

41
DeJ



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO QUIMICO Y BIOLOGICO PRELIMINAR DE
Bromelia pinguin. (Bromeliaceae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MARIA SELENE CHAVEZ GALLARDO



MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON
FALSA LEYENDA



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 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

LISTA DE CUADROS -----	.I
LISTA DE ESPECTROS -----	.II
LISTA DE ESQUEMAS -----	.III
LISTA DE FIGURAS -----	.IV
LISTA DE GRAFICAS -----	.V
LISTA DE ABREVIATURAS -----	.VI
I. INTRODUCCION. -----	1
1.1 Generalidades del género <i>Bromelia</i> -----	1
1.2 Antecedentes de <i>Bromelia pinguin</i> -----	6
II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS. -----	8
III. PARTE EXPERIMENTAL. -----	11
3.1 Materiales y métodos -----	11
3.1.1 Material vegetal -----	11
3.1.2 Métodos de extracción y fraccionamiento -----	11
3.1.3 Determinación de la toxicidad para el crustáceo <i>Artemia salina</i> -----	16
3.1.3.1 Preparación de la muestra -----	16
3.1.3.2 Bioensayo -----	16
3.1.4 Evaluación cualitativa antimicrobiana -----	17
3.1.4.1 Microorganismos de prueba -----	17
3.1.4.2 Preparación de las muestras a evaluar	

y de los testigos -----	18
3.1.4.3 Preparación de los inóculos de los microorganismos de prueba -----	18
3.1.4.4 Siembra de los microorganismos ---	18
3.1.4.5 Aplicación de las muestras objeto de la evaluación en las placas de agar previamente inoculadas con los microorganismo de prueba -----	19
3.1.4.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana -----	19
3.1.5 Determinación de la actividad alelopática y antifúngica de los extractos con y sin minadores -----	20
3.2 Aislamiento y purificación de los compuestos -----	21
3.2.1 Obtención del Estigmasterol (19) --	21
3.2.2 Obtención de β -sitosterol (20) -----	21
3.2.3 Obtención de β -D-glucositosterol (21)	21
3.2.4 Obtención de β -D-glucopiranososa (22)	21
3.3 Caracterización de los compuestos aislados	21
3.3.1 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas -----	22
3.3.2 Prueba química preliminar para identificación de azúcares -----	23
3.3.3 Obtención del acetyl derivado del estigmasterol. -----	23

IV. RESULTADOS Y DISCUSION -----	24
4.1 Identificación de los compuestos aislados.	29
4.1.1 Identificación del estigmasterol (19)	29
4.1.2 Identificación del β -sitosterol (20)	29
4.1.3 Identificación del β -D gluco- sitosterol (21) -----	30
4.1.4 Identificación de la β -D-gluco- piranosa (22) -----	30
4.2 Evaluaciones biológicas -----	40
 V. CONCLUSIONES. -----	 47
 VI. BIBLIOGRAFIA -----	 49

I. LISTA DE CUADROS

Cuadro 1	Flavonoides aislados de la familia Bromeliaceae -----	2
Cuadro 2	Estructura de los flavonoides aislados de la familia Bromeliaceae -----	5
Cuadro 3	Resumen del fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna del extracto metanólico de <i>Bromelia pinguin</i> -----	13
Cuadro 4	Sistemas de eluyentes y agentes cromogé- nicos utilizados para los análisis cro- matográficos en capa fina -----	15
Cuadro 5	Microorganismos de prueba empleados para la evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana -----	17
Cuadro 6	Rendimiento de los compuestos aislados del extracto metanólico de las partes aéreas de <i>Bromelia pinguin</i> . -----	28
Cuadro 7	Potencial antimicrobiano del extracto total. -----	29
Cuadro 8	Constantes físicas y espectroscópicas del estigmasterol (19) -----	31
Cuadro 9	Constantes físicas y espectroscópicas de la β -D-glucopiranososa -----	38

II. LISTA DE ESPECTROS.

Espectro 1	Espectro IR del estigmasterol (19) ----	33
Espectro 2	Espectro IR del derivado acetilado del estigmasterol (19a) -----	34
Espectro 3	Espectro RMNP (CDCl ₃) del estig- masterol (19) -----	35
Espectro 4	Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃) del estigmasterol (19) -----	36
Espectro 5	Espectro de RMNP bidimensional COSY (CDCl ₃) del estigmasterol (19) -----	37
Espectro 6	Espectro comparativo de la β-D-gluco- piranosa (22) obtenida y una muestra autentica. -----	39

III.LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 Preparación del extracto metanólico de
las partes aéreas de *Bromelia pinguin*. --- 14

IV LISTA DE FIGURAS.

Figura 1	Constituyentes aislados de <i>Bromelia pinguin</i> -----	7
Figura 2	Comparación mediante las técnicas de ccf y HPLC, de los extractos metanólicos de las partes aéreas de <i>Bromelia pinguin</i> con minadores y sin minadores -----	26
Figura 3	Espectro UV-visible del extracto MeOH de las partes aéreas de <i>B. pinguin</i> con minadores y sin minadores. -----	27
Figura 4	Cromatograma HPLC del extracto MeOH de las partes aéreas de <i>B. pinguin</i> con minadores y sin minadores. -----	27
Figura 5	Estructuras de los compuestos aislados del extracto metanólico de las partes aéreas de <i>B. pinguin</i> . -----	28

V. LISTA DE GRAFICAS

- Gráfica 1 Efecto del extracto MeOH de *B. pinguin* con minadores sobre el crecimiento radicul de *A. hypocondriacus* y *E. crusgalli*. ----- 41
- Gráfica 2 Efecto del extracto MeOH de *B. pinguin* sin minadores sobre el crecimiento radicular de *A. hypocondriacus* y *E. crusgalli*. ----- 42
- Gráfica 3 Efecto del extracto MeOH de *B. pinguin* con minadores sobre el crecimiento radial de hongos fitopatógenos. (48hrs.) ----- 43
- Gráfica 4 Efecto del extracto MeOH de *B. pinguin* con minadore sobre el crecimiento radial de hongos fitopatógenos (72 y 192 hrs.) --- 44
- Gráfica 5 Efecto del extracto MeOH de *B. pinguin* sin minadores sobre el crecimiento radial de hongos fitopatógenos (48 hrs.) ----- 45
- Gráfica 6 Efecto del extracto MeOH de *B. pinguin* sin minadores sobre el crecimiento radial de hongos fitopatógenos. (72 y 192 hrs.) --- 46

VI. LISTA DE ABREVIATURAS.

IR : Infrarrojo

RMNP : Resonancia Magnética Nuclear Protónica

CDCl_3 : Cloroformo Deuterado

RMN^{13}C : Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13

Hex : Hexano

CHCl_3 : Cloroformo

MeOH : Metanol

i-PrOH : Isopropanol

AcOEt : Acetato de Etilo

LC_{50} : Concentración letal media

mm : Milímetros

μl : Microlitros

p.f : Punto de fusión

KBr : Bromuro de potasio

TMS : Tetrametil Silano

ppm : Partes por millón

ml : Mililitros

mg : Miligramos

μg : Microgramos

g : Gramos

MHz : Megahertz

HPLC : Cromatografía de líquidos de alta resolución

ccf : Cromatografía capa fina.

I. INTRODUCCION.

1.1 Generalidades del género *Bromelia*.

El género *Bromelia* pertenece a la familia Bromeliaceae, la cual comprende 45 géneros y 1900 especies limitadas a el Nuevo Mundo, excepto la especie *pitcairnia* que se encuentra localizada en el Oeste Africano. (Williams, 1978).

Se ha observado que dicha familia es morfológica y anatómicamente diferente, por lo cual es tratada por muchos taxónomos como un grupo aislado dentro de las Monocotiledóneas.

Desde el punto de vista químico, la familia Bromeliaceae no ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, en una revisión acerca de la química de las partes aéreas de 61 especies (Williams, 1978), se encontró que los metabolitos secundarios más característicos son los flavonoides. Los flavonoides descritos en la familia, incluyen flavonoles y flavonas las cuales se resumen en el Cuadro 1.

En nuestro país se encuentran reportados únicamente dos especies de este género (Martínez, 1989) : *Bromelia karatas* y *Bromelia pinguin*.

Cuadro 1 Flavonoides aislados de la familia Bromeliaceae.

Subfamilia, Género, especie	compuestos o sustituyentes
Bromeloideae	
<i>Acanthostachys strebilaceae</i> (Schull. f.) Klatzsch.	Quercetina
<i>Aechmea bromelifolia</i> (Rudge) Baker	Quercetina
<i>Billbergia zebrina</i> (Herb.) Lindl	Quercetina, Luteolina
<i>Canistrum lindenii</i> (Regel) Nez. var <i>lindenii</i> .	Quercetina
<i>Gravisia aquilega</i> (Salisb) Nez.	Quercetina
<i>Neoregalia spectabilis</i> (Moore) L.B. Smith.	Luteolina
<i>N. fulgens</i> Lem.	Quercetina
<i>N. innocentii</i> Lem. var. <i>innocentii</i>	Quercetina, Miricetina
<i>N. procerum</i> Lindl. var. <i>Procerum</i> .	Quercetina
<i>N. aff rutilans</i> E. Morr.	Quercetina
<i>Protea petropolitana</i> . (Nowra) Mez.	Quercetina, Miricetina
<i>Quesnelia liboniana</i> (De Jonghe) Mez	Quercetina
<i>Streptocalyx longifolius</i> (Rudge) Baker	Quercetina

Cuadro 1 Flavonoides aislados de la familia Bromeliaceae.

