.
Raíces	Nimbilina y nimolinina	Diclorometano y extracto etanólico	Ara <i>et al.</i> , 1989b.
Semillas	Genisteina 7-O-glucosido y (-)-epicatequina	<i>n</i> -hexano y extracto de acetato de etilo	Kanwal <i>et al.</i> , 2011.
	Tetranortriterpeno	Aceite de semilla en alcohol	Gaikwad <i>et al.</i> , 1990.
	Compuestos organosulfuros	Extracto dietil éter, extracto volátiles con vapor	Balandrin, Lee, y Klocke, 1988; Mubarak y Kulatilleke, 1990.

Continuación de TABLA 2.3

Semillas	<p>Salanina <i>n</i>-hexano</p> <p>Azadiractina M, azadiractina N, 11-epi-azadiractina H, triterpenoide (1α,7α-diacetoxiapotirucal-14-eno-3α,21,22,24,25-pentaol), odoratona, 2β,3β,4β-trihidroxipregnan-16-ona</p> <p>11-Hidroxiazadiractina-B, 1-tigloil-3-acetilazadiractinina, 1,2-diacetil-7-tigloil-12-hidroxivilasinina, y 23-desmetillimocina-B</p> <p>1α-Metoxy-1,2-dihidroepoxiazadiradiona, 1β,2β-diepoxiazadiradiona, 7-acetilneotrichilenona, desacetil-7-benzoilazadiradiona, 7-desacetil-7-enzolepoxiazadiradiona, 7-desacetil-7-benzoil-gedunina</p> <p>Azadiractina</p> <p>Deacetilazadirachtinol</p> <p>1α,2α-Epoxi-17β-hidroxiazadiradiona, 1α,2α-epoxinimolicinol y 7-desacetilnimolicinol junto con epoxiazadiradiona, 17β-hidroxiazadiradiona, gedunina, nimbina y nimolicinol</p>	<p><i>n</i>-hexano</p> <p>Extracto metanólico</p> <p>Extracto metanólico</p> <p>Extracto éter de petróleo disuelto en metanol</p> <p>Extracto diclorometano y etanólico Aceite de semilla</p> <p>Extracto metanólico</p>	<p>Yamasaki, <i>et al.</i>, 1988. Luo, <i>et al.</i>, 1999; Luo, <i>et al.</i>, 2000.</p> <p>Kumar, Srinivas, y Yakkundi, 1996.</p> <p>Kraus, Cramer, y Sawitzki, 1981.</p> <p>Jarvis y Morgan, 2000; Deota, <i>et al.</i>, 2000. Kubo, <i>et al.</i>, 1986.</p> <p>Hallur, Sivramakrishnan, y Bhat, 2002.</p>
Flores	<p>Flavonoides prenilados</p> <p>Flowerinea, flowerona, o-metilazadiranolida y diepoxiazadirol</p> <p>Sesquiterpenos, compuestos aromáticos, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, y pocos hidrocarburos</p> <p>Azarona, azadirona, e isoazadiranolida</p>	<p>Extracto metanólico</p> <p>Extracto metanoico</p> <p>Extracto <i>n</i>-hexano</p> <p>Extracto metanólico</p>	<p>Nakahara <i>et al.</i>, 2002.</p> <p>Siddiqui <i>et al.</i>, 2003.</p> <p>Siddiqui <i>et al.</i>, 2009.</p> <p>Siddiqui, Ali, y Kashif, 2006.</p>

Continuación TABLA 2.3

Frutas	Mahmoodina, azadiractol y naheedina	Extracto etanolico	Siddiqui, <i>et al.</i> , 1992.
	Salimuzalina, ácido azadirolico, azadiradinol y azadironol	Extracto etanolico	Siddiqui, Ghaiussdin, y Faizi, 1998.
	Limocinona, limocin A, limocin B, limocinol y limocinina	Extracto etanolico	Siddiqui, Ghiasuddin y Faiz, 1991.
Corteza	Polisacáridos G1A, G1B	Extracto acuoso	Fujiwara <i>et al.</i> , 1982.
	Polisacáridos G2A, G3A		Fujiwara <i>et al.</i> , 1984.
	NB-2 Peptidoglucano		Vander Nat <i>et al.</i> , 1987.
	Ácido gálico, (+) galocatequina, (-) epicatequina, (+) catequina y epigalocatequina		Vander Nat <i>et al.</i> , 1991.
	Margolona, margolonona, isomargolonona.		Ara <i>et al.</i> , 1989.
	Margocina, margocinina y margocilina		Ara <i>et al.</i> , 1990.

2.6.4. Efecto acaricida de la semilla del árbol de “neem” sobre garrapatas *Rhipicephalus microplus*

Se han realizado estudios sobre la utilización de extractos de neem para controlar especies de garrapatas como *Hyalomma anatolicum excavatum*, *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis* y *Rhipicephalus microplus* (Micheletti *et al.*, 2009). En Colombia, Benavides (2001) expuso garrapatas *R. microplus* a extractos etéreo y acuoso de semilla y observó que el extracto etéreo tuvo el mayor efecto de inhibición en la oviposición (90.7 %) y mortalidad (80 %), mientras que el extracto acuoso no tuvo efecto ixodicida. En la India Srivastava *et al.* (2008), evaluaron la eficacia acaricida del extracto etanólico de semilla de neem en *R. microplus* usando el método de inmersión de hembras, y obtuvieron mortalidad de 15 a 50 % a concentraciones de 2 a 5 %, y de 65 y 70 % a concentraciones de 6 y 7 %, respectivamente. En Brasil, Micheletti *et al.* (2009), evaluaron el efecto del extracto hexánico de semilla molida de neem en garrapatas adultas *R. microplus*, resultando una mortalidad de 65 % a la concentración de 1% a los 21 días; también evaluaron un extracto etanólico obtenido de hoja de neem a la misma concentración que el hexánico (1 %), y este extracto provocó 32 % de inhibición de la oviposición y 75 % de eclosión de larvas de *R. microplus*. En Brasil, Giglioti *et al.* (2011) obtuvieron 82 y 88 % de inhibición de la oviposición en *R. microplus* expuestas

a extracto etanólico de semilla de neem enriquecido con aceite comercial diluido a 10 y 12 %, respectivamente.

2.7. Esponja *Ectyoplasia ferox*

La esponja *Ectyoplasia ferox*, perteneciente a la familia *Raspailiidae*, fue identificada en 1864 por Duchassaing & Michelotti, es de color rojo marrón como se muestra en la **Figura 2.12**. Esta especie se encuentra en costas rocosas y arrecifes poco profundos, crece en las paredes de cuevas, ya que tiende a ser incrustante. Puede alcanzar de 30 a 50 cm de diámetro y de 1 a 5 cm de espesor, posee ósculos tubulares, y los lóbulos pueden alcanzar 5-10 cm. Se encuentra distribuido en Florida, el Caribe y las Bahamas, además de ser muy abundante en los fondos coralinos cubanos.



FIGURA 2.12 Esponja *Ectyoplasia ferox*.

2.7.1. Actividad biológica de *Ectyoplasia ferox*

El potencial químico y biológico de la esponja marina *Ectyoplasia ferox* está apoyado por algunos estudios de actividad citotóxica sobre varias líneas celulares como, por ejemplo, el estudio de los extractos polares de *Ectyoplasia ferox* recolectada en los arrecifes de Florida y las Bahamas que exhibían una citotoxicidad moderada (IC_{50} entre 8.5 y 19 $\mu\text{g/ml}$) en tres líneas celulares, J774 (macrófagos monocitos murinos), WEHI164 (fibrosarcoma murino), y P388

(leucemia murina). Los resultados de los estudios químicos asociaron la actividad citotóxica con la presencia de saponinas triterpenoides en los extractos, a las cuales denominaron ectyoplásidos y feróxidos, que fueron identificados como los mayores componentes químicos de esta especie (Cafieri *et al.*, 1999; Campagnuolo *et al.*, 2001). Otro estudio de un extracto crudo de *Ectyoplasia ferox*, recolectada en arrecifes de Curazao, demostró que este extracto inducía efectos sobre el ritmo cardiaco, tanto del tipo cronotrópico como inotrópico, el efecto se atribuyó a la interacción de las moléculas presentes en el extracto con los canales de calcio tipo L (Christ *et al.*, 2004). Colorado *et al.* en 2013 evaluaron la citotoxicidad de una mezcla de saponinas obtenidas del fraccionamiento de *E. ferox* frente a un bioensayo *in vitro* con líneas humanas de células cancerosas (Jurkat) y células de ovario hámster chino (CHO-K1), mostrando un IC₅₀ para células CHO-K1 de 38 mg/ml y para las células Jurkat a 48 mg/ml.

2.7.2. Metabolitos aislados de *Ectyoplasia ferox*

Existen algunos estudios de *Ectyoplasia ferox*, por ejemplo, Cafieri *et al.* (1999), aisló dos triglicósidos norlanostanos denominados ectyoplasido A (**34**) y ectyoplasido B (**35**) (**Figura 2.13**), fueron extráidos con MeOH, haciendo una partición con MeOH:H₂O y posteriormente haciendo un fraccionamiento con *n*-hexano, ambos compuestos se ha demostrado que poseen cadenas de azúcar idénticos (compuesto de dos unidades de β-galactosa y una unidad de α-arabinosa), pero que difieren en que **35** posee un grupo hidroxilo en sustitución de un hidrógeno del metilo, los compuestos fueron elucidados por elucidado por ¹H, ¹³C, COSY, HSQC, HMBC.

Costantino *et al.* (2000) aislaron de especímenes de *Ectyoplasia ferox* proveniente de la costa de Eleuteria, Islandia, dos glicoesfingolípidos con galactosa preniladas y cadenas de alquilo con ciclopropano, los cuales fueron nombrados plakosido C (**36**) y plakosido D (**37**), como se muestra en la **Figura 2.13**. Fueron extraídos con MeOH y BuOH, posteriormente se hicieron particiones con H₂O y BuOH, los compuestos fueron caracterizados con GC-MS y RMN con ¹H, ¹³C, COSY, HSQC, HMBC, ROESY. Estos compuestos junto con plakoside A (**38**) y B (**39**) (aislados de *Plakortis simplex*), son hasta la fecha los únicos ejemplos de glicoesfingolípidos con un azúcar prenilada.

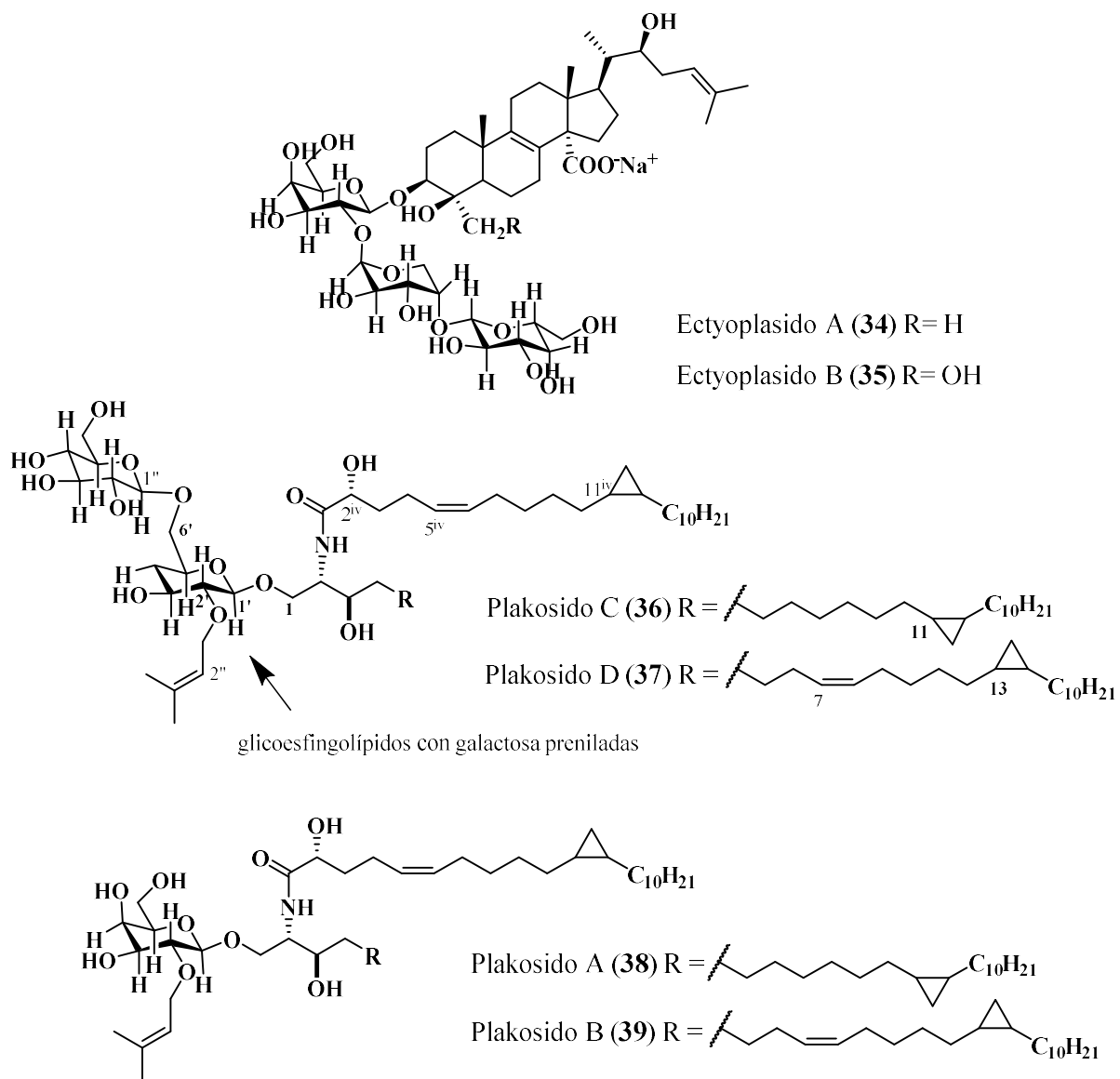


FIGURA 2.13 Algunos compuestos aislados de *Ectyoplasia ferox*.

Posteriormente, Campagnuolo *et al.* (2001), aislaron dos nuevas saponinas terpenoides, nombrados feróxosido A (40) y feróxido B (41) de especímenes de *E. ferox* provenientes de la isla de Gran Bahama (Figura 2.14). Fueron extraídos por el método de Kupchan, con disolvente butanol, fueron caracterizados por HPLC y elucidado por ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC. Estos triterpenos son norlanostano glicosilados con una ramnosa que contiene una cadena de tetrasacárido. La estereoquímica de C-23 se obtuvo por el método de Mosher

modificado para alcoholes secundarios, **40** y **41** son moderadamente citotóxicos (IC₅₀ 19 µg/ml) contra la línea celular de monocitos y macrófagos de agentes murinos.

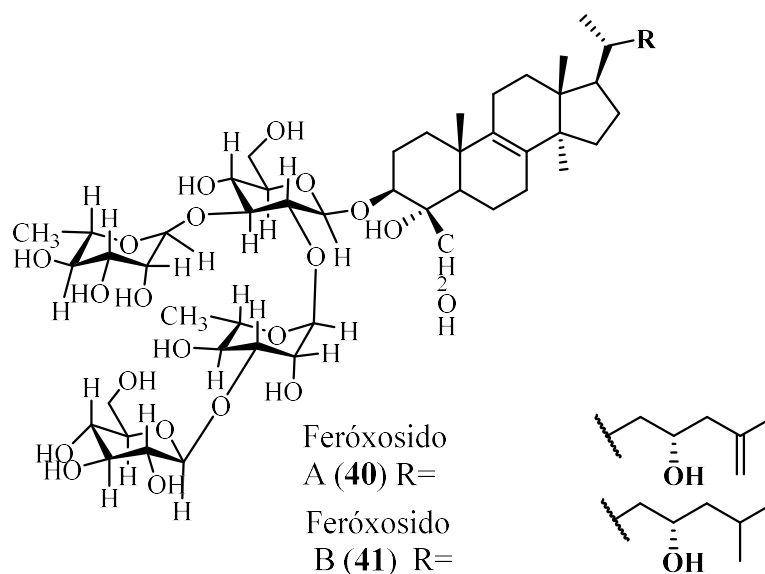


FIGURA 2.14 Saponinas terpenoides aisladas de *Ectyoplasia ferox*.

Costantino *et al.* 2003, aislaron a partir de *Ectyoplasia ferox* proveniente de las costas de Cayo rum (Bahamas) una ectyoceramida (**42**) con una galactosa en forma de furanosa (**Figura 2.15**), este es el primer ejemplo de un monohexo-furanosilceramida y, en general, el primer glicoesfingolípido natural con azúcar en forma de furanosa, fue extraído con MeOH y cloroformo, posteriormente en partición con H₂O y *n*-BuOH. El compuesto fue caracterizado por RMN ¹H, ¹³C, COSY, HSQC, HMBC.

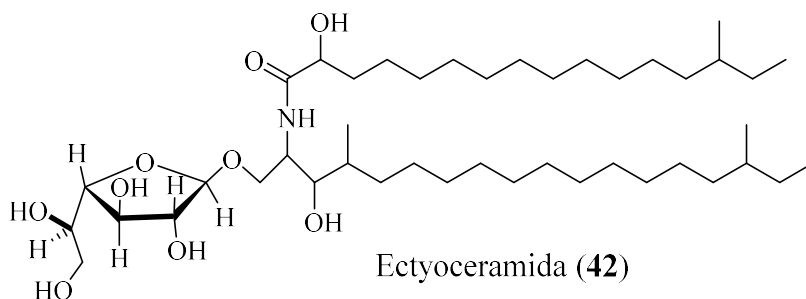


FIGURA 2.15 Primer glicoesfingolípido natural aislado de *Ectyoplasia ferox*.

Colorado *et al.* (2013), aislaron y elucidaron la estructura de cuatro triterpenoides glicosídicos, tres de los cuatro compuestos resultaron ser compuestos aún no descritos en la literatura y fueron denominados: Ulosósido F (**43**), Urabaósidos A (**44**) y Urabaósidos B (**45**), como se muestra en la **Figura 2.16**. El cuarto compuesto, Ulosósido A (**46**), ya había sido descrito en la esponja marina *Ulosa sp.* Fueron extraídos con disolventes CH₂Cl₂, MeOH, elucidado por RMN (¹H, ¹³C), COSY, HSQC, HMBC.

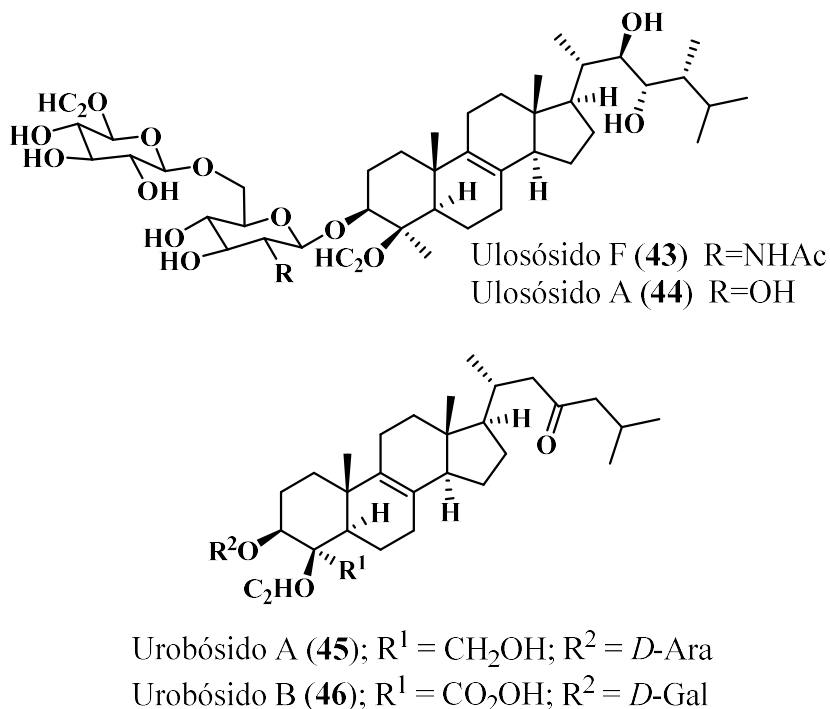


FIGURA 2.16 Triterpenoides glicosídicos aislados de *E. ferox*.

2.8. Esponja *Amphimedon compressa*

Amphimedon compressa, es una de las especies más comunes en las costas de Veracruz y el Caribe. Fue identificada desde 1864 por Duchassaing & Michelotti y pertenece a la familia Niphatidae, cuyo color varía de marrón con tonos verde a rojo o púrpura-marrón (**Figura 2.17**). Esta es una esponja de morfología variable pero frecuentemente columnar, los poros exhalantes son grandes y visibles, dispersados en filas, con bordes levantados y una superficie áspera y porosa. Se le ha encontrado en sustrato rocoso y a una profundidad de 19 m.



FIGURA 2.17 Esponja *Amphimedon compressa*.

2.8.1 Actividad biológica de *Amphimedon compressa*

Martínez *et al.* (2007), evaluó la actividad insecticida del extracto etanólico de la esponja *Amphimedon compressa* sobre larvas de IV estadio de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* a tres concentraciones, 500, 200 y 100 ppm, dando como resultado que el extracto tiene mayor efecto tóxico sobre las larvas de *Aedes aegypti* que sobre las larvas de *Culex quinquefasciatus*, con un promedio de mortalidad del 72.5 % a una concentración de 500 ppm.

Estrada *et al.* (2013), evaluaron la actividad citotóxica de trece fracciones obtenidas de las esponjas marinas *Amphimedon compressa*, *Cinachyrella kuekenthali*, *Svenzea zeai* e *Ircinia campana* para determinar su potencial citotóxico, en las líneas celulares Jurkat clon E6-1 y CHO-K1. Se emplearon las técnicas de MTT y coloración vital de Azul de Tripano para evaluar su citotoxicidad y viabilidad para determinar su concentración inhibitoria media, sin embargo, los resultados mostraron, que ninguna fracción, presenta actividad citotóxica significativa.

2.8.2 Metabolitos aislados de *Amphimedon compressa*

En las esponjas del género *Amphimedon* se han aislado aproximadamente 86 compuestos (Xu *et al.*, 2007), y entre las actividades biológicas más importante se encuentran la actividad

citotóxica, antiangiogénica, neurotóxica, además de inhibir la ADN-topoisomerasa I (Nemoto *et al.*, 1997; Matsunaga *et al.*, 2004).

Carballeira *et al.* (1992), encontró 3 aldehídos fosfolípidos de *Amphimedon compressa*, a los que denominó: (Z)-17-tricosenal (**47**), (Z)-19-pentacosenal (**48**) y (Z)-19-hexacosenal (**49**), junto con 5 fosfolípidos de ácidos grasos: (Z)-16-tricosenoico (**50**), (Z)-18-tricosenoico (**51**), (Z)-19-pentacosenoico (**52**), (Z)-20-heptacosenoico (**53**) y (Z)-21-octacosenoico (**54**). Estos fosfolípidos de ácidos grasos de cadena muy larga (**50-54**) que biosintetizan estos invertebrados marinos no han sido reportadas en organismos terrestres (**Figura 2.18**). Fueron extraídos con cloroformo-MeOH (1:1) y caracterizado por espectrómetro de masas.

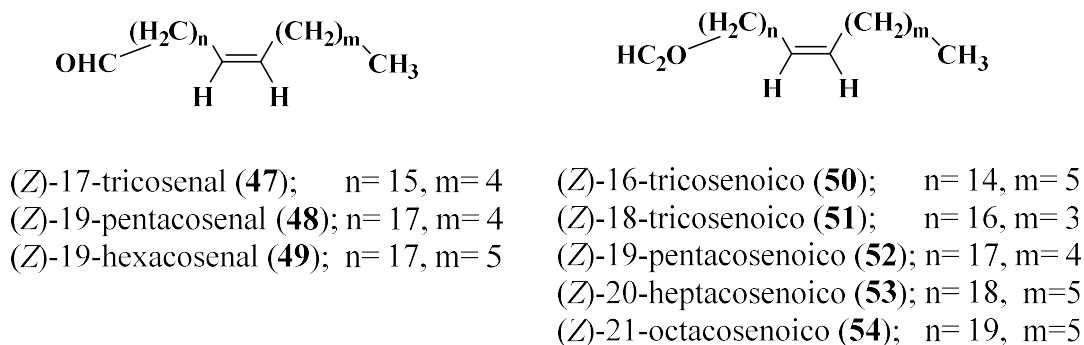
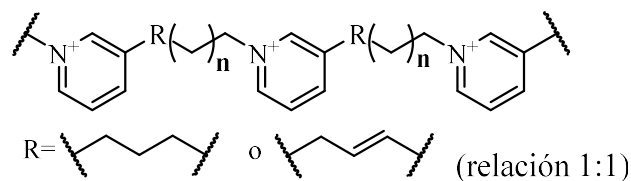
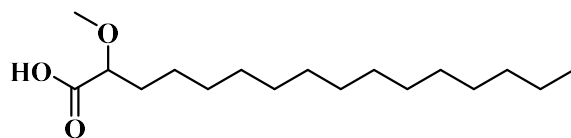


FIGURA 2.18 Aldehídos fosfolípidos y fosfolípidos de ácidos grasos aislados de *A. compressa*.

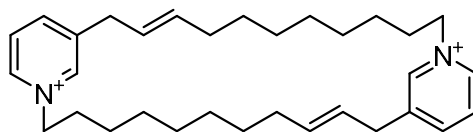
Albrizio *et al.* (1995), aisló de *Amphimedon compressa* un alcaloide de piridinio al que llamaron anfitoxina (**55**), el cual se caracteriza por ser un polímero de las unidades de 3-alkil- y 3-alkenilo piridinio (**Figura 2.19**). Fue extraído con MeOH:Tolueno (3:1), consecutivamente con *n*-BuOH, fue caracterizado por ^1H , ^{13}C , DET, COSY. Posteriormente, Thompson *et al.* (2010), establecieron que **55** posee una actividad insecticida moderada frente a *Xiphophorus variatus* (pez luna) y *Cylas formicarius elegantulus* (dulce gorgojo) y una importante mortalidad sobre peces luna. La esponja fue recolectada cerca de la costa de la isla de San Salvador.

Anfitoxina (**55**)**FIGURA 2.19** Alcaloide piridio aislado de *Amphimedon compressa*.

Carballeira *et al.* (1998), identificó el ácido 2-metoxihexadecanoico (**56**), ácido graso encontrado por primera vez en forma natural (**Figura 2.20**). La identificación de **56** tuvo una importante relevancia biosintética, fue extraído con MeOH:cloroformo (1:1) y fue caracterizado con CG-MS.

Ácido 2-metoxihexadecanoico (**56**)**FIGURA 2.20** Ácido graso aislado de *Amphimedon compressa*.

Xu *et al.* (2007), aislaron un nuevo compuesto antibacteriano denominado 8,8'-dienociclostelatamina (**57**) (**Figura 2.21**), la esponja provenía de Florida y fue extraído con MeOH, elucidado por ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC. El compuesto **57** mostró actividad antimicrobiana contra *Cándida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cryptococcus neoformans*, *Staphylococcus aureus* (MRSA) y *Aspergillus fumigatus* con IC_{50} de 0.4, 1.3, 2.1, 2.5, 0.25, y 0.3 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente.

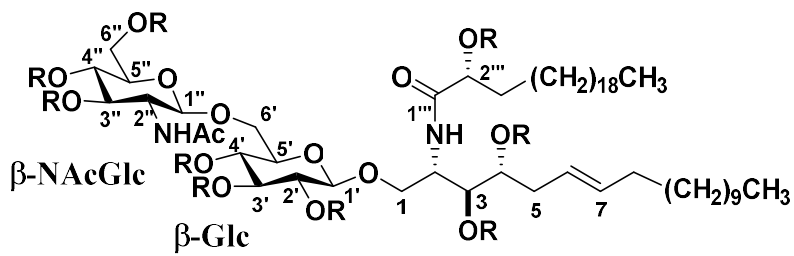


8,8'-dienociclostelatamina (57)

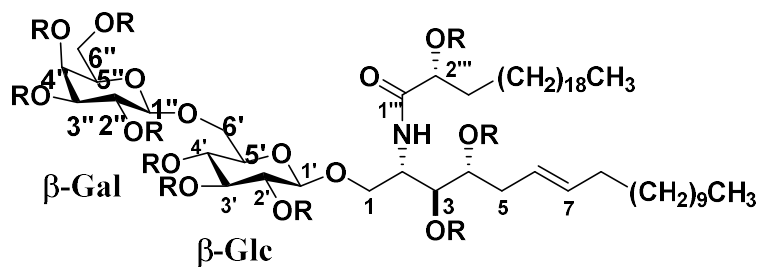
FIGURA 2.21 Nuevo compuesto antibacteriano, aislado de *Amphimedon compressa*.

Costantino *et al.* (2009) aislaron de *Amphimedon compressa*, dos glicosfingolípidos, nuevos hasta ese momento, denominados anficeramida A (58) y anficeramida B (59), que poseen una unidad de fitoesfingosina inusual (**Figura 2.22**). Fueron extraídos con Cloroformo-MeOH, caracterizado por HPLC y elucidado por ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC, MS.

La cadena del sacárido 58 se compone de un residuo de β -glucosa glicosilada en la posición 6 por un N-acetil- β -glucosamina. La cadena del sacárido de 59 se compone de una alolactosa [Gal (1 β → 6) Glc] con residuos β -ceramida, 58 y 59 se encontraron por primera vez en un producto natural.



Anficeramida A (58)



Anficeramida B (59)

FIGURA 2.22 Compuestos con grupos de ceramidas, aislado de *Amphimedon compressa*.

Además, se aisló e identificó acetamidoglucosil ceramida (**60**) como una nueva especie molecular para esta esponja, además de glucosil ceramida (halicerebrosido A (**61**)) y melibiosil ceramida (anfimelibrosido C (**62**)), **61** y **62** que ya habían sido reportadas para las especies de *Haliclona* sp. y *Agelas clathrodes*, respectivamente (**Figura 2.23**).

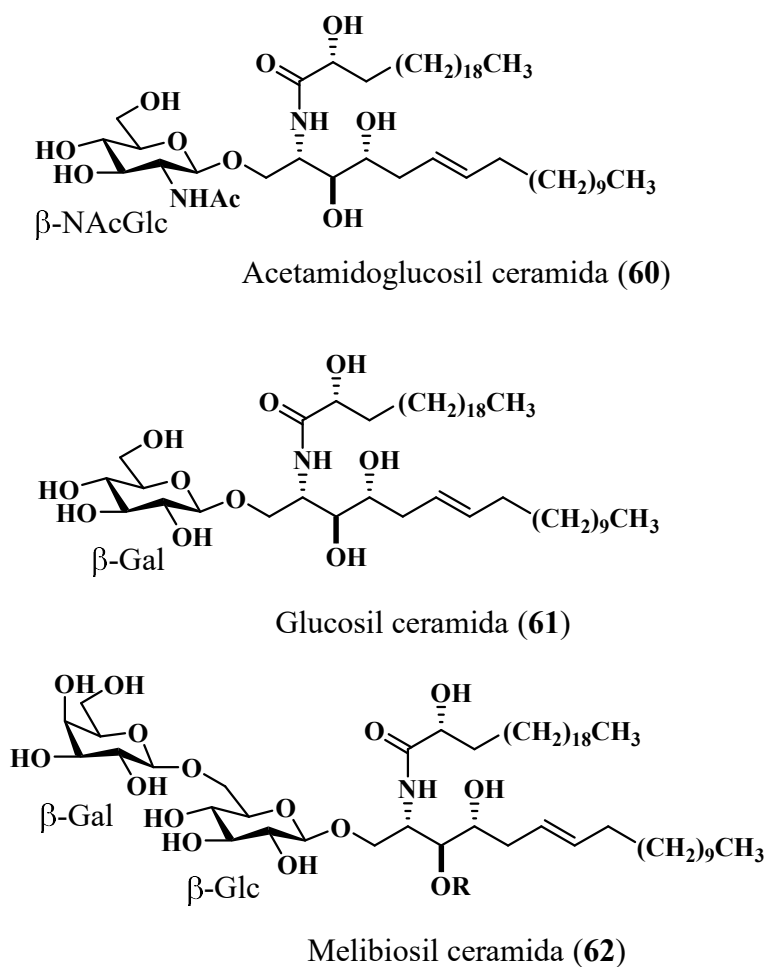


FIGURA 2.23 Compuestos con grupos de ceramidas, aislado de *Amphimedon compressa*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Extraer, purificar y determinar la estructura de metabolitos secundarios de las semillas de la planta *Azadirachta indica* y de las esponjas *Ectyoplasia ferox* y *Amphimedon compressa* recolectadas en el estado de Veracruz.

3.2 Objetivos específicos

- Extraer los metabolitos secundarios de las semillas de la planta *Azadirachta indica* y de las esponjas *Ectyoplasia ferox* y *Amphimedon compressa*, mediante técnicas de extracción sólido-líquido y líquido-líquido.
- Aislar y purificar los principales metabolitos secundarios de las semillas de la planta *Azadirachta indica* y de las esponjas *Ectyoplasia ferox* y *Amphimedon compressa*, utilizando diversas técnicas cromatográficas como columnas por gravedad, columnas de media presión y HPLC.
- Elucidar la estructura de metabolitos secundarios puros, utilizando técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

4. MATERIALES Y METODOS

El desarrollo de esta investigación se realizó en el laboratorio de Investigación “Química y Biotecnología” de la Facultad de Bioanálisis de la Universidad Veracruzana, Campus Veracruz, así como el “laboratorio de Bioprocesos”, ubicado en el edificio de la UNIDA del Instituto Tecnológico de Veracruz.

El esquema general de la investigación se muestra en la **Figura 4.1**.

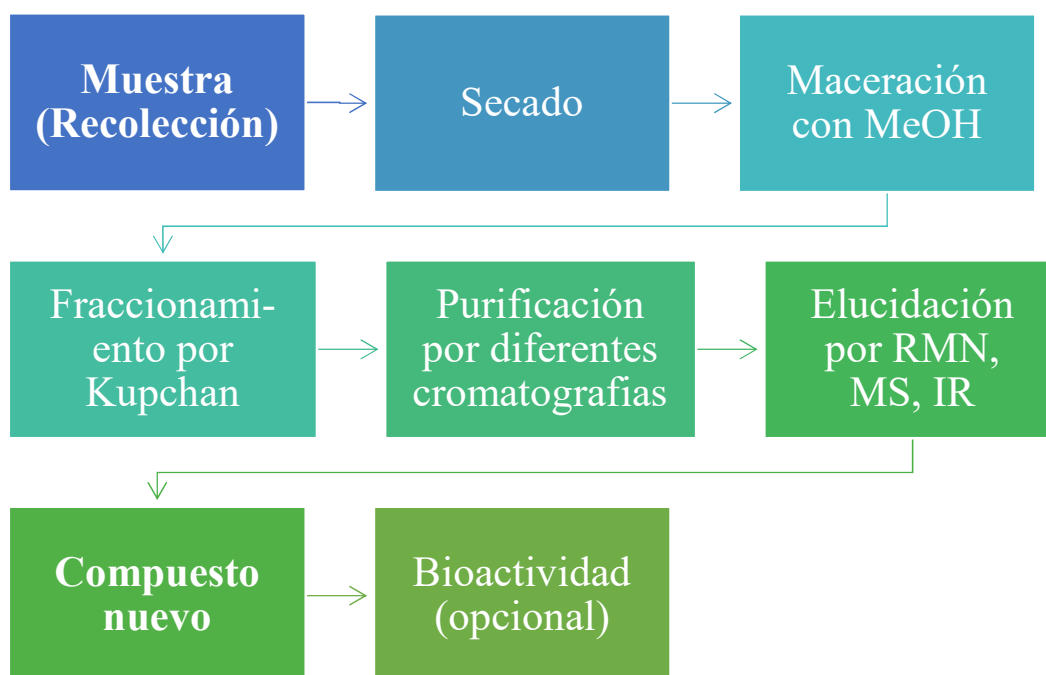


FIGURA 4.1 Esquema general del procedimiento para la extracción y elucidación de metabolitos secundarios de las especies

4.1. Recolección de los especímenes

Las semillas y la corteza de *Azadirachta indica* fueron recolectadas el 21 de mayo del 2016 en el rancho “Los Coyotes”, localizado en el municipio de Ignacio de la Llave (19°19’14’’N; 96°7’56’’O), propiedad del Ing. Netzahualcóyotl Gómez Utrera. Fueron identificadas por taxonomistas del Instituto de Investigaciones Biológicas de la Universidad Veracruzana y un ejemplar fue depositado en el herbario de la Universidad. Las semillas se secaron a la sombra

extendiéndolas en bandejas durante 7 días, en el laboratorio de “Química y Biotecnología” de la Facultad de Bioanálisis-UV. Posteriormente se molieron hasta obtener un tamaño de partícula inferior a 1 cm, en una licuadora Osterizer a una temperatura de 23 °C aproximadamente. En el caso de los especímenes de las esponjas *Ectyoplasia ferox* y *Amphimedon compressa*, la recolección se realizó el 18 de septiembre de 2014, en el arrecife Tuxpan, ubicado al norte de Veracruz, aproximadamente a 300 Km del Sistema Arrecifal Veracruzano (21° 01’N y 97° 11’ O). La recolección de las esponjas se realizó mediante buceo libre y con equipo SCUBA, los especímenes se guardaron en una nevera y se transportaron inmediatamente al laboratorio para su procesamiento que consistió en separar los organismos asociados y triturar los especímenes. Un ejemplar de cada especie fue depositado en la colección del Laboratorio de Arrecifes Coralinos de la Universidad Veracruzana (UVE) en Tuxpan, Veracruz.

4.2. Maceración de los especímenes

Una vez procesadas las muestras biológicas se procedió a su extracción, mediante una maceración en frío, la cual consistió en colocar las semillas y la corteza de *A. indica* (previamente secas y trituradas) y las esponjas *E. ferox* y *A. compressa* (trituras en fresco) con MeOH, se dejó reposar 24- 48 horas y posteriormente se filtraron con papel filtro N° 2 en un embudo de filtración simple. Posteriormente, los cuatro extractos filtrados, se concentraron en un rotavapor a presión reducida hasta sequedad (en cada especie se realizaron de 5 a 7 veces el procedimiento anterior, obteniéndose los extractos crudos de cada especie), un ejemplo del procedimiento se observa en la **Figura 4. 2**.

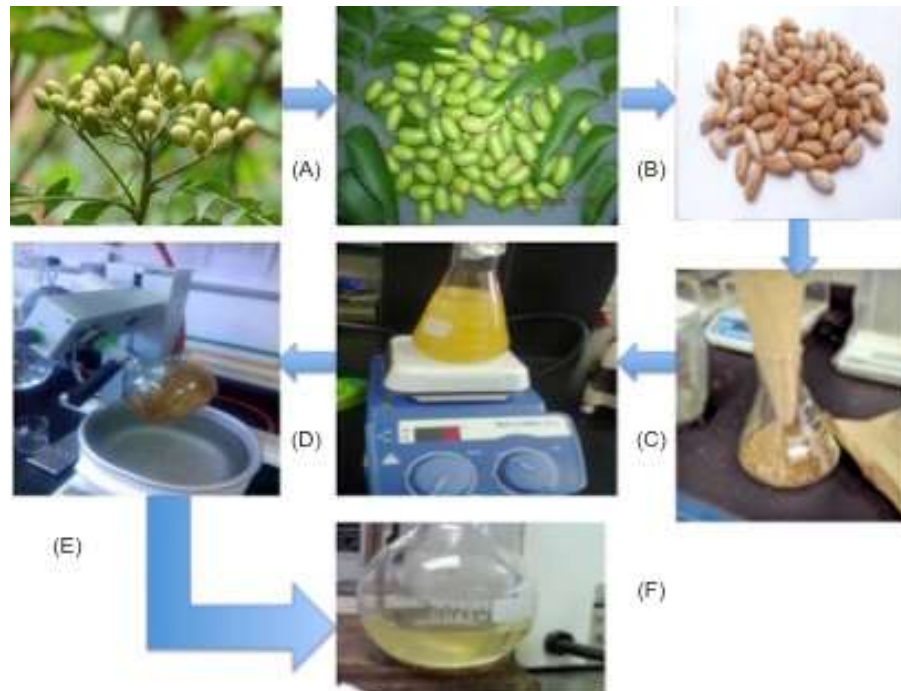


FIGURA 4.2 Recolección (A), secado de las semillas (B), maceración (C), agitación (D), evaporación rotatoria bajo presión (E), obtención del extracto metanólico (F).

