

15
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

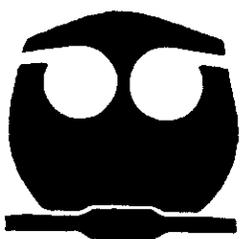
FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA Y ESTUDIO DE LA RELACION
ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE DITERPENOS
AISLADOS DE SALVIAS MEXICANAS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
Q U I M I C O
P R E S E N T A :
JOSE LUIS MEDINA FRANCO



MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

34042



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

- Presidente: Prof. Pozas Horcasitas Rocío.
Vocal: Prof. Esquivel Rodríguez Baldomero.
Secretario Prof. Ávila Zárrega José Gustavo.
1er. suplente Prof. Gracia Mora María Isabel.
2do. suplente Prof. Hernández Gómez Luciano.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Microbiología Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología y Laboratorio 3 de la Unidad de Investigación en Plantas Medicinales (UIPM) del Instituto de Química, UNAM.


M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez.
Asesor del tema


Dr. Jorge Romero Farero.
Supervisor técnico


José Luis Medina Franco
Sustentante

Dios nuestro, eres digno de recibir la gloria, el honor y el poder, porque tú has creado todas las cosas.
(Ap 4, 11)

*A mis padres como un fruto de su
dedicación, sacrificio y amor.*

*A mis hermanos, Heriberto y Jesús y a
mi hermana Maria Teresa que ha estado
conmigo aún desde antes de nacer.*

Agradecimientos

Quiero expresar mi sincero agradecimiento al M. en C. Baldomero Esquivel por la dirección de esta investigación y por todo el apoyo que me ha brindado en mi desarrollo profesional. De igual modo, agradezco la guía del Dr. Jorge Romero en el desarrollo del trabajo microbiológico de esta tesis.

Doy las gracias también a las siguientes personas por su valiosa colaboración: a la profesora Guadalupe Vélez, de la Facultad de Química; a la bióloga Silvia Julieta Rojas, de la ENEP Iztacala y a la Q.F.B. María Teresa Ramírez, del Instituto de Química, por sus valiosas asesorías en la metodología de las pruebas biológicas; al Ing. Jesús González por facilitarme una parte del material que me fue necesario en las mismas pruebas y al D.G. Efraín Mora por las excelentes fotografías que tomó de los microorganismos de prueba y los antibiogramas (Figuras 3.1, 3.6 a 3.9, 3.12 y 3.13).

*Cur moriatur homo cui salvia crescit in horto?
Contra vim mortis non est medicament in hortis.*

(Sentencia de la Escuela de Salerno, siglo XIII)

Índice

Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Antecedentes	5
2.1. Antimicrobianos.	5
2.1.1. Definición.	5
2.1.2. Antimicrobianos como agentes quimioterapéuticos.	5
2.1.3. Historia.	7
2.1.4. Clasificación.	10
2.1.5. Fuentes de obtención.	12
2.2. Diterpenos.	13
2.2.1. Diterpenos como terpenos.	13
2.2.1.1. Características de los terpenos.	13
2.2.1.2. Clasificación de los terpenos.	14
2.2.2. Estructura y biogénesis.	15
2.2.3. Clasificación.	18
2.2.4. Contenido de diterpenos en las salvias mexicanas.	18
2.2.4.1. Salvias.	19
2.2.4.2. Contenido en las salvias mexicanas.	20
2.2.5. Actividad antibacteriana.	22
2.2.5.1. Usos de las salvias en la medicina tradicional mexicana.	22
2.2.5.2. Actividad antibacteriana de diterpenos aislados de salvias.	24
2.2.6. Diterpenos evaluados.	33

Capítulo 3. Evaluación de la actividad antibacteriana de 7α-acetoxiroyleanona, fruticulina A, tilifolidiona y 19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona	35
3.1. Microorganismos de prueba.	35
3.2. Material, equipo y reactivos.	35
3.3. Métodos.	38
3.3.1. Método de disco de papel.	39
3.3.1.1. Preparación de los antibacterianos de referencia.	39
3.3.1.2. Preparación de los diterpenos.	40
3.3.1.3. Preparación de los microorganismos de prueba.	40
3.3.1.4. Preparación de los medios de cultivo.	40
3.3.1.5. Preparación de los discos.	40
3.3.1.6. Bioensayos para trazar las curvas dosis-respuesta.	41
3.3.1.7. Bioensayos para determinar la actividad antibacteriana de los diterpenos.	43
3.3.2. Método de pozo en agar.	43
3.3.2.1. Preparación de los antibacterianos de referencia.	43
3.3.2.2. Preparación de los diterpenos.	44
3.3.2.3. Preparación de los microorganismos de prueba.	44
3.3.2.4. Preparación de los medios de cultivo.	44
3.3.2.5. Preparación de los pozos.	45
3.3.2.6. Bioensayos para trazar las curvas dosis-respuesta.	45
3.3.2.7. Bioensayos para determinar la actividad antibacteriana de los diterpenos.	47
3.4. Resultados.	48
3.4.1. Método de disco de papel.	48

3.4.1.1. Curvas dosis-respuesta.	48
3.4.1.2. Actividad antibacteriana de 7 α -acetoxiroyleanona, fruticulina A, tilifolidiona y 19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona.	53
3.4.2. Método de pozo en agar.	57
3.4.2.1. Conteo de células.	57
3.4.2.2. Curvas dosis-respuesta.	58
3.4.2.3. Actividad antibacteriana de 7 α -acetoxiroyleanona, fruticulina A, tilifolidiona y 19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona.	61
3.5. Discusión de resultados.	63
3.5.1. Método de disco de papel.	64
3.5.2. Método de pozo en agar.	65
3.6. Conclusiones.	68
Capítulo 4. Relaciones estructura-actividad	70
4.1. Fruticulina A.	73
4.2. 7 α -acetoxiroyleanona.	75
4.3. 19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona.	75
Bibliografía.	78

Introducción

Durante siglos el Hombre ha utilizado una gran variedad de productos naturales para el tratamiento de sus enfermedades. La medicina tradicional, que predominó hasta antes del siglo XIX, aún continúa teniendo un fuerte impacto en el mundo actual.

Dentro de los productos naturales empleados, las plantas ocupan un lugar muy importante. Por ejemplo, en México se utilizan cerca de 3200 especies de plantas para el alivio de una gran diversidad de malestares y dolencias.

Debido a que muchos de los extractos y remedios usados en la medicina tradicional han mostrado efectos positivos en el tratamiento de enfermedades, se han estudiado las fuentes naturales y se han aislado fármacos específicos que son utilizados en la medicina convencional. Por ejemplo, de extractos de plantas empleados por los indios que habitaban en el territorio de lo que hoy es Estados Unidos se aislaron ciento setenta fármacos que son o que fueron oficiales en la Farmacopea de Estados Unidos o en el Formulario Nacional de ese país. En un cálculo muy generalizado se estima que la cuarta parte de los fármacos prescritos en países desarrollados contienen principios activos extraídos de plantas.¹ Aunque en la actualidad la mayoría de los fármacos son de origen sintético gracias al enorme progreso que ha tenido la química orgánica desde finales del siglo pasado, es común que sustancias tales como antibióticos, vitaminas y hormonas sean obtenidas por la purificación de los extractos de origen natural

¹ Cfr. Korolkovas, Andrejus. *Essentials of Medicinal Chemistry*. Second edition. Wiley-Interscience, New York, 1988. p. 65.

y posterior aislamiento y caracterización de los principios activos.²

Nuestro planeta cuenta con aproximadamente 600,000 especies vegetales (de 250,000 a 500,000 son plantas superiores). Sin embargo, pese a la gran importancia que han tenido las plantas en la obtención de nuevos fármacos, menos del 10% han sido química y farmacológicamente estudiadas. De los estudios que hasta ahora se han realizado, la Organización Mundial de la Salud estima que a nivel mundial partes de aproximadamente 20,000 plantas son utilizadas en la medicina tradicional y/o en la industria farmacéutica y que 228 de estas plantas contienen con toda seguridad principios activos que están siendo investigados.³

Un grupo de plantas superiores a las que se les han atribuido propiedades bactericidas y antitumorales entre otras, y que por este motivo se han usado desde tiempos remotos en la medicina tradicional, pertenecen al género *Salvia*.⁴ Este género es uno de los 224 géneros de la familia Lamiaceae y comprende 900 especies ampliamente distribuidas por todo el mundo. En México hay 312 especies de las cuales 88% son endémicas.⁵

Mediante estudios fitoquímicos que se han realizado de diferentes especies de *Salvia* se ha encontrado que la composición química de las partes aéreas implica diterpenos, triterpenos, esteroides, flavonoides y compuestos fenólicos. Por otra parte, la presencia de diterpenos de tipo abietano en las raíces se considera una característica quimiotaxonomía de las plantas del género *Salvia* (comúnmente llamadas "salvias") hasta ahora estudiadas.⁶

² Hasta 1930 los fármacos fueron predominantemente de origen natural incluyendo plantas, animales y minerales.

³ Cfr. Korolkovas, Andrejus. *Ob. cit.* p. 65.

⁴ Cfr. Rodríguez-Hahn, L. *et al.* Diterpenos abietánicos de salvias mexicanas. *Rev. Latinoam. Quím.* 20, (1989), p. 105.

⁵ Cfr. Ramamoorthy, T.P. and Elliot, M. Mexican Lamiaceae: Evolution, distribution and endemism. In Ramamoorthy, T.P., Bye, R., Lot, A. y Fa, J. (editors) *Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution*. Oxford University Press, New York. 1993. pp. 520 y 521.

⁶ Cfr. Rodríguez-Hahn, L. *et al.* *Ob. cit.* p. 105.

Además de los usos medicinales que se les da a las salvias se ha observado que varias especies son resistentes al ataque de insectos, herbívoros y hongos e inhiben el crecimiento de otras plantas a su alrededor. Una explicación a estas observaciones es que las plantas producen metabolitos secundarios con actividad biológica y que son los responsables de este mecanismo de defensa. Esta hipótesis, aunada a los usos medicinales, ha conducido a estudios sobre las actividades biológicas tanto de los extractos como de metabolitos secundarios aislados de estas plantas.⁷

Aunque el estudio de las salvias comenzó a principios de siglo, aproximadamente sólo un 8% del género ha sido cubierto. Así mismo, la evaluación de la actividad biológica de los constituyentes está muy limitada.⁸

Los estudios que se han realizado de extractos de salvias han revelado que muestran una gran variedad de actividad biológica. Son cuatro las especies que han probado ser activas contra bacterias: *Salvia aegyptiaca*, *S. lanigera*, *S. moorcroftiana* y *S. officinalis*. De estas especies *S. lanigera* y *S. moorcroftiana* tienen un alto contenido de diterpenos de tipo abietatrieno.⁹

La evaluación de la actividad antibacteriana de diterpenos aislados de salvias comenzó en España en 1989.¹⁰ Desde entonces, diversos grupos de investigación en varias partes del mundo han venido haciendo estudios *in vitro* de diterpenos para determinar este tipo de actividad. De 59 diterpenos evaluados, 33 han mostrado cierta actividad antibacteriana.

De esta forma, las propiedades antibacterianas atribuidas a las salvias en la

⁷ Cfr. Esquivel, R. B. *et al.* Recent advances in phytochemistry and biological activity of mexican Labiatae *Rev. Latinoamer. Quím.* 24, (1996). p. 57.

⁸ Cfr. Esquivel, R. B. Estudio quimiotaxonómico de la sección fulgentes del género *Salvia*. Tesis de maestría UNAM. 1986 p. 8

⁹ Cfr. González, A. G. *et al.* A first study of antibacterial activity of diterpenes isolated from some *Salvia* species (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 17, (1989). p. 293.

¹⁰ Cfr. *Loc. cit.*

medicinal tradicional, las observaciones de campo y los resultados hasta ahora obtenidos en la evaluación sistemática de la actividad antibacteriana tanto de los extractos como de los diterpenos aislados de salvas parecen indicar que estas especies son una fuente potencial de agentes antibacterianos.

Debido a que la búsqueda de nuevos antibióticos es una de las necesidades primordiales en el mundo actual y a la fuerte evidencia que se tiene de que en las salvas hay diterpenos con propiedades antibacterianas, en esta investigación se determinará la actividad antibacteriana de cuatro diterpenos aislados de salvas mexicanas. En base a los resultados obtenidos se plantearán modificaciones químicas a los compuestos que resultaren más activos con la finalidad de proponer compuestos que pudieran llegar a tener uso terapéutico.

Antecedentes

2.1. Antimicrobianos.

2.1.1. Definición.

Los términos *antimicrobiano* y *antibiótico*¹ se aplican a aquellas sustancias químicas que, en bajas concentraciones, pueden interferir con el crecimiento y metabolismo de los microorganismos.²

Según los microorganismos sobre los que actúan, los antimicrobianos se clasifican en *antibacterianos*, *antifúngicos*, *antihelmínticos*, *antiprotozoarios* y *antiviricos*.

2.1.2. Antimicrobianos como agentes quimioterapéuticos.

Los antimicrobianos que se utilizan específicamente para el tratamiento de enfermedades infecciosas se denominan *agentes quimioterapéuticos*. La propiedad principal que debe tener un antimicrobiano para que tenga uso terapéutico es que debe

¹ La palabra *antibiótico*, que en griego significa "contra la vida", fue acuñada por Paul Vuillemin en 1889. En 1942, Waksman definió a los antibióticos como "sustancias producidas por microorganismos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento y aún de destruir a otros microorganismos". Cinco años después Benedict y Langlykke definieron antibiótico como "un compuesto químico derivado o producido por un organismo vivo, que es capaz, en concentraciones pequeñas, de inhibir el proceso de vida de microorganismos." De acuerdo a la definición de Benedict y Langlykke, la fuente de obtención de los antibióticos no son solamente los microorganismos sino los organismos vivos en general incluyendo plantas superiores y animales. Considerando los miles de análogos estructurales de los antibióticos presentes en la naturaleza que se han sintetizado y que han mostrado utilidad quimioterapéutica, estos compuestos sintéticos también se incluyen dentro de la categoría de antibióticos. En este contexto, antibiótico puede definirse como una sustancia química específica derivada o producida por organismos vivos así como sus análogos estructurales obtenidos por síntesis, capaz de inhibir, a bajas concentraciones, procesos vitales de una o más especies de microorganismos (cfr. Korolkovas, Andrejus. *Essentials of Medicinal Chemistry*. Second edition. Wiley-Interscience, New York, 1988. p. 750).

² Cfr. Korolkovas, Andrejus. *Ob. cit.* p. 750 y Pelzcar, Michael J. Jr. *Microbiology* Fifth edition McGraw-Hill, New York, 1986. p. 490.

mostrar toxicidad selectiva sobre el microorganismo parásito, esto es, que debe dañar al microorganismo invasor sin causar daño al organismo huésped.^{3, 4} La falta de esta propiedad hace que muchos antimicrobianos queden sin aplicación terapéutica. De hecho, de los más de 6000 antimicrobianos reportados en la literatura solamente de 300 a 400 tienen uso práctico en medicina porque, entre otras razones, la mayoría de los antimicrobianos carecen de toxicidad selectiva o no tienen ninguna ventaja sobre los ya conocidos.⁵

Otras cualidades que debe poseer un antimicrobiano para que se considere un agente quimioterapéutico son:

- No debe producir en el huésped efectos secundarios indeseables tales como alergias, alteraciones nerviosas, irritaciones, etc.
- No debería causar el desarrollo de formas resistentes al antimicrobiano o, al menos, que no lo hicieran con facilidad.
- No debe eliminar la flora microbiana normal de los tractos intestinal, respiratorio y vaginal del hospedador. La alteración de la flora puede provocar que microorganismos comúnmente no patógenos o patógenos restringidos por el equilibrio normal se desarrollen en forma desmedida produciendo una nueva infección (superinfección).
- Debe tener una farmacocinética adecuada, esto es, que la absorción, distribución, biotransformación y excreción del antimicrobiano en el huésped se conjuguen para que ejerza su efecto.

³ Cfr. Korolkovas, Andrejus y Burckhalter, J. H. *Compendio Esencial de Química Farmacéutica*. Versión española de Ricardo Granados Jarque y Juan Bosch Cartes. Reverté, Barcelona, 1979. p. 469.

⁴ Los antimicrobianos se clasifican en *desinfectantes*, *antisépticos* y *agentes quimioterapéuticos*. Un desinfectante se emplea para matar las células vegetativas pero no necesariamente las formas esporuladas de los patógenos. El término se aplica comúnmente a sustancias usadas sobre objetos inanimados. Un antiséptico también se emplea para combatir infecciones. Este término se emplea para designar a aquellos agentes usados sobre la piel (cfr. Spooner, D. F. y Sykes, G. *Laboratory Assessment of Antibacterial Activity*. In Ribbons, Norris (editor) *Methods in Microbiology*. Academic Press, New York, 1972. Vol. 7B. pp. 211 y 212).

⁵ Cfr. Korolkovas, Andrejus. *Ob. cit.* p. 750.

Es muy difícil que un solo agente quimioterapéutico reúna todas estas características. Es por ello que se emplean combinaciones de ellos para el tratamiento de una infección.⁶

2.1.3. Historia.

La historia de los antimicrobianos puede revisarse desde dos perspectivas. Una de ellas es simplemente la cronología de los avances más sobresalientes (Tabla 2.1) y la otra, derivada de la primera, es el análisis de las etapas que se han presentado en la investigación de los antimicrobianos (Tabla 2.2). La segunda perspectiva es más interesante porque agrupa a las investigaciones particulares en estrategias generales que se han desarrollado para el estudio de estas sustancias. Tal como se indica, varias de estas estrategias continúan vigentes.

De la Tabla 2.1 se resaltan dos aspectos interesantes. Uno de ellos es que la gran cantidad de avances que ocurrieron durante el período de 1940 a 1959 le dieron a esta etapa el nombre de "época de oro del descubrimiento de los antibióticos". Esta época de oro se debió a la conjunción de los conocimientos y las técnicas experimentales que se fueron acumulando con los usos terapéuticos importantes de las penicilinas y de la estreptomina. El otro aspecto es que, aunque en la década siguiente (1960-1970) hubo una disminución en el aislamiento de nuevos antimicrobianos, las modificaciones a las moléculas de los antimicrobianos conocidos para la producción de otros agentes quimioterapéuticos fueron exitosas teniéndose así, por ejemplo, penicilinas semisintéticas, cefalosporinas, rifamicinas y tetraciclinas.

⁶ Tortora, Gerard J., Funke, Berdell, R. y Case, Christine L. *Introducción a la Microbiología*. Tercera edición. Traducción de Rafael Rotger Anglada. Acribia, Zaragoza, 1993. p. 479.

Tabla 2.1 Cronología de los primeros antimicrobianos.

Año	Suceso
1877 ^A	Pasteur y Joubert señalan que un cultivo líquido de bacterias aerobias inhibían el crecimiento de <i>B. anthracis</i> .
1924	Gratia y Dath aislan la actinomicetina
1929	Fleming observa la inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> por <i>Penicillium notatum</i> .
1939	Florey y Chain aislan la bencilpenicilina de <i>Penicillium notatum</i> . Dubos aisla de una cepa de <i>Bacillus brevis</i> lo que él llamó tirotricina (gramicidina y tirocidina).
1940	Waksman aisla la actinomicina.
1942	Waksman aisla la estreptotricina.
1943	Johnson y Meleney aislan la bacitricina de <i>Bacillus subtilis</i> . Waksman aisla la estreptomina.
1947	Burkholder aisla el cloranfenicol de <i>Streptomyces venezuelae</i> . Duggar <i>et al.</i> aislan la clorotetraciclina.
1949	Waksman aisla la neomicina.
1950	Finlay <i>et al.</i> aislan la oxitetraciclina.
1951	Szabo <i>et al.</i> sintetiza la penicilina G benzatina.
1952	McGuire <i>et al.</i> aislan la eritromicina de <i>Streptomyces erythraeus</i> .
1953	Newton y Abraham aislan la cefalosporina C. Boothe <i>et al.</i> aislan la tetraciclina. Brandl <i>et al.</i> sintetizan la penicilina V.
1954	Sobin <i>et al.</i> aislan la oleandomicina. Ruskin sintetiza la penicilina G procaina.
1957	Umezawa aisla la kanamicina de <i>Streptomyces kanamyceticus</i> . Sheehan y Henery-Logan realizan en forma racional la primera síntesis total de una penicilina natural con rendimiento apreciable y del ácido 6-aminopenicilánico.