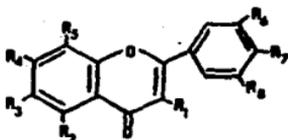
(continuación)

Subfamilia, Género, especie	Compuesto o sustituyente
Pitcairnioideae.	
<i>Brocchinia reducta</i> Baker	Quercetina
<i>P. atrorubens</i> (Beer) Baker	Quercetina
<i>P. corallina</i> Linden et Andree	Apigenina, 6 OH Luteolina Escutelareina
<i>P. derblayana</i> Andree	Apigenina, 6 OH Luteolina Escutelareina
<i>P. imbricata</i> (Brongn) Regel.	6 OH Luteolina
<i>P. integrifolia</i> Ker Gawl	Quercetina 6 OH Luteolina
<i>P. poortmanii</i> Andree	6 OH Luteolina Escutelareina
<i>P. punicea</i> Scheidv	Quercetina, Escutelareina
<i>P. rubiflora</i>	Quercetina, Apigenina 6 OH Luteolina, Kaempferol
<i>P. sprucei</i> Baker.	Quercetina, 6 OH Luteolina Kaempferol
<i>P. kanthocalyx</i> Mart. <i>puya s.p.</i>	Luteolina, 6 OH Luteolina 6 OH Luteolina
Tillandsioideae	
<i>Catopsis berteroniano</i> (Schult. fil) Mez	Quercetina, Gossipetina
<i>T. brachycoulos</i> schiechfend	Quercetina, Patuletina

Cuadro 1 Flavonoides aislados de la familia Bromeliaceae.
(continuación)

Subfamilia, Género, especie	Compuesto o sustituyente
<i>T. bulbosa</i> Hooker	Patuletina
<i>T. cyanea</i> Linden ex K. Koch var <i>cyanea</i> .	6 OH Luteolina.
<i>T. aeranthos</i> (Loisel) (L.B. Smith)	Quercetina
<i>T. fasciculata</i> Swartz	Quercetina, 6'5'3' tri OMe- 3 5 7 4' tetra OH flavona, 6 3'5' -tri OMe- 3 5 7 4'- tetra OH flavona.
<i>Vriesea imperialis</i> E. Morr	Quercetina, Patuletina
<i>V. regina</i> Beer	Quercetina, Patuletina

Cuadro 2 Estructuras de los flavonoides aislados de la familia Bromeliaceae.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
Kaempferol (1)	OH	OH		OH			OH	
Quercetina (2)	OH	OH		OH		OH	OH	
Miricetina (3)	OH	OH		OH		OH	OH	OH
Fatuletina (4)	OH	OH	OMe	OH		OH	OH	
Gossipetina (5)	OH	OH		OH	OH	OH	OH	
Flavonol (6)	OMe	OH	OMe	OH		OMe	OH	OMe
Flavonol (7)	OH	OH	OMe	OH		OMe	OH	OMe
Apigenina (8)		OH		OH			OH	
Luteolina (9)		OH		OH		OH	OH	
6OH-Luteolina (10)		OH	OH	OH		OH	OH	
Escutelareina (11)		OH	OH	OH			OH	

1.2 Antecedentes de la *Bromelia pinguin*.

La *Bromelia pinguin* es una planta herbácea, de hojas en roseta, largas y angostas con el borde espinado; sus frutos son amarillos, de sabor ácido y son conocidos popularmente como fruta maya. *B. pinguin* se encuentra ampliamente distribuida en los estados de Oaxaca, Veracruz, Yucatán, Chiapas y San Luis Potosí y se le conoce en estas regiones con los nombres comunes de bagulo, jocuistle, pifuelillo, pifuela y mutajte, respectivamente. En la medicina popular mexicana es empleada como agente antigotoso e hipocolesterolemizante. (Martínez, 1989).

Desde el punto de vista químico, la *Bromelia pinguin* ha sido objeto de una investigación previa (Raffauf, 1981), en la cual se estudiaron las raíces y los tallos. Este estudio condujo al aislamiento de tres flavonoides: penduletina (12), cirsimaritina (13) y casticina (14) así como el ácido ferúlico (15) y tres nuevos diterpenoides, dos de los cuales son derivados de filocladona: 3-oxofilocladan-16-ol (16), filocladan-16 α -diol, (17) y el 3-oxopimar-15-ene-7 β , 8 β -diol (18). En la Figura 1 se muestran las estructuras de los compuestos aislados.

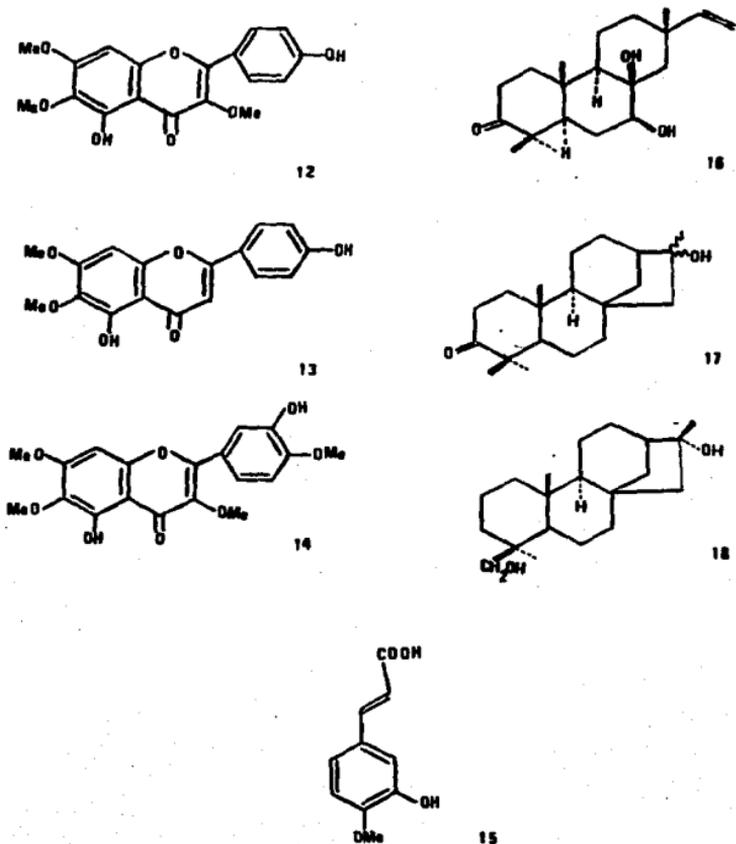


Figura 1. Constituyentes aislados de *Bromelia pinguin*.

II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

Uno de los principales criterios para descubrir nuevos productos naturales con posible actividad terapéutica, sin duda ha sido el estudio sistemático de plantas usadas en medicina tradicional (Farnsworth y Bingel, 1977; Farkas, 1988; Salemink, 1980; *inter alia*). Entre las plantas mexicanas que son utilizadas en la medicina popular, se encuentra la *Bromelia pinguin*, la cual como ya se mencionó previamente es empleada como agente antigotoso e hipocolesterolemiante (Martínez, 1989; Rico, V. comunicación personal). Cabe mencionar, que la *Bromelia pinguin* en su habitat natural presenta la particularidad de que algunas partes de las hojas son susceptibles al ataque de algunos insectos.

Con base a lo antes expuesto y considerando que no existe ningun reporte previo de esta planta en México, se decidió realizar el estudio químico y biológico preliminar de *Bromelia pinguin*, como parte de un estudio sistemático de plantas mexicanas empleadas en la medicina tradicional, con la finalidad de aislar compuestos bioactivos, y por otra parte, en contribuir al conocimiento de los elementos constitutivos de la misma. (Cruz, 1990; Chávez, 1991; Bahena, 1992; *inter alia*). Adicionalmente, se decidió investigar de manera preliminar si existen diferencias cualitativas en la composición química de las partes aéreas de la planta con minadores y sin minadores.

Los objetivos específicos planteados para el presente trabajo son los siguientes:

- a) Recopilar la información bibliográfica acerca de aspectos biológicos, fitoquímicos, etnobotánicos y taxonómicos de la planta objeto de estudio.
- b) Realizar las operaciones preliminares propias de la preparación de extractos vegetales.
- c) Comparar mediante las técnicas de ccf y HPLC, los extractos obtenidos de las partes aéreas de las operaciones preliminares previamente mencionadas, de los lotes de la planta con minadores y sin minadores.
- d) Preparar el/los extracto/s de las hojas con o/y sin minadores de acuerdo a la metodología convencional y fraccionarlo mediante los métodos adecuados.
- e) Identificar mediante métodos químicos y espectroscópicos los compuestos aislados.
- f) Determinar la toxicidad del extracto, fracciones y compuestos aislados para la *Artemia salina* tomando en cuenta que este bioensayo permite detectar de forma preliminar actividades biológicas más complejas (Meyer, et al, 1987)
- g) Determinar la actividad antimicrobiana de el extracto total. (con y sin minadores), considerando que este bioensayo ha revelado el potencial de plantas superiores como fuente de nuevos agentes

anti-infectivos (Mitscher, et al, 1972, 1987; Rojas 1992).