En el caso de las esponjas, el residuo se secó por 7 días y se extrajo en caliente con MeOH, empleando un equipo de Soxhlet, el extracto resultante de este se mezcló a su respectivo extracto de la maceración en frío (utilizando MeOH y a temperatura ambiente), así se obtuvieron las fracciones AIS-1, AIC-1, EFM-1 y ACM-1 (*A. indica* semilla y corteza, *E. ferox* y *A. compressa* respectivamente).

4.3. Extracción y partición de los especímenes

Cada uno de los extractos fueron sometidos a una partición por el método de Kupchan (Kupchan *et al.*, 1973), el cual se fundamenta en diferente solubilidad de los metabolitos presentes en el extracto crudo en los diferentes disolventes a utilizar; *n*-hexano, CH₂Cl₂, AcOEt y la mezcla de MeOH:H₂O (1:1). Inicialmente, cada extracto se suspendió en 400 ml de una mezcla de MeOH:H₂O y se agregó 400 ml de *n*-hexano, la mezcla obtenida se mantuvo en agitación continua por 1 hora, posteriormente se pasó la mezcla bifásica a un embudo de separación, se separó la fase hexánica se concentró en rotavapor para obtener la fracción de *n*-hexano, este procedimiento se realizó tres veces y a la fracción MeOH:H₂O restante, se le realizó

consecutivamente un proceso de extracción con cada uno de los disolventes, CH_2Cl_2 y AcOEt en lugar del *n*-hexano (**Figura 4.3**).

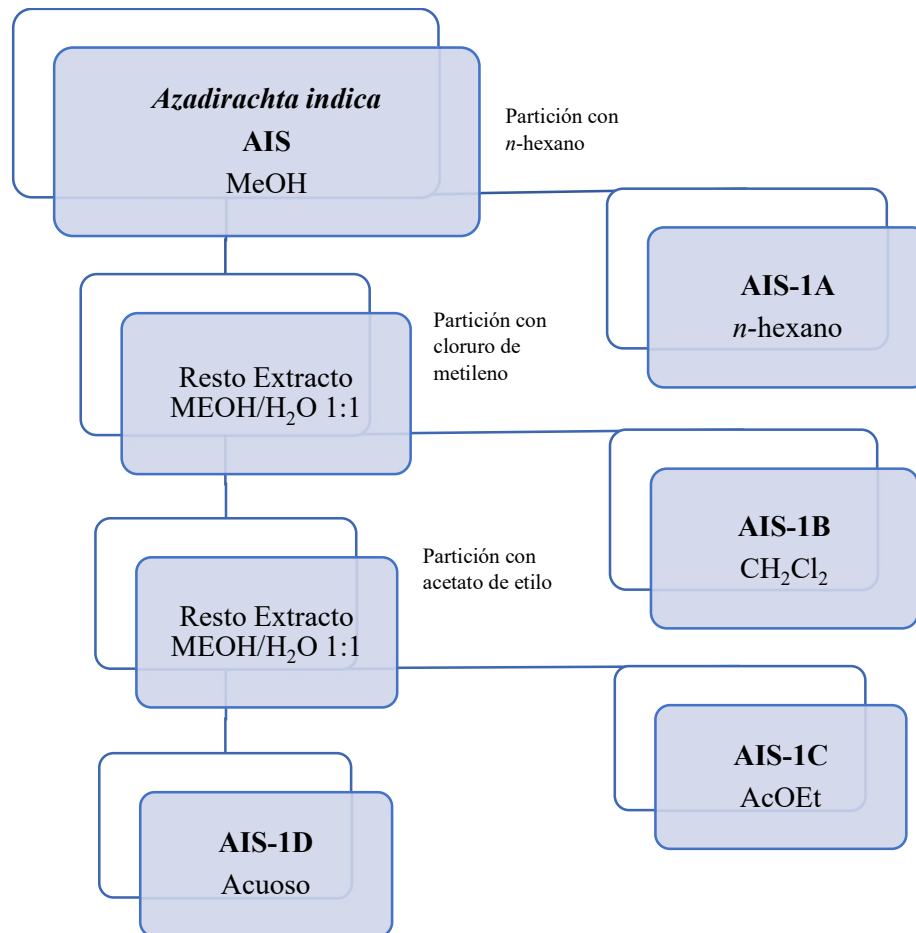


FIGURA 4.3 Esquema del fraccionamiento del extracto metanólico por el método de Kupchan, ejemplo de las semillas de *A. indica*.

A cada especie se le hace la partición ya descrita anteriormente con los mismos disolventes, obteniendo así cuatro fracciones para cada extracto crudo, como se muestra en la **Tabla 4.1**.

TABLA 4.1 Fracciones obtenidas de la partición por el método de Kupchan de *A. indica*, *E. ferox* y *A. compressa*.

Fracción	Naturaleza del extracto	Especie
AIS-1A	<i>n</i> -hexano	<i>Azadirachta Indica</i> semilla
AIS-1B	CH ₂ Cl ₂	
AIS-1C	AcOEt	
AIS-1D	MeOH:H ₂ O (1:1)	
AIC-1A	<i>n</i> -hexano	<i>Azadirachta Indica</i> corteza
AIC-1B	CH ₂ Cl ₂	
AIC-1C	AcOEt	
AIC-1D	MeOH:H ₂ O (1:1)	
EFM-1A	<i>n</i> -hexano	<i>Ectyoplasia ferox</i>
EFM-1B	CH ₂ Cl ₂	
EFM-1C	AcOEt	
EFM-1D	MeOH:H ₂ O (1:1)	
ACM-1A	<i>n</i> -hexano	<i>Amphimedum compressa</i>
ACM-1B	CH ₂ Cl ₂	
ACM-1C	AcOEt	
ACM-1D	MeOH:H ₂ O (1:1)	

Las fracciones, **AIS-1A**, **1B** y **1C**, se les realizó una segunda extracción líquido-líquido, tipo Kupchan, es decir, se concentraron las muestras, se disolvieron con MeOH:H₂O (1:1) y posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido por disolventes de polaridad, obteniéndose en el caso de **AIS-1A** (11.2 g), tres subfracciones, **AIS-1A1** (*n*-hexano; 5.25 g), **AIS-1A2** (CH₂Cl₂; 3,65 g) y **AIS-1A3** (MeOH:H₂O; 2.3 g); mientras que de la fracción **AIS-1B** (16.8 g) se obtuvieron las fracciones **AIS-1B2** (CH₂Cl₂; 12 g) y **AIS-1B3** (MeOH:H₂O; 2.3 g), debido a que la extracción es en orden ascendente de polaridad, además que el hexano es inmisible con el diclorometano; la fracción **AIS-1C** (2.5 g) se fraccionó en las subfracciones **AIS-1C2** (CH₂Cl₂; 1.3 g) y **AIS-1C3** (MeOH:H₂O; 1.2 g) y finalmente de la fracción **AIS-1D** (3.2 g) se obtuvieron las fracciones **AIS-1D2** (CH₂Cl₂; 0.83 g) y **AIS-1D3** (MeOH:H₂O; 2.1 g).

4.4 Técnicas cromatográficas

Para la extracción y purificación de los compuestos se usaron disolventes destilados de grado reactivo de la marca Golden Bell[®], mientras que para el proceso de remoción de los disolventes

se utilizó un evaporador rotatorio R-3 equipado con un baño con agua a una temperatura 40 °C y bombas de alto vacío V-700, de la marca Büchi.

La elección de los sistemas de elución, de los disolventes y sus mezclas, de las cromatografías en columna, así como la monitorización de las mismas para realizar la colección de las fracciones, se hizo mediante cromatografía de capa fina (CCF), utilizando placas silicagel soportada en aluminio conteniendo un indicador fluorescente (Silica gel 60 F₂₅₄, de la casa comercial Merck[®], Kenilworth, NJ, USA). Las placas fueron reveladas primeramente por exposición a la luz UV de onda corta (254 nm) y de onda larga (365 nm), posteriormente por impregnación con una disolución al 10 % de ácido fosfomolibdico en etanol y calentadas a 140 °C en una parrilla de calentamiento (**Figura 4.4**)

4.4.1. Cromatografía de exclusión

Para la separación de compuestos por diferencia de pesos moleculares, se utilizó el método de permeación en gel, como fase estacionaria se utilizó la resina lipofílica Sephadex[®] (25–100 µm) de Sigma-Aldrich[®]. Las columnas fueron preparadas, humectando la resina en metanol durante 12 h para posteriormente empacar la columna con el material, por gravedad.

4.4.2. Cromatografía de fase normal

El fraccionamiento de las muestras por cromatografía de columna de fase normal se realizó utilizando como fase estacionaria gel de sílice 60 G (Merck[®]), empacada en una columna de cristal con diversos diámetros internos. La columna se preparó con una pasta de gel de sílice y el eluyente y se vertió en la columna, evitando la formación de burbujas de aire y cuarteaduras dentro de la misma. Posteriormente se depositó la muestra y se procedió a agregar el disolvente para la elución. La relación entre el peso del producto/peso de la gel de sílice, fue de 1/200.

4.4.3. Cromatografía en columnas de media presión

La cromatografía de columna de media presión se realizó en columnas preempacadas Lobar[®] LiChroprep[®] si-60 (40–63 µm) Gröbe B (ø 310 x 25mm) de Merck[®], con una bomba de flujo de disolvente.

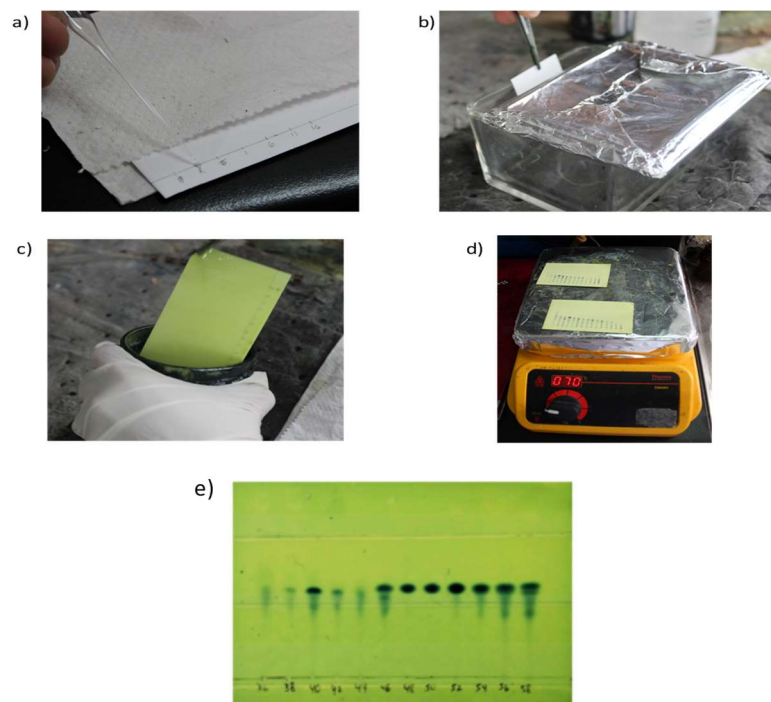


FIGURA 4.4 Cromatografía en capa fina. a) Aplicación de muestra, b) Elución de placa cromatográfica, c) Aplicación del revelador, d) Calentamiento de la placa, e) Patrón de desplazamiento de la placa cromatográfica.

4.4.4. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Las separaciones por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) se llevaron a cabo con un sistema LKB 2248 (LKB-Producter AB, Bromma, Suecia), el cual está equipado con un detector de matriz (arreglo) de fotodiodos. Todos los disolventes utilizados fueron de calidad HPLC. La cromatografía por HPLC se monitorizó mediante CCF, usando las placas cromatográficas de de Silica gel 60 F₂₅₄, descritas previamente y se visualizaron como ya se mencionó. La inyección de la muestra en el sistema de cromatografía de HPLC, se realizó mediante una jeringa marca Hamilton de 2 ml.

4. 5. Técnicas Espectroscópicas

4.5.1. Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), se realizaron en espectrómetros Bruker® Avance™ (500 y 600 MHz), a 300 K. El espectrómetro Bruker® Avance 600 MHz está equipado con una criosonda de detección inversa TCI de 5 mm. Los espectros fueron

referenciados utilizando la señal residual del CHCl_3 (δ_{H} 7.26 ppm para ^1H y δ_{C} 77.0 ppm para el ^{13}C) y del MeOH (δ_{H} 3.31 ppm para ^1H y δ_{C} 49.0 ppm para el ^{13}C). Los desplazamientos químicos de RMN (δ) descritos en el presente trabajo se presentan en partes por millón (ppm), así mismo, las constantes de acoplamiento homo y heteronucleares (J) se presentan en Hertz (Hz). Los experimentos de RMN, COSY, HSQC y HMBC, se adquirieron utilizando secuencias de pulsos estándar. Los datos de adquisición obtenidos del espectrómetro fueron procesados en un PC utilizando un Software Topspin y MestReNova (v 11.01, Santiago de Compostela, España). Las muestras se prepararon de la siguiente manera:

- Como primer paso la muestra pura fue secada para eliminar restos de disolvente, y posteriormente se preparó con el disolvente deuterado.
- Para la muestra se dispone de una cantidad apropiada de solución de 0,6-0,7 mL en el tubo de RMN de 0.5 mm de diámetro (**Figura 4.5**).
- Posteriormente se procedió a su registro en el espectro de RMN.



FIGURA 4.5 Muestras preparadas para análisis de RMN

4.5.2. Espectroscopia Infrarroja

Los espectros de Infrarrojo (IR) fueron registrados en un espectrómetro Bruker IFS55 (Billerica, MAA, EE.UU.). Se utilizó una solución de cloroformo para colocar una película de los compuestos en el disco de NaCl.

4.5.3. Espectrometría de Masas

Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se realizaron en un espectrómetro VG AutoSpec VG-FISONS[®] (Danvers, MA, EE. UU.). De acuerdo a las necesidades particulares de cada muestra se utilizaron las técnicas de cationización por impacto electrónico (EI), bombardeo de átomos rápidos (FAB) y electrospray (ESI).

4.5.4. Rotación óptica

La rotación óptica se determinó en un polarímetro Perkin-Elmer[®], modelo 241 (Waltham, MA, EE. UU.), a una temperatura de 25 °C y usando la línea D de sodio ($\lambda = 589 \text{ nm}$). Los metabolitos fueron disueltos en cloroformo anhidro y se empleó una celda de 1 dm de longitud. Se utilizó como disolvente MEOH para disolver las muestras.

4.5.5. Espectroscopía de absorción en el Ultravioleta-Visible

Los espectros UV-visible fueron registrados en un espectrofotómetro V-560, de Jasco Inc., los compuestos de interés fueron disueltos en metanol y se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm.

4.6. Actividad acaricida de fracciones y compuestos puros *in vitro*

A los compuestos puros obtenidos de las fracciones de la corteza de *A. indica* se le realizó actividad acaricida, como se muestra a continuación.

4.6.1. Colección de garrapatas

Se recolectaron 20 teleoginas (hembras repleta de huevos) de *R. microplus*, fueron recolectadas de ganado infestado de manera natural en una granja privada ubicada en el municipio de Puente Nacional, (México) (19 ° 19'47"N; 96 ° 28'57"W). Este ganado no había sido tratado con acaricidas durante 30 días antes de la recolección de las garrapatas. Las teleoginas se depositaron en cajas de petri con perforaciones en la tapa para permitir la circulación de aire, posteriormente fueron trasladadas al Laboratorio de Parasitología de la Unidad de Diagnóstico de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana (FMVZ-UV). Se incubaron a una temperatura de 28°C con una humedad relativa de 80% (simulando el ambiente de potrero). Al término de la ovoposición, se colectaron los huevos y se depositaron en viales de cristal de 10 ml cerrados con un algodón de algodón durante 21 días (**Figura 4.6**). Se

mantuvieron bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad hasta la eclosión larvaria, alrededor de tres semanas posteriores a su colecta (Shaw *et al.*, 1968).



FIGURA 4.6 Izquierda: Ovoposición de teleóginas en caja de cultivo. Derecha: Huevos contenidos en viales de vidrio para su transporte.

4.6.2. Actividad acaricida de compuestos puros *in vitro*

Las actividades acaricidas de las fracciones de *A. indica* se evaluaron durante la purificación a ≤ 5.0 % p/v (≤ 37.5 mg en 750 μ L de una solución que contenía 1.0% de etanol y 0.02% de Triton X-100), dependiendo del grado de pureza de la fracción a probar. Por otro lado, los compuestos **63-70** se analizaron a siete concentraciones diferentes (15 mM, 10 mM, 7.5 mM, 3.75 mM, 1.87 mM, 0.94 mM y 0.47 mM) en 750 μ L de una solución que contiene 1.0 % de etanol y 0.02 % de Triton X-100. Posteriormente, se agregaron 100 larvas a cada dilución usando un pincel y se sumergieron durante 10 minutos y, posteriormente, se colocaron en recipientes de papel y se mantuvieron a 28 ° C y 80 % de humedad relativa durante 24 h. Se usó ivermectina (22,23-dihidroavermectina B1; Sigma-Aldrich) como control positivo; mientras que el control negativo se trató con etanol al 1,0 % y solución acuosa de Triton X-100 al 0,02 %. Se usaron tres réplicas para cada prueba. Después de 24 h, se anotó el número de larvas vivas o muertas y se calculó su mortalidad (FAO, 2004), como se muestra en la **Figura 4.7**



FIGURA 4.7 Izquierda: larvas vivas. Derecha: larvas muertas.

4.6.3. Análisis estadístico de mortalidad acaricida

La mortalidad corregida se analizó mediante regresión probit logarítmica utilizando el paquete estadístico SPSS 20.0, (intervalos de confianza del 95 %), para obtener la dosis letal 50 y 90 (LD₅₀ y LD₉₀) para cada una de las fracciones analizadas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se señaló en los antecedentes, los estudios cromatográficos previos de las semillas y corteza de *Azadirachta indica* y de las esponjas *Ectyoplasia ferox* y *Amphymedum compressa* han puesto de manifiesto que estos organismos producen una gran cantidad de metabolitos. Estos compuestos además de poseer una gran diversidad estructural han demostrado tener interesantes actividades farmacológicas.

Entre la gran cantidad de tetranortriterpenoides aislados de varias partes de *Azadirachta indica* Juss (neem), se ha encontrado que la azadiractina A, es el principal metabolito secundario bioactivo que exhiben una gran actividad biológica como es insecticida, antimicótica y disruptiva del crecimiento contra una variedad de plagas de insectos (Sharma *et al.*, 2003).

En la actualidad hay varios informes disponibles sobre la extracción y el aislamiento de diversos compuestos de neem. El proceso de aislamiento de estos constituyentes implica la extracción, el reparto de los extractivos entre diferentes disolventes, la cromatografía en columna, la cromatografía preparativa de capa fina y la cromatografía preparativa de líquidos de alto rendimiento y posteriormente la elucidación de los compuestos aislados, utilizando diversas técnicas como RMN, MS, IR, UV, entre otras.

Como se ha descrito en el apartado de antecedentes, son pocos los estudios que se encuentran en la literatura sobre la corteza de *A. indica*, dentro de los compuestos aislados se encuentran los diterpenoides: margolona **23**, margolonona **24**, isomargolonona **25**, que mostraron un efecto antibacteriano (Ara *et al.*, 1989), posteriormente aislaron margocina **26**, margocinina **27** y margocilina **28**, los compuestos fueron aislados con EtOH y posteriormente en una partición entre AcOEt y H₂O, las técnicas que se emplearon para la elucidación fueron MS, IR y por RMN ¹H, ¹³C. aunque no se reportó alguna actividad biológica (Ara *et al.*, 1990).

En el presente trabajo observamos la obtención de dos nuevos compuestos que no han sido reportados y otros seis compuestos ya reportados en la literatura, a continuación se describe el método de aislamiento y posteriormente la elucidación de los mismos. Cabe señalar que todos

los perfiles cromatograficos que se siguieron para el aislamiento y la purificación de estos compuestos no fueron los mismos que los reportados en la literatura.

5.1. Metabolitos aislados de la corteza de *Azadirachta indica*

Los espectros de RMN ^1H y el perfil cromatográfico observado por CCF, nos sugirió que la fracción **AIC-1C** (fracción de acetato de etilo; 4.8 g) era la más interesante desde el punto de vista estructural, debido a que presentaba señales características de aromáticos (^1H 6-8.5 ppm y ^{13}C ppm) y señales de grupos éster y alcohol, por lo que se prosiguió a purificar esta fracción. Se realizó en una columna de 4.5 cm de diámetro y 38 cm de altura, empacada con Sephadex (200 g previamente humectada con 300 ml de MeOH). Como fase móvil se utilizaron las siguientes relaciones de Metanol:agua: MeOH (200 ml), MeOH: H₂O (500 ml), H₂O (500 ml), se recolectaron 90 tubos de 16 ml cada uno, dando como resultado las siguientes fracciones: **AIC-1C1** (1-160 ml), **AIC-1C2** (161-320 ml), **AIC-1C3** (321-480 ml), **AIC-1C4** (481-640 ml), **AIC-1C5** (641-800 ml), **AIC-1C6** (801-960 ml), **AIC-1C7** (961-1,080 ml), **AIC-1C8** (1,081-1,240ml), **AIC-1C9** (1,241-1,400 ml).

De las fracciones antes mencionadas solo se describe a continuación las fracciones **AIC-1C2**, **AIC-1C3** y **AIC-1C4** (apartados 5.1.1 a 5.1.3), debido principalmente a que los espectros de dichas fracciones no presentaron las señales características en RMN ya mencionadas, así mismo no se llegaron hasta el compuesto puro, por lo que podría servir para próximos trabajos. Cabe mencionar que este parámetro fue el mismo para las fracciones que se purificaron y para las que no se describen en este trabajo.

5.1.1 Obtención de 3-*O*-butil(-)-epicatequina

La primera marcha cromatográfica se realizó de la fracción **AIC-1C2** (743 mg) en una columna pre-empaquetada LiChroprep® fase reversa RP-18 (40-63 μm) marca MERCK, con una bomba de presión marca FLUID metering, INC. Se utilizó como fase móvil una mezcla de polaridad ascendente de MeOH:H₂O (8:2→6:4), la purificación fue monitoreado por CCF, agrupando los compuestos con el mismo perfil cromatográfico, se utilizó como fase móvil benceno:acetona:MeOH:CH₃COOH 6N (75:40:9.5:0.5) y como revelador ácido fosfomolibdico al 10%, dando como resultado 4 fracciones que se denominaron **AIC-1C2A** (1-35 ml; 21.2 mg),

AIC-1C2B (36-170 ml; 582.5 mg), **AIC-1C2C** (171-294 ml; 37 mg), **AIC-1C2D** (295-495 ml; 102.1 mg), como se muestra en la **Figura 5.1**.

Posteriormente la fracción **AIC-1C2B** se purificó en una columna pre-empaquetada Lobar LiChroprep® fase reversa RP-18 (40-63 µm) marca MERCK, con una bomba de presión marca FLUID metering, INC., usando una fase móvil CH₂Cl₂:acetona:MeOH (7.5:1.5:1.0) y realizando lavados con MeOH (100 ml), MeOH:H₂O:Butanol (100; 100; 50 ml) y H₂O:Acetona:*n*-hexano:MeOH (20; 100; 100; 300 ml respectivamente). Este fraccionamiento dio como resultado las fracciones **AIC-1C2B1** (1-42 ml; 118.8 mg), **AIC-1C2B2** (43-119 ml; 185.1 mg), **AIC-1C2B3** (120-287 ml; 35.5 mg), **AIC-1C2B4** (288-343 ml; 4.2 mg), **AIC-1C2B5** (344-353 ml; 24.9 mg), **AIC-1C2B6** (354-603 ml; 24.2 mg), **AIC-1C2B7** (604-993 ml; 29.2 mg), como se muestra en la **Figura 6.1**. Se determinó por medio de CCF que el compuesto **AIC-1C2B1** estaba puro y posteriormente fue denominado *3-O-butil-(-)-epicatequina* (**63**), como se muestra en la **Figura 5.1**.

El método de aislamiento y purificación de este compuesto no se encuentra en la literatura y no se siguió el procedimiento de alguno ya reportado en la corteza de *A. indica*.

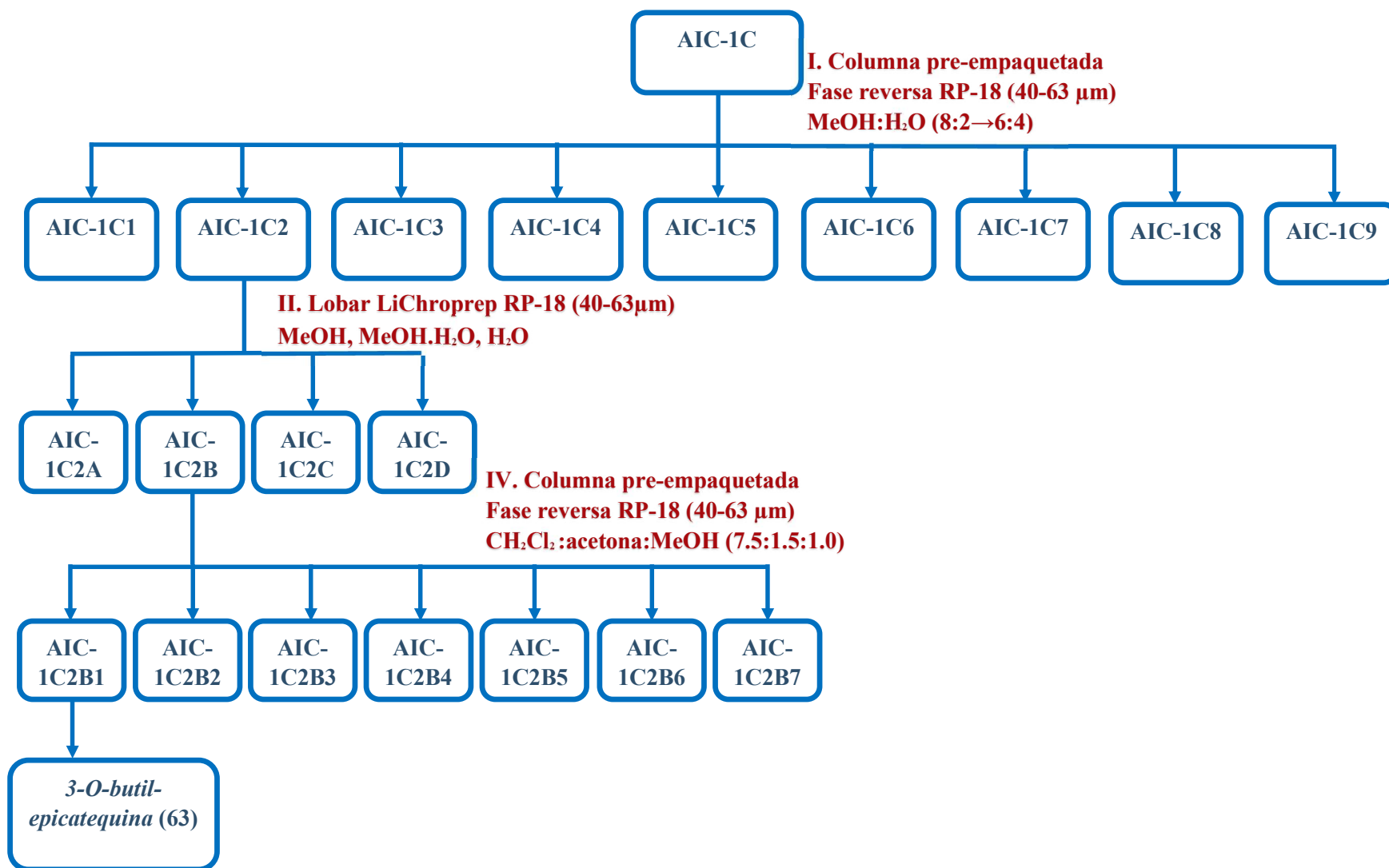


FIGURA 5.1 Diagrama de obtención del compuesto 3-O-butil(-)-epicatequina (63).

5.1.2 Obtención de 3-*O*-butil(-)-epigallocatequina

La marcha cromatográfica de la muestra **AIC-1C3** se realizó en una columna abierta, fase normal con sílicagel, utilizando como fase móvil CH₂Cl₂:MeOH (8:2). La muestra no se disolvió completamente en el sistema, por lo que se decidió filtrar con un filtro Nylon NY 0.22 μm, formándose dos muestras: la insoluble en MeOH y la soluble en el sistema, fueron llamadas **AIC-1C3A** y **AIC-1C3B** respectivamente. Para la purificación de la muestra **AIC-1C3A** se realizó en una columna abierta fase normal, en una columna de 4 cm de diámetro y una altura de 30 cm, empaquetada por gravedad con sílicagel, como fase móvil se utilizó el sistema CH₂Cl₂:MeOH (8:2), se recolectaron 70 tubos de 7-8 ml aproximadamente, la purificación fue monitoreado por CCF, agrupando los compuestos con el mismo perfil cromatográfico, se utilizó como fase móvil benceno:acetona:MeOH:CH₃COOH 6N (75:40:9.5:0.5) y como revelador ácido fosfomolibdico al 10 %. Este fraccionamiento dió como resultado las fracciones **AIC-1C3A1** (1-42 ml; 1.9 mg), **AIC-1C3A2** (43-289 ml; 807.9 mg), **AIC-1C3A3** (290-387 ml; 28.5 mg), **AIC-1C3A4** (388-553 ml; 14.2 mg).

De acuerdo al estudio realizado por RMN ¹H, se decidió purificar la muestra **AIC-1C3A2**, en una columna fase normal con sílicagel, en una columna de 2.5 de diámetro y 46 cm de altura, se utilizó como fase móvil CH₂Cl₂:MeOH (85:15), dando como resultado 6 fracciones: **AIC-2A** (1-42 ml; 1.6 mg), **AIC-2B** (43-289 ml; 72.1 mg), **AIC-2C** (290-387 ml; 160.4 mg), **AIC-2D** (388-553 ml; 394.0 mg), **AIC-2E** (43-289 ml; 513.0 mg), **AIC-2F** (290-387 ml; 89.7 mg). Posteriormente, se purificó la muestra **AIC-2B** por medio de HPLC con una columna semipreparativa C₁₈ (Agilent-tecnology (ø 4 x 40 cm), con una gradiente ascendente de polaridad de MeOH:H₂O (8:2→6:4) dando como resultado 2 fracciones que se denominaron **AIC-2B1** (1-35 ml; 20.2 mg) y **AIC-2B2** (36-170 ml; 19.5 mg), siendo **AIC-2B1** el compuesto más importante estructuralmente por RMN ¹H, denominado 3-*O*-butil(-)-epigallocatequina (**64**), como se muestra en la **Figura 5.2**.

Por otra parte para la purificación de la muestra **AIC-1C3B** se realizó por medio de CCF preparativa marca SiliaPlate, sílicagel con 2.5 mm de espesor, utilizando como fase móvil CH₂Cl₂:MeOH (80:20) y que se eluyó en una cámara de elución de 20 x 30 cm. Se utilizaron dos placas y se aplicó 1.2 g de muestra en cada una, disuelta en la misma concentración de fase

móvil, las placas cromatográficas fueron eluidas dos veces y se revelaron con lámpara UV donde las bandas fueron marcadas con grafito para no alterar los compuestos aislados, para posteriormente rasparlas y extraer los 5 compuestos aislados con 50 ml de acetato de etilo:MeOH (8:2). Las disoluciones, se agitaron 30 minutos con agitador magnético a 200 rpm. Posteriormente, cada disolución se filtró a través de filtros de Nylon NY 0.22 μm y se concentraron en un rotavapor, obteniendo 5 fracciones Sin embargo, al analizar los espectros de RMN ^1H , no se observaron señales de compuestos aromáticos o de halógenos, por lo que no se siguió purificando (**Figura 5.2**).

El método de aislamiento y purificación de este compuesto no se encuentra en la literatura y no se siguió el procedimiento de alguno ya reportado en la corteza de *A. indica*.

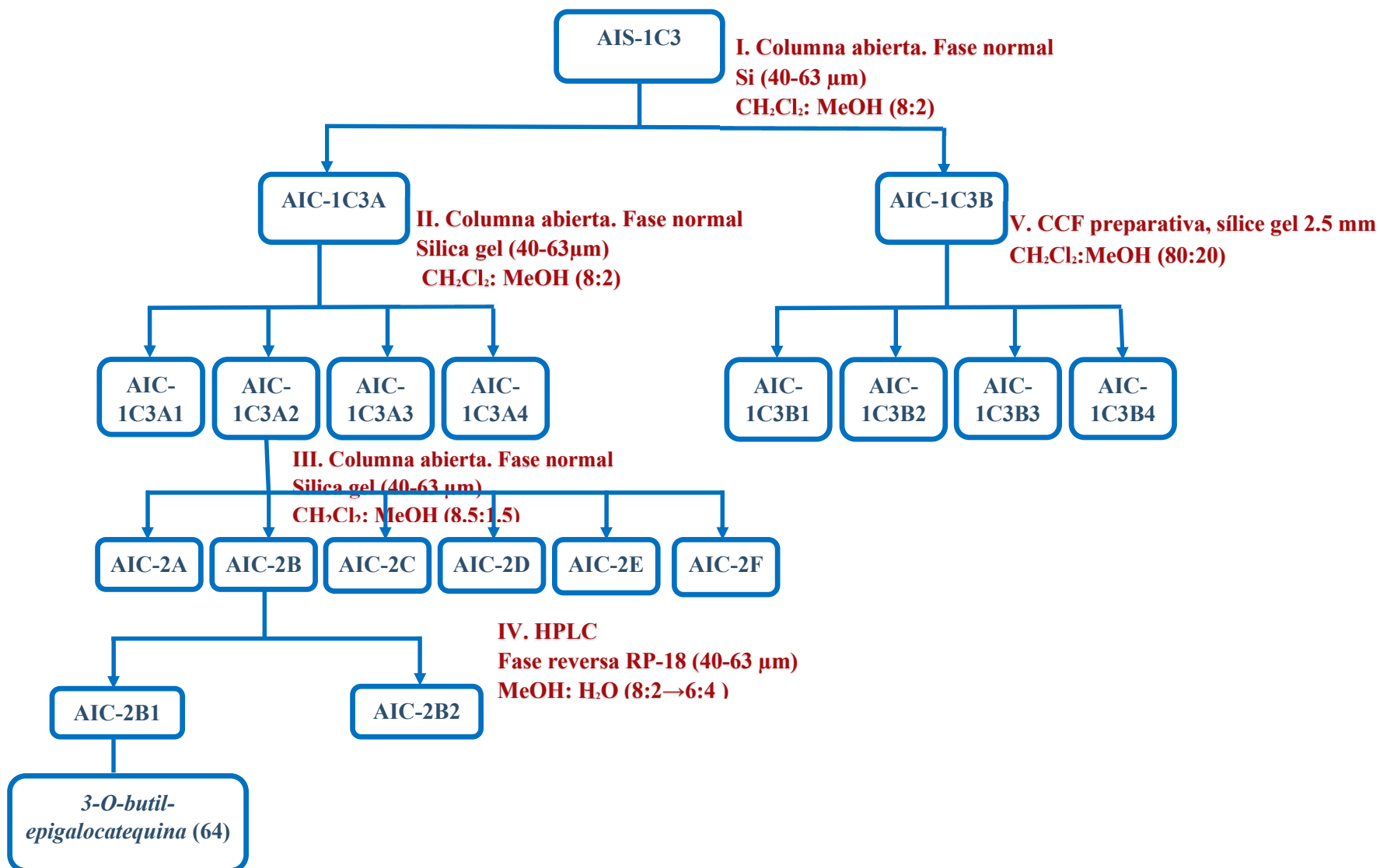


FIGURA 5.2 Diagrama de obtención del compuesto 3-O-butil-(-)-epigallocatequina (64).

5.1.3 Obtención de (-)-epicatequina, (+)-galocatequina y (-)-epigallocatequina

El fraccionamiento de esta muestra se realizó a partir de la muestra **AIC-1C4**, se utilizó una columna abierta de 4 cm de diámetro y una altura de 30 cm, empaquetada por gravedad con Sephadex (200 g previamente humectada con 300 ml de MeOH), utilizando como fase móvil MeOH (1000 ml), se recolectaron 126 tubos de 7-8 ml aproximadamente, la purificación fue monitoreado por CCF, agrupando los compuestos con el mismo perfil cromatográfico, se utilizó como fase móvil benceno:acetona:MeOH:CH₃COOH 6N (75:40:9.5:0.5) y como revelador ácido fosfomolibdico al 10 %, dando como resultado 7 fracciones: **AIC-1C4A** (1-68 ml; 13.3 mg), **AIC-1C4B** (69-110 ml; 112.2 mg), **AIC-1C4C** (111-147 ml; 298.0 mg), **AIC-1C4D** (203 ml; 328.7 mg), **AIC-1C4E** (204-469 ml; 518.2 mg), **AIC-1C4F** (470-805 ml; 80.0 mg), **AIC-1C4G** (805-980 ml; 66.7 mg).

Posteriormente para la purificación de la muestra **AIC-1C4C** se realizó en una columna columna pre-empaquetada LiChroprep® fase reversa RP-18 (40-63 µm) marca MERCK, con una bomba de presión marca FLUID metering, INC., como fase móvil se utilizó el sistema CH₂Cl₂:acetona:MeOH (7.5:1.5:1.0), se recolectaron 35 tubos de 7-8 ml aproximadamente y se realizaron tres lavados, el primero con 100 ml con MeOH, posteriormente 300 ml de MeOH:H₂O:Butanol (1:1:0.5) y por último con H₂O:Acetona:*n*-hexano:MeOH (50, 100, 100, 300 ml respectivamente), la purificación fue monitoreado por CCF, agrupando los compuestos con el mismo perfil cromatográfico, se utilizó como fase móvil benceno:acetona:MeOH:CH₃COOH 6N (75:40:9.5:0.5) y como revelador ácido fosfomolibdico al 10%,. Este fraccionamiento dio como resultado las fracciones **AIC-1C4C1** (1-35 ml; 13.7 mg), **AIC-1C4C2** (36-91 ml; 168.0 mg), **AIC-1C4C3** (92-227 ml; 2.5 mg). Después de haberles realizado ¹H-RMN mostró que la muestra **AIC-1C4C2** presentaba las señales características de compuestos aromáticos (¹H 6.5-8 ppm y ¹³C, además de presentar otras señales características por lo que ésta muestra es la que se siguió purificando como se muestra en la **Figura 5.3**.

La muestra **AIC-1C4C2** se purificó por medio de HPLC con una columna semipreparativa C₁₈ (Agilent-technology (ø 4 x 40 cm), se utilizó como fase móvil H₂O:MeOH (80:20→0:100), con un flujo de 1 ml/min y se recolectaron 90 tubos de 1 ml cada uno, la purificación fue monitoreado por CCF, agrupando los compuestos con el mismo perfil cromatográfico, se utilizó como fase

móvil benceno:acetona:MeOH:CH₃COOH 6N (75:40:9.5:0.5) y como revelador ácido fosfomolibdico al 10 %, dando como resultado 6 fracciones: **AIC-5A** (1-25 ml; 81.9 mg), **AIC-5B** (26-31 ml; 82.3 mg), **AIC-5C** (32-37 ml; 8.1 mg), **AIC-5D** (38-42 ml; 70.1 mg), **AIC-5E** (43-53 ml; 24.6 mg), **AIC-5F** (54-100 ml; 50.6 mg). Se obtuvo así un compuesto puro **AIC-5D**, denominado *epicatequina* (**65**).

Posteriormente se purificó la muestra **AIC-5A** por medio de HPLC con una columna semipreparativa C₁₈ (Agilent-technology (ø 4 x 40 cm), con una gradiente ascendente de polaridad de MeOH:H₂O (8:2→6:4), a un flujo de 1 ml/min, se recolectaron 90 tubos de 1 ml cada uno, la purificación fue monitoreado por CCF, agrupando los compuestos con el mismo perfil cromatográfico, se utilizó como fase móvil benceno:acetona:MeOH:CH₃COOH 6N (75:40:9.5:0.5) y como revelador ácido fosfomolibdico al 10 %, dando como resultado 8 fracciones que se denominaron **AIC-5A1** (1-20 ml; 20.2 mg), **AIC-5A2** (21-23 ml; 19.5 mg), **AIC-5A3** (24-26 ml; 30.5 mg), **AIC-5A4** (27-31 ml; 21.5 mg), **AIC-5A5** (32-33 ml; 15.2 mg), **AIC-5A6** (34-44 ml; 21.5 mg), **AIC-5A7** (45-47 ml; 12.2 mg), **AIC-5A8** (49-90 ml; 32.5 mg), siendo **AIC-5A3** el compuesto que se obtuvo *epigallocatequina* (**67**), como se muestra en la **Figura 5.3**.

