

56  
205



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**



U. N. A. M.

**ESTUDIO FITOQUIMICO DE SALVIA REPTANS  
Y UN ENSAYE ELECTROQUIMICO-  
BACTERIOLOGICO DE HORMINONA  
AISLADA DE**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
LUIS ANTONIO RAMIREZ RAMIREZ

Director: René Miranda Ruvalcaba  
Asesor: Martha Beatriz Vilchis Argueta

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1993

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **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 está 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.

## INDICE

## INDICE

<b>I.- INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>II.- GENERALIDADES.....</b>	<b>4</b>
<b>III.- PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>25</b>
<b>IV.- DISCUSION.....</b>	<b>32</b>
<b>V.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>37</b>
<b>VI.- ESPECTROS.....</b>	<b>38</b>
<b>VII.- BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>45</b>

## INTRODUCCION

## INTRODUCCION

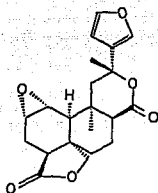
El género *Salvia* de la familia Labiatae (Lamiaceae) es uno de los géneros mas abundantes y diversificados de esta familia, comprende ca de 900 especies<sup>1</sup> distribuidas en zonas tropicales y subtropicales. Bentam,<sup>2</sup> dividió este género en cuatro subgéneros: *Salvia*, *Sclarea*, *Leonia* y *Calosphace*. Las *salvias* europeas y asiáticas pertenecen principalmente a los subgéneros *Salvia* y *Sclarea*. El subgénero *Leonia* se encuentra representado por varias especies de *Salvias* de América del Norte; la mayor parte de las 500 especies de *Salvias* de México, Centro y Sudamérica, pertenecen al género *Calosphace*<sup>3</sup>. En México existen ca de 300 especies de *Salvias* que se encuentran predominantemente en bosques de pinos, abetos y encinos, por encima de los 1000 metros de altura.

Algunas especies del género *Salvia* se usan en el tratamiento de diferentes enfermedades debido a sus propiedades bactericidas y antitumorales<sup>4</sup> (Tabla 1), por lo cual ha despertado gran interés en el estudio de sus metabolitos secundarios. Recientemente se realizó un estudio fitoquímico de *Salvia reptans* Jacq en su parte aérea,<sup>5</sup> reportándose dos nuevos diterpenos, uno con esqueleto de clerodano y otro de 5,6 *seco-clerodano* (fig. 1); además de ciertos productos naturales conocidos, tales como: el  $\beta$ -sitosterol, los ácidos ursólico y oleanoico, así como la flavona llamada diosmetina.

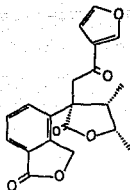
Tabla 1. Actividad biológica de algunos diterpenos abietánicos de tipo quinoidal.

Aislado de	Compuesto	Actividad Biológica	Ref.
<i>Taxodium distichum</i>	Taxodiona y Taxodona	Efectos citotóxicos	4
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Furanaftoquinona	Tratamiento de afecciones cardíacas, -anormalidades hemáticas y hepatitis.	4
<i>Salvia balloteafora</i>	Conacytona icetexona y romulogarzona	Problemas estomacales	4
<i>Lepechinia bullata</i>	Horminona	Citotóxica sobre células cancerígenas, é inhibidores del crecimiento de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	6
<i>Salvia microstegia</i>	Ferruginol, Pisiferal.	Diurético, antiséptico.	7

En el presente trabajo de tesis deseamos informar sobre el aislamiento de Horminona<sup>6</sup> (Fig. 2), una diterpenquinona con esqueleto de abietano, la cual fue encontrada en el extracto *n*-hexánico de la raíz de *Salvia reptans*. Asimismo, se mencionan algunos aspectos relacionados al comportamiento electroquímico de la molécula, y finalmente se reportan los resultados del estudio microbiológico del metabolito antes mencionado mediante los cuales se mide su efecto bactericida o bacteriostático sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC, *Pseudomona aeruginosa* ATCC y *Staphylococcus aureus* ATCC.



1a.- 1- $\alpha$ ,2-epoxy-3,4- $\alpha$ -  
dihydrolinearolactona



1b.- Salvireptanolido; un  
5,6-secoclerodano

Fig. 1 Metabolitos secundarios recientemente aislados de la parte  
aérea de *S. reptans*.<sup>5</sup>

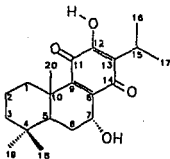


Fig. 2.- Estructura química de la Horminona



## GENERALIDADES

## GENERALIDADES

Todas las plantas para llevar a cabo su metabolismo, necesitan de una serie de especies químicas esenciales como los aminoácidos, ácidos grasos, azúcares y biopolímeros (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos), los cuales son conocidos como metabolitos primarios.

Del mismo modo, estas plantas presentan metabolitos secundarios o productos naturales<sup>8</sup> que son definidos como compuestos característicos de una o varias especies relacionadas. Estos suelen obtenerse por diferentes vías metabólicas que realiza la planta (Esquema 1). Los metabolitos secundarios, en su mayoría, parecen no tener un papel biológico para la planta, sin embargo, algunos de ellos presentan actividad hormonal, por ejemplo, el ácido giberélico (hormonas de crecimiento), otros proporcionan a la planta mecanismos de defensa contra el medio ambiente (algunos secretan sustancias tóxicas para ciertos insectos, animales y plantas).<sup>9</sup>

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, todas las moléculas que pertenecen a los productos naturales pueden estar clasificadas en alguno de los siguientes grupos<sup>12</sup>:

- Grupo I Clasificación en base a su estructura química
- Grupo II Clasificación basada en su actividad fisiológica
- Grupo III Clasificación basada en su taxonomía
- Grupo IV Clasificación basada en su biogénesis

**Grupo I Clasificación en base a su estructura química**

- A.- Cadena abierta: ácidos grasos, azúcares y algunos aminoácidos.
- B.- Homocíclicos: esteroides, alcaloides y terpenoides.
- C.- Aromáticos : fenólicos, quinonas, etc..
- D.- Heterocíclicos: alcaloides, flavonoides y ácidos nucleicos.

**GRUPO II Clasificación en base a su actividad fisiológica**

- A.- Hormonas
- B.- Vitaminas
- C.- ANTIBIOTICOS
- D.- MICOTOXINAS

**GRUPO III Clasificación basada en su taxonomía**

Esta clasificación esta basada en la comparación de diversos estudios morfológicos de las plantas, es decir su taxonomía. Se sabe que en animales y algunos microorganismos algunos metabolitos finales son excretados, mientras que en las plantas son almacenados.

Algunos de estos, componentes como los alcaloides e isoprenoides, han sido aislados de especies, géneros, tribus o familias específicas de plantas. Al respecto de un mismo tipo de especies, estas suelen contener numerosos constituyentes ligados estructuralmente entre sí.