- h) **Determinar la actividad alelopática y antifúngica potencial de los extractos con y sin minadores.**

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIALES Y METODOS

3.1.1 Material Vegetal

El material vegetal (partes aéreas con minadores y sin minadores) utilizado en este estudio fué recolectado en la Estación de Biología el Morro de la Mancha, Municipio Actopan Veracruz, por el Dr. Victor Rico. Una muestra de referencia se depositó en el Herbario Nacional de Jalapa (Voucher : R. Ortega No.718).

Las hojas fueron secadas a temperatura ambiente y posteriormente se molieron en un molino de cuchillas, modelo Willey 4.

3.1.2 Métodos de extracción y fraccionamiento

Los dos lotes del material vegetal (con minadores y sin minadores) se trataron según el procedimiento mostrado en el Esquema 1.

Una vez obtenidos los extractos metanólicos de ambos lotes, se pudo comprobar mediante las técnicas de ccf y HPLC, que no existían diferencias significativas en el contenido metabólico de los extractos con minadores y sin minadores, por lo que se decidió reunir ambos extractos.

El extracto metanólico resultante (443.90 g) se fraccionó

vía cromatografía en columna abierta utilizando como adsorbente gel de sílice (1 Kg de sílice gel G 60 Merck). El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano - cloroformo, cloroformo, cloroformo-metanol y metanol en diferentes proporciones.

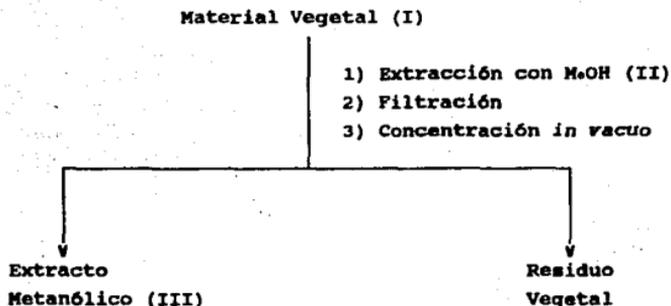
Se recogieron un total de 206 fracciones de un litro cada una, uniéndose aquellas cromatográficamente similares.

En el Cuadro 3 se resumen los sistemas de eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con cada uno de ellos y las fracciones combinadas.

Para el análisis cromatográfico mediante la técnica de HPLC de ambos extractos (con y sin minadores), se utilizó una columna de fase reversa μ -Bondapack C-18, 10 μ , empleando como eluyente una mezcla de MeOH-H₂O en una proporción 8:2, con un flujo de 0.7 ml/min. Previamente fué necesario obtener los espectros en la región UV y Visible para determinar los máximos de absorción de los extractos.

Cuadro 2. Resumen del fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna del extracto metanólico de *Bromelia pinguin*.

Eluyente	Proporción	Número de fracciones	Fracciones combinadas
Hexano	100	1-10	1-7, 8-15
Hex- CNCI_3	90:10	16-24	16-20, 21-24
Hex- CNCI_3	80:20	25-28	25-28
Hex- CNCI_3	70:30	29-36	29-35
Hex- CNCI_3	60:40	37-47	36-38, 39-42, 43-45, 46-47
Hex- CNCI_3	50:50	48-60	48-49, 50-52, 53-60
Hex- CNCI_3	40:60	61-90	61-67, 68-90
Hex- CNCI_3	20:80	91-102	91-99, 100-102
Hex- CNCI_3	2:98	103-104	103-104
CNCI_3	100	105-109	105-109
CNCI_3 -MeOH	99:1	110-130	110-115, 116-117, 118, 119-133
CNCI_3 -MeOH	97:3	131-142	134-137, 138-145
CNCI_3 -MeOH	95:5	143-155	146-155
CNCI_3 -MeOH	90:10	156-176	156-158, 159-163, 164, 168-171, 173- 175
CNCI_3 -MeOH	80:20	177-194	177, 178, 179, 180- 182, 183, 184, 185- 186, 187-188, 189- 191, 192-193
CNCI_3 -MeOH	70:30	195-199	194-198, 199
CNCI_3 -MeOH	50:50	200-205	200-201, 202-203, 204, 205
MeOH	100	206	206



- I. Cantidad de material vegetal con minadores 1.8934g y cantidad de material vegetal sin minadores 2.185g

- II. Extracción vía maceración (dos veces por periodos de dos días cada uno, con un volumen de 30 litros.

- III. Peso extracto metanólico con minadores 203.32g y peso extracto metanólico sin minadores 240.58g

Esquema 1. Preparación del extracto metanólico de las partes aéreas de *Bromelia pinguin*

Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron siguiendo técnicas convencionales, utilizando placas de vidrio recubiertas de gel de sílice (sílica gel 60 GF 254 Merck), varios sistemas de eluyentes y diferentes agentes cromogénicos.

Los sistemas de eluyentes y reactivos reveladores empleados se encuentran resumidos en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Sistemas de eluyentes y agentes cromogénicos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

Sistema de eluyente	Composición	Proporción	Referencia
I	Hexano	100	-
II	Hex / CHCl ₃	Diversas	-
III	Cloroformo	100	-
IV	CHCl ₃ /MeOH	Diversas	-
V	Metanol	100	-
VI	i-PrOH/AcOEt/H ₂ O	83:11:16	Stahl 1969

Reactivo	Agentes cromogénicos composición	Referencia
Sulfato Cérico	12g de Sulfato cérico 22.2ml de H ₂ SO ₄ conc. 350g de hielo picado	Stahl, 1969
Anisaldehido	0.5 ml anisaldehido 9.0 ml etanol 0.5 ml de H ₂ SO ₄	"

* Para el desarrollo de color fué necesario calentar por dos minutos aproximadamente.

3.1.3 Determinación de la toxicidad para el crustáceo *Artemia salina*.

3.1.3.1 Preparación de las muestras.

Las muestras (compuestos puros, fracciones y/ o extractos) se preparan disolviendo 20 mg de material en 20 ml de disolvente apropiado. Posteriormente se transfieren a tres viales, colocando 500, 50 y 5 μ l de la solución original, teniendo concentraciones de 1000, 100 y 10 ppm respectivamente, cada una de las cuales se realizan por triplicado. Por último se dejó evaporar el disolvente de cada una de las soluciones al vacío.

3.1.3.2 Bioensayo.

Después de haber desarrollado durante 48 horas los huevecillos de *Artemia salina* en un medio salino artificial, se transfieren 10 especímenes a cada una de los viales, conteniendo la muestra a evaluar, más 5 ml de medio salino. Transcurridas 24 horas se registran el número de microorganismos sobrevivientes. Los resultados finales se expresan en porcentaje de muerte de los crustáceos o calculando la concentración letal media (LC_{50}).

3.1.4 Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana.

3.1.4.1 Microorganismos de prueba.

Los microorganismos empleados para la evaluación incluyeron bacterias Gram positivas, Gram negativas y una levadura. En el Cuadro 5 se resumen los microorganismos de prueba, indicándose además las cepas correspondientes.

Cuadro.5 Microorganismos de prueba empleados para la evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana

Gram +	<i>Staphilococcus aureus</i> (ATCC 15006) <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)
Gram -	<i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC 14207) <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)
Levadura	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)

3.1.4.2. Preparación de las muestras a evaluar y de los testigos

El extracto total se evaluó como una suspensión al 10% en agua-Tween 80 a una concentración de 20 mg/ml.

Como controles positivos, se prepararon soluciones de estreptomycin (1 mg/ml) para las bacterias y de nistatina (3 mg/ml) para la levadura.

3.1.4.3 Preparación de los inóculos de los microorganismos de prueba

Las bacterias se pusieron a desarrollar en caldo nutritivo (Merck) y se incubaron durante un período de 24 horas a 37°C.

La levadura, se sembró en caldo-glucosa 2% sabouraud (Merck) y se incubó por 48 horas a 28°C

Una vez desarrollados los microorganismos fué necesario estandarizar su número a una concentración aproximada de 1.5×10^6 células/ml empleando los patrones de turbidez de Mc. Farland (Barley, 1984) mediante la disolución de caldo nutritivo, inoculando una solución salina isotónica.

3.1.4.4. Siembra de los microorganismos.

A fin de lograr una mejor distribución de los

microorganismos, se eligió el método de vertido en placa, en el cual 1 ml de las soluciones estandarizadas de microorganismos (aprox 1.5×10^6 células) se colocó en cajas de petri estériles. Posteriormente, se agregaron a cada caja, 20 ml de agar fundido a una temperatura aproximada de 45° C homogenizando mediante una agitación cuidadosa. El agar empleado para las bacterias fué el agar # 1 para antibióticos de Merck y en el caso de la levadura se utilizó agar glucosa 4% Sabouraud (Merck).

3.1.4.5. Aplicación de las muestras objeto de la evaluación en las placas de agar previamente inoculadas con los microorganismos de prueba.

Transcurrido el tiempo necesario para la solidificación de las placas de agar se procedió a hacer tres horadaciones convenientemente distribuidas en cada placa, utilizando un horador cilíndrico de 10 mm de diámetro. Posteriormente adicionaron a cada pozo 100 y 50 μ l del control positivo. Las placas así preparadas se incubaron por 24 horas a 37° C en el caso de las bacterias y durante 48 horas a 28° C en el caso de la levadura.

3.1.4.6. Evaluación de la actividad antimicrobiana.

Al cabo del tiempo de incubación se evaluó la actividad

antimicrobiana del extracto midiendo el diámetro de la zona clara de inhibición.