La muestra **AIC-5B** se purificó por medio de HPLC con una columna semipreparativa C₁₈ (Agilent-technology (ø 4 x 40 cm), con una gradiente ascendente de polaridad de MeOH:H₂O (8:2→6:4), a un flujo de 1 ml/min, se recolectaron 100 tubos de 1 ml cada uno, la purificación fue monitoreado por CCF, agrupando los compuestos con el mismo perfil cromatográfico, se utilizó como fase móvil benceno:acetona:MeOH:CH₃COOH 6N (75:40:9.5:0.5) y como revelador ácido fosfomolibdico al 10 %, dando como resultado 7 fracciones que se denominaron **AIC-5B1** (1-28 ml; 21.5 mg), **AIC-5B2** (29-33 ml; 19.5 mg), **AIC-5B3** (34-38 ml; 15.3 mg), **AIC-5B4** (39-43 ml; 20.2 mg), **AIC-5B5** (44-46 ml; 30.5 mg), **AIC-5B6** (47-50 ml; 21.5 mg), **AIC-5B7** (51-100 ml; 21.2 mg), obteniendo de la muestra **AIC-5B1** el compuesto *galocatequina* (**66**), como se muestra en la **Figura 5.3**.

De la misma forma la muestra **AIC-5C** se purificó por medio de HPLC con una columna semipreparativa C₁₈ (Agilent-technology (ø 4 x 40 cm), con una gradiente ascendente de polaridad de MeOH:H₂O (8:2→5:5), a un flujo de 1 ml/min, se recolectaron 50 tubos de 1 ml cada uno,

la purificación fue monitoreado por CCF, agrupando los compuestos con el mismo perfil cromatográfico, se utilizó como fase móvil benceno:acetona:MeOH:CH₃COOH 6N (75:40:9.5:0.5) y como revelador ácido fosfomolibdico al 10 %, dando como resultado 3 fracciones que se denominaron **AIC-5C1** (1-15 ml; 18.5 mg), **AIC-5C2** (16-19 ml; 15.5 mg), **AIC-5C3** (20-50 ml; 21.3 mg), siendo la muestra **AIC-5C3** que se obtuvo el compuesto *epicatequina* (**65**), como se muestra en la **Figura 5.3**.

El método de aislamiento y purificación de estos compuestos no son similares a los que se encuentran en la literatura y no se siguió el procedimiento de alguno de ellos, ya que estos se encontraron en el extracto acuoso de la corteza de *A. indica* y posteriormente con *n*-hexano en un equipo soxhlet (Vander Nat *et al.*, 1991).

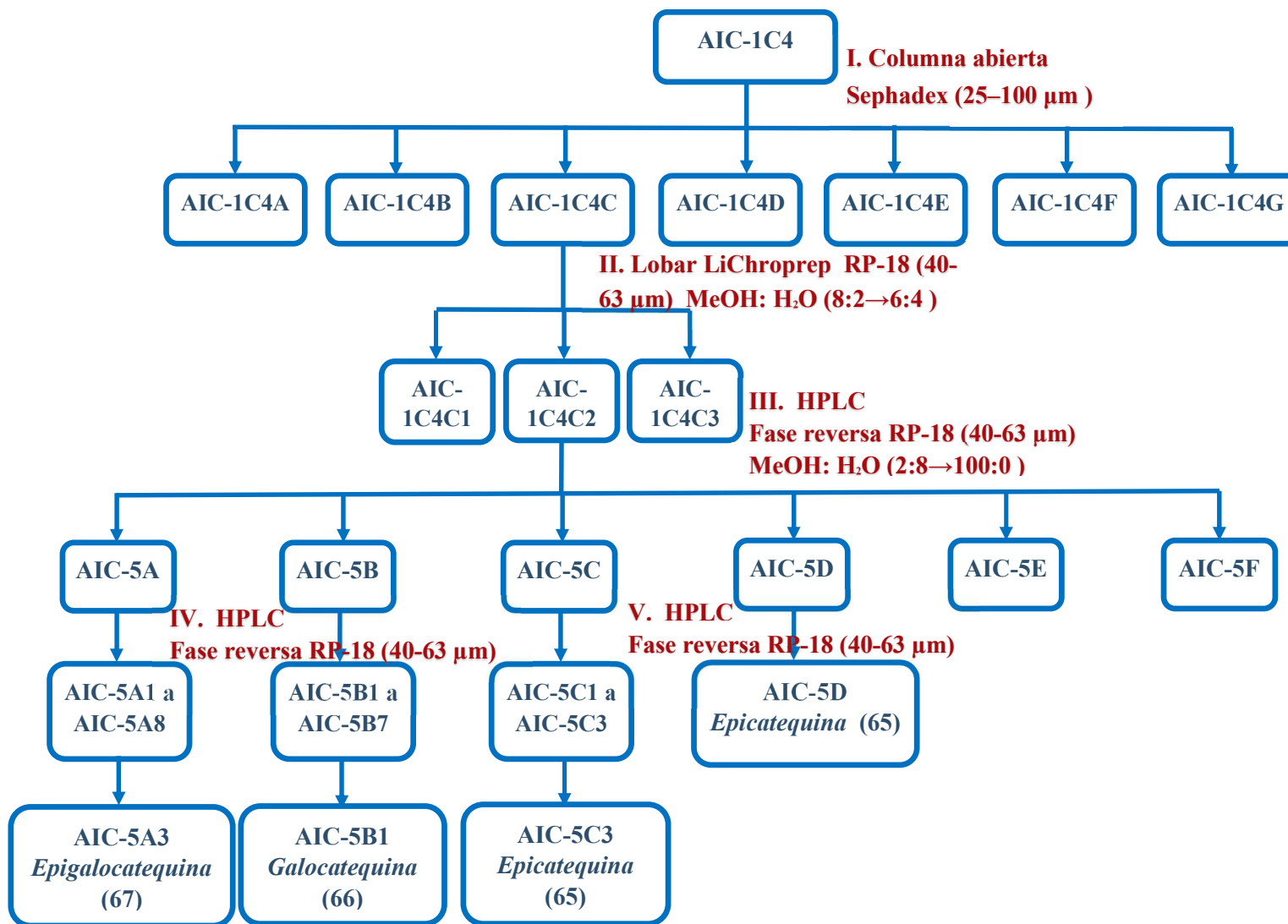


FIGURA 5.3 Diagrama de obtención de (-)-epicatequina, (+)-galocatequina y (-)-epigallocatequina.

5.1.4 Obtención de azadiractina, trilinoleina y ácido octadecanoico-tetrahidrofurano-3,4-diil éster

La primera marcha cromatográfica se realizó de la fracción **AIC-1B** (743 mg) se realizó en una columna 4 cm de diámetro y una altura de 30 cm, empaquetada por gravedad con con Silica gel (0.2-0.5 mm), utilizando como fase móvil *n*-hexano:EtOAc (6:4), se recolectaron 70 tubos de 7-8 ml aproximadamente y se realizaron dos lavados, el primero con 200 ml con MeOH y posteriormente 600 ml de *n*-hexano:acetona (2:1), la purificación fue monitoreado por CCF, agrupando los compuestos con el mismo perfil cromatográfico, se utilizó como fase móvil benceno:acetona:MeOH:CH₃COOH 6N (75:40:9.5:0.5) y como revelador ácido fosfomolibdico al 10 %. Este fraccionamiento dio como resultado las fracciones **AIC-1B1** (1-42 ml; 1.9 mg), **AIC-1B2** (43-289 ml; 807.9 mg), **AIC-1B3** (290-387 ml; 28.5 mg), **AIC-1B4** (388-553 ml; 14.2 mg). De la cual se decidió purificar la muestra **AIC-1B2**, la cual se purificó por una columna Lobar FertigsauLe Grobe (310-25) LiChroprep® Si60, marca MERCK, Se utilizó como fase móvil *n*-hexano:acetona (7:3) dando como resultado 6 fracciones que se denominaron **AIC-3A** (1-35 ml; 21.2 mg), **AIC-3B** (36-170 ml; 582.5 mg), **AIC-3C** (171-294 ml; 37 mg), **AIC-3D** (295-495 ml; 102.1 mg), **AIC-3E** (36-170 ml; 582.5 mg), **AIC-3F** (171-294 ml; 37 mg) como se muestra en la **Figura 5.4**.

Posteriormente la fracción **AIC-3B** se purificó por medio de HPLC con una columna μ -porasil con una fase móvil *n*-hexano:acetato de etilo (9:1), a un flujo de 1 ml/min, se recolectaron 50 tubos de 1 ml cada uno, la purificación fue monitoreado por CCF, agrupando los compuestos con el mismo perfil cromatográfico, se utilizó como fase móvil benceno:acetona:MeOH:CH₃COOH 6N (75:40:9.5:0.5) y como revelador ácido fosfomolibdico al 10 %, dando como resultado 4 fracciones **AIC-3B1** (1-42 ml; 28.8 mg), **AIC-3B2** (43-119 ml; 25.1 mg), **AIC-3B3** (120-287 ml; 18.5 mg), **AIC-3B4** (288-343 ml; 22.2 mg). De las muestras **AIC-3B2** y **AIC-3B3** se obtieron los compuestos *trilinoleina* (**69**) y *ácido octadecanoico-tetrahidrofurano-3,4-diil éster* (**70**), respectivamente, como se muestra en la **Figura 5.4**.

Así la muestra **AIC-3F** se purificó por medio de HPLC con una columna μ -porasil con una fase móvil *n*-hexano:CH₂Cl₂:acetato de etilo (9:1), a un flujo de 1 ml/min, se recolectaron 50 tubos de 1 ml cada uno, la purificación fue monitoreado por CCF, agrupando los compuestos con el mismo perfil cromatográfico, se utilizó como fase móvil

benceno:acetona:MeOH:CH₃COOH 6N (75:40:9.5:0.5) y como revelador ácido fosfomolibdico al 10 %, dando como resultado 3 fracciones **AIC-3F1** (1-42 ml; 28.8 mg), **AIC-3F2** (43-119 ml; 25.1 mg), **AIC-3F3** (120-287 ml; 18.5 mg), obteniendo de la muestra **AIC-3F2** el compuesto *azadiractina* (**68**), como se muestra en la **Figura 5.4**.

El método de aislamiento y purificación de estos compuestos no son similares a los que se encuentran en la literatura y no se siguió el procedimiento de alguno de ellos, ya que *azadiractina* (**68**) se ha aislado principalmente de las semillas del extracto diclorometano y etanolico (Luo *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2000; Jarvis y Morgan, 2000; Deota *et al.*, 2000), trilinoleina (**69**) y ácido octadecanoico-tetrahidrofuran-3,4-diil éster (**70**) se aisló del extracto de cloroformo de *A. indica* (Du *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010).

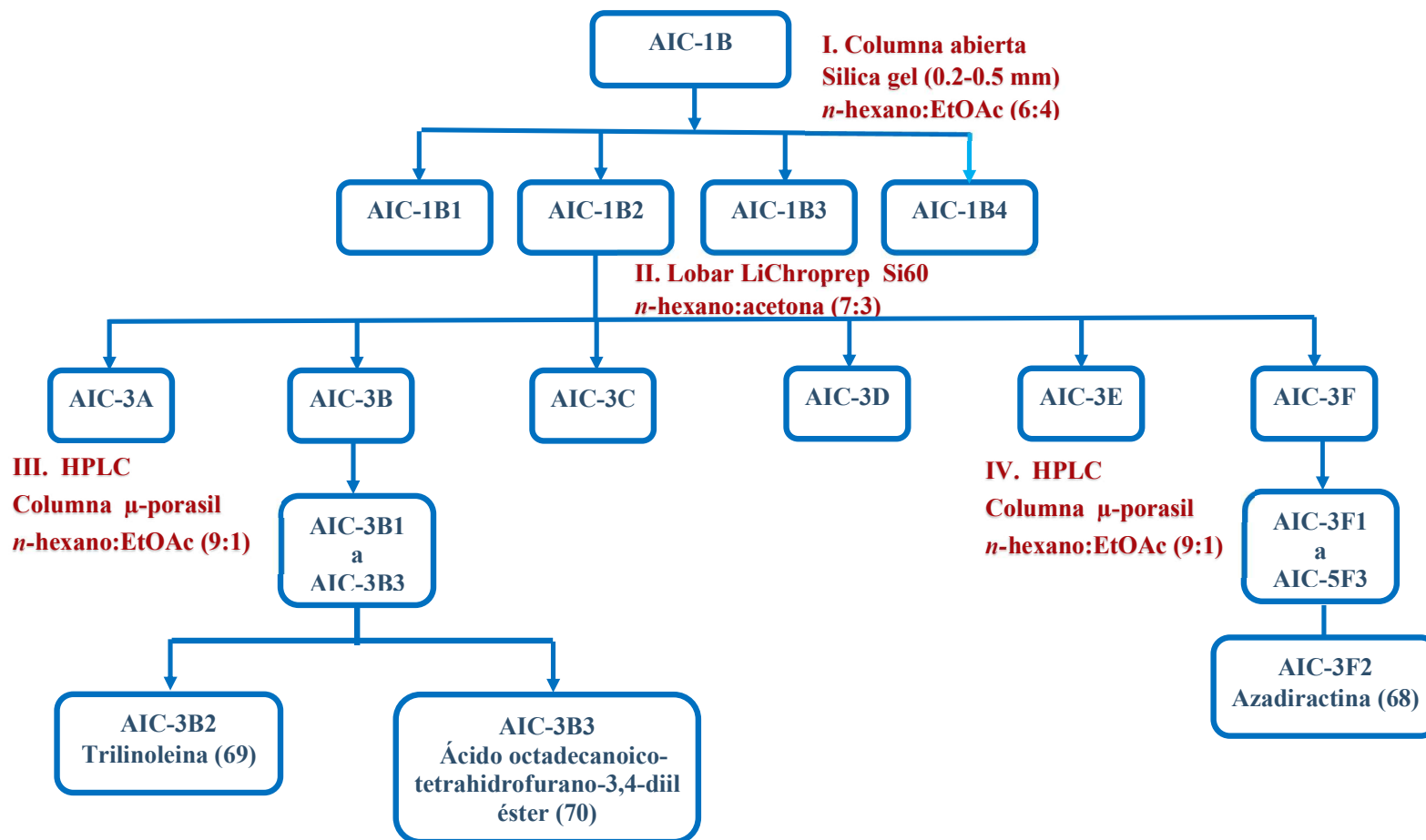


FIGURA 5.4 Diagrama de obtención de azadiractina, trilinoleina y ácido octadecanoico-tetrahidrofurano-3,4-diil éster.

5.2. Metabolitos aislados de las semillas de *Azadirachta indica*

En la semilla se han encontrado algunos tetranortriterpenos, incluyendo nimbina, nimbinina, nimbidinina, nimbolida y nimbídica y principalmente azadiractina que es el compuesto responsable de diferentes bioactividades, sin embargo, estos compuestos se han encontrado en la semilla y principalmente en la fracción hexánica, en este trabajo se obtuvieron de la semilla un compuesto ya reportado en la literatura.

5.2.1 Obtención del octadecanoil-tetrahidrofuran-3,4-diil éster

Los espectros de RMN ^1H y el perfil cromatográfico observado por CCF, nos sugirió que las fracciones **AIS-1A2**, **AIS-1C2** y **AIS-1D2** eran las más interesantes desde el punto de vista estructural, al tiempo que nos indicaron que eran muy similares, por lo que se mezclaron obteniendo 5.39 g, posteriormente se realizó su purificación en una columna de 4 cm de diámetro empacada con gel de sílice y utilizando como fase móvil una mezcla de polaridad ascendente de *n*-hexano:acetona (7.5:2.5 \rightarrow 5.5:4.5), la purificación fue monitoreado por CCF, agrupando los compuestos con el mismo perfil cromatográfico, se utilizó como fase móvil benceno:acetona:MeOH:CH₃COOH 6N (75:40:9.5:0.5) y como revelador ácido fosfomolibdico al 10 %, dando como resultado 9 fracciones que se denominaron **AIS-3A** (1-50 ml; 255 mg), **AIS-3B** (51-80 ml; 325.8 mg), **AIS-3C** (81-185 ml; 269.9 mg), **AIS-3D** (82-275 ml; 755.4 mg), **AIS-3E** (276-410 ml; 516.2 mg), **AIS-3F** (411-475 ml; 816.1 mg), **AIS-3G** (476-550 ml; 898.2 mg), **AIS-3H** (551-610 ml; 361.8 mg) y **AIS-3I** (611-655 ml; 825.9 mg).

La fracción **AIS-3B** se purificó en una columna pre-empaquetada Lobar de fase normal usando una fase móvil *n*-hexano:CH₂Cl₂:acetona (7.5:1.5:1.0), la purificación fue monitoreado por CCF, agrupando los compuestos con el mismo perfil cromatográfico, se utilizó como fase móvil benceno:acetona:MeOH:CH₃COOH 6N (75:40:9.5:0.5) y como revelador ácido fosfomolibdico al 10 %. Este fraccionamiento dio como resultado las fracciones **AIS-3B1** (1-25 ml; 68.1 mg), **AIS-3B2** (26-40 ml; 80.5 mg), **AIS-3B3** (41-52 ml; 41.8 mg), **AIS-3B4** (53-72 ml; 22.2 mg), **AIS-3B5** (73-97 ml; 47.6 mg), **AIS-3B6** (98-130 ml; 81.7 mg), **AIS-3B7** (131-152 ml; 21.1 mg), **AIS-3B8** (153-170 ml; 8.2 mg), **AIS-3B9** (171-225 ml; 133.8 mg), **AIS-3B10** (226-270 ml; 71.2 mg), **AIS-3B11** (271-312 ml; 57.5 mg) y **AIS-3B12** (313-338 ml; 61 mg).

La fracción **AIS-3B9** se purificó utilizando como fase móvil n-hexano:acetona:MeOH (8:2:5 gotas) a un flujo de 1 ml/min y 1 ml por tubo, la purificación fue monitoreado por CCF, agrupando los compuestos con el mismo perfil cromatográfico, se utilizó como fase móvil benceno:acetona:MeOH:CH₃COOH 6N (75:40:9.5:0.5) y como revelador ácido fosfomolibdico al 10 %, de este fraccionamiento se obtuvieron **AIS-3B9A** (tubos 11-17; 2.0 mg), **AIS-3B9A** (tubos 18-25; 8.1 mg), **AIS-3B9A** (tubos 26-33; 29.6 mg), **AIS-3B9A** (tubos 34-37; 15.4 mg), **AIS-3B9A** (tubos 38-48; 13.22 mg), **AIS-3B9A** (tubos 49-59; 16.9 mg) y **AIS-3B9G** (tubos 60-100; 17.9 mg). Obteniendo así el compuesto ácido octadecanoico-tetrahidrofuran-3,4-diil ester (**70**) en la fracción **AIS-3B9B**, como se muestra en la **Figura 5.5**.

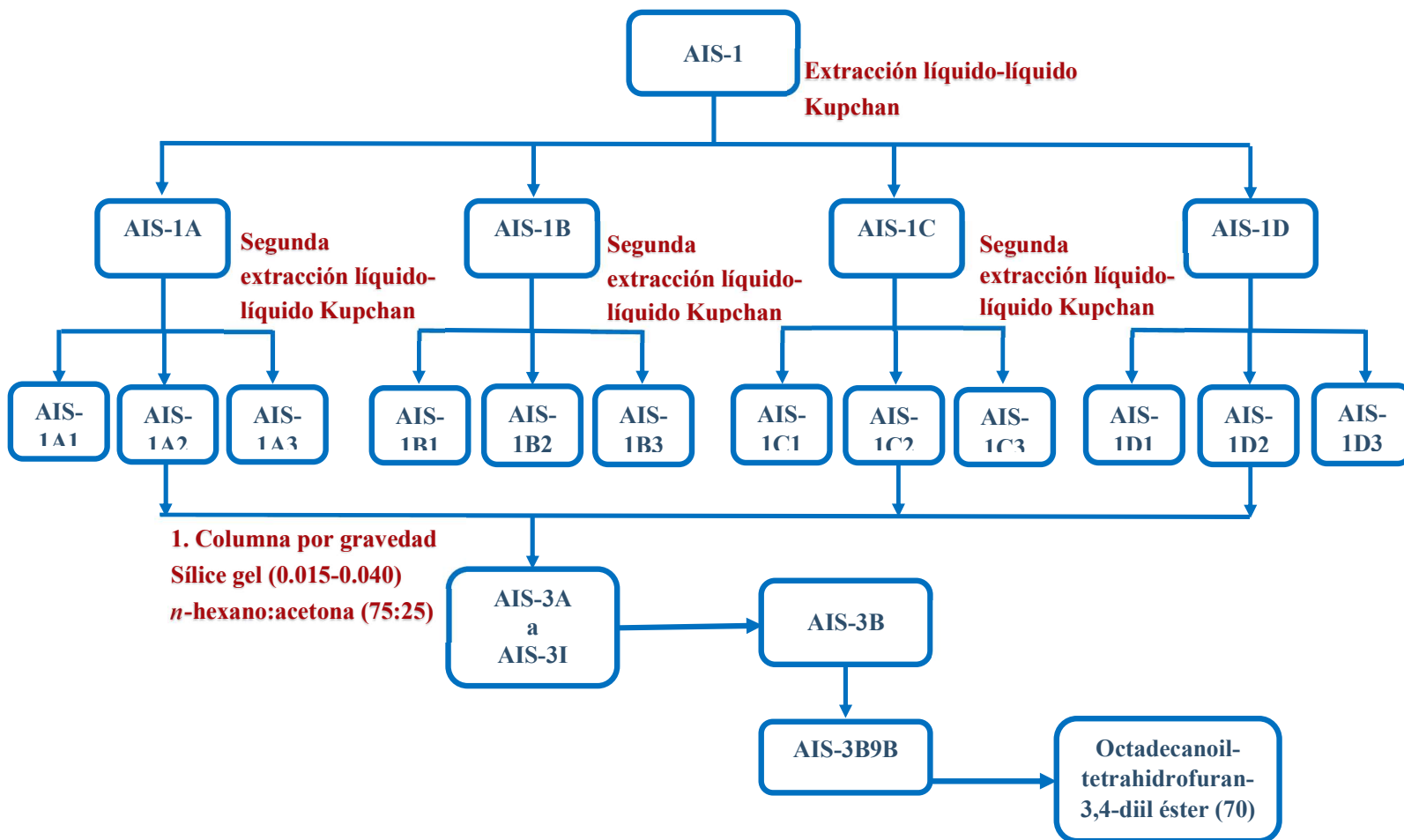


FIGURA 5.5 Diagrama de obtención del octadecanoil-tetrahidrofuran-3,4-diil éster (70).

5.3 Estudio de elucidación estructural de los compuestos aislados de corteza

En las últimas décadas, un gran número de catequinas se han aislado y sus estructuras se han caracterizado, principalmente por la técnica de la espectroscopia de RMN. Sin embargo, los datos de RMN están ampliamente dispersos en la literatura (particularmente en el caso de datos ^1H) y a menudo se encuentran incompletos o contienen información de asignaciones incorrectas.

Las asignaciones de RMN ^1H y ^{13}C obtenidas en este trabajo se logró principalmente a través de RMN de hidrógeno, de carbono y métodos de correlación bidimensionales por ejemplo COSY, el cual permite correlacionar 1H y 1H vecinos, asimismo permite establecer fragmentos de una estructura; sin embargo esta correlación se ven cortadas por la presencia de carbonos cuaternarios o heteroátomos. Por otro lado, las correlaciones directas se obtienen mediante el experimento HMQC, que nos permite correlacionar que hidrogeno corresponde a cada carbono en una estructura, y HMBC que permite observar la correlación a largo alcance, es decir, el hidrogeno con el carbono pero a 2 o 3 enlaces o carbonos vecinos. Las señales de los compuestos fueron comparadas con Davis *et al.* (1996).

5.3.1. Estudio de elucidación estructural de 3-*O*-butil(-)-epicatequina (compuesto nuevo)

Se aisló 3-*O*-butil(-)-epicatequina (**63**) como un sólido amarillo amorfo (**Figura 6.6**), $[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 11$ (c 0.2, MeOH), el espectro de infrarojo indicó absorciones debido a las presencia de los grupos -OH y R-O-R (IR ν_{max} (MeOD) 3198, 2930, 1604, 1516, 1455, 1335, 1246, 1140 y 1033 cm^{-1}) (**Figura 5.14**). Su fórmula molecular se estableció como $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_6$ mediante ESI-HRMS ($[\text{M}]^+$ pico de ión molecular en m/z 346.3810, calc. 346.1416), como se muestra en la **Figura 5.13**. Los datos de MS fueron respaldados por el análisis de los desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN de **63**, donde se identificaron un metilo, cuatro grupos de metileno y siete de metino, así como siete carbonos cuaternarios aromáticos. Los espectros de ^1H -NMR y COSY señalaron la presencia del sistema ABX₂ característico del anillo C en una estructura de flavanol: CH-2 (δ_{H} 4.65; d; $J = 1.5$ Hz) \rightarrow CH-3 (δ_{H} 4.17; ddd; $J = 1.5, 2.4, 4.6$ Hz) \rightarrow CH₂-4 (δ_{H} 2.69/2.76; dd/dd; $J = 2.4, 17.1/4.6, 17.1$ Hz). Además, el espectro de ^1H -RMN indicó la existencia de cinco metinos aromáticos característicos de los anillos A y B de la familia de las flavonas. Los espectros de ^1H y ^{13}C -RMN presentaron las señales espectrales correspondientes de (-)-

epicatequina (**65**). Sin embargo, **63** mostró un sistema de giro ^1H - ^1H adicional en su estructura, las asignaciones de protones del resto pueden iniciarse convenientemente desde $\text{H-1}''$ (δ_{H} 3.58, t, $J = 6.7$ Hz), que se acopló con $\text{H}_2\text{-2}''$ (δ_{H} 1.9, p, $J = 6.9$ Hz), y estos secuencialmente a $\text{H}_2\text{-3}''$ (δ_{H} 1.31, h, $J = 7.4$ Hz), y este último fue acoplado con $\text{H}_3\text{-4}''$ (δ_{H} 0.87, t, $J = 7.4$ Hz). Finalmente, la estructura de **63** fue asignada de manera no ambigua por las correlaciones HMBC entre el metino $\text{H-1}''$ y el carbono C-3 (δ_{C} 65.5), lo que indica al mismo tiempo que ambos fragmentos están unidos por un enlace éter (**Figura 5.7**), todos los desplazamientos químicos se muestran en la **Tabla 5.1** y los espectros antes mencionados se muestran en **las Figuras (Figura 5.8 a 5.12)**.

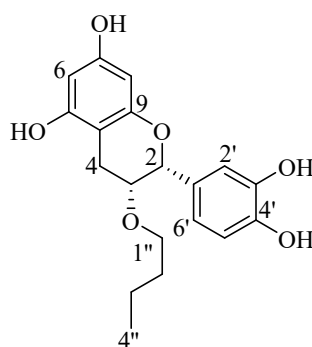


FIGURA 5.6 Estructura de 3-O-butil(-)-epicatequina (**63**).

La comparación de las fracciones obtenidas para la estructura de 3-O-butil(-)-epicatequina (**63**), entre las correlaciones COSY y HMBC se muestran en la **Figura 5.7**.

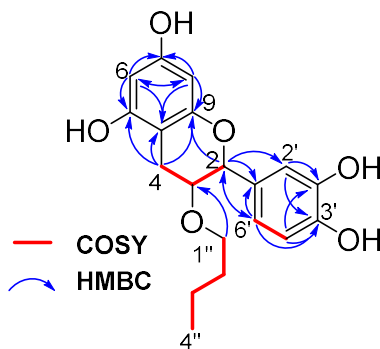


FIGURA 5.7 Correlaciones observadas derivadas de la RMN para 3-O-butil- (-) - epicatequina (**63**).

TABLA 5.1 Datos de desplazamiento de RMN para 3-*O*-butil(-)-epicatequina (**63**) en D₂O.

n° C	3- <i>O</i> -butyl(-)-epicatequina (63) (D ₂ O)	
	δ _C , mult.	δ _H , mult. (<i>J</i> en Hz)
2	77.9, CH	4.65, d (1.5)
3	65.5, CH	4.17, ddd (1.5, 2.4, 4.6)
4	27.4, CH ₂	2.69, dd (2.4, 17.1) 2.76, dd (4.6, 17.1)
5	155.4, C	
6	95.7, CH	6.05, s
7	154.8, C	
8	95.2, CH	6.02, s
9	155.2, C	
10	99.5, C	
1'	130.9, C	
2'	114.2, CH	6.95, d (2.0)
3'	143.5, C	
4'	143.7, C	
5'	115.9, CH	6.88 d (8.2)
6'	118.8, CH	6.80, dd (2.0, 8.2)
1''	61.5, CH ₂	3.58, t (6.7)
2''	33.4, CH ₂	1.49, p (6.9)
3''	18.3, CH ₂	1.31, h (7.4)
4''	13.0, CH ₃	0.87 t (7.4)

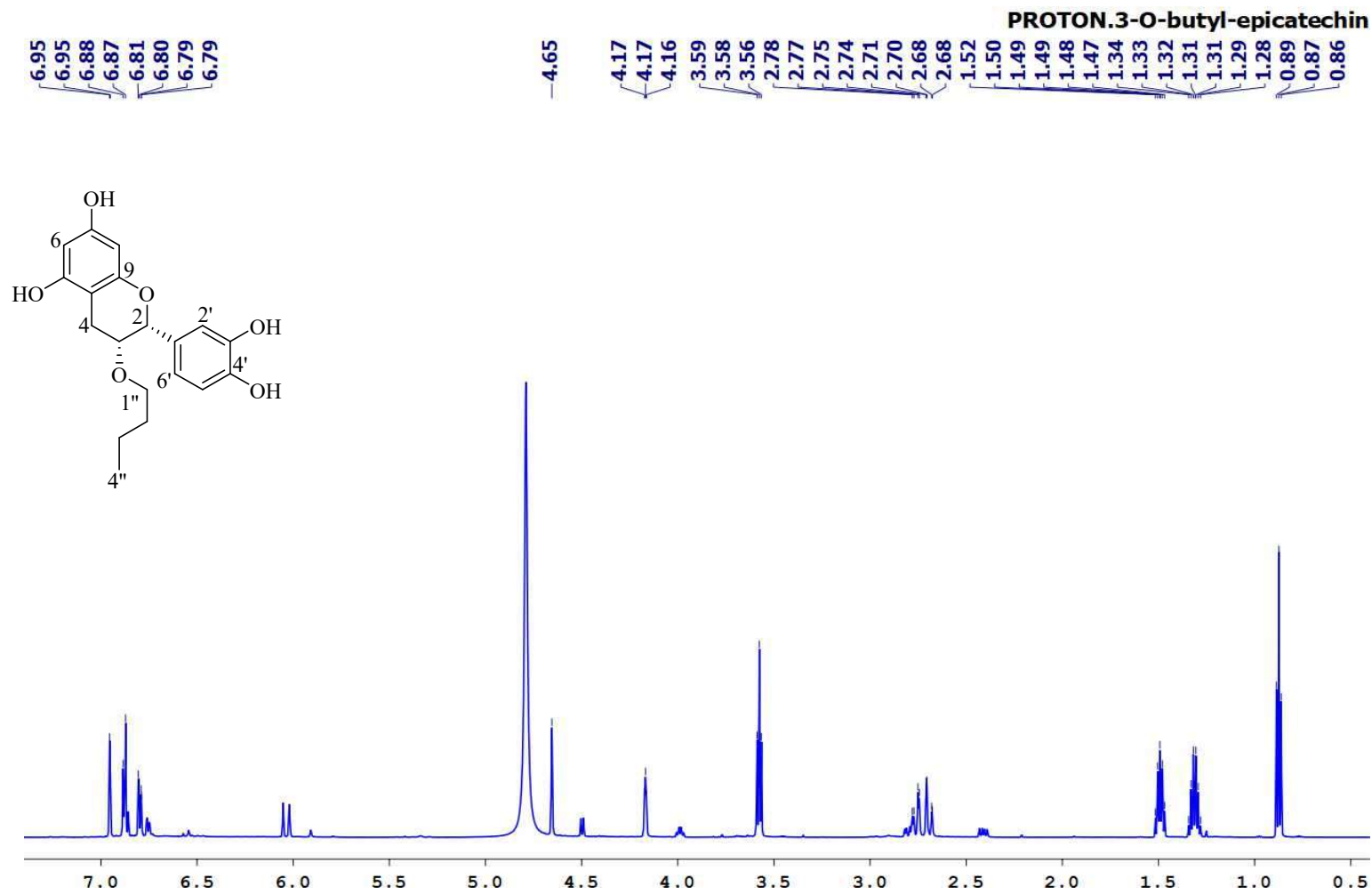


FIGURA 5.8 $^1\text{H-NMR}$ espectro de 3-*O*-butyl-(-)-epicatequina (**63**) en D_2O a 298 K, 600 MHz.

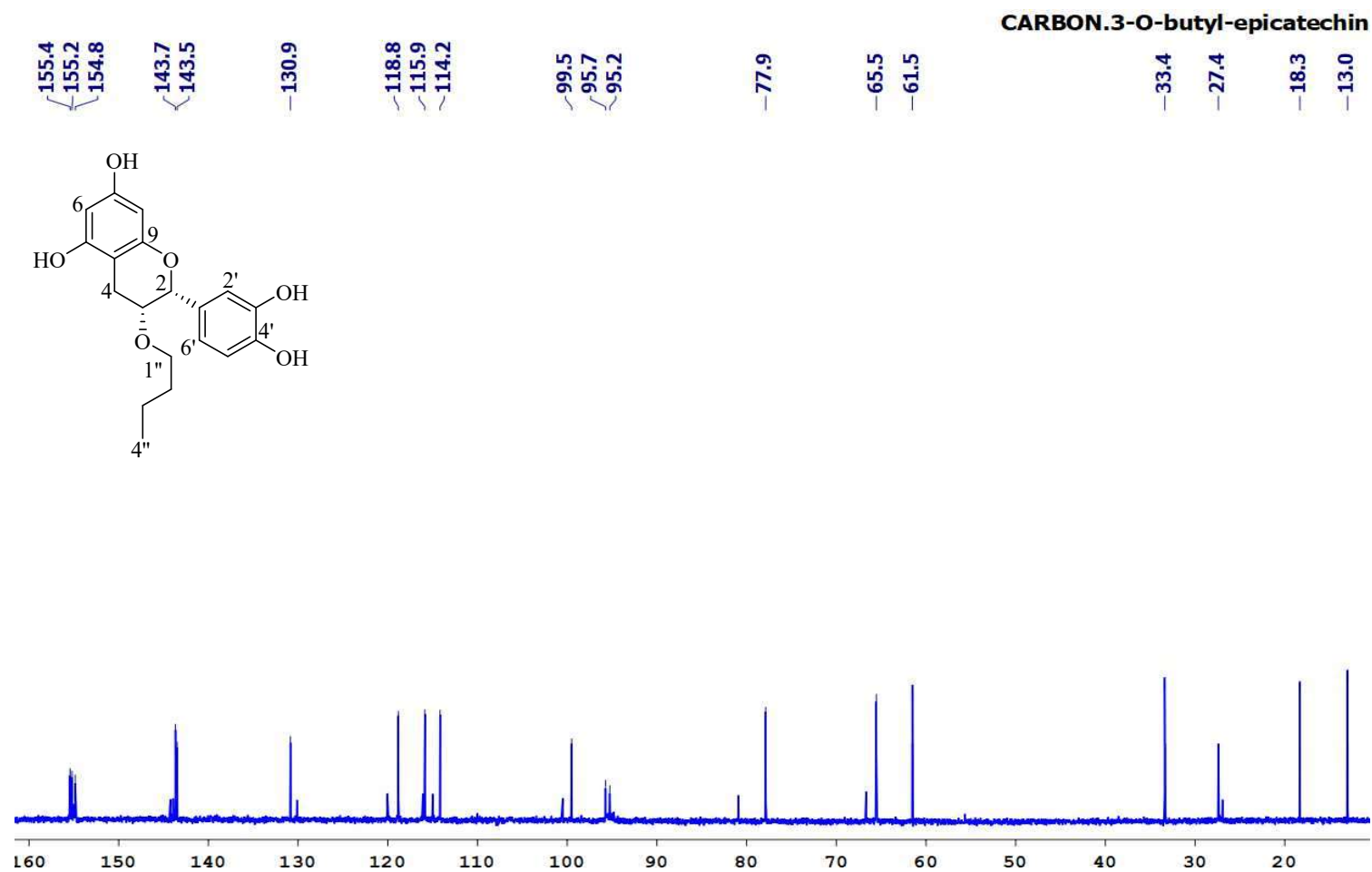


FIGURA 5.9 ^{13}C NMR espectro de 3-O-butyl-(-)-epicatequina (**63**) en D_2O a 298 K, 150 MHz.

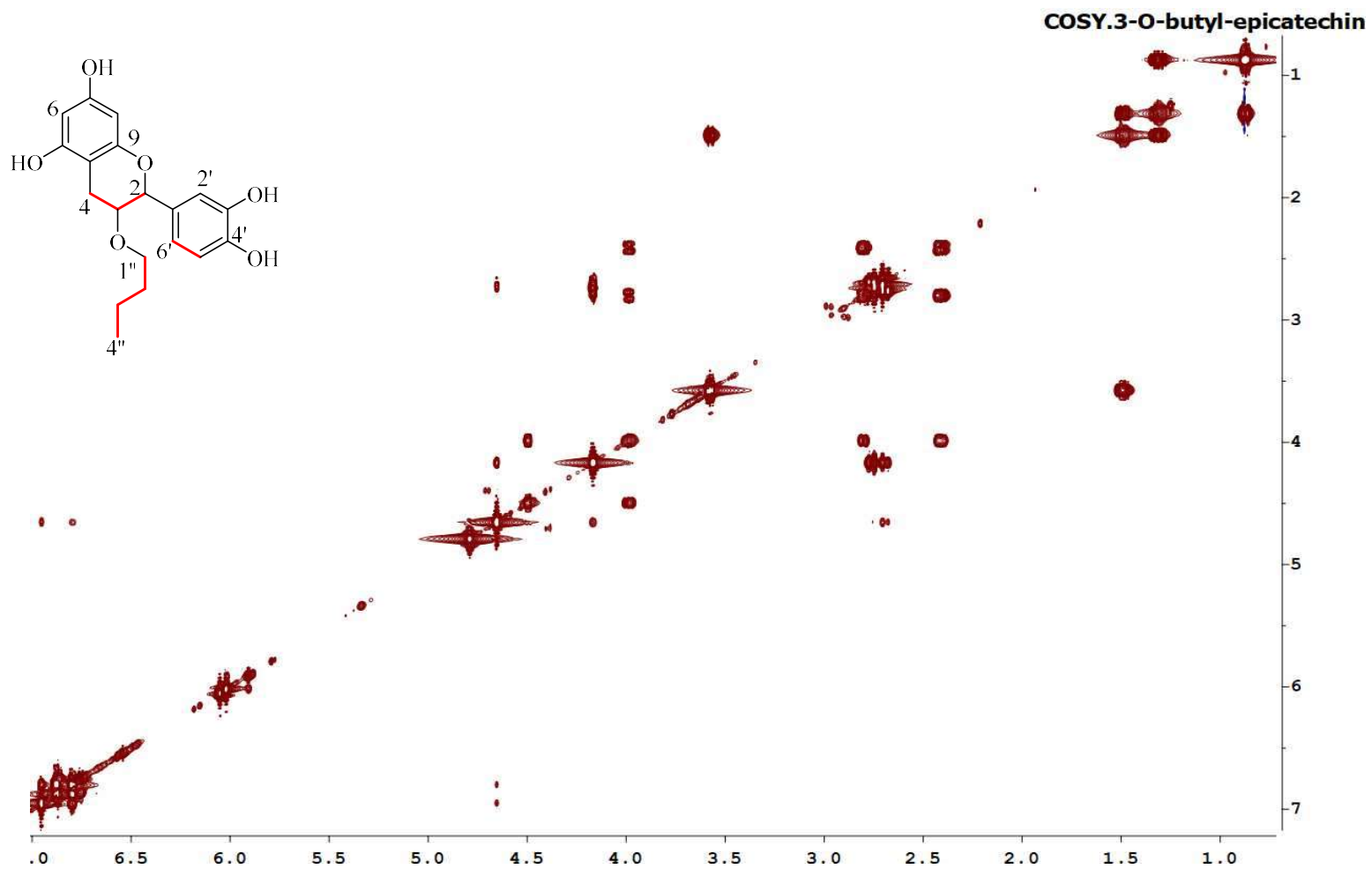


FIGURA 5.10 COSY espectro de 3-O-butyl(-)-epicatequina (63) en D₂O a 298 K, 600 MHz.