^A Siglos antes de nuestra era ya se utilizaban con frecuencia mohos que ahora se sabe contienen antibióticos. Sin embargo, el fenómeno de la antibiosis se estudió científicamente después que Pasteur diera las bases de la bacteriología

Tabla 2.1 Cronología de los primeros antimicrobianos (continuación).

Año	Suceso
1959	Coffey aísla la paromomicina. Sensi aísla rifamicinas. En los laboratorios Beecham se aísla el ácido 6-aminopenicilánico de mohos de <i>P.chrysogenum</i> .
1961	Godfredsen y asociados aíslan el ácido fusídico. Herr <i>et al.</i> aíslan la capreomicina. Mason <i>et al.</i> aíslan la espectinomicina. Doyle <i>et al.</i> sintetizan la ampicilina y meticilina.
1962	Mason <i>et al.</i> aíslan la lincomicina. Chauvette <i>et al.</i> sintetizan la cefalotina. Naylor <i>et al.</i> sintetizan la cloxacilina. Wittenau <i>et al.</i> sintetizan la doxiciclina.
1963	Luedemann y Weinstein aíslan la gentamicina de <i>Micromonospora purpureae</i> .
1967	Stark <i>et al.</i> aíslan la tobramicina.
1969	Hendlin <i>et al.</i> aíslan la fosfomicina.
1970	Weinstein <i>et al.</i> aíslan la sisomicina.

Tabla 2.2 Las seis fases de la historia de los antimicrobianos.

Etapas	Periodo	Características
1	1877-1930	Estudio científico de los microorganismos y sus relaciones mutuas. De este estudio se obtuvo que algunos de estos microorganismos producían sustancias químicas que inhibían específicamente el crecimiento de varias bacterias patógenas.
2	1930-1944	Confirmación exitosa de que una de estas sustancias (penicilina) podía ser usada para curar infecciones bacterianas en humanos.
3	1945-presente	Estudios de ensayo y error, en gran escala, de otros antimicrobianos con acción análoga a la penicilina incluyendo a los extraídos de plantas superiores y animales.
4	1950-presente	Investigación empleando métodos científicos, del mecanismo de acción de los antimicrobianos a nivel molecular.
5	1960-presente	Modificación a las estructuras de antimicrobianos naturales con el propósito de obtener mejores agentes quimioterapéuticos.
6	presente	Uso de la ingeniería genética para obtener antibióticos que no se han descubierto en la naturaleza

En la década de los 70's la búsqueda de nuevos antimicrobianos se hizo siguiendo las siguientes estrategias: (a) modificación a las moléculas de antimicrobianos útiles, (b) aislamiento de nuevos antimicrobianos de fuentes naturales y (c) variación estructural de antimicrobianos tóxicos para el huésped o poco activos.⁷

2.1.4. Clasificación.

Diversos criterios básicos se han empleado para clasificar a los antimicrobianos: origen, biosíntesis, estructura química, espectro de actividad, toxicidad y mecanismo de acción. De estos, los principales criterios son: biosíntesis, espectro de actividad, estructura química y mecanismo de acción.⁸

I. Biosíntesis.

De acuerdo a su biosíntesis o biogénesis los antimicrobianos se dividen en las siguientes clases:

- A. Antimicrobianos derivados de aminoácidos.
- B. Antimicrobianos derivados de azúcares.
- C. Antimicrobianos derivados principalmente de unidades de propionato o acetato.
- D. Antimicrobianos con estructuras varias.

II. Espectro de actividad.

Por su espectro de actividad los antimicrobianos se clasifican en:

- A. Antimicrobianos de amplio espectro: aquellos que afectan a un gran número de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.
- B. Antimicrobianos predominantemente activos contra bacterias Gram-positivas.
- C. Antimicrobianos predominantemente activos contra bacterias Gram-negativas.

⁷ Cfr. Korolkovas, Andrejus *Ob. cit. Essentials of Medicinal Chemistry*, pp. 751-753.

⁸ Cfr. *ibid.* pp. 753-756.

D. Antimicrobianos predominantemente activos contra micobacterias.

E. Antimicrobianos activos contra hongos.

F. Antimicrobianos activos en neoplasias.

III. Estructura química.

A pesar de que muchos autores han presentado clasificaciones de los antimicrobianos de acuerdo a su estructura química todavía no hay una clasificación satisfactoria. Las clasificaciones más antiguas corresponden a Shemyakin y colaboradores (1961), Waksman y Lechevalier (1962) y Umezawa (1964, 1967). Sensi y Coronelli, en 1970, clasificaron a los antimicrobianos de acuerdo a las estructuras químicas que reconocieron como constituyentes principales de sus moléculas. Tales estructuras fueron: núcleos aromáticos, cadenas alifáticas, cicloalcanos, aminoácidos, heterociclos y azúcares. A cada grupo lo subdividieron en dos o más grupos. En el mismo año Yonehara dividió a los antimicrobianos en diez familias. Bérdy, también en 1970, hizo una mejor clasificación que permite la división de acuerdo a la estructura química o de acuerdo a las propiedades generales más significativas de los antimicrobianos.

IV. Mecanismo de acción.

Según su mecanismo de acción, los antimicrobianos pueden dividirse en los siguientes grupos.⁹

A. Antimicrobianos que afectan la síntesis de la pared celular bacteriana.

1. Antimicrobianos que inhiben los enzimas biosintéticos.

2. Antimicrobianos que se combinan con las moléculas transportadoras.

3. Antimicrobianos que se combinan con los substratos.

4. Antimicrobianos cuyo punto de acción sobre la síntesis de la pared celular no ha sido localizado.

⁹ Cfr. Korolkovas, Andrejus *Ob cit Compendio Esencial de Química Farmacéutica*. pp. 665-670

B. Antimicrobianos que afectan la función de la membrana citoplasmática.

1. Antimicrobianos que permiten la desorganización de la membrana citoplasmática.
2. Antimicrobianos que producen cambios específicos en la permeabilidad catiónica.
3. Antimicrobianos que inhiben a los enzimas unidos a la membrana que intervienen en la transferencia de energía.

C. Antimicrobianos que afectan la síntesis de ácidos nucleicos.

1. Antimicrobianos que interfieren el metabolismo nucleótido.
2. Antimicrobianos que impiden la formación del molde ADN.
3. Antimicrobianos que inhiben la ARN polimerasa en la síntesis de ácidos nucleicos.

D. Antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas.

1. Antimicrobianos de la fase de iniciación.
2. Inhibidores del ciclo de elongación.
3. Inhibidores de la fase de terminación.

2.1.5. Fuentes de obtención.

De los fármacos considerados como esenciales por la Organización Mundial de la Salud aproximadamente 50% son obtenidos por síntesis química, 11% proceden de partes de vegetales, 9.5% son preparados por síntesis química parcial, 9% provienen de fuentes minerales, 8.7% son extraídos de órganos de animales, 6.5% son de origen microbiano, 4.3% son vacunas y 2.0% son sueros.¹⁰ Sin embargo, los porcentajes correspondientes a las fuentes de obtención de los antimicrobianos difieren considerablemente de las fuentes de los fármacos en general. De los 6000 antibióticos

¹⁰ Cfr. Korolkovas, Andrejus. *Ob. cit. Essentials of Medicinal Chemistry*. p. 55.

descritos en la literatura,¹¹ 5000 provienen de microorganismos (aproximadamente 85.2% distribuidos de la siguiente manera: 58.2% *Actinomycetales*; 7.7% *Eubacteriales*, especialmente *Bacilli*; 1.2% *Pseudomonales* y 18.1% fúngicos), 0.9% provienen de algas y líquenes; 12.1% de plantas superiores y 1.8% de animales.

2.2. Diterpenos.

2.2.1. Diterpenos como terpenos.

2.2.1.1. Características de los terpenos.

Los terpenos son uno de los grupos de productos naturales que se encuentran más extendidos por todo el mundo. Además, comprenden una gran diversidad de estructuras químicas. Históricamente, los terpenos se han extraído de plantas superiores de las cuales son productos del metabolismo secundario pero hay otro tipo de fuentes naturales que también los contienen.¹²

A pesar de la gran variedad de estructuras que pueden encontrarse dentro de este grupo de compuestos Ruzicka observó que las estructuras de todos ellos guardan una relación a la que llamó *regla del isopreno* que establece:

"El esqueleto de carbonos de los terpenos está constituido por unidades de isopreno unidos en forma regular o irregular".¹³

¹¹ *Ibid.* p. 750.

¹² Se utilizan casi indistintamente los nombres de *terpeno* o *terpenoide* para designar a este tipo de productos naturales. Sin embargo, Tomas Hudlicky señala que el término *terpeno* se aplica si el compuesto proviene de una planta superior y *terpenoide* si no se especifica su fuente natural (cfr. *McGraw-Hill Encyclopedia of Science & Technology*. Seventh edition. Vol. 18. McGraw-Hill, New York, 1992. p. 232). Por otra parte, Ruzicka indica que "la palabra *terpenoide* se introdujo en forma innecesaria por analogía con la expresión "esteroide" que denota un grupo de compuestos que tienen un número irregular de átomos de carbono". Añade que "en el campo de los terpenos, la expresión *terpenoide* debería reservarse por analogía para los compuestos en los cuales el número de átomos de carbono varía en forma irregular, en contraste con los terpenos propiamente, en donde el número de átomos de carbono es siempre un múltiplo de cinco" (cfr. Ruzicka, L. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia* 9, (1953) p. 367).

La palabra *terpeno* (del inglés *terpene*) proviene de *tremantina* (del inglés *turpentine*), resina que se extrae de diversas especies de coníferas y parece ser que comenzó a aparecer en la literatura en los escritos de Kékulé en 1866 (cfr. Hanson, J. R. Introduction and Nomenclature. In Newman, A. *Chemistry of Terpenes and Terpenoids*. Academic Press, New York, 1972. p. 3).

¹³ Ruzicka, L. *Ob. cit.* p. 357.

Hay algunas aparentes excepciones a esta regla. Sin embargo, estas "violaciones" al arreglo de las unidades de isopreno dieron y continúan dando lugar al estudio de la biosíntesis de los terpenos en la cual pueden darse rearrreglos.

2.2.1.2. Clasificación de los terpenos.

Los terpenos se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que los constituyen (Tabla 2.3).¹⁴

Tabla 2.3 Clasificación de los terpenos.

Átomos de carbono	Unidades isoprenicas	Clasificación
5	1	Hemiterpenos
10	2	Monoterpenos
15	3	Sesquiterpenos
20	4	Diterpenos
25	5	Sesterpenos
30	6	Triterpenos
40	8	Tetraterpenos ^A
5n (n>8)	n (n>8)	Politerpenos

^A También llamados carotenoides.

Las unidades de isopreno en los monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y sesterpenos están unidas cabeza con cola (Figura 2.1). Los triterpenos y tetraterpenos están conformados a partir de dos unidades de sesquiterpenos y diterpenos, respectivamente. Los sesquiterpenos se unen cola con cola para formar a los

¹⁴ La clasificación más clara de los terpenos se fundamenta en consideraciones biosintéticas. Es por esto que también puede decirse que "los terpenos se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que intervienen en su biosíntesis" considerando que durante la síntesis no se pierden o ganan más de cinco átomos de carbono (cfr. Connolly, J. D. and Hill, R. A. *Dictionary of Terpenoids*. Chapman & Hall, London, 1991 Vol. 1. p. xiv).

tetraterpenos.

Aunque los terpenos pueden nombrarse de acuerdo a las normas de la IUPAC es más usual emplear nombres comunes que, a menudo, reflejan el nombre de la fuente de la cual provienen.

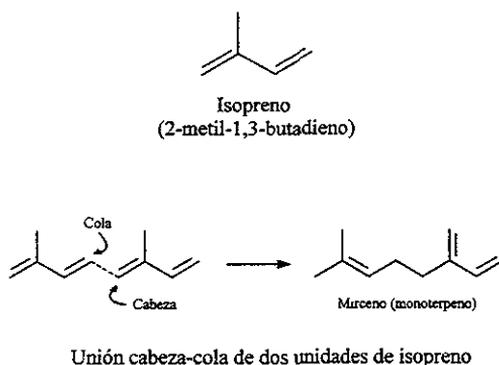


Figura 2.1 Unidad de isopreno y unión cabeza-cola para la formación de terpenos.

2.2.2. Estructura y biogénesis.

Los diterpenos, de acuerdo a la Tabla 2.3, son un tipo de terpenos con veinte átomos de carbono (cuatro unidades de isopreno). Este extenso grupo de compuestos en su mayoría tienen estructuras cíclicas que van desde dos hasta cuatro anillos por molécula.

El precursor biosintético de los diterpenos es el pirofosfato de geranylgeranilo que a su vez proviene del pirofosfato de isopentenilo (molécula precursora de todos los terpenos).

La serie de transformaciones que van dando origen a la formación de los terpenos se describe a continuación. Primero, el pirofosfato de isopentenilo reacciona con el

pirofosfato de dimetilalilo para dar pirofosfato de geranilo. Esta molécula sufre rearrreglos posteriores dando origen a los monoterpenos. Cuando el pirofosfato de geranilo reacciona con pirofosfato de isopentenilo añade otros cinco átomos de carbono a su estructura produciéndose pirofosfato de farnesilo que, también por rearrreglos, forma a los sesquiterpenos y es precursor de los triterpenos (al unirse dos unidades de pirofosfato de farnesilo cola con cola) y de los sesterpenos. De manera semejante, cuando al pirofosfato de farnesilo se le adicionan cinco átomos de carbono por reacción con pirofosfato de isopentenilo, se forma el pirofosfato de geranilgeranilo. Modificaciones estructurales a esta molécula, precursora de los tetraterpenos (por dimerización), genera a los diterpenos. En la Figura 2.2 se resumen las relaciones biosintéticas de los terpenos a partir del pirofosfato de isopentenilo.¹⁵

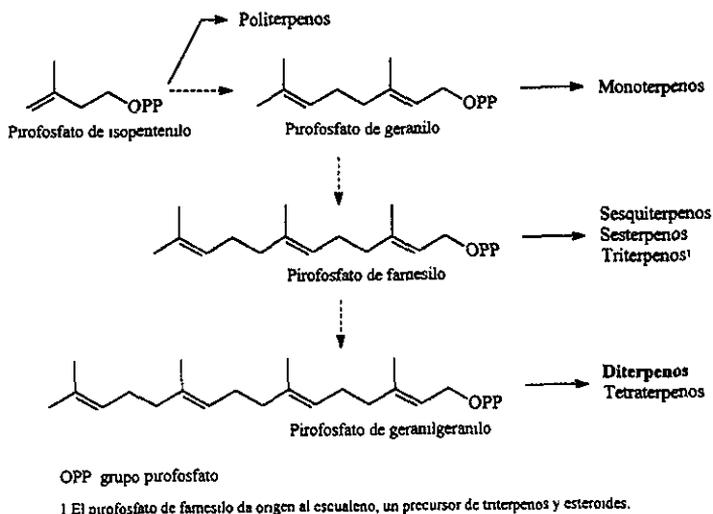


Figura 2.2 Relaciones biosintéticas de los terpenos.

¹⁵ El pirofosfato de isopentenilo se origina por la condensación de tres moléculas de acetil coenzima A siguiendo la ruta: acetil CoA → acetoacetil Co A → hidroximetil glutarato → ácido mevalónico → isopentenilo (cfr. *McGraw-Hill Encyclopedia of Science & Technology*. Ob. cit. p. 232).

La gran diversidad de estructuras que tienen los diterpenos, y los terpenos en general, se debe a la gran cantidad de rearrreglos que se pueden ir presentando a partir del pirofosfato de geranilgeranilo. De hecho, Hanson afirma que "la química de los terpenos ha presentado muchos problemas cuyas soluciones, en muchos casos, han dado la pauta para la creación de teorías que ahora son fundamentales para la química orgánica".¹⁶ En la Figura 2.3 se esquematizan algunos ejemplos de estos rearrreglos que son la base para la clasificación de los diterpenos.

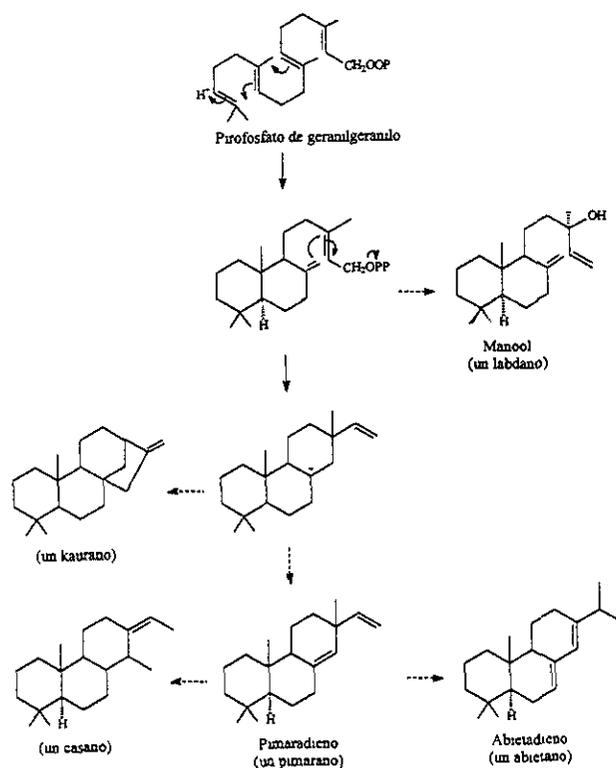


Figura 2.3 Ejemplos de rearrreglos del pirofosfato de geranilgeranilo.

¹⁶ Hanson, J. R. *Ob. cit.* p. 2.

2.2.3. Clasificación.

Los diterpenos se clasifican de acuerdo a su tipo de estructura. Algunos tipos importantes son: abietanos, clerodanos, pimaranos, labdanos, icetexanos, texanos, totaranos, casanos, kauranos, beyeranos, atisanos, aconanos, gibanos y giberejanos. Las estructuras características de los cinco primeros se dan en la Figura 2.4 donde se indica la numeración que se utiliza para nombrarlos de acuerdo a la IUPAC.

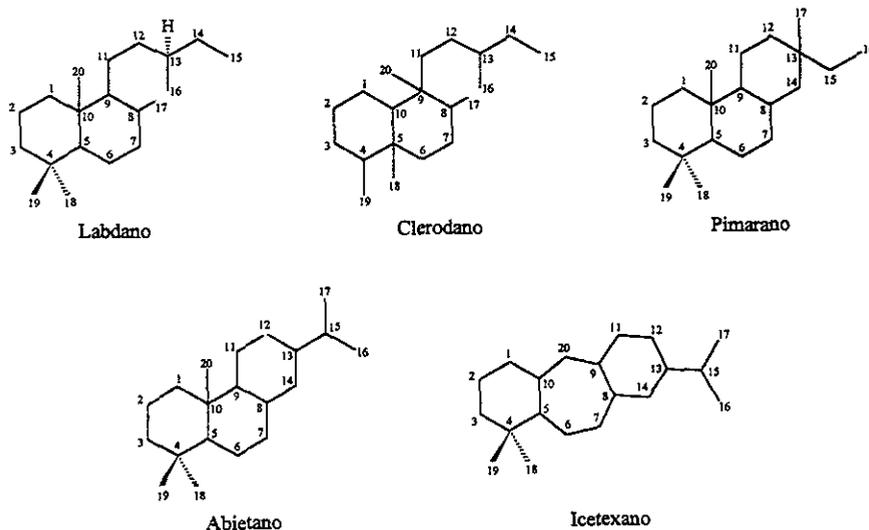


Figura 2.4 Algunos tipos de diterpenos importantes.

2.2.4. Contenido de diterpenos en las Salvias mexicanas.

Los diterpenos no sólo se encuentran en las plantas superiores sino también en hongos, insectos y organismos marinos.¹⁷ Sin embargo, como en esta investigación se estudian diterpenos aislados de salvias, la revisión está enfocada a este género de plantas superiores.

¹⁷ Cfr. Connolly, J. D. y Hill, R. A. *Ob. cit.* p. xxxii.