Las pruebas se realizaron por duplicado y todo el procedimiento se efectuó en una campana de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad.

3.1.5. Determinación de la actividad alelopática y antifúngica de los extractos con y sin minadores.

El potencial alelopático de los extractos metanólicos de las partes aéreas con y sin minadoras de *Bromelia pinguin*, fueron probados sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypocondriacus* y *Echinochloa crusgalli*.

Con respecto a la determinación de la actividad antifúngica de ambos extractos, se utilizaron los hongos de los géneros *Alternaria*, *Fusarium*, y *Pythium*.

Estas evaluaciones fueron realizadas en el laboratorio de la Dra. Ana Luisa Anaya del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Las evaluaciones se realizaron de acuerdo a la metodología descrita para este tipo de bioensayos. (Anaya, 1990; Castañeda 1992.).

3.2 Aislamiento y purificación de los compuestos.

3.2.1. Obtención del Estigmasterol (19)

De las fracciones 68-90 de la columna I (ver cuadro 3) se obtuvieron 3.8252g de un sólido cristalino blanco de p.f 120-125°C.

3.2.3. Obtención del β -Sitosterol (20)

De las fracciones 157-167 de la columna I (ver cuadro 3) se obtuvieron 711.0mg de un sólido amorfo blanco.

3.2.4. Obtención del β -D-glucofitosterol (21)

De la fracción 157-167 de la columna I (ver cuadro 3) precipitaron 130 mg de un sólido amorfo blanco. p.f 274-276°C.

3.2.5. Obtención de la β -D-glucopiranosa (22)

De las fracciones 203-206 de la columna I (ver Cuadro 3) precipitaron de manera espontánea 1.0310g de un sólido cristalino amorfo, de p.f. 177-179°C, ópticamente activo.

3.3 Caracterización de los compuestos aislados.

3.3.1. Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas

- a) Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Fisher-Johnes; se reportan sin corregir.
- b) Los espectros IR fueron registrados en un espectrofotómetro de rejilla Perkin Elmer modelo 549 B en pastilla KBr.
- c) La rotación óptica fué medida en un polarímetro digital Jasco DIP 360.
- d) Los espectros de RMNP y RMN¹³C se determinaron en un instrumento Varian 300S utilizando como disolvente CDCl₂ y como referencia interna TMS.
- e). Los cromatogramas fueron obtenidos en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Lambda-Max, Modelo 481, Millipore.
- f) Los espectros UV y Visible fueron registrados en un espectrofotómetro Beckman Du-68.

3.3.2. Prueba química preliminar para identificación de azúcares.

Prueba de Molisch.

Una pequeña cantidad del compuesto se disolvió en 2 ml de agua y se le adicionó un ml de reactivo de α naftol (10% en etanol), seguidamente se agregaron por las paredes aproximadamente 5 gotas de H_2SO_4 concentrado, observándose una coloración violeta en la interfase de los líquidos.

La coloración observada fué indicativa de una prueba positiva para carbohidratos.

3.3.3. Obtención del acetil derivado del Estigmasterol

Para formar el derivado acetilado del estigmasterol se empleó 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de piridina por cada 100 mg de producto. La mezcla de reacción se dejó por 12 horas a temperatura ambiente y al cabo del tiempo señalado se procesó de manera habitual (Shriner, Furson-Curtin, 1980); se acetilaron 20 mg de estigmasterol, obteniéndose 18 mg de compuesto acetilado.

IV.RESULTADOS Y DISCUSION

Los extractos preparados a partir de las partes aéreas de la *Bromelia pinguin* con y sin minadores fueron sujetos a un análisis cromatográfico comparativo (ccf y HPLC), encontrándose que no existía diferencia en cuanto al contenido metabólico, por lo cual se decidió unir ambos extractos (Figura 2).

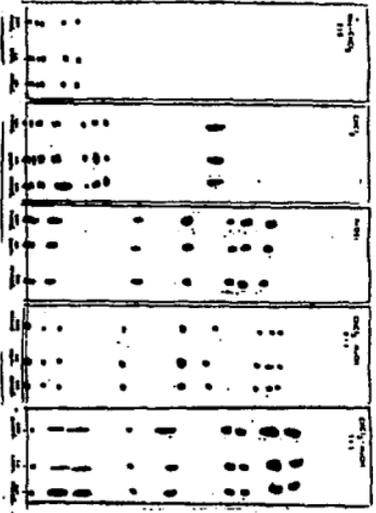
El extracto metanólico resultante, se fraccionó mediante una cromatografía preparativa en columna de gel de sílice según se indicó en la sección 3.1.2. El extracto y las fracciones obtenidas fueron evaluadas contra el crustáceo *Artemia salina* de acuerdo al procedimiento de Meyer y colaboradores (Meyer et.al. 1982) , obteniéndose para todos ellos resultados poco halagadores ($LC_{50} > 1000$ ppm).

Con base a lo anterior, no fué posible realizar el estudio biodirigido de la planta, por lo que se decidió proceder al estudio fitoquímico de manera convencional.

Como resultado de este proceso se aislaron 3 esteroides; [el estigmasterol (19), el β -sitosterol (20), y el β -D-glucositolsterol (21)] y un monosacárido: [la β -D-glucopiranososa (22).]

Los compuestos aislados fueron identificados mediante la comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con las de una muestra auténtica. En el Cuadro 6 se resumen los rendimientos de los compuestos aislados.

Figura 2 Comparación de las mediciones cronológicas de cada tipo de las excavaciones arqueológicas en las partes adyacentes de la planicie con el número y las medidas de las medidas en diferentes momentos de tiempo.



CHANNEL A
INSTRY 70/07/07 41/04/77
18

con medidas

FILE 3.	HTIX	WTHOM N.	RT	WMA 7
PERMB	0.189	0.14	1.87	04
1	26.482	2.17	3417	02
2	48.795	4.26	6325	02
4	6.154	0.24	4079	02
5			2004	02
TOTNL	100.		6064	

CHANNEL A
INSTRY 70/07/07 41/04/77

sin medidas

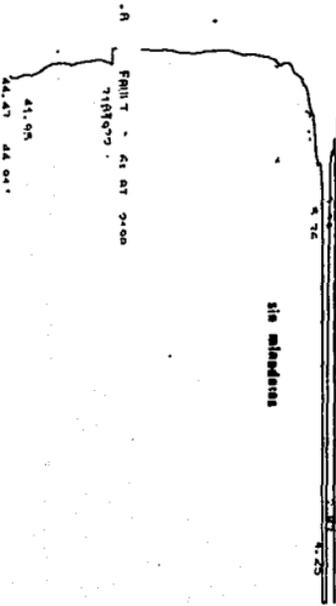
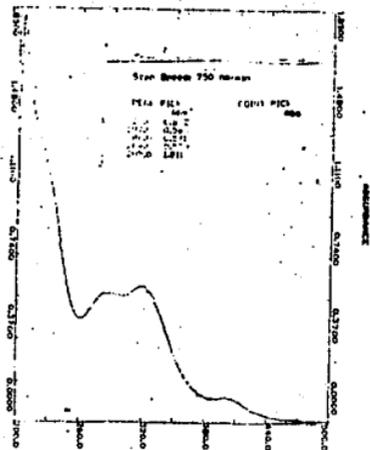


Figura 4 Cronología de las excavaciones arqueológicas en las partes adyacentes de la planicie con el número y las medidas de las medidas en diferentes momentos de tiempo.

con minadores



sin minadores

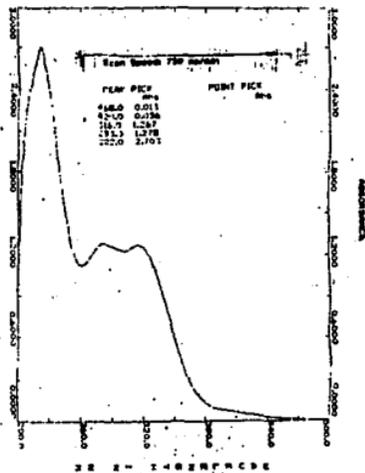


Figura 1 Espectro UV-visible del extracto MACH de R. pinguis con minadores y sin minadores.

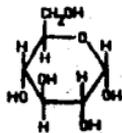
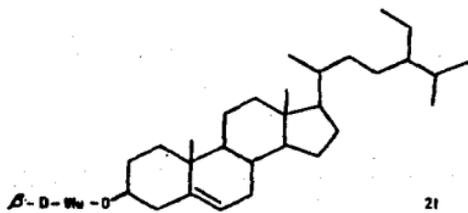
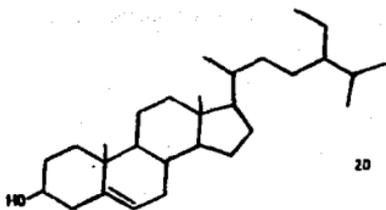
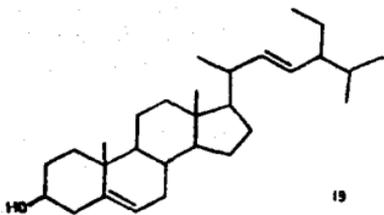


Figura 2. Estructuras de los compuestos aislados del extracto metanólico de las partes aéreas de *B. pinguin*.

Cuadro 6. Rendimiento de los compuestos aislados del extracto metanólico de las partes aéreas de *Bromelia pinguin*.