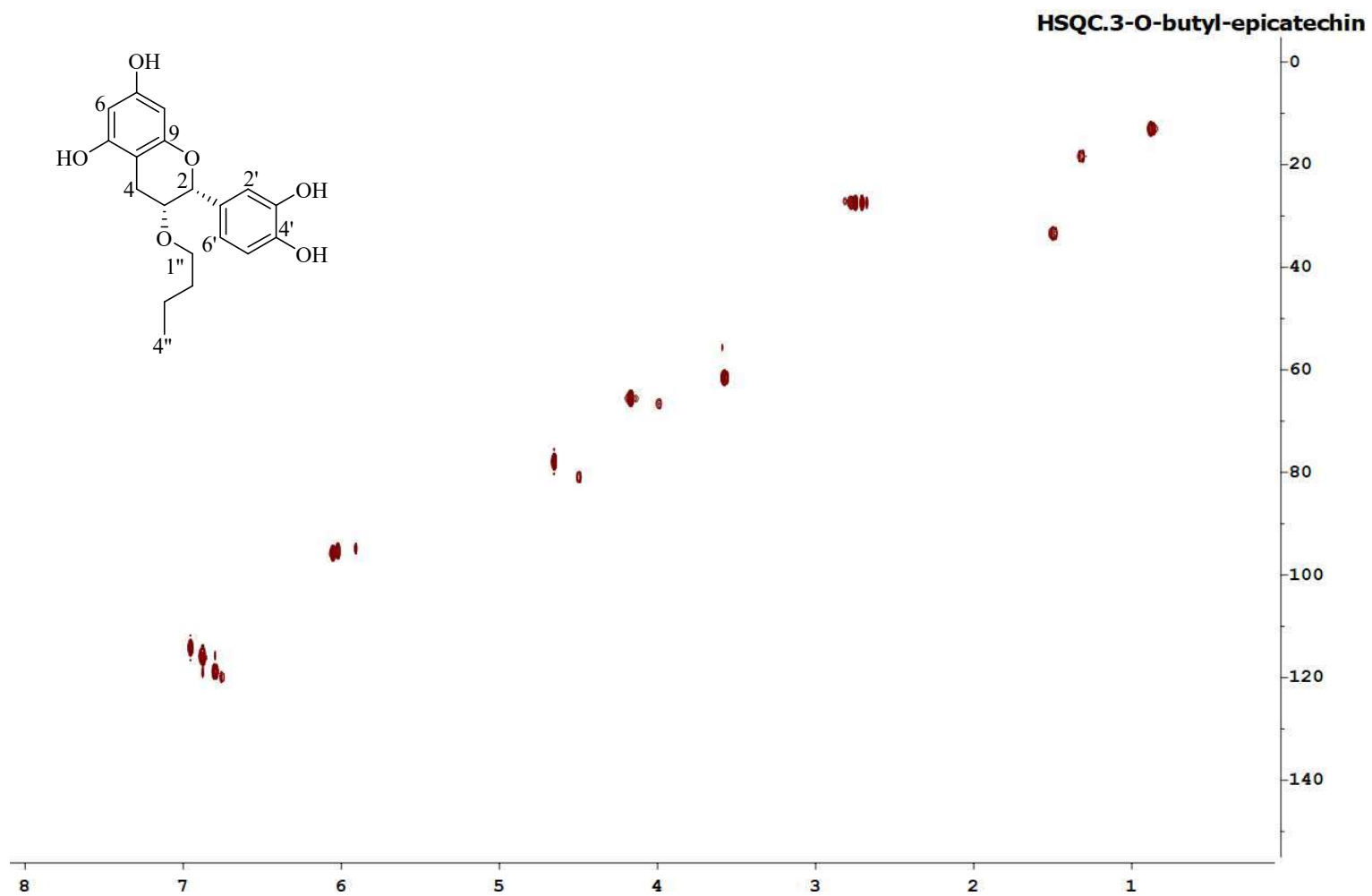


FIGURA 5.11 HSQC espectro de 3-O-butyl(-)-epicatequina (63) en D₂O a 298 K, 600 MHz.

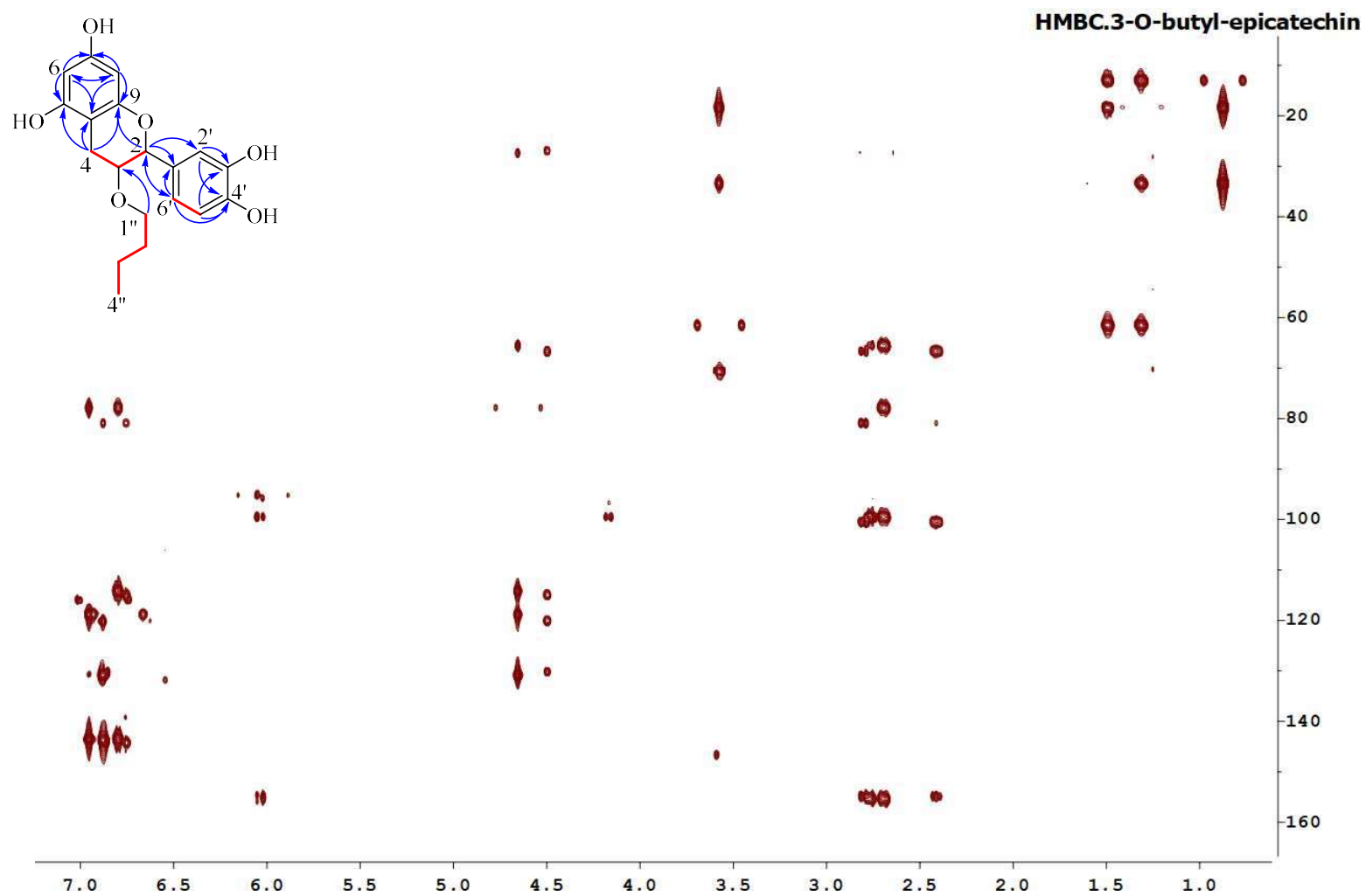


FIGURA 5.12 HMBC espectro de 3-O-butyl(-)-epicatequina (63) en D₂O a 298 K, 600 MHz.

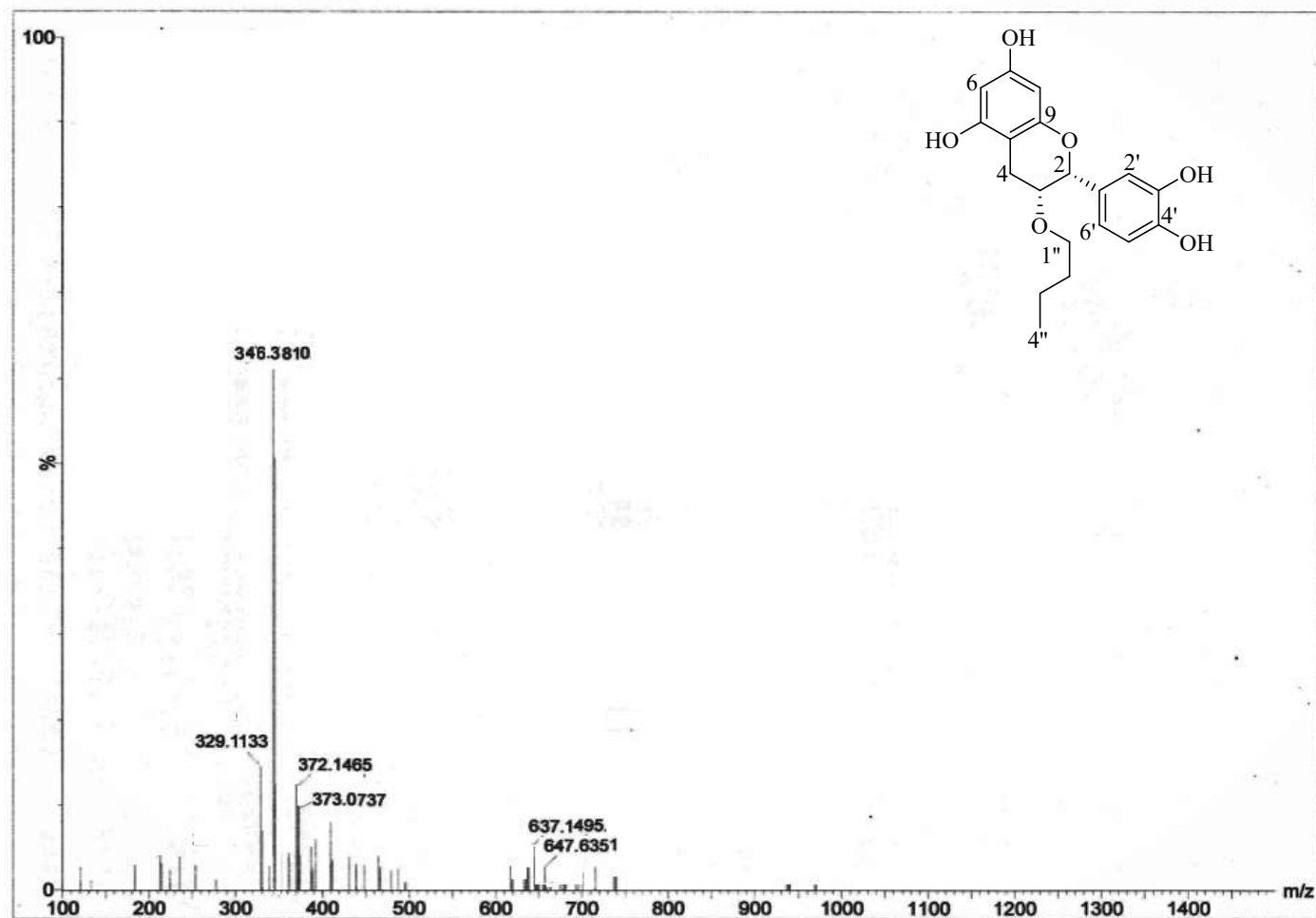


FIGURA 5.13 HRMS espectro de 3-O-butyl(-)-epicatequina (63).

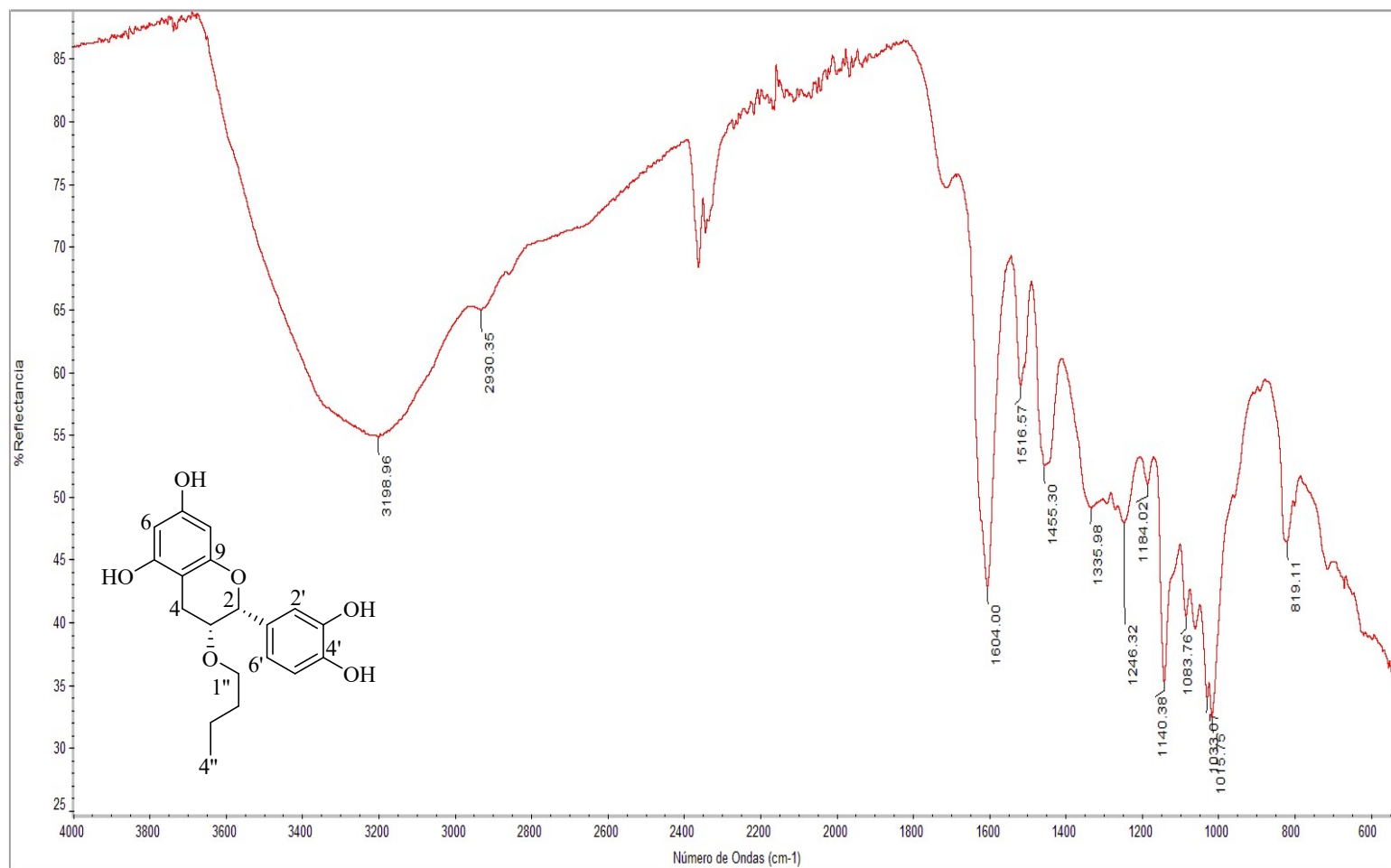


FIGURA 5.14 IR espectro de 3-O-butyl(-)-epicatequina (63).

5.3.2. Estudio de elucidación estructural de 3-O-butil(-)-epigalocatequina (compuesto nuevo)

El compuesto 3-O-butil(-)-epigalocatequina (**64**) se aisló como un sólido amarillo amorfo (**Figura 5.15**), $[\alpha]_D^{25} -13$ (c0.2, MeOH). La fórmula molecular de **64**, $C_{19}H_{22}O_7$, se estableció mediante el análisis HRESIMS, donde se observó su ión molecular a m/z 362.1420, calculado 362.1366 $[M]^+$ debido a que contenía un átomo de oxígeno adicional respecto a **63** (**Figura 5.23**). La estructura de este metabolito se determinó por comparación de sus datos espectroscópicos con los de 3-O-butil(-)-epicatequina (**63**), debido a que estaban estrechamente relacionados. Por lo tanto, el análisis de los espectros de RMN bidimensional (2D) (COSY, HSQC y HMBC) de **2** indicó la presencia del mismo esqueleto de carbono mostrado en **63**, pero con un sustituyente hidroxilo adicional en el enlace del anillo B (**Tabla 5.2**, **Figura 5.18** a **5.22**). Es importante destacar que las estructuras de **63** y **64** poseen un grupo de butil éter, ya que hay pocos informes en la literatura científica de compuestos naturales con este grupo inusual.

3-O-butil(-)-epigalocatequina (**64**), presenta un $IR_{\nu_{max}}$ (MeOH) 3201, 2921, 2851, 1605, 1519, 1444, 1240 y 1058 cm^{-1} (**Figura 5.24**); HR-ESI-MS m/z 362.1420 $[M]^+$ (calc. 362.1366 para $C_{19}H_{22}O_7$) (**Figura 5.23**); 1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ 6.52 (2H, s, H-2', H-6'), 5.93 (1H, d, $J= 2.2$ Hz, H-6), 5.91 (1H, d, $J= 2.2$ Hz, H-8), 4.75 (1H, d, $J= 1.4$ Hz, H-2), 4.17 (1H, ddd, $J= 1.4, 3.2, 4.6$ Hz, H-3), 3.55 (2H, t, $J= 6.7$ Hz, H₂-1''), 2.73 (1H, dd, $J= 3.2, 16.7$ Hz, H-4a), 2.85 (1H, dd, $J= 4.6, 16.7$ Hz, H-4b), 1.46 (2H, p, $J= 6.9$ Hz, H₂-2''), 1.29 (2H, h, $J= 7.4$ Hz, H₂-3''), 0.84 (3H, t, $J= 7.4$ Hz, H₃-4''); ^{13}C NMR (125 MHz, MeOD) δ 158.0 (C, C-5), 157.7 (C, C-7), 157.3 (C, C-9), 146.7 (C, C-5'), 146.7 (C, C-3'), 133.6 (C, C-4'), 131.5 (C, C-1'), 107.0 (CH, C-2'), 107.0 (CH, C-6'), 100.1 (CH, C-10), 96.4 (C, C-6), 95.9 (CH, C-8), 79.9 (CH, C-2), 67.5 (CH, C-3), 61.2 (CH₂, C-1''), 33.1 (CH₂, C-2''), 29.1 (CH₂, C-4), 18.0 (CH₂, C-3''), 12.7 (CH₃, C-4''); HR-ESI-MS m/z 362.1420 $[M]^+$ (calc. 362.1366 para $C_{19}H_{22}O_7$); *anal.* C, 62.98 %; H, 6.12 %; O, 30.91 %.

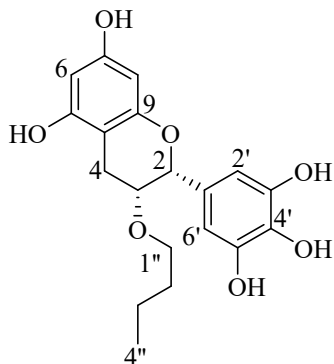


FIGURA 5.15 Estructura de 3-*O*-butil(-)-epicagalocatequina (64).

La comparación de las fracciones obtenidas para la estructura de 3-*O*-butil(-)-epicagalocatequina (64), entre las correlaciones COSY y HMBC se muestran en la **Figura 5.16**.

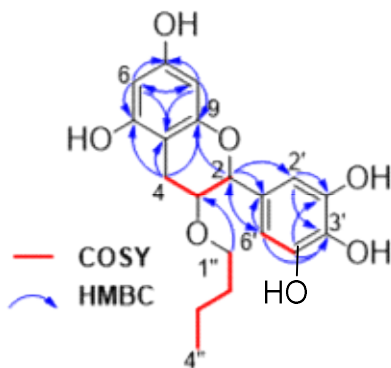


FIGURA 5.16 Correlaciones derivadas de la RMN para 3-*O*-butil(-)- epicagalocatequina (64).

TABLA 5.2 Datos de desplazamiento de RMN para 3-*O*-butil(-)-epigallocatequina (**64**) en MeOD.

n° C	3- <i>O</i> -butil(-)-epigallocatequina (64) (MeOD)	
	δ_C , mult.	δ_H , mult. (<i>J</i> in Hz)
2	79.9, CH	4.75, d (1.4)
3	67.5, CH	4.17, ddd (1.4, 3.2, 4.6)
4	29.1, CH ₂	2.73, dd (3.2, 16.7) 2.85, dd (4.6, 16.)
5	158.0, C	
6	96.4, CH	5.93, d (2.2)
7	157.7, C	
8	95.9, CH	5.91, d (2.2)
9	157.3, C	
10	100.1, C	
1'	131.5, C	
2'	107.0, CH	6.52, s
3'	146.7, C	
4'	133.6, C	
5'	146.7, C	
6'	107.0, CH	6.52, s
1''	61.2, CH ₂	3.55, t (6.7)
2''	33.1, CH ₂	1.46, p (6.9)
3''	18.0, CH ₂	1.29, h (7.4)
4''	12.7, CH ₃	0.84, t (7.4)

El análisis para 3-*O*-butil(-)-epigallocatequina (**64**), indicó la presencia del mismo esqueleto de carbono que se muestra en **1**, pero con un sustituyente hidroxilo adicional en el anillo B, por lo que en la **Tabla 5.3** se muestra su comparación de los compuestos **63** y **64**.

La comparación de las fracciones obtenidas para la estructura de **63** y **64**, entre las correlaciones COSY y HMBC se muestran en la **Figura 5.17**.

TABLA 5.3 Datos de desplazamiento de RMN para 63 y 64 (600 MHz; 125 MHz).

n°	3- <i>O</i> -butil(-)-epicatequina (63) (D ₂ O)		3- <i>O</i> -butil(-)-epigallocatequina (64) (MeOD)	
	δ _C	δ _H , mult. (<i>J</i> en Hz)	δ _C	δ _H , mult. (<i>J</i> en Hz)
2	77.9	4.65, d (1.5)	79.9	4.75, d (1.4)
3	65.5	4.17, ddd (1.5, 2.4, 4.6)	67.5	4.17, ddd (1.4, 3.2, 4.6)
4	27.4	2.69, dd (2.4, 17.1) 2.76, dd (4.6, 17.1)	29.1	2.73, dd (3.2, 16.7) 2.85, dd (4.6, 16.)
5	155.4		158.0	
6	95.7	6.05, s	96.4	5.93, d (2.2)
7	154.8		157.7	
8	95.2	6.02, s	95.9	5.91, d (2.2)
9	155.2		157.3	
10	99.5		100.1	
1'	130.9		131.5	
2'	114.2	6.95, d (2.0)	107.0	6.52, s
3'	143.5		146.7	
4'	143.7		133.6	
5'	115.9	6.88 d (8.2)	146.7	
6'	118.8	6.80, dd (2.0, 8.2)	107.0	6.52, s
1''	61.5	3.58, t (6.7)	61.2	3.55, t (6.7)
2''	33.4	1.49, p (6.9)	33.1	1.46, p (6.9)
3''	18.3	1.31, h (7.4)	18.0	1.29, h (7.4)
4''	13.0	0.87 t (7.4)	12.7	0.84, t (7.4)

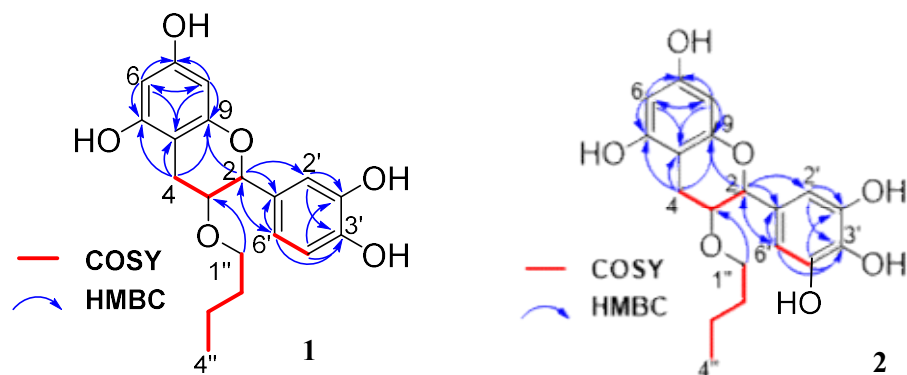


FIGURA 5.17 Correlaciones observadas derivadas de RMN para los compuestos 3-*O*-butil(-)-epicatequina (63) (D₂O) y 3-*O*-butil(-)-epigallocatequina (64) (MeOD).

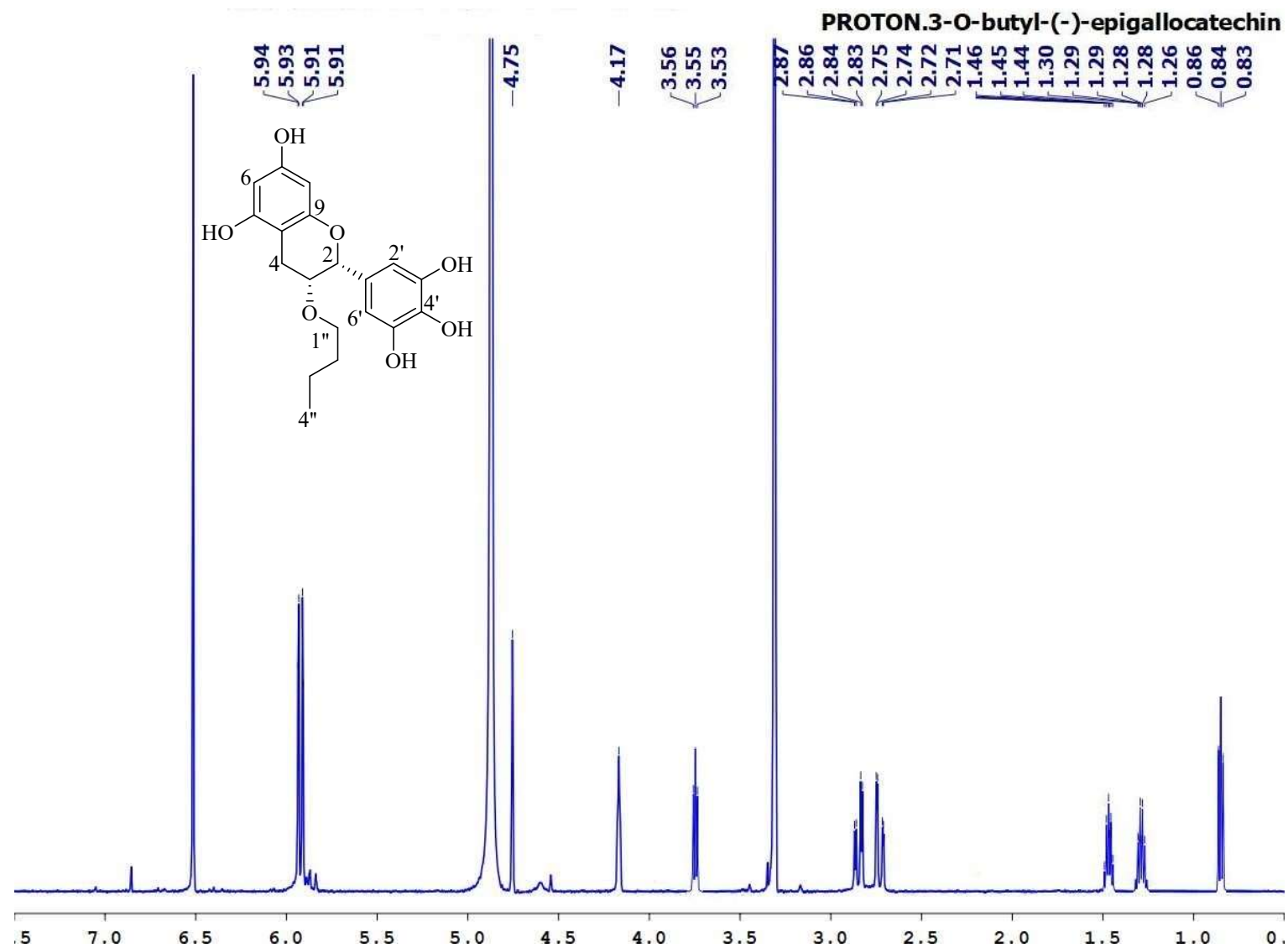


FIGURA 5.18 $^1\text{H-NMR}$ espectro de 3-*O*-butil(-)-epigallocatequina (**64**) en MeOD a 298 K, 600 MHz.

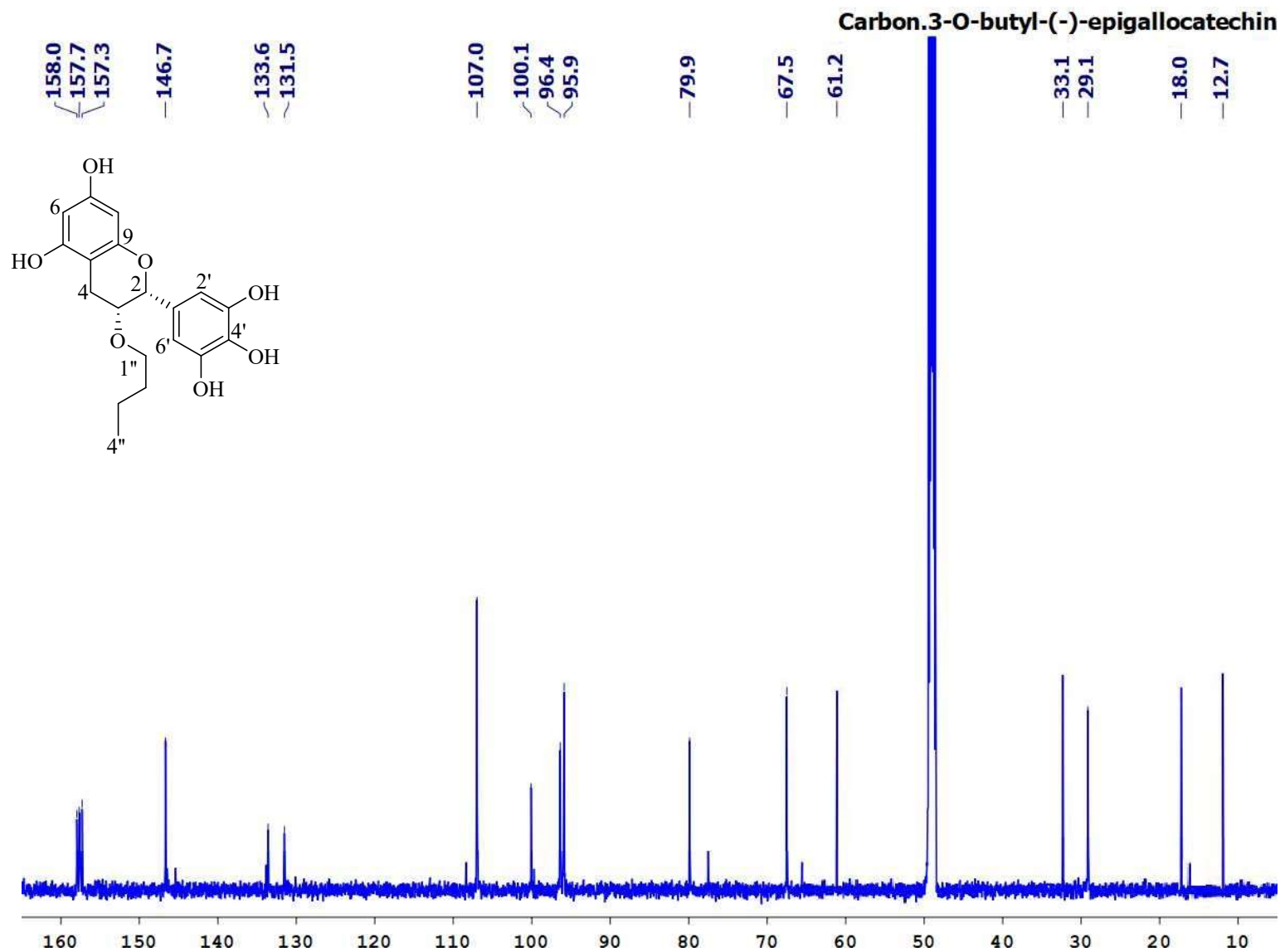
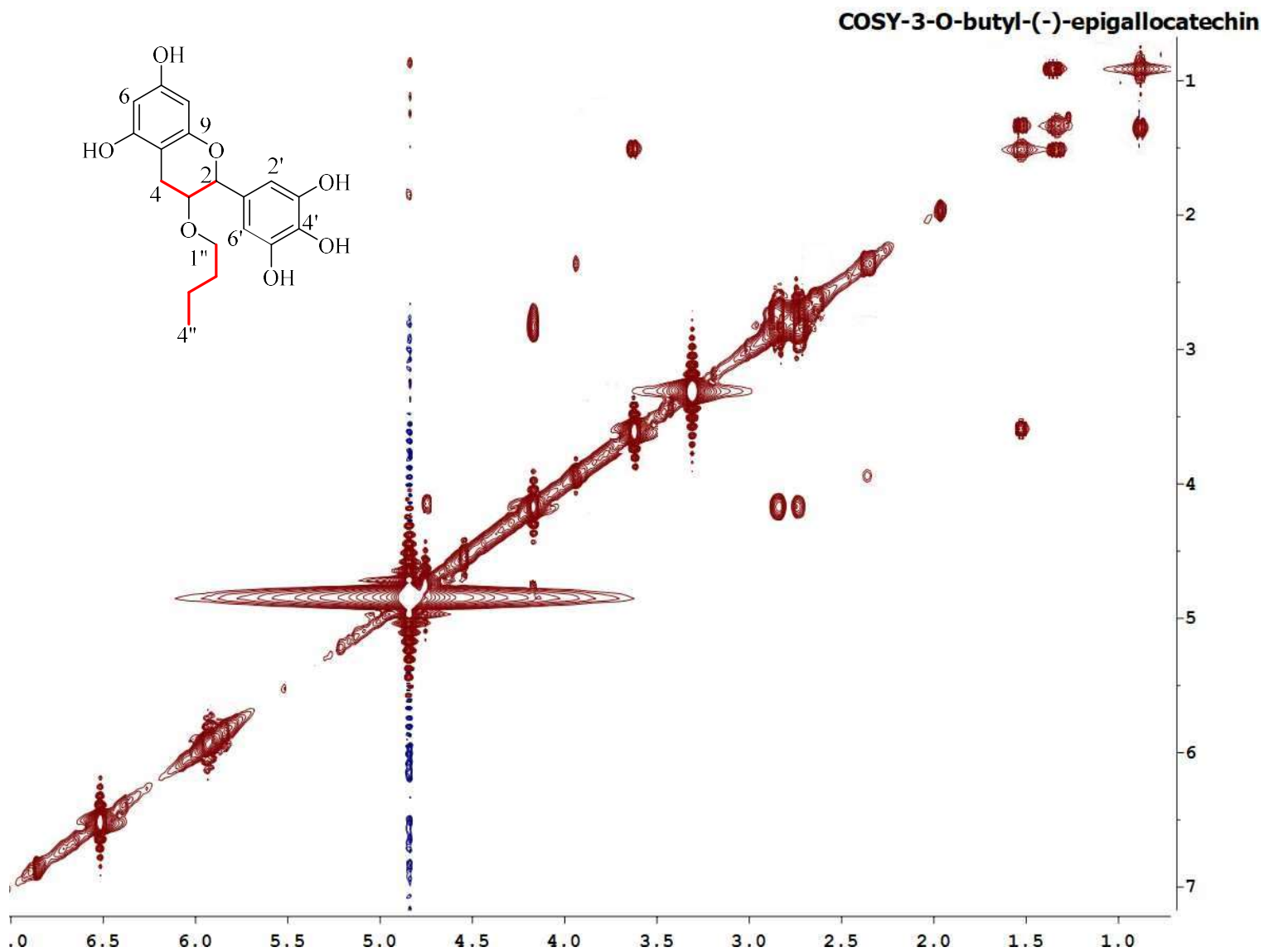


FIGURA 5.19 ¹³C NMR espectro de 3-O-butyl(-)-epigallocatequina (64) en MeOD a 298 K, 150 MHz.



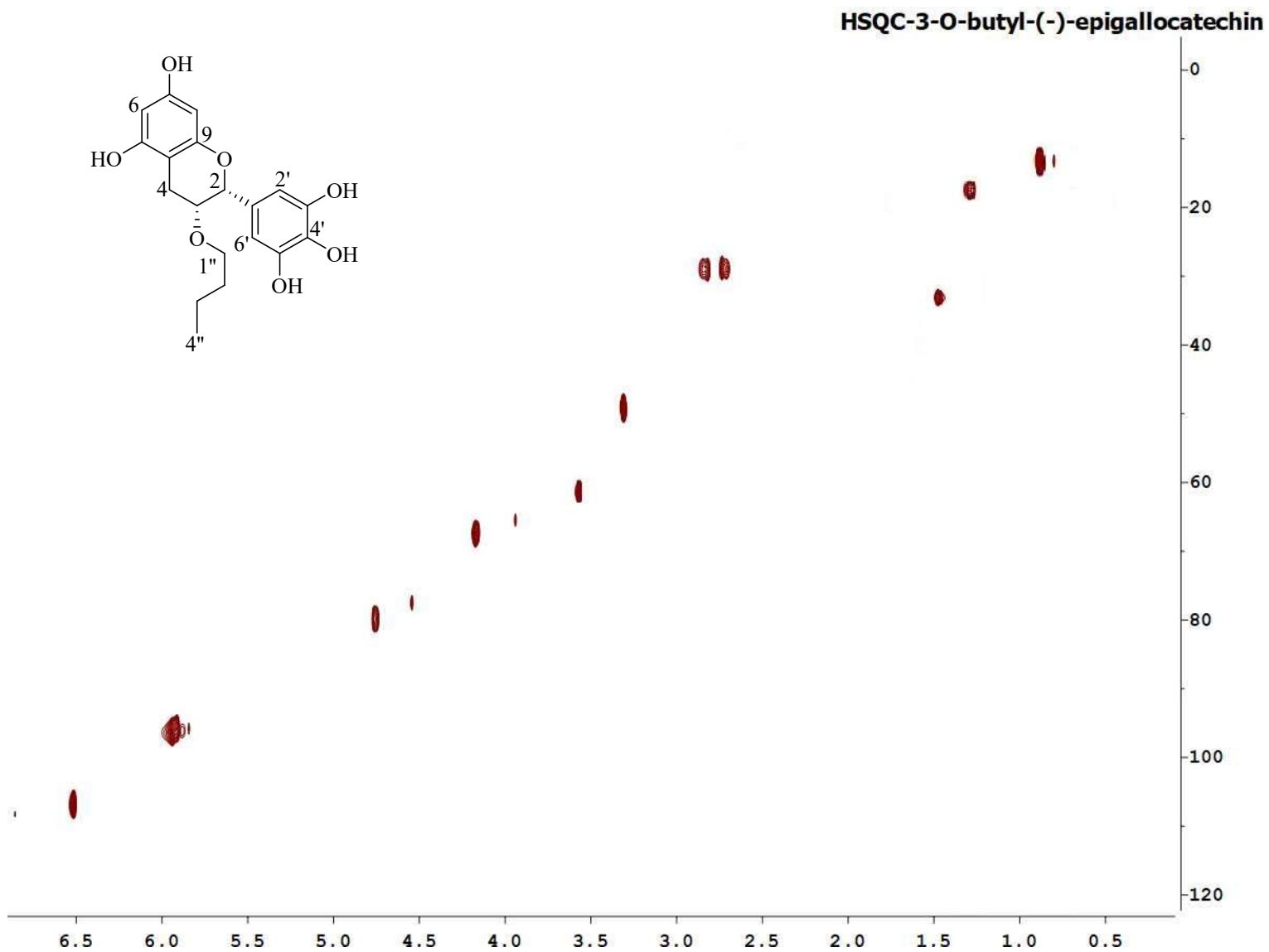


FIGURA 5.21 HSQC espectro de 3-O-butyl(-)-epigallocatequina (64) en MeOD a 298 K, 600 MHz.