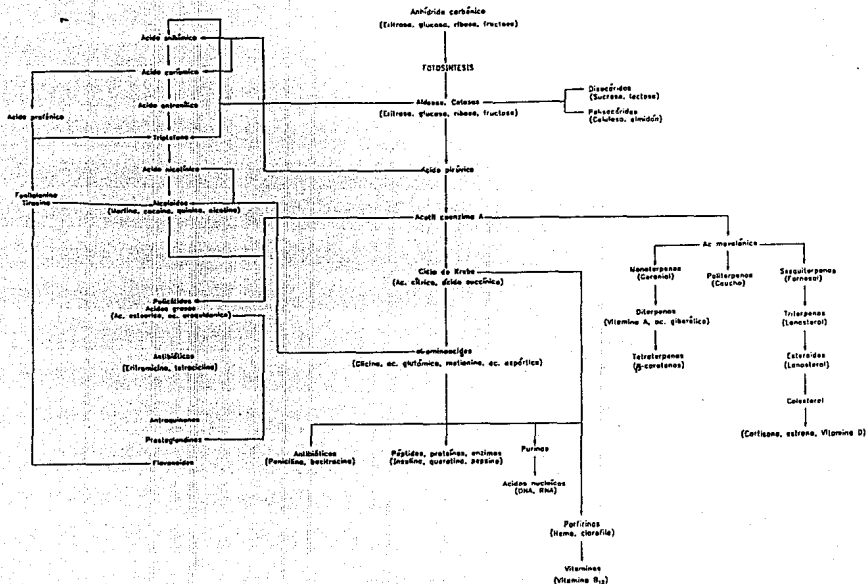
**GRUPO IV Clasificación basada en su biogénesis. .**

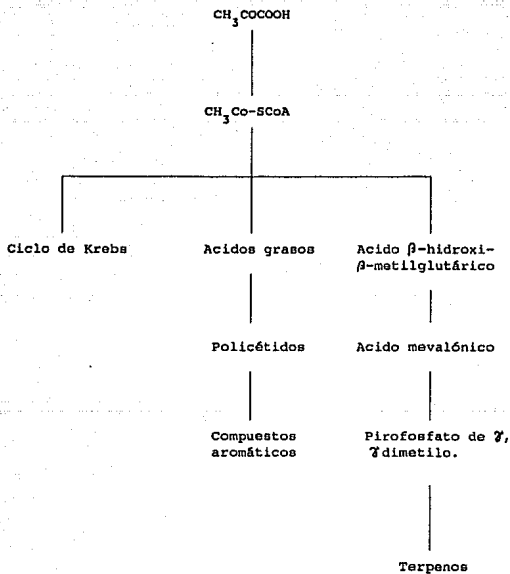
Los componentes de todas las plantas y animales son biosintetizados por reacciones enzimáticas, siendo la glucosa la principal fuente de carbono, la cual es fotosintetizada en plantas verdes (organismos autótrofos) o la obtienen del medio ambiente (organismos heterótrofos).

De acuerdo con lo anterior, resulta que solamente un limitado grupo de compuestos tienen importancia taxonómica en las diferentes familias, como a continuación se menciona<sup>9</sup>:

- TERPENOS
- Alcaloides
- Flavonoides
- QUINONAS
- Poliacetilenos
- Glucosinolatos
- Compuestos cianogénicos

# ORIGEN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

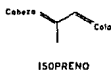


ORIGEN DE LOS TERPENOS<sup>11</sup>

**TERPENOS.**- Los terpenos se encuentran almacenados en cantidades relativamente grandes en ciertas plantas, por esta razón algunas presentan interés taxonómico. Algunos terpenos se encuentran en presencia de otras sustancias tales como: glicósidos, ésteres y en otros casos con algunas proteínas.

Los miembros más sencillos de esta clase ( $C_{10}$  y  $C_{15}$ ) suelen ser obtenidos de plantas frescas y secas por arrastre de vapor, mientras que los miembros más grandes (más de 20 átomos de C) generalmente son aislados por extracción con disolventes, separados y purificados por: cristalización, destilación y/o cromatografía.

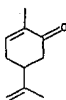
Los terpenoides están relacionados a un origen y una estructura común, así su composición ( $C_{10}$ ,  $C_{15}$ ,  $C_{20}$ ,  $C_{25}$ ,  $C_{30}$ , etc.,) sugiere que, estos compuestos son múltiplos de cinco átomos de carbono, y en la elucidación de sus estructuras se ha demostrado la presencia de la unidad del esqueleto hidrocarbonado conocido como isopreno (Fig. 3).



Mirceno



Geraniol



Carvona

Fig. 3. Representación de la estructura del isopreno

De acuerdo con lo anterior, en la Tabla 2. se presenta la clasificación de los terpenos:

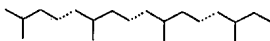
Tabla 2. Clasificación de los terpenos<sup>11</sup>

GRUPO	NC	NUI
Hemiterpenos	C <sub>5</sub>	1
Monoterpenos	C <sub>10</sub>	2
Sesquiterpenos	C <sub>15</sub>	3
Diterpenos	C <sub>20</sub>	4
Sesteterpenos	C <sub>25</sub>	5
Triterpenos	C <sub>30</sub>	6
Tetraterpenos	C <sub>40</sub>	8
Politerpenos	(C <sub>5</sub> ) <sub>n</sub>	n

NC.- NUMERO DE ATOMOS DE CARBONO

NUI.- NUMERO DE UNIDADES DE ISOPRENO.

Se sabe que las estructuras terpénicas siguen la Regla del isopreno, debido a que están formados por 2, 3, 4, etc., unidades isoprénicas en un orden establecido, pudiendo formar uniones cabeza-cola o cola-cabeza, existiendo anomalías a la regla como son las uniones cola-cola, cabeza-cabeza (Fig.4 a-c).



a) Terpenos



b) Sesquiterpenos



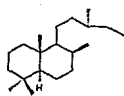
c) Diterpenos



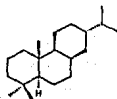
Fig. 4 a-c



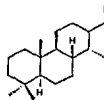
**DITERPENOS.**- Productos naturales constituidos por cuatro unidades de isopreno dispuestas según la regla isoprénica, éstos, suelen poseer además otro tipo de funcionalidades como: insaturaciones, grupos carboxílicos, fenólicos y alcohólicos. A continuación se muestra una relación biosintética de los esqueletos de diterpenos más representativos.



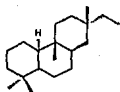
Grupo del Labdano



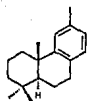
GRUPO DEL ABIETANO



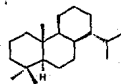
Grupo del Cassano



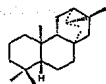
Grupo del Pimarano



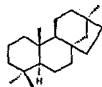
Grupo del Podocarpano



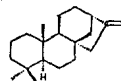
Grupo del Tolarano



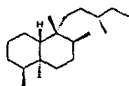
Grupo del Atisano



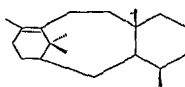
Grupo del Beyerano



Grupo del Kaureno



Grupo del Clerodano



Grupo del Taxeno

Por otro lado, en la Fig. 5 se ilustra la correlación esquemática de los principales grupos diterpénicos<sup>12</sup>.

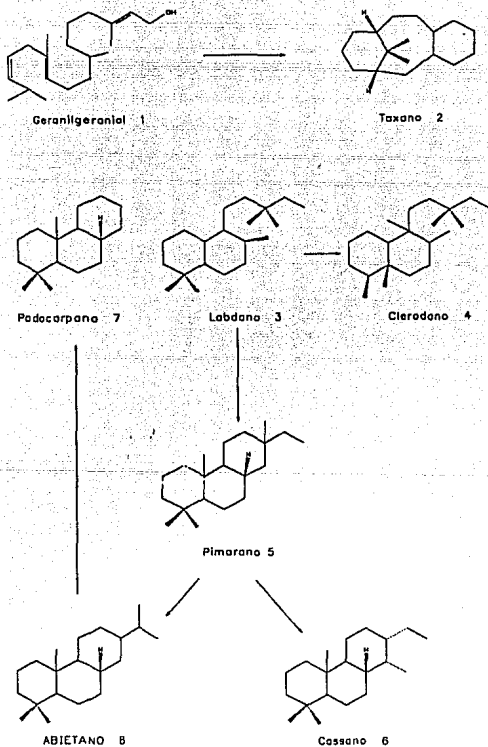


Fig. 5 Correlación estructural de los principales esqueletos diterpénicos.

Los diterpenos de tipo abietánico son metabolitos secundarios que se encuentran distribuidos en una gran variedad de especies del género *Salvia*; en México existen ca de 300 especies de *Salvias*, todas ellas clasificadas en el subgénero *Calosphaea*, el cual a su vez esta dividido en 91 secciones.<sup>3</sup> Por otro lado, en el reino vegetal, los diterpenos abietánicos estan distribuidos en una gran diversidad de géneros, así por ejemplo algunos como los indicados en la Tabla 3.