Nombre	Cantidad Obtenida (g)	‡ en relación a planta seca.
(19) Estigmasterol	3.8252	0.0987
(20) β -D-sitosterol	0.7110	0.0174
(21) β -D-glucositolsterol	0.130	0.0031
(22) glucosa	1.0310	0.0252

En relación con los ensayos biológicos, se determinó el potencial antimicrobiano del extracto total; se emplearon bacterias gram positivas, gram negativas y una levadura. Los resultados obtenidos se indican en el Cuadro 7.

Finalmente, los extractos con y sin minadores, fueron evaluados como posibles agentes alelopáticos y antifúngicos. En el primer caso, se evaluaron sobre las especies *Amaranthus hypocondriacus* y *Echinochloa crusgalli*, en tanto que en el segundo caso las especies objeto de estudio fueron *Fusarium*, *Alternaria* y *Pythium*. Los resultados obtenidos de estos bioensayos se resumen en las gráficas 1-6.

El análisis de las evidencias que permiten la identificación de los compuestos aislados será el objetivo funda-

mental de la presente sección

Cuadro 7 Potencial antimicrobiano del extracto total.

Diámetro de los halos de inhibición (mm)	Estreptomicina 100µg	Nistatina 100µg	Exto. Total 100µg	Exto total 50µg
<i>S. subtilis</i>	8	-	-	-
<i>S. aureus</i>	11	-	-	-
<i>E. coli</i>	9	-	-	-
<i>P. auriginosa</i>	7	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	9	-	-

4.1. Identificación de los compuestos aislados.

4.1.1. Identificación del estigmasterol (19)

El compuesto obtenido de la fracción 68-90 de la columna I (ver cuadro 3), se aisló como un sólido blanco con p.f 122-125 °C el cual se identificó como estigmasterol (19) mediante la comparación por cromatografía en capa fina con una muestra auténtica, así como de sus constantes físicas y espectroscópicas las cuales se resumen en el Cuadro 8.

4.1.2. Identificación del β -sitosterol (20)

De la fracción 157-167 de la columna I (ver cuadro 3)

se obtuvo un sólido amorfo blanco con p.f 134-137 °C el cual se identificó como β -sitosterol (20) mediante la comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con el de una muestra auténtica.

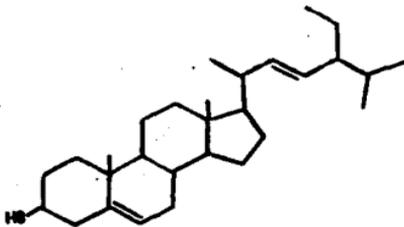
4.1.2. Identificación del β -D-glucositolsterol (21)

El β -D-glucositolsterol (21) fué aislado de la fracción 157-167 de la columna I (ver cuadro 3) y se identificó como tal, mediante la comparación por cromatografía en capa fina con una muestra auténtica.

4.1.4. Identificación de la β -D-glucopiranososa (22)

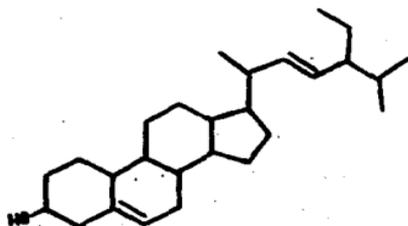
De las fracciones más polares obtenidas de la columna I (fracciones 203-206, ver cuadro 3) se obtuvo un sólido cristalino con p.f 177-179 °C, ópticamente activo, el cual debido a su alta solubilidad en agua, así como de el resultado positivo para la prueba de Molisch permitió inferir la naturaleza sacárida del compuesto, el cual al ser comparado con patrones de referencia por medio de cromatografía en capa fina, y un espectro IR comparativo con una muestra auténtica, se identificó como β -D-glucopiranososa (22). En el Cuadro 9 se resumen sus constantes físicas y espectroscópicas empleadas para su caracterización..

Cuadro 8. Constantes físicas y espectroscópicas del
Estigmasterol. (19)



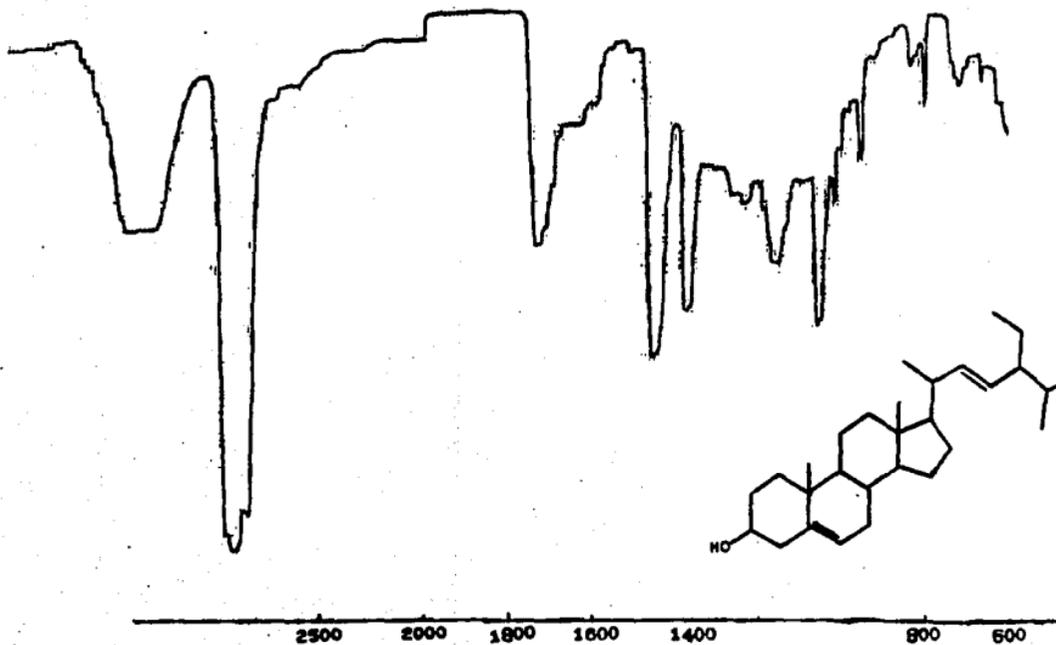
Fórmula molecular	C ₂₉ H ₄₈ O		
Punto de fusión	122-125 °C		
IR (KBr) cm ⁻¹ (Espectro 1)	3350, 2900, 2840, 1730, 1460, 1370 1160, 1060, 950.		
RMN ¹³ C ppm (CDCl ₃ -300 MHz) (Espectro 2)	140.9(+)	138.2(-)	129.2(-)
	121.6(-)	71.70(-)	56.80(-)
	56.0(-)	50.1(-)	45.8(-)
	42.2(+)	39.7(+)	37.2(+)
	36.1(-)	33.9(-)	31.9(+)

Cuadro 8 Constantes físicas y espectroscópicas del estigmasterol (19) (continuación)

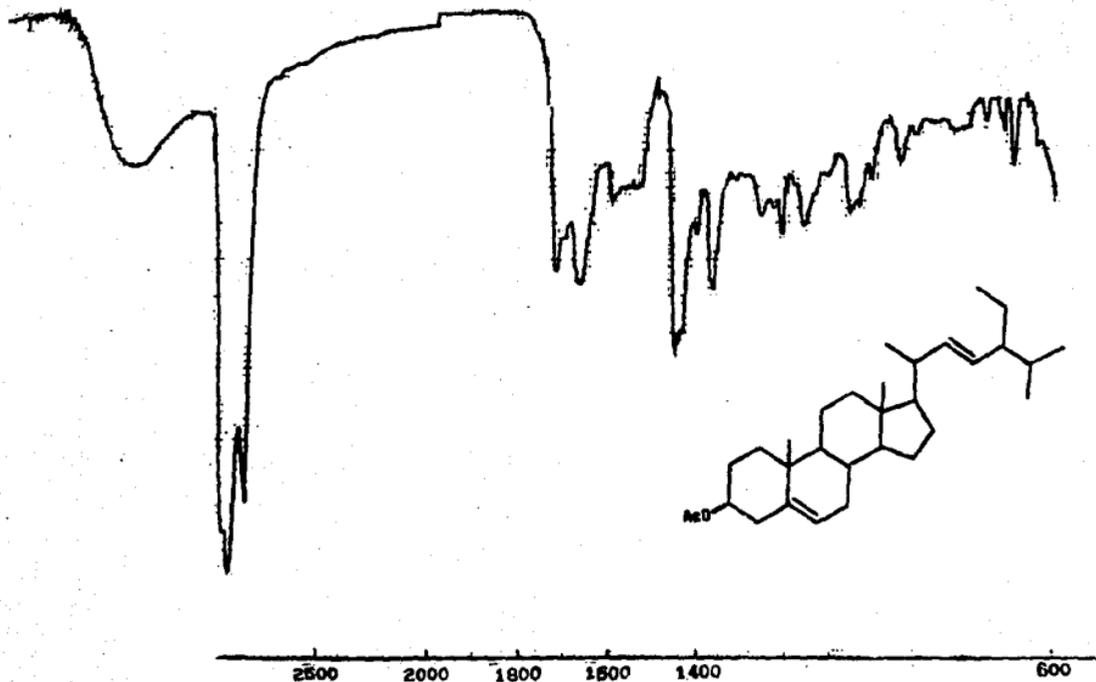


^{13}C ppm (CDCl₃, 300 MHz) (Espectro 2)	31.6(+)	29.7(+)	29.1(+)
	28.2(-)	26.0(+)	24.3(+)
	23.0(+)	21.0(+)	19.8(-)
	19.4(-)	19.0(-)	18.7(-)
	12.0(-)	11.8(-)	
PMR ppm (CDCl₃, 300 MHz) (Espectro 3)	5.36(m, 3H), 3.5(m, H-3)		
	1.4-2.4(m), 0.6-1.3(CH ₃)		