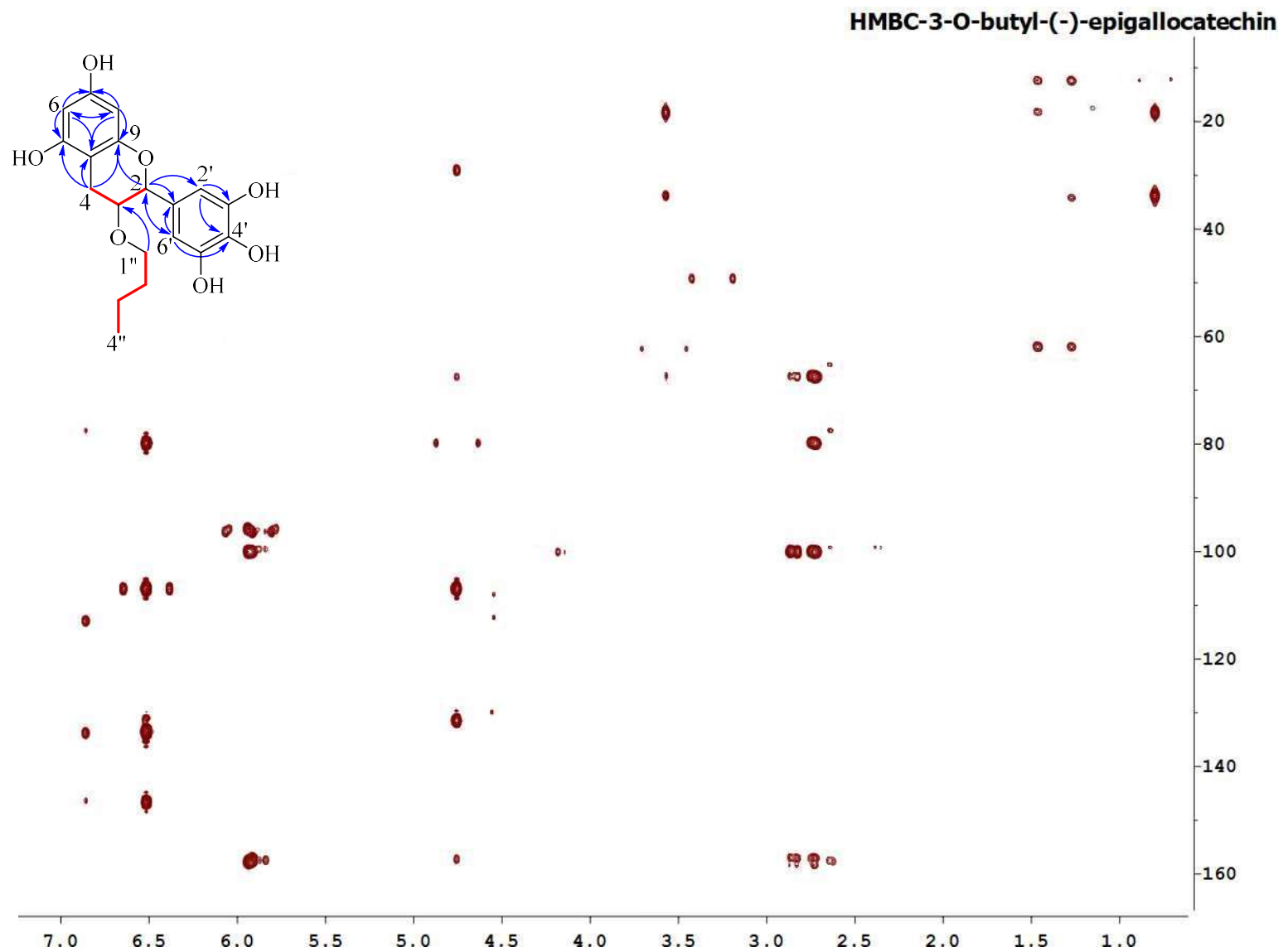
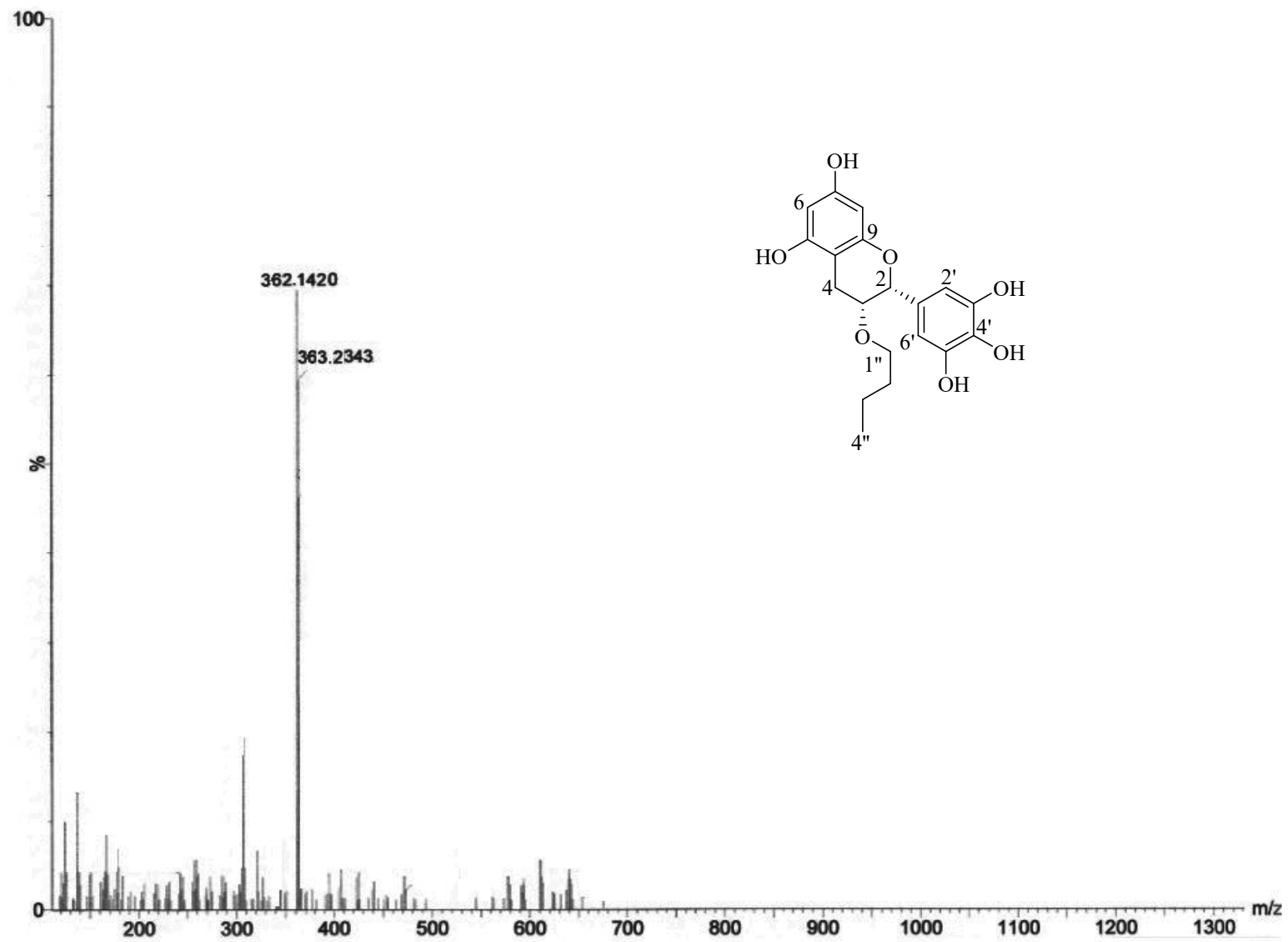


FIGURA 5.22 HMBC espectro de 3-O-butil(-)-epigallocatequina (64) en MeOD a 298 K, 600 MHz.

FIGURA 5.23 HRMS espectro de 3-*O*-butil(-)-epigalotequina (64).

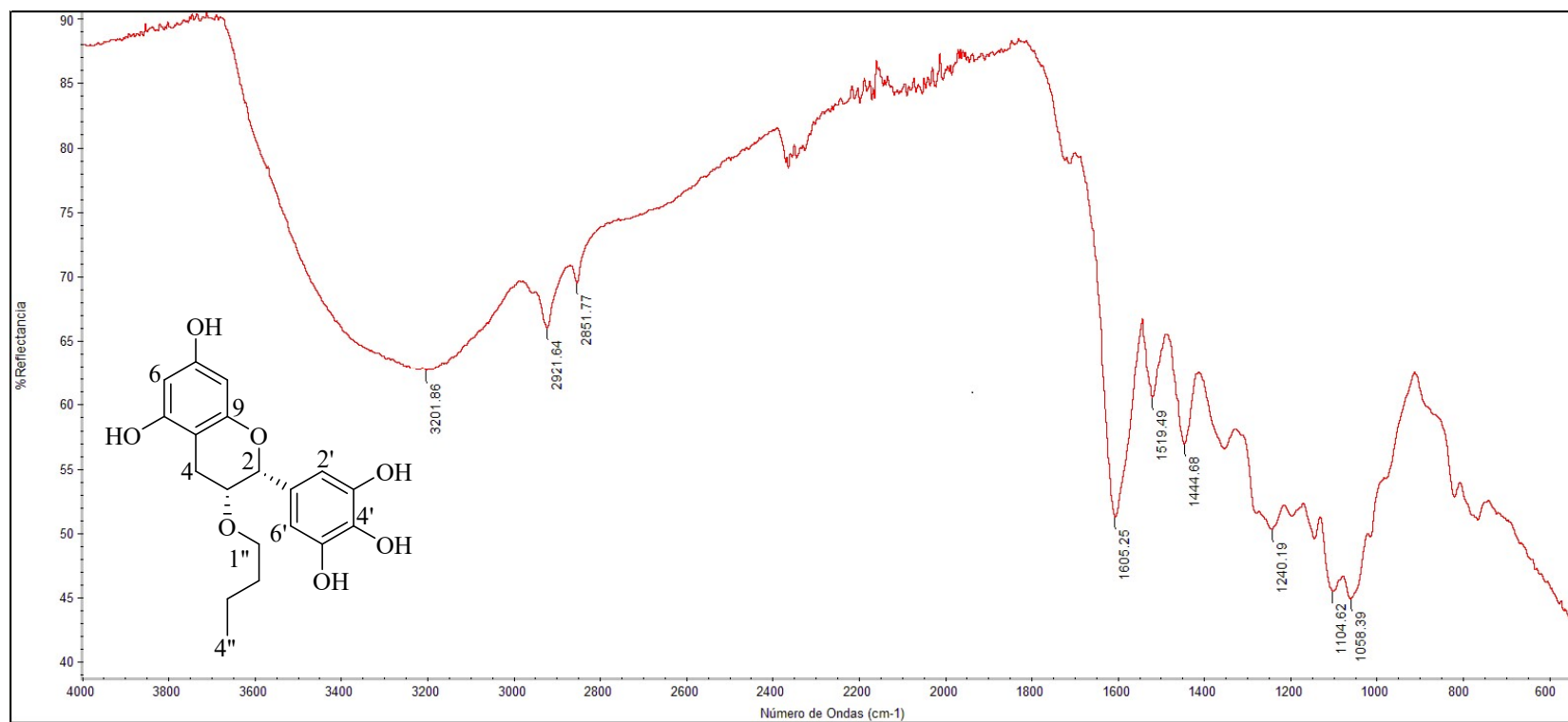


FIGURA 5.24 IR espectro de 3-O-butil(-)-epigallocatequina (64).

5.3.3. Estudio de elucidación estructural de compuestos ya reportados

Junto con los metabolitos descritos anteriormente, los compuestos conocidos, (-)-epicatequina (**65**), (+)-galocatequina (**66**), (-)-epigalocatequina (**67**), azadiractina A (**68**), trilinoleina (**69**) y ácido octadecanoico-tetrahidrofuran-3,4-diil éster (**70**) (**Figura 5.25**).

Los flavonoides representan el grupo más estudiado de los polifenoles y se refiere a un grupo aromático de compuestos heterocíclicos que contienen oxígeno, están ampliamente distribuido entre las plantas, constituyendo la mayoría de los colores amarillo, rojo y azul de las plantas y frutas. Por ende, se encuentran en abundancia en las uvas, manzanas, cebollas y cerezas, además de ser parte del árbol *Ginkgo Biloba*, *Camelia Sinensis* y *Theobroma Cacao* (Keen, 2001).

Las catequinas se encuentran en frutas como los albaricoques, cerezas y en bebidas como en el vino tinto, sin embargo, las principales fuentes de catequinas son el té verde y el chocolate. La catequina y epicatequina son los flavanoles más comunes en las frutas, mientras que las galocatequinas, epigalocatequinas y epigalocatequina 3-galato, se encuentran en algunas semillas de leguminosas, uvas y principalmente en el té (Arts *et al.*, 2000).

En el caso de *Azadirachta indica*, Vander Nat *et al.* (1991), aisló en el extracto acuoso de la corteza, encontrando ácido gálico, (+) galocatequina (**66**), (-) epicatequina (**65**), (+) catequina y epigalocatequina (**67**). Azadiractina (**68**) se ha aislado principalmente de las semillas del extracto diclorometano y etanólico (Luo *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2000; Jarvis y Morgan, 2000; Deota *et al.*, 2000), trilinoleina (**69**) y ácido octadecanoico-tetrahidrofuran-3,4-diil éster (**70**) se aisló del extracto de cloroformo de *A. indica* y se probó *in vitro* la toxicidad contra las larvas de *S. scabiei* (Du *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010).

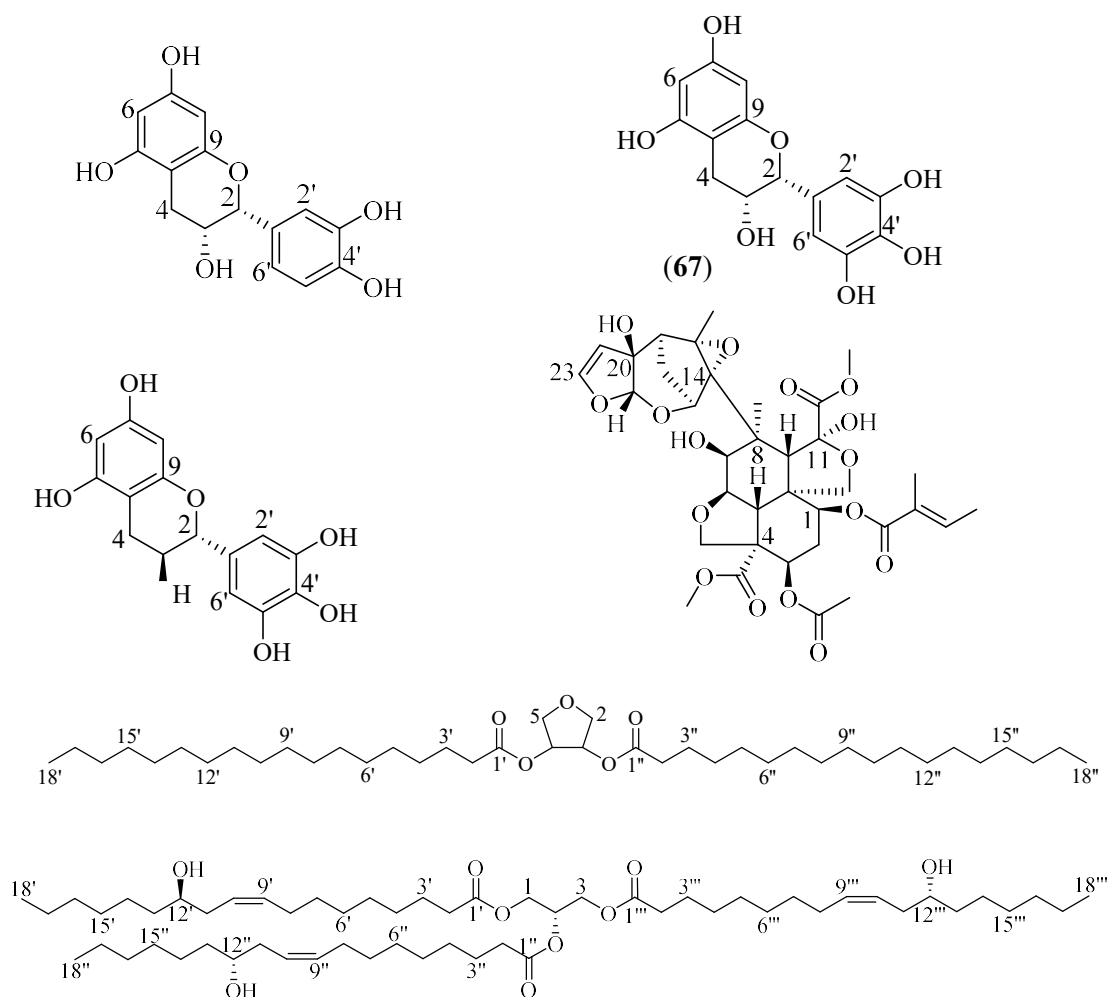


FIGURA 5.25 Compuestos reportados en la literatura de *A. indica*, (-)-epicatequina (65), (+)-galocatequina (66), (-)-epigallocatequina (67), azadiractina A (68), trilinoleína (69) y ácido octadecanoico-tetrahidrofuran-3,4-diil éster (70).

Como se mencionó anteriormente muchos de los datos espectroscópicos y espectrométricos se encuentran dispersos en la literatura, sin embargo los compuestos 65, 66 y 67 se identificaron por comparación de sus datos espectroscópicos con Lôbo *et al.* (2008), como se muestran a continuación (Figura 5.26), fueron comparados con los obtenidos en este trabajo:

(-)-epicatequina (65). RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) d: 6.97 (*d*, $J = 1.2$ Hz, H-2'); 6.79 (*dd*, $J = 8.1$ e 1.2 Hz, H-6'); 6.75 (*d*, $J = 8.1$ Hz, H-5'); 5.93 (*d*, $J = 1.8$ Hz, H-6); 5.91 (*d*, $J = 1.8$ Hz, H-8); 4.82 (*sl*, H-2); 4.17 (*sl*, H-3); 2.85 (*dd*, $J = 16.8$ y 4.5 Hz, H-4a); 2.72 (*dd*, $J = 16.8$ y

2.4 Hz, H-4b). RMN de ^{13}C [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO} + \text{gts D}_2\text{O}$] d: 157.3 (C-5); 157.1 (C-9); 156.7 (C-7); 145.1 (C-4'); 145.0 (C-3'); 131.7 (C-1'); 119.0 (C-6'); 115.4 (C-5'); 115.0 (C-2'); 99.5 (C-10); 96.0 (C-6); 95.3 (C-8); 79.1 (C-2); 66.6 (C-3); 28.5 (C-4).

(+)-galocatequina (66). RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) d: 6.83 (*d*, $J = 1.8$ Hz, H-2'); 6.76 (*d*, $J = 8.1$ Hz, H-5'); 6.71 (*dd*, $J = 8.1$ y 1.8 Hz, H-6'); 5.93 (*d*, $J = 2.2$ Hz, H-6); 5.85 (*d*, $J = 2.2$ Hz, H-8); 4.57 (*d*, $J = 7.5$ Hz, H-2); 3.97 (*m*, H-3); 2.85 (*dd*, $J = 16.1$ y 5.5 Hz, H-4a); 2.51 (*dd*, $J = 16.1$ y 8.2 Hz, H-4b). RMN ^{13}C [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO} + \text{gts D}_2\text{O}$] d: 157.5 (C-7); 157.0 (C-9); 156.6 (C-5); 145.6 (C-3'); 145.5 (C-4'); 131.7 (C-1'); 119.8 (C-6'); 115.6 (C-5'); 115.2 (C-2'); 100.3 (C-10); 96.0 (C-6); 95.1 (C-8); 82.4 (C-2); 68.0 (C-3); 28.6 (C-4).

(-)-epigalocatequina (67). RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) d: 6.83 (*d*, $J = 1.8$ Hz, H-2'); 6.76 (*d*, $J = 8.1$ Hz, H-5'); 6.71 (*dd*, $J = 8.1$ e 1.8 Hz, H-6'); 5.93 (*d*, $J = 2.2$ Hz, H-6); 5.85 (*d*, $J = 2.2$ Hz, H-8); 4.57 (*d*, $J = 7.5$ Hz, H-2); 3.97 (*m*, H-3); 2.85 (*dd*, $J = 16.1$ e 5.5 Hz, H-4a); 2.51 (*dd*, $J = 16.1$ e 8.2 Hz, H-4b). RMN ^{13}C [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO} + \text{gts D}_2\text{O}$] d: 157.5 (C-7); 157.0 (C-9); 156.6 (C-5); 145.6 (C-3'); 145.5 (C-4'); 131.7 (C-1'); 119.8 (C-6'); 115.6 (C-5'); 115.2 (C-2'); 100.3 (C-10); 96.0 (C-6); 95.1 (C-8); 82.4 (C-2); 68.0 (C-3); 28.6 (C-4).

Los datos espectrales de los compuestos **65**, **66** y **67**, por tratarse de epímeros, son muy similares. En el análisis del espectro de RMN ^1H de **63** se observaron cuatro señales en la región de hidrogenos alifáticos: dos dobles dobletes integrando un hidrógeno cada uno, centrados en δ 2,50 y 2,85, característicos de hidrogenos de grupo metileno ligado a carbono oximetínico; un múltiple en δ 3,97, atribuido a un hidrógeno ligado al carbono oximetínico y un doblete, integrando un hidrógeno, en δ 4,57, característico de hidrógeno oximetínico-bencílico. Este conjunto de señales es típico del anillo C de catequinas.

En la región de hidrógeno aromático, se observaron tres signos que caracterizan un sistema de acoplamiento AM_x en δ 6,83 (*d*, $J = 1,8$ Hz, ^1H), 6,71 (*dd*, $J = 8,1$ y $1,8$ ^1H) y 6.76 (*d*, $J = 8,1$ Hz, ^1H), así como dos dobletes meta relacionados ($J = 2,2$ Hz, ^1H) en δ 5,93 y 5,85, atribuidos a los hidrógenos 6 y 8 del anillo A de la catequina. Estos acoplamientos fueron todos confirmados a través del análisis del espectro COSY ^1H .

El análisis del espectro de RMN ^{13}C de **65**, en conjunto con el espectro HSQC, así como la comparación con los datos de la literatura, permitió asignar los 15 señales observados a los

quince carbonos de la estructura principal de la (+)-catequina, que se atribuye al carbono oximetínico-bencílico C-2, siendo éste uno de las señales más importantes para distinguir las estructuras de las catequinas de su epímero en C-3.

El análisis del espectro HSQC de S₁ también fue importante para asignar con precisión los signos en δ 115,6 y 115,2 a los carbonos C-5' y C-2', respectivamente, ya que mostraron correlaciones 1J con las señales en δ 6,76 y 6,83, los cuales habían sido atribuidos respectivamente a los hidrogenos H-5' y H-2'.

Los datos de RMN 1H de **66** y **67** son similares a los de **65**, destacándose sólo pequeñas diferencias tanto en el desplazamiento químico como en el patrón de acoplamiento, principalmente con relación a los hidrogenos alifáticos. Por ejemplo, H-2 y H-3 exhiben solos anchos en δ 4,82 y 4,17, respectivamente, y H-4b un doble doblete en δ 2,72 con J 16,8 y 2,4 Hz, todo esto como consecuencia del cambio de la estereoquímica del carbono C-3 (OH-a) en **66**.

Los datos espectrales de RMN ^{13}C de **66** y **67** también son similares a los de **65**, destacándose como diferencia sólo los signos atribuidos a los carbonos C-5' (OH) y C-3, caracterizando la estereoquímica diferenciada de **66** y **67** en relación a **65**.

Los espectos de RMN de 1H y ^{13}C de (-)-epicatequina (**65**) (**Figura 5.27** y **5.28**), (+)-galocatequina (**66**) (**Figura 5.29** y **5.30**), (-)-epigalocatequina (**67**) (**Figura 5.31** y **5.32**), azadiractina A (**69**) (**Figura 5.33**), trilinoleina (**69**) (**Figura 5.34** y **5.35**) y ácido octadecanoico-tetrahidrofuran-3,4-diil éster (**70**) se muestran en las **Figuras 5.36** y **5.37**.

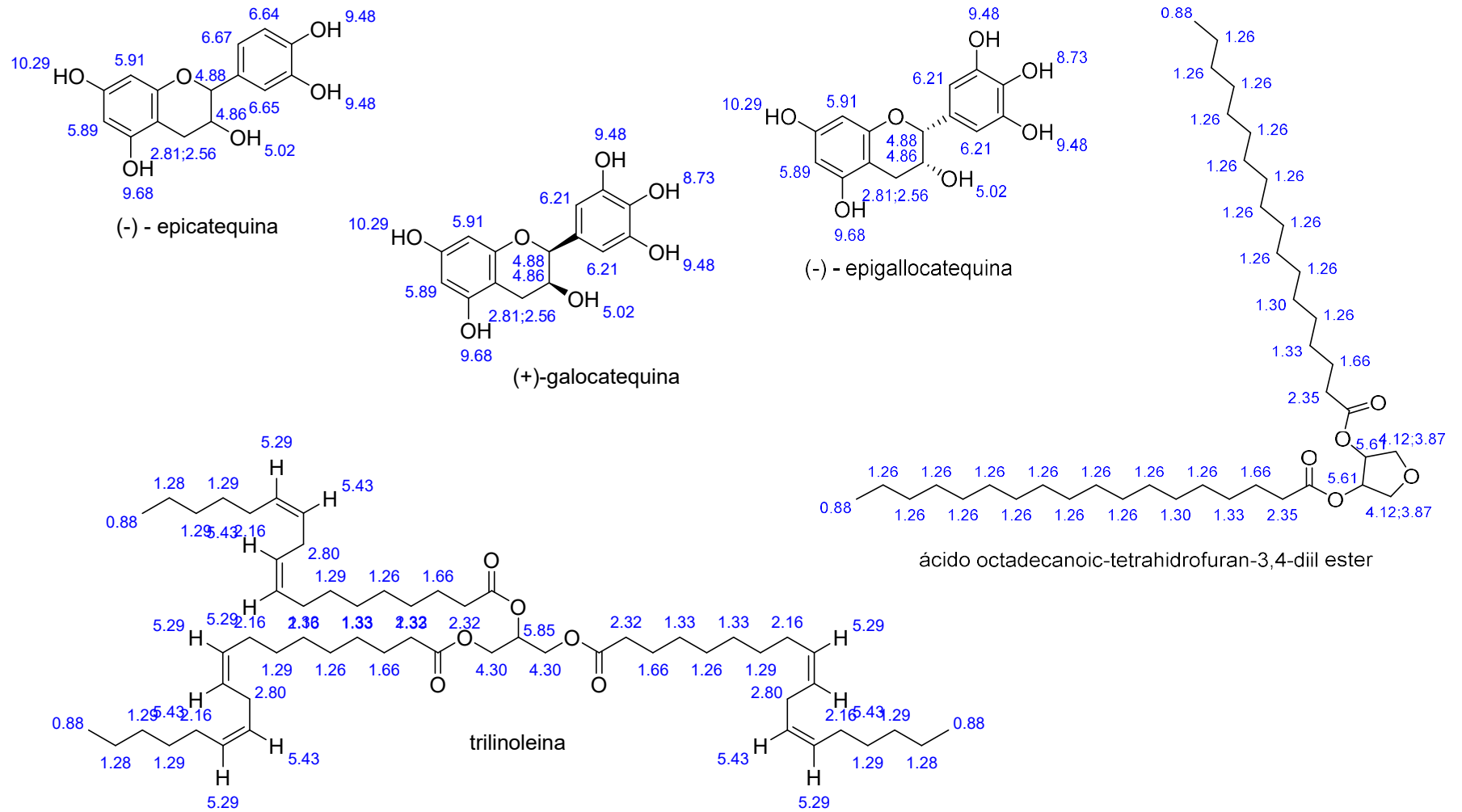


FIGURA 5.26 Desplazamientos químicos de $^1\text{H-NMR}$ de compuestos químicos ya reportados de *A. indica*.

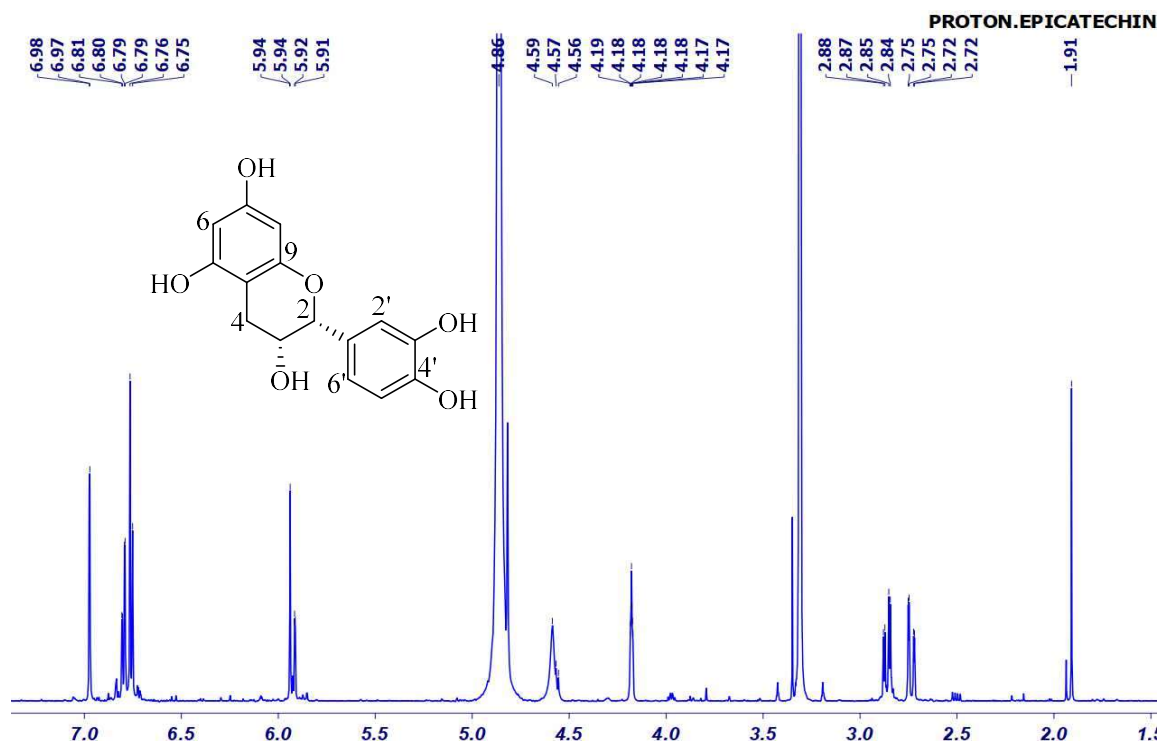


FIGURA 5.27 $^1\text{H-NMR}$ espectro de (-)-epicatequina (65) en MeOD a 298 K, 600 MHz.

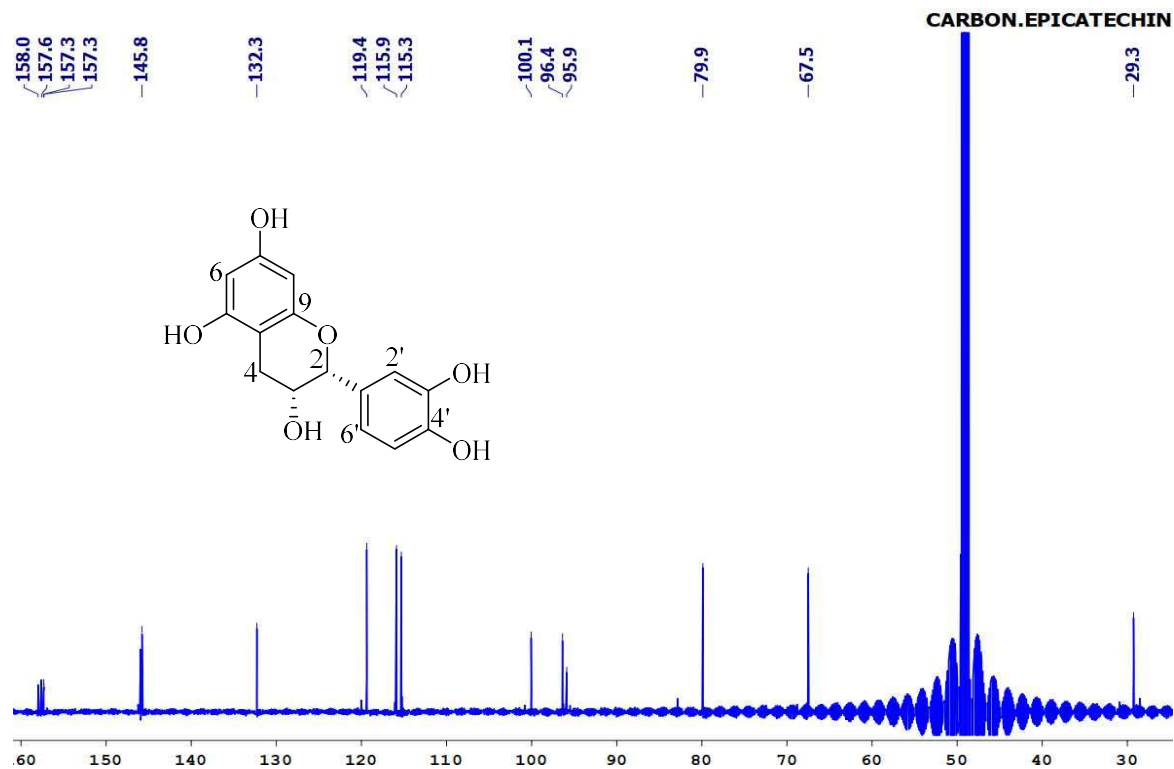


FIGURA 5.28 $^{13}\text{C-NMR}$ espectro de (-)-epicatequina (65) en MeOD a 298 K, 150 MHz.

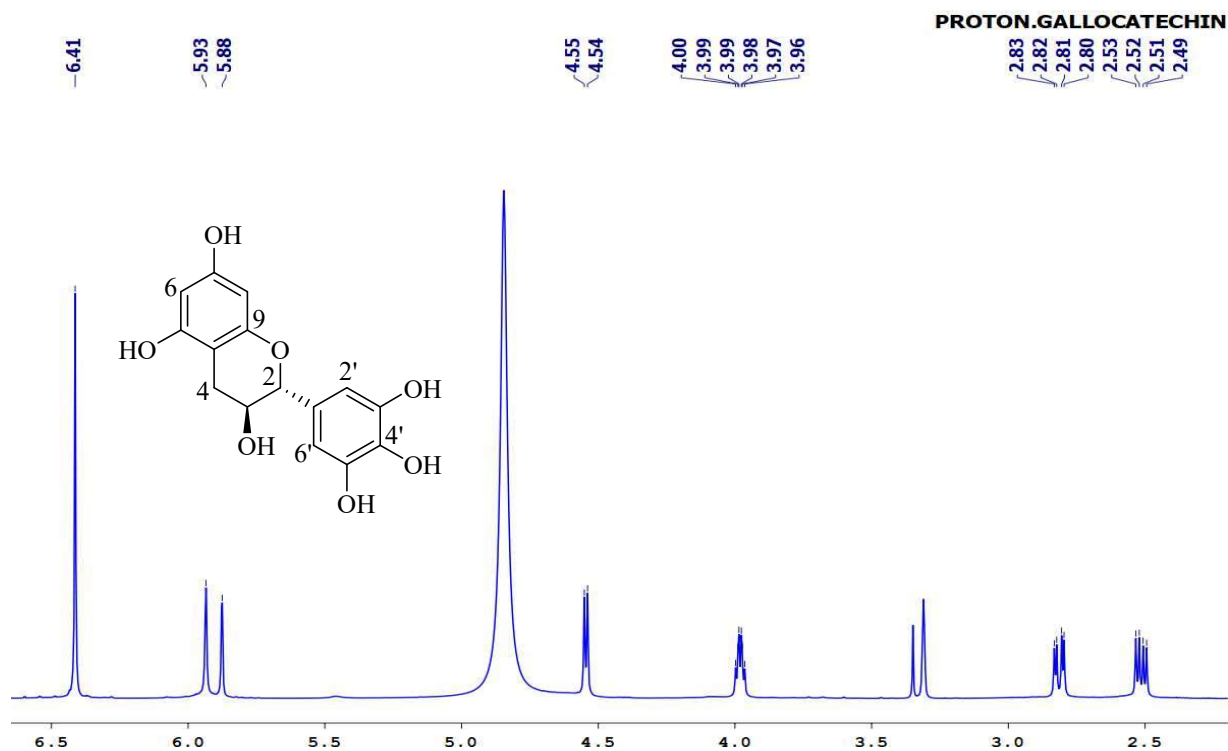


FIGURA 5.29 $^1\text{H-NMR}$ espectro de (+)-galocatequina (**66**) en MeOD a 298 K, 600 MHz.

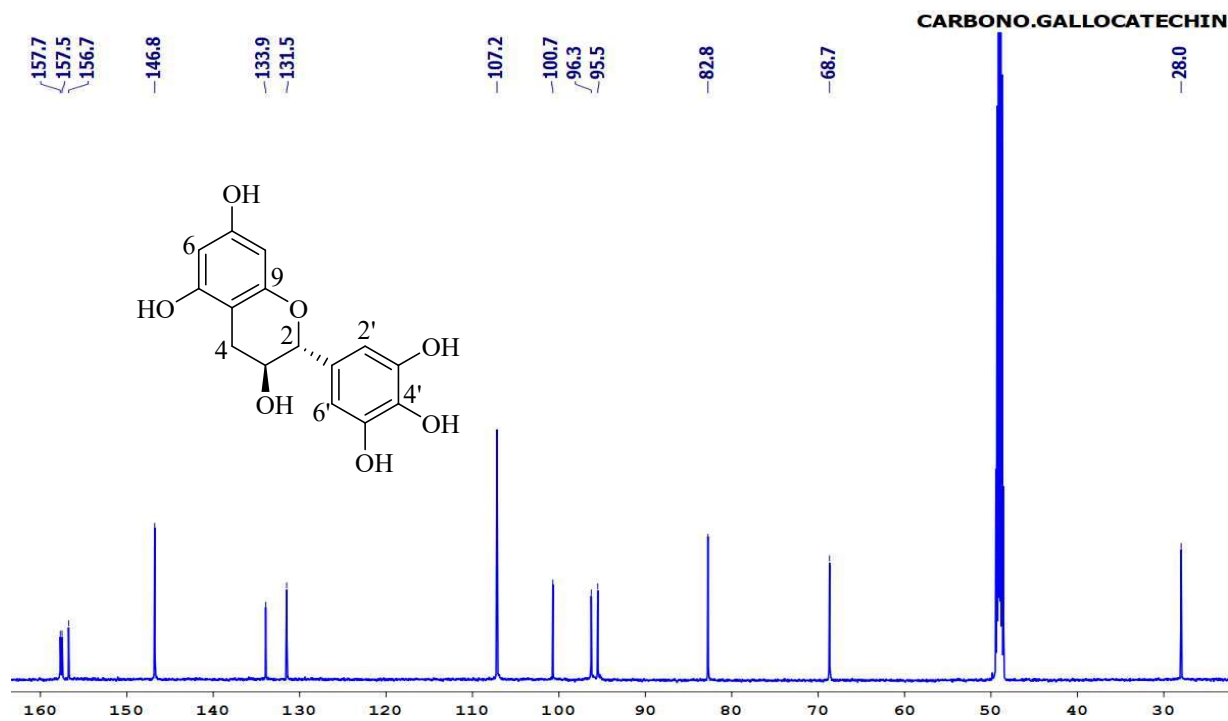


FIGURA 5.30 $^{13}\text{C-NMR}$ espectro de (+)-galocatequina (**66**) en MeOD a 298 K, 150 MHz.

