

00524  
71



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

COMPUESTOS ANTIBACTERIANOS DE LAS ESPECIES  
ALVARADOA AMORPHOIDES LIEBM. (SIMAROUBACEAE) Y  
HOFMEISTERIA SCHAFFNERI (A. GRAY) KING & ROBINSON  
(ASTERACEAE)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA  
P R E S E N T A  
VERÓNICA GURROLA CASTRO



MEXICO, D. F.



2003

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

A



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:**

<b>Presidente</b>	<b>Dra. Yolanda Caballero Arroyo</b>
<b>Vocal</b>	<b>Dra. María Isabel Aguilar Laurents</b>
<b>Secretario</b>	<b>Dra. Rachel Mata Essayag</b>
<b>1er. Suplente</b>	<b>Dr. Francisco Hernández Luis</b>
<b>2º. Suplente</b>	<b>M. en C. Isabel Rivero Cruz</b>

**Sitio en donde se desarrolló el tema:**  
**Laboratorio 124. Edificio E. Facultad de Química.**

**Asesor**

  
Dra. Rachel Mata Essayag

**Supervisor técnico**

  
Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

**Sustentante**

  
Verónica Gurrola Castro

---

## AGRADECIMIENTOS

La presente investigación se realizó con el apoyo económico del proyecto "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America" financiado por el NIH (National Institute of Health) de los Estados Unidos de Norteamérica. De manera personal agradezco a esta Institución por la beca otorgada a través del mismo proyecto.

A los miembros del jurado designado para la revisión del presente trabajo de tesis, por sus comentarios que permitieron mejorar la versión final de ésta.

Al personal técnico de la USAI (Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación) por el registro de los distintos espectros utilizados en el presente estudio. En particular agradezco a Georgina Duarte, Oscar Yañez y Marisela Gutiérrez.

Al personal del Cepario de la Facultad de Química, UNAM, por proporcionar las cepas de los microorganismos utilizados en la presente investigación.

A las M. en C. Isabel Rivero Cruz y Laura Acevedo Arteaga por el apoyo técnico brindado durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava por su asesoría técnica y enseñanza a lo largo de este estudio.

A mis compañeros del Laboratorio 124 por su grata compañía y ayuda desinteresada.

A la Dra. Rachel Mata por el apoyo que me brindó en todo momento, por sus valiosos consejos y comentarios. Muchas gracias por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.

---

## **DEDICATORIAS**

Gracias a Dios por ponerme en este camino, con una familia increíble y con grandes amigos; por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida.

A mis queridísimos padres, Angela y Manuel porque siempre se han preocupado por mí y por las cosas que hago, por ser mi ejemplo y mi fuerza; sin ustedes no hubiera culminado esta meta tan importante y que es totalmente para ustedes. Mil gracias por su apoyo pero sobre todo por su amor y por darme la vida. Los quiero mucho y son los mejores padres que Dios me pudo dar.

A mis hermanitos: Eri y Ale porque han estado conmigo en todo momento, por las peleas y los buenos ratos, por ser mi mejor compañía. Los quiero.

A Juan, por tu amor y tu compañía, porque has estado en los buenos y malos momentos, por ser un gran apoyo para mí, por tu comprensión, por estos años que hemos estado juntos pero sobre todo por ser mi mejor amigo. Eres una parte muy importante en mi vida, te amo.

A mi mejor amiga, Vale porque has estado conmigo estos últimos años, porque siempre me has apoyado. Te quiero mucho y pase lo que pase siempre estaremos juntas. Gracias por tu sincera amistad.

A Vane, una gran amiga porque no importa que no siempre estemos juntas se que cuento contigo.

A Irais, Rebeca, Alethea y Lenin, mis grandes amigos porque no importa la distancia ni el tiempo siempre perdurará nuestra amistad.

D

---

A mi amiguito Pancho, por su ayuda y su compañía durante este último año.

A mis amigos de la Facultad, Eric, Pedrito, Marce, Ginori, Emilio, Miguel, Mario, Erika, Liz, Quique, Myrna y Mariana porque con ustedes pase muy buenos momentos y con algunos de ustedes muy buenas fiestas, ¿verdad?

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Martha, Isabel, Blanca, Laura, Paola, Toño, Sergio y Sandra por su ayuda desinteresada y porque han hecho muy agradable mi estancia en el laboratorio.

F

## ÍNDICE.

	<b>Página</b>
Lista de Figuras	IV
Lista de Esquemas	IV
Lista de Cuadros	IV
Lista de Abreviaturas	VI
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	4
2.1. ANTECEDENTES DE LA ESPECIE <i>Alvaradoa amorphoides</i> .	4
2.2. ANTECEDENTES DE LA ESPECIE <i>Hofmeisteria schaffneri</i> .	8
<b>3. OBJETIVOS</b>	9
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL</b>	10
4.1. PROCEDIMIENTOS GENERALES.	10
4.1.1. Análisis cromatográficos.	10
4.1.2. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales.	10
4.2. MATERIAL VEGETAL.	11
4.3. ENSAYOS BIOLÓGICOS	11
4.3.1. Evaluación del potencial antimicrobiano para las especies <i>Alvaradoa amorphoides</i> y <i>Hofmeisteria schaffneri</i> .	11
4.3.1.1. Microorganismos de prueba y medio de cultivo.	11
4.3.1.1.1. Determinación del número de células por medio del estándar turbidimétrico de McFarland.	12

## ÍNDICE (continuación)

	<b>Página</b>
4.3.1.2. Determinación de la concentración crítica de antibióticos.	12
4.3.1.2.1. Preparación de los inoculos.	13
4.3.1.2.2. Preparación de las concentraciones de antibióticos.	13
4.3.1.3. Bioensayo.	14
4.3.1.4. Determinación cualitativa de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar.	15
4.3.1.5. Determinación de la concentración inhibidora mínima (CIM).	16
4.4. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA ESPECIE <i>Alvaradoa amorphoides</i> .	16
4.4.1. Preparación del extracto.	16
4.4.2. Fraccionamiento primario del extracto total de la corteza de <i>Alvaradoa amorphoides</i> .	16
4.4.3. Fraccionamiento secundario de la fracción activa F001.	16
4.4.3.1. Aislamiento del crisofanol (1) y del $\beta$ -sitosterol (7).	18
4.4.3.2. Aislamiento de la crisofaneína (2), pulmatina (3) fisciona (4) y $\beta$ -D-glucositolsterol (8).	19
4.4.4. Aislamiento del crisofanol (1), crisofaneína (2), pulmatina (3) y $\beta$ -sitosterol (7) de la fracción activa primaria F002.	20
4.4.5. Pruebas químicas para la identificación de glicósidos.	21
4.4.5.1. Prueba de Molish.	21
4.4.5.2. Hidrólisis ácida de los compuestos 2 y 3.	22
4.5. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA ESPECIE <i>Hofmeisteria schaffneri</i> .	22
4.5.1. Preparación del extracto.	22



## ÍNDICE (continuación)

	<b>Página</b>
4.5.2. Fraccionamiento primario del extracto de <i>Hofmeisteria schaffneri</i> y aislamiento de $\beta$ -sitosterol (7), $\beta$ -caroteno (9) y euparina (10).	22
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	<b>24</b>
5.1. SELECCIÓN DE LAS ESPECIES <i>Alvaradoa amorphoides</i> Y <i>Hofmeisteria schaffneri</i> COMO CANDIDATOS APROPIADOS PARA LA OBTENCIÓN DE PRINCIPIOS ANTIBACTERIANOS.	24
5.2. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE LA ESPECIE <i>Alvaradoa amorphoides</i> .	24
5.2.1. Caracterización de la fiscona (4).	30
5.2.2. Caracterización del crisofanol (1), crisofaneína (2) y pulmatina (3).	31
5.3. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE LA ESPECIE <i>Hofmeisteria schaffneri</i> .	35
5.3.1. Caracterización del $\beta$ -caroteno (9).	36
5.3.2. Caracterización de la euparina (10).	38
5.4. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE LAS ESPECIES <i>Alvaradoa amorphoides</i> Y <i>Hofmeisteria schaffneri</i> .	40
<b>6. RESUMEN Y CONCLUSIONES</b>	<b>44</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>45</b>
APÉNDICE DE ESPECTROS	50

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. <i>Alvaradoa amorphoides</i> . (a) Arbusto completo, (b) Flores.	5
2. Ejemplar de herbario de la especie <i>Hofmeisteria schaffneri</i> .	8
3. Ensayo de difusión en agar: (a) Forma en que se colocaron los discos de papel filtro, (b) Concentraciones de los antibióticos a evaluar.	14
4. Evaluación del potencial antimicrobiano para los extractos, fracciones primarias y compuestos puros.	15
5. Cromatograma del extracto y compuestos 1, 2 y 3 de la especie <i>Alvaradoa amorphoides</i> .	34
6. Cromatograma del extracto de la especie <i>Hofmeisteria schaffneri</i> y del compuesto 10.	40

**LISTA DE ESQUEMAS**

<b>Esquema</b>	<b>Página</b>
1. Extracción y fraccionamiento primario de la corteza de <i>Alvaradoa amorphoides</i> .	17

**LISTA DE CUADROS**

<b>Cuadro</b>	<b>Página</b>
1. Metabolitos secundarios aislados del género <i>Alvaradoa</i> .	6
2. Agente cromógeno utilizado para los análisis cromatográficos en capa fina.	10
3. Estándar turbidimétrico de McFarland.	12
4. Composición de la disolución buffer peptona-cloruro de sodio pH = 7.2	13
5. Controles positivos utilizados en el bioensayo.	13
6. Concentraciones críticas de los antibióticos empleados como control positivo.	15

**LISTA DE CUADROS (continuación)**

	<b>Página</b>
7. Fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción F001 de <i>Alvaradoa amorphoides</i> .	18
8. Resumen del fraccionamiento terciario vía cromatografía en columna abierta de la fracción F001-XV de <i>Alvaradoa amorphoides</i> .	19
9. Resumen del fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa F002 de la especie <i>Alvaradoa amorphoides</i> .	21
10. Fraccionamiento primario de las partes aéreas de la especie <i>Hofmeisteria schaffneri</i> , mediante cromatografía en columna abierta.	23
11. Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>Alvaradoa amorphoides</i> y <i>Hofmeisteria schaffneri</i> . Los resultados representan los diámetros promedio en mm de la zona de inhibición $\pm$ D.E.	25
12. Actividad antimicrobiana de las fracciones primarias de <i>Alvaradoa amorphoides</i> . Los resultados representan los diámetros promedio en mm de la zona de inhibición $\pm$ D.E.	26
13. Metabolitos secundarios aislados de la especie vegetal <i>Alvaradoa amorphoides</i> .	28
14. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la fracción (4).	30
15. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del crisofanol (1).	32
16. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la crisofancina (2) y la pulmatina (3).	33
17. Metabolitos secundarios aislados de la especie vegetal <i>Hofmeisteria schaffneri</i> .	35
18. Características físicas, espectroscópicas y espectrométricas del $\beta$ -caroteno (9).	36
19. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la euparina (10).	39
20. Actividad antimicrobiana de la crisofancina (2). Los resultados representan los diámetros promedio en mm de la zona de inhibición $\pm$ D.E.	41
21. Actividad antimicrobiana de la pulmatina (3). Los resultados representan los diámetros promedio en mm de la zona de inhibición $\pm$ D.E.	41

**LISTA DE CUADROS (continuación).**

		<b>Página</b>
22.	Actividad antimicrobiana del $\beta$ -caroteno (9). Los resultados representan los diámetros promedio en mm de la zona de inhibición $\pm$ D.E.	42
23.	Actividad antimicrobiana de la euparina (10). Los resultados representan los diámetros promedio en mm de la zona de inhibición $\pm$ D.E.	42

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
AcOEt	Acetato de etilo
ATCC	American Type Culture Collection
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CMI	Concentración mínima inhibidora
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
COSY	Correlación homonuclear
HETCOR	Correlación heteronuclear
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
$\delta$	Desplazamiento químico
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
d	Doblete
dd	Doble de doble
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMIE	Espectrometría de masas por Impacto Electrónico
FAB	Fast Atom Bombardment positive
°C	Grados centígrados
Gram (-)	Gram negativo
Gram (+)	Gram positivo

**LISTA DE ABREVIATURAS  
(continuación).**

g	Gramo
Hz	Hertz
Hex	Hexano
IR	Infrarrojo
Intel. Rel.	Intensidad relativa
M <sup>+</sup>	Ion molecular
Kg	Kilogramo
L	Litro
v <sub>max</sub>	Máxima longitud de onda
MeOH	Metanol
%	Por ciento
m	Multiplete
m/z	Relación masa-carga
RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
s	Singlete
sa	Singlete ancho
TMS	Tetrametilsilano
t	Triplete
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Adquirida

## I. INTRODUCCIÓN

Durante algún tiempo la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos de origen vegetal se vio sensiblemente disminuida debido a la gran revolución ocasionada por los antibióticos de origen microbiano (Cowan, 1999; Miller y Gereau, 2000; Newman *et al.*, 2000). Sin embargo, en los últimos años, el interés por los agentes antimicrobianos derivados de plantas ha resurgido notablemente. Muchas razones han contribuido a este hecho, destacándose la aparición de un sin número de especies resistentes a los fármacos de uso actual. Así mismo, el interés por desarrollar fármacos antimicrobianos más potentes y eficaces ha motivado la búsqueda de nuevos productos de origen natural. Cabe destacar, que en la medicina actual se ha incrementado el uso de antimicrobianos y otros productos derivados de plantas, ya que algunos antibióticos tradicionales se han vuelto poco efectivos para el tratamiento de enfermedades infecciosas y virales. El creciente interés por este tipo de productos se debe a varias razones: En primer lugar, las plantas constituyen un recurso natural abundante; así, se estima que existen entre 250,000 y 500,000 especies de plantas en la Tierra y tan solo un pequeño porcentaje de éstas (~1-10%) son utilizadas por el hombre y algunas especies animales como alimento, y es posible que un porcentaje mayor sea empleado con fines medicinales. Así mismo, el aumento en el número de personas afectadas por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y otras enfermedades infecciosas ha motivado un incremento en las investigaciones sobre plantas con mira al descubrimiento de agentes antimicrobianos. El uso de técnicas microbiológicas contemporáneas ha permitido comprobar que los extractos de plantas superiores de diversos géneros y familias poseen una actividad notable en contra de numerosas bacterias y hongos patógenos (Chattopadhyay *et al.*, 2001; Eloff, 1998; Fyhrquist *et al.*, 2002; Karaman *et al.*, 2003; Kokoska *et al.*, 2002; Miller y Gereau, 2000; Penna *et al.*, 2001; Portillo *et al.*, 2001; Pundarikakshudu, *et al.*, 2001; Rabanal *et al.*, 2002; Tegos *et al.*, 2002).

En este creciente interés por los agentes antimicrobianos de origen vegetal, la medicina alternativa ha desempeñado un papel fundamental como criterio para la selección de plantas con principios antisépticos potenciales; de tal manera que se estima que el 74% de las plantas o productos derivados de ellas, seleccionadas por medio de este criterio han resultado activas como agentes antisépticos (Fyhrquist *et al.*, 2002; Miller y Gereau, 2000.). En el caso particular de México, un país con una gran diversidad vegetal y una gran tradición en el uso de plantas con fines medicinales, muchas son las especies que gozan de reputación folklórica como agentes antisépticos. Investigaciones recientes indican que el 78% de las plantas medicinales más frecuentemente utilizadas por las comunidades rurales, se emplean para prevenir o curar enfermedades de origen microbiano

destacándose las de la piel, las gastrointestinales y las respiratorias. En consecuencia, la flora medicinal de México ofrece buenas perspectivas para el descubrimiento de nuevos agentes con propiedades antisépticas (Rojas *et al.*, 2001).