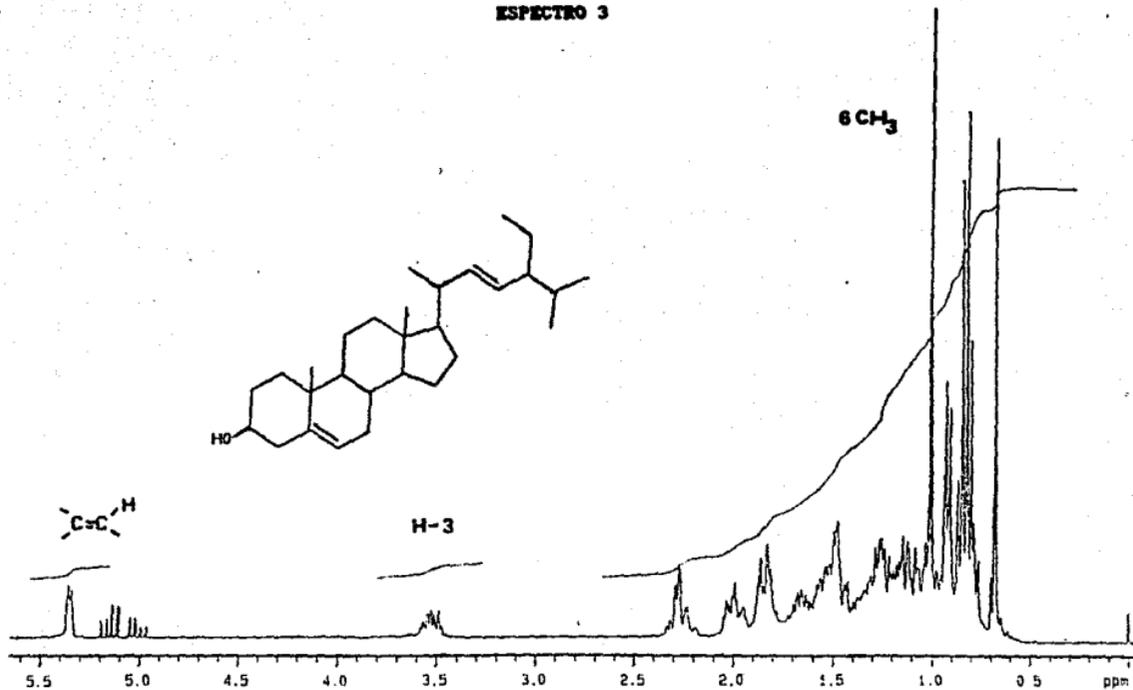
ESPECTRO 1



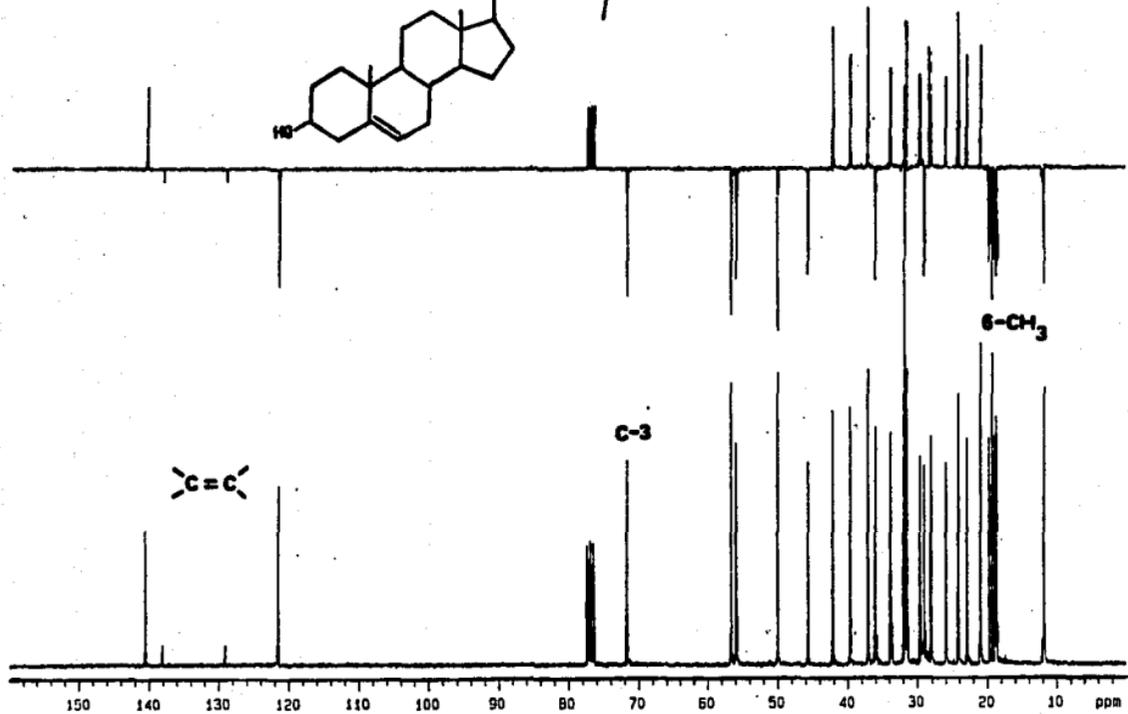
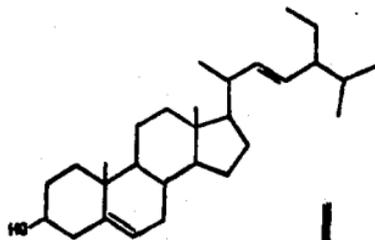
ESPECTRO 2



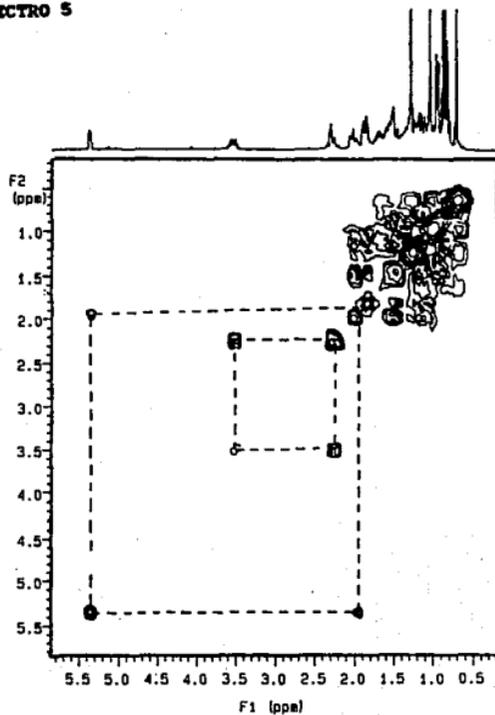
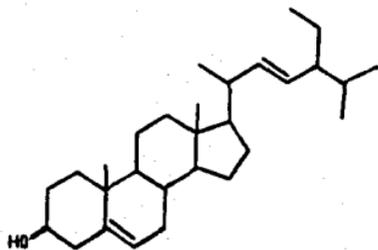
ESPECTRO 3



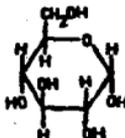
ESPECTRO 4



ESPECTRO 5

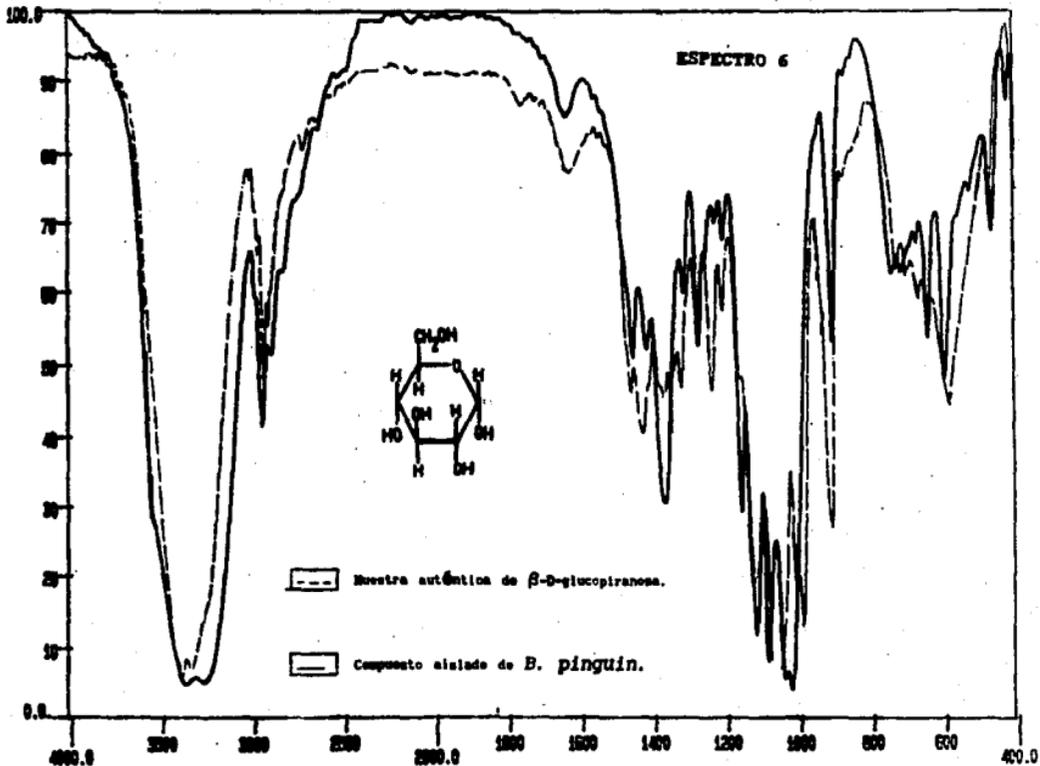


Cuadro 8 Constantes físicas y espectroscópicas de la
 β -D-glucopiranososa (22)