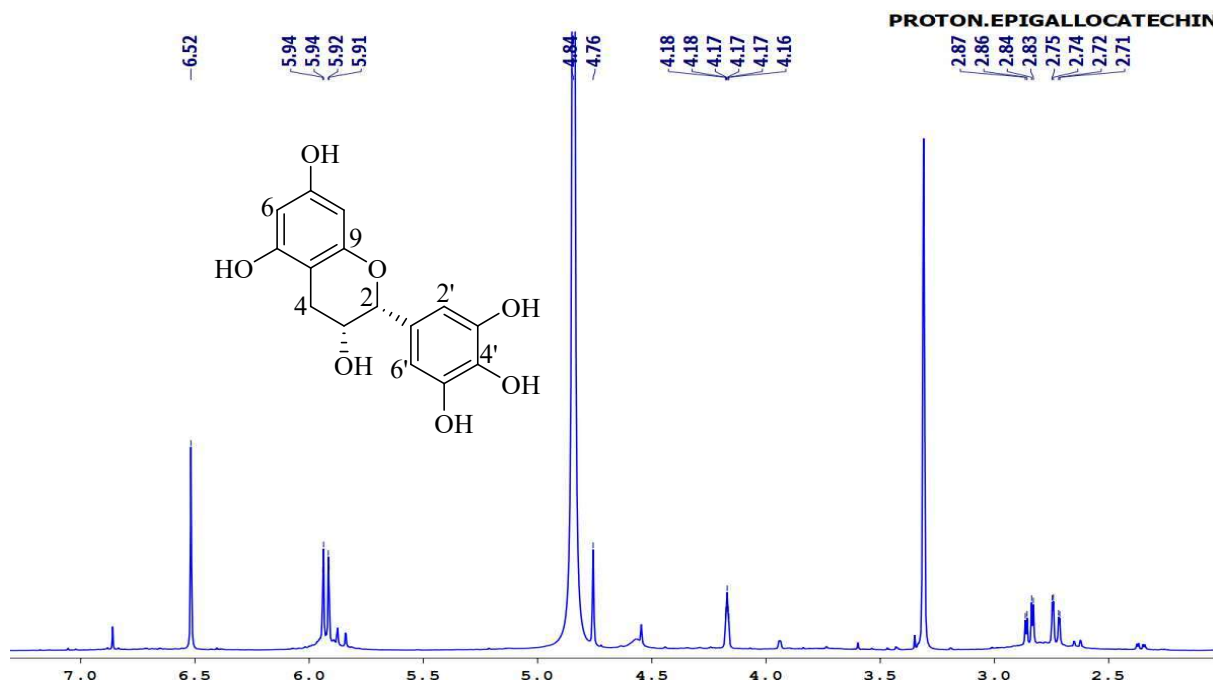


FIGURA 5.31 ^1H -NMR espectro de epigallocatequina (67) en MeOD a 298 K, 600 MHz.

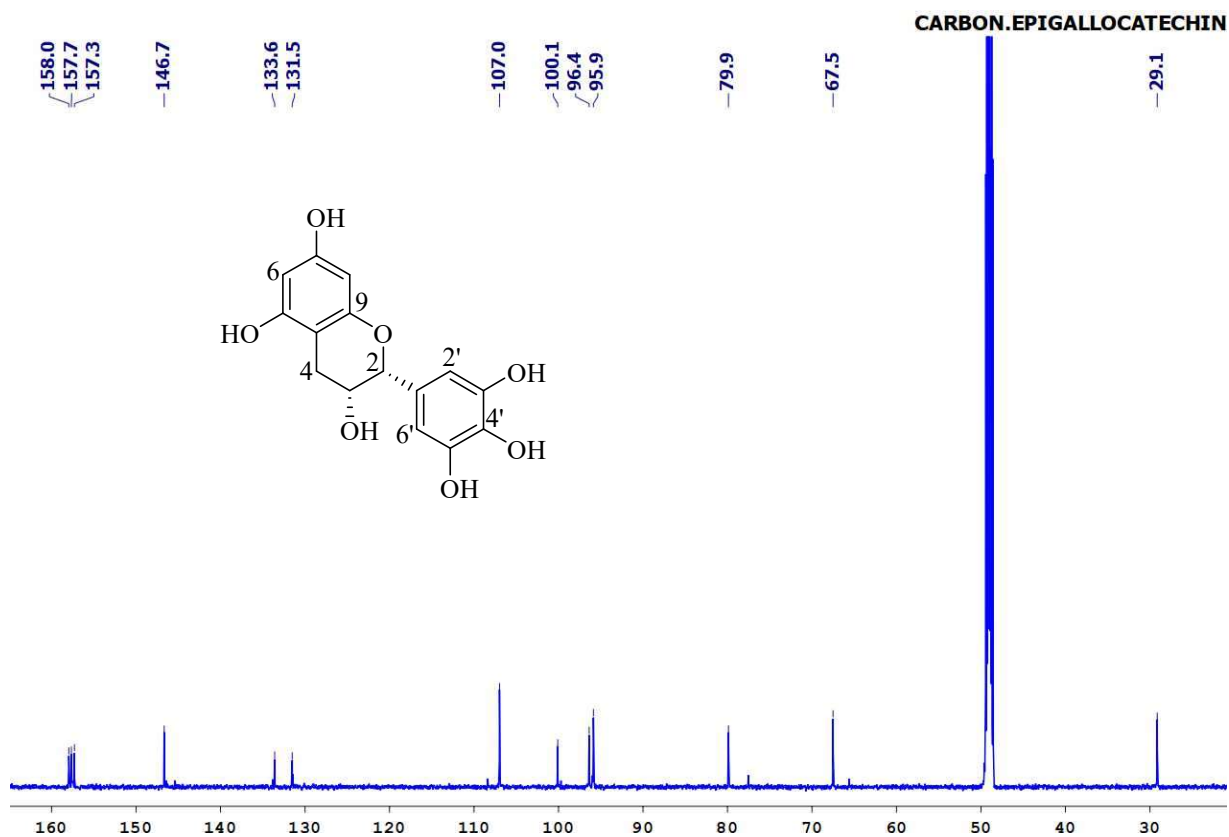


FIGURA 5.32 ^{13}C NMR espectro de epigallocatequina (67) en MeOD a 298 K, 150 MHz.

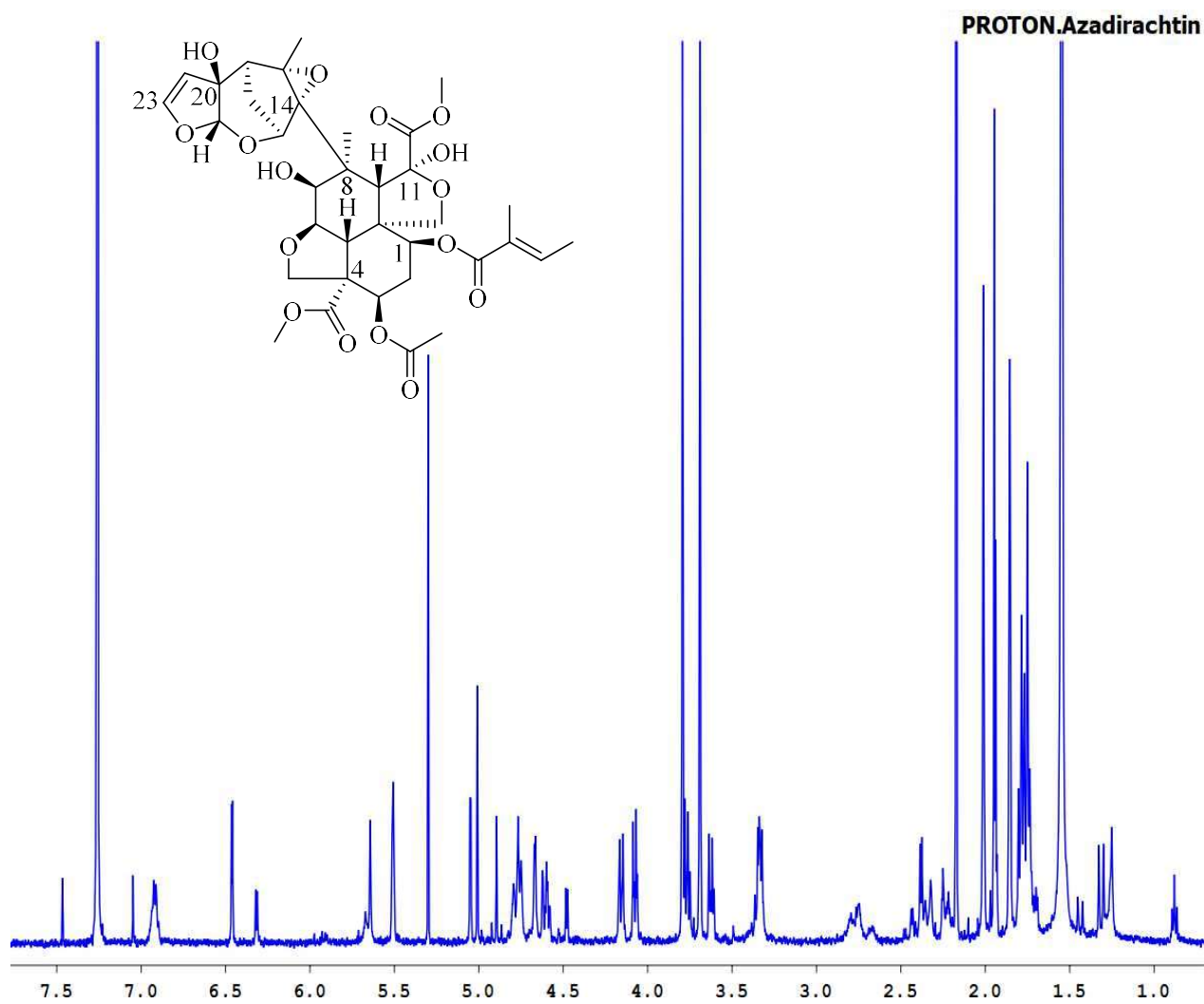


FIGURA 5.33 ¹H-NMR espectro de azadiractina A (68) en CDCl₃ a 298 K, 600 MHz.

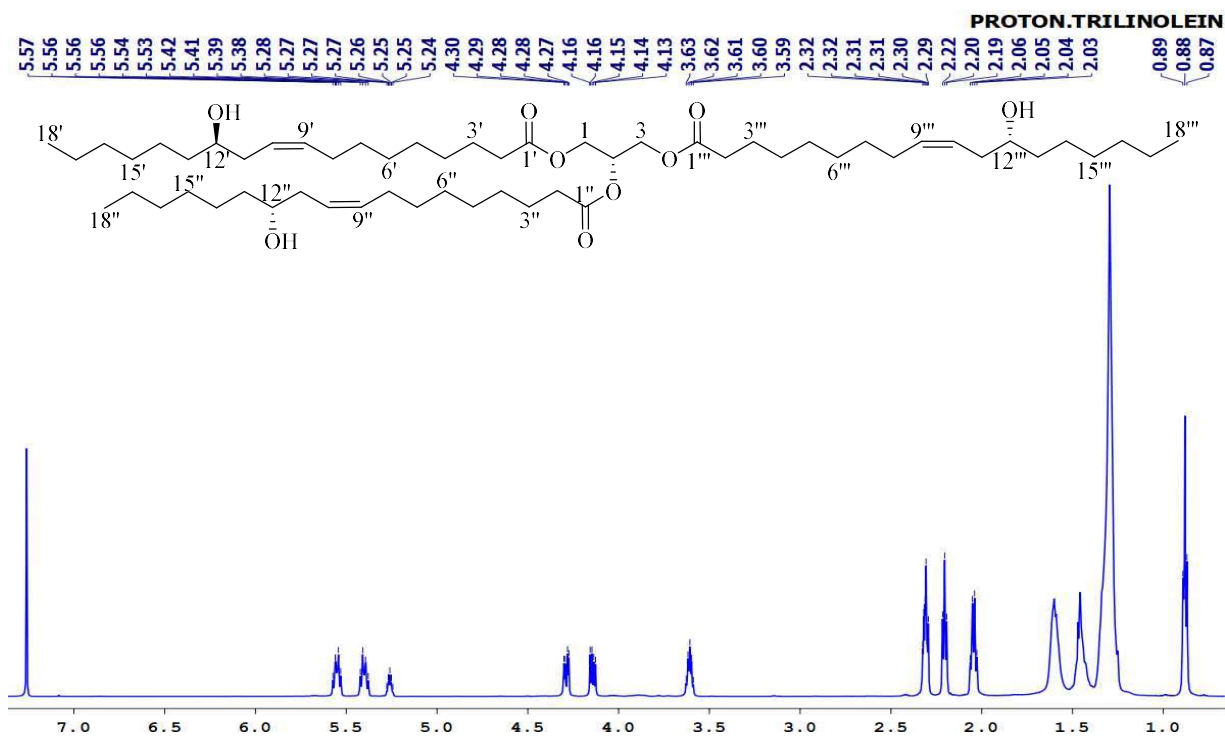


FIGURA 5.34 ^1H -NMR espectro de trilinoleina (69) en CDCl_3 a 298 K, 600 MHz.

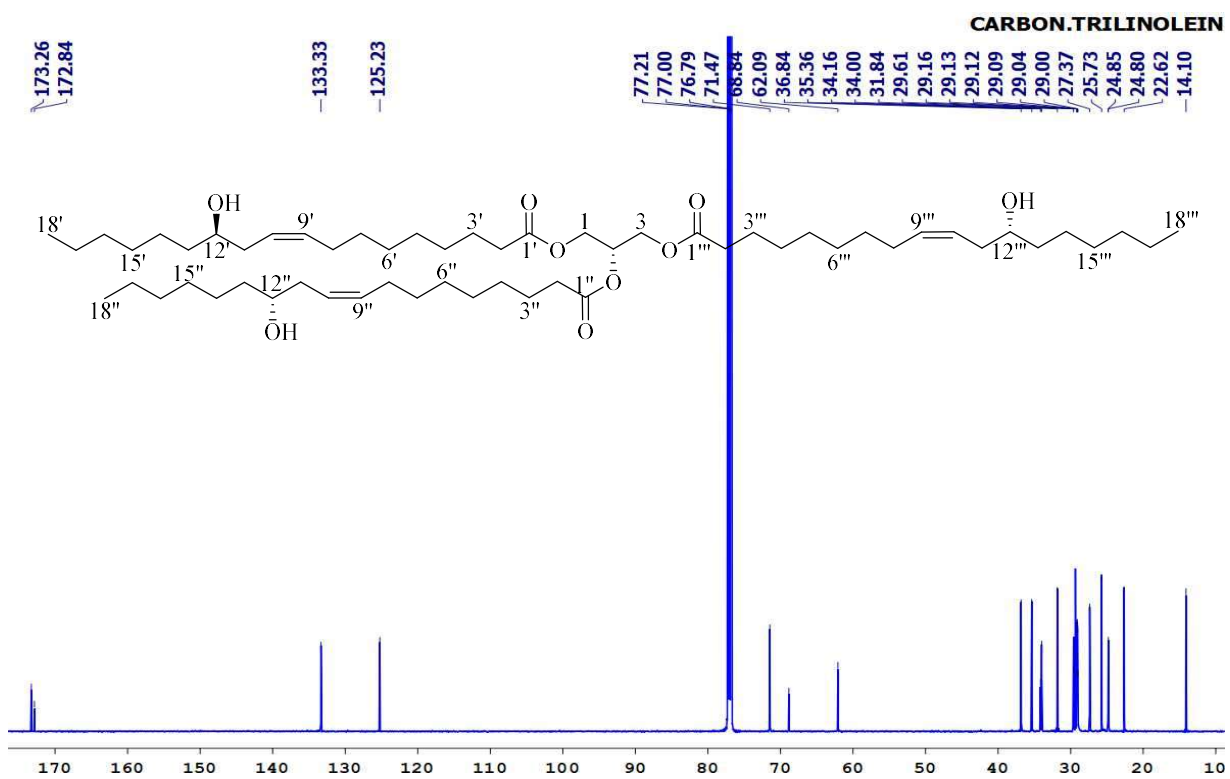


FIGURA 5.35 ^{13}C NMR espectro de trilinoleina (69) en CDCl_3 a 298 K, 150 MHz.

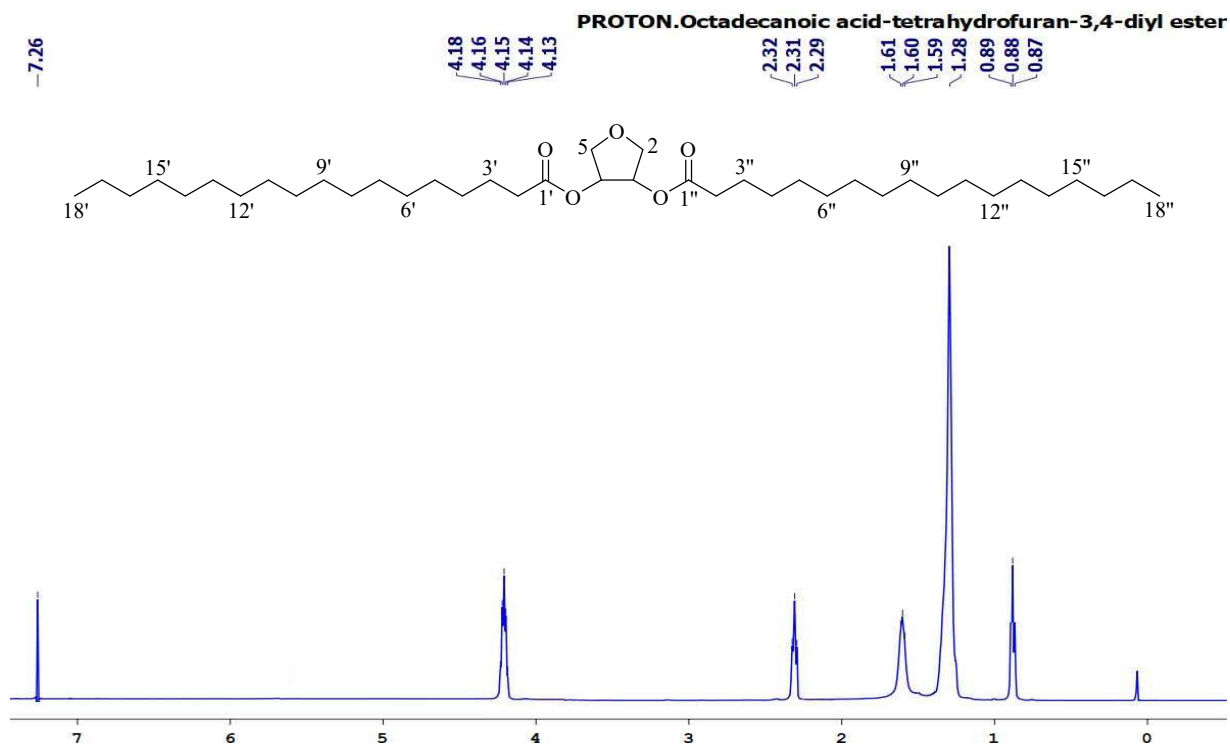


FIGURA 5.36 $^1\text{H-NMR}$ espectro de ácido-octadecanoico tetrahydrofuran-3, 4-diil ester (70) en CDCl_3 a 298 K, 600 MHz.

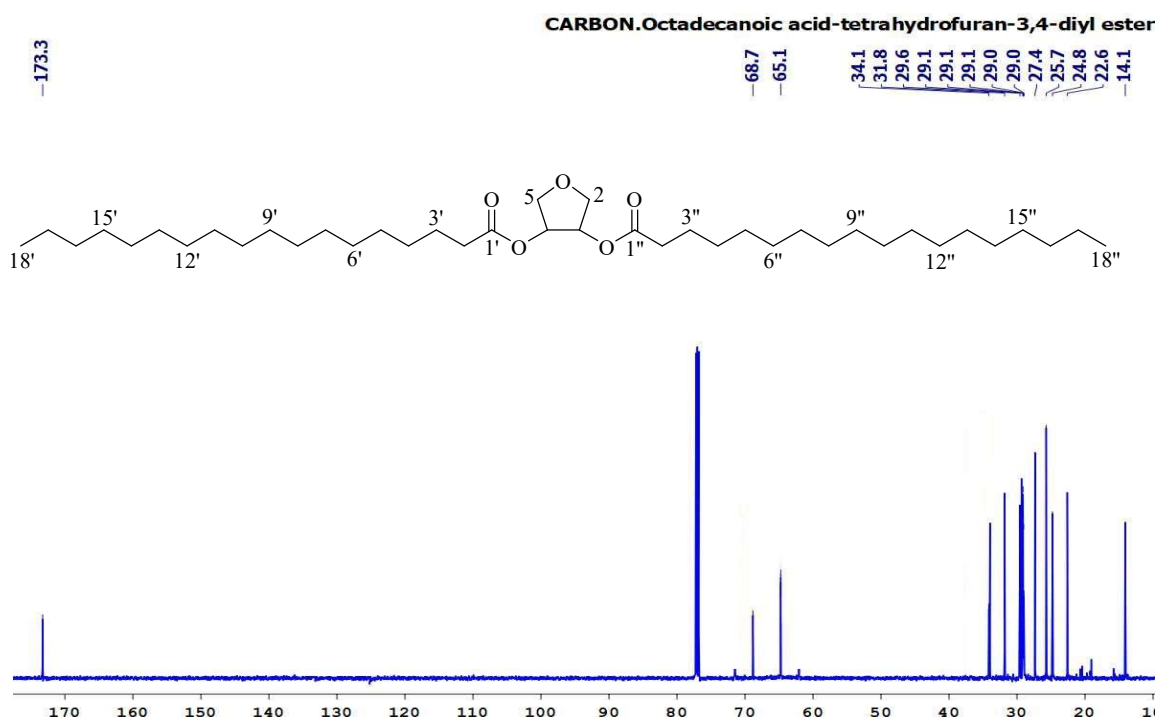


FIGURA 5.37 $^{13}\text{C NMR}$ espectro de ácido octadecanoico tetrahydrofuran-3, 4-diil ester (70) en CDCl_3 a 298 K, 150 MHz.

5.4. Actividad acaricida de los compuestos aislados de corteza de *Azadirachta indica*

La actividad in vitro-caricida de **63-70** se evaluó mediante el ensayo de inmersión en larvas de Shaw utilizando larvas de *Rhipicephalus microplus* (Shaw *et al.*, 1968). Como se muestra en la **Tabla 1**, azadiractina A (**68**) mostró el efecto acaricida más potente con un $LD_{50} = 1.9$ mM. Los nuevos compuestos naturales, 3-O-butil (-)-epicatequina (**63**) ($LD_{50} = 4.6$ mM) y 3-O-butil(-)-epigallocatequina (**64**) ($LD_{50} = 3.6$ mM), mostraron actividad en la gama de flavonas conocidas, (-)-epicatequina (**65**), (+)-gallocatequina (**66**) y (-)-epigallocatequina (**67**) y al ácido octadecanoico-tetrahidrofurano-3,4-diil éster (**70**). Por otro lado, la trilinoleína (**69**) solo indujo una mortalidad del 14% a la concentración máxima evaluada (15 mM) (**Tabla 5.4**).

Los flavonoides muestran una variedad de propiedades biológicas donde su actividad antioxidante es altamente significativa. Sin embargo, en los últimos años se ha descrito que este grupo de compuestos tiene importantes actividades acaricidas (Ravindran *et al.*, 2011; Juliet *et al.*, 2012; Adenubi *et al.*, 2018). Los nuevos flavonoides acaricidas, compuestos **63** y **64**, presentan un fragmento inusual en la naturaleza, como el grupo éter butílico. Estos éteres de cadena corta media no son comunes en los flavonoides, y en este caso, logran un aumento en las propiedades de liposolubilidad de los metabolitos, que parecen afectar sus bioactividades. En efecto, en el caso de 3-O-butil (-)-epigallocatequina (**64**) $LD_{50} = 3.6$, LogP 2.72 versus (-)-epigallocatequina (**67**) $LD_{50} = 5.5$, LogP 1.11, se correlacionó un incremento en la liposolubilidad con la potencia del compuesto. Asimismo, la mayor solubilidad en agua de la epigallocatequina (**67**) (LogP 1.11) con respecto a la epicatequina (**65**) (LogP 1.50) se correlacionó con una disminución de la actividad. Sin embargo, para el par 3-O-butil (-)-epicatequina (**63**) versus (-)-epicatequina, el incremento en la liposolubilidad parece tener un efecto negativo que varía de $LD_{50} = 3.9$, LogP 3.11 a $LD_{50} = 4.6$, LogP 1.50. Esta relación entre LogP y la actividad acaricida, en este caso, aparentemente sugiere que los compuestos con valores en torno a LogP 2-3, tienen mejores actividades. Se observó un comportamiento similar en la evaluación de las fracciones de Kupchan, ya que solo las fracciones de polaridad baja y media (n-hexano y diclorometano) mostraron una actividad acaricida significativa. Por otro lado, los compuestos con configuración R en C-3 parecen tener más actividad acaricida que aquellos con configuración 3S ((-) -epigallocatequina (**67**) en comparación con (+)-gallocatequina (**68**)).

TABLA 5.4 Actividad acaricida para los compuestos **63-70** contra larvas de *R. microplus*.

Compuesto	LD ₅₀ [mM]	LD ₉₀ [mM]
3- <i>O</i> -butil(-)-epicatequina (63)	4.6	8.7
3- <i>O</i> -butil(-)-epigallocatequina (64)	3.6	8.3
(-)-Epicatequina (65)	3.9	11.3
(+)-Galocatequina (66)	7.2	12.9
(-)-Epigallocatequina (67)	5.5	10.0
Azadiractina (68)	1.9	3.6
Trilinoleina (69)	> 15	> 15
Ácido Octadecanoico –tetrahidrofuran-3,4-diil ester (70)	5.4	12

5.5. Metabolitos aislados de la esponja *Ectyoplasia ferox*

Como se mencionó en la sección 4.4 y en la Tabla 4.1, las fracciones de *Ectyoplasia ferox* (EFM-1A, EFM-1B, EFM-1C y EFM-1D) obtenidas por el método de Kupchan, se les realizó una segunda extracción líquido-líquido con el mismo disolvente usado en el paso anterior, obteniendo así las fracciones EFM-1A1 (2.90 g), EFM-1A2 (1.90 g), EFM-1B1 (1.19 g), EFM-1B2 (0.97 g), EFM-1C1 (1.13 g) y EFM-1C2 (1.87 g) (Figura 5.38), no se obtuvo un fraccionamiento de EFM-1D (20.8 g), ya que en ésta no se separó nada con AcOEt. Es importante destacar que esta parte del trabajo lo realizó la Ingeniera en Industria Alimentaria Ana Karen Ramírez Hernández.

5.5.1 Obtención de β -sitosterol

La fracción EFM-1A1 fue sometida a una cromatografía de fase normal, utilizando silicagel en una columna de 4 cm de diámetro interno y una altura de 30 cm, como fase móvil se utilizó el sistema de elución de *n*-hexano:acetona:MeOH (85:15:5 gotas), la purificación fue monitoreado por CCF, agrupando los compuestos con el mismo perfil cromatográfico, se utilizó como fase móvil *n*-hexano:acetona:MeOH (85:15:5 gotas) y como revelador ácido fosfomolibdico al 10 %, para dar las siguientes fracciones: EFM-1A1A (15-30 ml; 417.9 mg), EFM-1A1B (31-45 ml; 14.4 mg), EFM-1A1C (46-62 ml; 374.3 mg), EFM-1A1D (63-74 ml; 76.3 mg), EFM-1A1E (75-96 ml; 96.1 mg), EFM-1A1F (97-108 ml; 24.9 mg), EFM-1A1G (109-125 ml; 40.4

mg), **EFM-1A1H** (126-137 ml; 27.0 mg), **EFM-1A1I** (138-156 ml; 33.2 mg), **EFM-1A1J** (157-183 ml; 227.9 mg).

La muestra **EFM-1A1C** que se monitoreo por CCF, se observó compuesto semi puros por lo que se fraccionó primeramente por columna abierta con sílicagel, utilizando como sistema de elución *n*-hexano:CH₂Cl₂:acetona:MeOH (70:20:10:5 gotas), la purificación fue monitoreado por CCF, agrupando los compuestos con el mismo perfil cromatográfico, se utilizó como fase móvil *n*-hexano:CH₂Cl₂:acetona:MeOH (70:20:10:5 gotas) y como revelador ácido fosfomolibdico al 10 %, obteniéndose 6 fracciones: **EFM-1A1C1** (1-20 ml; 136.3 mg), **EFM-1A1C2** (21-42 ml; 90.5 mg), **EFM-1A1C3** (43-72 ml; 2.1 mg), **EFM-1A1C4** (73-136 ml; 2.8 mg), **EFM-1A1C5** (137-250 ml; 2.8 mg), **EFM-1A1C6** (lavados con acetona y MeOH) (**Figura 5.38**). Se observó por CCF que los compuestos se encontraban en la fracción **EFM-1A1C2**, para su purificación se utilizó el sistema de elución *n*-hexano:acetona:CH₂Cl₂:MeOH (75:15:10:5 gotas) a un flujo de 1 ml/min y un minuto por tubo, la purificación fue monitoreado por CCF, agrupando los compuestos con el mismo perfil cromatográfico. Se obtuvieron 9 reuniones, **EFM-2A** (1-13 ml; 17.3 mg), **EFM-2B** (14-27 ml; 38.4 mg), **EFM-2C** (28-29 ml; 10.8 mg), **EFM-2D** (30-34 ml; 6.5 mg), **EFM-2E** (35-39 ml; 12 mg), **EFM-2F** (40-51 ml; 10.3 mg), **EFM-2G** (52-67 ml; 0.2 mg), **EFM-2H** (68-120 ml; 1.2 mg), se confirmó por RMN que la fracción **EFM-2B** contenía el compuesto **β-Sitosterol (71)** (**Figura 5.38**).

5.5.2 Obtención de Ectyoplasin

La fracción de acetato de etilo (**EFM-1C**), se le realizó una segunda extracción líquido-líquido con el mismo disolvente usado como se describe en el apartado 5.5, obteniendo dos fracciones **EFM-1C1** (1.13 g) y **EFM-1C2** (1.87 g), por CCF se observó que los compuestos se encontraban en la fracción **EFM-1C2**, por lo que ésta fracción se cromatografió mediante cromatografía de presión media, utilizando MeOH y con una columna LiCloprep-RP18 de Lobar/H₂O (6: 4) a 1 ml/min de flujo y luego por HPLC (columna Bond-BondapakTM C-18, H₂O/MeOH (7:3)) para proporcionar 3.4 mg de compuesto puro de **Ectyoplasin (72)** (**Figura 5.38**)

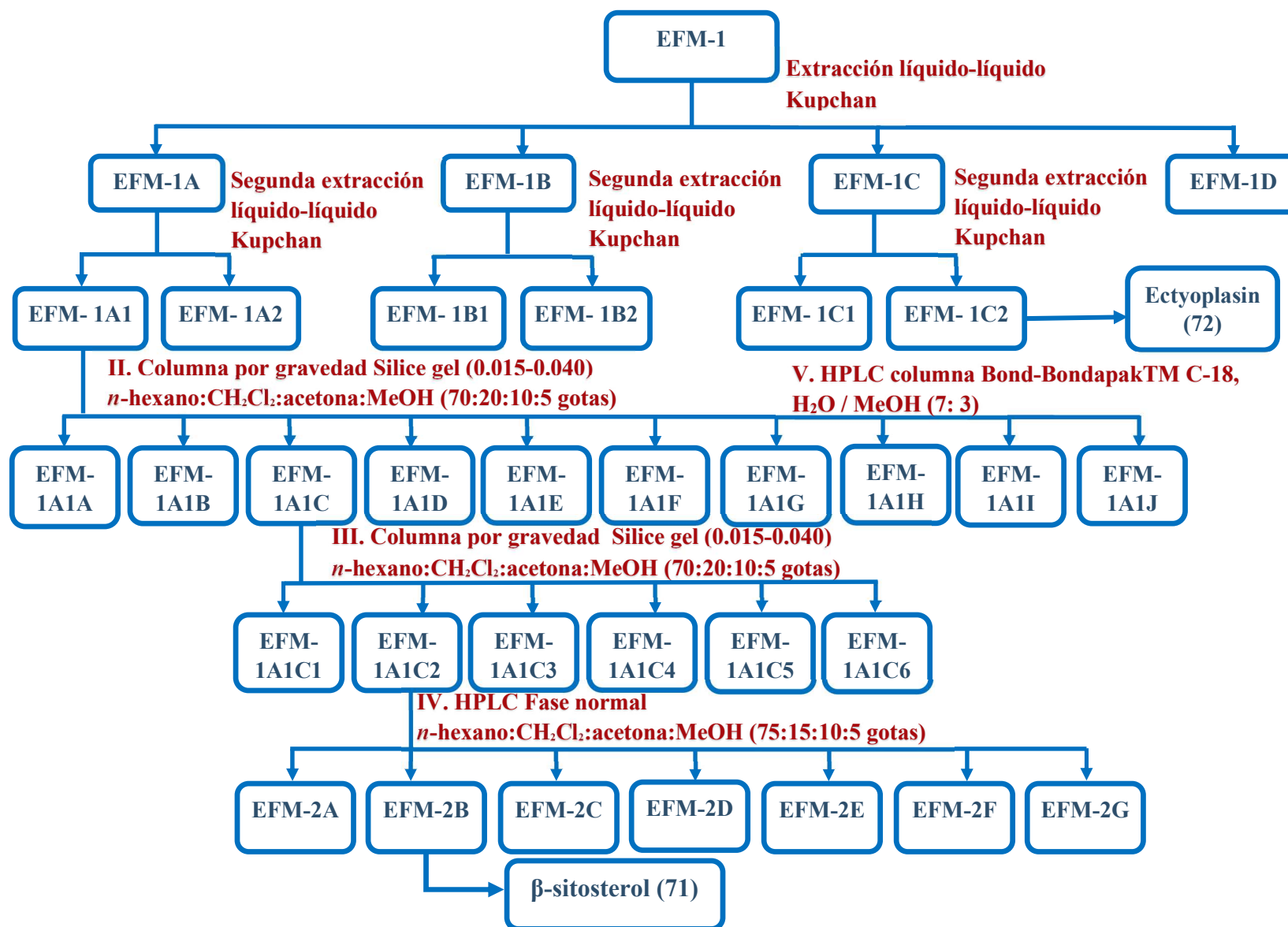


FIGURA 5.38 Diagrama de obtención del compuesto β -Sitosterol.

5.6 Estudio de elucidación estructural de los compuestos aislados de *Ectyoplasia ferox*

5.6.1. Estudio de elucidación estructural de β -Sitosterol (compuesto reportado)

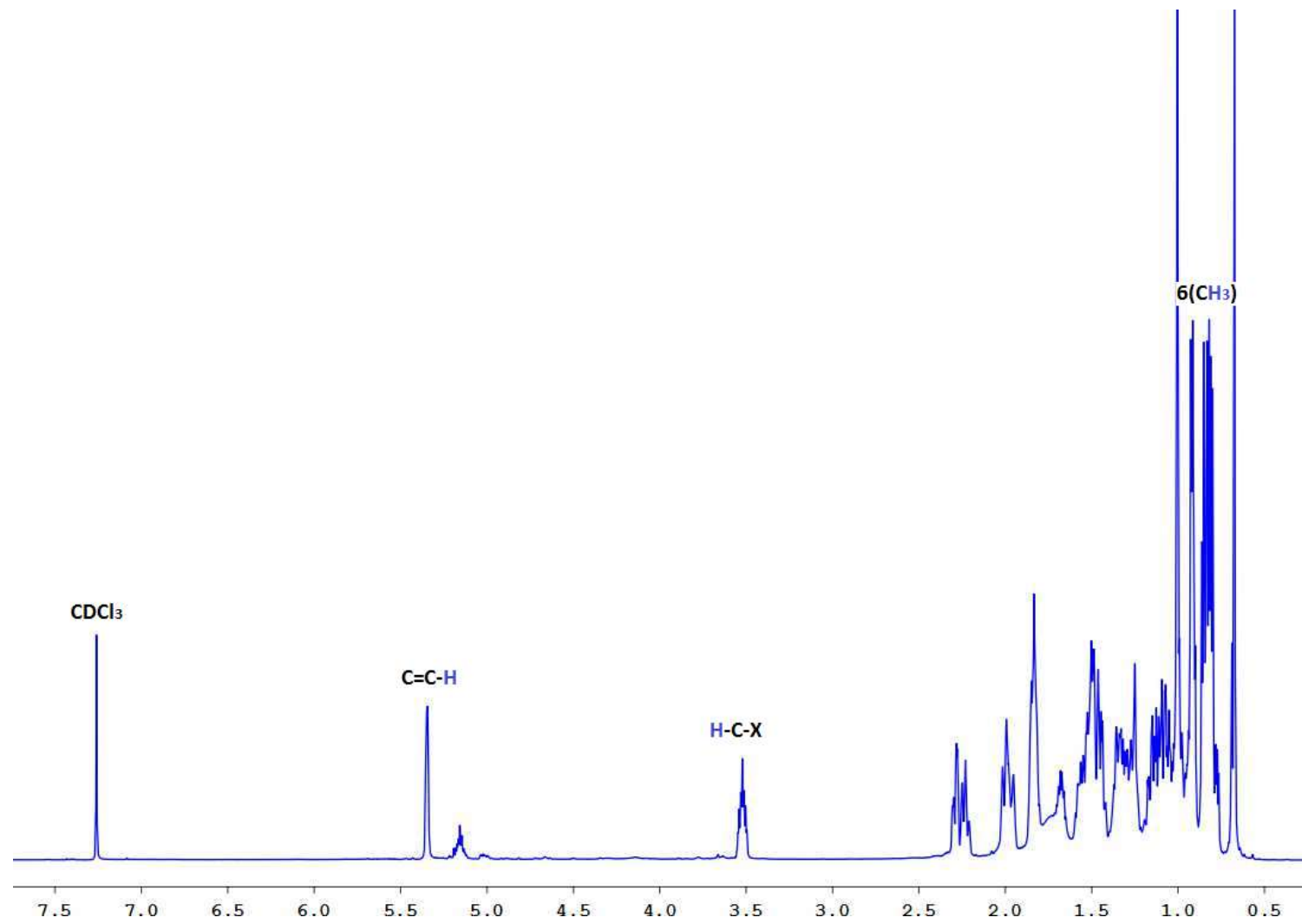
La elucidación estructural se inició con el análisis de RMN ^1H , en este experimento se observaron seis señales, cada una de las cuales integran para tres hidrógenos (protones), por lo que se asignaron a seis grupos metilos ($-\text{CH}_3$); localizándose a un desplazamientos químicos que va de 0.69 a 1.00 ppm. Por otro lado, a campos más bajos, se pudo observar dos señales a δ_{H} 3.52 y 5.35 ppm, características de un protón vecino a un heteroátomo electronegativo y de un protón sobre un carbono sp^2 . En lo referente a la zona entre 1.1 a 2.3 ppm, debido a que hay mucho solapamiento de señales no se pudo analizar. El siguiente experimento, que se analizó fue el espectro de ^{13}C , el cual nos indico la presencia de 29 átomos de carbonos (**Figura 5.39** y **5.40**).

El siguiente paso, fue establecer las correlaciones entre los átomos presentes en la molécula. Para ello, es necesario el uso de los experimentos bidimensionales, el primer experimento que se analizó fue el COSY, el cual, como se mencionó nos permite unir protones que se encuentran sobre carbonos que son vecinos, pero si el carbono vecino es cuaternario estas correlaciones se truncan. Así, se obtuvieron dos sistemas de espines de protones directamente correlacionados, **Fragmento I** ($\text{H}_2\text{-1—H}_2\text{-4}$) y **Fragmento II** ($\text{H-6—H}_3\text{-29}$) (**Figura 5.41**). A modo de ejemplo, se indicará como se estableció el **Fragmento I**, se inició convenientemente de las señales del metileno $\text{H}_2\text{-4}$ a δ_{H} 2.24/2.29, el cual se correlaciona con el protón del metino H-3 a δ_{H} 3.52, y este secuencialmente con los protones del metileno $\text{H}_2\text{-2}$ a δ_{H} 1.50/1.83, finalmente estos protones se correlacionan con los protones $\text{H}_2\text{-1}$ a δ_{H} 1.07/1.85. De una forma similar se estableció el **Fragmento II**, pero este tuvo la gran dificultad de que hubo mucho solapamiento, y muchas correlaciones son difíciles de presentar en una imagen.

Una vez establecido todos los protones presentes en la molécula, se procedió a unirlos a sus respectivos carbonos, esto se realizó con ayuda del experimento HSQC (**Figura 5.42**) así se pudo establecer los desplazamientos químicos de protón y carbono de los dos fragmentos parciales (**Tabla 5.5**).