Para la determinación de la actividad antimicrobiana se emplean los métodos de dilución y difusión en agar. En general, los ensayos biológicos se realizan con una serie de microorganismos de prueba que incluyen bacterias Gram positivas (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*), Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa*), levaduras (*Candida albicans*) y hongos (*Aspergillus niger* y *Trichophyton mentagrophytes*), tanto resistentes como susceptibles.

La susceptibilidad de los microorganismos de prueba al agente potencial antimicrobiano se determina en dos fases: en la primera se realiza un ensayo cualitativo primario que permite detectar la presencia o ausencia de actividad. En la segunda, se cuantifica la potencia relativa (Koneman, 1989; Romero, 1994; Vanden Berghe *et al.*, 1991). Para realizar el ensayo primario se utiliza generalmente, el método de difusión en placa de agar, en el cual las muestras a evaluar (extractos, fracciones o compuestos puros) contenidas en un reservorio se ponen en contacto con un medio apropiado previamente inoculado con el microorganismo de prueba. El ensayo se realiza en placas de Petri o en placas de 98 pozos; después de un período de incubación adecuado se examina la placa en busca de zonas de inhibición del crecimiento microbiano alrededor del reservorio (Paxton, 1991; Stermitz *et al.*, 2000; Vanden Berghe *et al.*, 1991). En cambio, para cuantificar se emplea el método de dilución en agar, que permite calcular la concentración inhibidora mínima (CIM) de los productos ensayados. Los compuestos naturales se clasifican como antimicrobianos con base en pruebas de susceptibilidad que permiten establecer su concentración inhibidora mínima (CIM), considerándose como activos aquellos con CIMs comprendidas en el intervalo entre 100 y 1000 µg/mL. Un compuesto que es sintetizado como respuesta a una invasión patógena y que se requiere para proteger a la planta pero que muestra una pequeña actividad en pruebas de susceptibilidad *in vitro* no constituye necesariamente un agente antimicrobiano (Rabanal *et al.*, 2002).

La mayoría de los metabolitos secundarios muestran una actividad considerable contra bacterias Gram (+) pero no contra Gram (-) y levaduras. Este comportamiento se debe a que las bacterias Gram (-) y las levadura están cubiertas por una membrana que posee una estructura tal que impide el paso de los compuestos antimicrobianos; en cambio, las bacterias Gram (+) presentan una membrana que permite el paso de dichos compuestos. Aunado a esto, las bacterias Gram (-) poseen proteínas resistentes a los fármacos que se encargan de expulsar cualquier producto que pudiera penetrar a través

de la membrana externa de la bacteria. Esta última es la principal razón por lo que en la actualidad los antimicrobianos de origen vegetal no son utilizados de manera sistemática como antibióticos (Tegos *et al.*, 2002). Sin embargo, recientemente varios grupos de investigadores demostraron que algunos extractos vegetales contienen sustancias capaces de inhibir estas proteínas, lo cual explica la eficacia de muchos extractos utilizados como agentes antisépticos en las prácticas medicas populares (Stermitz *et al.*, 2000; Tegos *et al.*, 2002).

En la actualidad las investigaciones conducentes a la obtención de principios activos vegetales se realizan mediante estrategias biodirigidas (Eloff, 1998; Miller y Gereau, 2000; Taylor *et al.*, 1995) empleando un bioensayo conveniente para guiar el aislamiento de los constituyentes bioactivos, sin importar sus propiedades químicas o sus concentraciones relativas en los extractos. Los estudios biodirigidos, garantizan la obtención de compuestos bioactivos, muchos de los cuales pueden ser estructuralmente novedosos contribuyendo no solamente al campo de la química farmacéutica, sino también a otras áreas más específicas del conocimiento de los productos naturales (Eloff, 1998; Farnsworth, 1991; Miller y Gereau, 2000).



## 2. ANTECEDENTES

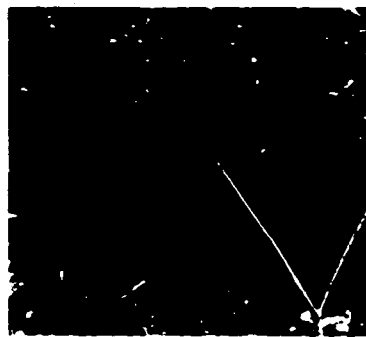
### 2.1. ANTECEDENTES DE LA ESPECIE *Alvaradoa amorphoides*.

La especie *Alvaradoa amorphoides* Liebm, perteneciente a la familia Simaroubaceae, es un arbusto grande de 2 a 8 metros de altura, pudiendo alcanzar los 15 metros (Figura 1a; Martínez, 1990). La corteza es de color gris y la mayoría de las veces lisa, sus racimos femeninos son muy densos con un arreglo similar al de un penacho. Sus flores son pequeñas verdes o blanquecino-amarillentas y se presentan en racimos largos; el fruto es una sámara alargada color rosado y densamente ciliado (Figura 1b).

*Alvaradoa amorphoides* florece en los meses de Septiembre a Octubre. Su hábitat se encuentra en las selvas bajas caducifolias y perennifolias, entre 385 y 1,370 metros sobre nivel del mar. En México se distribuye en los estados de Chiapas, Chihuahua, Durango, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Oaxaca y Yucatán. Popularmente la población de estas localidades denominan a la especie con distintos nombres: palo de hormiga, pie de gallo, plumajillo, peinecillo (Jalisco); camarón (Chiapas); huachipil (Guerrero) ó Be-sink-ché (Yucatán).

En la literatura etnobotánica se describe que la especie *Alvaradoa amorphoides* tiene diversos usos en la medicina popular de México. Así, en Yucatán la infusión que se obtiene del cocimiento de la corteza se emplea contra la comezón, como tónico digestivo y como remedio para la tos. En Guerrero las hojas se aplican a la piel para curar el mal del pinto. También la corteza molida se aplica localmente para sanar las heridas y en algunos lugares se cultiva como planta de ornato (Martínez, 1990; Niembro, 1986; Villarreal, 1992).

Un estudio fitoquímico anterior de ésta especie permitió el aislamiento de varias antraquinonas, las cuales se caracterizaron como el crisofanol (1), la crisofaneína (2) y la pulmatina (3) [Giral *et al.*, 1974]. Wayne y colaboradores (1999) estudiaron las partes aéreas de la especie relacionada *Alvaradoa jamaicensis* caracterizando el crisofanol (1), la fisciona (4) y las alvaradoinas A (5) y C (6) como los principales constituyentes de la especie. En el Cuadro 1 se muestran las estructuras de los metabolitos secundarios aislados del género *Alvaradoa*.



(a)

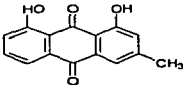
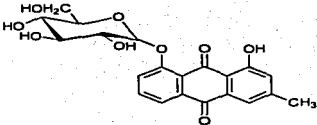
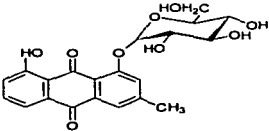
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



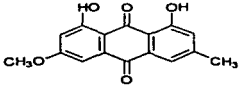
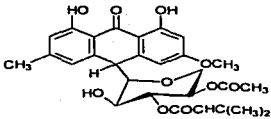
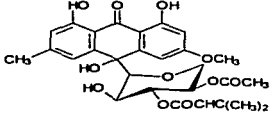
(b)

Figura 1. *Alvaradoa amorphoides*: (a) Arbusto completo, (b) Flores.

Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Alvaradoa*.

COMPUESTO	ESPECIE	REFERENCIA
 <p data-bbox="242 434 366 450">Crisofanol (1)</p>	<p data-bbox="520 358 729 374"><i>Alvaradoa amorphoides</i></p> <p data-bbox="520 377 729 394"><i>Alvaradoa jamaicensis</i></p>	<p data-bbox="788 358 956 374">Giral <i>et al.</i>, 1974</p> <p data-bbox="788 377 956 394">Wayne <i>et al.</i>, 1999</p>
 <p data-bbox="231 661 376 678">Crisofancina (2)</p>	<p data-bbox="520 576 729 592"><i>Alvaradoa amorphoides</i></p>	<p data-bbox="796 576 948 592">Giral <i>et al.</i>, 1974</p>
 <p data-bbox="245 896 369 912">Pulmatina (3)</p>	<p data-bbox="520 789 729 805"><i>Alvaradoa amorphoides</i></p>	<p data-bbox="796 789 948 805">Giral <i>et al.</i>, 1974</p>

Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Alvaradoa* (continuación).

COMPUESTO	ESPECIE	REFERENCIA
 <p data-bbox="231 432 341 448">Fisciona (4)</p>	<i>Alvaradoa jamaicensis</i>	Wayne <i>et al.</i> , 1999
 <p data-bbox="206 667 368 685">Alvaradoina A (5)</p>	<i>Alvaradoa jamaicensis</i>	Wayne <i>et al.</i> , 1999
 <p data-bbox="206 901 368 920">Alvaradoina C (6)</p>	<i>Alvaradoa jamaicensis</i>	Wayne <i>et al.</i> , 1999

## 2.2.ANTECEDENTES DE LA ESPECIE *Hofmeisteria schaffneri*.

El género *Hofmeisteria* perteneciente a la tribu Eupatorieae de la familia Asteraceae comprende ocho especies, todas endémicas de México. En particular, la especie *Hofmeisteria schaffneri* (A. Gray) King & Robinson se distribuye en los estados de Jalisco y San Luis Potosí, donde se conoce popularmente como ámbar. *Hofmeisteria schaffneri* habita en ambientes húmedos y cálidos; crece en las grietas de las rocas, en filtraciones y salientes húmedas, y la mayoría de las veces en las orillas de los arroyos; florece en los meses de Febrero a Abril. En la medicina popular se utiliza para el tratamiento de heridas y la infusión de sus hojas, sola o acompañada con toronjiles, se emplea como agua de uso contra padecimientos del tracto gastrointestinal como vómito, diarrea y dolor de estómago. Es importante destacar que ninguna especie de este género ha sido objeto de estudios fitoquímicos ó biológicos previos.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 2. Ejemplar de herbario de la especie *Hofmeisteria schaffneri*.

### 3. OBJETIVOS

Con base en las consideraciones indicadas en la parte introductoria acerca de la necesidad de encontrar nuevos agentes antimicrobianos, el objetivo principal del presente trabajo de tesis es determinar el potencial antibacteriano de los extractos y productos derivados de *Alvaradoa amorphoides* y *Hofmeisteria schaffneri*, con la finalidad de detectar nuevas fuentes naturales y compuestos útiles para el desarrollo de nuevos productos antimicrobianos de interés terapéutico.

Para el cumplimiento del objetivo general se contemplan los siguientes objetivos específicos:

1. Recopilar la información botánica, etnobotánica y química de las dos especies vegetales seleccionadas para el desarrollo del presente estudio.
2. Determinar la actividad antimicrobiana preliminar de los extractos vegetales mediante la aplicación del método de difusión en agar con la finalidad de detectar si son candidatos apropiados para realizar un estudio fitoquímico biodirigido con miras a obtener los principios activos.
3. Caracterizar los compuestos aislados de las fracciones activas mediante la aplicación de métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos.
4. Evaluar los compuestos aislados aplicando la metodología microbiológica indicada en el inciso dos.
5. Correlacionar en lo posible los resultados obtenidos con la información etnobotánica y/o química previamente descrita en la literatura.
6. Contribuir al conocimiento de los elementos constitutivos de la flora medicinal mexicana y, en general, de la biodiversidad de México.

#### 4. PARTE EXPERIMENTAL

##### 4.1. PROCEDIMIENTOS GENERALES.

###### 4.1.1. Análisis cromatográficos.

Para los análisis de cromatografía en capa fina tipo analítico (CCF) se utilizaron placas de aluminio de distintas dimensiones recubiertas con una capa de gel de sílice de 0.25 mm de espesor (sílica gel Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Merck). Para la separación y purificación de los compuestos por medio de cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) se utilizaron placas de vidrio de 20 cm x 20 cm recubiertas con el mismo adsorbente, con un espesor de 0.25 mm (sílica gel 60 F<sub>254</sub> Merck).

Para los análisis cromatográficos en columna abierta se emplearon columnas de vidrio empacadas con gel de sílice (sílica gel 60 Merck, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, malla de 70-230 µm), empleando varios sistemas de elución. Para visualizar las placas se utilizó una lámpara de luz UV (onda corta: 254 nm; onda larga: 356 nm) y sulfato cérico como agente cromógeno (la composición del sulfato cérico se resume en el Cuadro 2); para el desarrollo del color las placas cromatográficas se calentaron en una parrilla eléctrica con una temperatura aproximada de 110 °C.

**Cuadro 2.** Agente cromógeno utilizado para los análisis cromatográficos en capa fina.

Reactivo	Composición	Referencia
Sulfato cérico	12.0 g de sulfato cérico 22.0 mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 350.0 g de hielo picado	Lowrey <i>et al.</i> ; 1993

###### 4.1.2. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales.

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. Los espectros en el IR se registraron en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer, modelo 599B, utilizando la técnica de pastilla de KBr o película. Los análisis de espectrometría de masas se realizaron en un espectrómetro de masas HP 5890.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-<sup>1</sup>H) y de Carbono 13 (RMN-<sup>13</sup>C), se registraron en un aparato Unity Inova, marca Varian VXR-300S, el cual se operó a una frecuencia de 300 MHz; utilizando CDCl<sub>3</sub> o DMSO como disolvente. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm referidos al tetrametilsilano (TMS) que se utiliza como referencia interna.

Los análisis indicados anteriormente se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

## 4.2. MATERIAL VEGETAL.

La corteza de la especie *Alvaradoa amorphoides* se recolectó en Batopilas Chihuahua el 21 de febrero del año 2002. Las partes aéreas de la especie *Hofmeisteria schaffneri* se recolectaron en San Luis Potosí en noviembre del 2002.

En el Herbario Nacional (MEXU) se depositaron ejemplares de referencia de ambas especies. [Vouchers: R.Bye 21381 (*Alvaradoa amorphoides*), R.Bye & E.Linares 31018 (*Hofmeisteria schaffneri*)]. La recolección e identificación de dichas especies fue realizada por el Dr. Robert Bye del Instituto de Biología, UNAM.

El material vegetal de ambas especies se secó a temperatura ambiente y se fragmentó en un molino Willey Modelo 4.

## 4.3. ENSAYOS BIOLÓGICOS

### 4.3.1. Evaluación del potencial antimicrobiano para las especies *Alvaradoa amorphoides* y *Hofmeisteria schaffneri*.

#### 4.3.1.1. Microorganismos de prueba y medio de cultivo.

Para la realización de los bioensayos se emplearon cepas de microorganismos ATCC (American Type Culture Collection) que incluyen bacterias Gram positivas [*Staphylococcus aureus* (ATCC 75923) y *Bacillus subtilis* (ATCC 6051)] y Gram negativas [*Salmonella typhi* (ATCC 9992v), *Escherichia coli* (ATCC 10536) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)].



Los microorganismos empleados fueron proporcionados por el Cepario de la Facultad de Química, UNAM.

Como medio de cultivo se utilizó agar nutritivo; este agar se rehidrato de acuerdo con las indicaciones de la casa comercial y se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 lb/cm<sup>2</sup>, durante 30 minutos.

#### 4.3.1.1.1. Determinación del número de células por medio del estándar turbidimétrico de McFarland.

El número de bacterias en un medio líquido puede ser determinado por la comparación visual de su turbidez con la de un estándar turbidimétrico que representa un número conocido de bacterias en suspensión. En el Cuadro 3 se enumeran los reactivos y las cantidades necesarias de las soluciones requeridas para la preparación del estándar turbidimétrico de McFarland. La turbidez generada por la mezcla de los reactivos a una determinada proporción corresponde a un número de células bacterianas presentes en el medio líquido (Bailey y Scott's, 1990).