Punto de fusión	177-179 °C
$[\alpha]_D$ [H ₂ O, 1 mg/ml]	+36°
IR (KBr cm ⁻¹) (Espectro 5)	3250,2920,1440,1360,1270, 1150,1110,1080,1020,900.

RT



4.2 Evaluaciones biológicas.

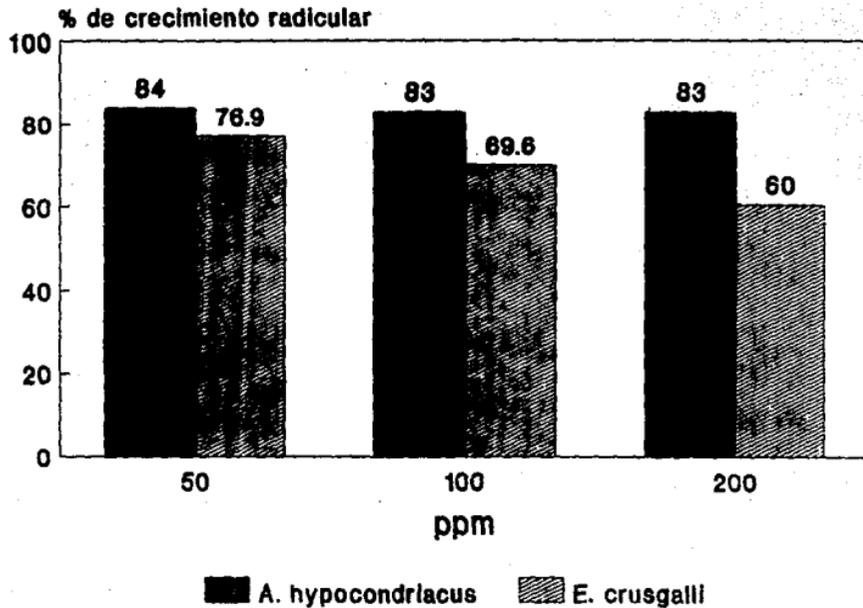
Con relación a los ensayos biológicos, se evaluó el potencial antimicrobiano del extracto total de las partes aéreas con y sin minadores de *Bromelia pinguin*, contra bacterias gram positivas, gram negativas y una levadura. en todos los casos, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios. (Ver Cuadro 6).

Por otro, lado los extractos con y sin minadores fueron evaluados individualmente como posibles agentes alelopáticos sobre las especies *Amaranthus hypocondriacus* y *Echinochloa crusgalli*. Los resultados indicados en las gráficas 1 y 2, evidencian en el caso del extracto sin minadores una inhibición selectiva y significativa a 200 ppm en el crecimiento radicular de *A. hypocondriacus*, en tanto que sobre *E. crusgalli*, la inhibición fué poco significativa.

Por lo que respecta al extracto con minadores, este mostró un efecto selectivo e inhibitorio, acentuado sobre *E. crusgalli*, principalmente a 200 ppm (40%).

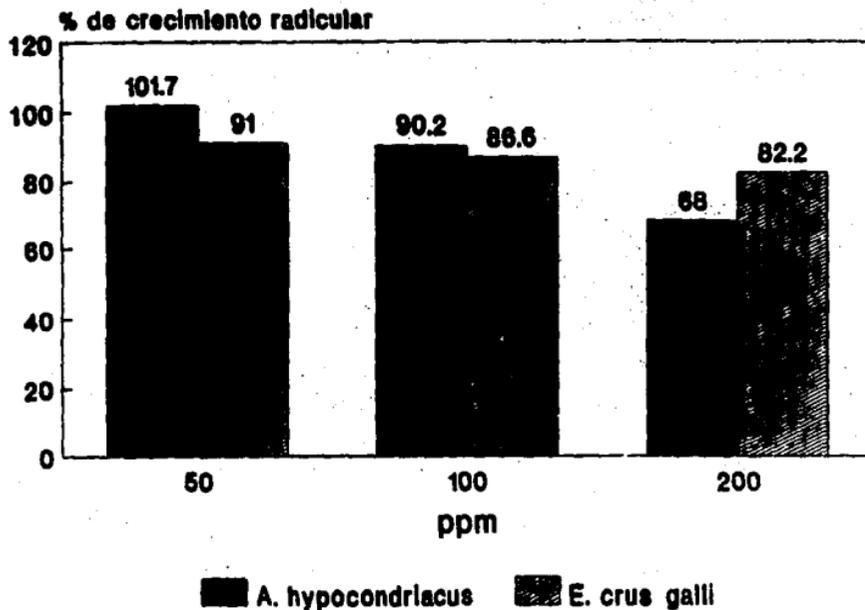
Finalmente los resultados obtenidos de los ensayos contra hongos fitopatógenos (*Fusarium*, *Alternaria* y *Pythium*) de ambos extractos, fueron poco alentadores ya que en la mayoría de los casos se observó una estimulaciónn significativa del crecimiento radial.

EFFECTO DEL EXTRACTO MEQH DE *B. pinguis* CON
MINADORES SOBRE EL CRECIMIENTO RADICULAR
DE *A. hypocondriacus* Y *E. crusgalli*.



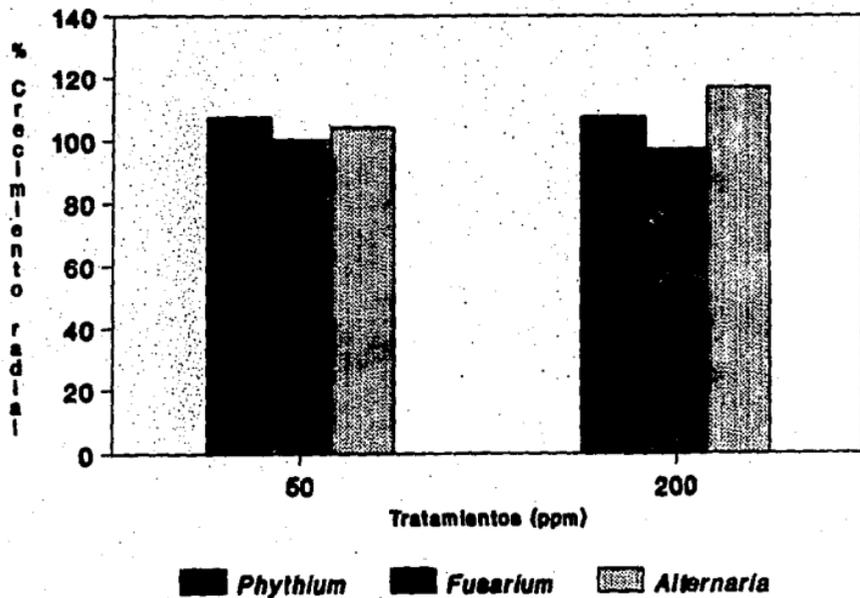
GRAFICA 1

EFECTO DEL EXTRACTO MASH DE B. pinguin SIN
MINADORES SOBRE EL CRECIMIENTO RADICULAR
DE *A. hypocondriacus* Y *E. crus galli*.