TABLA 5.5 Datos de RMN para β -sitosterol en MeOD.

n° C	β -sitosterol (MeOD)	
	δ_C , mult.	δ_H , mult. (<i>J</i> in Hz)
1	37.2, CH ₂	1.07, 1.85
2	31.6, CH ₂	1.50 1.83
3	71.8, CH	3.52, dd
4	42.2, CH ₂	2.24, 2.29
5	140.8, C	
6	121.8, CH	5.35 s
7	31.8, CH ₂	1.52, d (2.2) 1.95
8	31.8, CH	1.45
9	50.1, CH	0.93
10	36.5, C	
11	21.9, CH ₂	1.15, s 1.47
12	39.7, CH ₂	1.15 2.01
13	42.2, C	
14	56.7, CH	0.99
15	28.1, CH ₂	1.26, s 1.85
16	24.2, CH ₂	1.07, t (6.7) 1.56
17	55.9, CH	1.10,
18	11.8, CH ₃	0.69
19	19.3, CH ₃	1.00
20	36.1, CH	1.36
21	18.8, CH ₃	0.92
22	33.8, CH ₂	0.97, 1.35
23	26.3, CH ₂	1.03, 1.30
24	45.9, CH	0.92
25	23.0, CH ₂	1.13, 1.31
26	12.3, CH ₃	0.85
27	28.8, CH	1.68
28	18.9, CH ₃	0.81
29	19.6, CH ₃	0.82

FIGURA 5.39 Espectro de RMN ^1H de β -sitosterol (71).

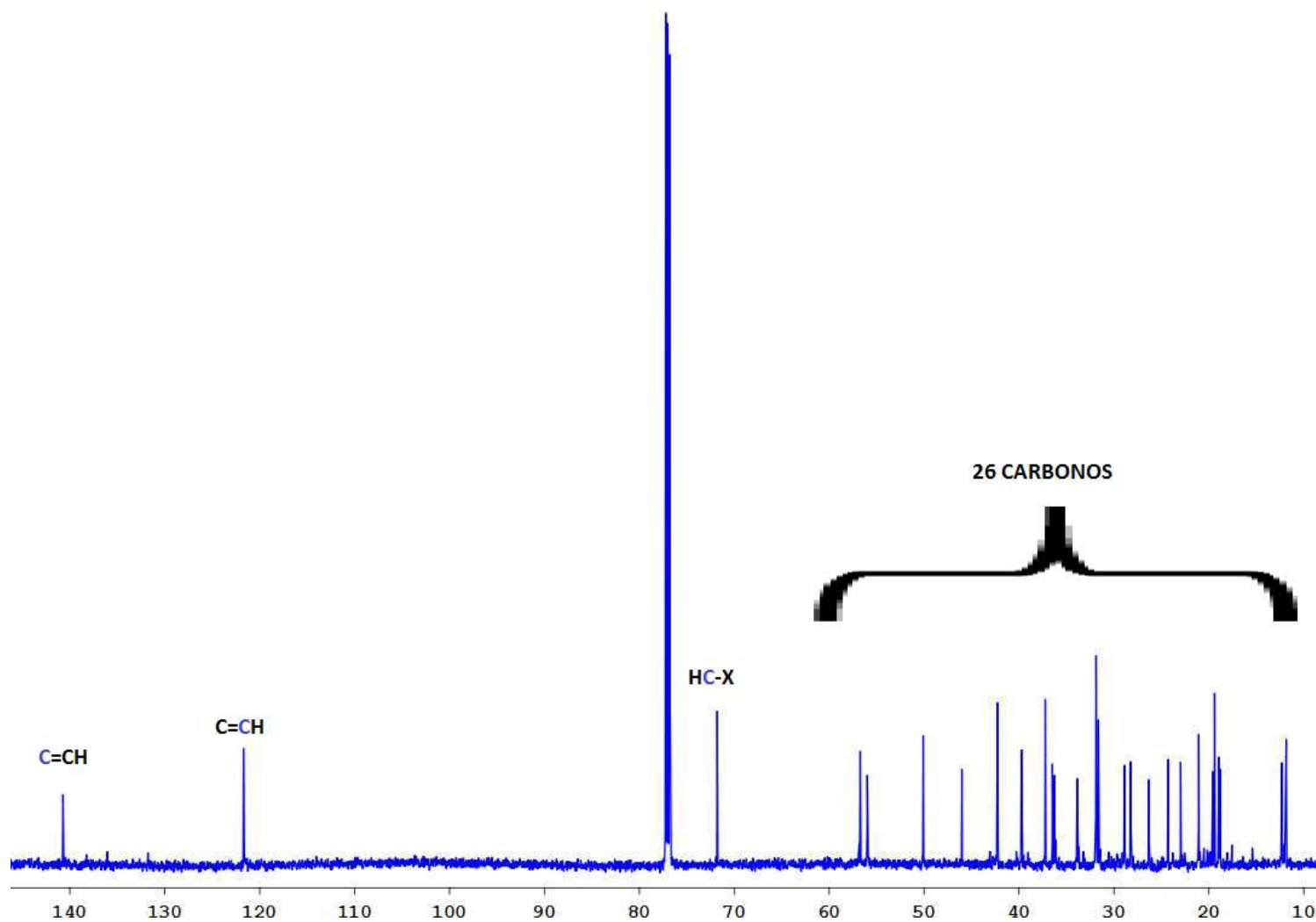


FIGURA 5.40 Espectro de RMN ^{13}C de β -sitosterol (71).

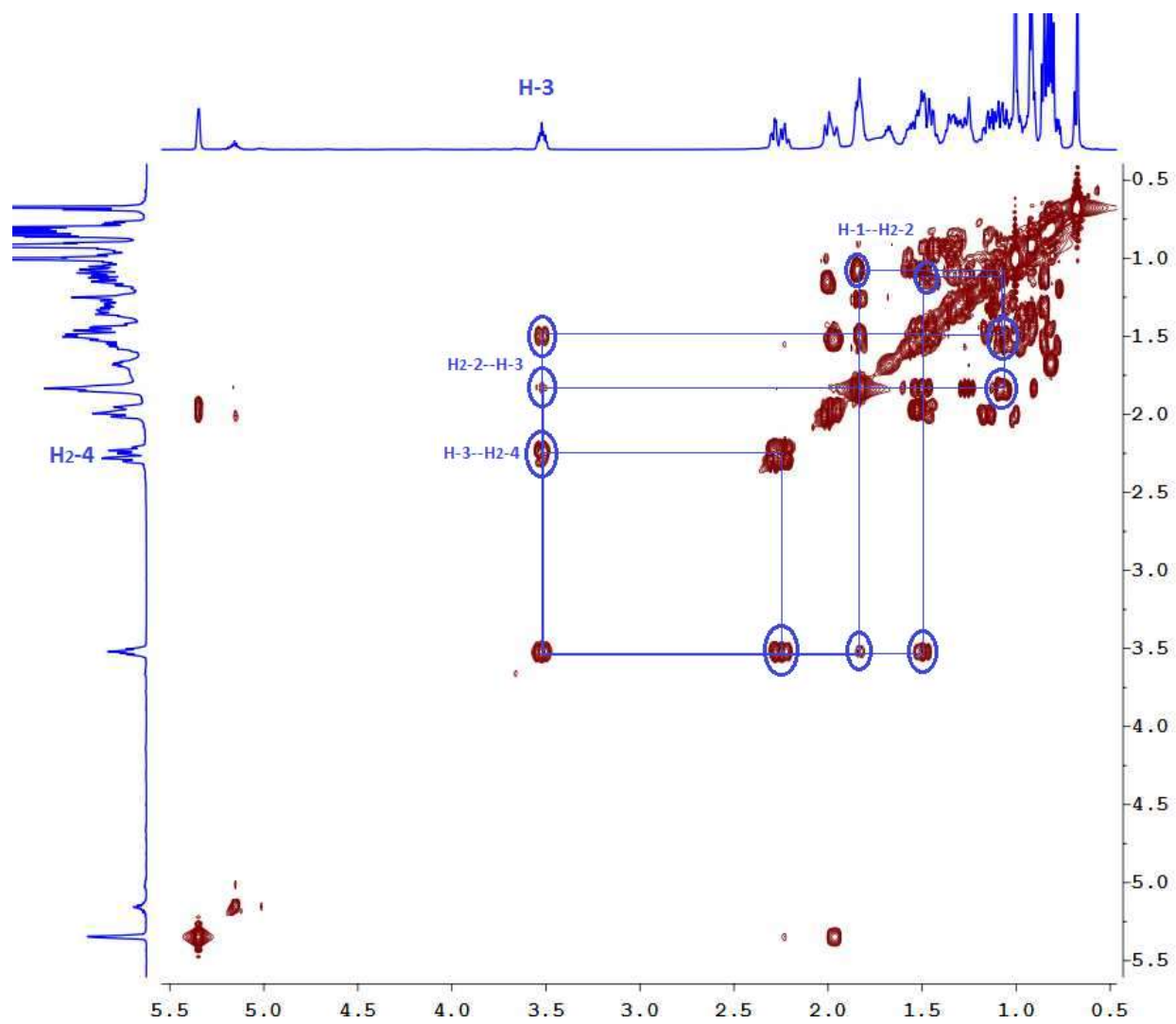


FIGURA 5.41 Espectro COSY de β -sitosterol (71).

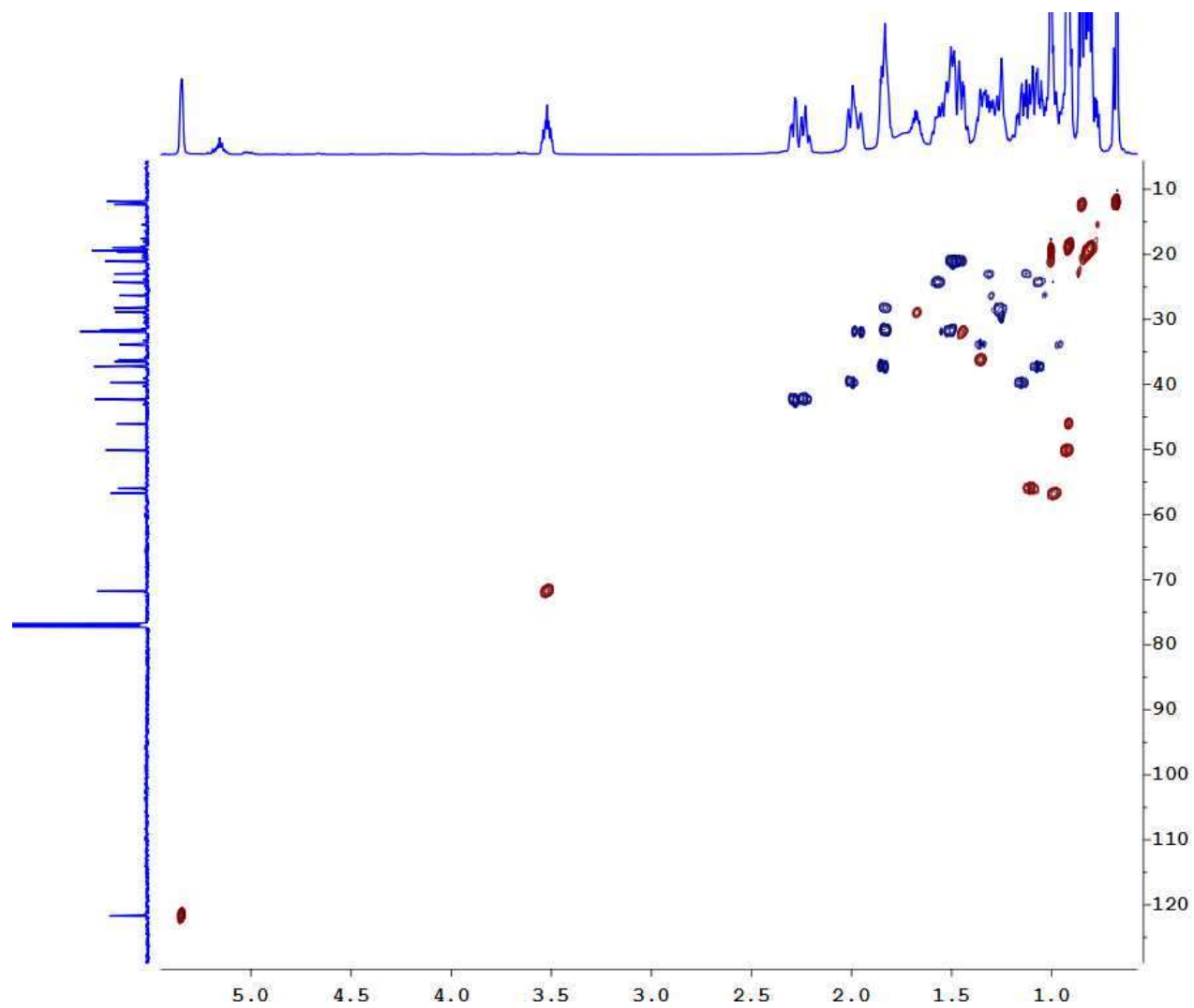


FIGURA 5.42 Espectro HSQC de β -sitosterol (71).

Para unir estos fragmentos, a través de los carbonos cuaternarios, se utilizó el experimento HMBC, el cual permite correlacionar H—C, las correlaciones observadas de los protones del metilo H₃-19 a δ_H 1.00 con los carbonos C-1 (δ_C 37.2), C-5 (δ_C 140.8), C-9 (δ_C 50.1) y C-10 (δ_C 36.5); junto con las observadas para el protón del metino H-6 a δ_H 5.35 con los carbonos C-4 (δ_C 42.2) y C-10, permitió establecer los anillos A y B de nuestro compuesto. Finalmente, las correlaciones HMBC de los protones del metilo H₃-18 a δ_H 0.69 con los carbonos C-12 (δ_C 39.7), C-13 (δ_C 42.2), C-14 (δ_C 56.7) y C-17 (δ_C 55.7), permitió establecer el sistema ciclopentanoperhidrofenantreno, al mismo tiempo que estableció la estructura del compuesto, tal y como se muestra en la **Figura 5.43**.

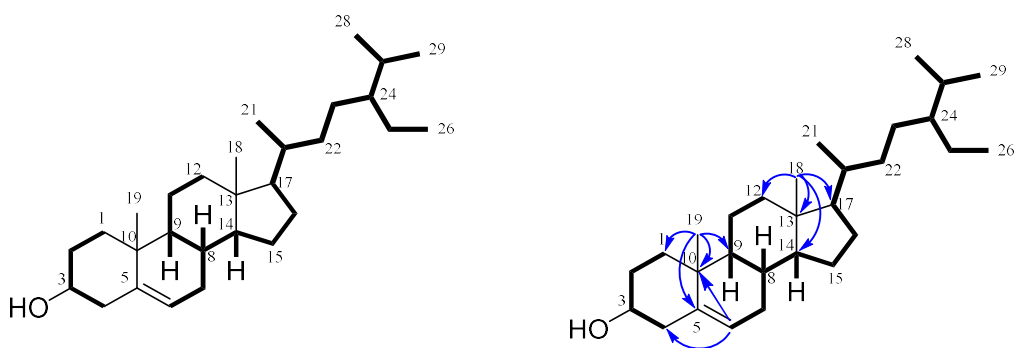


FIGURA 5.43 Estructura plana del compuesto β -sitosterol (**71**). En negritas se representa los fragmentos establecidos por el experimento COSY y con las flechas en azul se muestran las conectividades HMBC.

Se compararon los desplazamientos de ^{13}C con la literatura los resultados obtenidos fueron muy similares a los obtenidos para nuestro compuesto tal y como se observa en la **Figura 5.44**.

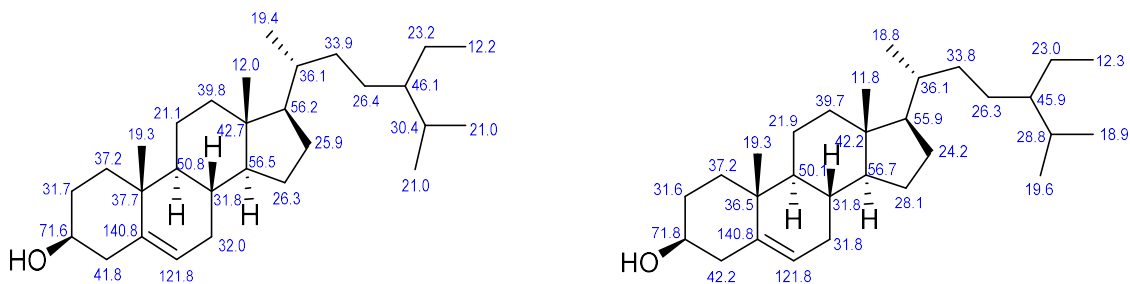


FIGURA 5.44 A la izquierda se muestran los desplazamientos químicos de ^{13}C asignados por la literatura. A la derecha se muestran los desplazamientos químicos experimentales de ^{13}C asignados por RMN.

Finalmente, una búsqueda bibliográfica, nos indicó que este compuesto, ya había sido aislado, por A. Gauvin *et al.*, de la esponja marina *Petrosia spheroida*, en 1988 y lo denominó β -Sitosterol (**71**).³⁰ La comparación de los desplazamientos químicos de nuestro compuesto con los reportados para el β -Sitosterol (**71**), nos indicó que se trata del mismo compuesto.

5.6.1. Estudio de elucidación estructural de Ectyolasin (compuesto nuevo)

La estructura de Ectyoplasin (**72**) (**Figura 5.45**) se estableció mediante métodos espectrométricos de RMN.

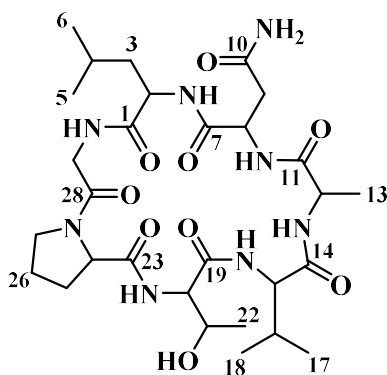


FIGURA 5.45 Estructura de Ectyoplasin (**72**).

Se aisló el compuesto **72** como un sólido blanco amorfo, y su fórmula molecular, $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{N}_8\text{O}_9$, se dedujo por MS de HR-ESI (pico de ión molecular $[\text{M} + \text{Na}]^+$ m/z 675.3442, calc. 675.3442) (**Figura 5.50**). Los datos de ^1H RMN (**Figura 5.46**) registrados para ectioplasin (**72**) en MeOH-

*d*₄ permitieron establecer la presencia de seis grupos metilo, seis metilenos y nueve metino, así como ocho grupos carbonilo. La naturaleza peptídica de **72** fue evidente por el alto contenido de N, junto con la absorción de grupos carbonilo de amida a 1650 y 1180 cm⁻¹ en el espectro IR.

Los espectros de COSY, HSQC y HMBC (**Figuras 5.47 a 5.410**), nos permitieron la asignación completa de señales de RMN de residuos de aminoácidos, leucina, asparagina, alanina, valina, treonina, prolina y glicina de la siguiente manera. La correlación escalar entre los protones H-2 (δ_{H} 4.73, m) y H₂-3 (δ_{H} 1.38 / 1.54), que se acopló con H-4 (δ_{H} 1.54), y esto secuencialmente a H₃-5 (δ_{H} 0.90, d, $J = 6.3$) y H₃-6 (δ_{H} 0.90, d, $J = 6.1$); junto con la correlación HMBC de los protones H-2 y H₂-3 con la amida carbonil C-1 (δ_{C} 173.4), nos permitió establecer de forma inequívoca la presencia de **leucina** en **72**. El acoplamiento entre los protones H-8 (δ_{H} 4.56, m) y H₂-9 (δ_{H} 3.23 / 3.29) en combinación con HMBC, permitieron la correlación de estos mismos protones con los carbonilos de amida C-7 (δ_{C} 172.2) y C-10 (δ_{C} 174.9) y fue indicativa de la presencia de un residuo de **asparagina** en **72**. Se asignó un sistema AX₃ entre H₃-13 (δ_{H} 1.43, d, $J = 7.4$) y H-12 (δ_{H} 4.12, q, $J = 7.4$) al residuo de **alanina** y apoyos por las correlaciones HMBC entre H₃-13 y C-11 (δ_{C} 174.9).

El siguiente sistema de espín se inició convenientemente a partir de los grupos metilo geminales H₃-17 (δ_{H} 0.91, d, $J = 6.7$ Hz) y H₃-18 (δ_{H} 0.95, d, $J = 6.3$ Hz), que se acoplaron con H-16 (δ_{H} 2.16), y esto secuencialmente a H-15 (δ_{H} 4.16). Las correlaciones HMBC del protón H-15 y H-16 con el carbonilo C-14 (δ_{C} 173.1), permitieron establecer la presencia de un residuo de **valina** en **72**. El siguiente residuo de aminoácido, **treonina**, se comenzó a partir del grupo metilo. H₃-22 (δ_{H} 1.20, d, $J = 6.4$), que se acopló con H-21 (δ_{H} 4.82, dq, $J = 6.4, 10.7$), y esto secuencialmente a H-20 (δ_{H} 4.65, d, $J = 10.7$). Este fragmento se unió a su amida carbonil, a través de las correlaciones HMBC de los protones H-20 y H-21 con C-19 (δ_{C} 170.2). La correlación HMBC observada entre H₂-25 y la amida carbonil C-23 (δ_{C} 174.2) y entre H₂-27 y C-24 (δ_{C} 62.6) permitió establecer que el sistema de giro spin ¹H-¹H, H-24 (δ_{H} 4.27, m) —H₂-25 (δ_{H} 1.96/2.24) —H₂-26 (δ_{H} 1.97/2.14)—H₂-27 (δ_{H} 3.71/4.23), pertenece al residuo de **prolina**. Finalmente, el acoplamiento de espín ¹H-¹H entre los protones geminales H₂-29 (δ_{H} 3.47/4.29, d, $J = 17.1$) en combinación con la correlación HMBC de estos mismos protones con

la amida carbonil C-28 (δ_c 170.6), permitió establecer la presencia de un residuo de **glicina** en **72**.

La secuencia peptídica de ectyoplasin (**72**) se estableció sobre la base de la conectividad entre el grupo carbonilo de los residuos i con la amida y/o protones α del residuo $i + 1$ obtenido del experimento HMBC en MeOH- d_3 , (H-8 y C-1, H-12 y C-7, H-15 y C-11, H-20 y C-14, H-24 y C-19, H2-29 y C-23 y H-2 y C- 28).

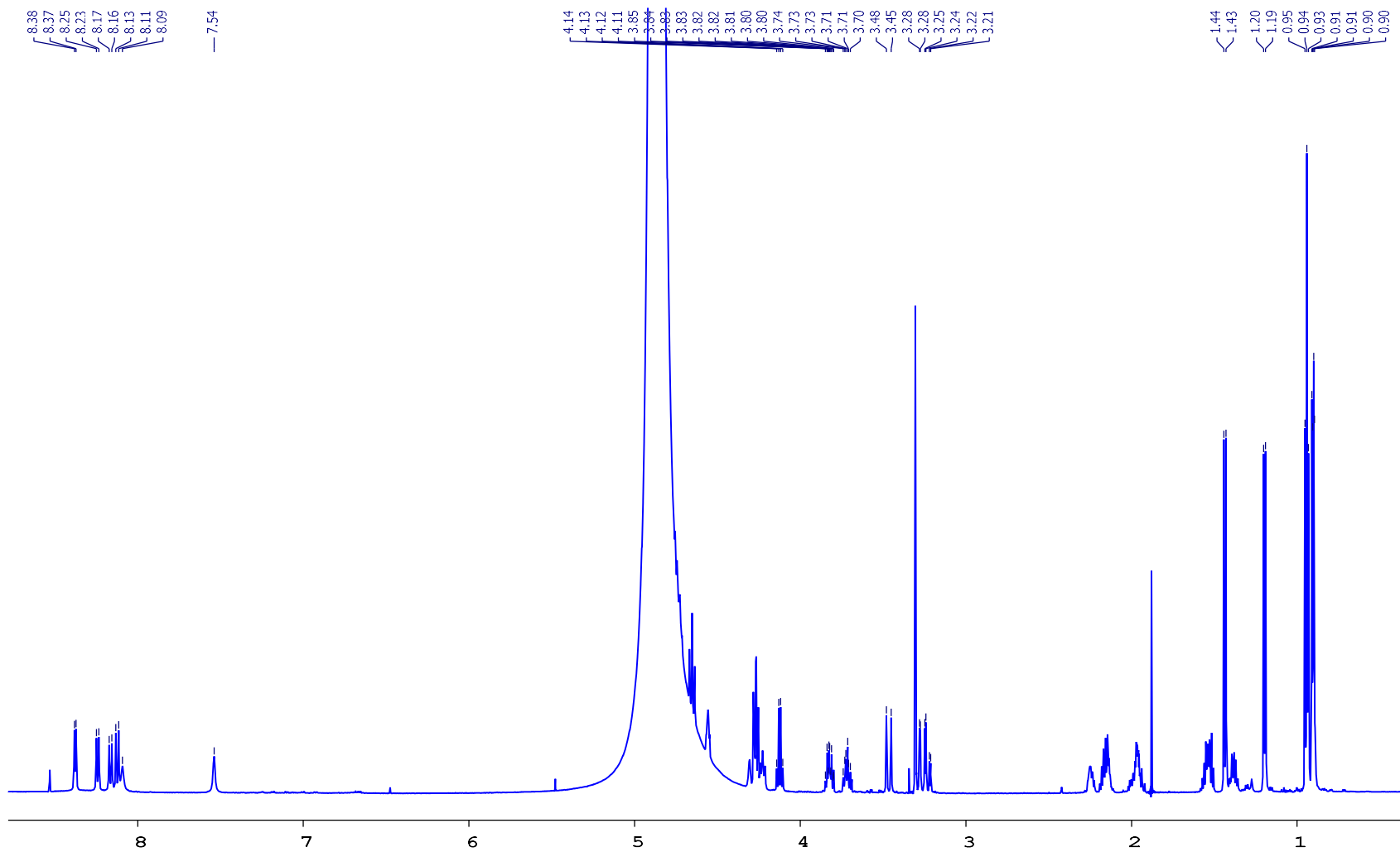


FIGURA 5.46 Espectro de RMN ^1H de Ectyoplasin (72).

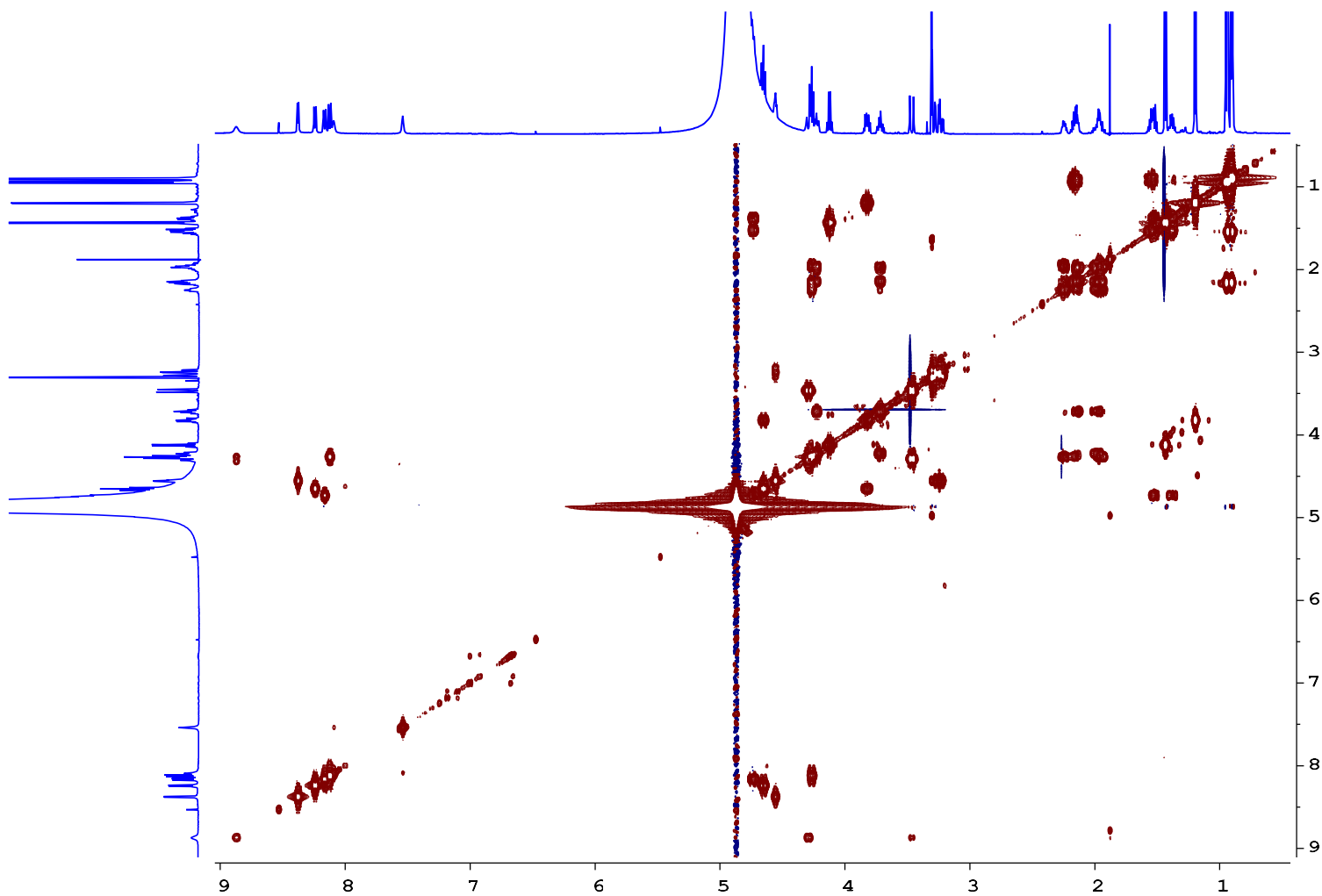


FIGURA 5.47 Espectro de COSY de Ectyoplasin (72).

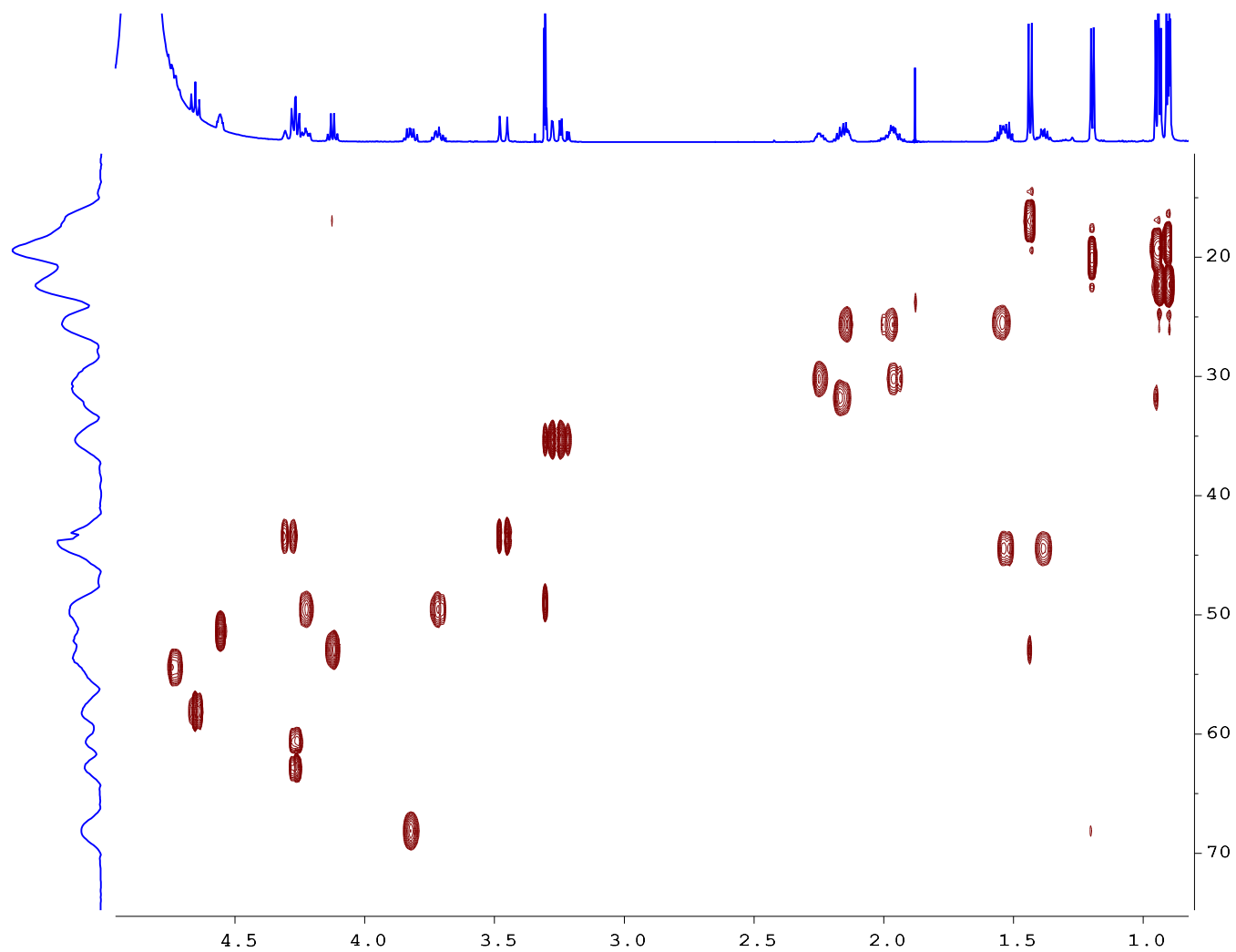


FIGURA 5.48 Espectro de HSQC de Ectyoplasin (72).

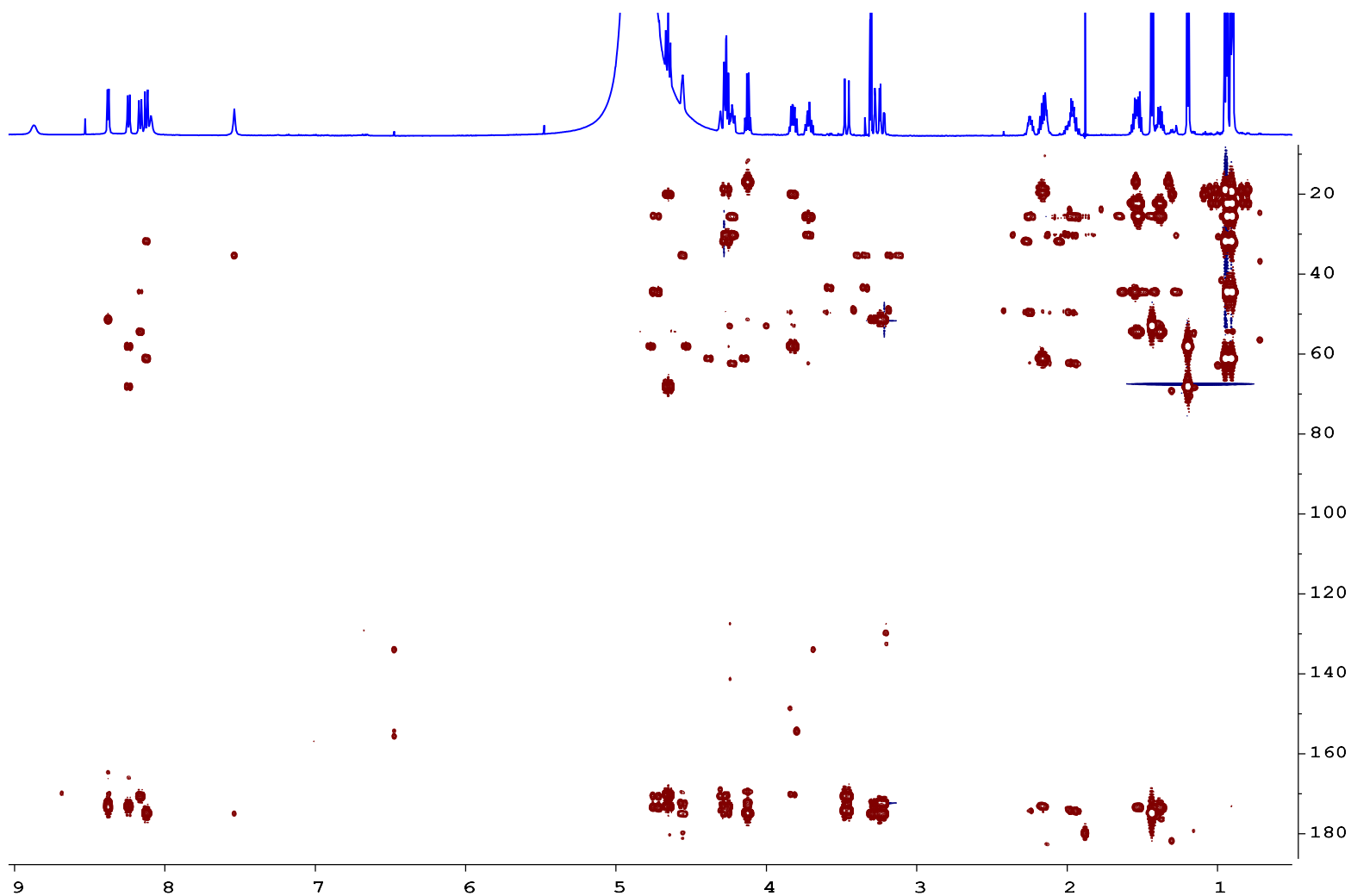


FIGURA 5.49 Espectro de HMBC de Ectyoplasin (72).

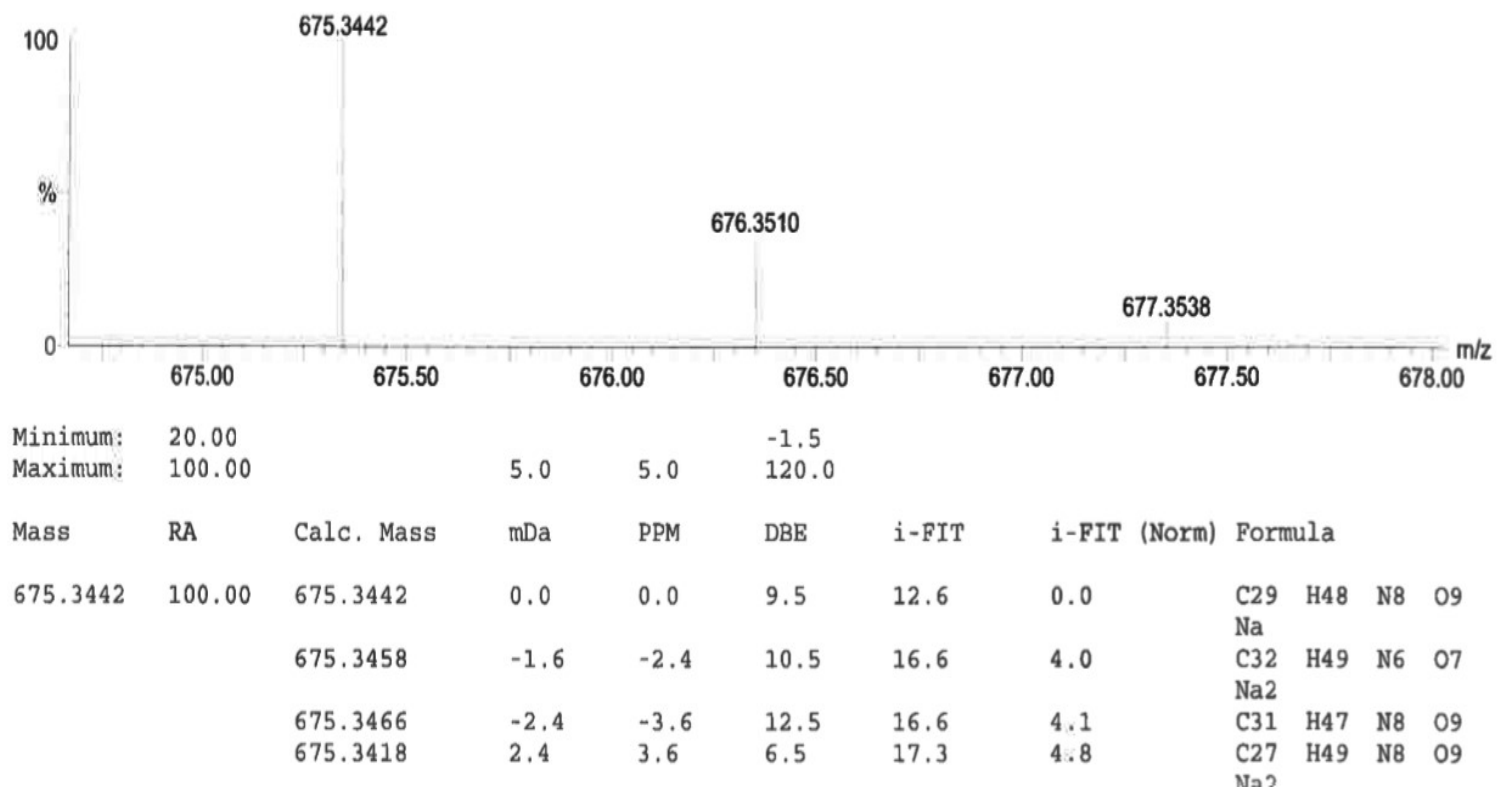


FIGURA 5.50 Espectro de HRMS de Ectyoplasin (72).