Tabla 3.- Algunos diterpenos abietánicos distribuidos en diversos géneros vegetales.

Especie	Molécula aislada
<i>Lepechinia bullata</i> <sup>6</sup>	Horminona
<i>Inula royleana</i> <sup>13</sup>	Royleanona
<i>Taxodium distichum</i> <sup>14</sup>	Taxodiona , Taxodona
<i>Salvia phlomoides</i> <sup>15</sup>	Taxodiona , Taxodona
<i>Salvia sessei</i> <sup>16</sup>	Seseína
<i>Salvia regia</i> <sup>17</sup>	Deacetilseseína
<i>Salvia pubescens</i> <sup>18</sup>	Nemorona
<i>Salvia nemorosa</i> <sup>19</sup>	Nemorona
<i>Salvia balloteafora</i> <sup>20</sup>	Conacytona, 3-B-Hidroxidesmetilcryptojaponol.
<i>Salvia fruticulosa</i> <sup>21a,b</sup>	Fruticulina A
<i>Salvia goldmanii</i> <sup>22</sup>	7-hidroxi-desmetilfruticulina
<i>Salvia miltiorrhiza</i> <sup>4</sup>	Desoxineocriptotanshiona
<i>Salvia microstegia</i> <sup>7</sup>	Ferruginol, 5,11,12-Trihidroxiabieta-8,11,13-trieno.

**PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS:** Las pruebas de susceptibilidad<sup>23</sup> proporcionan una ayuda indispensable en la selección del quimioterapéutico correcto, sin embargo, es necesario adicionar otro tipo de pruebas que complementen el diagnóstico, sobre todo en los casos en los que el paciente cursa por condiciones patológicas muy complicadas, especialmente este es el caso de la endocarditis o bien aquellas infecciones en las que el paciente se encuentra severamente inmunocomprometido. Es, en estas condiciones que se requiere de una estimación eficiente del antimicrobiano y la concentración en la que se debe de dosificar para inhibir completamente al agente infeccioso, para ello se cuenta con diversas pruebas de sensibilidad:

*I. Prueba de difusión en agar o sensidiscos*

*II Prueba de dilución en caldo*

*III. Impedancia*

*IV. Conductancia*

*V. Bioluminiscencia*

Las pruebas tradicionales usadas en la detección de susceptibilidad en medio líquido (caldo) y en placas de agar (o sensidiscos) requieren de un periodo de incubación de 18 a 24 horas. Esto, representa un problema muy grave sobre todo en aquellos casos en los que bacterias multiresistentes a los antimicrobianos necesitan de ser tratadas lo más rápido posible, como sucede en los pacientes con endocarditis y aquellos que estan inmunocomprometidos. En este sentido

se han desarrollado métodos más eficientes para determinar la sensibilidad de microorganismos a los quimioterapéuticos<sup>26</sup>.

#### I. PRUEBAS DE DIFUSION EN AGAR<sup>25</sup>:

Los primeros ensayos que se realizaron para cuantificar la potencia antibacteriana de una sustancia fueron realizados por Fleming en 1924, al evaluar la efectividad de diferentes antisépticos, y en 1929 estableció el principio de la prueba de susceptibilidad por difusión en agar al depositar el agente antibacteriano en un orificio cilíndrico hecho en el agar y midiendo su potencia según el diámetro del halo de inhibición del crecimiento del organismo.

Comenzaron después a utilizarse diferentes métodos para medir la actividad de las sulfonamidas, penicilina y otros antimicrobianos; infortunadamente, los resultados obtenidos no eran comparables entre diferentes laboratorios y muchas veces ni aun dentro del mismo laboratorio.

En 1966, Bauer, Kirby, Shorris y Turk<sup>26</sup> publicaron los criterios unificadores de la prueba por difusión en agar o antibiograma y posteriormente otros expertos<sup>27</sup> han establecido las normas de las diversas técnicas usadas en la determinación de la susceptibilidad que les han dado mayor precisión y reproducibilidad.

La técnica de difusión en agar, también conocida como la difusión en disco, antibiograma o "Kirby-Bauer" es la más utilizada en los laboratorios de microbiología clínica.

Esta técnica es, en esencia, el resultado de la interacción de tres elementos: el antibiótico depositado en un reservorio, generalmente en un disco de papel filtro; un microorganismo el cual será inhibido o no por el antibiótico y un medio sólido (agar) que servirá como apoyo al crecimiento de la bacteria y de difusión del antibiótico. El comportamiento de estos tres elementos a su vez estará determinado por las condiciones de incubación: temperatura, concentración de bióxido de carbono y tiempo de incubación.

Al depositar el disco con el antibiótico en el agar ya uniformemente inoculado se establece un competencia entre el antibiótico que difunde a través del medio y el microorganismo que empieza a crecer. Si éste es susceptible habrá un halo de inhibición que se extenderá hasta un límite donde la concentración alcanzada por el antibiótico en ese punto (''Concentración crítica'') ya que no será suficiente para inhibir el crecimiento exponencial del organismo que en la periferia ha alcanzado la ''masa crítica'' necesaria para superar la concentración inhibitoria del antibiótico. Este fenómeno sucede dentro de un tiempo crítico, por lo que el diámetro de la zona de inhibición indicará el grado de susceptibilidad del organismo al antibiótico cuando este queda como única variable del sistema. A mayor zona de inhibición mayor será la susceptibilidad del organismo y, en consecuencia, la concentración necesaria del antibiótico para inhibir su crecimiento será menor.<sup>26,27</sup>

El antibiograma puede ser utilizado solamente para los organismos de crecimiento rápido para los que el número óptimo de bacterias se obtiene en 18 o 24 horas de incubación; además, ciertos organismos o antibióticos requieren condiciones especiales.<sup>28</sup>

En las pruebas de susceptibilidad en disco a pesar de ser tan compleja la relación entre el antibiótico, el medio de cultivo y los microorganismos pueden obtenerse resultados reproducibles y útiles mediante un estricto control de calidad. La mejor forma de hacerlos es seguir fielmente, paso a paso, la técnica tal como ha sido establecida; utilizar el material y equipo adecuado, incluir organismos de susceptibilidad conocida como control de calidad, medir correctamente los diámetros de las zonas de inhibición, interpretarlas de manera correcta y transcribirlas sin error.

La falta de un estricto control de calidad puede ocasionar una o varias fallas más comunes que se cometen con esta técnica, como algunas de las siguientes:

1. Utilizar un medio diferente al de Mueller-Hinton, utilizar medio caduco o mal preparado, no controlar su pH.
2. No ajustar el inóculo.
3. Utilizar un tubo de McFarland inexacto como referencia de turbiedad.
4. No exprimir el hisopo cargado con el inóculo y su sembrado.
5. Tiempo excesivo entre la preparación del inóculo y su sembrado.
6. Tiempo prolongado entre el sembrado del medio y la aplicación de los discos.
7. Retardo en la incubación después de la inoculación.
8. Utilizar inóculos mixtos.

## II PRUEBAS DE DILUCION<sup>23</sup>:

Este método consiste en preparar un medio de cultivo líquido (caldo), en el cual se adiciona el agente antimicrobiano a diversas diluciones (de aquí que este método pueda ser empleado para determinar la mínima concentración inhibitoria), y la cepa en estudio. En esta técnica se debe de realizar una incubación de por lo menos 18 horas, al término de la cual se mide la turbidez que presentan los tubos problema en comparación con los patrones ya preparados y un blanco con el cual se hace la calibración del fotómetro. Este método, da como resultado densidades ópticas que al ser previamente calibradas con el blanco y comparadas con el patron pueden indicar claramente si hay o no resistencia al antibiótico en la medida en que hay inhibición del microorganismo.

Una variación de este mismo método consiste en hacer la preparación de un medio de cultivo sólido al que previamente se le adicionó el antibiótico a una concentración conocida, posteriormente se inocula el microorganismo de prueba y se observa su posible crecimiento. Se preparan placas de diferentes diluciones del antibiótico en cada placa para observar cual es la mínima concentración inhibitoria. A este método se le llama "Método de dilución en agar".