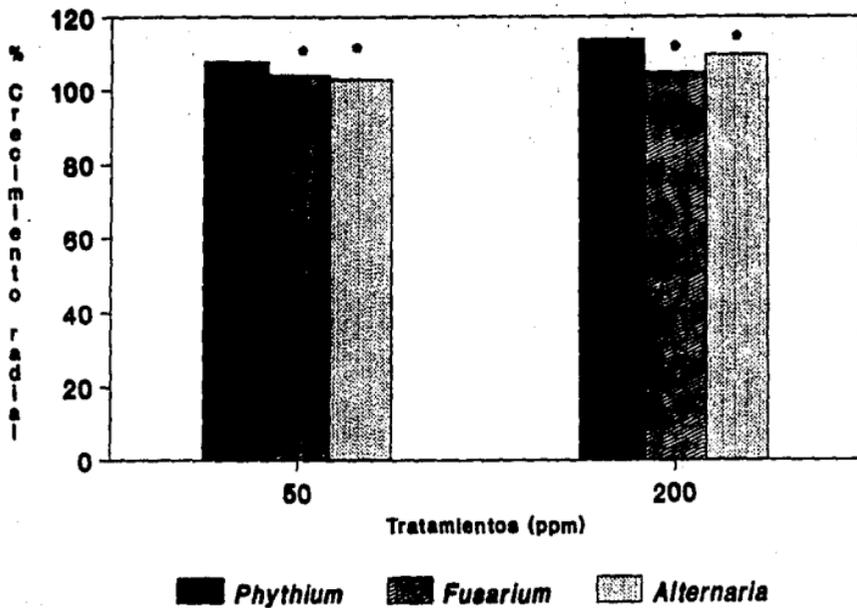


GRAFICA 2

EFEECTO DEL EXTRACTO MUSH DE B. pinguin CON
MINIHOJAS SOBRE EL CRECIMIENTO RADIAL DE
HONGOS FITOPATOGENOS (48 HRS)



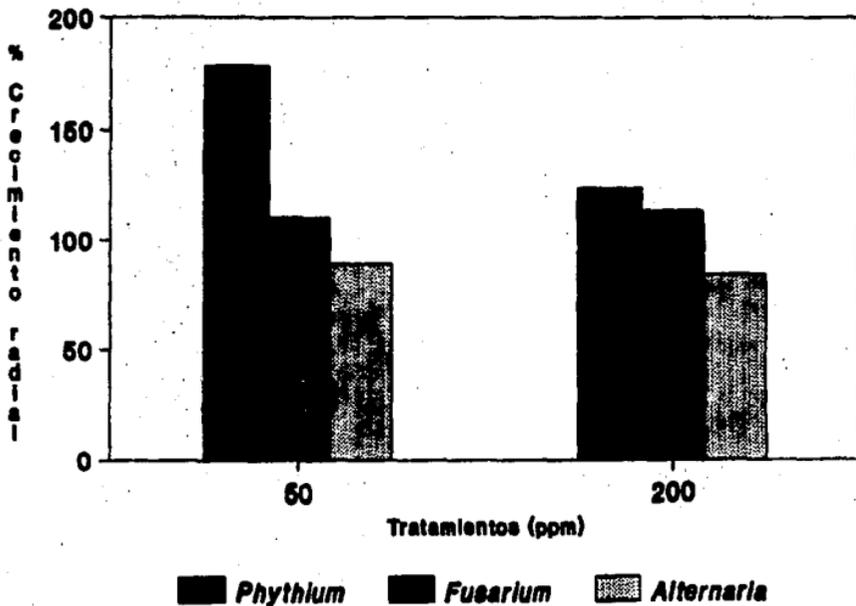
GRAFICA 3



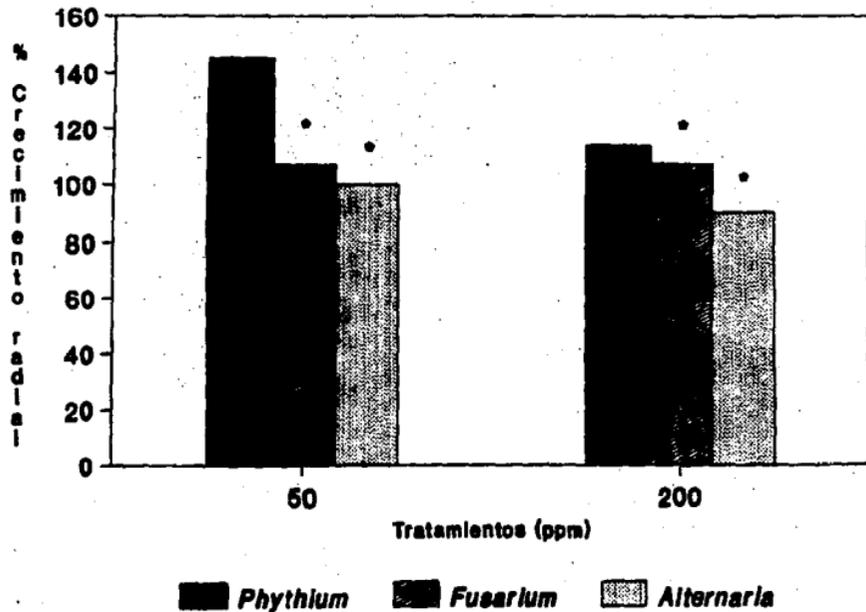
EFECTO DEL EXTRACTO MCHH DE *B. pinguis* CON
 MIZANOSOS SOBRE EL CRECIMIENTO RADIAL DE
 HONGOS FITOPATOGENOS (72 Y 172 HRS)

GRAFICA 4

EFFECTO DEL EXTRACTO MACHO DE *B. pinguin* SIN NITRÓGENO SOBRE EL CRECIMIENTO RADIAL DE HONGOS FITOPATÓGENOS (48 HRS)



GRAFICA 5



EFECTO DEL EXTRACTO MASH DE *B. pinguin* SIM
 MINADORES SOBRE EL CRECIMIENTO RADIAL DE
 HONGOS FITOPATOGENOS (72 Y 192 HRS)

• 192 hrs

GRAFICA 6

V. CONCLUSIONES.

- 5.1 El análisis cromatográfico comparativo de los extractos obtenidos de las partes aéreas de la *Bromelia pinguin* con minadores y sin minadores permitió establecer que aparentemente no existe diferencia significativa entre ambos, en cuanto a su contenido metabólico.
- 5.2 El estudio fitoquímico convencional de las partes aéreas de *Bromelia pinguin* permitió el aislamiento y caracterización del estigmasterol, el β -D-sitosterol, el β -D-glucositosterol y la β -D-glucopiranososa.
- 5.3 El extracto metanólico y las fracciones obtenidas de las partes aéreas de *Bromelia pinguin* no presentaron toxicidad para *Artemia salina* (L.C.₅₀ > 1000 ppm).
- 5.4 Los extractos metanólicos con y sin minadores de las partes aéreas fueron evaluados como posibles agentes antimicrobianos. El efecto se determinó sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas y una levadura. En ningún caso se obtuvieron resultados halagadores.
- 5.5 El extracto metanólico sin minadores mostró un efecto selectivo inhibitorio sobre el crecimiento radicular

de *A. hypocondriacus*, en tanto que para el extracto metanólico con minadores se obtuvo un acentuado efecto inhibitorio y selectivo sobre *E. crugalli*.

- 5.6 Los extractos metanólicos con y sin minadores mostraron estimulación significativa en el crecimiento radial de los hongos fitopatógenos objeto de estudio.
- 5.7 En esta investigación no se encontraron ninguno de los constituyentes descritos previamente en la literatura como constituyentes de las raíces y tallos de *Bromelia pinguin*, lo cual puede ser atribuido a variaciones ontogénicas.
- 5.8 La presencia de esteroides en esta planta podría estar correlacionada con el uso tradicional de la misma como agente hipocolesterolemiante.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Anaya, A; Calera M; Mata, R; Pereda- Miranda, R; J.

Chem. Ecology, 16 (9) 2145, (1990)

- Bahena, Alma. Estudio fitoquímico de la corteza y
semillas de *Celaenodendron mexicanum* Standl
(*Euphorbiaceae*), Tesis profesional, UNAM (1992)

- Barley; *Diagnostic Microbiology*, C.V. Mosby Company
175-200 (1974)

- Castañeda, P; García, M.R , Hernández, B.E ; Torres,
B,A; Anaya, A.L; Mata, R; J. Chem. Ecol, 18 (7) 1025,
1992.

- Cruz, M. del Carmen; Mendoza, Sandra. Estudio químico
preliminar de *Guazuma ulmifolia* (*Stercu-
liaceae*) y Constituyentes adicionales de *Hintonia
latiflora* (*Rubiaceae*), Tesis profesional UNAM 1991.

- Chávez, Daniel; Estudio químico de *Equisetum
myriochaetum*. Tesis Profesional, UNAM (1991)

- Farkas, L., *Journal of Ethnopharmacology*, 2, 145 (1988)

- Farnsworth, N. y Bingel, S.; *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity*, Springer Verlag, New York, Berlin, 1977, pp 1.

- Farnsworth, N.; *Journal of Ethnopharmacology*, 2, 173 (1980)

- Martínez, M.; *Catálogo de nombres vulgares y científico de plantas mexicanas*. Fondo de Cultura Económica. (1989).

- Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; J.E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E.; McLaughlin, J.L.; *Planta Medica*. 45, 31 (1982)

- Mitscher, L.A.; Leu, R-P.; Bathala, M.S.; Wu, W-N.; Beal, J.L; *Lloydia* 35, 157-166 (1972).

- Mitscher, L.A.; Drake, S.; Gollapudi, S.R.; Okwute, S.K.; *J. Nat. Prod.* 50, 1025-1040 (1987).

- Raffauf, F.R. ; Menochery, M.D.; Le Quesne W.P.; *Journal Org Chem.* 46, 1094, (1981).

- Rico, V. Comunicación personal.1992.

- Rojas, A.; Hernández, L.; Pereda, M.R.; Mata, R.;
Journal of Ethnopharmacology, 35, 275, (1992).

- Salemink, C.A.; *J. Ethnopharmacology* 2, 135, (1980).

- Shiner-Fusor-Curtin, *Identificación sistemática de
compuestos orgánicos*, Limusa, México (1980)

- Stahl, E.; *Thin Layer Chromatography*, Academic Press
Inc, New York, 487, (1969)

- Williams, C.; *Phytochemistry*. (1978) vol. 17, p.p
729-734