5.7. Metabolitos aislados de la esponja *Amphimedon compressa*

Como se mencionó en la sección 4.4 y en la **Tabla 4.1**, las fracciones de *Amphimedon compressa* **ACM-1A** (*n*-hexano), **ACM-1B** (CH₂Cl₂), **ACM-1C** (AcOEt) y **ACM-1D** (MeOH:H₂O), se les realizó una segunda extracción líquido-líquido para eliminar restos de compuestos polares (**Figura 4.8**), obteniendo así de fracciones **ACM-1A1** (2.76 g), **ACM-1A2** (1.3 g), **ACM-1B1** (0.71 g), **ACM-1B2** (0.59 g), **ACM-1C1** (0.16 g), **ACM-1C2** (0.91 g), **ACM-1D1** (1.45 g) y **ACM-1D2** (0.56 g). Es importante destacar que esta parte del trabajo lo realizó la Ingeniera en Industria Alimentaria Ana Karen Ramírez Hernández.

5.7.1 Metabolitos aislados de la esponja *Amphimedon compressa*

La muestra **ACM-1A1** se fraccionó por medio de cromatografía de fase normal con silica gel (70-200 mallas) y como sistema de elución *n*-hexano:acetona (9:1→7:3), la purificación fue monitoreado por CCF, agrupando los compuestos con el mismo perfil cromatográfico, se utilizó como fase móvil *n*-hexano:acetona (75:25) y como revelador ácido fosfomolibdico al 10 %, obteniendo 13 fracciones: **ACM-1A1A** (12-24 ml; 345.5 mg), **ACM-1A1B** (25-41 ml; 814.5 mg), **ACM-1A1C** (42-55 ml; 118.2 mg), **ACM-1A1D** (56-68 ml; 24.1 mg), **ACM-1A1E** (69-75 ml; 27.6 mg), **ACM-1A1F** (76-84 ml; 76.4 mg), **ACM-1A1G** (86-92 ml; 58.9 mg), **ACM-1A1H** (93-102 ml; 42.8 mg), **ACM-1A1I** (103-113 ml; 39.4 mg), **ACM-1A1J** (114-127 ml 48.3 mg), **ACM-1A1K** (128-144 ml; 383.2 mg), **ACM-1A1L** (145-158 ml; 129.0 mg), **ACM-1A1M** (159-166 ml 94.4 mg).

5.8. Estudio de elucidación estructural de los compuestos aislados de *Amphimedon compressa*

En el caso de la esponja *Amphimedon compressa*, sólo se realizaron fraccionamientos preliminares y no se obtuvieron compuestos puros, debido a que la cantidad de materia prima recolectada fue poca, por lo que la cantidad no era la suficiente para seguir purificando y por lo tanto no hubo compuestos puros para elucidar, como se muestra en la **Figura 5.51**.

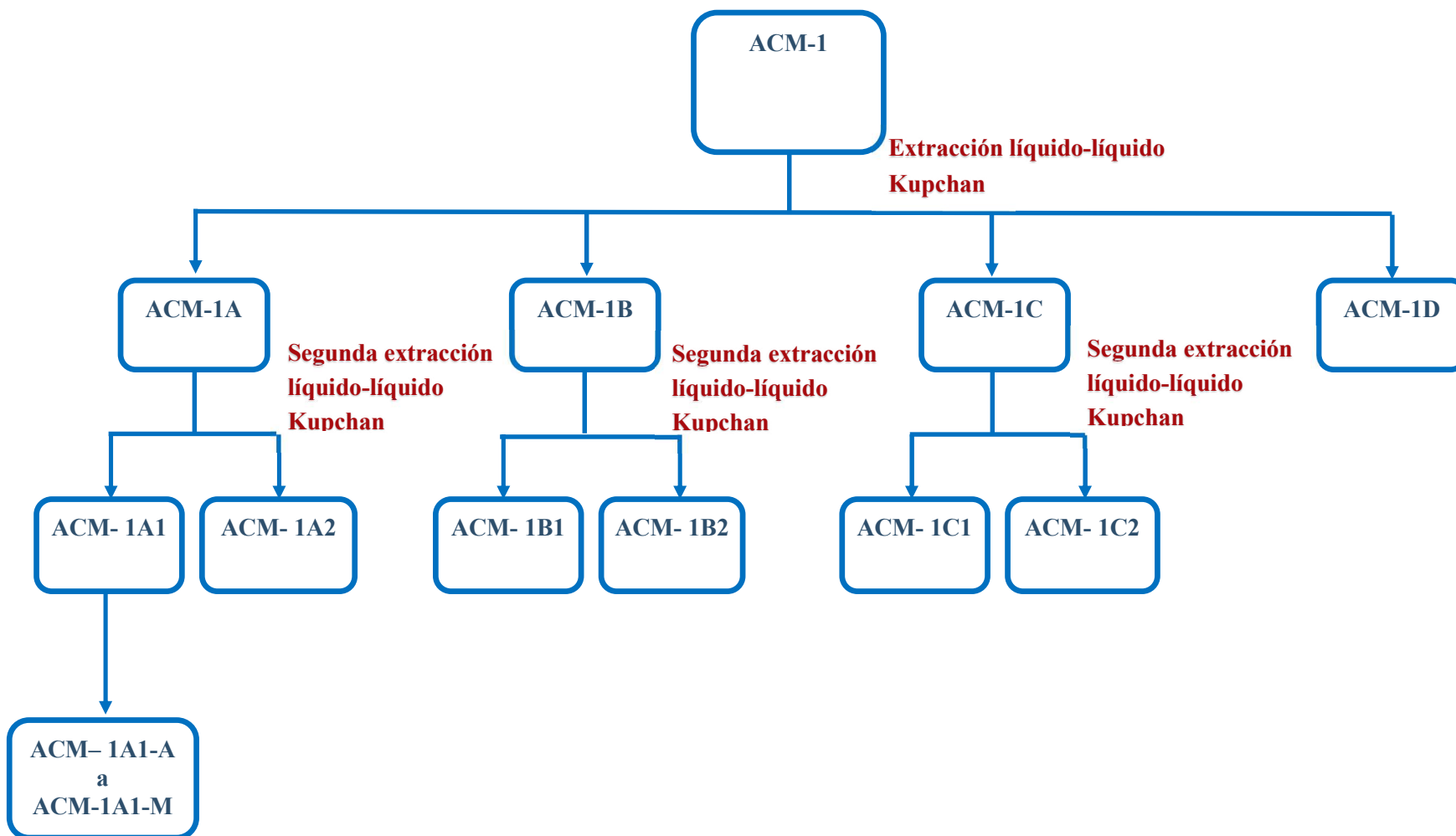


FIGURA 5.51 Marcha cromatográfica de la fracción hexánica ACM-1A de la esponja *A. compressa*.

Los estudios cromatográficos previos de las semillas y corteza de *Azadirachta indica* y de las esponjas *Ectyoplasia ferox* y *Amphymedum compressa* han puesto de manifiesto que estos organismos producen una gran cantidad de metabolitos. Estos compuestos además de poseer una gran diversidad estructural han demostrado tener interesantes actividades farmacológicas. Como se ha descrito en el apartado de antecedentes, son pocos los estudios que se encuentran en la literatura sobre la corteza de *A. indica*,

En el presente trabajo observamos la obtención de tres nuevos compuestos que no han sido reportados y otros siete compuestos ya reportados en la literatura, en el caso de *Azadirachta indica* se aislaron dos nuevos compuestos: 3-O-butil(-)-epicatequina (63) y 3-O-butil(-)-epigalocatequina (64) y seis ya reportados en la literatura: (-)-epicatequina (65), (+)-galocatequina (66), (-)-epigalocatequina (67) azadiractina A (68), trilinoleina (69) y ácido octadecanoico-tetrahidrofuran-3,4-diil éster (70), sus estructuras se muestran en la **Figura 5.52**. En el caso de *Ectyoplasia ferox* se encontró un compuesto ya reportado en la literatura conocido como β -sitosterol (71), y se aisló un nuevo heptapéptido cíclico, denominado ectyoplasin (72), cuyas estructuras se muestran en la **Figura 5.52**.

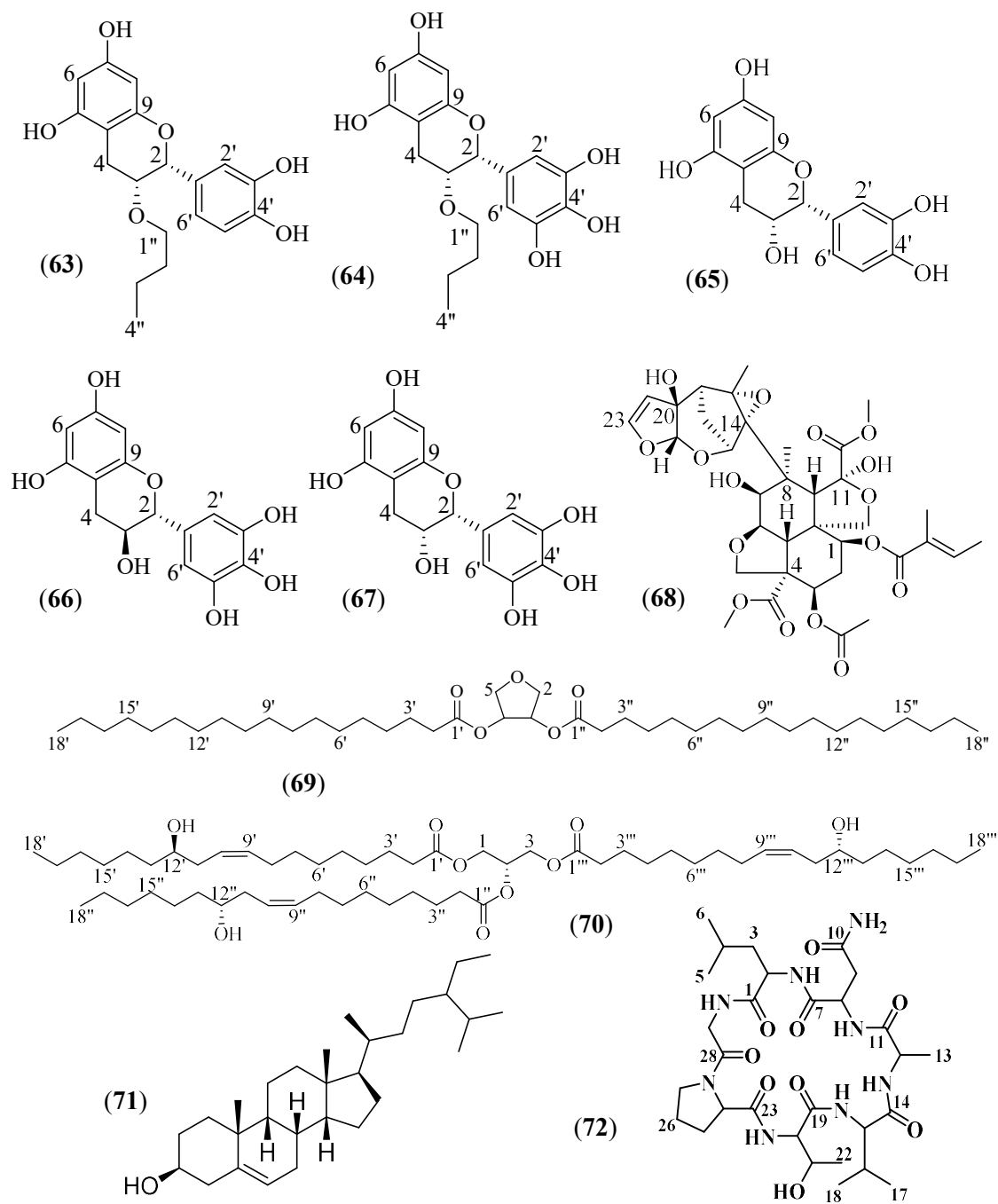


FIGURA 5.52 Compuestos aislados de *A. indica*: 3-O-butil (-)-epicatequina (63) y 3-O-butil(-)-epigallocatequina (64), (-)-epicatequina (65), (+)-galocatequina (66), (-)-epigallocatequina (67), azadiractina A (68), trilinoleína (69) y ácido octadecanoico-tetrahidrofuran-3,4-diil éster (70).
Compuestos aislados de *Ectyoplasia ferox*: β -sitosterol (71) y ectyplasin (72)

6. CONCLUSIONES

En el presente estudio, se identificaron dos nuevos compuestos naturales de la fracción de acetato de etilo, denominados 3-O-butil (-)-epicatequina (**63**) y 3-O-butil(-)-epigallocatequina (**64**) relacionados estructuralmente con las flavonas conocidas (-)-epicatequina (**65**), (+)-galocatequina (**66**), (-)-epigallocatequina (**67**) azadiractina A (**68**), trilinoleina (**69**) y ácido octadecanoico-tetrahidrofuran-3,4-diil éster (**70**). Es importante destacar que los nuevos metabolitos **63** y **64** poseen un grupo *n*-butil éter poco común entre los productos naturales. Asimismo, se aislaron los compuestos **67-70**, ya conocidos. La actividad acaricida de los compuestos aislados se probó utilizando un ensayo estándar de inmersión en larvas de Shaw. Todos los compuestos, excepto **69**, poseen un valor LD₅₀ entre LD₅₀ = 3.6-7.2. No se encontraron en la literatura antecedentes del control de garrapatas utilizando compuestos de corteza de “neem”.

Estos resultados indican que la corteza de *A. indica* es una gran fuente de compuestos pesticidas, como sus semillas, y que la actividad del neem depende de varios compuestos con una gran diversidad estructural y no solo de los metabolitos miembros de la familia tetranortriterpenoid (limonoide). Por lo tanto, es evidente que los compuestos activos de estas plantas o de sus mezclas tienen el potencial de ser utilizados en forma combinada o aislada como una alternativa eficaz en el control de *R. microplus*.

Se elucidó un compuesto de la esponja marina *Ectyoplasia ferox*, denominado estigmast-5-en-3-ol, también conocido como β-sitosterol (**71**), éste compuesto ya había sido aislado, por A. Gauvin *et al.* (1988) de la esponja marina *Petrosia spheroida*. Asimismo se aisló un nuevo heptapéptido cíclico, denominado ectyoplasin (**72**), la estructura planar de **72** se determinó mediante espectroscopia de RMN de una y dos dimensiones y espectrometría de masas en tándem de alta resolución, mostrando el ciclo (-Leu¹-Asn²-Ala³-Val⁴-Thr⁵-Pro⁶-Gly⁷-). Su estereoquímica absoluta fue resuelta por el método de Marfey.

De la esponja marina *Amphimedon compressa*, no se purificaron compuestos, debido a que la materia prima fue insuficiente, por lo que se recomienda seguir con las investigaciones de esta esponja.

7. BIBLIOGRAFIA

- Adenubi, O. T., Abdalla, M. A., Ahmed, A. S., Njoya, E. M., McGaw, L. J., Eloff, J. N., Naidoo, V. 2018. Isolation and characterization of two acaricidal compounds from *Calpurnia aurea* subsp. *aurea* (Fabaceae) leaf extract. *Exp Appl Acarol.* **75**,345-354.
- Albrizio, S., Ciminiello, P., Fattorusso, E., Magno, S., Pawlik, J.R. 1995. Amphitoxin, a New High Molecular Weight Antifeedant Pyridinium Salt from the Caribbean Sponge *Amphimedon compressa*. *J. Nat. Prod.*, **58** (5), 647–652.
- Alves, T. M. A., Fonseca, S. A., Brandão, T.S. M. Grandi, E.F.A., Smânia, A. S., y Zani, C.L. 2000. Biological screening of brazilian medicinal plants. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* **95**(3), 367-373.
- Amador, M. L., Jimeno, J., Paz, A. L., Cortes, F. H., Hidalgo, M. 2003. Progress in the development and acquisition of anticancer agents from marine sources. *Ann Oncol*, **14**(11), 1607-15.
- Angulo, E. M. A., Gardea, B. A. A., Vélez, R. B., García, E. R. S., Carrillo, F. A., Cháidez, Q. C., y Partida, L. J. I. 2004. Azadirachtin a content in neem seeds (*Azadirachta indica* A. Juss) collected in Sinaloa, México. *Fitotec. Mex.* **27** (4). 305 – 311.
- Ara I., Shaheen S. B., Faizi S., y Salimuzzaman S. 1989. Structurally novel diterpenoid constituents from the stem bark of *Azadirachta indica* (Meliaceae) *J. CHEM. SOC. PERKIN TRANS.* **25** (3), 111-114.
- Ara I., Shaheen S. B., Faizi S., y Salimuzzaman S. 1990. Tricyclic diterpenoids from root bark of *Azadirachta indica*. *Phytochemistry*, **29** (3), 911-914.
- Arts, I. C., Van De Putte, B., y Hollman, P. C. 2000. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1746-1751.
- Balandrin, M. F., Mark, L. S., y Klocke, J. A. 1988. Biologically active volatile organosulfur compounds from seeds of the neem tree, *Azadirachta indica* (Meliaceae). *J. Agric. Food Chem.* **36**, 1048-1054.
- Balandrin, M., y Kinghorn, A. D. 1993. Plant-derived natural products in drug discovery and development. *American Chemical Society.* **534**, 3-10.
- Bandyopadhyay, U., Biswas, K., Chatterjee, R., Bandyopadhyay, D., Chattopadhyay, I., Kumar, Ch., Chakraborty, T., Bhattacharya, K., y Banerjee, R. 2002. Gastroprotective effect of neem *Azadirachta indica* bark extract: possible involvement of H⁺-K⁺ATPase inhibition and scavenging of hydroxyl radical. *Life Science.* **71**, 2845–2865.

- Bazán, J., Ventura, R., Massuo, J.K., Rojas, C., Delgado, G.E. 2011. Actividad insecticida de *Piper Tuberculatum* jacq. Sobre *Aedes Aegypti* l. (Díptera: Culicidae) y *Anopheles pseudopunctipennis* Tehobal (Díptera: Culicidae). 2011. *Anales de Biología* **33**, 135-147.
- Benavides, E. O., Hernández, G. M., Romero, A. Hernando, C., Rodriguez, J.L. B. 2001. Evaluación preliminar de extractos del Neem (*Azadirachta indica*), como alternativa para el control de la garrapata *Boophilusmicroplus* (Acari: Ixodidae). *Rev. Colomb de Entomol.*, **27**, 1-13.
- Bermúdez, A., y Oliveira, M.M.A., 2005. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*, **30** (8), 453-459.
- Bina, S.F., Siddiqui, T. A., y Muddasar, H. 2004. Tetracyclic triterpenoids from the leaves of *Azadirachta indica*. *Phytochem.* **65(16)**: 2363-2367.
- Blümich, B. 2005. Essential NMR for Scientists and Engineers. 2nd. Ed. Springer
- Brechelt, A. y Fernández, C. L. 1995. El nim, un árbol para la agricultura y el medio ambiente. Experiencias en la República Dominicana. 2nd ed., Ed. Santo Domingo, Fundación Agricultura y Medio Ambiente. pp 133.
- Cafieri, F., Fattorusso, E. y Tagliatela, S. 1999. Ectyoplasides A–B – Unique Triterpene Oligoglycosides from the Caribbean Sponge *Ectyoplasia ferox*. *European Journal of Organic Chemistry*, **1999**, 231-238.
- Campagnuolo, C., Fattorusso, E. y Tagliatela, S. 2001. Feroxides A-B, two norlanostane tetraglycosides from the Caribbean sponge *Ectyoplasia ferox*. *Tetrahedron* (**57**), 4049-4055.
- Carballeira, N. M., Colón R., y Emiliano, A. 1998. Identification of 2-Methoxyhexadecanoic Acid in *Amphimedon compressa*. *J. Nat. Prod.* **61**, 675-676.
- Carballeira, N. M., Negrón V., y Reyes E. D. 1992. Novel monounsaturated fatty acids from the sponges *Amphimedon compressa* and *Mycale laevis*. *J. Nat. Prod.* **55** (3), 333–339.
- Carter, C., Hull, C., Luthra, N. y Walter, J. 1992. Storage Stable Azadirachtin. Formulation. New York. *United States Patent*. US 5.124.349.
- Christ, T., Wüst, M., Matthes, J., Jänchen, M., Jürgens, S., y Herzig S. 2004. An aqueous extract of the marine sponge *Ectyoplasia ferox* stimulates L-type Ca²⁺ current by direct interaction with the Cav1.2 subunit. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **370**, 474-483.
- Colorado, R. J., Muñoz, D., Montoya, G., Márquez, D., Márquez, M. E., López, J., y Martínez, A. 2013. HPLC-ESI-IT-MS/MS Analysis and Biological Activity of Triterpene Glycosides from the Colombian Marine Sponge *Ectyoplasia ferox*. *Marine Drugs*, **11**, 4815-4833.

- Costantino, V., Fattorusso E., Imperatore C., Mangoni A., y Teta R. 2009. Amphiceramide A and B, Novel Glycosphingolipids from the Marine Sponge *Amphimedon compressa*. *Eur. J. Org. Chem.* **12**, 2112–2119.
- Costantino, V., Fattorusso, E., Imperatore, C., y Mangoni, A. 2003. Ectyoceramide, the First Natural Hexofuranos y ceramide from the Marine Sponge *Ectyoplasia ferox*. *Eur. J. Org. Chem.* **11**. 1433-1437.
- Costantino, V., Fattorusso, E., y Mangoni, A. 2000. Glycolipids from Sponges. Part 9:1 Plakoside C and D, Two Further Prenylated Glycosphingolipids from the Marine Sponge *Ectyoplasia ferox*. *Tetrahedron.* **56**, 5953-5957.
- Coventry E, Allan E. J. 2001. Microbiological and chemical analysis of neem (*Azadirachta indica*) extracts: new data on antimicrobial activity. *Phytoparasitica.* **29**, 1-10.
- Cragg, G. M., Newman, D. J. 2016. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products.* Review. **4** (4), 297-300.
- Croteau, R. 2008. Natural products (Secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of plants.* **24**, 1250-1319.
- Cruz, F. M. y Del Ángel, R. 2004. El árbol de Neem, establecimiento y aprovechamiento en la huasteca. *INIFAP-CIRNE*. Campo Experimental Huichihuayán y Campo Experimental Ébano. San Luis Potosí, México. *Folleto Técnico*, (3):1 23.
- Cuadrado, C., Castellanos, L., Osorno, O., Ramos, A., y Duque C. 2010. Estudio químico y evaluación de la actividad *antifouling* del octocoral caribeño. *Eunicea laciniata*. *Quim. Nova.* **33** (3), 656-661.
- Damaria, S., Sridhar, S., Raman, K. y Chandrasekaran, M. 2004. Storage Stable Pesticide Formulations Containing Azadirachtin. Bangalore. India. *United States Patent*. US 6.811.780.B1.
- Davis, L. A., Cai, Y., Davies, A. P., y Lewis, J. R. 1996. ¹H and ¹³C NMR Assignments of Some Green Tea Polyphenols. *Magnetic Resonance in Chemistry.* **34**, 887-890.
- Deota, P. T., Upadhyay, P. R., Patel, K. B., y Mehta, K. J. 2000. Estimation and isolation of azadirachtin a from neem (*Azadirachta Indica* A. Juss) seed kernels using high performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies.* **23** (14), 2225–2235.
- Dias, D. A., Urban, S., y Roessner U. 2013. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites*, **2**, 303-336.

- Du, Y. H., Li, J. L., Jia, R. Y., Yin, Z. Q., Li, X. T., Lu, C., Ye, G., Zhang, L., Zhang, Y. Q. 2009. Acaricidal activity of four fractions and octadecanoic acid-tetrahydrofuran-3,4-diyl ester isolated from chloroform extracts of neem (*Azadirachta indica*) oil against *Sarcoptes scabiei* var. *cuniculi* larvae *in vitro*. *Vet Parasitol.* **163**(1-2), 175-178.
- Dureja, P., Johnson, S. 2000. Photodegradation of azadirachtin-A: A neem-based pesticide. *Current Science.* **79** (12). 1700 – 1703.
- Elisabetsky, E., Amador, T. A., Leal, M., y Nunes, D. S. 1997. Merging ethnopharmacology with chemotaxonomy: an approach to unveil bioactive natural products. The case of *Psychotria* alkaloids as potential analgesics. *Ci Cul.* **49**, 378-850.
- Estrada, N., López, J., Márquez, D., Martínez, A., Márquez M. 2013. Cytotoxic evaluation of fractions obtained from marine sponges from the colombian caribbean *Amphimedon compressa*, *Revista Nacional de Colombia.* **2** (1). 24-30
- Faulkner D. J., Marine natural products. 2002. *Nat. Prod. Rep.* **18**, 1-49.
- FAO (Food Agriculture Organization of the United Nation). 2004. Module 1. Ticks: Acaricides Resistance: Diagnosis Management and Prevention in: Guidelines Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants. FAO Animal Production and Health Division, Rome.
- Fattorusso, E.; Gerwick, W. H.; Tagliatela-Scafati, O. 2012. Handbook of Marine Natural Products. 1nd, Ed. Springer.
- Ferreira, E. G., Wilke, D. V., Jimenez, C. P., Portela, A. T., Silveira, R. E., Hajdu, E., Pessoa, C., Moraes, O. M., y Costa, L. V. 2007. Cytotoxic activity of hydroethanolic extracts of sponges (Porifera) collected at Pedra da Riscado Marine State Park, Ceará State, Brazil. *Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability.* **313**. 310-312.
- Gauvin, A., Smadja, J., Aknin, M., & Gaydou, E. M. 1998. Cyclopropane-containing sterols in the marine sponge *Petrosia spheroida*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* **121** (4), 451-456.
- Gajalakshmi, S. y Abbasi, S. A. 2004. Neem leaves as a source of fertilizer-cumpesticide vermicompost. *Bioresource Technology.* **92**, 291–296.
- Giglioti, R., Formin, M.R., Oliveira, H.N., Chagas, A.C.S., Ferrezini, J., Brito, L.G., Falcowski, T.O.R.S., Albuquerque, L.G., Oliveira, M.C.S. 2011. *In vitro* acaricidal activity of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations against *Rhipicephalus microplus*. *Vet. Parasitol.*, **181**, 309-315.
- Gómez, V. A. 2012. Plant use knowledge of the Winikina Warao: The case for questionnaires in ethnobotany. *Econ. Bot.* **56**, 231-242.

- Govindachari, T.R., Suresh, G., Gopalakrishnan, G., Banumathy, B., y Masilamani, S. 1998. Identification of antifungal compounds from the seed oil of *Azadirachta indica*. *Phytoparasitica*, **26** (2), 1-8.
- Govindachari T. R., Sandhya G., y Ganeshr A. J.S. 1992. Azadirachtins hand i: two new tetranortriterpenoids from *azadirachta indica*. *Journal of Natural Produurts*. **55** (5), 596-601.
- Grabley, S.; Thiericke, R. *Drug Discovery from Nature*, Ed. Springer-Verlag, Germany, **2000**. Pag 5-7.
- Gupta K. R., Nand P., Drabu S. 2012. Insignificant anti-acne activity of *Azadirachta indica* leaves and bark. *Journal of Pharmaceutical*. **3**, 29-33.
- Haefner, B. 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov Today*, **8** (12), 536-544.
- Harborne, J. B., Baxter, H., y Moss, G.P. 2001. *A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. 2nd Edition, Editorial *Taylor and Francis*.
- Hostettmann, K. 1997. Strategy for the biological and chemical evaluation of plant extracts. *Pure Appl. Chem*. **70** (11), 23-27.
- Huang, Z., Shi, P., Dai, J., y Du, J. 2004. Protein metabolism in *Spodoptera litura* (F.) is influenced by the botanical insecticide azadirachtin. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **80**, 85–93.
- Jarvis, A. P., y Morgan, E. D. 2000. Analysis of small samples of limonoids of neem (*Azadirachta indica*) using solid phase extraction from tissue culture. *Phytochemical Analysis*. **11**(3), 184–189.
- Juliet, S., Ravindran, R., Ramankutty, S. A., Gopalan, A. K. K., Nair, S. N., Kavillimakkil, A. K., Bandyopadhyay, A., Rawat, A. K. S., Ghosh, S. 2012. *Jatropha curcas* (Linn.) leaf extract a possible alternative for population control of *Rhipicephalus(Boophilus)annulatus*. *Asian Pac J Trop Dis*. **2**(3), 225–229.
- Jasbbi, A. 2006. Chemistry and biological activity of secondary metabolites in Euphorbia. *En: Iran PhytochemistryK*. **67**, 1977-1984.
- Kakuko, Y., Fumiko, A., Ariaki, N., Hikaru, O., Lozada, L., López, E., Estrada, E., Aguilar, A., Reyes, R. 2005. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. *Journal of Ethnopharmacology*. **97**(2), 293–299.
- Keen C. 2001. Chocolate: Food as Medicine/Medicine as Food. *American College of Nutrition*. **20**, 436-439.
- Khazir, J., Bilal, A. M., Shabir, A. M., y Don, C. 2014. Natural products as lead compounds in drug Discovery. *Journal of Asian Natural Products Research*, **25**, 345-350.

- Kintzios, S. E. 2006. Territorial plant derived anticancer agents and plant species used in anticancer research. *Critic Reviews in Plant Physiology*. **25**, 79-113.
- Kupchan, S. M., Tsou, G., Sigel, C. W. 1973. Datiscacin, a novel cytotoxic cucurbitacin 20-acetate from *Datisca glomerate*. *J Org Chem*. **38**(7), 1420–1421.
- Kurose, K., y Yatagai, M. 2005. Components of the essential oils of *Azadirachta indica* A. Juss, *Azadirachta siamensis* and *Azadirachta excels* (Jack) Jacobs and their comparison. *Journal Wood Science*. **51**, 185-188.
- Lahlou, M. 2013. The Success of Natural Products in Drug Discovery. *Pharmacology & Pharmacy*. **4**. 17-31
- León, J., Liza, L., Soto, I., Torres, M., Orosco, A. 2010. Bacterias marinas productoras de compuestos antibacterianos aisladas a partir de invertebrados intermareales. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública*. **27**, 215- 221.
- Lôbo, L.T., Ferreira, C. K. C., Silva, P. A. M., Da Silva M. N., Arruda, C. A., Müller, A. H., Skelding P. A. G. M., y Santos, A. S. 2008. Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (Leguminosae). *Quim. Nova*. **31** (3), 493-497.
- Lokeshwar, P., Pankaj, S., Mukesh, B., Vishnu, B. 2012. Review on neem (*Azadirachta indica*): Thousand problems one solution. *International research journal of pharmacy*. **2** (12), 97-102.
- Magaña, M. A. A., Gama, C. L. M., Méndez, R. M. 2010. El uso de las plantas medicinales en las comunidades mayachontales de Nacajuca, Tabasco, México. *Polibotánica*. **29**, 213-262.
- Mahmoud, D. A., Hassanein, M. N., Youssef, A. K., & Zeid, A. M. 2011. Antifungal activity of different neem leaf extracts and the nimonol against some important human pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*. **42**, 1007–1016.
- Martínez A. M., Galeano, J. E., Cadavid, J., Miranda R. Y., Llano L. J., y Montalvo M. K. 2007. Insecticide action of ethanol extracts of sponges from urabá gulf on *Aedes aegypti* and *culex quinquefasciatus* larvae. *Vitae*, **2**, 90-94.
- Martínez, M. E., Sosa, E. J. E., y Álvarez, F. 2014. El estudio de la biodiversidad en México: ¿una ruta con dirección? *Revista Mexicana de Biodiversidad*. **85**, S1-S9.
- Martins, A., Vieira, H., Gaspar, H., y Santos, S. 2014. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success. *Mar Drugs*. **12** (2), 1066–1101.
- Matsunaga, S., Miyata, Y., Van, S. R. W., y Fusetani N. 2004. Tetrahydrohalicyclamine A and 22-hydroxyhalicyclamine A, new cytotoxic bis-piperidine alkaloids from a marine sponge *Amphimedon* sp. *J Nat Prod*. **67** (10), 1758-1760.

- Micheletti, S.M.F.B., Valente E.C.N., Alves de Souza, L., Dias N. da S., Pérez, K.G., Trindade, R.C.P. 2009. Control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) con extractos vegetales. *Rev. Colomb. Entomol.*, **35** (2), 145-149.
- Montaser, R., y Luesch, H. 2012. Marine natural products: a new wave of drugs? *Future Med Chem.* **3** (12), 1475–1489.
- Mora, J., Zea, S., Santos, M., Newmark U. F. 2007. Capacidad Antimitótica de Extractos de Esponjas del Caribe Colombiano. *Bol. Invest. Mar. Cost.* **36**, 167–169.
- Naumann, K., Currie, R. W., y Isman, M. B. 1994. Evaluation of the repellent effects of a neem insecticide on foraging honey bees and other pollinators. *The Canadian Entomologist.* **126**. 225-230.
- Naumann, K., y Isman, M. B. 1996. Toxicity of a neem (*Azadirachta indica* A. Juss) insecticide to larval honey bees. *American Bee Journal.* **136** (7), 518-520.
- Navarro, V., Rojas G., Delgado G., y Lozoya, X. 1998. Antimicrobial compounds detected in *Bocconia arborea* extracts by a direct bioautographic method. *Medical Research.* **29** (2),191-194.
- Neem Foundation, (2006). Growing Neem. Disponible en internet: <http://www.neemfoundation.org/contact.htm>.
- Nemoto, T., Ojika, M., y Sakagami, Y. 1997. Amphimic acids, novel unsaturated C28 fatty acids as DNA Topoisomerase I inhibitors from an Australian sponge *Amphimedon* sp. *Tetrahedron Lett.* **38** (32), 5667-5670.
- Okemo, P. O., Mwatha, W. E., Chhabra, S. C., y Fabry, W. 2001. The kill kinetics of *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) extracts on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *African J Sci Technol.* **2**, 113-8.
- OMS. 1979. The selection of essential drugs. *Who Technical Report Series* **641**. 1-44.
- Oñate, R. J., y Quintero, L. A. 2008. Caracterización fisicoquímica de los extractos de la semilla del árbol de Neem (*Azadirachta Indica*) en el Departamento del Cesar. Trabajo de graduación de Ing. Agroindustrial. Facultad de Ingeniería y Tecnología, Universidad Popular del Cesar. Colombia. p. 35.
- Parmar, B.S., Balraj, T., Varshney, M., y Shah, D. O. 2004. Neem oil microemulsion without cosurfactants or alcohols and a process to form the same. *United States Patent.* **6**, 703.
- Ramos, C., González, V., Soto, M., Engleman, E., Rodríguez, D. 2004. Variación en contenido de azadiractina en frutos de Margosa durante su desarrollo. *Revista Fitotecnica Mexicana.* **27** (1), 81-85.
- Rates, S. M. K. 2001. Plants as source of drugs. Review. *Toxicon.* **39**, 603–613.

- Raveendra, M., Acharya, L. D. y Udupa, N. 2004. Evaluation of antiplaque activity of *Azadirachta indica* leaf extract gel a 6-week clinical study. *Journal of Ethnopharmacology*. **90**, 99–103.
- Ravindran, R., Juliet, S., Sunil, A., Kumar, K. A., Nair, S. N., Amithamol, K., Shynu, M., Rawat, A. K. S., Ghosh, S. 2011. Ecllosion blocking efect of ethanolic extract of *Leucas aspera*(Lamiaceae) on *Rhipicephalus(Boophilus) annulatus*. *Vet Parasitol.* **179**(1), 287–290.
- Rice, M. 1993. Development of Neem Research and industry in Australia. *World Neem Conference*. Bangalore, India. pp 8-24.
- Roland, M. y Blouin, J. 1995. Co-Extraction of *Azadirachta* and Neem Oil. New York. *United States Patent*. (5.397.571).
- Salazar, R., Jhon, D., Ospina, S. D, I., Orozco, S, F., Hoyos, S. R., Arango, A. M. 2014. Actividad antifúngica de extractos de biomasa celular de neem sobre aislamientos de dermatofitos. *Biotecnología*. **10**, 187-193.
- Saleem, S., Muhammad, G., Muhammad, A. H., Nasir, S. A. B. 2018. A comprehensive review of phytochemical profile, bioactives for pharmaceuticals, and pharmacological attributes of *Azadirachta indica*. *Phytotherapy Research*. 1–32.
- Saxena, R. C. 2002. Management of insect pests with neem: Global perspective. *Neem Foundation*, India.
- Shaw, R. D., Cook, M., Carson, R.E. 1968. Developments in the resistance status of the southern cattle tick to organophosphorus and carbamate insecticides. *J Econ Entomol.* **61**, 1590-1594.
- Shivashankar, S., Roy, T. K. y Krishna, M. P. 2012. Headspace Solid Phase Micro Extraction and GC/MS. Analysis of the Volatile Components in Seed and Cake of *Azadirachta indica* A. juss. *Chem. Bull.* **57** (71), 1.
- Soest, R. W. V., Boury-Esnault N., Vacelet, J., Dohrmann, M., Erpenbeck, D., De Voogd, N. J., Santodomingo, N., Vanhoorne, B., Kelly, M., Hooper, J. N. 2012. Global diversity of sponges (Porifera). **7**(4), 105.
- Soto, R. G., Vega, A. L., Tamajón J. 2002. Instructivo técnico del cultivo de *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf (caña santa). *Rev. Cubana Plantas Med.* **7**, 89-95.
- Srivastava, R., Ghosh, S., Mandal, D.B., Azhahianambi, P., Singhal, P.S., Pandey, N., Swarup, D. 2008. Efficacy of *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus*. *Parasitol. Res.*, **104**,149-153.

- Stoney, C. 1997. *Azadirachta indica* - neem, a versatile tree for the tropics and subtropics. Forest, Farm, and Community Tree Network (FACT Net). Disponible en internet: <http://food-security.info/foodsecurity.info/Winrock%20Archive/neem.htm>.
- Toledo, V. 2001. *Atlas Etnoecológico de México. Etnobiología*. 6 (8). 15. México D.F.
- Thompson, M.N., Gallimore W. A., Townsend, M. M., Chambers N. A., y Lawrence, A. D. 2010. Bioactivity of Amphitoxin, the Major Constituent of the Jamaican Sponge *Amphimedon compressa*. *Chemistry & Biodiversity*. 7, 1904-1910.
- Van derNat J. M., Van DerSluis W. G., THart L.A., VanDUk H., DeSilva K. T. D., y Labadie, R.P. 1991. Activity-guided isolation and identification of *Azadirachta indica* bark extract constituents which specifically inhibit chemiluminescence production by Activated Human Polymorphonuclear Leukocytes. *Planta Med.* 57, 65-68.
- Verpoorte, R., Choi, Y. H., Kim, H. K. 2005. Ethnopharmacology and systems biology: A perfect holistic match. *J Ethnopharmacol.* 100 (1-2), 53-65.
- Vuorela, P., Leinonen, M., Saikku, P., Tammela, P., Rauha, J. P., Wennberg, T. 2004. Natural Products in the Process of Finding New Drug Candidates. *Current Med Chem.* 11, 1375-89.
- Williams, D. Pant, C. 2007. Extraction method. *United States Patent*. US 7.179.927 B2.
- Williams, R. F., Peng, C. Y. S., Chuang, R.Y., Doi, R.H., y Mussen, E.C. 1998. The inhibitory effect of azadirachtin on *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood in the honeybee, *Apis mellifera* L. *J Invert Pathol.* 72. 252.
- Xu, N.J., Xue, S., Xiao, J.Y. 2007. A new cyclostelletamine from sponge *Amphimedon compressa*. *Chinese Chemical Letters.* 18, 947-950.
- Yu, Q. Z., Jiao, X., Zhong, Q., Yina, R. Y., Yang, L., Fan, Y., Yong H., Dua, P. Z., Cheng L., Ting, X. H., Shu, L. L., Gang S., Geng, Y. 2010. Isolation and identification of the antibacterial active compound from petroleum ether extract of neem oil. *Fitoterapia.* 81 (7), 747-750.
- Zani, C.L., Chaves, P.P.G., Queiroz, R. A.B., De Oliveira, C. J., Anjos, A.M.G., y Grandi, T.S.M. 1995. Brine shrimp lethality as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Phytomedicine.* 2 (1), 47-50.