El método de dilución en caldo puede modificarse de tal manera que se haga una microdilución del caldo en el que se inocula la cepa bacteriana comparandola con el tubo 0.5 de McFarland.



### III. IMPEDANCIA<sup>29</sup>:

Los métodos habituales de diagnóstico para la determinación de susceptibilidad involucran un gran número de manipulaciones técnicas independientemente de un periodo de incubación de 24 horas. Las opciones de métodos automatizados ofrecen una reducción apreciable de errores técnicos además de un punto de vista más objetivo en la interpretación de los resultados, que pueden ser más exactos y, así de esta manera, se incrementa la precisión de la prueba. Mediante esta técnica se puede realizar un monitoreo continuo de los efectos que tiene el antibiótico sobre el crecimiento del microorganismo.

El crecimiento bacteriano en los sistemas automatizados puede ser medido directamente por medio de un conteo bacteriano apoyandose en el paso de un haz luminoso por el caldo como medida de la densidad óptica<sup>30,31</sup>.

El crecimiento también se puede medir indirectamente por medio de los cambios de IMPEDANCIA ELECTRICA que se presentan en el medio de crecimiento<sup>32,33,34</sup>. La IMPEDANCIA ELECTRICA es una medida de la resistencia al flujo de la corriente eléctrica. Los cambios de impedancia en el medio de crecimiento se presentan de forma paralela al crecimiento de la bacteria, considerando que se coloca una concentración bacteriana de  $10^6$  organismos por ml.

La medición de los cambios de impedancia eléctrica ofrece ventajas potencialmente importantes: a) se puede realizar un monitoreo continuo de los efectos del antibiotico sobre la bacteria; b) los electrodos colocados en el interior de los tubos de cultivo permiten medir de manera electrónica y continua los cambios de impedancia sin

tener que hacer uso de fotómetros o movimientos mecánicos en las cubetas. Este sistema ha sido utilizado para medios de cultivo líquidos mediante el método de dilución en caldo y los cambios de impedancia se siguen mediante el uso de una computadora.

#### IV. CONDUCTANCIA<sup>35</sup>:

Este método ha sido creado para estimar la mínima concentración inhibitoria (MIC), la mínima concentración bactericida (MBC) que normalmente necesitan de una incubación muy prolongada, por lo que esta técnica proporciona una reducción importante en el tiempo de incubación necesario para establecer la sensibilidad al antibiótico. Se han utilizado una gran cantidad de métodos para establecer la inhibición del crecimiento de las bacterias, tal es el caso de las mediciones turbidimétricas. Otros sistemas para la medición del crecimiento bacteriano son la microcalorimetría<sup>36</sup>, radiometría<sup>37</sup>, así como la bioluminiscencia<sup>24</sup>.

Este sistema consiste en comparar los patrones de conductividad eléctrica de un cultivo en el que no se ha colocado el antimicrobiano junto con la bacteria con otro al que conteniendo el organismo se le adiciona el quimioterapéutico. Las dos curvas obtenidas se analizan para establecer la posible susceptibilidad del microorganismo.

#### V. BIOLUMINISCENCIA DE ATP<sup>24</sup>:

La bioluminiscencia de la luciferin-luciferasa para el adenosintrifosfato (ATP) establece con exactitud la biomasa de bacterias<sup>38</sup> en el medio de cultivo. El ATP es requerido en la reacción de luciferin-luciferasa como un dador de energía que proporciona una luminosidad que es directamente proporcional a la cantidad de bacterias en el medio de cultivo. Este método ya ha sido reportado previamente por otros autores<sup>39,40</sup>.

**VOLTAMETRIA CICLICA**<sup>41</sup>: En la reciente década, se han desarrollado varios métodos dinámicos en electroquímica analítica; debido a esto, la voltametría cíclica está adquiriendo mayor atención. A su vez ha logrado superar en gran escala a la polarografía clásica para tratar algunos problemas puramente analíticos. El método se utiliza ampliamente en procesos de oxido-reducción en química orgánica, en la inorgánica y en otras disciplinas.

Para el desarrollo de este método se consideran dos proposiciones; la primera se apoya en los fundamentos matemáticos y como consecuencia ha sido posible obtener una interpretación cuantitativa de las variantes del proceso electroquímico en función de su respuesta voltamétrica. Una segunda consideración que ha dado amplia popularidad al método, consiste en emplear un criterio

apropiado de tal manera que sin hacer uso de las matemáticas complicadas, es posible obtener una amplia información sobre las propiedades electroquímicas de las especies involucradas en el estudio.

Las experiencias voltamétricas normalmente se realizan utilizando un electrodo de trabajo estacionario en solución ausente de agitación. Si el potencial de un electrodo que se encuentra sumergido en una solución que contiene una especie oxidable se hace crecer rápidamente desde valores muy negativos, se observa una variación de la corriente registrada según la curva de la Fig. 6.

Cuando el valor del potencial es bajo, no hay reacción electroquímica apreciable y se registra la corriente residual. Cuando se alcanza un potencial mayor, empieza la oxidación y la corriente crece rápidamente. La concentración de la sustancia consumida en el electrodo disminuye más rápidamente que lo que se puede compensar el transporte por difusión.

La intensidad pasa entonces por un máximo y luego disminuye a partir del momento en el cual la difusión empieza a controlar la velocidad del proceso.

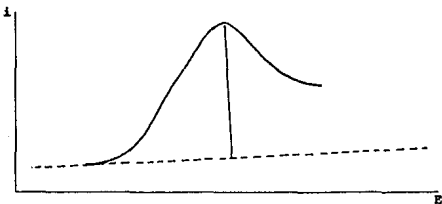


Fig. 6

Si después el potencial del pico se invierte bruscamente en el sentido del barrido, es posible obtener un pico correspondiente a la reacción electroquímica inversa. Si esto ocurre, la sustancia producida en el electrodo en la primera parte de la operación no ha tenido tiempo de difundirse; se encuentra todavía en la cercanía del electrodo y puede ser reducida a su vez (fig. 7).

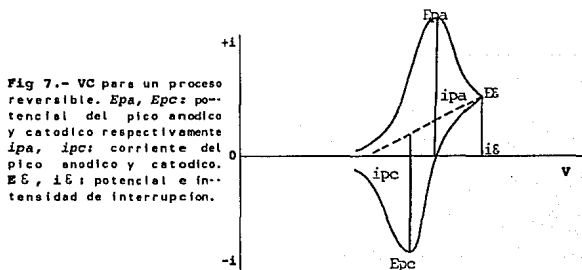


Fig 7.- VC para un proceso reversible.  $E_{pA}$ ,  $E_{pC}$ : potencial del pico anódico y catódico respectivamente.  $i_{pA}$ ,  $i_{pC}$ : corriente del pico anódico y catódico.  $EE$ ,  $iE$ : potencial e intensidad de interrupción.

En la voltametría cíclica el transporte de masa de la especie electroactiva es por difusión. Para evitar la corriente de la migración y reafirmar la conductividad, se adiciona a la solución un electrolito soporte en una concentración ca 0.1 M. . Para tal efecto, los metales alcalinos y especialmente las sales de tetralquilamonio han resultado ser las más eficientes; así, sales como el tetrafluoroborato de tetraetilén amonio  $[(TEA)BF_4]$  el hexafluorofosfato de tetra-*n*-butil amonio  $[(TBA)PF_6]$  que se caracterizan por sus altos voltajes de descomposición, se utilizan actualmente para tal efecto en presencia de disolventes apróticos.

La concentración de la sustancia electroactiva, normalmente se encuentra entre  $10^{-3}$  y  $10^{-5}$  M.

La preparación óptima de la muestra, la solución electrolítica y las mediciones en la celda son esenciales para obtener buenos resultados. Las impurezas aún en trazas, pueden interferir en la cuantitatividad de los voltagramas cíclicos.