2.2.4.1. Salvias.

Salvias es el nombre que se les da a las especies que pertenecen al género *Salvia*, palabra derivada del latín *salvare*, debido a las propiedades curativas que se han atribuido en el Viejo Mundo a la especie europea *Salvia officinalis* y otras afines. Estas especies ampliamente distribuidas por todo el mundo, principalmente en las zonas tropicales, subtropicales y partes templadas, son plantas herbáceas o arbustivas, de tallos cuadrangulares y hojas opuestas y aromáticas.^{18, 19}

El género *Salvia*, establecido por Linneo en 1753,²⁰ es uno de los 224 géneros que pertenecen a la familia de las Labiadas. Bentham lo dividió en cuatro subgéneros: *Salvia*, *Calosphace*, *Leonia* y *Sclarea*.²¹ *Salvia* es el género de la familia que más especies comprende: 900 de 5600 especies totales.²² Las salvias europeas y asiáticas pertenecen principalmente a los subgéneros *Salvia* y *Sclarea*. El subgénero *Leonia* está representado por varias especies de América del Norte mientras que las salvias de México, Centro y Sudamérica pertenecen al subgénero *Calosphace*²³ (principalmente distribuidas en las regiones montañosas del centro de México y Centroamérica y, en menor proporción, en el norte de los Andes y tierras montañosas de Brasil).²⁴ Este subgénero, dividido por Epling en 105 secciones, comprende por sí solo 550 especies (62% del género).²⁵

¹⁸ Cfr. Álvarez, José Rogelio (director). *Enciclopedia de México*. Sabeca International Investment Corporation c/o Enciclopedia Británica de México S.A. de C.V. México, 1993. Tomo XII. p. 7131.

¹⁹ Cfr. Rodríguez-Hahn, L. et al. Diterpenos abietánicos de salvias mexicanas. *Rev. Latinoamer. Quím.* 20, (1989) p. 105.

²⁰ Cfr. Esquivel, R. B. Estudio quimiotaxonomico de la sección fulgentes del género *Salvia*. Tesis de maestría. UNAM 1986. p 7

²¹ Datos recientes, taxonómicos y químicos, sugieren una revisión de esta clasificación (cfr. Esquivel, R. B. et al. Recent advances in phytochemistry and biological activity of mexican Labiatae. *Rev. Latinoamer. Quím.* 24, (1996). p. 45).

²² Cfr. Ramamoorthy, T.P. y Elliot, M. Mexican Lamiaceae: Evolution, distribution and endemism. in Ramamoorthy, T. P., Bye, R., Lot, A. y Fa, J. (editors) *Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution*. Oxford University Press, New York, 1993. pp. 514 y 520.

²³ Cfr. Rodríguez-Hahn, L. et al. *Ob. cit.* pp. 105 y 106.

²⁴ Cfr. Esquivel, R. B. *Ob. cit.* Estudio quimiotaxonomico de la sección fulgentes del género *Salvia*. p 7

²⁵ Cfr. Esquivel, R. B. et al. *Ob. cit. Rev. Latinoamer. Quím.* p 4

En México hay 27 géneros de Labiadas organizados en seis tribus,²⁶ con aproximadamente 512 especies. *Salvia*, perteneciente a la tribu Mentheae, es el género que cuenta con el mayor número de especies (312, todas pertenecientes al subgénero *Calosphace*) con un alto porcentaje de endémicas (88%).²⁷ Así mismo, de las 105 secciones del subgénero *Calosphace* reconocidas por Epling, 59 se encuentran en México y 25 son endémicas.²⁸

Los hábitats en donde se encuentran las *Salvias* principalmente están compuestos por pinos, abetos, robles y coníferas. Pueden desarrollarse en bosques caducifolios y bosques de nubes, en zonas semiáridas y en desiertos.²⁹

Varias especies de *Salvia* son resistentes al ataque de insectos, herbívoros, hongos e inhiben la germinación a su alrededor de otras plantas del hábitat. Esto sugiere que en la composición química de estos vegetales, que les sirve para competir exitosamente por el hábitat contra otras especies, debe haber sustancias con actividad biológica incluyendo la antimicrobiana. Dichas sustancias podrían ser algunos metabolitos secundarios que producen estas plantas tales como los terpenos.^{30, 31}

2.2.4.2. Contenido en las salvias mexicanas.

Una de las características más sobresalientes de las Labiadas es que las glándulas presentes en las células epidérmicas contienen terpenos. Los aceites de esas glándulas proveen a la planta de aroma lo que hace que sean utilizadas en varias partes

²⁶ Las tribus, con el número de géneros que comprenden son: Ajugeae (3 géneros), Lamieae (4 géneros), Mentheae (11 géneros), Nepeteae (2 géneros), Ocimeae (5 géneros) y Salviae (2 géneros) (cfr. Ramamoorthy, T.P. *et al. Ob. Cit.* pp. 517 y 521)

²⁷ Cfr. Esquivel, R. B. *et al. Ob. cit. Rev. Latinoamer. Quím.* p. 45.

²⁸ Cfr. Ramamoorthy, T.P. *et al. Ob. Cit.* p. 523

²⁹ Cfr. *Ibid.* pp. 518 y 522.

³⁰ Cfr. Esquivel, R. B. *et al. Ob. cit. Rev. Latinoamer. Quím.* p. 57.

³¹ Tomas Hudlicky menciona: "la función de los terpenos en las plantas y otros organismos no es clara, aunque algunas veces tienen propiedades tóxicas ligadas a la protección de las especies" (cfr. *McGraw-Hill Encyclopedia of Science & Technology Ob. cit.* p. 232).

del mundo en la medicina tradicional y en platillos típicos.³²

De los estudios realizados de algunos géneros de la familia se ha obtenido que contienen esteroides, flavonoides, iridoides, sesquiterpenos, monoterpenos, diterpenos, triterpenos y sesterpenos.^{33, 34}

Por su parte, estudios fitoquímicos de diferentes especies de *Salvia* han revelado que en las partes aéreas de estas plantas se encuentran diterpenos, triterpenos, esteroides, flavonoides y compuestos fenólicos. Los diterpenos que se han aislado son de los tipos labdano, clerodano, abietano y pimarano (Figura 2.4), principalmente.^{35, 36} A su vez, la presencia de diterpenos con esqueleto de abietano en las raíces se ha considerado como una característica quimiotaxonómica de las plantas del género *Salvia* tomando en cuenta que se han estudiado mucho más las raíces de las salvias de origen europeo y asiático que las de origen americano.³⁷

Por otra parte, cerca del 80% de los diterpenos aislados hasta ahora de salvias mexicanas son del tipo clerodano.³⁸

Parece ser que muchas secciones del subgénero *Calosphace* que se encuentran en México son químicamente diferentes al resto de las secciones. Estudios de Rodríguez-Hahn y sus colaboradores sugieren que varias secciones se caracterizan por diterpenos únicos. Por ejemplo, las secciones *Erythrostachys*, *Tomentellae*, *Fulgentes* y

³² Cfr. Ramamoorthy, T.P. et al. Ob. Cit. p. 514

³³ Cfr. Esquivel, R. B. et al. Ob. cit. Rev. Latinoamer. Quím p 45

³⁴ Cfr. Esquivel, R. B. Ob. cit. Tesis de maestría. pp. 5 y 6.

³⁵ Cfr. Esquivel, R. B. et al. Ob. cit. Rev. Latinoamer. Quím pp 45 y 46.

³⁶ Rodríguez-Hahn, L. et al. resumen el contenido de diterpenos en las salvias de la siguiente manera: en las salvias de los subgéneros *Salvia* y *Sclarea* (europeas y asiáticas) los diterpenos son principalmente del tipo abietano, mientras que los diterpenos de los subgéneros *Leonia* y *Calosphace* (mexicanas, centro y sudamericanas) predominantemente son del tipo clerodano o productos biogénicamente relacionados con este tipo (cfr. Rodríguez-Hahn, L. et al. Ob. cit. pp 105 y 106). De hecho, Esquivel, R. B. et al. indican que de casi el 100 % de las especies de salvias europeas y asiáticas estudiadas fitoquímicamente se han aislado diterpenos de tipo abietano (cfr. Esquivel, R., B. et al. Ob. cit. Rev. Latinoamer. Quím. p. 51)

³⁷ Los diterpenos con estructura de abietano que se hacen mención son de tipo quinona. (cfr. Rodríguez-Hahn, L. et al. Ob. cit. p. 105. y Esquivel, R., B. et al. Ob. cit. Rev. Latinoamer. Quím. p. 51).

³⁸ Cfr. *Ibid.* p. 106.

Scorodonia se distinguen por su contenido de diterpenos tipo abietano.³⁹ Así, los estudios fitoquímicos realizados hasta la fecha de diversas especies mexicanas (todas pertenecientes al subgénero *Calosphace*) permiten establecer, con algunas excepciones, una relación entre el contenido de diterpenos en las especies y la sección taxonómica a la que pertenecen.⁴⁰

2.2.5. Actividad antibacteriana.

2.2.5.1. Usos de las salvias en la medicina tradicional mexicana.

El género *Salvia* se ha caracterizado por su uso en la medicina tradicional. Como se asentó, su nombre mismo se originó por propiedades curativas que se observaron en algunas especies.⁴¹

Se tienen numerosos ejemplos del manejo que el pueblo ha dado a estas plantas para tratar sus malestares. En la Tabla 2.4 se dan algunos de ellos resaltando en primer lugar las especies usadas en México.

En México, además de las especies de *Salvia* mencionadas, el pueblo usa varias plantas con el nombre de salvia. Por ejemplo, *Hyptis albida* es la *salvia real* (las hojas se emplean para combatir los dolores reumáticos y algunas enfermedades de los oídos); *Lippia geminata* H. B. K. es la *salvia betónica* (para los resfriados y como sudorífico, antiespasmódico y estomáquico). Otras especies conocidas como salvias son *Hyptis*

³⁹ Cfr. Ramamoorthy, T.P. *et al. Ob. Cit.* p. 523.

⁴⁰ Cfr. Esquivel, R. B. *et al. Ob. cit. Rev. Latinoamer. Quím.* p. 46.

⁴¹ Se le atribuyeron tantas propiedades curativas a la *Salvia officinalis* L. que una sentencia de la Escuela de Salerno llegó a decir de ella en el siglo XIII: *Cur moriatur homo cui salvia crescit in horto? Contra vim mortis non est medicamentum in hortis*. Esto es: ¿De qué podrá morir el hombre que tiene salvia en el huerto? Aunque la segunda parte reconoce que contra el poder de la muerte no hay planta que valga" (cfr. Pio Fon Quer *Plantas Medicinales. El Dioscórides renovado*. Labor. 1982. p. 678).

Tabla 2.4 Empleo de algunas especies de *Salvia* en la medicina tradicional.

Especie (nombre común)	Lugar de uso	Propiedades atribuidas
<i>Salvia ballotaeflora</i> Beneth ⁴²	México	Tratamiento de problemas estomacales.
<i>Salvia microphylla</i> var. <i>neurepea</i> (mirto) ^{43,44}	México	Antiparasitario y malestares estomacales. ^A
<i>Salvia divinorum</i> Epl. y Jativa ^{44,45}	México	Propiedades psicotrópicas, alucinógenas y eméticas. Los indios mazatecos de Oaxaca la usan en ritos de adivinación.
<i>Salvia leucantha</i> Car. (salvia real) ^{46,47}	México	El cocimiento de sus hojas y flores se emplea contra los mareos y "contra el dolor de pecho".
<i>Salvia officinalis</i> L. (salvia) ^{45,48}	Europa	Para cáncer de encía, antitumoral, dolores reumáticos, tratamiento de asma, normaliza las funciones menstruales de la mujer, tónico para el riñón, hígado y pulmones, etc. ^B
<i>Salvia candelabrum</i> Boissier (salima basta) ⁴⁸	Europa	Las hojas se emplean como febrífugas.
<i>Salvia sclarea</i> L. (amaro) ⁴⁸	Europa	Usada como antiséptico, antiespasmódico, astringente, balsámico, estimulante; en el tratamiento del cáncer, catarro, debilidad, dolor de cabeza y enfermedades digestivas, oftálmicas, del riñón y del útero.
<i>Salvia aethiopsis</i> L. ⁴⁸	Europa	Las raíces se usan para curar llagas, heridas y úlceras. El extracto de la corteza de la raíz para sanar las hemorroides.
<i>Salvia pratensis</i> L. ⁴⁸	Europa	Las hojas se emplean para limpiar y curar heridas en la piel.
<i>Salvia verbenaca</i> L. ⁴⁸	Europa	Para curar llagas y heridas y aclarar la vista.
<i>Salvia miltiorrhiza</i> ⁴²	China	Tratamiento de problemas cardiacos. ^C
<i>Innula royleana</i> ^{D,42}	Himalaya Occidental	El arbusto se considera venenoso y se ha usado como insecticida y desinfectante.

^A De esta especie se aisló el diterpeno ácido 7 α -hidroxisandaracopimárico que mostró actividad tripanocida.

^B Se dice que la planta inhalada por algún tiempo causa intoxicación y mareo.

^C La *Salvia miltiorrhiza* es una de las especies de *Salvia* más estudiadas. Está incluida en la Farmacopea de medicina tradicional China.⁴⁹

^D Se menciona este arbusto porque es fuente de uno de los diterpenos bajo estudio en esta investigación.

⁴² Cfr. Rodríguez-Hahn, L. *et al.* *Ob. cit.* pp. 105 y 107.

⁴³ Cfr. Esquivel, R. B. *et al.* *Ob. cit.* Tesis de maestría. p. 3.

⁴⁴ Cfr. Esquivel, R. B. *et al.* *Ob. cit.* *Rev. Latinoamer. Quím.* p. 61.

⁴⁵ Cfr. Duke, James A. *Handbook of Medicinal Herbs*. CRC Press, Florida, 1985 pp. 419-422.

⁴⁶ Cfr. Álvarez, José Rogelio. *Ob. cit.* p. 7131.

⁴⁷ Cfr. Martínez, M. *Las Plantas Medicinales en México*. Tercera edición. Batas, México, 1944. p. 453.

⁴⁸ Cfr. Pro Fon Quer. *Ob. cit.* pp. 677-684.

⁴⁹ Son 18 los extractos obtenidos de Labiadas que se han incluido en diversas farmacopeas en el mundo porque tradicionalmente han mostrado actividad terapéutica durante cientos de años (cfr. Wagner, H. *Rev. Latinoamer. Quím.* 8, (1977). pp. 23 y 24).

laniflora Beneth. y *H. rhytidea* Beneth. (las hojas se usan como febrífugo).⁵⁰

La eficiencia que durante mucho tiempo han mostrado tener diferentes especies del género *Salvia* en el tratamiento empírico de enfermedades diversas es un fuerte antecedente para pensar que las especies de este género contienen sustancias específicas que logran tales efectos. Prueba de esto es el diterpeno tipo pimarano ácido 7α -hidroxisandaracopimárico aislado de *Salvia microphylla* var. *neurepea* que mostró actividad tripanocida (Tabla 2.4).

2.2.5.2. Actividad antibacteriana de diterpenos aislados de salvias.

El estudio fitoquímico de las salvias comenzó desde principios de este siglo siendo las especies de Europa y Asia más estudiadas que las de América.⁵¹ A pesar de que es ya casi un siglo de investigación sólo se ha cubierto el 8% de las especies totales⁵² y el 15% de las existentes en México.⁵³

Estudios de la posible actividad antimicrobiana y, en general, actividad biológica de los componentes químicos de las salvias se han venido dando paulatinamente. A principios de siglo los aceites esenciales extraídos se utilizaban principalmente para las industrias de la perfumería y la alimenticia.⁵⁴ En 1955 dio comienzo la prueba sistemática de la actividad biológica de los extractos⁵⁵ encontrándose que cubren una amplia gama de actividades. Por ejemplo, extractos de las especies *Salvia aegyptiaca*, *S. lanigera*, *S. moorcroftiana* y *S. officinalis* han probado ser activos contra bacterias.⁵⁶ Posteriormente comenzó la evaluación de las propiedades biológicas de los compuestos aislados de

⁵⁰ Cfr. Álvarez, José Rogelio. *Ob. cit.* p. 7131.

⁵¹ Cfr. Esquivel, R. B. *et al.* *Ob. cit.* Tesis de maestría. p. 7.

⁵² Cfr. *Loc. cit.*

⁵³ Cfr. Esquivel, R. B. *et al.* *Ob. cit. Rev. Latinoamer. Quím.* p. 46.

⁵⁴ Cfr. Esquivel, R. B. *et al.* *Ob. cit.* Tesis de maestría. pp. 1 y 2.

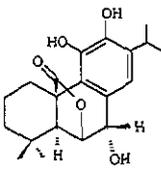
⁵⁵ Cfr. Ross, S. A., El-Keltawi, N. E. y Megalia, S. E. *Fitoterapia* 51, (1980) p. 201.

⁵⁶ Cfr. González, A. G. *et al.* A first study of antibacterial activity of diterpenes isolated from some *Salvia* species (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 17, (1989). p. 293.

salvias.⁵⁷

En 1989 se realizó el primer estudio de la actividad antibacteriana de diterpenos aislados de salvias.⁵⁸ A partir de entonces múltiples publicaciones sobre diterpenos aislados de salvias han ido surgiendo en donde el aislamiento, caracterización y determinación de la actividad antibacteriana de este tipo de terpenos es un factor común. En la Tabla 2.5 se resumen los resultados de estas investigaciones mostrando las estructuras caracterizadas de los diterpenos que exhibieron actividad antibacteriana bajo las condiciones de prueba.⁵⁹ Se indica de que especie de *Salvia* fueron aislados y las especies bacterianas contra las que mostraron actividad y contra las que no fueron activos.

Tabla 2.5 Actividad antibacteriana de diterpenos aislados de *Salvias*.

Diterpeno	Actividad antibacteriana	
	Activo	No activo
<p>60,61</p>  <p>Rosmanol <i>Salvia canariensis</i> L. (flores) y <i>Rosmarinus officinalis</i></p>	<p>Gram-positivas</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i></p> <p><i>Bacillus subtilis</i></p>	<p>Gram-negativas</p> <p><i>Escherichia coli</i></p> <p><i>Salmonella</i> sp.</p> <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>

⁵⁷ Se ha encontrado que hay una gran cantidad de metabolitos secundarios aislados de Labiadas con propiedades que cubren un amplio espectro tales como antibacterianas, antitumorales, antivirales, antialimentarias contra insectos, inhibidoras del crecimiento de insectos, citotóxicas, antiespasmódicas y sedantes. Dentro de estos metabolitos los diterpenos ocupan un lugar muy importante (cfr. Wagner, H. *Ob. cit.* p. 17-19; Kubo, I., Taniguchi, M. y Kubota, T. The biological activities of the *Isodon* diterpenoids *Rev. Latinoamer. Quim.* 9, (1978), pp. 157-159 y Esquivel, R. B. *et al. Ob. cit. Rev. Latinoamer. Quim.* p. 45)

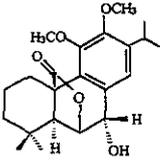
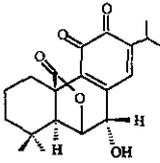
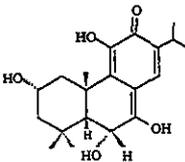
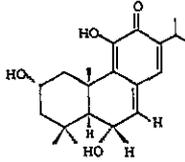
⁵⁸ Cfr. González, A. G. *et al. Ob. cit.*

⁵⁹ Los métodos para la evaluación de la actividad antibacteriana no fueron los mismos en todos los estudios. En las publicaciones están especificados los métodos empleados.

⁶⁰ Cfr. González, A. G. *et al. Ob. cit.*

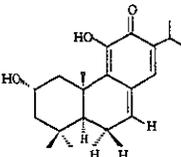
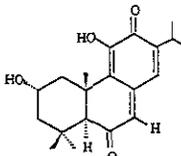
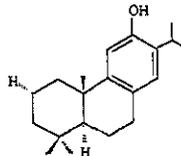
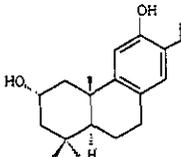
⁶¹ Cfr. Moujir, L. *et al.* Structure-antimicrobial activity relationships of abietane diterpenes from *Salvia* species *Phytochemistry* 34 (6), 1493-1495, (1993)

Tabla 2.5 Actividad antibacteriana de diterpenos aislados de *Salvias* (continuación).