**Cuadro 3.** Estándar turbidimétrico de McFarland.

	No. de tubo										
	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>BaCl<sub>2</sub> 1% (mL)</b>	<b>0.05</b>	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% (mL)</b>	<b>9.95</b>	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9
<b>No. Células (x10<sup>9</sup>/mL)</b>	<b>1.5</b>	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

#### 4.3.1.2. Determinación de la concentración crítica de antibióticos.

Antes de llevar a cabo la determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos y compuestos puros, se realizó la determinación de la concentración inhibidora crítica de los antibióticos empleados como controles y que fueron seleccionados de acuerdo a las especificaciones de la literatura (Catálogo ATCC). Para ello se utilizó el método de difusión en agar, empleando diferentes concentraciones del antibiótico a ensayar y utilizando como reservorio discos de papel filtro (12 mm). Estas pruebas permitieron determinar las concentraciones críticas de cada antibiótico.

#### 4.3.1.2.1. Preparación de los inoculos.

Los microorganismos de prueba se sembraron en tubos con medio de cultivo inclinado durante 24 horas a 37°C. El cultivo anterior se cosechó con 3 mL de agua destilada estéril; 1 mL de esta última suspensión se sembró en un matraz Erlenmeyer que contenía 50 mL de medio sólido de agar nutritivo y se incubó durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, este último cultivo se cosecho con 10 mL de agua destilada estéril. A partir del concentrado anterior se realizó una dilución 1:19 y se ajustó visualmente el número de microorganismos a la turbidez correspondiente al estándar 0.5 de McFarland (Cuadro 3).

#### 4.3.1.2.2. Preparación de las concentraciones de antibióticos.

En el Cuadro 4 se indica el disolvente empleado para la realización de la solución stock y para la preparación de las soluciones de los antibióticos. Los antibióticos utilizados como control positivo y sus concentraciones empleadas para la determinación de la concentración crítica se muestran en el Cuadro 5.

**Cuadro 4.** Composición de la disolución buffer peptona-cloruro de sodio pH = 7.2

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.56 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	7.23 g
NaCl	4.30 g
Peptona caseína	1.00 g
Agua destilada	1000 mL

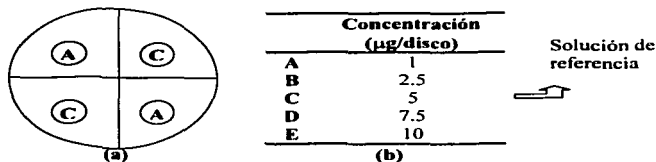
**Cuadro 5.** Controles positivos utilizados en el bioensayo.

Microorganismo	Antibiótico	Concentración (µg/disco)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ampicilina	10, 7.5, 5, 2.5, 1
<i>Salmonella typhi</i>	Cloranfenicol	10, 7.5, 5, 2.5, 1
<i>Escherichia coli</i>	Cloranfenicol	10, 7.5, 5, 2.5, 1
<i>Bacillus subtilis</i>	Estreptomicina	16, 12, 8, 4, 0.8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gentamicina	25, 20, 15, 10, 5

### 4.3.1.3. Bioensayo.

Se inocularon 200  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana por cada 100 mL de agar nutritivo. Las placas se prepararon agregando 10 mL de agar inoculado previamente con el microorganismo de prueba en cada caja Petri.

Una vez solidificadas las placas de agar se colocaron cuatro discos en forma equidistante en cada placa. Dos discos contenían 50  $\mu\text{L}$  del antibiótico estándar y los otros dos contenían una concentración diferente (Figura 3). Las cajas se preincubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se incubaron por 24 horas a 37 °C. El ensayo se realizó por triplicado para obtener un valor de CIM. Posteriormente, el ensayo se realizó cuatro veces más, para obtener un total de 5 valores de concentración crítica para cada microorganismo, esto con el fin de poder realizar un tratamiento estadístico y así determinar la concentración a utilizar en la evaluación de los extractos y compuestos puros. La concentración de cada uno de los antibióticos de prueba seleccionados para su empleo como control positivo se presenta en el Cuadro 6.



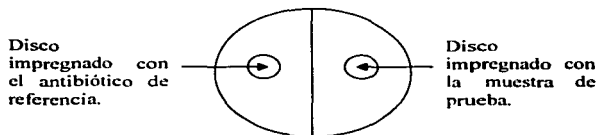
**Figura 3.** Ensayo de difusión en agar: (a) Forma en que se colocaron los discos de papel filtro, (b) concentraciones de los antibióticos a evaluar.

**Cuadro 6.** Concentraciones críticas de los antibióticos empleados como control positivo.

Microorganismo	Antibiótico	Concentración (µg/disco)	Concentración utilizada en el ensayo (µg/disco)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ampicilina	0.6	1.2
<i>Bacillus subtilis</i>	Estreptomicina	0.4	4
<i>Escherichia coli</i>	Cloranfenicol	0.7	0.8
<i>Salmonella typhi</i>	Cloranfenicol	0.9	1.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gentamicina	4.0	12.0

**4.3.1.4. Determinación cualitativa de la actividad antimicrobiana, por el método de difusión en agar.**

Para la determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos, fracciones primarias y compuestos puros se siguió el mismo procedimiento empleado para la determinación de la concentración inhibidora crítica de los antibióticos con algunas variantes. En cada caso se colocaron dos discos de papel filtro de manera equidistante (Figura 4); los discos se impregnaron con 200 µL del extracto o de las fracciones primarias disueltos en DMSO conteniendo 1000, 500 y 100 µg en 200 µL. Los compuestos también disueltos en DMSO, se evaluaron a 100, 10 y 1 µg en 200µL. Además se utilizó el control positivo del antibiótico adecuado dependiendo del microorganismo de prueba, a una concentración mayor a la concentración inhibidora crítica determinada previamente.



**Figura 4.** Evaluación del potencial antimicrobiano para los extractos, fracciones primarias y compuestos puros.

#### **4.3.1.5. Determinación de la concentración inhibidora mínima (CIM).**

Los valores de CIM que se presentan en este estudio se determinaron de acuerdo al tratamiento de Linton. (Linton, 1983).

#### **4.4. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA ESPECIE *Alvaradoa amorphoides*.**

##### **4.4.1. Preparación del extracto.**

El material vegetal seco y molido (4 kg) se extrajo mediante un proceso de maceración con 30 litros de una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH (1:1) durante 15 días. Al finalizar este tiempo el extracto resultante se filtró y concentró al vacío obteniéndose 132.9 g de extracto seco.

##### **4.4.2. Fraccionamiento primario del extracto total de la corteza de *Alvaradoa amorphoides*.**

El extracto seco (132.9 g) se sometió a un fraccionamiento primario mediante particiones sucesivas utilizando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt y MeOH acuoso (10%) como disolventes (Esquema 1).

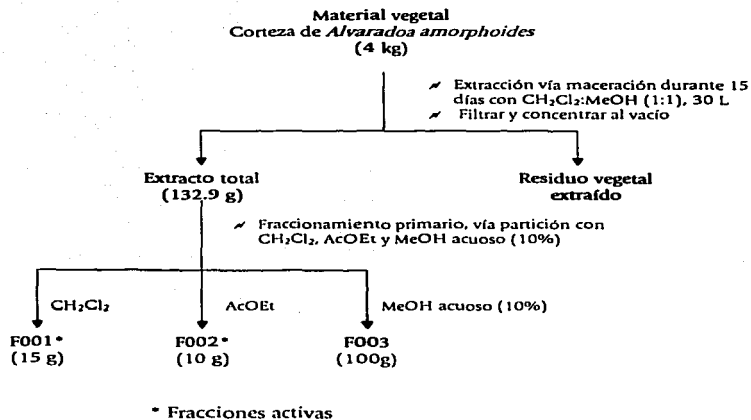
De acuerdo con los ensayos de difusión en agar, las fracciones primarias F001 y F002 concentraron la actividad antimicrobiana.

##### **4.4.3. Fraccionamiento secundario de la fracción activa F001.**

La fracción primaria activa F001 (15 g) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante el método de cromatografía en columna abierta, utilizando como adsorbente gel de sílice (329 g) y como eluyentes hexano, hex- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (diversas proporciones),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (diversas proporciones). De este fraccionamiento se obtuvieron 240 fracciones de 120 mL cada una.

Las fracciones obtenidas se monitorearon por cromatografía en capa fina, reuniéndose las que presentaron similitud cromatográfica, obteniéndose así un total de 15 fracciones secundarias. En el Cuadro 7 se resume este fraccionamiento.

Cada una de las fracciones resultantes se evaluó mediante el empleo de la técnica cualitativa de difusión en agar, encontrándose que la actividad antimicrobiana se concentraba en las fracciones F001-X y F001-XV.



**Esquema 1.** Extracción y fraccionamiento primario de la corteza de *Alvaradoa amorphoides*.

**Cuadro 7.** Fraccionamiento secundario via cromatografía en columna abierta de la fracción F001 de *Alvaradoa amorphoides*.

Fracciones	Sistema de elución	Proporción (%)	Fracciones combinadas	Clave
1-26	Hexano	100	1-14	F001-I
27-38	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	15-26	F001-II
39-47	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	27-36	F001-III
48-56	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	70:30	37-46	F001-IV
57-177	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60:40	47-58	F001-V
178-195	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	59-64	F001-VI
196-204	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	65-74	F001-VII
205-210	Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	75-94	F001-VIII
211-224	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	95-101	F001-IX
225-230	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH	99:1	102-136	F001-X *
231-240	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH	50:50	137-140	F001-XI
			141-151	F001-XII
			152-166	F001-XIII
			167-230	F001-XIV
			231-240	F001-XV *

\* Fracciones activas

#### 4.4.3.1. Aislamiento del crisofanol (1) y del β-sitosterol (7).

De la fracción activa F001-X precipitaron de manera espontánea 1.2 g de un sólido cristalino en forma de finas agujas anaranjadas, con un punto de fusión de 200-201 °C, identificado como el crisofanol (1) por comparación con una muestra auténtica aislada de *Rumex hymenosepalus* (Guerrero Analco y Martínez Luis, 2002).

De la fracción F001-XII precipitó un sólido blanco (676 mg), el cual se purificó por recrystalización. Este compuesto con punto de fusión de 141-143 °C se identificó como el β-sitosterol (7) por comparación con una muestra auténtica.

4.4.3.2. Aislamiento de la crisofancina (2), pulmatina (3) fisciona (4) y  $\beta$ -D-glucositosterol (8).

La fracción secundaria activa F001-XV (5.7 g) se sometió a un fraccionamiento terciario vía cromatografía en columna abierta utilizando como adsorbente 330.5 g de gel de sílice desactivado (10% H<sub>2</sub>O) y como eluyentes hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (diversas proporciones), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (diversas proporciones). Se obtuvieron 175 fracciones de 100 mL, las cuales fueron agrupadas con base en su similitud cromatográfica en 12 fracciones terciarias (Cuadro 8). Las fracciones resultantes se evaluaron, concentrándose la actividad antimicrobiana en las fracciones F001-XV-3 y F001-XV-9.

**Cuadro 8.** Resumen del fraccionamiento terciario vía cromatografía en columna abierta de la fracción F001-XV de *Alvaradoa amorphoides*.

Fracciones	Sistema de elución	Proporción (%)	Fracciones reunidas	Clave
1-23	Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	1-26	F001-XV-1
24-35	Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	70:30	27-34	F001-XV-2
36-42	Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60:40	35-49	F001-XV-3 *
43-48	Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	50-63	F001-XV-4
49-57	Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	64-106	F001-XV-5
58-67	Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30:70	107-115	F001-XV-6
68-78	Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	116-126	F001-XV-7
79-83	Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10:90	127-140	F001-XV-8
84-88	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	141	F001-XV-9 *
89-99	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	99:1	142-144	F001-XV-10
100-117	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	98:2	145-151	F001-XV-11
118-122	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	97:3	152-175	F001-XV-12
123-127	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	96:4		
128-132	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	95:5		
133-140	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	93:7		
141-147	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10		
148-153	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	80:20		
154-157	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	70:30		
158-162	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	60:40		
163-169	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	50:50		
170-175	MeOH	100		

\* Fracciones activas



De la fracción F001-XV-2 se obtuvieron cantidades adicionales (33.9 mg) de crisofanol (1).

La fracción F001-XV-3 se sometió a una cromatografía en capa fina preparativa utilizando como eluyente Hex-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6:4, 3 veces). Este proceso permitió el aislamiento y purificación de 5.8 mg de fisciona (4) como un sólido amarillo con un punto de fusión de 198-200 °C. De manera adicional, se obtuvieron 5 mg de crisofanol (1).

Así mismo, la aplicación de la técnica de cromatografía preparativa en capa fina de la fracción F001-XV-9 utilizando como sistema de elución CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-Ac. acético (85:5:10, 3 veces) permitió el aislamiento y purificación de 15 mg de crisofancina (2) y 10 mg de pulmatina (3), las cuales se identificaron mediante el análisis de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas.

Por último, de la fracción F001-XV-9 precipitó de manera espontánea un sólido blanco (51 mg), identificado como β-D-glucositosterol (8) por comparación con una muestra auténtica (Morales, 2003).

#### **4.4.4. Aislamiento del crisofanol (1), crisofancina (2), pulmatina (3) y β-sitosterol (7) de la fracción activa primaria F002.**

La fracción primaria activa F002 (10 g) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante el método de cromatografía en columna abierta utilizando como adsorbente gel de sílice (349 g) y como eluyentes, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (diversas proporciones). Se obtuvieron un total de 230 fracciones de 100 mL cada una. Aquellas fracciones que presentaron características cromatográficas similares se combinaron para generar 14 fracciones secundarias (Cuadro 9).

La actividad antimicrobiana se concentró en los grupos de fracciones F002-II y F002-VIII de acuerdo con los resultados del ensayo de difusión en agar.

A partir de la fracción activa F002-II se obtuvieron 42 mg adicionales de crisofanol (1). De la fracción inactiva F002-III cristalizaron espontáneamente 31.8 mg de β-sitosterol (7). Por último, de la fracción activa F002-VIII precipitaron espontáneamente 500 mg de una mezcla constituida por los glicosidos crisofancina (2) y pulmatina (3).

**Cuadro 9.** Resumen del fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa F002 de la especie *Alvaradoa amorphoides*.

Fracciones	Sistema de elución	Proporción (%)	Fracciones combinadas	Clave
1-32	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	1-4	F002- I
33-38	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH	99:1	5-7	F002- II *
39-78	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH	98:2	8-21	F002- III
79-85	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH	97:3	22-32	F002- IV
86-110	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH	96:4	33-56	F002- V
111-135	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH	95:5	57-64	F002-VI
136-154	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH	94:6	65-89	F002-VII
1555-160	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH	93:7	90-143	F002-VIII*
161-166	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH	92:8	144-164	F002-IX
167-173	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH	90:10	165-176	F002- X
174-195	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH	80:20	177-187	F002- XI
196-211	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH	70:30	188-198	F002-XII
212-218	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH	60:40	199-216	F002-XIII
219-224	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH	50:50	217-230	F002-XIV
225-230	MeOH	100		

\* Fracciones activas

#### 4.4.5. Pruebas químicas para la identificación de glicósidos.

##### 4.4.5.1. Prueba de Molish.

Se disolvieron 2 mg de los compuestos 2 y 3 en 3 mL de agua destilada de manera independiente en un tubo de ensayo. A las disoluciones resultantes se adicionó 1 mL de una disolución etanólica de  $\alpha$ -naftol (10%). Posteriormente, se agregó por las paredes de cada tubo de ensayo dos gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado observándose la aparición de una coloración violeta en la interfase. La formación del anillo violeta en la interfase es indicativa de la presencia de carbohidratos. Se emplearon glucosa y agua destilada como control positivo y blanco, respectivamente (Fariás, 1993).

#### 4.4.5.2. Hidrólisis ácida de los compuestos 2 y 3.

A 5 mg de los compuestos 2 y 3 se añadió 1 mL de HCl 1N. La mezcla anterior se sometió a reflujos durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo, la disolución ácida se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 5 mL); la fase orgánica obtenida se extrajo sucesivamente con  $\text{NaHCO}_3$  al 10% y agua, posteriormente, se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. La fase acuosa se utilizó para la detección cromatográfica de los azúcares. Al concentrar la fase orgánica a sequedad se obtuvieron 2 mg de un producto idéntico al crisofanol.