Los requisitos para el uso de los disolventes apróticos son muchos y muy rigurosos, tales como la purificación del disolvente y la preparación de la muestra; el problema reside en remover las impurezas prácticas (principalmente el agua).

## PARTE EXPERIMENTAL

## PARTE EXPERIMENTAL

**Estudio fitoquímico:** El punto de fusión se determinó en un aparato Fisher-Jones y no está corregido. La espectrofotometría de absorción en el infrarrojo (IR) se obtuvo en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 283 utilizando la técnica de pastilla (KBr). El espectro de masas fue determinado en un espectrómetro SHIMADZU GCMS-QP2000A, mediante la técnica de impacto electrónico a 70 eV y 250 °C en la cámara de ionización. Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron generados en un espectrofotómetro VARIAN FT-200. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están dados en ppm, y están referidos al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Para indicar los patrones de acoplamiento se usan las siguientes abreviaturas: s = señal simple, d = señal doble, t = señal triple, q = señal cuádruple, sa = señal simple ancha, dd = señal doble de doble, ddd = señal doble de doble de doble, smc = señal múltiple compleja, s/sp = señal sobrepuesta con; y las constantes de acoplamiento (J) están dadas en Hertz. La separación del metabolito secundario fue llevada a cabo por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando como reveladores: disolución de sulfato cérico al 1 % en ácido sulfúrico 2 N, vapores de yodo y luz visible. La cromatografía en columna (CC), se realizó con gel de sílice tamaño de partícula de 0.2-0.5 milímetros (35-70 mallas), utilizando como eluyente un gradiente del sistema n-hexano/AcOEt. Voltamperometría cíclica: Se empleó un Potenciostato Parc 173, las condiciones generales de trabajo fueron: Tetrafluoroborato de tetraetilamónio como electrólito, el disolvente



y Platino como electrodo de trabajo. Pruebas microbiológicas: Las pruebas consistieron en determinar la susceptibilidad de las bacterias *Escherichia coli* ATCC 10563, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; utilizandose para tal efecto el agar de Mueller-Hinton como medio de difusión de los sensidiscos impregnados con el producto natural previamente disuelto en *n*-hexano. En terminos generales en el Esquema 2 se describe el diagrama de flujo de la parte experimental.

COLECCION  
( Arcos del sitio, Tepetzotlán Estado de México, Octubre de 1990 )

IDENTIFICACION  
Biologo Francisco Ramos  
(Instituto de Biología de la UNAM)

RAIZ SECA

RAIZ MOLIDA

(180 g.)

EXTRACTO *n*-HEXANICO

AISLAMIENTO DEL PRODUCTO NATURAL (PN)

(Cromatografía en columna)

IDENTIFICACION DEL PN COMO HORMINONA  
(RMN H<sup>1</sup>, RMN C<sup>13</sup>, IR, EMIE)

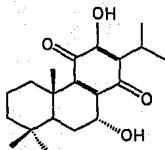
ESTUDIO ELECTROQUIMICO

ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

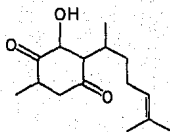
**MATERIAL VEGETAL:** La raíz de *Salvia reptans* Jacq. fue recolectada en el mes de octubre de 1990 en Arcos del Sitio, Tepetzotlán, Estado de México, un espécimen Voucher (FESC-RE 21) se depositó en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

**EXTRACCION, SEPARACION E IDENTIFICACION:** La raíz (180 g) de *Salvia reptans*, previamente secada y molida, fue tratada con *n*-hexano a temperatura ambiente. El extracto hexánico fue concentrado a presión reducida y cromatografiado en columna sobre gel de sílice, la fracción eluida con *n*-hexano/ACOFt (9:1) proporcionó un sólido que recristalizado de *n*-hexano proporcionó 1.55 g. (0.861 %) de un producto cristalino amarillo: p.f. 198-199 °C, análisis elemental (calculado)  $C_{20}H_{28}O_4$ , 72.3 % C, 8.4 % H, 19.3 % O; RMN  $H^1$  (300 MHz,  $CDCl_3$ -TMS):  $\delta$  ppm: 4.7 (m, H-7 $\beta$ ), 3.18 (m, H-15), 3.05 (sa,  $D_2O$ , 7-OH), 2.70 (dddd, H-1), 1.95 (d, H-6 $\alpha$ ), 1.25 (d, Me-16, 17), 1.25 (ss/sp, Me-20), 0.98 (s, Me-18), 0.90 (s, Me-19); RMN  $C^{13}$  (75.5 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  ppm: 189 (C-14), 184 (C-11), 151 (C-12), 147.5 (C-9), 143 (C-8), 124.1 (C-13), 63.1 (C-7), 45.7 (C-5), 24.0 (C-15), 21.7 (C-19), 19.87 (C-17), 19.75 (C-16), 18.4 (C-20); EMIE. (70 eV), m/z (% ab. rel.): 332 (48.8)  $M^+$ , 317 (12)  $[M-15]^+$ , 314 (28)  $[M-H_2O]^+$ , 299 (38)  $[M-15-18]^+$ , 43 (100)  $C_3H_7^+$ .

**VOLTAMPEROMETRIA CICLICA:** En una celda electrolítica de aproximadamente 100 ml. de capacidad se colocaron 25 ml. de una disolución 1 mM de horminona en MeCN anhidro ( $P_2O_5$ ); a ésta se le adicionaron otros 25 ml. de tetrafluoroborato de tetraetilénamónio 0.2 M en MeCN anhidro. La mezcla anterior previa homogenización, se sometió a un proceso de VC (0/-1500/0/+1500/0 mV) a diferentes velocidades de barrido (30, 60 y 120 mv/s). El electrodo de trabajo utilizado fue de lámina de Pt, como electrodo de referencia se empleó Ag/AgNO<sub>3</sub> y un tercer electrodo de Pt como auxiliar o contraelectrodo. De esta VC destaca un potencial de reducción ca -1.2 mv (Fig. 8) congruente para sistemas quinoidales análogos<sup>42</sup>, en la Fig. 9 a-b se puede observar la estructura química tanto de la Perezona como de la Horminona.



8a



8b

Fig. 8a.- Estructura química de la Horminona

Fig. 8b.- Estructura química de la Perezona

**PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A LA HORMINONA:** La Horminona (8.70 mg.) purificada mediante tres recristalizaciones con *n*-hexano fue inicialmente disuelta en 1 ml. de *n*-hexano grado espectroscópico. Con esta disolución se realizaron pruebas preliminares consistentes en impregnar discos de papel filtro (Whatman Cat. 1002 125) de 0.5 mm de diámetro con 10  $\mu$ l de la disolución anterior. Una vez secos, los discos se colocaron en placa de agar Mueller Hinton (BIOXON) en donde previamente se inocularon con hisopo las cepas de: *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Después de 24 horas de incubación a 37 °C se efectuó la lectura de la inhibición en la periferia de los discos.

En las pruebas preliminares sólo la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 denotó susceptibilidad a la Horminona. Los diámetros de inhibición para la prueba preliminar se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Promedio de los diámetros de inhibición en las pruebas preliminares.

Microorganismo	Promedio de los diámetros de inhibición. (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	8.46
<i>Escherichia coli</i>	---
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	---

Posteriormente a la prueba preliminar en disco, *S. aureus* la bacteria que resultó sensible al producto natural se sometió a una serie de evaluaciones (Mediante la técnica de disco) con diversas diluciones de Horminona/n-hexano (8.70 mg/ml.), estas diluciones fueron: 1:10, 1:100, 1:1000 y por último 1:10000; (en cada disco se colocaron 10 µl de cada dilución). Al encontrar la dilución mínima (1:10) capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias se hicieron otras diluciones intermedias para establecer con cierto margen de exactitud la dilución que todavía puede impedir el desarrollo del microorganismo. En este sentido, se realizaron diluciones menores a 1:10, ya que ésta resultó ser la última en la que el microorganismo fue inhibido ligeramente.