Diterpeno	Actividad antibacteriana	
	Activo	No activo
 <p>Derivado del rosmanol Sintetizado a partir del rosmanol</p>	<p>Gram-positiva</p> <p><i>Bacillus subtilis</i></p>	<p>Gram-positiva</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i></p> <hr/> <p>Gram-negativas</p> <p><i>Escherichia coli</i></p> <p><i>Salmonella sp.</i></p>
 <p><i>Salvia canariensis</i> y <i>Salvia mellifera</i></p>	<p>Gram-positivas</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i></p> <p><i>Bacillus subtilis</i></p>	<p>Gram-negativas</p> <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p><i>Escherichia coli</i></p> <p><i>Salmonella sp.</i></p>
 <p>2α,7-hidroxitaxonona <i>Salvia texana</i> (raíces)</p>	<p>Gram-positiva</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i></p>	<p>Gram-positiva</p> <p><i>Bacillus subtilis</i></p> <hr/> <p>Gram-negativas</p> <p><i>Escherichia coli</i></p> <p><i>Salmonella sp.</i></p>
 <p>2α-hidroxitaxonona <i>Salvia texana</i> (raíces)</p>	<p>Gram-positiva</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i></p>	<p>Gram-positiva</p> <p><i>Bacillus subtilis</i></p> <hr/> <p>Gram-negativas</p> <p><i>Escherichia coli</i></p> <p><i>Salmonella sp.</i></p>

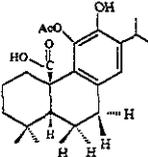
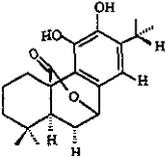
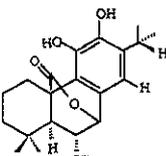
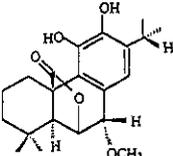
⁶⁰ Cfr. González, A. G. et al. Ob. cit. / ⁶¹ Cfr. Moujir, L. et al. Ob. cit.

Tabla 2.5 Actividad antibacteriana de diterpenos aislados de *Salvias* (continuación).

Diterpeno	Actividad antibacteriana	
	Activo	No activo
⁶⁰  6-deoxo-2α-hidroxitaxodiona <i>Salvia texana</i> (raíces)	Gram-positivas <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Gram-negativas <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> sp.
⁶⁰  2α-hidroxitaxodiona <i>Salvia texana</i> (raíces)	Gram-positivas <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Gram-negativas <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> sp.
⁶⁰  Ferruginol <i>Salvia sclarea</i> L. (planta completa)	Gram-positivas <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Gram-negativas <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> sp.
⁶⁰  Salviol <i>Salvia canariensis</i> L. (parte aérea)	Gram-positivas <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Gram-negativas <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> sp.

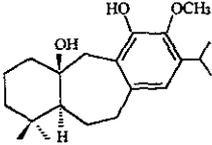
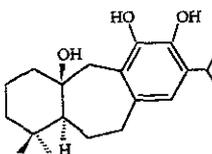
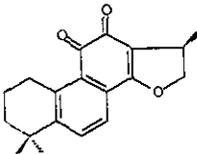
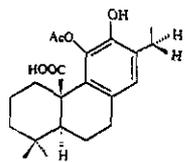
⁶⁰ Cfr. González, A. G. et al. Ob. cit.

Tabla 2.5 Actividad antibacteriana de diterpenos aislados de *Salvias* (continuación).

Diterpeno	Actividad antibacteriana	
	Activo	No activo
⁶⁰  ácido 11-acetoxi-12-hidroxy-abieta-8,11,13-trien-20-oico Derivado del ácido camósico (<i>Salvia canariensis</i>)	Gram-positivas <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Gram-negativas <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella sp.</i>
⁶¹  Camosol <i>Salvia canariensis</i> y <i>Salvia mellifera</i>	Gram-positivas <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Gram-negativas <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
⁶¹  <i>Salvia canariensis</i> y <i>Salvia mellifera</i>	Gram-positivas <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Gram-negativas <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
⁶¹  Derivado del rosmanol <i>Salvia canariensis</i> y <i>Salvia mellifera</i>	Gram-positivas <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Gram-negativas <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

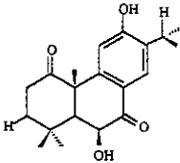
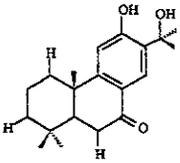
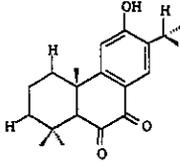
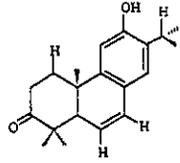
⁶⁰ Cfr. González, A. G. et al. Ob. cit. / ⁶¹ Cfr. Moujir, L. et al. Ob. cit.

Tabla 2.5 Actividad antibacteriana de diterpenos aislados de *Salvias* (continuación).

Diterpeno	Actividad antibacteriana	
	Activo	No activo
⁶¹  Salvicanol <i>Salvia canariensis</i> y <i>Salvia mellifera</i>	Gram-positivas <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Gram-negativas <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
⁶¹  Desmetilsalvicanol <i>Salvia canariensis</i> y <i>Salvia mellifera</i>	Gram-positivas <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Gram-negativas <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
⁶¹  <i>Salvia canariensis</i> y <i>Salvia mellifera</i>	Gram-positivas <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Gram-negativas <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
⁶¹  <i>Salvia canariensis</i> y <i>Salvia mellifera</i>	Gram-positivas <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Gram-negativas <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

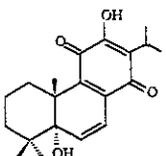
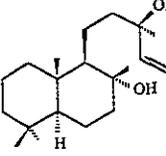
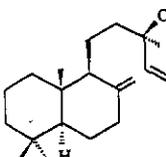
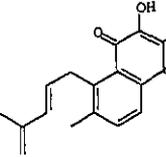
⁶¹ Cfr. Moujir, L. et al. Ob. cit.

Tabla 2.5 Actividad antibacteriana de diterpenos aislados de *Salvias* (continuación).

Diterpeno	Actividad antibacteriana	
	Activo	No activo
 <p>Hipargenina A <i>Salvia hypargeia</i> Fisch et Mey (raíces)</p>	Gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i>	Gram-positivas <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus epidermis</i>
	Gram-negativa <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram-negativa <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
 <p>Hipargenina B <i>Salvia hypargeia</i> Fisch. et Mey (raíces)</p>	Gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i>	Gram-positivas <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus epidermis</i>
	Gram-negativa <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram-negativa <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
 <p>Hipargenina C <i>Salvia hypargeia</i> F. M. (raíces)</p>	Gram-positivas <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Gram-positiva <i>Staphylococcus epidermis</i>
		Gram-negativas <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
 <p>Hipargenina D <i>Salvia hypargeia</i> F. M. (raíces)</p>	Gram-positiva <i>Bacillus subtilis</i>	Gram-positivas <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermis</i>
		Gram-negativas <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>

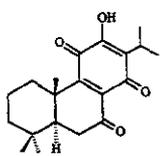
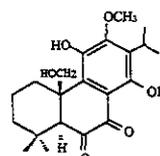
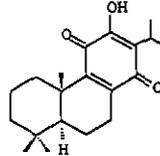
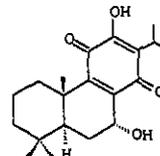
⁶² Cfr. Ulubelen, A. et al. Diterpenoids from the roots of *Salvia hypargeia*. *Journal of Natural Products* 51 (6), 1178-1183, (1988)

Tabla 2.5 Actividad antibacteriana de diterpenos aislados de *Salvias* (continuación).

Diterpeno	Actividad antibacteriana	
	Activo	No activo
 <p>Hipargenina F <i>Salvia hypargea</i> F M (raíces)</p>	⁶² Gram-positivas <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermis</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Gram-negativa <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram-positiva <i>Bacillus subtilis</i> Gram-negativa <i>Klebsiella pneumoniae</i>
 <p>Sclareol <i>Salvia sclarea</i> L. (planta completa)</p>	⁶³ Gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i>	Gram-positivas <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus epidermis</i> Gram-negativas <i>Proteus marabilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
 <p>Manool <i>Salvia sclarea</i> L. (planta completa)</p>	⁶³ Gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i>	Gram-positivas <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus epidermis</i> Gram-negativas <i>Proteus marabilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
 <p>2,3-dehidrosalvipisona <i>Salvia sclarea</i> L. (planta completa)</p>	⁶³ Gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i>	Gram-positivas <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus epidermis</i> Gram-negativas <i>Proteus marabilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>

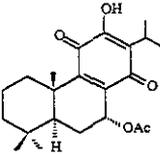
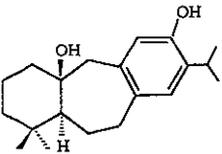
⁶² Cfr Ulubelen, A. et al. *Ob. cit.* / ⁶³ Cfr Ulubelen, A. et al. Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry* 36 (4), 971-974, (1994).

Tabla 2.5 Actividad antibacteriana de diterpenos aislados de *Salvias* (continuación).

Diterpeno	Actividad antibacteriana	
	Activo	No activo
⁶³  7-oxoroyleanona <i>Salvia sclarea</i> L. (planta completa)	Gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i>	Gram-positivas <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus epidermis</i> Gram-negativas <i>Proteus marabilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
⁶⁴  Forskalinona <i>Salvia forskahlei</i> L. (raíces)	Gram-positivas <i>Staphylococcus epidermis</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Gram-positivas <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> Gram-negativas <i>Proteus marabilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
⁶⁵  Royleanona <i>Salvia officinalis</i> L. (raíces)	Gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i>	
⁶⁵  Horminona <i>Salvia officinalis</i> L. (raíces)	Gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i>	

⁶³ Cfr. Ulubelen, A. *et al.* Ob. cit. Terpenoids from *Salvia sclarea*. / ⁶⁴ Cfr. Ulubelen, A. *et al.* An abietane diterpene and two phenolics from *Salvia forskahlei*. *Phytochemistry* 42 (1), 145-147, (1996). / ⁶⁵ Cfr. Masterova, I. *et al.* [Royleanones in the roots of *Salvia officinalis* L. of domestic provenance and their antimicrobial activity]. *Ceska-Slov-Farm.* 45 (5), 242-245, (1996).

Tabla 2.5 Actividad antibacteriana de diterpenos aislados de *Salvias* (continuación).

Diterpeno	Actividad antibacteriana	
	Activo	No activo
⁶⁵  7α-acetoxiroyleanona <i>Salvia officinalis</i> L. (raíces)	Gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i>	
⁶⁶  Lanigerol <i>Salvia lanigera</i> Poir. (raíces)	Gram-positivas <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Mycobacterium luteus</i>	Gram-negativas

2.2.6. Diterpenos evaluados.

Se determinó la actividad antibacteriana de los diterpenos 7α-acetoxiroyleanona (aislado de las raíces de *Salvia fruticulosa*),⁶⁷ fruticulina A (aislado de las hojas de *S. fruticulosa*),⁶⁸ tilifolidiona (aislado de las raíces de *S. thymoides*),⁶⁹ y 19(R)-acetoxi-19-

⁶⁵ Cfr. Masterova, I. *et al.* *Ob. cit.*

⁶⁶ Cfr. El-Lakany, A. M. *et al.* Lanigerol: a new antimicrobial icetexane diterpene from *Salvia lanigera*. *Planta-Med.* 61 (6), 559-560, (1995)

⁶⁷ 7α-acetoxiroyleanona se aisló por primera vez del arbusto *Inula royleana* (cfr. Edwards, O. E. *et al.* Diterpenoid quinones of *Inula royleana* D.C. *Canadian Journal of Chemistry* 40, 1540-1546, (1962)). Es un diterpeno que se ha aislado de la raíz de varias salvias (cfr. Rodríguez-Hahn, L. *et al.* *Ob. cit.* p. 106).

⁶⁸ Fruticulina A se aisló por primera vez de *Salvia fruticulosa*. En esta publicación (cfr. Rodríguez-Hahn, L. *et al.* New highly oxidized diterpene quinones from *Salvia fruticulosa* (Labiatae). *Tetrahedron Letters* 27 (45), 5459-5462, (1986)) y en otra más reciente se caracterizó su estructura química (cfr. Rodríguez-Hahn, L. *et al.* Abietane type diterpenoids from *Salvia fruticulosa*. A revision of the structure of fruticulina B. *Phytochemistry* 28 (2), 567-570, (1989)).

⁶⁹ De la especie *Salvia tiliaefolia* se aisló por primera vez el diterpeno tilifolidiona (cfr. Luis, J. *et al.* Tilifolidione, a cycloheptanenaphthoquinone-type diterpenoid of abietanic origin from the roots of *Salvia tiliaefolia* *Phytochemistry* 36 (1), 115-117, (1994))

deoxoicetexona (aislado de las hojas de *S. pubescens*)⁷⁰ (Figura 2.5).

En un estudio reciente se ha determinado la actividad antibacteriana de 7 α -acetoxiroleanona (Tabla 2.5). Sin embargo, la información que se tiene sobre los métodos y los microorganismos de prueba utilizados en dicho estudio es limitada.

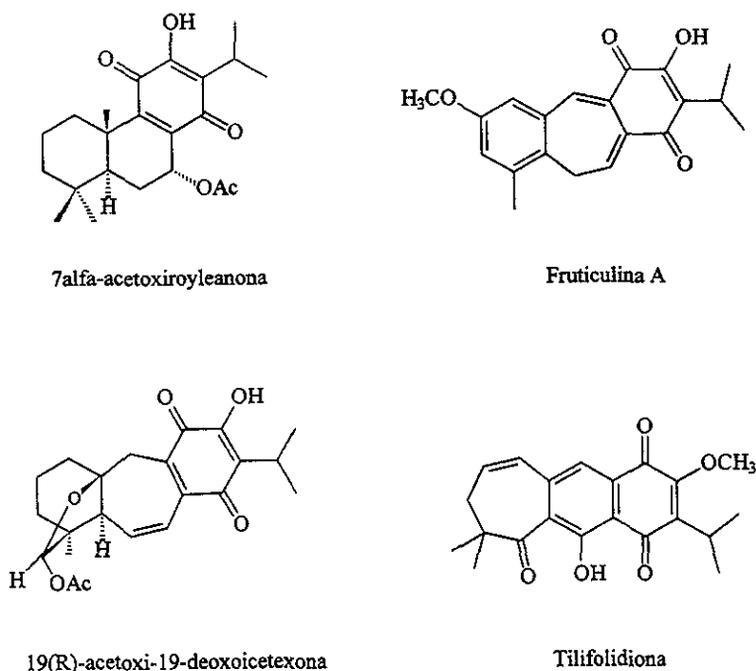


Figura 2.5 Diterpenos evaluados.

Los diterpenos fueron proporcionados por el M. en C. Baldomero Esquivel R. del Instituto de Química en donde aislaron, purificaron y caracterizaron los compuestos. Los diterpenos se aislaron con buenos rendimientos.

⁷⁰ De los diterpenos evaluados, 19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona es el compuesto que se ha aislado y caracterizado más recientemente (cf. Esquivel, B. *et al* Abietane and icetexane diterpenoids from *Salvia pubescens* *Natural Product Letters* 10, 87-93, (1997)).

Evaluación de la actividad antibacteriana de 7 α -acetoxiroleanona, fruticulina A, tilifolidiona y 19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona

3.1. Microorganismos de prueba.

Los microorganismos de prueba fueron las bacterias *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Vibrio campbellii* (ATCC 25920), *Flavobacterium marinotypicum* (ATCC 19260), *Curtobacterium albidum* (ATCC 15831) y *Bacillus subtilis* (ATCC 6051)¹ (Figura 3.1). Las tres primeras especies son Gram-negativas y las dos últimas Gram-positivas.

Las cepas fueron obtenidas del laboratorio de Microbiología Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología a excepción de *Escherichia coli* que fue proporcionada por la Q.F.B. María Teresa Ramírez del Instituto de Química.

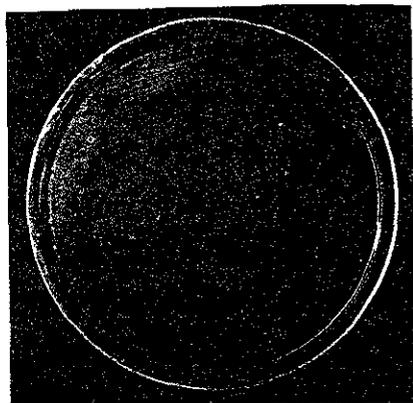
3.2. Material, equipo y reactivos.

Los subcultivos de las cepas bacterianas y los antibiogramas (curvas dosis-respuesta y antibiogramas de los diterpenos) se realizaron en cajas de Petri de plástico estériles S y M[®] de 90 mm x 15 mm.

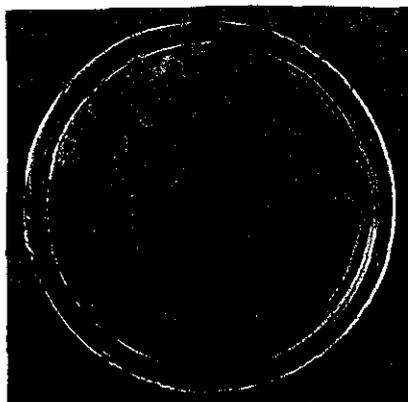
¹ De acuerdo a otras clasificaciones la especie *Vibrio campbellii* recibe el nombre de *Beneckeia campbellii* y *Curtobacterium albidum* el nombre de *Brevibacterium albidum* (cf. American Type Culture Collection. *American Type Culture Collection. Catalogue of Bacteria and Bacteriophages*. Eighteen edition. Maryland, 1992 pp. 569 y 582). Estas dos especies, junto con *Flavobacterium mannotypicum*, son bacterias quitinolíticas que en concentraciones superiores a las normales pueden causar la muerte de cultivos de camarón al degradar su exoesqueleto en una enfermedad conocida como de "puntos negros" (Dr. Jorge Romero J. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Comunicación personal).



Escherichia coli (ATCC 10536)



Vibrio campbellii (ATCC 25920)



Bacillus subtilis (ATCC 6051)



Flavobacterium marnotypicum (ATCC 19260)



Curtobacterium albidum (ATCC 15831)

Figura 3.1 Microorganismos de prueba

Para hacer las pruebas de sensibilidad de las bacterias *Flavobacterium marinotipicum*, *Curtobacterium albidum* y *Bacillus subtilis* a los antibióticos ampicilina y bacitricina se utilizaron sensidiscos Difco® ampicilina 10 u y bacitricina 10 u.

Los discos de papel filtro utilizados en los antibiogramas se hicieron con perforadora. El diámetro de los discos fue de 0.55 cm. El papel filtro fue Whatman® número 1.

Los pozos que se hicieron en el medio de cultivo se realizaron con un monohorador de 0.39 cm de diámetro.

Los medios de cultivo líquidos para el conteo de células se hicieron en tubos de vidrio de 20 mm x 200 mm con tapones de plástico.

La incubadora a 35°C fue de la marca J. M. Ortiz.

El material y los medios de cultivo se esterizaron en autoclave.

Para homogeneizar los cultivos bacterianos líquidos contenidos en tubos de ensaye se utilizó un supermezclador Lab-Line Instruments Inc.

Los halos de inhibición fueron medidos con vernier.

Los antibióticos de referencia ampicilina y cloranfenicol fueron de los laboratorios Aldrich Chemical, USA.

Los medios de cultivo para antibióticos números 1 y 2 se prepararon según lo indica el manual Bioxon.² Los componentes de los medios fueron de los mismos laboratorios Bioxon a excepción del extracto de carne y la dextrosa que fueron de los laboratorios Merck, USA.

El dimetilsulfóxido empleado para la disolución de los diterpenos fue de los laboratorios J. T. Baker, México.

Todo material que lo requirió, antes de ser empleado en las pruebas biológicas,

² Cfr. *Manual Bioxon*. 1989. p. 55.

fue esterilizado en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 20 minutos.

3.3. Métodos.

La actividad antibacteriana de los diterpenos se comparó con la actividad antibacteriana de antibióticos conocidos. Específicamente se compararon las concentraciones de los diterpenos y de los antibacterianos de referencia que produjeran el mismo tamaño de halo de inhibición. Para esto, se determinaron experimentalmente las curvas dosis-respuesta (concentración del antibacteriano-halo de inhibición) para cada microorganismo de prueba con un antibacteriano de referencia. Posteriormente se realizaron los antibiogramas para los cuatro diterpenos con cada uno de los microorganismos de prueba y los halos de inhibición resultantes se interpolaron en las curvas dosis-respuesta correspondientes comparándose la potencia de cada diterpeno con los antibacterianos de referencia.