### 4.5. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA ESPECIE *Hofmeisteria schaffneri*.

#### 4.5.1. Preparación del extracto.

El material vegetal seco (1.6 Kg) se extrajo mediante un proceso de maceración con 20 L de una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1), el extracto resultante se filtró y concentró al vacío obteniéndose 350 g de extracto seco. Posteriormente, se determinó la actividad antimicrobiana del extracto resultante, empleando la técnica cualitativa de difusión en agar.

#### 4.5.2. Fraccionamiento primario del extracto de *Hofmeisteria schaffneri* y aislamiento de $\beta$ -sitosterol (7), $\beta$ -caroteno (9) y cuparina (10).

El extracto seco resultante (350 g) se sometió a un fraccionamiento primario vía cromatografía en columna abierta, empleando gel de sílice (818 g) como adsorbente y como eluyentes hexano, hexano- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (diversas proporciones),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (diversas proporciones). Se obtuvieron 272 fracciones de 200 mL cada una. El análisis cromatográfico en capa delgada de las mismas condujo a su agrupamiento en 13 fracciones primarias (Cuadro 10).

De la fracción primaria F2 precipitó espontáneamente un sólido amorfo rojo ladrillo (49.7 mg) con un punto de fusión de 183-184 °C. Este compuesto se identificó como el  $\beta$ -caroteno (9).

De la fracción F3 precipitó un sólido cristalino amarillo, el cual se purificó por sucesivas recristalizaciones de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  para generar 456.2 mg de euparina (10) bajo la forma de finas agujas cristalinas con un punto de fusión de 121-122 °C.

Por último de la fracción F5 precipitó un sólido cristalino blanco (141.7 mg), identificado como el  $\beta$ -sitosterol (7).

**Cuadro 10.** Fraccionamiento primario de las partes aéreas de la especie *Hofmeisteria schaffneri*, mediante cromatografía en columna abierta.

Fracciones	Sistema de elución	Proporción (%)	Fracciones reunidas	Clave
1-48	Hex- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	50:50	1-2	F1
49-65	Hex- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	40:60	3-7	F2
66-111	Hex- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	30:70	8-14	F3
112-120	Hex- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	20:80	15-29	F4
121-131	Hex- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	10:90	30-67	F5
132-145	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	100	68-149	F6
146-159	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH	99:1	150-173	F7
160-186	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH	98:2	174-192	F8
187-198	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH	97:3	193-203	F9
199-214	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH	96:4	204-243	F10
215-229	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH	95:5	244-253	F11
230-244	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH	90:10	254-259	F12
245-250	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH	80:20	260-272	F13
251-261	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH	70:30		
262-266	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH	60:40		
267-272	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH	50:50		

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 5.1. SELECCIÓN DE LAS ESPECIES *Alvaradoa amorphoides* Y *Hofmeisteria schaffneri* COMO CANDIDATOS APROPIADOS PARA LA OBTENCIÓN DE PRINCIPIOS ANTIBACTERIANOS.

La selección primaria de las especies *Alvaradoa amorphoides* y *Hofmeisteria schaffneri* se realizó de acuerdo con el criterio etnomédico, uno de los criterios más importantes para seleccionar las materias primas destinadas al descubrimiento de sustancias biológicamente activas (Farnsworth, 1991; Fyhrquist *et al.*, 2002). Posteriormente, durante la realización de los ensayos antimicrobianos efectuados al inicio de esta investigación, se estableció que los extractos crudos de estas especies poseen propiedades antibacterianas.

Como ensayo biológico para detectar la actividad inicial de los extractos íntegros se utilizó el método de difusión en agar y se emplearon cepas de bacterias Gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa*). En el caso de la especie *Alvaradoa amorphoides* se comprobó que el extracto era activo contra todos los microorganismos de prueba excepto *S. aureus*. Por otro lado, el extracto de la especie *Hofmeisteria schaffneri* presentó actividad significativa contra dos bacterias Gram negativas, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, presentando incluso una mayor actividad contra *P. aeruginosa* que la demostrada por la Gentamicina (12 µg/disco). Los resultados correspondientes a los dos extractos ensayados se indican en el Cuadro 11.

### 5.2. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE LA ESPECIE *Alvaradoa amorphoides*.

La preparación del extracto destinado a la separación de los principios antibacterianos de *A. amorphoides* se realizó mediante un proceso de maceración utilizando una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1) como disolvente de extracción. El extracto activo se fraccionó de manera preliminar mediante un proceso de partición, utilizando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt y MeOH acuoso (10%). Este proceso generó tres

fracciones primarias (Esquema 1). Cada una de ellas se evaluó utilizando la técnica de difusión en agar encontrándose que la actividad antimicrobiana se concentraba en las fracciones F001 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) y F002 (AcOEt) [Cuadro 12].

La fracción F001 resultó ser la más activa de las fracciones primarias. Todos los microorganismos utilizados fueron susceptibles a esta fracción. En el caso de las bacterias Gram positivas (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*) se observó que la actividad únicamente se presentó a concentraciones mayores de 500  $\mu\text{g}/\text{disco}$ . Por otra parte, la fracción F002 presentó actividad selectiva contra las bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa*), sin embargo, el crecimiento de *S. typhi* únicamente se afectó a la máxima concentración de prueba (1000  $\mu\text{g}/\text{disco}$ ). Por último, la fracción F003 solamente inhibió el crecimiento de *E. coli*. En general, en todos los casos se observó que el efecto antibacteriano fue similar al del control positivo.

**Cuadro 11.** Actividad antimicrobiana de los extractos de *Alvaradoa amorphoides* y *Hofmeisteria schaffneri*. Los resultados representan los diámetros promedio en mm de la zona de inhibición  $\pm$  D.E.

Extracto	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Controles positivos	Ampicilina 1.2 $\mu\text{g}/\text{disco}$	Estreptomicina 4 $\mu\text{g}/\text{disco}$	Cloranfenicol 1.1 $\mu\text{g}/\text{disco}$	Cloranfenicol 0.8 $\mu\text{g}/\text{disco}$	Gentamicina 12 $\mu\text{g}/\text{disco}$
<i>A. amorphoides</i> 1000 $\mu\text{g}/\text{disco}$	N.A.	20.50 $\pm$ 2.1	21.70 $\pm$ 0.6	22.70 $\pm$ 1.1	29.30 $\pm$ 2.3
Control positivo	---	22.00 $\pm$ 2.8	24.00 $\pm$ 1.0	25.00 $\pm$ 0.0	28.00 $\pm$ 1.7
<i>A. amorphoides</i> 500 $\mu\text{g}/\text{disco}$	N.A.	20.00 $\pm$ 1.4	22.30 $\pm$ 1.5	23.70 $\pm$ 1.1	25.00 $\pm$ 1.0
Control positivo	---	22.00 $\pm$ 1.0	23.70 $\pm$ 1.1	25.70 $\pm$ 1.1	28.00 $\pm$ 1.0
<i>A. amorphoides</i> 100 $\mu\text{g}/\text{disco}$	N.A.	20.00 $\pm$ 1.0	21.70 $\pm$ 1.5	24.00 $\pm$ 1.7	31.00 $\pm$ 1.0
Control positivo	---	20.50 $\pm$ 0.7	23.00 $\pm$ 1.0	24.30 $\pm$ 0.6	26.50 $\pm$ 0.7

N.A. = No activo

**Cuadro 11.** Actividad antimicrobiana de los extractos de *Alvaradoa amorphoides* y *Hofmeisteria schaffneri*. Los resultados representan los diámetros promedio en mm de la zona de inhibición  $\pm$  D.E. (continuación).

Extracto	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Controles positivos	Ampicilina 1.2 $\mu$ g/disco	Estreptomicina 4 $\mu$ g/disco	Cloranfenicol 1.1 $\mu$ g/disco	Cloranfenicol 0.8 $\mu$ g/disco	Gentamicina 12 $\mu$ g/disco
<i>H. schaffneri</i> 1000 $\mu$ g/disco	N.A.	N.A.	20.30 $\pm$ 0.6	21.00 $\pm$ 0.0	29.30 $\pm$ 0.6
Control positivo	---	---	23.00 $\pm$ 1.0	21.50 $\pm$ 0.7	26.70 $\pm$ 1.1
<i>H. schaffneri</i> 100 $\mu$ g/disco	N.A.	21.50 $\pm$ 2.12	19.70 $\pm$ 0.6	21.00 $\pm$ 1.4	28.30 $\pm$ 1.5
Control positivo	---	25.50 $\pm$ 0.71	25.30 $\pm$ 0.6	21.50 $\pm$ 0.7	25.70 $\pm$ 1.1
<i>H. schaffneri</i> 10 $\mu$ g/disco	N.A.	N.A.	19.70 $\pm$ 0.6	21.00 $\pm$ 1.4	27.00 $\pm$ 1.7
Control positivo	---	---	22.30 $\pm$ 0.6	23.00 $\pm$ 2.8	25.30 $\pm$ 0.6

N.A. = No activo

**Cuadro 12.** Actividad antimicrobiana de las fracciones primarias del extracto de *Alvaradoa amorphoides*. Los resultados representan los diámetros promedio en mm de la zona de inhibición  $\pm$  D.E.

	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Controles positivos	Ampicilina 1.2 $\mu$ g/disco	Estreptomicina 4 $\mu$ g/disco	Cloranfenicol 1.1 $\mu$ g/disco	Cloranfenicol 0.8 $\mu$ g/disco	Gentamicina 12 $\mu$ g/disco
<b>F001</b> 1000 $\mu$ g/disco	21.00 $\pm$ 1.7	20.50 $\pm$ 0.7	23.30 $\pm$ 0.6	21.70 $\pm$ 0.6	26.00 $\pm$ 0.0
Control positivo	25.00 $\pm$ 0.0	25.50 $\pm$ 0.7	25.67 $\pm$ 0.6	22.70 $\pm$ 0.6	27.70 $\pm$ 0.6
<b>F001</b> 500 $\mu$ g/disco	21.00 $\pm$ 1.4	20.50 $\pm$ 0.7	20.70 $\pm$ 0.6	22.30 $\pm$ 1.1	27.30 $\pm$ 2.1
Control positivo	25.50 $\pm$ 0.7	25.00 $\pm$ 0.0	25.30 $\pm$ 0.6	21.00 $\pm$ 1.0	27.30 $\pm$ 0.6
<b>F001</b> 100 $\mu$ g/disco	N.A.	N.A.	21.00 $\pm$ 1.4	22.30 $\pm$ 0.6	26.70 $\pm$ 1.1
Control positivo	---	---	26.00 $\pm$ 0.0	22.30 $\pm$ 0.8	26.70 $\pm$ 1.5

N.A. = No activo

**Cuadro 12.** Actividad antimicrobiana de las fracciones primarias de *Alvaradoa amorphoides*. Los resultados representan los diámetros promedio en mm de la zona de inhibición  $\pm$  D.E. (continuación).

	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Controles positivos	Ampicilina 1.2 $\mu\text{g}/\text{disco}$	Estreptomicina 4 $\mu\text{g}/\text{disco}$	Cloranfenicol 1.1 $\mu\text{g}/\text{disco}$	Cloranfenicol 0.8 $\mu\text{g}/\text{disco}$	Gentamicina 12 $\mu\text{g}/\text{disco}$
<b>F002</b>			20.50	23.00	32.30
<b>1000 <math>\mu\text{g}/\text{disco}</math></b>	N.A.	N.A.	+ 0.7	+ 1.0	+ 2.1
Control positivo	---	---	25.50	22.30	24.70
			+ 0.7	+ 0.6	+ 1.1
<b>F002</b>			N.A.	22.00	28.30
<b>500 <math>\mu\text{g}/\text{disco}</math></b>	N.A.	N.A.	N.A.	+ 0.6	+ 0.6
Control positivo	---	---	---	22.00	26.00
				+ 1.0	+ 0.0
<b>F002</b>			N.A.	22.30	25.30
<b>100 <math>\mu\text{g}/\text{disco}</math></b>	N.A.	N.A.	N.A.	+ 0.6	+ 1.1
Control positivo	---	---	---	21.70	25.30
				+ 0.6	+ 0.6
<b>F003</b>			N.A.	21.33	N.A.
<b>1000 <math>\mu\text{g}/\text{disco}</math></b>	N.A.	N.A.	N.A.	+ 0.6	
Control positivo	---	---	---	22.33	---
				+ 1.1	
<b>F003</b>			N.A.	21.66	N.A.
<b>500 <math>\mu\text{g}/\text{disco}</math></b>	N.A.	N.A.	N.A.	+ 1.5	
Control positivo	---	---	---	22.66	---
				+ 0.6	
<b>F003</b>			N.A.	22.33	N.A.
<b>100 <math>\mu\text{g}/\text{disco}</math></b>	N.A.	N.A.	N.A.	+ 1.5	
Control positivo	---	---	---	22.33	---
				+ 0.6	

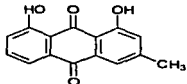
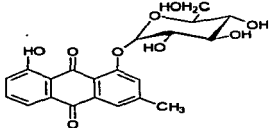
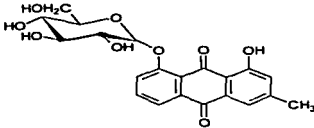
N.A. = No activo

Posteriormente, las fracciones activas F001 y F002 se sometieron a un fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta. Los resultados de las evaluaciones biológicas indicaron que las fracciones secundarias F001-X, F001-XV, F002-II y F002-VIII presentaron actividad antimicrobiana. Estas fracciones se sometieron a diversos procedimientos cromatográficos (Sección



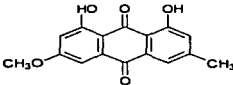
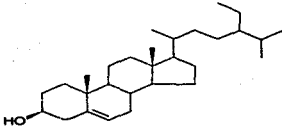
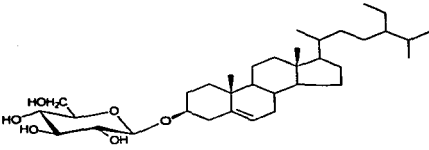
experimental 4.4.), lo que permitió el aislamiento de cuatro antraquinonas [crisofanol (1), crisofancina (2), pulmatina (3) y fisciona (4)] y de dos esteroides [ $\beta$ -sitosterol (7) y  $\beta$ -D-glucositosterol (8)]. En el Cuadro 13 se indican las estructuras de los compuestos aislados y sus rendimientos con base en el peso seco del material vegetal.

**Cuadro 13.** Metabolitos secundarios aislados de la especie vegetal *Alvaradoa amorphoides*.

COMPUESTO	RENDIMIENTO* (%)
 <p>Crisofanol (1)</p>	$3.1 \times 10^{-2}$
 <p>Crisofancina (2)</p>	$3.7 \times 10^{-4}$
 <p>Pulmatina (3)</p>	$2.5 \times 10^{-4}$

\* Con referencia al peso seco de la planta.

**Cuadro 13.** Metabolitos secundarios aislados de la especie vegetal *Alvaradoa amorphoides* (continuación).

COMPUESTO	RENDIMIENTO* (%)
 <p data-bbox="402 445 497 463">Fisciona (4)</p>	1.4x10 <sup>-4</sup>
 <p data-bbox="391 678 511 696">β-sitosterol (7)</p>	1.8x10 <sup>-2</sup>
 <p data-bbox="359 936 543 955">β-D-glucositosterol (8)</p>	1.3x10 <sup>-3</sup>

\* Con referencia al peso seco de la planta.

## 5.2.1. Caracterización de la fisciona (4).

La fisciona (4) se obtuvo como un sólido cristalino amarillo y soluble en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . En el Cuadro 14 se indican sus constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

El espectro en el IR presenta bandas de absorción asociadas con el carácter aromático de la molécula y con la presencia de grupos carbonilo de quinona ( $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$ ), e hidroxilo ( $\sim 3434\text{ cm}^{-1}$ ).

El espectro de masas generado por la técnica de impacto electrónico de la quinona 4, presentó un ión molecular con una relación masa carga ( $m/z$ ) de 284 uma, el cual corresponde a la fórmula  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$ .

**Cuadro 14.** Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la fisciona (4).

Fisciona (4)	
<b>Fórmula molecular</b>	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$
<b>Punto de fusión</b>	198-200 °C
<b>IR <math>\nu_{\text{máx}}</math> (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math></b>	3434, 2921, 1630, 1567, 1479, 1386, 1325, 1227, 1162, 757.
<b>EMIE <math>m/z</math> (int. rel.)</b>	284 [ $\text{M}^+$ ] (100), 255 (11), 241 (10), 213 (6), 185 (4), 128 (6).
<b>RMN-<math>^1\text{H}</math> (<math>\text{CDCl}_3</math>) (Espectro 7)</b>	12.32 (s, OH-1), 12.12 (s, OH-8) 7.63 (d, $J=1.5$ , H-5), 7.37 (d, $J=2.7$ , H-4), 7.08 (q, H-7), 6.69 (d, $J=2.4$ , H-2), 3.94 (s, $\text{OCH}_3$ -3), 2.45 (s, $\text{CH}_3$ -6).
<b>RMN-<math>^{13}\text{C}</math> (<math>\text{CDCl}_3</math>) (Espectro 8)</b>	190.79 (C-9), 182.03 (C-10), 166.54 (C-1), 165.18 (C-8), 162.49 (C-3), 148.44 (C-6), 135.30 (C-4a), 133.2 (C-10a), 124.50 (C-5), 121.28 (C-7), 113.70 (C-9a), 110.30 (C-8a), 110.26 (C-4), 106.76 (C-2), 56.08 ( $\text{OCH}_3$ -3), 22.16 ( $\text{CH}_3$ -6).

El análisis de los espectros de RMN del compuesto confirmó la presencia del núcleo 1,8-dihidroxi-antraquinona (Kalidhar, 1989). Las características más relevantes de estos espectros se indican a continuación:

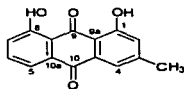
- o En  $\delta_C$  190.79 y 182.03 se observan dos señales atribuibles a los carbonilos de la porción quinona del núcleo base.
- o En  $\delta_H$  12.32 y 12.12 se observan señales para dos hidroxilos quelatados. Ambas señales desaparecen al equilibrar el espectro con  $D_2O$ . La presencia de estas señales en el espectro de RMN- $^1H$  es consistente con la ubicación de hidroxilos en C-1 y C-8.
- o En  $\delta_H$  2.45 se observa un singlete ancho atribuible a un metilo sobre anillo aromático. Esta señal correlaciona en el espectro HETCOR con la absorción en  $\delta_C$  22.16.
- o En la región aromática se aprecian dos conjuntos de señales. El primero aparece como un sistema AB en  $\delta_H$  7.63 (d,  $J=1.5$  Hz, H-5) y 7.08 (q, H-7). Estas señales son asignables a dos hidrógenos aromáticos *meta* relacionados, *orto* al grupo metilo en C-6. El segundo conjunto también corresponde a un sistema AB en  $\delta_H$  7.37 (d,  $J=2.7$  Hz) y  $\delta_H$  6.69 (d,  $J=2.4$  Hz) y las señales son atribuibles a H-4 y H-2, respectivamente.
- o Por último, en  $\delta_H$  3.94 se aprecia una señal característica para un grupo metoxilo. Este singlete correlaciona en el espectro HETCOR con la señal en  $\delta_C$  56.08.

Con base en las evidencias presentadas, el compuesto **4** se identificó como la fisciona. Cabe destacar que este producto se describe por vez primera como constituyente de *Alvaradoa amorphoides*.

### 5.2.2. Caracterización del crisofanol (1), crisofancina (2) y pulmatina (3).

El crisofanol (1) se caracterizó por comparación de sus constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas con aquellas de una muestra auténtica aislada de *Rumex hymenosepalus* (Guerrero Analco y Martínez Luis, 2002), [Cuadro 15].

Cuadro 15. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del crisofanol (1).



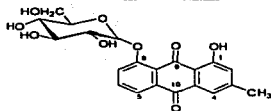
Crisofanol (1)

<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>
<b>Punto de fusión</b>	200-201 °C
<b>IR <math>\nu_{\text{max}}</math> (KBr) cm<sup>-1</sup></b>	2920, 1628, 1567, 1375, 1271, 1161, 753
<b>EMIE <math>m/z</math> (int. rel.)</b>	254 [M <sup>+</sup> ] (100), 237 (11), 226 (29), 197 (18), 152 (13), 127 (9), 115 (7)
<b>RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) (Espectro 1)</b>	12.12 (s, OH-1), 12.01 (s, OH-8), 7.82 (dd, $J=7.5, 1.2$ ; H-5), 7.67 (dd, $J=7.8, 7.8$ ; H-6), 7.65 (m, H-4), 7.30 (dd, $J=8.4, 1.2$ ; H-7), 7.10 (m, H-2), 2.47 (t, $J=0.6$ CH <sub>3</sub> -3)
<b>RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) (Espectro 2)</b>	192.5 (C-9), 182.0 (C-10), 162.7 (C-8), 162.4 (C-1), 149.3 (C-3), 136.9 (C-6), 133.6 (C-4a), 133.3 (C-10a), 124.5 (C-7), 124.4 (C-2), 121.4 (C-4), 119.9 (C-5), 115.8 (C-8a), 113.7 (C-9*), 22.3 (CH <sub>3</sub> -3)

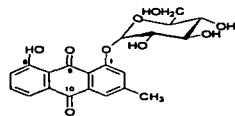
Las características de solubilidad de los metabolitos 2 y 3, así como la reacción positiva frente al reactivo de Molish permitió evidenciar la naturaleza glicosídica de los compuestos. El análisis cromatográfico de la fracción acuosa obtenida de la hidrólisis ácida (HCl 1N) de ambos productos permitió detectar a la glucosa como el único azúcar presente en las moléculas. Por otro lado, la porción aglicona obtenida de la fracción orgánica resultó idéntica en todos sus aspectos al crisofanol. En consecuencia los dos productos son glucósidos del crisofanol.

La principal diferencia entre los espectros de RMN de los compuestos **2** y **3** se observó en la zona de los protones aromáticos. Esta observación permitió inferir *a priori* que la glucosa se encuentra unida en un caso en el hidroxilo en C-1 y, en el otro en el hidroxilo en C-8 (Cuadro 16).

**Cuadro 16.** Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la crisofanecina (**2**) y la pulmatina (**3**).



**Crisofanecina (2)**



**Pulmatina (3)**

	<b>Crisofanecina (2)</b>	<b>Pulmatina (3)</b>
<b>Fórmula molecular</b>	$C_{21}H_{20}O_9$	$C_{21}H_{20}O_9$
<b>Punto de fusión</b>	248-249 °C	232-234 °C
<b>IR <math>\nu_{max}</math> (KBr) <math>cm^{-1}</math></b>	3450, 1600	3394, 1633
<b>FAB-MS <math>m/z</math> (int. rel.)</b>	416 [M <sup>+</sup> ], 253 (100)	416 [M <sup>+</sup> ], 253 (100)
<b>RMN-<sup>1</sup>H (DMSO) (Espectro 3 y 5)</b>	12.83 (OH-8), 7.87 (dd, $J=7.8, 2.4$ Hz; H-5), 7.84 (dd, $J=7.4, 7.3$ Hz; H-6), 7.69 (dd, $J=7.1, 2.5$ Hz; H-7), 7.50 (sa, H-4), 7.20 (sa, H-2), 5.17-3.35 (Glu), 2.42 (s, CH <sub>3</sub> -3)	12.83 (OH-1), 7.77 (t, $J=8.4$ Hz, H-6), 7.74 (sa, H-4), 7.65 (dd, $J=7.5, 1.5$ Hz; H-5), 7.53 (sa, H-2), 7.35 (dd, $J=8.1, 1.2$ Hz; H-7), 5.15-3.37 (Glu), 2.41 (s, CH <sub>3</sub> -3)
<b>RMN-<sup>13</sup>C (DMSO) (Espectro 4 y 6)</b>	187.5 (C-9), 182.1 (C-10), 158.2 (C-8), 147.6 (C-1, C-3), 135.9 (C-6), 134.8 (C-10a), 132.2 (C-4a), 124.1 (C-2), 122.5 (C-7), 120.6 (C-8a), 120.5 (C-5), 119.4 (C-4), 114.8 (C-9a), 100.5-60.6 (Glu), 21.5 (CH <sub>3</sub> -3)	187.6 (C-9), 182.0 (C-10), 161.6 (C-8), 158.2 (C-1), 147.2 (C-3), 136.0 (C-6), 134.4 (C-10a), 132.4 (C-4a), 124.2 (C-7), 122.8 (C-2), 120.6 (C-4), 118.3 (C-8a), 118.1 (C-5), 116.7 (C-9a), 100.6-60.6 (Glu), 21.7 (CH <sub>3</sub> -3)

La comparación de los desplazamientos químicos de los espectros de RMN de estos productos con los descritos en la literatura para varios glucósidos del crisofanol permitió identificar a los compuestos 2 y 3 como la crisofaneína y la pulmatina, respectivamente (Kubo *et al.*, 1992).

Considerando que los compuestos 1-3 predominan en los distintos cromatogramas del extracto de *Alvaradoa amorphoides* es altamente probable que estos sirvan como marcadores para pruebas de identidad y/o composición como parte de las pruebas de control de calidad de esta especie. A manera de ejemplo en la Figura 5 se muestra un cromatograma del extracto vegetal, el crisofanol (1), la crisofaneína (2) y la pulmatina (3), empleando como sistema de elución  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (90:10).

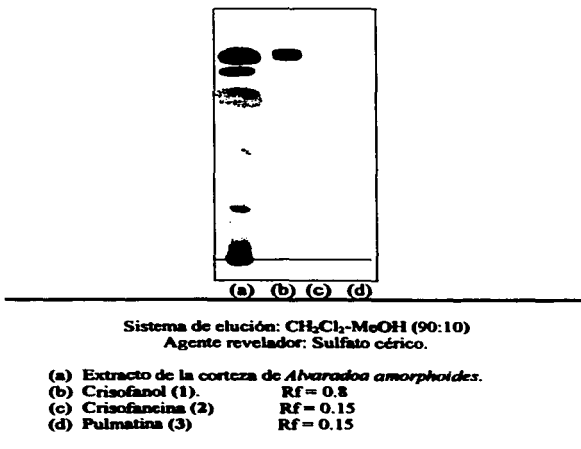


Figura 5. Cromatograma del extracto y compuestos 1, 2 y 3 de la especie *Alvaradoa amorphoides*.

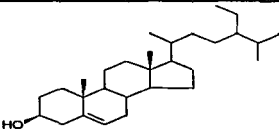
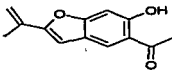
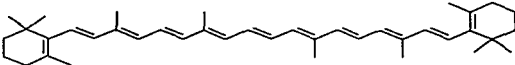
Como se desprende del cromatograma, el crisofanol (1) y sus glucósidos son los constituyentes diagnósticos del extracto.

### 5.3. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE LA ESPECIE *Hofmeisteria schaffneri*.

La preparación del extracto se realizó mediante un proceso de maceración utilizando como disolvente de extracción una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1). La metodología experimental se indicó en la Sección experimental, inciso 4.5.

Posteriormente, el extracto activo se fraccionó de manera preliminar mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. Este proceso generó 13 fracciones primarias (Cuadro 10) y los compuestos  $\beta$ -sitosterol (7),  $\beta$ -caroteno (9) y euparina (10) los cuales cristalizaron espontáneamente de la fracciones F-5, F-2 y F-3, respectivamente. En el Cuadro 17 se presentan las estructuras de los metabolitos aislados y sus rendimientos.

**Cuadro 17.** Metabolitos secundarios aislados de la especie vegetal *Hofmeisteria schaffneri*.

COMPUESTO	RENDIMIENTO* (%)
 $\beta$ -sitosterol (7)	$8.8 \times 10^{-3}$
 Euparina (9)	$2.8 \times 10^{-2}$
 $\beta$ -caroteno (10)	$3.1 \times 10^{-3}$

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

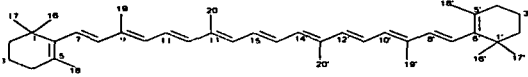
\* Con referencia al peso seco de la planta.



5.3.1. Caracterización del  $\beta$ -caroteno (9).

El  $\beta$ -caroteno (9) se aisló como un sólido amorfo color rojo ladrillo, soluble en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y con un punto de fusión de 183-184 °C. Las características físicas, espectroscópicas y espectrométricas se presentan en el Cuadro 18.

Cuadro 18. Características físicas, espectroscópicas y espectrométricas del  $\beta$ -caroteno (9).

	
<b><math>\beta</math>-caroteno (9)</b>	
<b>Fórmula molecular</b>	$\text{C}_{40}\text{H}_{56}$
<b>Punto de fusión</b>	183-184 °C
<b>IR <math>\nu_{\text{max}}</math> (KBr) <math>\text{cm}^{-1}</math></b>	2916, 2860, 1443, 964
<b>EMIE <math>m/z</math> (int. rel.)</b>	536 [M <sup>+</sup> ] (100), 444 (21), 268 (9), 209 (13), 157 (19), 119 (33), 69 (30), 55 (15)
<b>RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) (Espectro 9)</b>	6.03-6.69 (H-7/H-7', H-8/H-8', H-10/H-10', H-11/H-11', H-12/H-12', H-14/H-14', H-15/H-15'), 2.02 (m, H-4/H-4'), 1.97 (s, CH <sub>3</sub> -19/CH <sub>3</sub> -19', CH <sub>3</sub> -20/ CH <sub>3</sub> -20'), 1.72 (s, CH <sub>3</sub> -18/CH <sub>3</sub> -18'), 1.62 (m, H-3/H-3'), 1.47 (m, H-2/H-2'), 1.03 (s, CH <sub>3</sub> -16/CH <sub>3</sub> -16', CH <sub>3</sub> -17/CH <sub>3</sub> -17')
<b>RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) (Espectro 10)</b>	125.03-137.92 (C-7/C-7', C-8/C-8', C-10/C-10', C-11/C-11', C-12/C-12', C-14/C-14', C-15/C-15'), 39.7 (C-2/C-2'), 33.1 (C-4/C-4'), 28.98 (CH <sub>3</sub> -16/CH <sub>3</sub> -16', CH <sub>3</sub> -17/CH <sub>3</sub> -17'), 21.77 (CH <sub>3</sub> -18/CH <sub>3</sub> -18'), 19.3 (C-3/C-3'), 12.79 (CH <sub>3</sub> -19/CH <sub>3</sub> -19', CH <sub>3</sub> -20/CH <sub>3</sub> -20')

La fórmula molecular del producto se estableció por espectrometría de masas de alta resolución como  $C_{40}H_{56}$ , observándose el ion molecular en una relación  $m/z$  de 536 uma. Esta fórmula permite un índice de deficiencia de hidrógenos de 13.

El espectro en el IR, presenta bandas de absorción asociadas con la presencia de uniones C-H alifáticos ( $2916$ ,  $2860$ ,  $1443\text{ cm}^{-1}$ ) y de una cadena olefínica ( $964\text{ cm}^{-1}$ ). El análisis conjunto de los espectros de RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$  permitió establecer la naturaleza carotenoides del producto (Agarwal, 1998; Bjornland, *et al.*, 1989; Farias, 1993; Michaud *et al.*, 2000). Las características más relevantes de los espectros de RMN se resumen a continuación:

- o En  $\delta_{\text{H}}$  1.03 se observa un singulete atribuible al gem dimetilo ( $\text{CH}_3\text{-}16/\text{CH}_3\text{-}16'$ ,  $\text{CH}_3\text{-}17/\text{CH}_3\text{-}17'$ ) de las posiciones 1 y 1' del núcleo carotenoides. La señal del carbono correspondiente aparece en  $\delta_{\text{C}}$  28.98.
- o En  $\delta_{\text{H}}$  1.72/ $\delta_{\text{C}}$  21.77 se observa la señal correspondiente a los metilos sobre doble ligadura ubicados en las posiciones C-5 y C-5'.
- o En  $\delta_{\text{H}}$  1.97 se aprecia una señal simple asignable a los metilos sobre doble ligadura ubicados en la cadena isoprenoide. Esta señal correlaciona en el espectro HETCOR con la señal en  $\delta_{\text{C}}$  12.79.
- o En la zona comprendida entre  $\delta_{\text{H}}$  1.4 y 2.1 se aprecian tres señales múltiples en  $\delta_{\text{H}}$  1.47, 1.62 y 2.02 que se atribuyen a los hidrógenos H-2/H-2', H-3/H-3' y H-4/H-4', respectivamente. En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  los carbonos correspondientes aparecen en  $\delta_{\text{C}}$  39.66 (C-2/C-2'),  $\delta_{\text{C}}$  19.27 (C-3/C-3') y  $\delta_{\text{C}}$  33.12 (C-4/C-4').
- o Por último, en los rangos  $\delta_{\text{H}}$  6.1-6.7 y  $\delta_{\text{C}}$  125.03-137.92 se observan un conjunto de señales asociadas a los metinos de la cadena olefínica ubicada entre las dos unidades de ciclohexeno (H-7/H-7', H-8/H-8', H-10/H-10', H-11/H-11', H-12/H-12', H-14/H-14' y H-15/H-15').

La comparación de las señales antes descritas con las de una serie de carotenoides previamente descritos en la literatura (Aldrich, 1992; Bjornland, *et al.*, 1989) permitió identificar al compuesto como el  $\beta$ -caroteno (**9**). Este compuesto es de gran importancia como precursor de la Vitamina A y por sus propiedades colorantes y antioxidantes (Evans, 2002).

### 5.3.2. Caracterización de la euparina (10).

De la fracción primaria F3 se obtuvo a la euparina (10) bajo la forma de finas agujas amarillas. En el Cuadro 19 se resumen sus constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas. Las evidencias que permitieron establecer la estructura molecular del producto se describen a continuación.

El espectro en el IR presenta una absorción intensa asociada con la presencia de grupos aromático ( $\sim 1466, 1374 \text{ cm}^{-1}$ ), vinílico ( $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ ) y carbonilo de cetona conjugada ( $\sim 1634 \text{ cm}^{-1}$ ).

El espectro de masas generado por la técnica de impacto electrónico presenta un ión molecular en una relación  $m/z$  de 216 uma, el cual corresponde a la fórmula molecular de  $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_3$ .

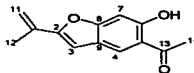
El análisis de los espectros de RMN confirmó la presencia de un núcleo benzofurano (De Gutiérrez *et al.*, 1995; Jia, A. y Zhao, Y. 1994) con un grupo isopropilideno en C-2 y una metilcetona en la posición C-5. Las características más importantes de estos espectros se indican a continuación:

- o En  $\delta_{\text{H}}$  7.88 y 6.53 se aprecian señales asignables a los hidrógenos H-4 y H-7 del anillo aromático. La apariencia de las señales es congruente con la disposición *para* de ambos hidrógenos. En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  las señales de los carbonos correspondientes se observan en  $\delta_{\text{C}}$  123.45 y 102.36, respectivamente.
- o En  $\delta_{\text{H}}$  6.93 se observa un singulete asignable al hidrógeno H-3. En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  este núcleo se observa en  $\delta_{\text{C}}$  99.37.
- o En  $\delta_{\text{H}}$  5.18 y 5.75 se observan dos señales múltiples atribuibles a los hidrógenos del grupo isopropilideno en C-2. Estas señales correlacionan en el espectro HETCOR con la absorción en  $\delta_{\text{C}}$  113.65. Las señales del metilo vinílico de esta misma unidad estructural se observan en  $\delta_{\text{H}}$  2.09 y  $\delta_{\text{C}}$  19.16.
- o En  $\delta_{\text{H}}$  2.67 se observa un singulete que correlaciona en el espectro HETCOR con la señal en  $\delta_{\text{C}}$  26.74. Las absorciones antes descritas y la señal de carbonilo en  $\delta_{\text{C}}$  203.86 confirman la presencia de una metilcetona en la molécula.
- o En  $\delta_{\text{H}}$  12.51 se observa un singulete que desaparece al equilibrar la disolución de la muestra con  $\text{D}_2\text{O}$ . Esta señal indica la presencia de un hidroxilo quelatado en la molécula.

La disposición relativa de los grupos metilcetona e hidroxilo en la porción aromática del benzofurano se determinó con base en el desplazamiento químico de los hidrógenos aromáticos. De tal forma que el desplazamiento a campo alto de uno de los hidrógenos aromáticos (H-7,  $\delta_{\text{H}}$  6.53) es

congruente con la ubicación del hidroxilo quelatado en C-6. En consecuencia, la metilcetona debe estar ubicada en la posición C-5. De esta manera se forma un puente de hidrógeno entre el grupo carbonilo y el hidroxilo.

**Cuadro 19.** Constantes físicas y espectroscópicas de la euparina (10).



**Euparina (10)**

<b>Fórmula molecular</b>	$C_{13}H_{12}O_3$
<b>Punto de fusión</b>	120-121°C
<b>IR <math>\nu_{max}</math> (KBr) <math>cm^{-1}</math></b>	2945, 1786, 1633, 1466.
<b>EMIE <math>m/z</math> (int. rel.)</b>	216 [M <sup>+</sup> ] (96), 201 (100), 198 (9), 173 (21), 115 (9), 91 (4), 69 (4), 51 (3)
<b>RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) (Espectro 11)</b>	12.51 (s, OH), 7.88 (sa, H-4), 6.96 (s, H-3), 6.53 (sa, H-7), 5.75 (s, H-11), 5.18 (s, H-11'), 2.67 (s, H-14), 2.09 (s, H-12).
<b>RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) (Espectro 12)</b>	203.86 (C-13), 161.53 (C-8), 159.60 (C-6), 157.84 (C-2), 132.08 (C-5), 123.45 (C-4), 121.84 (C-9), 116.78 (C-10), 113.65 (C-11), 102.36 (C-7), 99.37 (C-3), 26.74 (C-14), 19.16 (C-12).

Es importante mencionar que todos los datos espectroscópicos se encuentran de acuerdo con los descriptos previamente en la literatura para la euparina (10) (De Gutiérrez, *et al.*, 1995; Proksch, *et al.*, 1986; Siebertz, *et al.*, 1989).

Como resultado de este estudio se propone a la euparina (10) como un compuesto marcador para la identificación de la especie *Hofmeisteria schaffneri*. En todos los cromatogramas en capa delgada del extracto, la mancha correspondiente a este compuesto es la más notable. A manera de ejemplo, en la Figura 7 se muestra un cromatograma del extracto. Para la obtención de éste se empleó

como fase móvil una mezcla de hex- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5:95) y como agente revelador un reactivo a base de sulfato cérico.

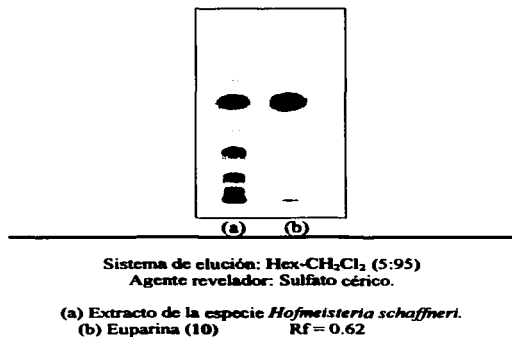


Figura 6. Cromatograma del extracto de la especie *Hofmeisteria schaffneri* y del compuesto 10.

#### 5.4. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE LAS ESPECIES *Alvaradoa amorphoides* y *Hofmeisteria schaffneri*.

La actividad antimicrobiana de los compuestos obtenidos en el presente estudio, se determinó mediante la técnica cualitativa de difusión en agar, utilizando los mismos microorganismos que para el extracto original.

Para determinar el potencial antimicrobiano se midieron los halos de inhibición de los compuestos puros sobre el crecimiento de los microorganismos de prueba y se compararon con los halos de inhibición generados por los antibióticos empleados como controles positivos. Los resultados obtenidos se muestran en los Cuadros 20-23.

**Cuadro 20.** Actividad antimicrobiana de la crisofanecina (2). Los resultados representan los diámetros promedio en mm de la zona de inhibición  $\pm$  D.E.

	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Controles positivos	Ampicilina 1.2 $\mu\text{g}/\text{disco}$	Estreptomycinina 4 $\mu\text{g}/\text{disco}$	Cloranfenicol 1.1 $\mu\text{g}/\text{disco}$	Cloranfenicol 0.8 $\mu\text{g}/\text{disco}$	Gentamicina 12 $\mu\text{g}/\text{disco}$
<b>Crisofanecina (2)</b> 100 $\mu\text{g}/\text{disco}$	19.00 $\pm$ 0.0	19.00 $\pm$ 0.0	20.10 $\pm$ 1.1	22.00 $\pm$ 1.4	27.70 $\pm$ 0.6
Control positivo	29.00 $\pm$ 1.0	21.50 $\pm$ 0.7	23.00 $\pm$ 1.0	22.00 $\pm$ 1.4	25.30 $\pm$ 1.5
<b>Crisofanecina (2)</b> 10 $\mu\text{g}/\text{disco}$	23.70 $\pm$ 1.5	19.00 $\pm$ 0.0	22.30 $\pm$ 1.5	19.50 $\pm$ 0.7	30.70 $\pm$ 2.3
Control positivo	28.70 $\pm$ 0.6	22.00 $\pm$ 1.4	23.70 $\pm$ 0.6	21.50 $\pm$ 0.7	23.30 $\pm$ 0.6
<b>Crisofanecina (2)</b> 1 $\mu\text{g}/\text{disco}$	N.A.	19.00 $\pm$ 0.0	20.00 $\pm$ 0.0	22.00 $\pm$ 2.8	29.70 $\pm$ 2.1
Control positivo	---	21.00 $\pm$ 0.0	24.00 $\pm$ 0.0	22.50 $\pm$ 2.1	25.00 $\pm$ 2.0
N.A.= No activo					

**Cuadro 21.** Actividad antimicrobiana de la pulmatina (3). Los resultados representan los diámetros promedio en mm de la zona de inhibición  $\pm$  D.E.

	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Controles positivos	Ampicilina 1.2 $\mu\text{g}/\text{disco}$	Estreptomycinina 4 $\mu\text{g}/\text{disco}$	Cloranfenicol 1.1 $\mu\text{g}/\text{disco}$	Cloranfenicol 0.8 $\mu\text{g}/\text{disco}$	Gentamicina 12 $\mu\text{g}/\text{disco}$
<b>Pulmatina (3)</b> 100 $\mu\text{g}/\text{disco}$	N.A.	19.00 $\pm$ 0.0	20.10 $\pm$ 1.1	22.00 $\pm$ 1.4	27.70 $\pm$ 0.6
Control positivo	---	21.50 $\pm$ 0.7	23.00 $\pm$ 1.1	22.00 $\pm$ 0.9	25.30 $\pm$ 0.6
<b>Pulmatina (3)</b> 10 $\mu\text{g}/\text{disco}$	23.70 $\pm$ 1.5	20.20 $\pm$ 0.6	22.00 $\pm$ 1.5	19.50 $\pm$ 0.7	30.70 $\pm$ 2.3
Control positivo	28.70 $\pm$ 0.6	22.00 $\pm$ 1.4	23.70 $\pm$ 0.6	21.50 $\pm$ 0.7	23.30 $\pm$ 0.6
<b>Pulmatina (3)</b> 1 $\mu\text{g}/\text{disco}$	N.A.	19.00 $\pm$ 0.0	20.00 $\pm$ 1.5	22.00 $\pm$ 2.8	29.30 $\pm$ 1.5
Control positivo	---	21.80 $\pm$ 0.8	24.00 $\pm$ 0.6	22.50 $\pm$ 2.1	25.00 $\pm$ 2.0
N.A.= No activo					

**Cuadro 22.** Actividad antimicrobiana del  $\beta$ -caroteno (9). Los resultados representan los diámetros promedio en mm de la zona de inhibición  $\pm$  D.E.

	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Controles positivos	Ampicilina 1.2 $\mu$ g/disco	Estreptomina 4 $\mu$ g/disco	Cloranfenicol 1.1 $\mu$ g/disco	Cloranfenicol 0.8 $\mu$ g/disco	Gentamicina 12 $\mu$ g/disco
<b><math>\beta</math>-caroteno (9)</b> <b>100 <math>\mu</math>g/disco</b>	N.A.	23.00 $\pm$ 1.7	22.00 $\pm$ 0.0	23.00 $\pm$ 2.0	25.00 $\pm$ 0.0
Control positivo	---	20.00 $\pm$ 0.0	24.30 $\pm$ 1.1	23.00 $\pm$ 1.0	24.50 $\pm$ 0.7
<b><math>\beta</math>-caroteno (9)</b> <b>10 <math>\mu</math>g/disco</b>	N.A.	21.30 $\pm$ 1.5	22.30 $\pm$ 0.6	22.30 $\pm$ 0.6	29.30 $\pm$ 1.5
Control positivo	---	20.30 $\pm$ 0.6	24.00 $\pm$ 0.0	23.30 $\pm$ 0.6	25.00 $\pm$ 1.0
<b><math>\beta</math>-caroteno (9)</b> <b>1 <math>\mu</math>g/disco</b>	N.A.	22.30 $\pm$ 1.5	22.70 $\pm$ 0.6	22.30 $\pm$ 0.6	25.30 $\pm$ 2.5
Control positivo	---	21.70 $\pm$ 1.1	25.70 $\pm$ 2.1	23.00 $\pm$ 0.0	25.30 $\pm$ 1.5

N.A.= No activo

**Cuadro 23.** Actividad antimicrobiana de la euparina (10). Los resultados representan los diámetros promedio en mm de la zona de inhibición  $\pm$  D.E.

	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Controles positivos	Ampicilina 1.2 $\mu$ g/disco	Estreptomina 4 $\mu$ g/disco	Cloranfenicol 1.1 $\mu$ g/disco	Cloranfenicol 0.8 $\mu$ g/disco	Gentamicina 12 $\mu$ g/disco
<b>Euparina (10)</b> <b>100 <math>\mu</math>g/disco</b>	N.A.	N.A.	21.70 $\pm$ 0.6	22.00 $\pm$ 0.0	30.70 $\pm$ 2.3
Control positivo	---	---	22.30 $\pm$ 0.6	21.30 $\pm$ 0.6	24.30 $\pm$ 1.1
<b>Euparina (10)</b> <b>10 <math>\mu</math>g/disco</b>	N.A.	N.A.	20.70 $\pm$ 0.6	21.30 $\pm$ 1.1	26.00 $\pm$ 2.0
Control positivo	---	---	23.00 $\pm$ 0.0	21.70 $\pm$ 1.1	25.00 $\pm$ 1.0
<b>Euparina (10)</b> <b>1 <math>\mu</math>g/disco</b>	N.A.	N.A.	19.70 $\pm$ 0.6	21.00 $\pm$ 0.0	25.00 $\pm$ 0.0
Control positivo	---	---	23.00 $\pm$ 0.0	20.50 $\pm$ 0.7	24.30 $\pm$ 0.6

N.A.= No activo

Los resultados obtenidos demostraron que los glucósidos **2** y **3** presentaron actividad contra todos los microorganismos de prueba, sin embargo, únicamente mostraron actividad significativa contra las bacterias Gram negativas. También es importante destacar que presentaron una mayor actividad que el control positivo (Gentamicina, 12 µg/disco) contra la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

Los compuestos **1** y **4** no se evaluaron debido a que la actividad antimicrobiana de estos productos naturales se encuentra bien documentado en la literatura científica (Hatano *et al.*, 1999; Manojlovic, *et al.*, 1998).

Con respecto a los metabolitos aislados de la especie *Hofmeisteria schaffneri*, el β-caroteno (**9**) presentó actividad contra una bacteria Gram positiva (*Bacillus subtilis*) y tres Gram negativas (*Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*). Por otra parte, la euparina (**10**) mostró actividad únicamente contra las bacterias Gram negativas (*Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) de manera similar al control positivo. Es importante mencionar que la euparina (**10**) ha sido objeto de estudios previos (Castañeda, *et al.*, 1996; Proksch y Rodríguez, 1983; Mitsakos *et al.*, 1986), destacándose su actividad fitotóxica contra *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*. Además este compuesto inhibe el metabolismo energético vegetal afectando tanto el proceso de la fotosíntesis como la respiración durante el proceso de germinación (Castañeda, *et al.*, 1998).

Finalmente, los resultados presentados justifican el uso de estas especies en la medicina tradicional de México para el tratamiento de desordenes gastrointestinales y para sanar las heridas, entre otras.



## 6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

- ☉ Los resultados del presente trabajo de tesis demuestran que la selección de especies vegetales con base en el criterio etnomédico permite la obtención de productos naturales con actividades biológicas.
- ☉ El estudio fitoquímico biodirigido de la especie *Alvaradoa amorphoides* permitió el aislamiento de seis metabolitos secundarios, caracterizados como crisofanol (1), crisofaneína (2), pulmatina (3) fisciona (4),  $\beta$ -sitosterol (7) y  $\beta$ -D-glucositosterol (8). Cabe mencionar, que este trabajo constituye la primera descripción de la fisciona (4) en la especie.
- ☉ El crisofanol (1), la crisofaneína (2) y la pulmatina (3) constituyen compuestos marcadores potenciales para el control de calidad de la especie *Alvaradoa amorphoides*.
- ☉ Los glicósidos 2 y 3 inhibieron de manera significativa el crecimiento de las bacterias *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. La mayor potencia antimicrobiana se observó contra *Pseudomonas aeruginosa*. Este hallazgo es de gran importancia porque la mayoría de los metabolitos secundarios presentan una actividad considerable contra bacterias Gram positivas pero no contra Gram negativas, lo que parece indicar que los compuestos inhiben las proteínas resistentes a los fármacos.
- ☉ El estudio preliminar de la especie *Hofmeisteria schaffneri* permitió el aislamiento y caracterización de  $\beta$ -sitosterol (7),  $\beta$ -caroteno (9) y euparina (10). Cabe destacar, que este trabajo constituye el primer estudio químico y biológico de la especie. La euparina (10) parece ser el compuesto marcador de esta especie, por lo tanto será de utilidad para el establecimiento de las pruebas de identidad de esta planta durante la realización de la monografía farmacopeica correspondiente.
- ☉ Los metabolitos secundarios 9 y 10 también inhibieron el crecimiento de las bacterias Gram negativas: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. De manera adicional, el  $\beta$ -caroteno (9) inhibió el crecimiento de *Bacillus subtilis*. Aparentemente las propiedades antimicrobianas del  $\beta$ -caroteno (9) no se han descrito.
- ☉ Este trabajo constituye una aportación al conocimiento de la flora medicinal de México y al campo de los productos naturales bioactivos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

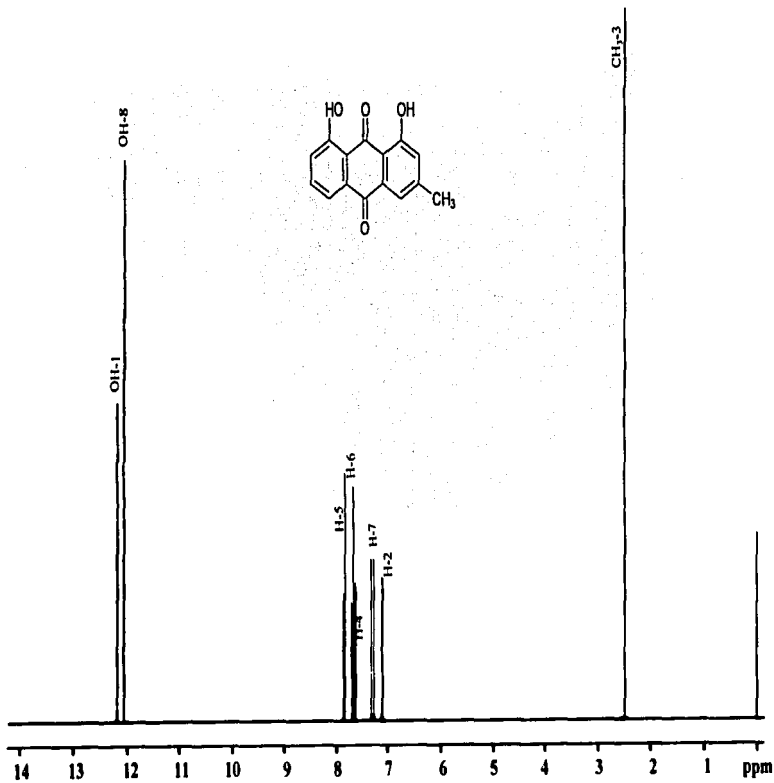
- o Agarwal, S. (1998). Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study. *Lipids*, **33** 981-984.
- o Aldrich. (1992). Library of  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  FT NMR Spectra 85555-3.
- o Bailey y Scott's (1990). Diagnostic Microbiology. Octava edición. The C.V. Mosby Company, pp 172-173.
- o Bjornland, T., Synnove, L., Thronsen, J. (1989). Carotenoids of the marine chrysophyte *Pelagococcus subviridis*. *Phytochemistry*, **28** 3347-3353.
- o Castañeda, P., Gómez, L., Mata, R. (1996). Phyto-growth-inhibitory and antifungal constituents of *Helianthella quinquenervis*. *Journal of Natural Products*, **59** 323-326.
- o Castañeda, P., Mata, R., Lotina-Henssen, B. (1998). Photosynthetic activities of enecalinal, dimethylencecalinal and euparin. *Journal of the science of food and agriculture*, **78** 102-108.
- o Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12** 564-582.
- o Chattopadhyay, D., Maiti, K., Kundu, A. P., Chakraborty, M. S., Bhadra, R., Mandal, S. C., Mandal, A. B. (2001). Antimicrobial activity of *Alistonia macrophylla*: a folklore of bay islands. *Journal of Ethnopharmacology*, **77** 49-55.
- o De Gutiérrez, A. N., Catalan, C. A., Díaz, J. G. (1995). Sesquiterpene lactones, a labdane and other constituents of *Urolepis hecatantha* and *Chromolaena arnottiana*. *Phytochemistry*, **39** 795-800.
- o Eloff, J. N. (1998). Which extractans should be used from screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology*, **60** 1-8.

- o Evans, W. C. (2002). Trease and Evans Pharmacognosy, 15 edición. B. Saunders. Londres, pp 585.
- o Farfás, G. (1993). Química Clínica. Décima edición. Manual Moderno, México, D.F., pp 91-93.
- o Farfás, G. (1993). Química Clínica. Décima edición. Manual Moderno, México, D.F. pp 245-251.
- o Farnsworth, N. R. (1991). Bioactive compounds from plants. Wiley, Chichester, pp 2-21.
- o Fyhrquist, P., Mwasumbi, C., Haeggström, A., Vuorela, H., Hiltunen, R., Vuorela, P. (2002). Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzania. *Journal of Ethnopharmacology*, **79** 169-177.
- o Giral, F., Soto, B. (1974). Chrysophanic acid, chrysophanein and chaparrin from. *Phytochemical Reports*, **13** 2018-2019.
- o Guerrero, J. y Martínez, S. (2002). Compuestos aromáticos bioactivos de *Rumex hymenosepalus* Torr. (Polygonaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- o Hatano, T., Uebayashi, H., Ito, H., Shiota, S., Tsuchiya, T., Yoshida, T. (1999). Phenolic constituents of *Cassia* seeds on anti bacterial effects of some naphthalenes and anthraquinones on methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*. *Chemical Pharmacology Bulletin*, **47** 1121.
- o Jia, Z. y Zhao, Y. (1994). Four new furans from the roots of *Ligularia przewalskii*. *Journal of Natural Product*, **57** 146-150.
- o Kalidhar, S. B. (1989). Location of glycosylation and alkylation sites in anthraquinones by <sup>1</sup>H-NMR. *Phytochemistry*, **28** 2455-2458.
- o Karaman, I., Sahin, F., Güllüce, M., Ögütçü, H., Sengül, M. (2003). Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, **85** 231-235.

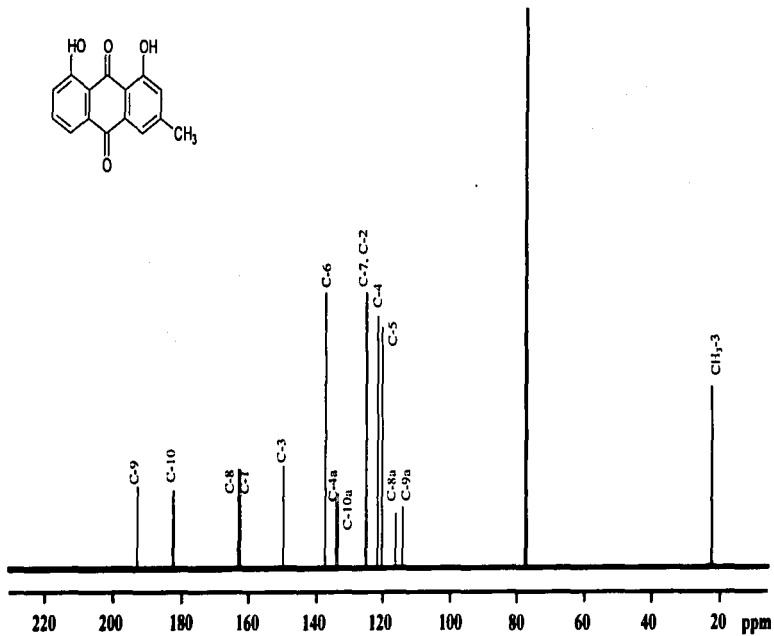
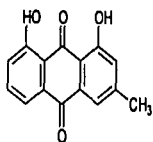
- o Kokoska, L., Polesny, Z., Rada, V., Nepovim, A., Vanek, T. (2002). Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **82** 51-53.
- o Koneman, E. W. (1989). Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas. Editorial Médica Panamericana, México, pp 380-401.
- o Kubo, I., Murai, Y., Soediro, I., Soetarno, S., Sastrodihardjo, S. (1992). Citotoxic anthraquinones from *Rheum pulmatum*. *Phytochemistry*, **31** 1063-1065.
- o Linton, A. (1983). Assessment of Antimicrobial Activity and Resistance. Academic Press, N. Y., pp 19-31.
- o Lowrey, C. (1993). Reagent chemical. American Society Specification. Washington, D.C. pp 90-91.
- o Manojlovic, N. T., Solujic, S., Sukdolak, S., Krstic, L. J. (1998). Anthraquinones from the lichen *Xanthoria parietina*. *Journal of Serbian Chemical Society*, **63** 7-11.
- o Martínez, M. (1990). Las plantas medicinales de México. Sexta edición. Ed. Botas, México, D.F., pp 656.
- o Michaud, D., Feskanich, D., Rimm, E. (2000). Intaken of specific carotenoids and risk of lung cancer in two prospective US cohorts. *American Journal of Clinical Nutrition*, **72** 990-997.
- o Miller, J. S., Gereau, R. E. (2000). Biologically Active Nature Products. Eds. S. Cutler, H. Cutler. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 25-36.
- o Mitsakos, A., Brever, M., Budzikiewicz, H. y Proksch, P. (1986). Benzofuran derivates from *Enceliopsis covillei*. *Phytochemistry*, **25** 2243-2244.
- o Morales, B. (2003). Compuestos aromáticos antimicobacterianos de las hojas de *Piper sanctum* (Piperaceae). Tesis de Maestría, Facultad de Química. UNAM.

- o Newman, D. J., Cragg, G. M. y Sander, K. M. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Products Reports*, **17** 215-234.
- o Niembro, R. A. (1986). Árboles y arbustos útiles de México. Limusa, México, D. F., pp 206.
- o Paxton, J. D. (1991). Methods in plant biochemistry. Ed: Harborne, J. H. Academic Press, New York, pp 33-46.
- o Penna, C., Marino, S., Vivot, E., Cruaños, M., Muñoz, J., Cruaños, J., Ferraro, G., Gutkind, G., y Martino, V. (2001). Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, **77** 37-40.
- o Portillo, A., Vila, R., Freixa, B., Adzet, T., y Cañigual, S. (2001). Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, **76** 93-98.
- o Proksch, P., Palmer, J. y Hartmann, T. (1986). Metabolism and bioconversion of chromene derivatives in *Ageratina adenophora*. *Planta*, **169** 130-134.
- o Proksch, P., Rodríguez, E. (1983). Chromenes and benzofurans of the Asteraceae, their chemistry and biological significance. *Phytochemistry*, **22** 2335-2348.
- o Pundarikakshudu, K., Patel, J., Bodar, M., Deans, S. (2001). Anti-bacterial activity of *Galiga officinalis* L. (Goat's Rue). *Journal of Ethnopharmacology*, **77** 111-112.
- o Rabanal, R., Arias, A., Prado, B., Hernández-Pérez, M., Sánchez-Mateo, C. (2002). Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. *Journal of Ethnopharmacology*, **81** 287-292.
- o Rojas, G., Lévaro, J., Tortoriello, J., Navarro, V. (2001). Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, **74** 97-101.

- o Romero, C. R. (1994). Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas. Ed: Romero, C. R. pp 50-51.
- o Siebertz, R., Proksch, P., Wray, V. y Witte, L. (1989). Accumulation and biosynthesis of benzofurans in roots cultures of *Eupatorium cannabinum*. *Phytochemistry*, **28** 789-793.
- o Stermitz, F., Lorenz, P., Tawara, J., Zenewicz, L., Lewis, K. (2000). Antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proceedings of the National Academic of Sciences*, **97** 1433-1437.
- o Taylor, R., Manandhar, N., Towers, G. (1995). Screening of selected medicinal plants of Nepal for antimicrobial activities. *Journal of Ethnopharmacology*, **54** 153-159.
- o Tegos, G., Stermitz, F., Lomovskaya, O., Lewis, K. (2002). Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plants antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46** 3133-3141.
- o Vanden Berghc, A. D. y Vlietinck, J. A. (1991). Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Methods in Plant Biochemistry*, **6** 47-67.
- o Villarreal, I., Tena, M. (1992). Enciclopedia temática de Jalisco. Gobierno del estado de Jalisco, México, D.F., pp 181-209.
- o Wayne, W., Geneive, E., Patrick, A., Helen, J., Stewart, M. (1999). Alvaradoins A-D. Anthracenone C Arabinosides from *Alvaradoa jamaicensis*. *Journal of Natural Products*, **62** 98-101.

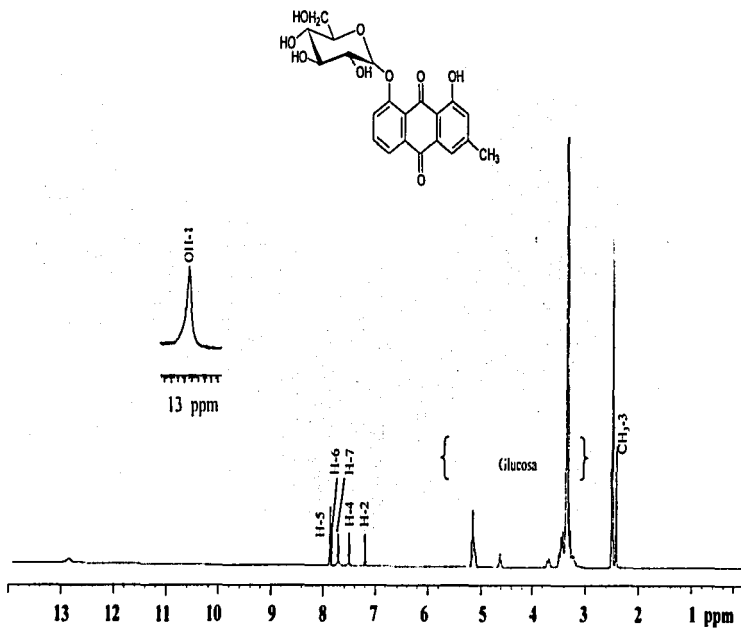


**Espectro 1.** Espectro de  $\text{RMN-}^1\text{H}$  del crisofanol (1), [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ].

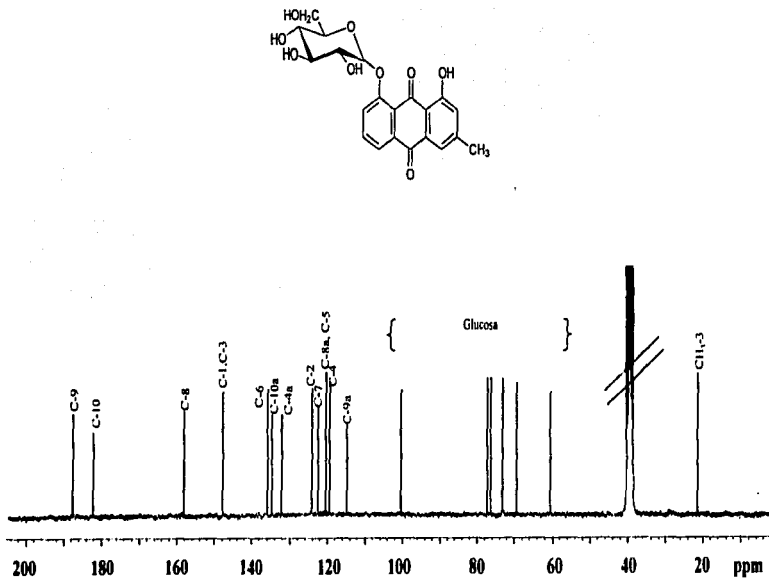


**Espectro 2.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del crisofanol (1), [75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>].

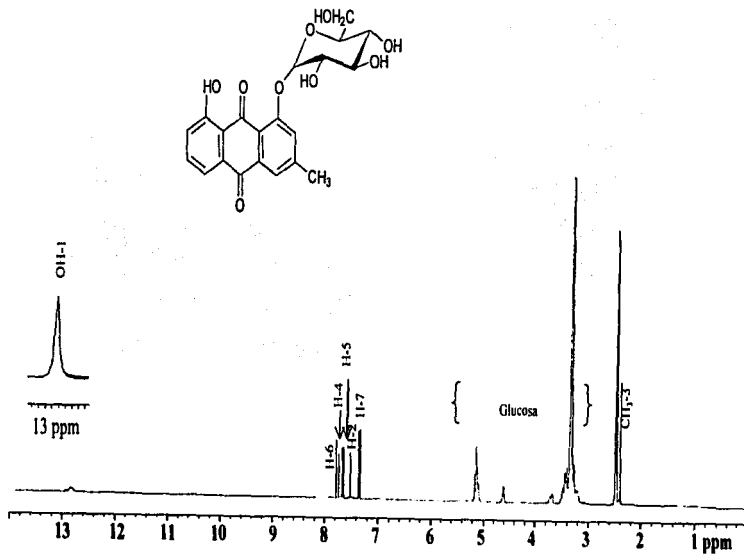




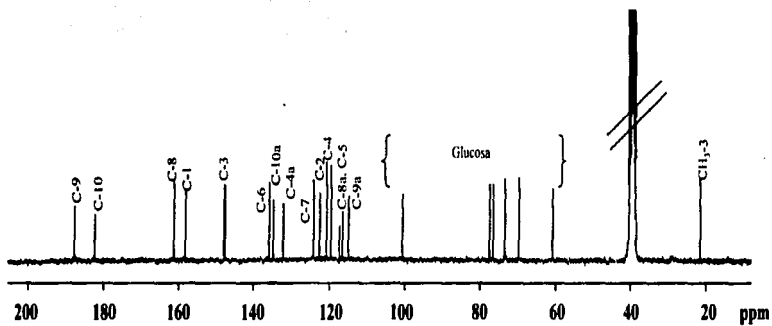
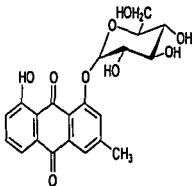
**Espectro 3.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la crisofaneína (2) [300 MHz, DMSO].



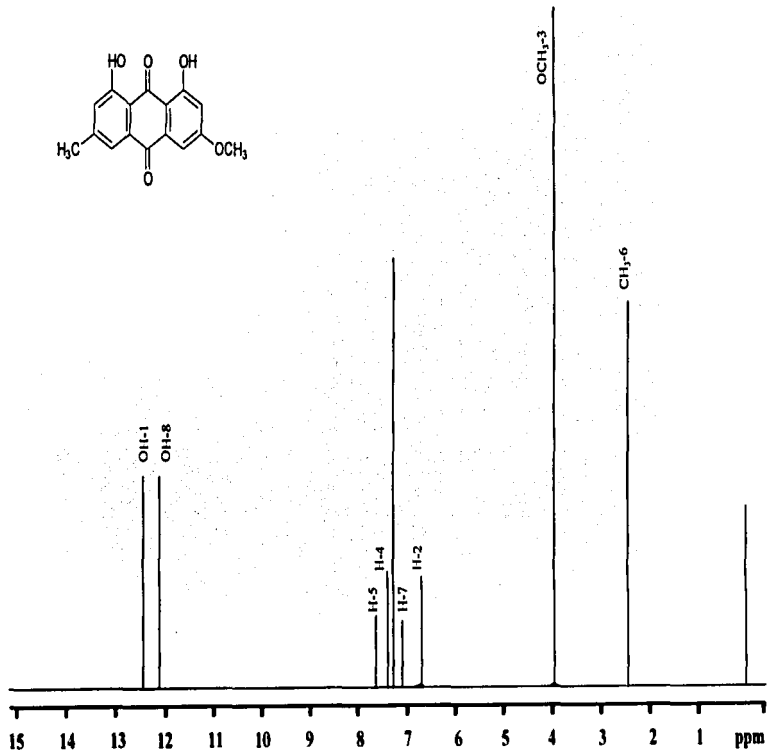
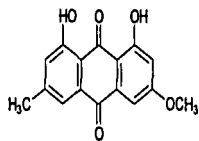
**Espetro 4.** Espetro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  de la crisofaneina (2) [75.5 MHz, DMSO].



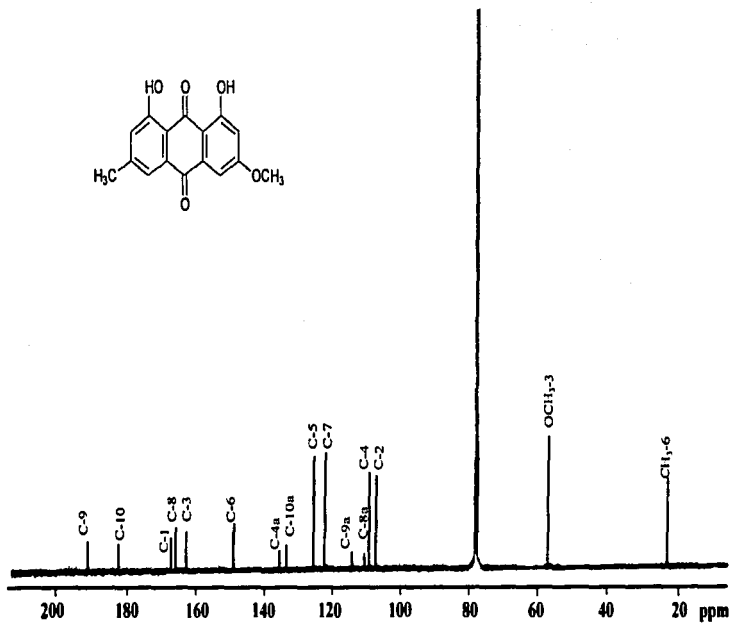
Espectro 5. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la pumatina (3), [300MHz, DMSO].



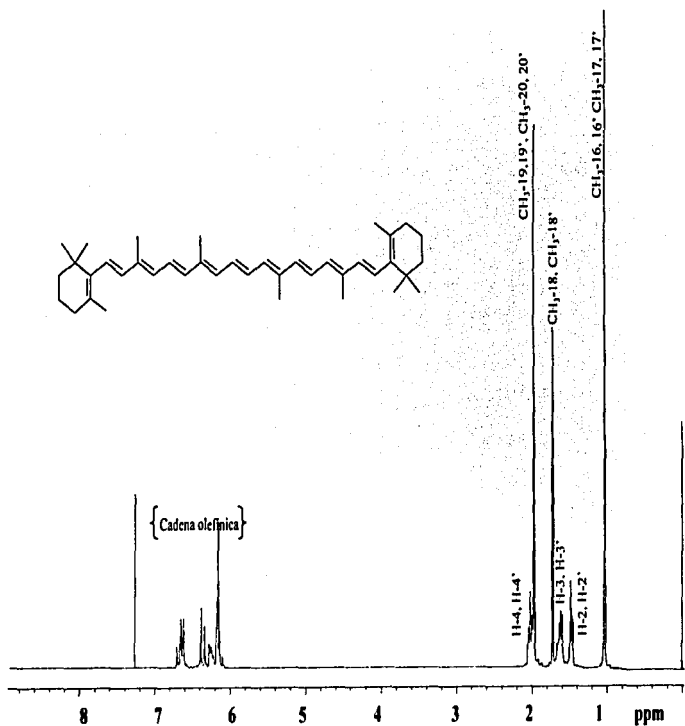
**Espectro 6.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de la pulmatina (3) [75.5 MHz, DMSO].



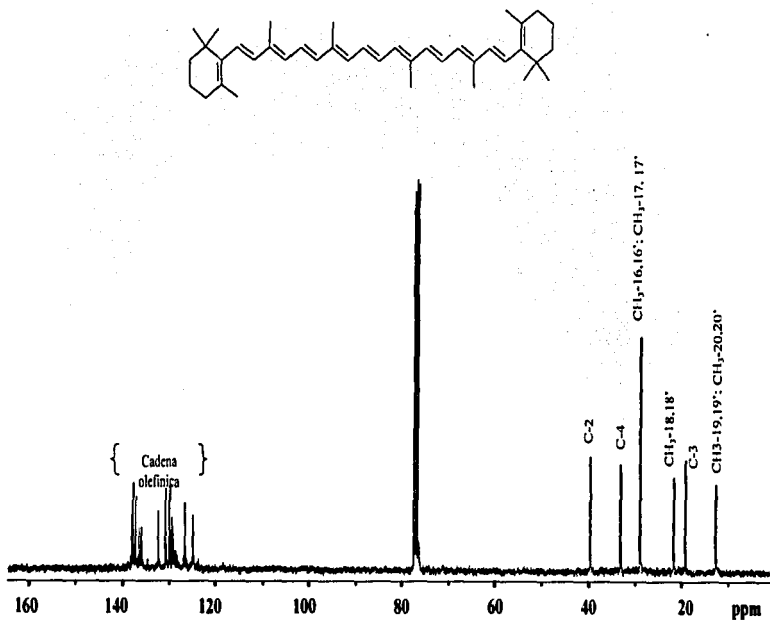
Espectro 7. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la fisicina (4), [300 MHz, CDCl<sub>3</sub>].



Spectro 8. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de la fisciona (4), [75.5MHz,  $\text{CDCl}_3$ ].

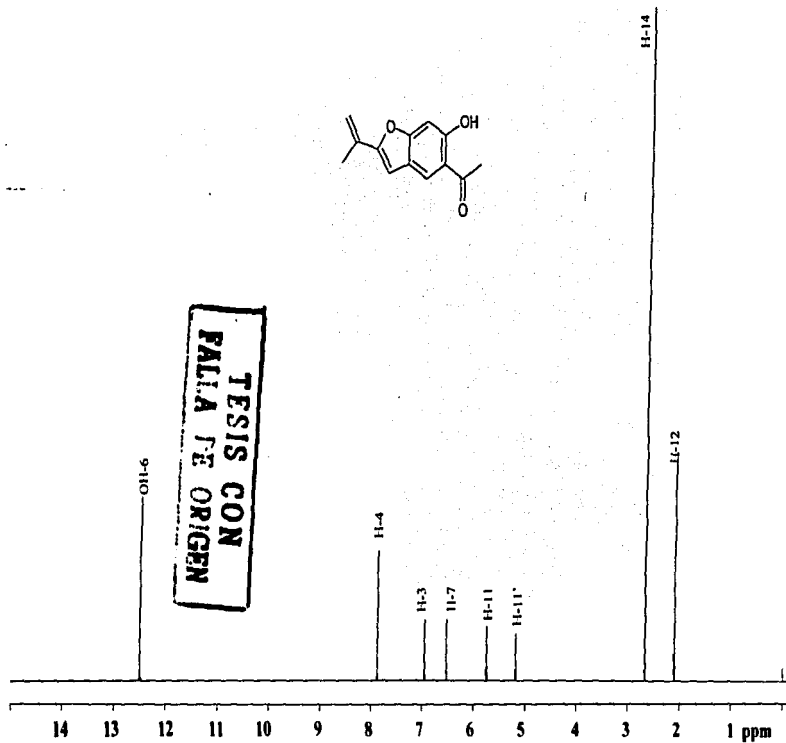


**Espectro 9.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del beta-caroteno (9), [300 MHz, CDCl<sub>3</sub>].

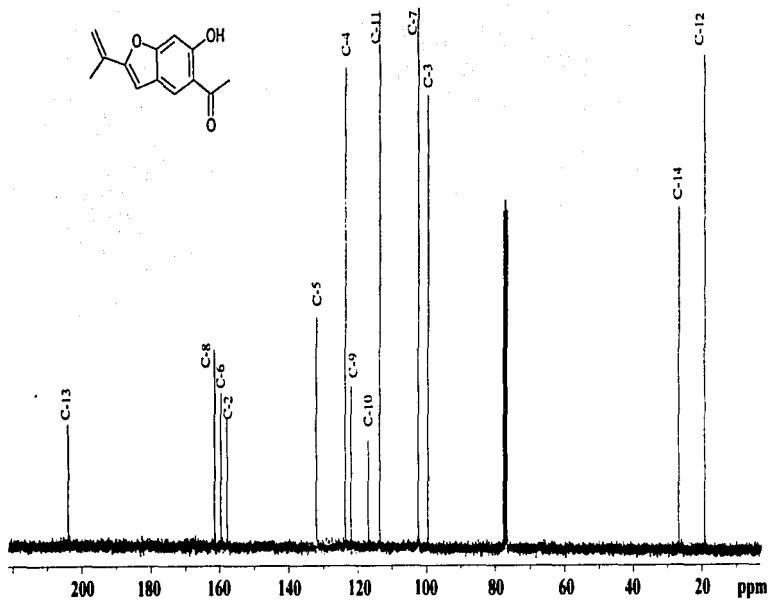


Espectro 10. Espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  del beta-caroteno (9), [75.5MHz,  $\text{CDCl}_3$ ].





Espectro 11. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la euparina (10), [300 MHz, CDCl<sub>3</sub>].



Espectro 12. Espectro de  $\text{RMN-}^{13}\text{C}$  de la euparina (10), [75.5MHz,  $\text{CDCl}_3$ ].