En la Tabla 5 se resumen los resultados obtenidos con *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, única cepa no resistente a la acción de la Horminona.

Tabla 5. Resultados promedio de los diámetros de inhibición para las diversas concentraciones de Horminona.

Concentración (mg./ml)	Promedio de los diámetros de inhibición (mm)
4.350	8.25
2.175	8.02
1.450	8.01
1.080	6.10
0.870	0

A CADA UNO DE LOS DISCOS EMPLEADOS EN LAS PRUEBAS SE LES ADICIONARON 3  $\mu$ l DE LA DILUCIÓN CORRESPONDIENTE.

## DISCUSSION



## DISCUSION

Del extracto *n*-hexánico de la raíz de *S. reptans* sometido a CC ( $\text{SiO}_2$  *n*-hexano/AcOEt; 9:1) se aislaron 1.55 g de un producto cristalino de color amarillo, el cual se identificó como Horminona (Fig. 2), un producto natural ya conocido<sup>6</sup>; la identificación se efectuó por correlación de los datos físicos y espectroscópicos obtenidos en el presente trabajo de tesis con respecto a los reportados en la literatura química (*vide supra*). Su punto de fusión resultó ser de 198-199 °C (174 °C Lit); por otro lado el metabolito secundario en su espectro de RMN  $\text{H}^1$  a 300 MHz presentó: En 4.7 ppm una señal múltiple que integra para un protón la que en base a su desplazamiento químico sugiere que sea un protón base de oxígeno, el cual se asigna al H-7, en 3.18 ppm aparece una señal heptuple que integra para un sólo protón particularmente H-15, base típica de el metino alílico del isopropilo, asimismo en el espectro se ve una señal simple ancha en aproximadamente 3.05 ppm, la que intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ , ésta, inequívocamente corresponde al protón del oxhidrilo en C-7, por otro lado, también aparece una señal dddd centrada en aproximadamente 2.70 ppm la cual integra para dos protones asignándose ésta a H-1, de igual manera en la región de 1.4-2.1 ppm destacan un conjunto de señales que se atribuyen a los protones H-2, H-3, H-4 y H-6, finalmente, en la región de los metilos se presenta una señal doble que integra para 6 protones la cual está centrada en 1.25 ppm y dos

señales simples en 0.98 y 0.90 ppm que integran para tres protones, dichas señales se asignan a los metilos en 16, 17, 18 y 19, es conveniente mencionar que la señal simple que corresponde a los protones del Me-20 está sobrepuesta con la señal doble en 1.25 ppm; en lo concerniente con la RMN de  $C^{13}$  normal y su versión APT se presentan en la región de los carbonilos dos señales, la primera a 189 ppm que corresponde a C-14, y la segunda a 184 ppm que sin lugar a dudas corresponde al carbonilo en C-11, a continuación en 151 ppm se observa una señal de  $Csp_2$  (*par*) que corresponde a C-12, en 147.5 ppm se obtiene una señal que típicamente describe un  $Csp_2$  (*par*) asignada a C-9, otro de los  $Csp_2$  en C-8 se identifica con claridad por la señal *par* en 143 ppm, también en 124.1 ppm se presenta otra señal correspondiente a  $Csp_2$  (*par*) en C-13, a continuación en 63.1 ppm se manifiesta una señal correspondiente a un carbono metínico (*non*) designada para C-7 base de oxhidrilo, también se observa una señal en 45.7 ppm dada para un carbono *non* correspondiente a C-5, en lo que respecta a la asignación de C-15 se obtiene una señal en 24.0 ppm atribuida a un carbono metínico, por último, se describe un conjunto de señales en 19.7, 19.8, 33.0, 21.7 y 18.4 ppm que se asignan a metilos en C-16, C-17, C-18, C-19 Y C-20 (*nones*) respectivamente; finalmente el espectro de masas (EMIE 70 eV) también correlaciona perfectamente con el previamente reportado, ya que aparece el ion molecular en 332, posteriormente se manifiestan picos  $m/z$  317,  $m/z$  314, y  $m/z$  299 asignados a pérdidas  $[M-Me]^+$ ,  $[M-H_2O]^+$  y  $[M-Me-H_2O]^+$  respectivamente.

De la voltamperometría cíclica de la Horminona realizada bajo las condiciones de trabajo previamente descritas en la parte experimental, se generó un voltamograma en el cual resalta la presencia de un potencial de media onda a  $-1.2$  mv, esto, es indicativo de que la molécula en estudio posee propiedades redox.

Al realizar una minuciosa revisión bibliográfica pudimos percatarnos que una molécula de estructura análoga, la Perezona<sup>42</sup> (Fig 8b) presenta un patrón oxidoreductor muy similar al de la Horminona (Fig. 10 a-b).

En consecuencia por correlación, se puede afirmar que el acoplamiento redox de la horminona esta dado principalmente por la funcionalidad quinoide de la molécula.

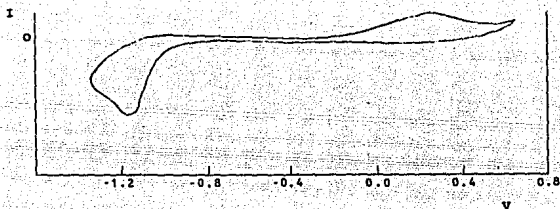


Fig. 9a Voltamograma cíclico de Horminona

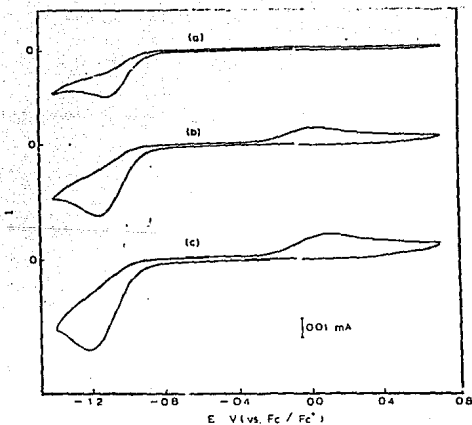


Fig. 9b Comportamiento voltamétrico de Parezona 1 mM (vide supra) medido con un electrodo de platino en presencia de ácido benzoico 0.01 M y TEAP 0.1 M en acetonitrilo, determinado a diferentes velocidades de barrido: a) 20, b) 60 y c) 120 mV/s.

Por otro lado, la Horminona fue empleada para realizar un estudio microbiológico mediante el método de difusión en agar, técnica seleccionada entre otros métodos como el de dilución en caldo dado que este último requiere de una sustancia de prueba que sea soluble en agua, mientras que la horminona es insoluble en agua y aun en buffer de  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  de pH 9.3.

Inicialmente se hizo una prueba preliminar con el objeto de determinar cual de las cepas en estudio ( *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli* ) es sensible a la Horminona, observandose su actividad bactericida o bacteriostática solamente sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a una concentración de 8.7 mg/ml (8.46 mm de diámetro de inhibición).

Posteriormente se procedió a diluir en forma logarítmica (1:10, 1:100, 1:1000, y 1:10000) la disolución inicial (8.7 mg/ml) para encontrar la "Mínima concentración" que todavía inhibe el crecimiento bacteriano, por lo que se determinó que a una dilución menor a 1:10 se presenta una escasa inhibición del crecimiento del microorganismo. En base a lo descrito previamente, se hicieron diluciones intermedias entre 1:2 y 1:8, estableciendo con mejor exactitud que la "Mínima Concentración Inhibitoria" es de 1.080 mg/ml la cual generó un diámetro de inhibición promedio de 6.10 mm.

Al continuar la revisión bibliográfica nos percatamos de que la Horminona posee una cierta similitud estructural con las tetraciclinas<sup>43</sup> (Fig. 9) y por consiguiente su actividad bactericida es análoga.

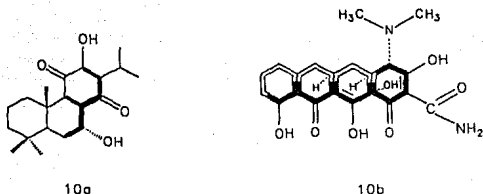


Fig 10 a-b.- Relación estructural entre la Horminona y las Tetraciclinas respectivamente. La porción sombreada en las tetraciclinas indica los grupos funcionales en los que se basa su actividad biológica.