Se utilizaron dos métodos de difusión en agar.³ En uno de ellos se emplearon discos de papel filtro y en el otro se efectuaron pozos en el medio de cultivo.

³ La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos reconoce dos métodos generales para la evaluación de la actividad antibacteriana de los compuestos, el método de difusión en agar y el turbidimétrico (cfr. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*, Sexta edición, 1994, p. 79) Estos dos métodos generales son reconocidos también en recientes ediciones de las farmacopeas de Estados Unidos (cfr. *U.S. Pharmacopoeia USP 23 National Formulary NF 18*, United States Pharmacopoeia Convention, Inc. 1994, p. 1690) e Inglaterra (cfr. *British Pharmacopoeia* 1993 p. A167).

El método de difusión en agar es la técnica que se utiliza más comúnmente (cfr. Pelzcar, M. J. Jr. *Microbiology*, Fifth edition, McGraw-Hill, New York, 1986, p. 536; Tortora, G. J., Funke, Berdell, R. y Case, Christine, L. *Introducción a la Microbiología*, Tercera edición, Traducción de Rafael R. Anglada, Acibia, Zaragoza, 1993, p. 494) y se fundamenta en la difusión del compuesto a evaluar desde un punto de aplicación a través de una superficie de agar inoculado con el microorganismo de prueba. A partir del disco se origina un gradiente de concentración del compuesto en el medio. Si el compuesto tiene propiedades antibacterianas contra ese microorganismo originará zonas de inhibición de crecimiento del microorganismo. El tamaño de la zona de inhibición está relacionada con la concentración del compuesto (cfr. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*, *Ob. cit.* p. 79 y Jawetz, Ernest y Melnick, Joseph L. *Manual de Microbiología Médica*, Manual Moderno, México, D.F., 1981, p. 116).

Dentro de los métodos de difusión en agar destacan tres variantes distinguiéndose por la forma en que se hace la aplicación del compuesto en el medio de cultivo. El que se emplea con más frecuencia utiliza discos de papel filtro. Otro emplea cilindros de acero con medidas estandarizadas y una tercera variante implica hacer perforaciones en el medio de cultivo (pозos) en donde se coloca el compuesto a evaluar (cfr. *Manual de Medios de Cultivo Merck* 1994, p. 47).

Para evaluar la actividad antibacteriana de los diterpenos contra *Escherichia coli*, *Vibrio campbellii*, *Flavobacterium marinotyticum* y *Curtobacterium albidum* se utilizó el método de disco de papel. Para *Bacillus subtilis* se empleó el método de pozo en agar. Este segundo método se utilizó también para *Escherichia coli*.⁴

3.3.1. Método de disco de papel.

3.3.1.1. Preparación de los antibacterianos de referencia.

En la Tabla 3.1 se indican los antibacterianos de referencia para cada microorganismo de prueba y la concentración de las disoluciones de trabajo preparadas para realizar la curva dosis-respuesta.

Para *Flavobacterium marinotyticum*, *Vibrio campbellii* y *Curtobacterium albidum* se realizaron ensayos de sensibilidad de estas bacterias a los antibacterianos ampicilina, bacitracina, estreptomina y cloranfenicol. Los resultados indicaron que los antibacterianos de referencia adecuados fueron los indicados en esta tabla.

Tabla 3.1 Antibacterianos de referencia.

Microorganismo de prueba	Antibacteriano de referencia	Concentración de la disolución de trabajo ^A
<i>Escherichia coli</i>	cloranfenicol ^B	1 mg/ml
<i>Vibrio campbellii</i>	cloranfenicol	1 mg/ml
<i>Flavobacterium marinotyticum</i>	estreptomina	1 mg/ml
<i>Curtobacterium albidum</i>	estreptomina	1 mg/ml

^A Las disoluciones de trabajo se prepararon de acuerdo a la Farmacopea de México.⁵

^B La Farmacopea de México y de Estados Unidos establecen que la cepa *Escherichia coli* (ATCC 10536) es sensible al cloranfenicol.⁶

⁴ *Escherichia coli* (ATCC 10563) se empleó en los dos métodos por ser una cepa estándar en las determinaciones de actividades antibacterianas de compuestos (cfr. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* Ob. cit. p. 84 y *U.S. Pharmacopoeia USP 23 National Formulary NF 18* Ob. cit. p. 1694).

⁵ Cfr. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* Ob. cit. p. 87.

⁶ Cfr. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* Ob. cit. p. 86 y *U.S. Pharmacopoeia USP 23 National Formulary NF 18* Ob. cit. p. 1694).

3.3.1.2. Preparación de los diterpenos.

Para la evaluación de la actividad antibacteriana se prepararon disoluciones de 7 α -acetoxiroyleanona, fruticulina A, tilifolidiona y 19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 20 mg/ml cada una.

3.3.1.3. Preparación de los microorganismos de prueba.

Al inicio de las pruebas biológicas se hicieron subcultivos de las cepas bacterianas en medio de cultivo para antibióticos número 1. Para hacer las antibiogramas se emplearon los microorganismos de los subcultivos.

Para hacer los subcultivos se inocularon los medios con la técnica de siembra por estría. Los medios se incubaron a 35 °C durante 24 horas a excepción de *Flavobacterium marinotypicom* que se incubó durante 48 horas. Los subcultivos se preservaron a 4 °C.

3.3.1.4. Preparación de los medios de cultivo.

Se utilizó el medio de cultivo para antibióticos número 2. Se prepararon en total dieciséis placas con el medio de cultivo para cada microorganismo de prueba: cuatro para la curva dosis-respuesta con el antimicrobiano de referencia y doce para los antibiogramas con los diterpenos.

Se distribuyeron 21 ml de medio de cultivo en cada caja de Petri (placa) y se esperó a que el agar solidificara antes de hacer los antibiogramas (los medios de cultivo se prepararon el mismo día en que se ocuparon para hacer la pruebas biológicas).

3.3.1.5. Preparación de los discos.

Los discos de papel filtro, después de ser cortados con una perforadora, fueron

esterilizados en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 20 minutos. En condiciones estériles, los discos se colocaron sobre tubos capilares (dos tubos colocados en paralelo a una distancia aproximada de 1 mm) y con una micropipeta se hicieron adiciones de 5 µl de las disoluciones de los antibacterianos de referencia, de las disoluciones de los diterpenos o de los disolventes (blancos), según fuera el caso, hasta completar la cantidad requerida. Todas las adiciones se hicieron en el mismo lado del disco. Entre una y otra adición se esperó el tiempo necesario para que el disolvente se evaporara. De la misma forma, después de hacer la última adición y antes de colocar el disco de papel filtro sobre el medio de cultivo se esperó a que el disolvente se evaporara.

3.3.1.6. Bioensayos para trazar las curvas dosis-respuesta.

La realización de las curvas dosis-respuesta estuvo de acuerdo, en su mayoría, a lo establecido por la Farmacopea de México.⁷ Las modificaciones que se hicieron quedan descritas en esta sección.

Se prepararon disoluciones con concentraciones diferentes para cloranfenicol y estreptomina haciendo diluciones de las disoluciones de trabajo indicadas en la Tabla 3.1. Como diluyente se utilizó agua destilada.

En la Tabla 3.2 se muestran las concentraciones para cada antibacteriano de referencia correspondientes a los cinco puntos de las curvas.

Se hizo un antibiograma para cada punto de la curva excepto para el punto C que fue la concentración media y se empleó como punto de referencia o de corrección de la curva y se incluyó en todos los antibiogramas.

⁷ Cfr. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* Ob. cit. pp 82 y 83.

Tabla 3.2 Concentraciones de los antibacterianos de referencia correspondientes a los cinco puntos de las curvas dosis-respuesta.

Punto de la curva dosis-respuesta	Concentración de cloranfenicol ($\mu\text{g}/\text{disco}$)	Concentración de estreptomicina ($\mu\text{g}/\text{disco}$)
A	0.6	1.3
B	1.3	2.5
C	2.5	5
D	5	10
E	10	20

La preparación de los antibiogramas queda descrita a continuación. En un medio de cultivo se sembró por estria al microorganismo de prueba en toda la superficie (la carga microbiana fue aproximadamente la misma en todos los casos). Inmediatamente después se colocaron tres discos de papel filtro a los que previamente se les aplicó el antibacteriano de referencia con la concentración del punto de la curva correspondiente. En forma alterna, se colocaron tres discos con la concentración media de la curva. Finalmente, se colocó un disco con el disolvente como blanco. Esto se hizo para cada punto de la curva.

Los discos se colocaron con la superficie donde se hicieron las adiciones de la sustancia tocando el medio de cultivo. Al momento de colocarlos se presionaron ligeramente contra la superficie del medio con unas pinzas estériles.

Se incubaron las placas a 35 °C durante 24 horas. Después de la incubación se midieron los halos de completa inhibición con un vernier (se incluyó el diámetro de los discos).⁸ Para los puntos A, B, D y E se midieron tres halos de inhibición mientras que para el punto C se midieron doce.

⁸ En todos los antibiogramas, tanto como para el método de discos como para el método de pozos, los halos de inhibición incluyeron el diámetro de los discos o de los pozos, según fuera el caso. También en todos los antibiogramas se midió la inhibición completa (cfr. *Difco Manual* Tenth edition. Detroit, Michigan; 1984. p. 846 y Bauer, A. W *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method *The American Journal of Clinical Pathology* 36, (1966). p. 493).

3.3.1.7. Bioensayos para determinar la actividad antibacteriana de los diterpenos.

Para hacer la evaluación de la actividad antibacteriana de los diterpenos se prepararon los antibiogramas de la siguiente forma. En el medio de cultivo se sembró el microorganismo de prueba de la misma forma en la que se hizo para la curva dosis-respuesta. En seguida se aplicaron tres discos de papel filtro conteniendo la concentración media de la curva dosis-respuesta del antibacteriano de referencia. Se colocó el disco de papel conteniendo 500 µg del diterpeno a evaluar y otros dos discos como blancos, uno con el disolvente del antibacteriano de referencia y el otro con DMSO (disolvente para los diterpenos). Al igual que en los antibiogramas de las curvas dosis-respuesta, los discos se colocaron con la superficie donde se hicieron las adiciones de las sustancias tocando el medio de cultivo y presionándolos ligeramente contra la superficie del medio con unas pinzas estériles.

Las placas se incubaron a 35 °C durante 24 horas. Al término del período de incubación se midieron los halos de completa inhibición con un vernier.

Estas pruebas se realizaron por triplicado para cada diterpeno con cada uno de los microorganismos de prueba.

3.3.2. Método de pozo en agar.

3.3.2.1. Preparación de los antibacterianos de referencia.

En la Tabla 3.3 se indican los antibacterianos de referencia para *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* y la concentración de las disoluciones de trabajo preparadas para realizar la curva dosis-respuesta.

Para *Bacillus subtilis* se realizaron ensayos de sensibilidad a los antibacterianos ampicilina, estreptomycin y cloranfenicol. Los resultados indicaron que el antibacteriano de referencia adecuado fue el indicado en esta tabla.

Tabla 3.3 Antibacterianos de referencia.

Microorganismo de prueba	Antibacteriano de referencia	Concentración de la disolución de trabajo ^A
<i>Escherichia coli</i>	cloranfenicol	1 mg/ml
<i>Bacillus subtilis</i>	ampicilina	1 mg/ml

^A Las disoluciones de trabajo se prepararon de acuerdo a la Farmacopea de México.⁹

3.3.2.2. Preparación de los diterpenos.

Las cuatro disoluciones de los diterpenos que se utilizaron en el método de disco de papel se diluyeron con DMSO hasta una concentración de 2.5 mg/ml.

3.3.2.3. Preparación de los microorganismos de prueba.

Se prepararon cultivos líquidos de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* de la siguiente forma. Cada cepa se inoculó en 5 ml de medio de cultivo para antibióticos número 1. Los tubos de ensaye con los cultivos se incubaron a 35 °C durante 24 horas con una inclinación aproximadamente de 30°. La preservación de estos cultivos se hizo a 4 °C.

Se hizo el conteo de células de cada medio de cultivo por el método de dilución y vaciado en placa (un método de recuento de células viables).¹⁰ Las diluciones se hicieron con buffer de fosfatos (pH = 7).

3.3.2.4. Preparación de los medios de cultivo.

Se utilizó el medio de cultivo para antibióticos número 1. Al igual que para el método de discos de papel, se prepararon dieciséis placas con el medio de cultivo para

⁹ Cfr. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* Ob. cit. pp 86 y 87

¹⁰ Cfr. Ramirez Gama R. M. (editor) *Manual de Prácticas de Microbiología General*. Facultad de Química, UNAM. 1996 pp. 138-142.

cada microorganismo de prueba: cuatro para la curva dosis-respuesta con el antimicrobiano de referencia y doce para los antibiogramas con los diterpenos.

Se distribuyó el medio de cultivo en tubos de ensaye, 15 ml en cada tubo. Antes de que solidificaran los medios (a una temperatura de 40 °C) se agregaron los cultivos líquidos de los microorganismos de prueba. Para *Bacillus subtilis* se agregaron 150 µl del cultivo líquido y para *Escherichia coli* 15 µl.¹¹ Las mezclas medio de cultivo-inóculo se homogeneizaron con un supermezclador.

Los medios de cultivo inoculados con los microorganismos de prueba se distribuyeron en cajas de Petri y se esperó a que el agar solidificara antes de hacer los antibiogramas (los medios de cultivo se prepararon el mismo día en que se ocuparon para hacer las pruebas biológicas).

3.3.2.5. Preparación de los pozos.

Después de que los medios de cultivo inoculados solidificaron en las cajas de Petri (los medios solidificaron en 30 minutos aproximadamente), se realizaron las perforaciones con un monohoradador de 0.39 cm de diámetro. Se eliminaron los fragmentos de medio de cultivo que quedaron dentro de las perforaciones con la ayuda de una aguja de acero esterilizada. Las dimensiones promedio de los pozos fueron de 0.39 cm de diámetro con 0.20 cm de espesor.

3.3.2.6. Bioensayos para trazar las curvas dosis-respuesta.

La forma de trazar las curvas dosis-respuesta en el método de pozos fue semejante a la realizada con el método de disco de papel. Las diferencias fueron las

¹¹ La diferencia en los volúmenes agregados para los cultivos líquidos de *B. subtilis* y *E. coli* se debió a que el cultivo líquido de *E. coli* estaba diez veces más concentrado que el cultivo de *B. subtilis* (cfr. Resultados). Sin embargo, la carga microbiana fue la misma.

propias de los dos métodos (la forma de inocular a los microorganismos y de aplicar a los compuestos en los medios de cultivo).

En la Tabla 3.4 se dan las concentraciones de cloranfenicol y ampicilina utilizadas en los antibiogramas para el trazo de la curva dosis-respuesta y las concentraciones de las disoluciones que se prepararon por dilución a partir de las disoluciones de trabajo de la Tabla 3.3. El diluyente fue agua destilada en ambos casos.

Tabla 3.4 Concentraciones de los antibacterianos de referencia correspondientes a los cinco puntos de las curvas dosis-respuesta y concentraciones de las disoluciones utilizadas.

Punto de la curva dosis-respuesta	Concentración de cloranfenicol ($\mu\text{g/pozo}$)	Disolución de cloranfenicol (mg/ml)	Concentración de ampicilina ($\mu\text{g/pozo}$)	Disolución de ampicilina (mg/ml)
A	0.6	0.06	0.6	0.06
B	1.3	0.13	1.3	0.13
C	2.5	0.25	2.5	0.25
D	5	0.5	5	0.5
E	10	1	10	1

A continuación se describe la preparación de los antibiogramas. Se hicieron siete pozos distribuidos en forma regular en el medio de cultivo inoculado con el microorganismo de prueba. Tres de ellos se llenaron con 10 μl del antibacteriano de referencia con la concentración media de la curva. En otros tres pozos (en forma alterna) se vertieron 10 μl del antibacteriano de referencia con la concentración del punto de la curva correspondiente. En el séptimo pozo (localizado en el centro) se agregaron 10 μl del disolvente como blanco. El proceso se repitió para cada uno de los puntos de la curva. Así, se efectuaron cuatro antibiogramas: uno para cada punto de la curva a excepción del punto C que se incluyó en las cuatro pruebas.

Los antibiogramas se incubaron a 35 °C durante 18 horas.¹² Después de la incubación se midieron los halos de inhibición con un vernier.

3.3.2.7. Bioensayos para determinar la actividad antibacteriana de los diterpenos.

Los antibiogramas para la evaluación de la actividad antibacteriana de los cuatro diterpenos se hicieron en forma semejante a los antibiogramas con el método de disco de papel. Después de inocular el medio de cultivo con el microorganismo de prueba se hicieron seis pozos. Tres pozos se llenaron con la concentración media del antibacteriano de referencia. El pozo localizado en el centro del medio se llenó con 10 µl de la disolución del diterpeno a evaluar (equivalente a 25 µg del diterpeno). En los dos pozos restantes se vertieron 10 µl de los blancos (en uno de ellos el disolvente del antibacteriano de referencia y en el otro DMSO).

Antes de incubar se esperó a que las disoluciones de los diterpenos difundieran lo más posible en los medios de cultivo a temperatura ambiente. El tiempo de espera estuvo limitado por la velocidad de crecimiento de los microorganismos a esa temperatura de manera que en el momento en que se observó en forma macroscópica crecimiento bacteriano las placas se metieron a incubar. Se esperaron 7 horas para los antibiogramas con *Bacillus subtilis* y 5 horas para los antibiogramas con *Escherichia coli*. Transcurrido este tiempo las placas se incubaron a 35 °C durante 18 horas para posteriormente medir los halos de inhibición con un vernier.

La evaluación de los cuatro diterpenos con los dos microorganismos de prueba se realizaron por triplicado.

¹² Este tiempo de incubación es el indicado por las Farmacopeas de México, Estados Unidos e Inglaterra para este tipo de antibiogramas (cfr. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* Ob. cit. p. 83; *U.S. Pharmacopoeia USP 23 National Formulary NF 18* Ob. cit. p. 1694 y *British Pharmacopoeia* Ob. cit. p. A167)

3.4. Resultados.

3.4.1. Método de disco de papel.

3.4.1.1. Curvas dosis-respuesta.

Se realizaron cuatro curvas dosis-respuesta (Tabla 3.5). En las Tablas 3.6, 3.7, 3.8 y 3.9 se presentan los promedios de los halos de inhibición para cada uno de los cinco puntos de las curvas. Los halos de inhibición de cada disco se midieron por triplicado. Los valores reportados están corregidos con el punto medio de la curva (la corrección se hizo según lo indica la Farmacopea de México¹³). La incertidumbre en las lecturas fue de ± 0.05 cm. Los disolventes de los antibacterianos de referencia (blancos) no mostraron halos de inhibición.

Debajo de cada tabla se muestra el gráfico resultante con los valores experimentales, la regresión lineal y su coeficiente de correlación (Figuras 3.2, 3.3, 3.4 y 3.5).

Tabla 3.5 Curvas dosis-respuesta.

Microorganismo de prueba	Antibacteriano de referencia
<i>Escherichia coli</i>	cloranfenicol
<i>Vibrio campbellii</i>	cloranfenicol
<i>Flavobacterium marinotypicum</i>	estreptomocina
<i>Curtobacterium albidum</i>	estreptomocina

¹³ Cfr. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Ob. cit. p. 83.

Tabla 3.6 Halos de inhibición promedio de la curva dosis-respuesta para *Escherichia coli*.

Punto de la curva	Concentración (C) de cloranfenicol (µg/disco)	log C	Halo de inhibición (cm)
A	0,6	-0,222	0,51
B	1,3	0,114	0,91
C	2,5	0,398	1,30
D	5,0	0,699	1,85
E	10,0	1,000	2,00

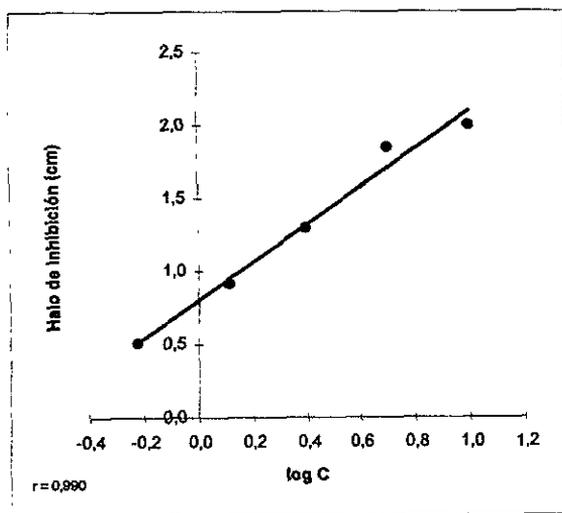


Figura 3.2 Curva dosis-respuesta para *Escherichia coli*

Tabla 3.7 Halos de inhibición promedio de la curva dosis-respuesta para *Vibrio campbellii*.

Punto de la curva	Concentración (C) de cloranfenicol (µg/disco)	log C	Halo de inhibición (cm)
A	0,6	-0,222	0,42
B	1,3	0,114	1,12
C	2,5	0,398	1,35
D	5,0	0,699	1,64
E	10,0	1,000	2,18

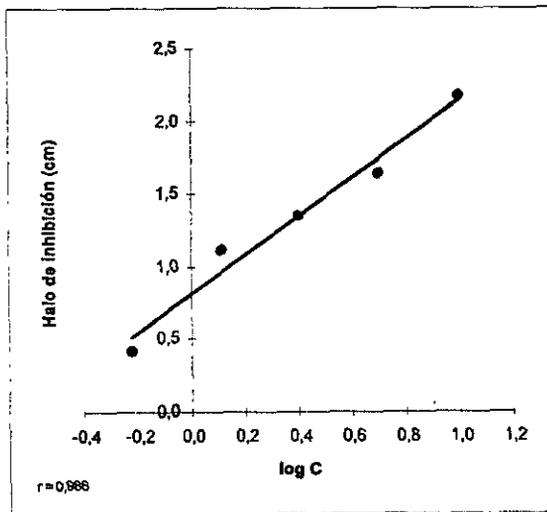


Figura 3.3 Curva dosis-respuesta para *Vibrio campbellii*.

Tabla 3.8 Halos de inhibición promedio de la curva dosis-respuesta para *Flavobacterium marinotypicum*.

Punto de la curva	Concentración (C) de estreptomicina (µg/disco)	log C	Halo de inhibición (cm)
A	1,3	0,097	1,71
B	2,5	0,398	2,00
C	5,0	0,699	2,07
D	10,0	1,000	2,36
E	20,0	1,301	2,36

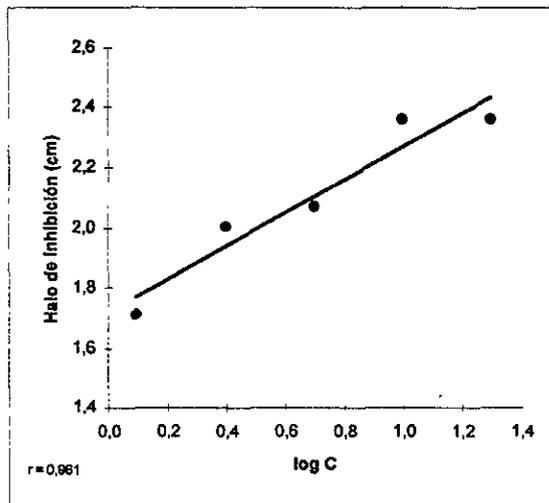


Figura 3.4 Curva dosis-respuesta para *Flavobacterium marinotypicum*.

Tabla 3.9 Halos de inhibición promedio de la curva dosis-respuesta para *Curtobacterium albidum*.

Punto de la curva	Concentración (C) de estreptomicina (µg/disco)	log C	Halo de inhibición (cm)
A	1,3	0,097	1,62
B	2,5	0,398	1,77
C	5,0	0,699	1,85
D	10,0	1,000	2,09
E	20,0	1,301	2,08

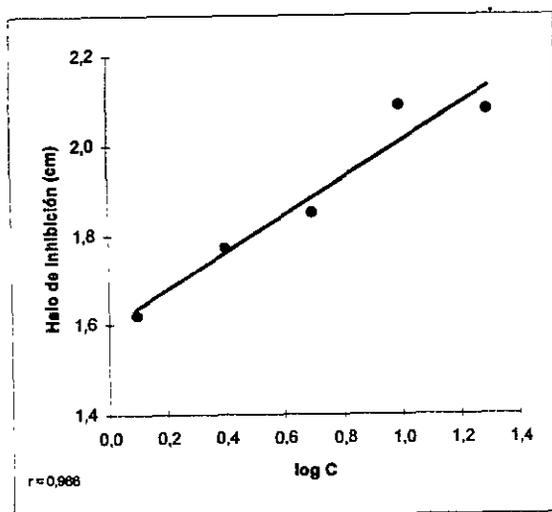


Figura 3.5 Curva dosis-respuesta para *Curtobacterium albidum*.

3.4.1.2. Actividad antibacteriana de 7 α -acetoxiroyleanona, fruticulina A, tilifolidiona y 19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona.

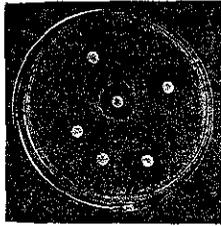
Los bioensayos realizados para la determinación de la actividad antibacteriana de cada uno de los diterpenos por el método de disco de papel están dados en las Figuras 3.6, 3.7, 3.8 y 3.9. Cada figura corresponde a un microorganismo de prueba. En cada caso se muestra una de las tres repeticiones realizadas para cada diterpeno con cada microorganismo.

Los resultados respectivos de los bioensayos están dados en las Tablas 3.10, 3.11, 3.12 y 3.13. En la segunda columna se muestran los valores promedio de los halos de inhibición producidos por los diterpenos. El valor promedio considera dos experimentos (los resultados de uno de los tres experimentos se descartaron porque los discos con DMSO (blancos) mostraron halos de inhibición).

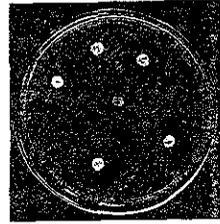
En la tercer y cuarta columnas de las tablas se presentan las concentraciones de los antibacterianos de referencia que producen los mismos halos de inhibición que la concentración evaluada de los diterpenos (500 $\mu\text{g}/\text{disco}$). Estos valores son obtenidos al interpolar los halos de inhibición de los diterpenos en las regresiones lineales de las curvas dosis-respuesta correspondientes (en la tercer columna están dados los logaritmos de las concentraciones de los antibacterianos de referencia ($\log C$) y en la cuarta columna los antilogartimos de los valores anteriores).

Fue una observación general que después del tiempo de incubación los discos quedaron impregnados con cierta cantidad de los diterpenos.

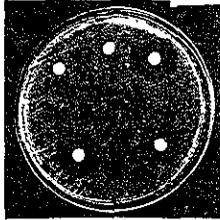
7 α -acetoxiroyleanona



Fruticulina A



Tilifolidiona



19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona

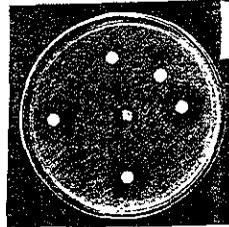
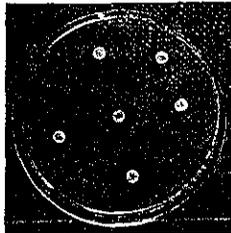
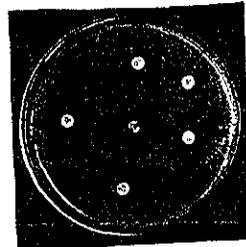


Figura 3.6 Actividad antibacteriana de los diterpenos y de cloranfenicol contra *Escherichia coli* (el disco central corresponde al diterpeno, el resto de los halos de inhibición a cloranfenicol y los dos discos sin halo a los blancos)

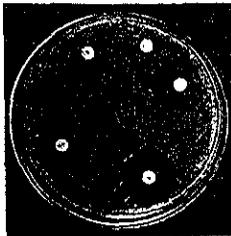
7 α -acetoxiroyleanona



Fruticulina A



Tilifolidiona



19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona

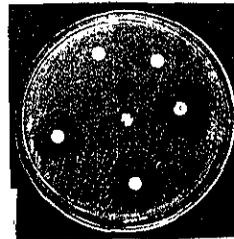
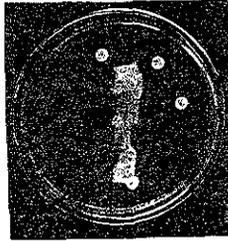
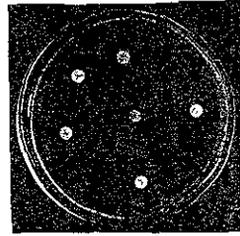


Figura 3.7 Actividad antibacteriana de los diterpenos y de cloranfenicol contra *Vibrio campbellii* (el disco central corresponde al diterpeno, el resto de los halos de inhibición a cloranfenicol y los dos discos sin halo a los blancos)

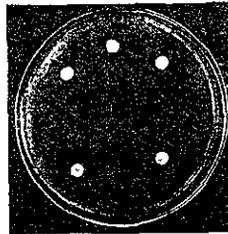
7 α -acetoxiroyleanona



Fruticulina A



Tilifolidiona



19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona

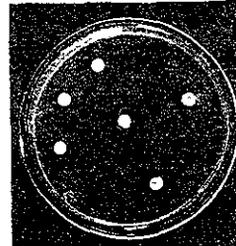
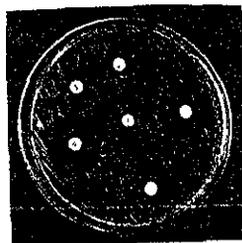
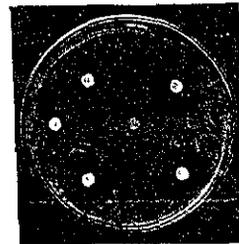


Figura 3.8 Actividad antibacteriana de los diterpenos y de estreptomycinina contra *Flavobacterium marinotipicum* (el disco central corresponde al diterpeno el resto de los halos de inhibición a estreptomycinina y los dos discos sin halo a los blancos)

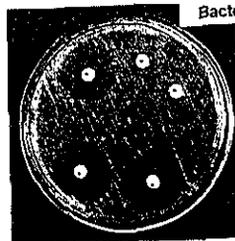
7 α -acetoxiroyleanona



Fruticulina A



Tilifolidiona



19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona

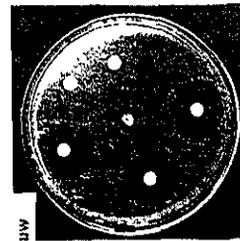


Figura 3.9 Actividad antibacteriana de los diterpenos y de estreptomycinina contra *Curtobacterium albidum* (el disco central corresponde al diterpeno el resto de los halos de inhibición a estreptomycinina y los dos discos sin halo a los blancos)

Tabla 3.10 Actividad antibacteriana de los diterpenos evaluados contra *Escherichia coli* comparada con la actividad de cloranfenicol.

Diterpeno (500 µg/disco)	Halo de inhibición (cm)	log C	Concentración (C) equivalente de cloranfenicol (µg)
Fruticulina A	1,02	0,171	1,48
19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona	0,96	0,124	1,33
7α-acetoxiroyleanona	0,88	0,062	1,15
Tilifolidiona	0,55	N. A. ^A	N. A.

^A No aplica.

Tabla 3.11 Actividad antibacteriana de los diterpenos evaluados contra *Vibrio campbellii* comparada con la actividad de cloranfenicol.

Diterpeno (500 µg/disco)	Halo de inhibición (cm)	log C	Concentración (C) equivalente de cloranfenicol (µg)
Fruticulina A	1,02	0,157	1,44
7α-acetoxiroyleanona	0,99	0,135	1,36
19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona	0,97	0,120	1,32
Tilifolidiona	0,76	-0,037	0,92

Tabla 3.12 Actividad antibacteriana de los diterpenos evaluados contra *Flavobacterium marinotopicum* comparada con la actividad de estreptomina.

Diterpeno (500 µg/disco)	Halo de inhibición (cm)	log C	Concentración (C) equivalente de estreptomina (µg)
Fruticulina A	1,08	-1,151	0,07
Tilifolidiona	0,77	-1,713	0,02
7α-acetoxiroyleanona	0,55	N. A. ^A	N. A.
19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona	0,55	N. A.	N. A.

^A No aplica.

Tabla 3.13 Actividad antibacteriana de los diterpenos evaluados contra *Curtobacterium albidum* comparada con la actividad de estreptomocina.

Diterpeno (500 µg/disco)	Halo de inhibición (cm)	log C	Concentración (C) equivalente de estreptomocina (µg)
Fruticulina A	0,62	-2,365	0,0043
19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona	0,55	N. A. ^A	N. A.
7α-acetoxiroyleanona	0,55	N. A.	N. A.
Tilifolidiona	0,55	N. A.	N. A.

^A No aplica.

Aunque los halos de inhibición reportados se refieren a inhibiciones completas del crecimiento de los microorganismos alrededor de los discos, 7α-acetoxiroyleanona mostró halos de inhibición no-total mayores a los dados anteriormente. Estos halos de inhibición no-total o parcial se refieren a que solo hay una disminución visual en la densidad de la población bacteriana al rededor del disco. Para *Escherichia coli* el halo de inhibición parcial promedio fue de 2 cm y para *Vibrio campbellii* de 1.3 cm.

3.4.2. Método de pozo en agar.

3.4.2.1. Conteo de células.

En las Tablas 3.14 y 3.15 se dan los resultados del conteo de células de los cultivos líquidos de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Los valores mostrados son los promedios de las unidades formadoras de colonias (UFC) de las diluciones realizadas.

Tabla 3.14 Conteo de células para *Escherichia coli*.

Dilución	UFC
10 ⁻⁵	54
10 ⁻⁶	5

Células por mililitro de cultivo: 3×10^5

Tabla 3.15 Conteo de células para *Bacillus subtilis*.

Dilución	UFC
10^{-4}	37
10^{-5}	6

Células por mililitro de cultivo: 5×10^6

3.4.2.2. Curvas dosis-respuesta.

Se efectuaron dos curvas dosis-respuesta (Tabla 3.16). En las Tablas 3.17 y 3.18 se muestran los promedios de los halos de inhibición para los cinco puntos de las curvas. Al igual que con el método de disco de papel, los halos de inhibición de cada disco se midieron por triplicado y los valores reportados están corregidos con el punto medio de la curva (la corrección se hizo según la Farmacopea de México¹⁴). La incertidumbre de las lecturas fue de ± 0.05 cm. Los disolventes de los antibacterianos de referencia (blancos) no mostraron halos de inhibición.

Debajo de cada tabla se muestra el gráfico resultante con los valores experimentales, la regresión lineal y su coeficiente de correlación (Figuras 3.10 y 3.11).

Tabla 3.16 Curvas dosis-respuesta.

Microorganismo de prueba	Antibacteriano de referencia
<i>Escherichia coli</i>	cloranfenicol
<i>Bacillus subtilis</i>	ampicilina

¹⁴ Cfr. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Ob. cit. p. 83

Tabla 3.17 Halos de inhibición promedio de la curva dosis-respuesta para *Escherichia coli*.

Punto de la curva	Concentración (C) de cloranfenicol (µg/pozo)	log C	Halo de inhibición (cm)
A	0,6	-0,222	0,14
B	1,3	0,114	0,07
C	2,5	0,398	1,45
D	5,0	0,699	2,11
E	10,0	1,000	2,34

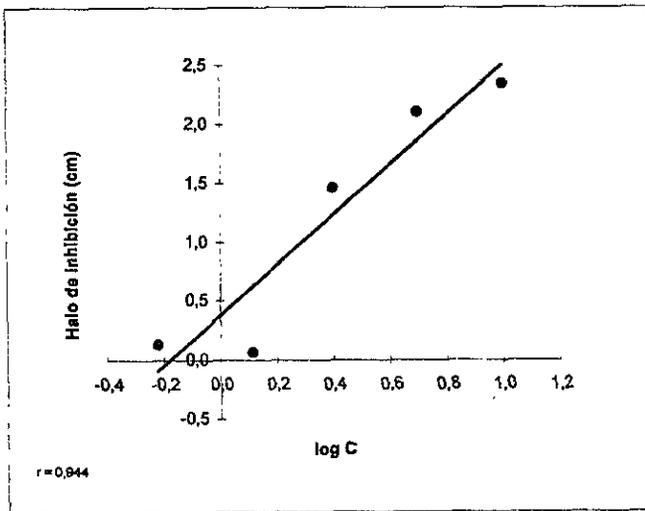


Figura 3.10 Curva dosis-respuesta para *Escherichia coli*.

Tabla 3.18 Halos de inhibición promedio de la curva dosis-respuesta para *Bacillus subtilis*.

Punto de la curva	Concentración (C) de ampicilina (µg/pozo)	log C	Halo de inhibición (cm)
A	0,6	-0,222	1,56
B	1,3	0,114	1,98
C	2,5	0,398	2,16
D	5,0	0,699	2,11
E	10,0	1,000	2,38

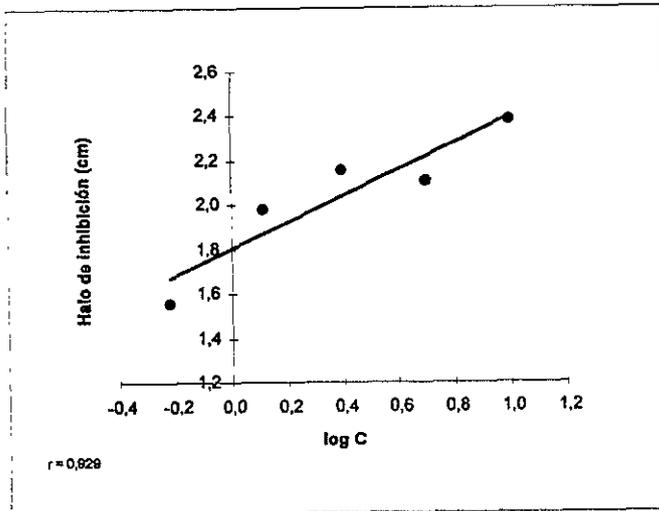


Figura 3.11 Curva dosis-respuesta para *Bacillus subtilis*.

3.4.2.3. Actividad antibacteriana de 7 α -acetoxiroyleanona, fruticulina A, tilifolidiona y 19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona.

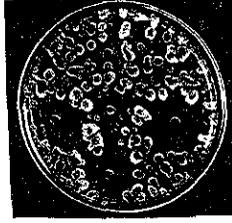
En las Figuras 3.12 y 3.13 se muestran una de las tres repeticiones de los bioensayos para determinar la actividad antibacteriana de los diterpenos contra *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* por el método de pozo en agar. Los resultados están dados en las Tablas 3.19 y 3.20. La información proporcionada en la segunda, tercera y cuarta columnas de estas tablas es equivalente a la información dada en las columnas correspondientes de las Tablas 3.10, 3.11, 3.12 y 3.13. A diferencia con el método de disco de papel, los halos de inhibición mostrados son el promedio de los tres experimentos. En todos los casos, los disolventes de los antibacterianos de referencia y el DMSO no mostraron halos de inhibición.

Tabla 3.19 Actividad antibacteriana de los diterpenos evaluados contra *Escherichia coli* comparada con la actividad de cloranfenicol.

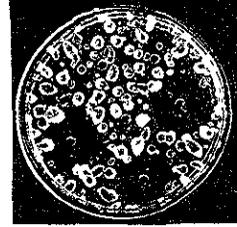
Diterpeno (25 μ g/pozo)	Halo de inhibición (cm)	log C	Concentración (C) equivalente de cloranfenicol (μ g)
Fruticulina A	1,24	0,406	2,55
19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona	1,07	0,326	2,12
7 α -acetoxiroyleanona	0,97	0,278	1,90
Tilifolidiona	0,58 ^A	0,094	1,24

^A Este es el promedio de tres lecturas de un sólo halo de inhibición. En las otras dos repeticiones no hubo halo de inhibición.

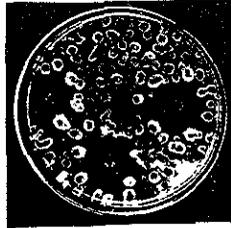
7 α -acetoxiroyleanona



Fruticulina A



Tilifolidiona



19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona

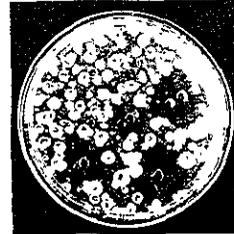
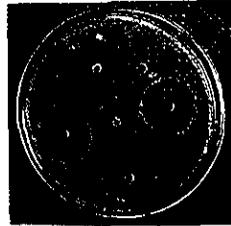
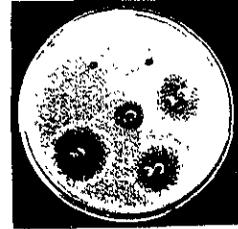


Figura 3.12 Actividad antibacteriana de los diterpenos y de cloranfenicol contra *Escherichia coli* (el pozo central corresponde al diterpeno, el resto de los halos de inhibición a cloranfenicol y los dos pozos sin halo a los blancos)

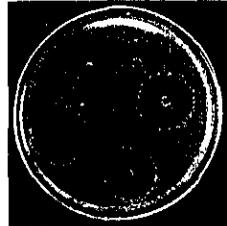
7 α -acetoxiroyleanona



Fruticulina A



Tilifolidiona



19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona

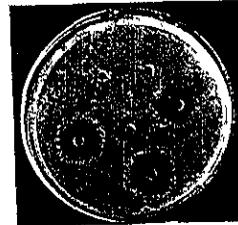


Figura 3.13 Actividad antibacteriana de los diterpenos y de ampicilina contra *Bacillus subtilis* (el pozo central corresponde al diterpeno, el resto de los halos de inhibición a ampicilina y los dos pozos sin halo a los blancos)

Tabla 3.20 Actividad antibacteriana de los diterpenos evaluados contra *Bacillus subtilis* comparada con la actividad de ampicilina.

Diterpeno (25 µg/pozo)	Halo de inhibición (cm)	log C	Concentración (C) equivalente de ampicilina (µg)
7 α -acetoxiroleanona	1,66	-0,244	0,57
Fruticulina A	1,49	-0,533	0,29
19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona	0,39	N. A. [^]	N. A.
Tilifolidiona	0,39	N. A.	N. A.

[^] No aplica.

También en el método de pozos 7 α -acetoxiroleanona mostró halos de inhibición parcial. Para *Escherichia coli* el promedio de este halo fue de 2 cm.

3.5. Discusión de resultados.

La medición de la actividad antibacteriana mediante métodos de difusión en agar tales como los utilizados en este estudio, proporcionan una primera información sobre la posible actividad antibacteriana de nuevos compuestos. Los resultados obtenidos sirven como un criterio valioso para posteriores estudios *in vitro* y luego *in vivo* para finalmente decidir si se trata de compuestos con uso terapéutico bien sea en humanos o en otros organismos vivos tales como especies marinas. De esta manera, la magnitud de los halos de inhibición producidos por los diterpenos no deben considerarse como un criterio definitivo para concluir sobre su posible uso terapéutico.

La comparación que se hizo de los diterpenos con los antibacterianos de referencia dio una idea aproximada sobre la potencia antimicrobiana de los productos naturales. No obstante, esta comparación no puede ser exacta ya que la respuesta de los microorganismos a diferentes compuestos en los métodos de difusión en agar

depende también de las propiedades de difusión de las diferentes sustancias.¹⁵ Esto debe tomarse en cuenta al comparar entre sí la actividad de los diterpenos.

3.5.1. Método de disco de papel.

Fruticulina A, 19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona y 7 α -acetoxiroyleanona mostraron halos de inhibición contra *Escherichia coli* (Tabla 3.10). La magnitud de los halos es similar para los tres diterpenos lo que sugiere que posean una actividad antimicrobiana parecida contra este microorganismo.

Con *Vibrio campbellii*, fruticulina A, 19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona y 7 α -acetoxiroyleanona mostraron halos de inhibición prácticamente iguales. Esto se hace más evidente al considerar la incertidumbre en las mediciones de los halos de inhibición (\pm 0.05 cm). Tilifolidiona, aunque fue el que tuvo menor halo, también generó inhibición del crecimiento de los microorganismos (Tabla 3.11).

Solamente fruticulina A y tilifolidiona produjeron halos de inhibición contra *Flavobacterium marinotypicum* (Tabla 3.12). La diferencia entre ambos halos de inhibición fue de 3.1 mm. Esto indica que fruticulina A pudiera ser más activa que tilifolidiona.

Fruticulina A fue el único diterpeno que exhibió halo de inhibición contra *Curtobacterium albidum* (Tabla 3.13). De hecho, fue un halo pequeño que excedió por muy poco el diámetro del disco de papel. Es por esto que es muy probable que fruticulina A no sea un antibacteriano efectivo contra este microorganismo.

En todos los casos los antibacterianos de referencia resultaron más potentes que los diterpenos activos contra los microorganismos de prueba. En los dos bioensayos en

¹⁵ Cfr. Marvin, T. *et al.* Comparison of single disc and tube dilution techniques in determining antibiotic sensitivities of Gram-negative pathogens. *Ann Int. Med.* 58, (1963). p. 63.

donde se utilizó cloranfenicol, entre 0.9 y 1.5 μg del antibacteriano generaron el mismo halo de inhibición que 500 μg de cualquiera de los diterpenos activos y para estreptomycin fueron 0.07 μg o menos de este antibacteriano los calculados para producir la misma inhibición que 500 μg de los diterpenos activos. Sin embargo, esta diferencia de concentraciones puede parecer no demasiado grande si se considera que no toda la cantidad de los diterpenos aplicada en los discos de papel difundió en el medio de cultivo. De hecho, 25 μg de los diterpenos que produjeron halos de inhibición contra *Escherichia coli* en el método de disco de papel generaron halos de inhibición semejantes en el método de pozo en agar lo que indica que la potencia relativa de los diterpenos dependió del método utilizado. Esto se discutirá en la siguiente sección.

3.5.2. Método de pozo en agar.

En los métodos de difusión en agar es importante que los compuestos evaluados difundan en el medio de cultivo antes de que haya crecimiento bacteriano.¹⁶ El método de pozo en agar permitió un mayor control sobre la cantidad de diterpeno que difundió del punto de aplicación (pozo) al medio de cultivo. Este control consistió en esperar a que prácticamente toda la disolución de diterpeno en DMSO fuera absorbida por el medio de cultivo inoculado con el microorganismo de prueba antes de incubar. Esto no fue posible con el método de discos de papel: el crecimiento bacteriano es más rápido que el proceso de difusión de un compuesto insoluble en agua (como los diterpenos evaluados) desde un disco de papel filtro al medio de cultivo. Fue por esto que sólo una parte de los 500 μg de diterpeno aplicados en los discos fueron los que realmente difundieron en el medio. Cabe señalar que la difusión de antimicrobianos solubles en agua desde los discos al medio de

¹⁶ Cfr. *British Pharmacopoeia. Ob. cit p. A167 y Jawetz, E. Ob. cit. p.116.*

cultivo es casi instantáneo desde que el disco hace contacto con el medio.¹⁷ Esto fue un factor importante que contribuyó a que la potencia de los antimicrobianos de referencia fuera mayor a la de los diterpenos que generaron halos de inhibición.

El método de pozo en agar proporcionó resultados similares en cuanto a la actividad de los diterpenos evaluados. En la Tabla 3.19 se observa que fruticulina A, 19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona y 7 α -acetoxiroyleanona son los compuestos que mostraron cierta actividad contra *Escherichia coli*. Comparando estos resultados con los de la Tabla 3.10 se tiene que fueron los mismos compuestos los determinados activos contra *Escherichia coli* por el método de disco de papel y que el orden de actividad es el mismo si se considera estrictamente que el halo de inhibición mayor corresponde al compuesto más activo (fruticulina A > 19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona > 7 α -acetoxiroyleanona). El halo de inhibición de tilifolidiona no es muy significativo por dos razones: la primera es que en dos de los tres bioensayos no mostró halo de inhibición. Como está señalado en la tabla, el resultado es el promedio de tres lecturas de un mismo bioensayo. La otra razón es precisamente que el halo de inhibición es ligeramente mayor al diámetro del pozo.

El mayor control sobre la cantidad de diterpeno que difundió en el medio de cultivo con el método de pozo en agar permitió hacer más comparable la potencia de los diterpenos activos con la de los antimicrobianos de referencia. En la Tabla 3.19 se tiene que la cantidad de cloranfenicol necesaria para producir el mismo efecto que los diterpenos activos se encuentra en el rango de 1.9 a 2.60 μ g, ciertamente cantidades poco mayores que en el método de disco de papel (0.9 a 1.5 μ g). Pero lo más significativo es que estas cantidades de cloranfenicol son mucho más comparables con

¹⁷ Cfr. *Difco Manual*. Ob. cit. p. 846

los 25 µg de los diterpenos empleados en el método de pozo en agar que con los 500 µg utilizados en el método de disco de papel.

Para *Bacillus subtilis* solamente 7α-acetoxiroyleanona y fruticulina A mostraron halos de inhibición que, por cierto, fueron los más grandes de los halos medidos tanto en el método de pozos como en el método de disco de papel (Tabla 3.20). También se hace notar que es el único bioensayo en el que fruticulina A no mostró el mayor halo de inhibición.

En general, los halos de inhibición de los diterpenos que mostraron cierta actividad tanto en el método de pozo en agar como en el método de disco de papel fueron de la misma magnitud que los halos de los diterpenos activos evaluados por González *et al.*¹⁸ y por Moujir *et al.*¹⁹ a pesar de que los métodos empleados en la determinación de la actividad antibacteriana no hayan sido los mismos.

Aunque los halos de inhibición de 7α-acetoxiroyleanona no fueron los mayores de los cuatro diterpenos es un compuesto que tienen propiedades antibacterianas interesantes. Los halos de inhibición que se designan en este estudio como "halo de inhibición parcial" son relativamente grandes (2 cm para *Escherichia coli*). Estos halos indican que los microorganismos probados fueron más sensibles a concentraciones menores del diterpeno pero generaron resistencia rápidamente quedando un halo de completa inhibición menor. A pesar de que los microorganismos probados generen cierta resistencia a este compuesto bajo las condiciones de los bioensayos no es un resultado del todo positivo, este compuesto resulta atractivo para continuar con su estudio.

¹⁸ Cfr. González, A. G. *et al.* A first study of antibacterial activity of diterpenes isolated from some *Salvia* species (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 17, (1989), p. 295.

¹⁹ Cfr. Moujir, L. *et al.* Structure-antimicrobial activity relationships of abietane diterpenes from *Salvia* species. *Phytochemistry* 34 (6), 1493-1495, (1993).

Otra observación que cabe mencionar acerca de estos halos de inhibición parcial es que son una prueba de que la 7 α -acetoxiroyleanona difunde bien en los medios de cultivo empleados y son un fuerte indicio de que el resto de los diterpenos evaluados también difunden bien en los medios de cultivo. No obstante, esto no se contrapone con el hecho de que sólo parte de los 500 μ g de los diterpenos aplicados en los discos lograron difundir de los discos de papel al medio de cultivo. Mas bien, esto indica que los 500 μ g fueron un exceso de compuesto y que se pudieron obtener los mismos efectos con menor cantidad.

3.6. Conclusiones.

- Fruticulina A mostró actividad contra las bacterias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Vibrio campbellii* y *Flavobacterium marinotipicum* y la bacteria Gram-positiva *Bacillus subtilis*. Contra la bacteria Gram-positiva *Curtobacterium albidum* fue muy poco activa. De los cuatro diterpenos evaluados fruticulina A fue el que mostró los halos de inhibición mayores salvo en el caso de *Bacillus subtilis* en el que 7 α -acetoxiroyleanona fue el diterpeno con mayor halo de inhibición.
- 7 α -acetoxiroyleanona fue activa contra dos bacterias Gram-negativas: *Escherichia coli* y *Vibrio campbellii* y fue el diterpeno con mayor halo de inhibición contra la bacteria Gram-positiva *Bacillus subtilis*.

La actividad contra *Bacillus subtilis* junto con la actividad reportada para este mismo diterpeno contra *Staphylococcus aureus* incrementa la probabilidad de la generalización de que sea activo contra bacterias Gram-positivas.

- 19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona fue activa contra dos bacterias Gram-negativas: *Escherichia coli* y *Vibrio campbellii*.

- Tilifolidiona solo mostró actividad contra la bacteria Gram-negativa *Vibrio campbellii*.
- Fruticulina A, 7 α -acetoxiroyleanona y 19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona, a diferencia de la gran mayoría de los diterpenos evaluados hasta la fecha, mostraron actividad contra bacterias Gram-negativas, particularmente contra *Escherichia coli*.
- Los antibacterianos de referencia cloranfenicol, ampicilina y estreptomycin fueron considerablemente más activos que los diterpenos que mostraron cierta actividad.
- El método de pozo en agar proporcionó el mismo orden relativo de actividad de los diterpenos evaluados que el método de disco de papel con la diferencia de que hizo más comparable la potencia de los compuestos evaluados con la de los antimicrobianos de referencia.

Relaciones estructura-actividad

Algunos grupos de investigación que han determinado la actividad antibacteriana de diterpenos aislados de salvias también han hecho estudios de relación estructura-actividad comparando la respuesta antibacteriana de una estructura base con diferentes grupos químicos como sustituyentes.¹

En este capítulo se proponen modificaciones a las estructuras de los diterpenos que en este estudio resultaron más activos, esto es, para fruticulina A, 7 α -acetoxiroyleanona y 19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona, con el objeto de realizar estudios estructura-actividad con las moléculas propuestas al determinar su actividad antibacteriana en una posterior investigación.

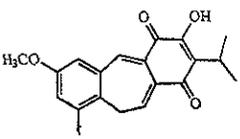
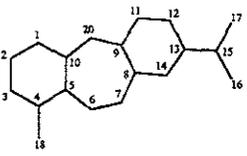
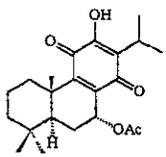
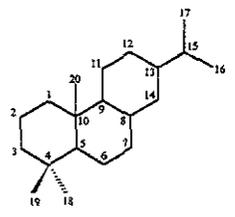
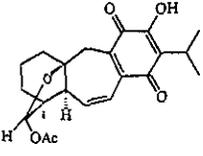
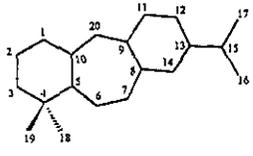
En la Tabla 4.1 está la clasificación de fruticulina A, 7 α -acetoxiroyleanona y 19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona de acuerdo al tipo de estructura de diterpeno que presentan.

Las modificaciones propuestas a las estructuras de los diterpenos están fundamentadas en los resultados de estudios de estructura-actividad con diterpenos de tipo abietano e icetexano que se han realizado anteriormente. Conclusiones de estos estudios son que grupos hidroxilo en las posiciones C-11 y C-12 parecen jugar un papel muy importante en la actividad de diterpenos abietánicos y que esta actividad es modificada por un grupo hidroxilo adicional en la posición C-7.²

¹ Cfr. González, A. G. *et al.* A first study of antibacterial activity of diterpenes isolated from some *Salvia* species (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 17, 293-296 (1989) y Moujir, L. *et al.* Structure-antimicrobial activity relationships of abietane diterpenes from *Salvia* species. *Phytochemistry* 34 (6), 1493-1495, (1993).

² Cfr. Moujir, L. *et al.* *Ob. cit.* pp. 1494, 1495.

Tabla 4.1 Clasificación de fruticulina A, 7 α -acetoxiroyleanona y 19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona de acuerdo a su tipo de estructura.

Compuesto	Tipo de estructura	Tipo de diterpeno
 <p>Fruticulina A</p>		Nor-icetexano
 <p>7α-acetoxiroyleanona</p>		Abietano
 <p>19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona</p>		icetexano

Conclusiones similares se obtienen de las relaciones estructura-actividad de diterpenos de tipo icetexano. Moujir *et al.* encontraron que el grupo hidroxilo en C-11 es fundamental para la actividad y que la presencia de otros grupos hidroxilo en la molécula incrementan la actividad.³

Las observaciones a partir de las cuales se obtuvieron las conclusiones anteriores fueron las siguientes. Para los diterpenos tipo abietano evaluados se tuvo la mayor

³ Cfr Moujir, L. *et al.* *Ob cit.* p. 1495

actividad con un grupo hidroxilo en C-11 y otro en C-12. Un grupo hidroxilo adicional bien sea en C-6 o en C-7 disminuyen la actividad. Sin embargo, un hidroxilo en C-7 incrementa la actividad si los hidroxilos de C-11 y C-12 están oxidados a cetonas. Un grupo metoxi u etoxi en C-7 anulan la actividad de los hidroxilos en C-11 y C-12 (Figura 4.1).

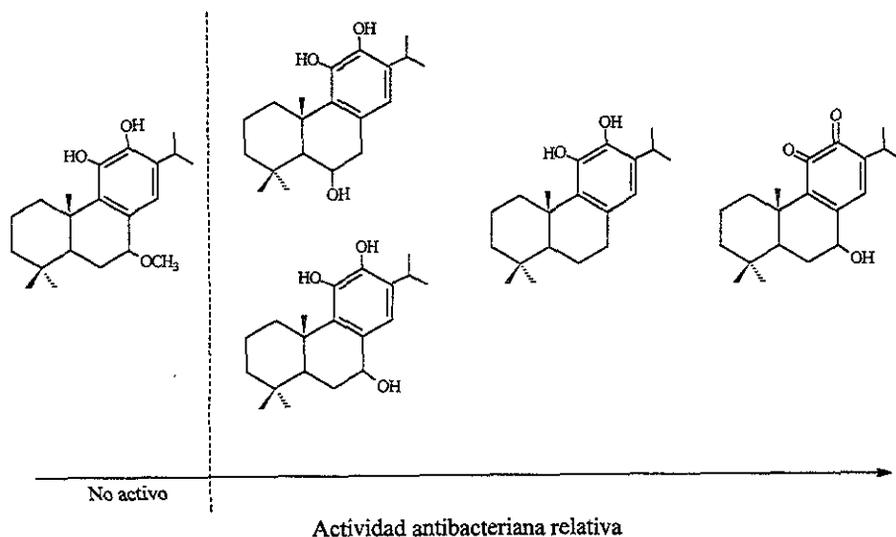


Figura 4.1 Representación esquemática de relaciones estructura-actividad para diterpenos de tipo abietano.

Observaciones adicionales fueron que la metilación de uno o de los dos hidroxilos de C-11 y de C-12 anulan la actividad. La metilación del hidroxilo en C-12 solamente disminuye la actividad si hay un hidroxilo en C-7.

Para diterpenos de tipo icetexano, además de las conclusiones expuestas, se determinó que la presencia de un grupo diferente al hidroxilo en C-11 inactiva al compuesto (Figura 4.2).

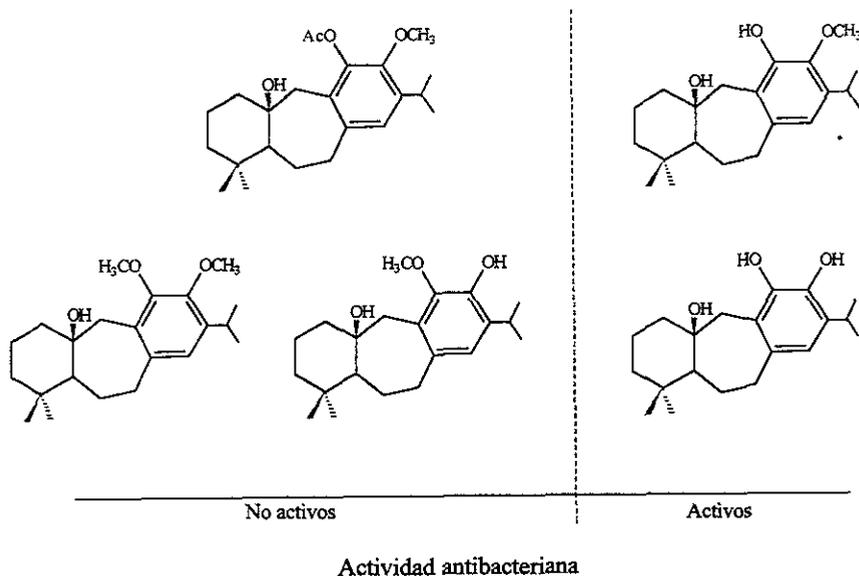


Figura 4.2 Representación esquemática de relaciones estructura-actividad para diterpenos de tipo icetaxano.

De acuerdo a las observaciones y conclusiones anteriores se proponen las siguientes modificaciones para las moléculas de fruticulina A, 7 α -acetoxiroyleanona y 19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona para la posterior evaluación de la actividad antibacteriana de los productos de cada transformación.

4.1. Fruticulina A.

Para fruticulina A se reducen primero los dos dobles enlaces del anillo B para tener una quinona en el anillo C. Con esta modificación que ya se ha reportado,⁴ se evaluaría el efecto de las dos dobles ligaduras sobre la actividad antibacteriana de fruticulina A y se genera una quinona que va a ser una estructura constante en las dos

⁴ Cfr. Rodríguez-Hahn, L. *et al.* Abietane type diterpenoids from *Salvia fruticulosa*. A revision of the structure of fruticulina B. *Phytochemistry* **28** (2). (1989). p. 569.

transformaciones siguientes.

Partiendo del producto de la transformación anterior se metila el grupo hidroxilo. Así, se evaluaría el efecto de este grupo en C-12 en un diterpeno de estructura muy similar a la de un icetexano. Por las conclusiones obtenidas para diterpenos de tipo icetexano revisadas anteriormente se espera que la actividad antibacteriana disminuya.

La última transformación consiste en desmetilar el grupo hidroxilo de C-2. De acuerdo a lo que discutió sobre los estudios de diterpenos de tipo icetexano, el grupo hidroxilo tiene un papel importante en la actividad antibacteriana de la molécula. Las reacciones correspondientes a estas transformaciones se muestran en la Figura 4.3

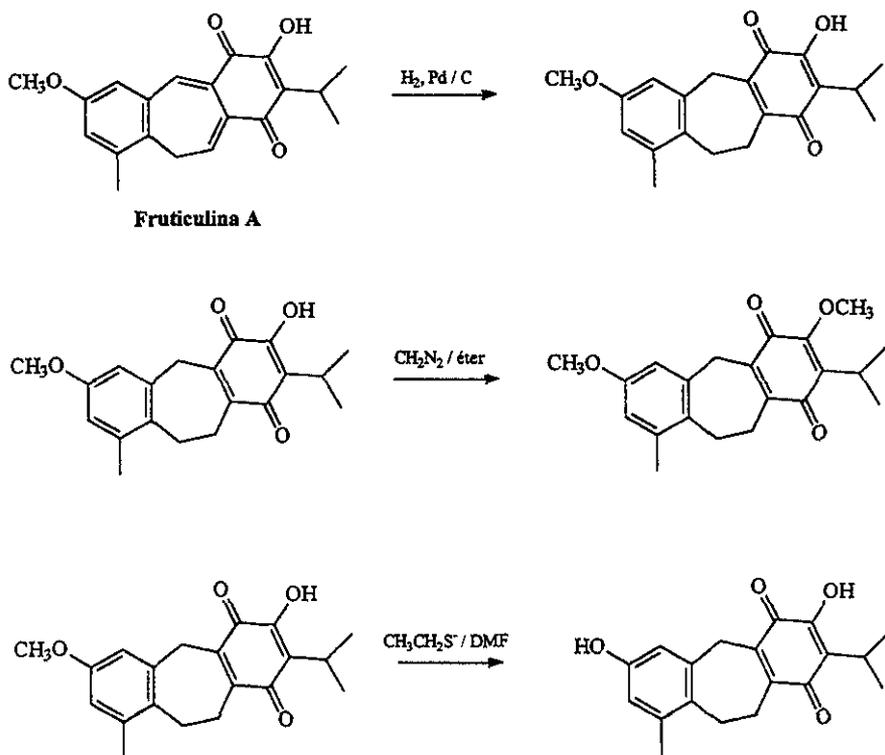


Figura 4.3 Modificaciones a la molécula de fruticulina A.

4.2. 7 α -acetoxiroyleanona.

Para 7 α -acetoxiroyleanona se hacen dos modificaciones en la posición C-7: hidrólisis del grupo acetato para producir 7 α -hidroxioyleanona y reducción del acetato para la síntesis de royleanona. Aunque ya se ha determinado la actividad antibacteriana de estos tres diterpenos (Tabla 2.5) se indicó que la información sobre los métodos empleados y los microorganismo de prueba utilizados es limitada.

Una vez establecido el efecto de los grupos acetoxi e hidroxilo en la posición C-7 sobre la actividad antibacteriana se metila el grupo hidroxilo de la royleanona (molécula sin sustituyente en C-7). Con esta metilación, a semejanza de fruticulina A, se determinará el efecto del grupo hidroxilo en C-12 que también ha mostrado ser un grupo clave en la actividad antibacteriana de diterpenos de tipo abietano.

Junto con las tres reacciones anteriores está reportada la metilación reductiva del metiléter de la royleanona.⁵ Resultaría muy interesante medir las propiedades antibacterianas del producto de esta transformación. Al reducir la quinona se tendrá información de la posible influencia de la quinona en la actividad antibacteriana. Estas cuatro reacciones se presentan en la Figura 4.4.

4.3. 19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona.

Las modificaciones propuestas para 19(R)-acetoxi-19-deoxoicetexona (diterpeno tipo icetexano) siguen la misma estrategia que las modificaciones para fruticulina A (diterpeno similar a un icetexano): reducción de una doble ligadura en el anillo B; metilación del grupo hidroxilo en C-12 y una modificación en el anillo A de la molécula.

⁵ Cfr. Edwards, O. E. et al. Diterpenoid quinones of *Inula royleana* D.C. *Canadian Journal of Chemistry* 40, (1962), pp. 1542-1546.

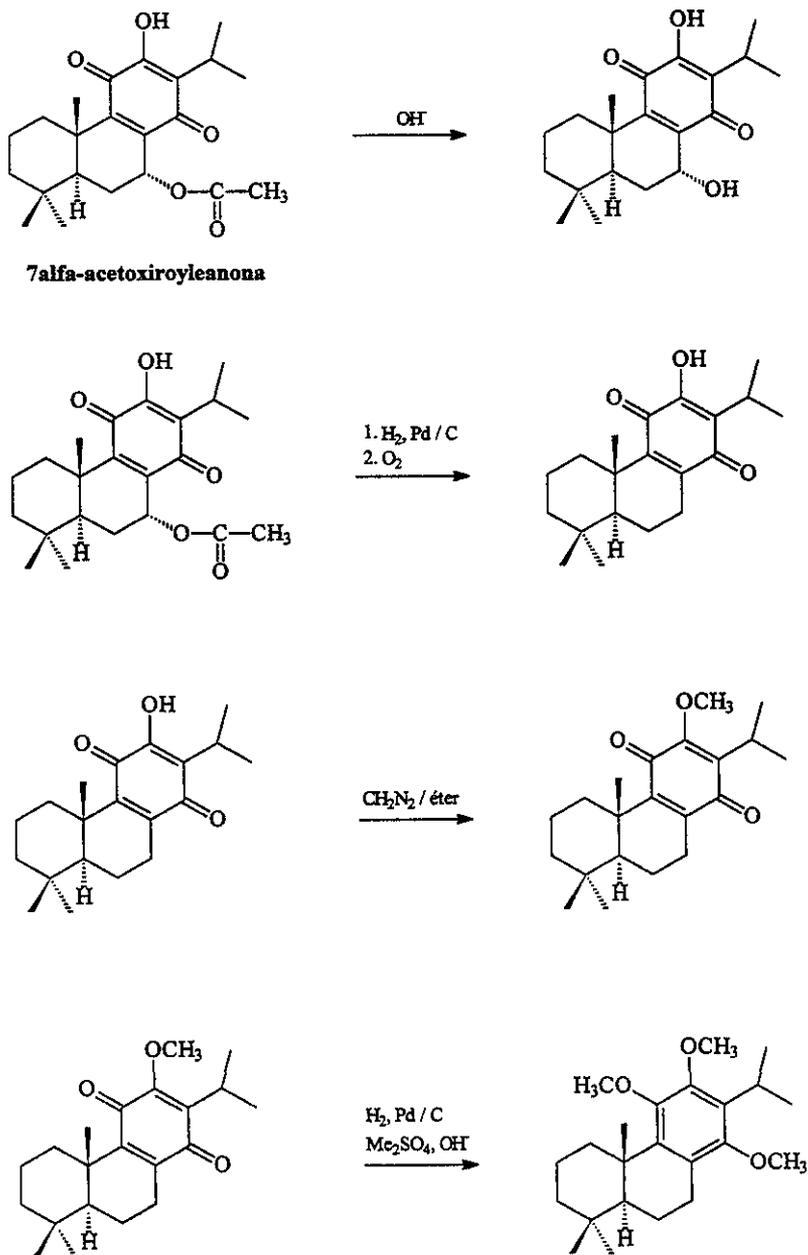


Figura 4.4 Modificaciones a la molécula de 7α-acetoxiroyleanona.

Con la metilación del grupo hidroxilo del producto de la reducción de la doble ligadura se espera que la actividad antibacteriana disminuya a semejanza de lo que se espera con la misma transformación para fruticulina A.

La modificación en el anillo A consiste en hacer la oxidación de 19(R)-acetoxi-19-deoxicetexona en C-19. El producto de esta reacción (descrita en la literatura⁶) es icetexona. Las reacciones que describen las transformaciones anteriores están dadas en la Figura 4.5.

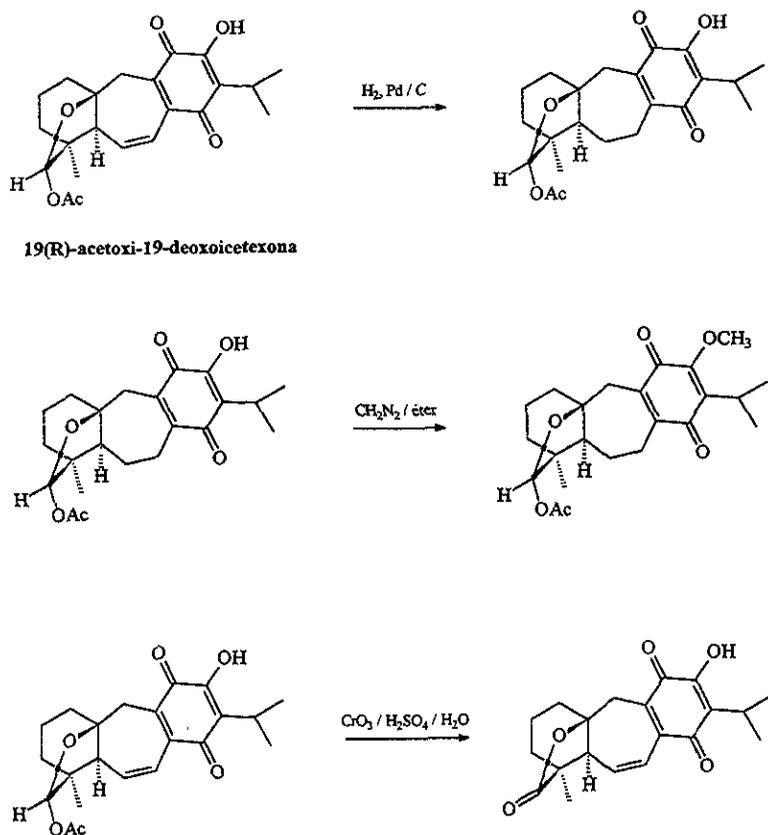


Figura 4.5 Modificaciones a la molécula de 19(R)-acetoxi-19-deoxicetexona.

⁶ Cfr. Esquivel, B. *et al.* Abietane and icetexane diterpenoids from *Salvia pubescens*. *Natural Product Letters* 10, (1997), pp. 90, 91.

Bibliografía

Libros

Álvarez, José Rogelio (director). *Enciclopedia de México*. Volumen XII. Sabeca International Investment Corporation c/o Enciclopedia Británica de México S.A. de C.V., México, 1993.

American Type Culture Collection. *American Type Culture Collection. Catalogue of Bacteria and Bacteriophages*. Eighteen edition. Maryland, 1992.

British Pharmacopoeia. 1993.

Connolly, J. D. and Hill, R. A. *Dictionary of Terpenoids*. Chapman & Hall, London, 1991.

Difco Manual. Tenth edition. Detroit, Michigan, 1984.

Duke, James A. *Handbook of Medicinal Herbs*. CRC Press, Inc, Florida, 1985.

Esquivel, R. B. *Estudio quimiotaxonómico de la sección fulgentes del género Salvia*. Tesis de maestría. UNAM. 1986.

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Sexta edición. 1994.

Goodman Gilman, A., Goodman L. S., Rall, T. H., y Murad, F. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Séptima edición. Traducción de la Editorial Médica Panamericana S.A. México, D. F., 1986.

Jawetz, Ernest y Melnick, Joseph L. *Manual de Microbiología Médica*. Manual Moderno, México, D.F., 1981.

Korolkovas, Andrejus. *Essentials of Medicinal Chemistry*. Second edition. Wiley-Interscience, New York, 1988.

Korolkovas, A. y Burckhalter, Joseph H. *Compendio Esencial de Química Farmacéutica*. Traducción de Ricardo Granados Jarque y Juan Bosch Cartes. Reverté, Barcelona, 1979.

Manual Bioxon. 1989.

Manual de Medios de Cultivo Merck. 1994.

Martínez, M. *Las Plantas Medicinales en México*. Tercera edición. Batas, México, D.F., 1944.

McGraw-Hill Encyclopedia of Science & Technology. Vol. 18. Seventh edition. McGraw-Hill, New York, 1992.

McMurry J. *Química Orgánica*. Tercera edición. Traducción de la Dra. Rocío Pozas Horcasitas y el Dr. Gustavo García de la Mora. Grupo Editorial Iberoamericana, México, D.F., 1994.

Newman A. *Chemistry of Terpenes and Terpenoids*. Academic Press, New York, 1972.

Pelzcar, Michael J. Jr. *Microbiology*. Fifth edition. McGraw-Hill, New York, 1986.

Pio Fon Quer. *Plantas Medicinales. El Dioscórides renovado*. Labor, México, 1982.

Ramamoorthy, T.P. and Elliot, M. Mexican Lamiaceae: Evolution, distribution and endemism. In Ramamoorthy, T. P., Bye, R., Lot, A. and Fa, J. (editors). *Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution*. Oxford University Press, New York, 1993.

Ramírez Gama R. M. (editor). *Manual de Prácticas de Microbiología General*. Facultad de Química, UNAM. 1996.

Ribbons, Norris. *Methods in Microbiology*. Vol. 7B. Academic Press, New York, 1972.

Sinderman, Carl J. *Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish*. Second edition. Academic Press, Inc. San Diego, California, 1990.

Singleton, Paul and Sainsbury, Diana. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*. Second edition. John Wiley & Sons, Great Britain, 1988.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tortora, Gerard J., Funke, Berdell, R. y Case, Christine L. *Introducción a la Microbiología* Tercera edición. Traducción de Rafael Rotger Anglada. Acribia, Zaragoza, 1993

U.S Pharmacopoeia USP 23. National Formulary NF 18. United States Pharmacopoeia Convention, Inc, 1994.

Artículos

Bauer, A. W , Kirby, W. M., Sherris, J. C. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method *The American Journal of Clinical Pathology* **36**, 493-496 (1966).

Edwards O. E., Feniak, G., Los, M. Diterpenoid quinones of *Inula royleana* D.C. *Canadian Journal of Chemistry* **40**, 1540-1546, (1962).

El-Lakany, A. M., Abdel-Kader, M. S., Sabri, N. N., *et al.* Lanigerol: a new antimicrobial icetexane diterpene from *Salvia lanigera*. *Planta-Med.* **61** (6), 559-560, (1995).

Esquivel, B., Calderón, J. S., Flores, E., *et al.* Abietane and icetexane diterpenoids from *Salvia pubescens*. *Natural Product Letters* **10**, 87-93, (1997).

Esquivel, B., Calderón, J. S., Sánchez, A. A., *et al.* Recent advances in phytochemistry and biological activity of mexican Labiatae *Rev Latinoamer. Quím.* **24**, 44-64, (1996).

Fraga, B. M., González, A. G., Herrera, J. R. *et al.* A revised structure for the diterpene rosmanol. *Phytochemistry* **24** (8), 1853-1854, (1985).

Fraga, B. M., González, A. G., Herrera, J. R., *et al.* Diterpenes from the roots of *Salvia canariensis*. *Phytochemistry* **25** (1), 269-271, (1986).

González, A. G , Abad, T., Jiménez, I. A., *et al.* A first study of antibacterial activity of diterpenes isolated from *Salvia* species (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **17**, 293-296, (1989).

González, A. G., Aguiar, Z. E., Luis, G. J., *et al.* Quinone methide diterpenoids from the roots of *Salvia texana*. *Phytochemistry* **27** (6), 1777-1781, (1988).

González, A. G., Fraga, J. G., Luis, J. G., *et al.* Componentes de la "*Salvia canariensis* L." *Anales de Química* **71**, 701-705, (1975).

González, A. G., Rodríguez, C. M. and Luis, J. G. Diterpenes from flowers of *Salvia canariensis*. *Phytochemistry* **26** (5), 1471-1474, (1987).

González, A. G., San Andrés, L., Luis, J. G., *et al.* Diterpenes from *Salvia mellifera*. *Phytochemistry* **30** (12), 4067-4070, (1991).

Kubo, I., Taniguchi, M. and Kubota, T. The biological activities of the *Isodon* diterpenoids. *Rev. Latinoamer. Quím.* **9**, 157-162, (1978).

Luis, J., Quiñones, W. and Echeverri, F. Tilifolidione, a cycloheptanenaphthoquinone-type diterpenoid of abietanic origin from the roots of *Salvia tiliaefolia*. *Phytochemistry* **36** (1), 115-117, (1994).

Masterova, I., Misikova, E., Sirotkova, L., *et al.* [Royleanones in the roots of *Salvia officinalis* L. of domestic provenance and their antimicrobial activity]. *Ceska-Slov-Farm.* **45** (5), 242-245, (1996).

Moujir, L., Gutiérrez-Navarro, A. M., San Andrés, L., *et al.* Structure-antimicrobial activity relationships of abietane diterpenes from *Salvia* species. *Phytochemistry* **34** (6) 1493-1495, (1993).

Rodríguez-Hahn, L., Esquivel, B., Sánchez, A. A., *et al.* Diterpenos abietánicos de salvias mexicanas. *Rev. Latinoamer. Quím.* **20**, 105-110, (1989).

Rodríguez-Hahn, L., Esquivel, B., Sánchez, C., *et al.* Abietane type diterpenoids from *Salvia fruticulosa*. A revision of the structure of fruticulín B. *Phytochemistry* **28** (2), 567-570, (1989).

Rodríguez-Hahn, L., Esquivel, B., Sánchez, C., *et al.* New highly oxidized diterpene quinones from *Salvia fruticulosa* (Labiatae). *Tetrahedron Letters* **27** (45), 5459-5462, (1986).

Ross, S. A., El-Keltawi, N. E. and Megalia, S. E. Antimicrobial activity of some Egyptian aromatic plants. *Fitoterapia* **51**, 201-205, (1980).

Ruzicka, L. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia* **9**, 357-396, (1953).

Turck, M., Lindemeyer, R. I., and Petersdorf, R. G. Comparison of single disc and tube dilution techniques in determining antibiotic sensitivities of Gram-negative pathogens. *Ann. Int. Med.* **58**, 56-65, (1963).

Ulubelen, A., Evren, N., Tuzlaci, E., *et al.* Diterpenoids from the roots of *Salvia hypargeia*. *Journal of Natural Products* **51** (6), 1178-1183, (1988).

Ulubelen, A., Sönmez, U., Topcu, G., *et al.* An abietane diterpene and two phenolics from *Salvia forskahlei*. *Phytochemistry* **42** (1), 145-147, (1996).

Ulubelen, A., Topcu, G., Eris, C., *et al.* Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry* **36** (4), 971-974, (1994).

Wagner, H. Pharmaceutical and economic use of the Labietae and Rutaceae families. *Rev. Latinoamer. Quím.* **8**, 16-25, (1977).