Las tetraciclinas son antimicrobianos de amplio espectro<sup>23</sup> debido a las propiedades químicas que le confiere su estructura, mientras que la Horminona se podría considerar como una sustancia de espectro reducido ya que su actividad bactericida es muy limitada.

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

1.- Se hizo el estudio fitoquímico de las raíces de *Salvia reptans*; estudio no descrito con anterioridad en la literatura química.

2.- Del extracto *n*-hexánico de *S. reptans* se aisló Horminona, una diterpenquinona con esqueleto de abietano. Esta ha sido aislada previamente de otros especímenes.

3.- El Producto Natural se identificó por correlación de sus datos espectroscópicos (RMN  $H^1$ , RMN  $C^{13}$  y EMIE) con los reportados en la literatura.

4.- Se reporta el voltamograma cíclico de Horminona, presentandose un potencial de media onda en ca -1.2 mv.

5.- Se determinó una acción bactericida limitada, puesto que la única cepa sensible a la acción de la Horminona es *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, la cual presentó un diámetro de inhibición de 1.080 mg/ml.



## TABLAS Y ESPECTROS

Correlación de RMN  $C^{13}$  normal y versión APT para la Horminona.

Señal	Literatura <sup>6</sup> $\delta$ (ppm)	<i>S. reptans</i> $\delta$ (ppm)	APT
C-1	35.7	35.0	Par
C-2	18.8	18.8	Par
C-3	41.0	41.1	Par
C-4	39.1	39.0	Par
C-5	45.7	45.7	Non
C-6	25.7	25.7	Par
C-7	63.2	63.1	Non
C-8	143.1	143.0	Par
C-9	147.8	147.5	Par
C-10	33.0	33.2	Non
C-11	183.1	184.1	Par
C-12	151.1	151.0	Par
C-13	124.1	124.1	Par
C-14	189.0	189.0	Par
C-15	23.9	24.0	Non
C-16	19.7	19.7	Non
C-17	19.8	19.8	Non
C-18	33.1	33.0	Par
C-19	21.7	21.7	Non
C-20	18.3	18.4	Non

Correlación de RMN  $H^1$  para la Horminona

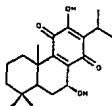
señal	M	Literatura <sup>6</sup> $\delta$ (ppm)	<i>S. reptans</i> $\delta$ (ppm)
H-1	ddd	2.69	2.70
H-2	m	1.72	--
H-3	m	1.5-1.7	--
H-6	d	1.96	1.95
H-7	d	4.73	4.70
H-7-OH	s	3.04	3.05
H-5	m	1.55	--
H-15	m	3.16	3.18
Me-16	d	1.21	1.25
Me-17	d	1.22	1.25
Me-18	s	0.98	0.98
Me-19	s	0.90	0.90
Me-20	s	1.22	1.25

M.- Multiplicidad

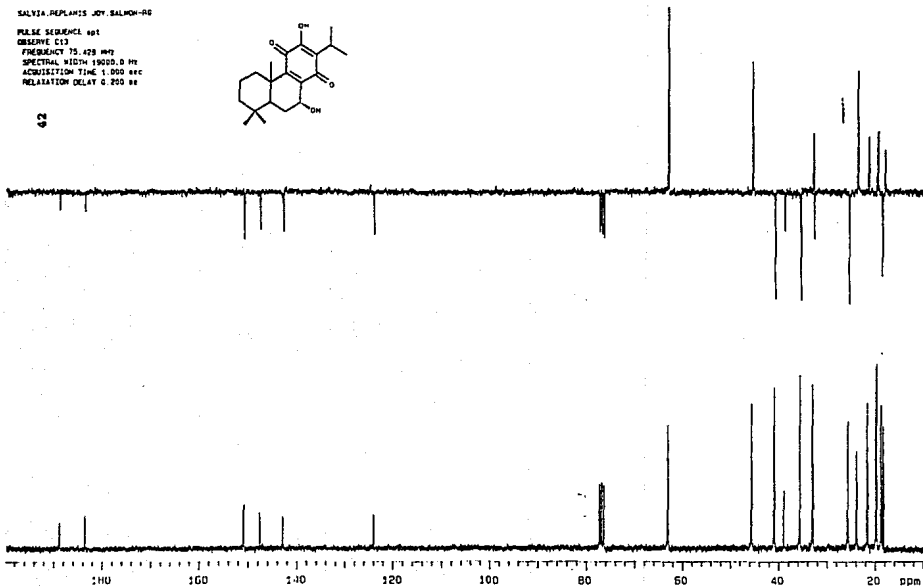
VERSION APT DE RMN C<sup>13</sup> DETERMINADO A 75.429 MHz PARA HORMINONA

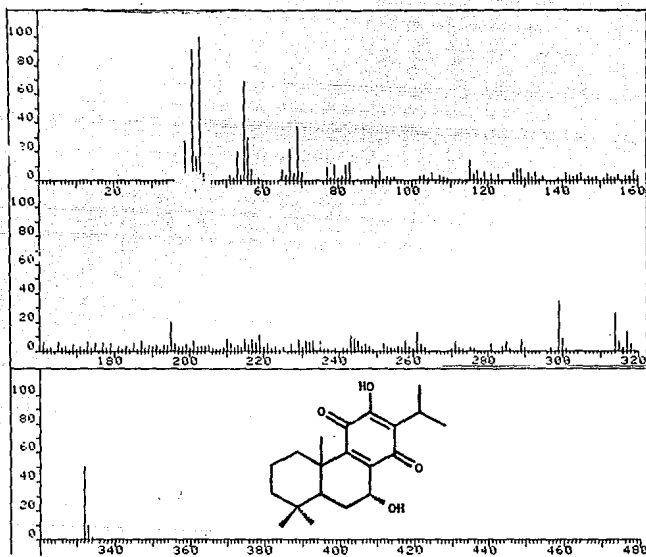
SALVIA REPLANIS JOY. SALMON-RO

FILE SEQUENCE apt  
OBSERVE C13  
FREQUENCY 75.429 MHz  
SPECTRAL WIDTH 19000.0 Hz  
ACQUISITION TIME 1.000 sec  
RELAXATION DELAY 0.200 sec



42

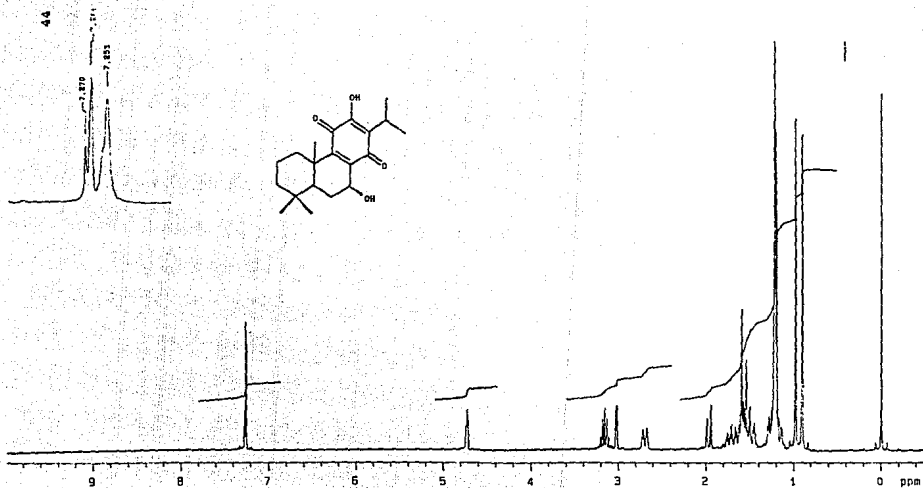




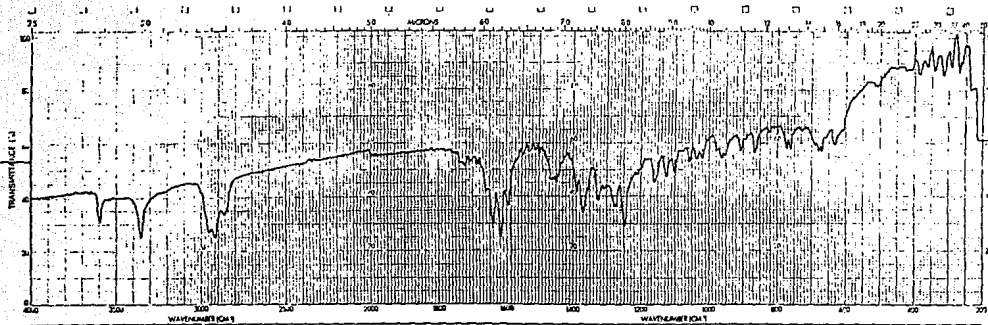
ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DETERMINADO A 200 MHz DE HORMINONA

881110.PRM\_8.03.01.01.01.01.01.01

DESDO-E H1  
FAS2.ACY 2x2 34x 44x



## ESPECTRO DE ABSORCION EN EL INFRAROJO PARA HORMINONA



SAMPLE	SOLVENT	CONCENTRATION	CELL PATH	WAVELLENGTH	SCANNER	OPERATOR
GLUCIN					1111	DATE

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## BIBLIOGRAFIA



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Standley, P., Williams, L., *Fieldiana*, 24 (9), 237, (1973).
- 2.- Bentham, G. A., De Candolle, *Prodr.*, 12, 27, (1848).
- 3.- Epling, C., *Repert. Spec. Nov. Beih. Veg.*, 110, 1, (1939).
- 4.- Rodríguez-Hahn, L., Esquivel, O., Cárdenas, J., *Rev. Latinoamer. Quím.*, 20, 3, 105-110, (1989).
- 5.- Esquivel, B., Esquivel, O., Cárdenas, J., *Phytochemistry*, 30, 2335-2338, (1991).
- 6.- Jonathan, L. T., Che, C. T., Pezzuto, J. H., Fong, H. H. S., Farnsworth, *J. Nat. Prod.*, 52, 571, (1989); y citas incluidas.
- 7.- Ulubelev, A., Topcu, G., *Phytochemistry*, 30-6, 2085-2086, (1991).
- 8.- Williams, P. H., Stone, M. J., Hauck, P. R. and Rahman, S. K., *J. Nat. Prod.*, 52, 1189, (1989).
- 9.- Domínguez, S. X. A., *Phytochemistry Methods Frontiers, First Special, Rev. Latinoamer. Quím.*, (1990).
- 10.- Román, L. U., Hernández, J. D., Del Río, R. E. and Bucio, M. A. *J. Org. Chem.*, 56, 1938, (1991).
- 11.- Geissman, T. A. and Crout, D. H. G., *Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism*, Freeman, Cooper and Company, pag. 25, 35, 235, (1969).
- 12.- Nakanishi, K., Goto, T., Ito, S. Natori. and Norde, S., *Natural products of chemistry*, Vol. 1, Kodasha LTD, Academic Press Inc., pag. 41, (1974).

- 13.- Edwards, O. E., Feniak, G., Los, M., *Can. J. Chem.*, 40, 1540, (1962).
- 14.- Kupchan, M., Karim, A., Marcks, C., *J. Org. Chem.*, 34, 3912, (1962).
- 15.- Hueso-Rodríguez, J. A., Jimeno, M. L., Rodríguez, B., Savona, G., Bruno, M., *Phytochemistry*, 22, 2005, (1983).
- 16.- Jiménez, M., Portugal, E., Lira-Rocha, A., Soriano-García, M., Toscano, R. J., *J. Nat. Prod.*, 51, 243, (1988).
- 17.- Hernández, M., Esquivel, B., Cárdenas, Jorge., Rodríguez-Hahn, L., Ramamoorthy, T. P., *Phytochemistry*, 26, 3297, (1987).
- 18.- Galicia, M., Esquivel, B., Sánchez, A. A., Cárdenas, J., Ramamoorthy, T. P., Rodríguez-Hahn, L., *Phytochemistry*, 27, 217, (1988).
- 19.- Romanova, D. C., Pribilova, G. F., Sajarov, P. I., Sheichenko, U. J., Bankovski, A. J., *Prirod. Soedinenii*, 7, 199, (1971).
- 20.- Domínguez, X. A., González, F., Alarcón, R., Gutiérrez, M., Marroquín, J. S., Watson, W., *Planta Médica*, 30, 237, (1976).
- 21.- a) Rodríguez-Hahn, L., Esquivel, B., Sánchez, C., Cárdenas, J., Estebanes, L., Soriano-García, M., Toscano, R., Ramamoorthy, T. P., *Tetrahedron letters*, 27, (1986); b) *Phytochemistry*, 28, 567, (1989).
- 22.- Brieskorn, C. H., Stehle, T., *Chem. Ber.*, 106, 922, (1873).
- 23.- Lennette, E. H., Spaulding, E. H., Truant, J. P., *Manual of Clinical Microbiology*, Second Edition, Ed. American Society for Microbiology, Washington D. C., 407, (1974).

- 24.- Wheat, P. F., Hastings, J. G. M., Spencer, R. C., *J. Med. Microbiol.*, 25, 95-96, (1988).
- 25.- Pichardo, R., Efren, A., *Infectologia*, 3, 215, (1982).
- 26.- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., *Amer. J. Clin. Path.*, 45, 493-496, (1966).
- 27.- Ericson, H. M., Sherris, J. C., *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, 217, 1-90, (1971).
- 28.- National Committee for Clinical Laboratory Standards Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Test, Approved Standards ASM-2, Villanova, (1975).
- 29.- Colvin, H. J., Sherris, J. C., *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 24:14, 61-66, (1977).
- 30.- Isenberg, H. P., Reichler, A., Wiseman, D., *Appl. Microbiol.*, 22, 980-986, (1971).
- 31.- Wyatt, P. J., *Nature*, 221, 1257-1258, (1969).
- 32.- Cady, P., Heden, C. G., Illeni, T., John Wiley and Sons Inc., New York, (1975).
- 33.- Stewart, G. N., *J. Exp. Med.*, 4, 235-243, (1899).
- 34.- Ur, A., Brown, D. F. J., *J. Med. Microbiol.*, 8, 19-28, (1975).
- 35.- Hogg, G. M., Patterson, M. F., Barr, J. G., *Journal of Applied Microbiology*, 62, 189-195, (1987).
- 36.- Rippa, K. T., Mordh, Horrelius, P. A., Cjung-Hom, K., *Journal of Clinical Microbiology*, 5, 393-396, (1977).
- 37.- Randal, E. L., *Rapid Methods and Automation in Microbiology*, Learned Information Inc., 144-146, (1974).

- 38.- D'Eustachio, A. J., Johnson, D. R., *Federations Proceedings*, 27, 761, (1968).
- 39.- Picciolo, G. L., Chapelle, E. W., *NASA Technical Note*, D-8439, (1977).
- 40.- Thore, a., Nilsson, L., Hoser, H., Ansehn, S., *Acta Pathol. Microbiol. et Immunologia Scand.*, 85-b, 161-166, (1977).
- 41.- Sánchez Curiel Flor Marina, Tesis Oxidación selectiva de esterres de Hantzsch por el método electroquímico. FESC UNAM, 7-9, (1985).
- 42.- González, F., Aceves, J., Miranda, R., González, I., J. *Electroanal. Chem.*, 310, 293-303, (1991).
- 43.- Bryan, L. E., *Antimicrobial Drug Resistance*, 2<sup>th</sup> Edition, Academic Press, 193-194, (1975).
- 44.- Joseph-Nathan, P., *Rev. Soc. Quím.*, 18 (5), 226, (1974).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA