

19  
2e1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

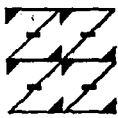
*Aislamiento Y Purificación de 6-epi-desacetil-laurenobiólida Extraída de Montanoa grandiflora y Determinación de su(s) Actividad (es) Biológica (s)*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A

*María del Carmen Gutiérrez Coutiño*

U N A M  
ZARAGOZA



LO HUMANO  
ES  
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.,

OCTUBRE DE 1994

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.



ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS  
PROFESIONALES • ZARAGOZA

DIRECCION

OFICIO NO. 82-010/

C. COORDINADOR DE LA ADMINISTRACION  
ESCOLAR.  
P R E S E N T E .

Comunico a usted que el alumno GUTIERREZ COUTINO MARIA DEL CARMEN,  
con número de cuenta 7951000-4 de la carrera Biólogo,  
se le ha fijado al día \_\_\_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ a las \_\_\_\_\_  
hrs., para presentar examen profesional, que tendrá lugar en esta Escuela,  
con el siguiente jurado:

PRESIDENTE DR. ARCADIO MONTÓY ATA

VOCAL DR. JAVIER TABOADA RAMIREZ

SECRETARIO M. EN C. ENRIQUE MENDIETA MARQUEZ

SUPLENTE O. MIKI OTANI IMURA

SUPLENTE M.C. ARMANDO SAUER RAMIREZ

El título de la tesis que se presenta es: Aislamiento y Purificación de  
6-epidesacetil-laurenobiolida Extraída de Montanoa grandiflora y Determi  
nación de su(s) Actividad(es) Biológica(s).

A T E N T A M E N T E  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
México, D.F., a 27 de septiembre de 19 94.

DR. BENNY WEISS STEIDER  
D I R E C T O R

R E C I B I

OFICINA DE EXAMENES  
PROFESIONALES Y GRADO.

YCR/MLR/mv

**A mis padres:**

**Germán y Eva Lidia  
por su paciencia, aceptación y apoyo.**

**A mis hermanos:**

**Ma. del Rocío, Eva Lidia y Germán  
por su tolerancia.**

**Gracias a todas las personas que contribuyeron en mi formación académica: maestros, compañeros y amigos.**

**Gracias al Maestro Javier Taboada por compartir su conocimiento y experiencia y por haber aceptado dirigir mi trabajo recepcional.**

**Gracias a Enrique, por el apoyo y las aportaciones para la realización de este trabajo.**

Esta tesis se realizó en el Instituto de Química de la UNAM bajo la asesoría del Dr. Carlos Guerrero (Parte Química) y del M.en C. Javier Antonio Taboada Ramírez (Pruebas Biológicas). Con el apoyo del Dr. Fructuoso Ayala Guerrero y su equipo del laboratorio de sueño del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM

Los resultados de este trabajo se han presentado en los siguientes foros:

- Pain International Up Date Mazatlan 93, celebrado los días 25-27 de octubre de 1993 en Mazatlán, Sin.
- Simposio Interno del Instituto de Química, celebrado los días, 26, 27 y 28 de enero de 1994, en el Instituto de Química de la UNAM.
- Reunión de la Sociedad Fitoquímica de América del Norte, celebrada en agosto de 1994 en la Cd. de México

## RESUMEN

Se aisló la lactona sesquiterpénica 6-epi-desacetil-laurenobiólida de *Montanoa grandiflora* Alamán (Compositae) que fue colectada en Huexotla, Edo. de México, estando la planta en floración en noviembre de 1992.

La parte aérea de la planta se extrajo con diclorometano y el producto natural se aisló mediante cromatografía en columna con sílica gel como soporte y con los siguientes sistemas de elución: diclorometano al 100% y 90-10 diclorometano-acetona. Se obtuvo el producto natural por cristalización de las fracciones polares.

La lactona sesquiterpénica 6-epi-desacetil-laurenobiólida presentó propiedades antibióticas sobre *Escherichia coli* y *Staphilococcus aureus*. Retardó la germinación de semillas de lechuga a una concentración de 200 ppm. También mostró actividad moluscicida en el género *Physella sp* así como actividad citotóxica sobre *Artemia salina*. Se determinó la toxicidad aguda preliminar en ratón, así como su efecto sobre el ciclo vigilia-sueño en rata, en esta última prueba los resultados obtenidos motivaron la realización de otros registros concluyéndose que se podría proponer como un modelo de dolor crónico para la evaluación de analgésicos.

## INDICE

<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>GENERALIDADES</b>	<b>4</b>
Familia Compositae (Asteraceae)	4
Género <i>Montanoa</i>	4
<i>Montanoa grandiflora</i>	5
Terpenos	7
<b>JUSTIFICACION</b>	<b>10</b>
<b>HIPOTESIS</b>	<b>11</b>
<b>OBJETIVO</b>	<b>11</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>12</b>
Parte Química	12
Pruebas de Actividad Biológica	14
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>21</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>34</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>35</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>36</b>



## INTRODUCCION

El hombre, desde su origen ha hecho uso de las plantas con fines alimenticios, medicinales y artesanales; los vegetales poseen un gran número de constituyentes, algunos farmacológicamente efectivos o principios activos, y otros inactivos. En la antigüedad se conocían las propiedades tóxicas y medicinales de una gran cantidad de plantas silvestres y cultivadas, sin embargo, no se conocían sus principios activos. En realidad, el conocimiento de principios activos es reciente, pues a pesar de que el alcohol, el ácido acético y el azúcar se conocen desde la más remota antigüedad no se tenía idea de su naturaleza química (1, 2).

En la actualidad con la aplicación de métodos modernos se ha logrado aislar y determinar la estructura química de los principios activos de muchas de las plantas usadas desde la antigüedad para los diversos fines.

Los procesos metabólicos de los diferentes organismos son variados y complejos; sin embargo, hay muchos productos finales o intermediarios del metabolismo que son compuestos orgánicos fácilmente aislables. Todos estos compuestos se agrupan bajo el encabezado general de productos naturales. Existen muchas clases diferentes de productos de origen natural, varios de ellos, tales como las grasas, los carbohidratos, las proteínas y los ácidos nucleicos, junto con una cantidad relativamente pequeña de sustancias relacionadas, están presentes en casi todos los organismos y se denominan metabolitos primarios. Existe una segunda clase de productos naturales conocidos como metabolitos secundarios; no se trata de que sean de importancia secundaria en el organismo, sino que su distribución dentro de la naturaleza tiende a ser más dependiente de las especies (3).

Cada día se incrementa el número de nuevos productos naturales, a los cuales se les elucida su estructura química y se les asigna un nombre; sin embargo, en muchos casos, la única información que se posee para esos productos naturales es su composición química, de ahí el interés de realizar estudios sobre su actividad biológica (capacidad de modificar las funciones del organismo), a partir de pruebas biológicas, sencillas, económicas y

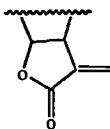
rápidas, obteniendo resultados que proporcionan información preliminar, la cual sirve de base para dirigir trabajos posteriores más detallados dentro de las diferentes áreas de investigación, logrando de este modo un adecuado aprovechamiento de los recursos económicos y científicos.

En el caso de las lactonas sesquiterpénicas, el interés por su estudio en México se originó a principios de la década de los años 60; una de las primeras investigaciones fue motivada por conocer el principio activo de la rosilla o chapuz (*Helenium mexicanum*) que le proporciona sus propiedades características como ser amarga, estomacatoria e insecticida (1,4).

En una revisión de lactonas sesquiterpénicas se menciona que la tasa más alta de reportes de nuevos compuestos ocurrió durante 1984 y 1985 y durante 1986 y 1987 la tasa bajó, probablemente porque la atención cambió hacia el descubrimiento de un extenso campo de compuestos biológicamente activos, así como al estudio de su uso farmacéutico y funciones ecológicas (5).

Algunas lactonas sesquiterpénicas tienen propiedades como citotoxicidad, bactericida o provocar dermatitis, las cuales son debidas a la presencia de un grupo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona en su estructura (6-11) (figura 1).

**FIGURA 1**  
 **$\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona**



A pesar de la relación estructura-actividad mencionada para varios compuestos químicos, en las lactonas sesquiterpénicas no es muy clara esa relación, ya que compuestos cercanamente relacionados en estructura con frecuencia difieren en su actividad (2, 5). Algunos estudios sugieren que

además de la estructura  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona, otros factores son importantes para la citotoxicidad y la actividad bactericida, por ejemplo, en un estudio de la relación estructura-actividad antimicrobial entre las lactonas sesquiterpénicas y compuestos relacionados se observó que la estructura química requerida para dar mayor actividad es una ciclopentanona  $\beta$  sin sustituir.(12).

El primer reporte de aislamiento de la lactona sesquiterpénica 6-epi-desacetil-laurenobiólida fue en 1984, a partir de hojas secas de *Montanoa grandiflora* colectada en la ciudad de México en junio de 1982 (13). En 1985 se reporta otro estudio fitoquímico de *Montanoa grandiflora* (14).

No se encontraron antecedentes o referencias acerca de alguna prueba biológica realizada con 6-epi-desacetil-laurenobiólida, siendo esto uno de los motivos para la realización de este trabajo, así como un aporte al estudio sistemático del género *Montanoa*, el cual se ha venido realizando desde 1970 en el Instituto de Química de la UNAM.

De las 30 especies que constituyen el género *Montanoa*, 18 de ellas han sido objeto de estudio fitoquímico y sólo a 7 se les ha realizado pruebas de actividad biológica. A este género pertenece el "cihuapatli" o "medicina de mujer", conocida y usada desde la época prehispánica para corregir irregularidades del ciclo menstrual, producir aborto o facilitar el parto (15).

Los estudios sobre actividad biológica que se han llevado a cabo, han sido principalmente, en relación con efectos uteroconstrictores; se reportan 6 especies de *Montanoa* capaces de inducir estos efectos si se administran en forma de extractos acuosos de sus hojas, pero la intensidad de los efectos depende del grado de crecimiento del vegetal, del suelo donde crece y de la época en que se cosecha (16).

Otra actividad biológica que se reporta es el efecto antialimentario en larvas de *Spodoptera frugiperda* (gusano cogoyero de maíz) de macerados o infusiones de *Montanoa grandiflora* (17).

## GENERALIDADES.

### Familia Compositae (Asteraceae).

El nombre de la familia se deriva de las cabezuelas compactas que semejan flores individuales. Así pues, lo que parece como una sola flor, es, en realidad, una flor "compuesta". Su distribución es mundial, siendo más abundantes en las regiones templadas y templado-cálidas. La mayoría de las especies de las regiones templadas son herbáceas, pero muchas de aquéllas de las regiones templado-cálidas y tropicales son arbustos y unas cuantas son árboles (18). Es una familia de cerca de 1,100 géneros y 20,000 especies, que se divide por lo general en 13 tribus y constituye la familia más numerosa de las angiospermas (6, 15).

En relación con el número de integrantes que tienen, las Compositae son fuente de relativamente pocos productos de importancia económica y médica (19). Sin embargo, como resultado de una investigación sistemática, quimiotaxonómica y farmacéutica se ha renovado la importancia de esta familia en las aplicaciones biológicas y terapéuticas (7).

### Género *Montanoa* Cervantes.

El género está constituido por 30 especies, en su gran mayoría mexicanas, que se extiende en América Latina y varias especies son cultivadas en partes cálidas del mundo. Todos los miembros pertenecientes a este género son leñosos, la mayoría son arbustos; sin embargo, la variación del tamaño dentro del género va desde las enredaderas (4 especies) a árboles de 20 metros de alto (5 especies) (20).

Algunas especies son objeto de cultivo como ornamentales; en el Valle de México se ven en esta calidad con cierta frecuencia *M. grandiflora* Alamán y *M. speciosa* A. P. de Candolle (15).

***Montanoa grandiflora* Alamán.**

Arbustos 1-4 m de alto, hojas variables, ovalado-lanceoladas a pentagonales de 5 - 23 cm de largo, 2.5 - 2.7 cm ancho, margen serrado a dentado irregular, algunas veces 3 - 5 lóbulos, superficie adaxial moderadamente pubescente; pecíolos de 2.5 - 12.5 cm de largo, en general alados; cabezuelas de 1.5 - 2 cm de diámetro en flor, 3 - 4 cm de diámetro en fruto. 10 - 12 flores radiales, corolas blancas; 65 - 95 flores del disco, corolas amarillas. En la foto 1 se presenta un ejemplar de esta especie

Periodo de floración y fructificación: Octubre - Noviembre.

Distribución y habitat: Sierra Madre del Sur en Michoacán, Guanajuato y México (figura 2); en encinares y pinares, sobre laderas de sierras templadas y algo secas, entre 750 - 2,500 m de altitud, pero generalmente sobre 2,000 m; de clima templado-húmedo.(20).

Nombres Populares que recibe *Montanoa grandiflora* (21):

Achual (Jamiltepec, Oax.)

Paracua (Pátzcuaro, Mich.)

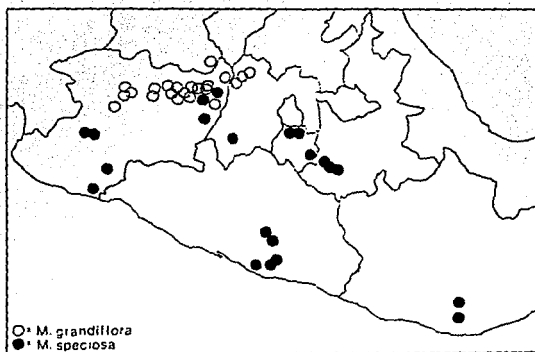
Rosa Blanca (Tierra Colorada, Gro.)

Vara Blanca (Tierra Colorada, Gro.)

Tacote (Sinaloa)

Margarita Cimarrona (Huexotla, Edo. de México. Información oral)

FIGURA 2



Mapa del sur de México mostrando la distribución de *M. grandiflora* y *M. speciosa*.

FOTO 1  
PLANTA Y CABEZUELAS DE *Montanoa grandiflora*



## Terpenos

Los terpenos constituyen una clase de compuestos orgánicos siendo los componentes más abundantes de los aceites esenciales de numerosas plantas. Los terpenos se pueden disectar en "unidades de isopreno" (2-metil-1,3-butadieno) (figura 3). Se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que contenga su molécula (3), conforme a lo señalado en la tabla 1.

FIGURA 3  
ISOPRENO

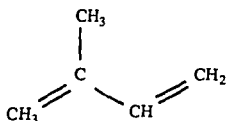


TABLA 1  
CLASIFICACION DE TERPENOS

	<u>Unidades de Isopreno</u>	<u>Número de Carbonos</u>
Monoterpenos	2	10
Sesquiterpenos	3	15
Diterpenos	4	20
Sesterpenos	5	25
Triterpenos	6	30
Politerpenos	n	n

El sesquiterpeno más sencillo y al que se considera precursor de los demás sesquiterpenos es el farnesol, sustancia de olor agradable que se encuentra en pequeñas cantidades en numerosas plantas.

Como se mencionó anteriormente, la distribución de los metabolitos secundarios en la naturaleza tiende a ser más dependiente de las especies, por lo que se usan como ayuda para la clasificación de plantas (quimiotaxonomía).

Entre los metabolitos secundarios más útiles para clasificar plantas de la familia Compositae, se tiene a los sesquiterpenos y en especial a las lactonas sesquiterpénicas, ya que algunos son característicos de tribus, de géneros y en ocasiones son típicos de especies. Desde el punto de vista de la quimiotaxonomía, mientras más pasos biogénéticos requiere una molécula para su formación, es más valiosa (4, 19).

Las lactonas sesquiterpénicas forman uno de los grupos más grandes de compuestos naturales de plantas; hasta la fecha se conocen cerca de 3,200 estructuras de lactonas sesquiterpénicas elucidadas (5). Éstas han sido aisladas de hongos, hepáticas y de varias familias de las angiospermas. Sin embargo la mayoría de los compuestos fueron aislados de las partes aéreas de la familia Compositae (22-24).

Las lactonas sesquiterpénicas han atraído considerable atención debido a la presencia de varias actividades biológicas, tales como actividad antitumoral, citotóxica, antihelmíntica, bactericida, así como su actividad reguladora del crecimiento vegetal, entre otras más (9).

Una sola lactona sesquiterpénica puede tener varias actividades biológicas, como la heliangina, que además de inhibir el crecimiento de las plantas posee la propiedad de favorecer la formación de raíces adventicias en cortes de frijol (25).

Desde principios de siglo algunos científicos notaron que las plantas compiten entre sí por el territorio, por la luz y por el agua. Las armas usadas por ellas son sustancias químicas que dañan al competidor que casi siempre es otra planta, pero que también pueden ser bacterias o insectos (26).



**El fenómeno por el cual una planta domina porque libera sustancias químicas que inhiben la germinación o el crecimiento de otras especies se conoce como alelopatía y se sabe que la interacción química entre plantas superiores tiene numerosos efectos y un papel importante en la composición de las comunidades (4).**

**Una de las interpretaciones dadas a la existencia o función de las lactonas sesquiterpénicas en las plantas es su posible papel ecológico como el que se menciona en líneas anteriores.**

## JUSTIFICACION.

La búsqueda para actividades específicas de sustancias frecuentemente pasan por alto otras actividades útiles, las cuales no son detectadas o son ignoradas, en el proceso de selección. Hay una necesidad real en el desarrollo de bioensayos generales, los cuales pueden detectar un amplio espectro de actividades farmacológicas en productos naturales.

El objetivo del presente trabajo es realizar un cernido de actividades biológicas a la lactona sesquiterpénica 6-epi-desacetil-laurenobiólida, y posteriormente seleccionar aquellas en las cuales presente resultados interesantes para beneficio del hombre. Las actividades que se investigan son: antibiótica, antimicótica, moluscicida, antialimentaria, analgésica, antiespasmódica y anticonvulsivante; se observa el efecto que tiene sobre la germinación y sobre el ciclo vigilia-sueño en rata. Además se determina la toxicidad sobre *Artemia salina* y la toxicidad aguda preliminar en ratón, como medio de seguridad de los efectos tóxicos que pudiera tener el compuesto.

## HIPOTESIS

Las lactonas sesquiterpénicas han demostrado tener diversas actividades biológicas por lo que es probable que la 6-epi-desacetil-laurenobiólida tendrá alguna actividad biológica, especialmente la citotóxica conferida por la presencia de un grupo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona, el cual se encuentra presente en otras lactonas sesquiterpénicas con esta propiedad.

## OBJETIVOS

### General:

- Evaluar la actividad biológica de la lactona sesquiterpénica 6-epi-desacetil-laurenobiólida de *M. grandiflora* en los siguientes bioensayos:

Efecto sobre Germinación.  
Actividad Antibiótica.  
Actividad Antimicótica.  
Toxicidad sobre *Artemia salina*.  
Actividad Moluscicida.  
Actividad Antialimentaria.  
Toxicidad Aguda Preliminar en Ratón.  
Actividad Analgésica.  
Actividad Antiespasmódica.  
Efecto sobre el Ciclo Vigilia-Sueño.  
Actividad Anticonvulsivante.

### Específicos:

- Aíslar y purificar la lactona sesquiterpénica 6-epi-desacetil-laurenobiólida de *Montanoa grandiflora*.
- Determinar su punto de fusión y estructura química.
- Determinar las posibles actividades biológicas de la lactona sesquiterpénica 6-epi-desacetil-laurenobiólida, a fin de incrementar el acervo del conocimiento del género *Montanoa* y encontrar posibles aplicaciones en beneficio del hombre.

## METODOLOGIA

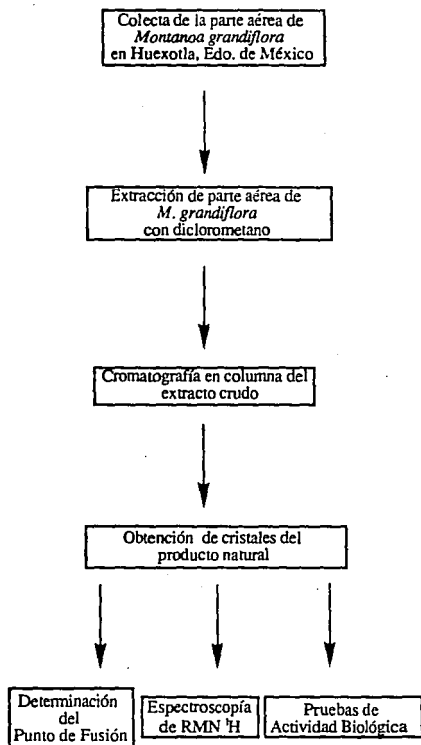
### Parte Química

Se colectó la parte aérea de *Montanoa grandiflora*, el 20 de noviembre de 1992, en Huexotla, Edo. de México. Se puso a secar obteniéndose 861.2 g de material seco, el cual se sometió a proceso de extracción con diclorometano por 3 días; durante ese lapso al extracto se le realizó destilación simple cada 24 horas. Finalmente se concentró a presión reducida en un rotavapor. El extracto concentrado se pesó (50.5 g) y se sometió a cromatografía de adsorción en columna con sílica gel, malla 35-70 (1 kg), como soporte y el sistema de elución inicial fue 100% diclorometano, aumentando la polaridad posteriormente, mediante mezclas de diclorometano-acetona, 90:10 y 80:20.

Durante la cromatografía en columna se extrajeron fracciones de 150 ml, las cuales se concentraron a presión reducida en un rotavapor y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 25 ml de capacidad, numerados de acuerdo a la fracción extraída que le correspondía. A cada fracción se le realizó cromatografía en placa fina con 100% diclorometano como eluyente, y solución de sulfato cérico ( $\text{CeSO}_4$ ) al 5%, como revelador, para detectar en cuáles fracciones se encontraba el producto de interés; hecho lo anterior, se evaporó el disolvente que contenían las fracciones de interés y se indujo la cristalización con éter isopropílico.

Los cristales se filtraron, después se disolvieron con acetona, se concentró el disolvente y se recrystalizaron. Obtenidos los cristales nuevamente, se determinó su punto de fusión; se les realizó cromatografía en placa fina, así como a una muestra de cristales anteriormente caracterizados como 6-epi-desacetil-laurenobiólida por el Dr. Quijano del Instituto de Química de la UNAM con diclorometano 100% como eluyente, para probar que se trataba del mismo producto. Se envió una muestra a espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno para corroborar su estructura química. En el diagrama 1 se esquematiza la metodología que se realizó.

# DIAGRAMA 1 METODOLOGIA



## Pruebas de Actividad Biológica

### Efecto sobre la Germinación

El método que se usó fue el que llevó a cabo C. Guerrero *et al* (27). Se prepararon soluciones del producto natural a las siguientes concentraciones: 200 ppm, 100 ppm, 50 ppm y 25 ppm, con agua corriente; el testigo fue sólo agua corriente. En cada una de las soluciones y el testigo se colocaron 25 semillas de lechuga durante 2 horas.

Se prepararon 5 cajas de Petri, una para cada uno de los tratamientos realizados, se colocaron discos de papel filtro Whatman No. 1 de tal forma que cubriera la superficie del fondo de la caja de Petri, sobre éste se pusieron 25 semillas y 5 ml de la solución en la cual estuvieron sumergidas.

El número de semillas germinadas se registró cada 24 horas durante tres días.

### Antibiótica

El procedimiento empleado fue el método del disco, en el cual se determina la zona clara de inhibición del crecimiento microbiano (halo de inhibición) (28). Se preparó medio para antibiosis No. 1 de Grove y Randall (Bioxon) según las especificaciones del fabricante. Se vertieron aproximadamente 25 ml del medio en cada caja de Petri esterilizada; después que el medio se hubo solidificado, las cajas de Petri se colocaron dentro de una estufa a una temperatura de 37 °C durante 24 horas, para asegurar que el medio no estuviera contaminado.

Se prepararon sensidiscos de la siguiente manera: Se cortó un disco de papel filtro Whatman No. 42 de un diámetro de 6 mm con una perforadora y se colocó en el centro de un vidrio de reloj. Por otro lado, se disolvió en 0.1 ml de acetona la cantidad del producto natural a probar ( $\approx$  10 mg) y con la ayuda de un tubo capilar se puso la solución en el disco de papel, esperando

a que evaporara el disolvente antes de aplicar nuevamente. Los discos testigo contenían únicamente acetona.

Las bacterias que se utilizaron fueron *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Observando las medidas de seguridad indicadas para el manejo de estos organismos, se realizó la siembra de cada una de las cepas en una caja de Petri. Posteriormente con ayuda de una pinza se colocaron tres discos sobre cada una de las siembras (un disco testigo y dos discos con el producto natural), teniendo cuidado de que el lado que contenía la sustancia quedara en contacto con la siembra; posteriormente, se introdujeron en una estufa a temperatura de 37 °C durante 24 horas; transcurrido ese tiempo se observó la aparición del halo de inhibición de crecimiento alrededor de los discos.

### Antimicótica

Se preparó medio Czapek (DIFCO) según instrucciones del fabricante. Los hongos con los cuales se probó el producto natural fueron: *Aspergillus terreus*, *Absidia cilindrospora* y *Trichoderma viride*. En general, la metodología fue igual a la prueba anterior, el número de cajas de Petri fueron dos, una para discos con producto natural (≈ 10 mg) y otra para discos testigo. Al momento de la siembra cada caja de Petri se dividió en tres zonas con un espacio entre ellas, en cada zona se sembró un hongo y se colocó un disco.

### Toxicidad sobre *Artemia salina*

El bioensayo es propuesto por B. N. Meyer *et al* (29), como método preliminar para determinar el potencial citotóxico de extractos de plantas y compuesto químicos. Se preparó solución salina al 3.5% con sal común y agua destilada, la que se vertió dentro de un pequeño estanque oscuro dividido en dos compartimentos, uno de los cuales estaba cubierto y en el cual se colocaron huevos de *Artemia salina*; el estanque se colocó dentro de una estufa con el mínimo movimiento, a una temperatura de 24 °C por un período de 48 horas.

Al término del tiempo de incubación, con el mínimo movimiento posible, el pequeño estanque se puso bajo una fuente luminosa blanca para atraer al compartimiento descubierto las larvas para su posterior manejo.

Se disolvió 6-epi-desacetil-laurenobiólida en solución salina en las siguientes concentraciones: 200 ppm, 100 ppm y 50 ppm. Se utilizaron 3 frascos pequeños por cada concentración a probar del producto natural así como para el testigo que fue únicamente solución salina.

Primero se vertieron en cada uno de los frascos de vidrio 3 ml de solución salina, en seguida se colocaron 10 larvas con la ayuda de una pipeta Pasteur, y finalmente 2 ml de la solución del producto natural a la concentración correspondiente. Los frascos preparados se dejaron bajo la fuente luminosa por un período de 24 horas; en seguida se registraron los organismos vivos para cada una de las concentraciones que se probaron y el testigo.

Para determinar la concentración letal 50 e intervalo de confianza del 95%, los datos fueron analizados con el programa Finney para computadora, el cual está incluido en la metodología propuesta.

### **Moluscicida**

La metodología que se realizó fue la llevada a cabo por Cruz-Reyes, *et al* (30). Se pesó la cantidad de sustancia necesaria para cada una de las siguientes soluciones: 50 ppm, 25 ppm y 5 ppm, para preparar 200 ml de cada una de ellas. La cantidad de cada concentración del producto natural a probar se disolvió antes en 1 ml de acetona, en una sopera pyrex; se cubrió la superficie interior del recipiente con la solución acetónica y después de dejar evaporar el disolvente, se agregaron los 200 ml de agua corriente desclorinada y 10 caracoles (*Physella sp*). A cada sopera se le colocó una cubierta de vidrio para evitar que los caracoles salieran del recipiente.

Se prepararon dos controles, en uno de ellos se utilizó 1 ml de acetona con el cual se cubrió la superficie del recipiente, dejando evaporar antes de



agregar el agua y 10 caracoles con su respectiva cubierta y el otro testigo consistió únicamente de agua con sus respectivos caracoles y cubierta.

Se realizaron 3 observaciones: la primera fue después de una hora, la segunda transcurridas 6 horas y la última a las 24 horas, registrando, en cada una, el número de organismos muertos.

### **Antialimentaria**

La prueba se llevó a cabo siguiendo el mismo método usado por Guerrero, *et al* (31). Cuadros de hoja de maíz tierna de 2 x 2 cm se sumergieron en 5 ml de solución acetónica de 100 ppm, 50 ppm y 25 ppm del producto natural por un lapso de un minuto y se dejaron secar. El testigo fue tratado con acetona.

En cajas de Petri se colocó un cuadro de hoja de maíz con la sustancia, una larva del insecto *Spodoptera frugiperda* (gusano cogoyero de maíz) y un poco de agua, se tapó, selló y se colocó bajo una fuente luminosa que irradiaba calor.

Se observaron cada 24 horas durante 72 horas y se registró si la larva comió o no de la de hoja de maíz.

### **Toxicidad Aguda Preliminar en Ratón.**

Cuando se emplean animales para probar la actividad biológica de un compuesto, es necesario determinar su posible dosis letal 50 preliminar (LD50) en los casos donde se desconoce por completo ésta. Para ello, se administran varias dosis hasta alcanzar la que produce el efecto de muerte antes de siete días después de haber sido administrada la dosis (32).

Para calcular la cantidad necesaria para administrar una dosis de 200 mg/kg de peso en 0.2 ml de aceite de maíz comestible a cada ratón,

inicialmente se pesaron cuatro ratones; se preparó 1.5 ml de suspensión previendo la cantidad que se adhiriera a la superficie del mortero.

Se administró la suspensión a cada uno de los ratones, dos por vía intraperitoneal (IP) y dos por vía subcutánea; se colocaron en una cámara de observación y se registró fecha y hora de inyección.

Debido a las observaciones, realizadas en los ratones anteriores se bajó la dosis, probándose 100 mg/kg y 50 mg/kg. Se utilizaron un total de doce ratones.

### **Analgésica**

Para evaluar analgésicos, Siegmund *et al* propuso el método que se realizó (33). Se administró una dosis de 2 mg/kg de fenilquinona en 0.2 ml de aceite de maíz comestible a cada ratón vía intraperitoneal y se observó por un periodo de 15 minutos, cuantificando cada cinco minutos las veces que el ratón presentaba contracciones intermitentes de abdomen y extensión de las extremidades traseras; estas observaciones se realizaron a dos ratones.

Posteriormente, a otros dos ratones, se les administraron, dosis de 50 mg/kg del producto natural en 0.2 ml de aceite comestible de maíz, vía subcutánea, a cada uno; transcurridos 30 minutos después de haber administrado el producto natural, se inyectaron vía intraperitoneal 0.2 ml de suspensión de fenilquinona a una dosis igual a la administrada a los controles; los ratones fueron observados y se cuantificaron el número de contracciones intermitentes de abdomen y estiramientos de las extremidades posteriores por un período de 15 minutos.

### **Antiespasmódica *in vivo*.**

En una cámara con pequeños orificios en la cubierta se introdujo un ratón y a través de un orificio en una de las paredes se administraron, por aspersión 2 ml de una solución de histamina a una concentración de 200 ppm. Se

observó la conducta del animal y en el momento en el cual presentó mayor desesperación o cuando su frecuencia respiratoria fue muy rápida o agitada, se administraron 2 ml de una solución  $10^{-2}$  M del producto natural por aspersión y se observó si hubo cambio en la frecuencia respiratoria.

Este método fue implementado durante la realización del presente trabajo por el director de esta tesis, M. en C. J. Taboada.

### **Efecto sobre el Ciclo Sueño-Vigilia**

Se siguió el mismo procedimiento que llevó a cabo en un estudio Ayala *et al* (34). A una rata macho, raza Wistar, adulta, clínicamente sana, bajo anestesia general con pentobarbital sódico 50 mg/kg I.P. se le implantaron epiduralmente dos pares de electrodos de acero inoxidable para registrar la actividad eléctrica de las regiones frontal y occipital del cerebro. La actividad ocular se registró por medio de electrodos colocados sobre el hueso supraorbitario; se procedió igual para registrar el electromiograma (EMG) de los músculos de la nuca.

La rata se dejó recuperar por un período mínimo de una semana. Luego se colocó en una cámara sono-amortiguada a temperatura y luz constantes, con agua y comida *ad libitum*, para registrar su ciclo vigilia-sueño mediante un polígrafo Grass, mod. 111 D de 8 canales. Los registros se obtuvieron primero bajo condiciones normales durante 10 horas continuas (de las 9:00 a las 19:00 horas); posteriormente una dosis de 9 mg/kg de la sustancia en estudio se inyectó por vía I.P. en 0.5 ml de aceite de maíz, registrándose inmediatamente después, de manera semejante a la descrita para las condiciones normales.

Los registros se analizaron visualmente, identificándose las diferentes etapas del ciclo vigilia-sueño. El tiempo total se midió manualmente, obteniéndose así su duración promedio en condiciones control y bajo el efecto de la sustancia administrada.

## Anticonvulsivante

Al ratón que sirvió de control, se le administró metrazol a una dosis de 90 mg/kg en 0.1 ml de solución acuosa por cada 10 g de peso del ratón, vía subcutánea. Se registraron el tiempo transcurrido al momento de la primera convulsión después de la administración del metrazol, el número de convulsiones que tuvo y el tiempo de su muerte, si ésta se presentó durante dos horas después de haber administrado el metrazol.

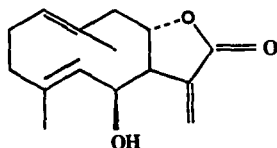
A un segundo ratón se le administraron 0.2 ml de una suspensión de la sustancia a probar, por vía intraperitoneal, a una dosis de 50 mg/kg. Se dejaron transcurrir 30 minutos y en seguida se administró la dosis de metrazol, en el mismo volumen y vía que el control. Se registraron las mismas observaciones llevadas a cabo durante el control. Esta metodología se describe en un estudio realizado por Campos *et al* (35).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Parte Química.

De 861.2 g de material seco obtenido de la parte aérea de *M. grandiflora* (hojas y flores) se obtuvo 50.5 g de extracto crudo con diclorometano y por medio de cromatografía de adsorción en columna se separó el producto natural, a partir de las fracciones obtenidas con una mezcla en proporción 90-10 de diclorometano-acetona. Se aislaron 4.9 g de cristales a los cuales se les determinó su punto de fusión siendo éste de 116 °C; y su pureza por medio de cromatografía en placa fina, comparándolos con una muestra de cristales proporcionados por el Dr. Quijano que anteriormente obtuvo de otra planta de *M. grandiflora* (13). También se envió una muestra a espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones de hidrógeno (RMN  $^1\text{H}$ ) para corroborar la estructura química, la cual se presenta en la figura 4. Se obtuvo un rendimiento del 0.57 %.

FIGURA 4



6-EPI-DESACETIL-LAURENOBIOLIDA

### Pruebas de Actividad Biológica.

En la tabla 2 se mencionan las pruebas biológicas realizadas para 6-epi-desacetil-laurenobiólida, separando aquellas en las que el resultado obtenido no se considera de interés.

**Tabla 2**  
**Pruebas Biológicas realizadas con**  
**6-epi-desacetil-laurenobiólida**

Con Resultados de Interés (Se discuten en el cuerpo del trabajo)	Sin Resultados de Interés	
	Prueba	Resultado
Efecto sobre germinación de semillas de lechuga.	Antimicótica en: <i>Aspergillus terreus</i> <i>Absidia cilindrospora</i> <i>Trichoderma viride</i>	No presentaron halo de inhibición.
Antibiótica sobre: <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Antialimentaria en <i>Spodoptera frugiperda</i>	No se observó reducción del consumo alimenticio.
Toxicidad en <i>Artemia salina</i>	Analgésica	No causó reducción en los estiramientos de abdomen y extremidades posteriores en ratones tratados con fenilquinona.
Moluscicida sobre <i>Physella sp.</i>	Antiespasmódica	No hubo modificación en la frecuencia respiratoria de ratones previamente tratados con histamina
Toxicidad Aguda preliminar en ratón	Anticonvulsivante	No hubo reducción de convulsiones en ratones tratados con metrazol.
Efecto sobre ciclo vigilia-sueño		

## Actividad sobre Germinación.

Se probaron cuatro concentraciones de 200, 100, 50 y 25 ppm y un control. En la tabla 3 se reporta el porcentaje de germinación a las 72 horas de haber iniciado los tratamientos con 25 semillas en cada uno y en la figura 5 la gráfica que aportaron los resultados obtenidos, a todos los tiempos analizados.

Se observa un ligero retraso en la germinación a las concentraciones de 25 y 50 ppm con respecto al control a las 24 horas; a la concentración de 100 ppm en ese mismo período el porcentaje de semillas germinadas es menor. Sólo a la concentración más alta, 200 ppm, hubo un atraso considerable en la germinación la cual se presentó hasta las 48 horas.

A las 72 horas el porcentaje de germinación a las concentraciones de 25, 50 y 100 ppm fue cercano al del control, no siendo así a 200 ppm el cual fue del 40% en relación al control.

Es posible que las lactonas sesquiterpénicas intervengan en fases del proceso de crecimiento de las plantas, ya que en general actúan como inhibidores, pues se ha demostrado que impiden el crecimiento de las células al interferir con ciertos sistemas enzimáticos (25).

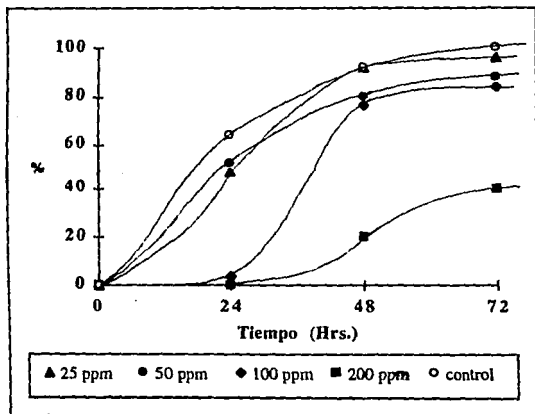
Al actuar como inhibidor en la germinación de semillas a una concentración alta, es posible creer que la lactona sesquiterpénica 6-epi-desacetil-laurenobiólida posea actividad desde el punto de vista ecológico, pues al quedar en el suelo a diferentes concentraciones, es posible que inhiba o estimule la germinación de las semillas de la misma o de diferente especie, lo cual puede determinar un equilibrio o influencia en la integración de los componentes de las comunidades vegetales.

Lo anterior se sugiere por la reversibilidad de la acción de estos compuestos, observada por ejemplo en la elefantina y la vernolepina que son inhibidores de la elongación del coleoptilo de trigo; si los inhibidores se lavan y los coleoptilos son luego tratados con auxina se observa que los coleoptilos presentan elongación (36).

**TABLA 3**  
**RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD SOBRE LA**  
**GERMINACION DE SEMILLAS DE LECHUGA DE**  
**6-epi-desacetil-laurenobiólida**  
**A LAS 72 HORAS**

<u>Concentración</u> (ppm)	<u>Porcentaje de</u> <u>Germinación</u>
Control	100
25	96
50	88
100	84
200	40

**FIGURA 5**



Se muestra el porcenje de germinación en función del tiempo y la concentración de 6-epi-desacetil-laurenobiólida en 25 semillas de lechuga.



### Actividad Antibiótica.

La prueba de antibiosis resultó positiva tanto para bacterias gram positivas como gram negativas. El diámetro del halo de inhibición con  $\approx 10$  mg de 6-epi-desacetil-laurenobiólida para *Escherichia coli* (Gram negativo) fue 2.5 cm y para *Staphylococcus aureus* (Gram positivo) de 2.2 cm.

La actividad antibacterial de 6-epi-desacetil-laurenobiólida puede encontrarse en su capacidad para reaccionar con grupos sulfidrilo de las enzimas, (por ejemplo, fosfofructoquinasa), las cuales controlan la división celular, esto se ha observado en lactonas sesquiterpénicas que poseen un grupo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona (8, 37).

Es posible que esta propiedad antibiótica beneficie a la planta que sintetiza dicho producto natural, o bien que interviene junto con otros constituyentes para la defensa contra bacterias.

### Toxicidad sobre *Artemia salina*.

El bioensayo con *Artemia salina*. es sugerido como una herramienta sencilla y económica para identificar de manera preliminar, a través de la toxicidad hacia las larvas recién incubadas, la actividad farmacológica de extractos de plantas o productos naturales, que pudieran ser de interés en la solución de problemas específicos (29).

Se determinó que la concentración letal 50 (LC<sub>50</sub>) de la sustancia bajo estudio, calculada como aquella que produce el efecto de muerte en el 50 % de todos los organismos con respecto al control, fue de 50 ppm en *Artemia salina*, con un intervalo de confianza del 95% de 32-62; lo que indica que este organismo es sensible a la actividad tóxica de la 6-epi-desacetil-laurenobiólida.

En un estudio realizado con diversos extractos de plantas, cuya actividad fue analizada tanto con el bioensayo de *Artemia salina* como con líneas celulares cancerosas 9PS y 9KB, se observó que 14 extractos cuya actividad cumplió

con el protocolo 12 del Cancer Chemotherapy Reports al mostrar dosis efectivas 50 (DE<sub>50</sub>) menores a 30 µg/ml en la inhibición del crecimiento de estas células, también resultaron tóxicas a la *Artemia salina*..

Derivado de lo anterior se considera que la 6-epi-desacetil-laurenobiólida podría tener propiedades anticancerosas (8, 29).

### Actividad Moluscicida.

En la tabla 4 se reportan los resultados obtenidos de la prueba de la lactona sesquiterpénica con los caracoles del género *Physella sp*, en la cual se observa que a las concentraciones de 50 y 25 ppm después de 6 horas de exposición todos los caracoles estaban muertos. En la mínima concentración probada, 5 ppm, a la seis horas el porcentaje de mortalidad fue del 10% y después de 24 horas del 90%.

Se observa que 6-epi-desacetil-laurenobiólida es una sustancia con alto potencial de uso como moluscicida, la cual podría ser probada con más especies de caracoles, principalmente en aquéllos que actúan como vectores de enfermedades parasitarias de humanos y de algunos animales de importancia económica, como es el caso de *Fossaria (Fossaria) humilis*, *Fossaria modicella*, *Pseudo succinea columella*, *Stagnicola bulimoides*, que son hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica*, común de la oveja y el ganado vacuno (30, 39).

Estudios recientes han demostrado que la aplicación de moluscicidas sintéticos afecta seriamente el habitat de los moluscos de agua dulce, actuando como biocidas residuales que eliminan flora y fauna asociados con los caracoles que se desean eliminar. Por esto es que se ha incrementado el interés por el estudio de extractos o productos aislados de plantas, para emplearlos como moluscicidas con la esperanza de que éstos sean más baratos, efectivos y menos contaminantes.

**TABLA 4**  
**ACTIVIDAD MOLUSCICIDA DE**  
**6-epi-desacetil-laurenobiólida**  
**SOBRE CARACOLES DEL GENERO**  
*Physella sp.*

Concentración (ppm)	Tiempo de Exposición			
	6 Horas		24 Horas	
	mueitos	% mortalidad	mueitos	% mortalidad
0	0	0	1	10
5	1	10	9	90
25	10	100	—	—
50	10	100	—	—

En todas las concentraciones se expusieron 10 caracoles  
 — Todos los caracoles murieron antes de 6 horas

### Toxicidad Aguda Preliminar en Ratón.

Es necesario proteger al hombre y a otras especies económicas, de los efectos tóxicos producidos por sustancias químicas, por lo tanto, las evaluaciones iniciales se tienen que basar en experimentos con animales de laboratorio y éstos tienen que explorar tanto los aspectos cuantitativos como cualitativos de la toxicidad.

Después de unos momentos de haber administrado la lactona sesquiterpénica 6-epi-desacetil-laurenobiólida por vía intraperitoneal se observó al ratón estirando el abdomen y patas posteriores, efectos que se consideraron como manifestaciones de toxicidad del producto natural.

Se procedió a determinar la posible dosis letal 50 (LD<sub>50</sub>) preliminar. Los resultados se presentan en la tabla 5. A cuatro ratones se les suministró una dosis de 200 mg/kg de la sustancia bajo estudio por vía intraperitoneal. Se obtuvo un 25% de mortalidad transcurrida la primera hora después de la administración. El 50% se registró a las 48 horas. Por otra parte, se administraron 100 mg/kg de la lactona sesquiterpénica a dos ratones, teniendo 0% de mortalidad después de siete días de observación.

En el caso de la administración por vía subcutánea, el 100% de mortalidad se presentó a las 6 horas después de la administración con dosis de 200 y 100 mg/kg, por lo que se probó con 50 mg/kg aportando 0% de mortalidad transcurridos 7 días a partir de la administración.

**TABLA 5**  
**DOSIS LETAL (LD50)**  
**PRELIMINAR EN RATON**

<u>Vía de Administración</u>	<u>LD50 Preliminar (mg/kg)</u>
Intraperitoneal	≈ 200
Subcutánea	> 50 y < 100

Dosis administradas en 0.2 ml de suspensión en aceite de maíz.

### **Efecto sobre ciclo Sueño-Vigilia.**

Durante el registro realizado a una rata después de haberle administrado 9 mg/kg de peso suspendidos en 0.5 ml de aceite de maíz vía I.P., se observó a la rata muy inquieta y con manifestaciones de dolor, es decir, estiramiento de abdomen, inducido por la administración de la sustancia, de igual manera que cuando se determinó la toxicidad aguda preliminar en ratón.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6, los cuales indicaron que la 6-epi-desacetil-laurenobiólida causó las siguientes modificaciones en el patrón de sueño: 1) reducción en 50% del sueño paradójico respecto al control; 2) incremento de la latencia del sueño paradójico, es decir, del tiempo que tarda en aparecer la primera etapa de sueño MOR (Movimiento Rápido Ocular) o paradójico; 3) incremento en la frecuencia de los estados de vigilia.

Debido a estos resultados se consideró la posibilidad de registrar otra rata pero ahora con el interés de provocar dolor y con ello proponer un modelo de dolor crónico provocado con la 6-epi-desacetil-laurenobiólida, el cual podría ser utilizado para el estudio de nuevos analgésicos.

En la tabla 7 se reportan los resultados de tres registros realizados a una rata. El primero fue en condiciones normales (control), al día siguiente se realizó el segundo registro, iniciándolo 30 minutos después de administrar 3 mg de 6-epi-desacetil-laurenobiólida suspendida en 0.2 ml de aceite de maíz vía intra-articular (rodilla de la pata posterior izquierda) a la rata previamente anestesiada con éter. Y el tercer registro se llevó a cabo al siguiente día después de repetir el procedimiento del día anterior (en la otra rodilla) más la administración de un analgésico vía I.P. inmediatamente antes de comenzar el registro. La administración del analgésico fue 0.3 mg de tiona bromada en 0.5 ml de aceite de maíz. En la figura 6 se presentan los hipnogramas de dichos registros.

Las modificaciones en el patrón de sueño provocadas por el dolor fueron: 1) reducción de la cantidad total de sueño en 50 %, siendo más afectado el sueño MOR; 2) reducción en la frecuencia del sueño MOR; 3) el sueño lento está muy fraccionado por lo que la duración de cada episodio de esta etapa es menor. La reducción del tiempo de sueño total, trajo consigo un incremento del tiempo invertido en la vigilia. Después de suministrar el analgésico se observa que la rata retorna a condiciones similares a las del control.

**TABLA 6**  
**EFFECTO DE 6-epi-desacetil-laurenobiólida SOBRE EL CICLO VIGILIA-SUEÑO DE RATA**

	Vigilia		Sueño Lento		Sueño MOR	
	Control	Dolor	Control	Dolor	Control	Dolor
Frecuencia	46	82	105	120	74	48
Tiempo (minutos)	184	182	305	359	110	57
Porcentaje	30.66	30.39	50.96	59.97	18.36	9.63
Duración Promedio (minutos)					1	1
Latencia (minutos)					32	23

Dolor: Se administró 3 mg de 6-epi-desacetil-laurenobiólida en 0.5 ml de aceite de maíz, vía intraperitoneal.

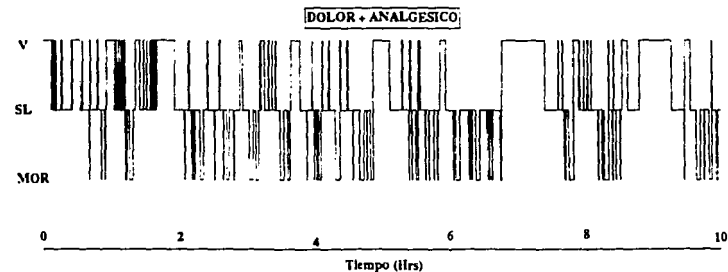
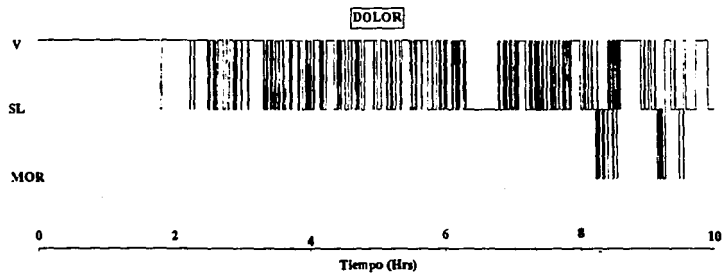
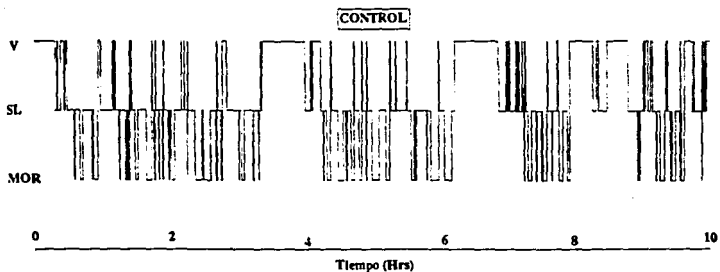
**TABLA 7**  
**COMPARACION DE LAS MODIFICACIONES DEL CICLO VIGILIA-SUEÑO BAJO TRES CONDICIONES**

	Vigilia			Sueño Lento			Sueño MOR		
	Control	Dolor	Dolor y Analgésico	Control	Dolor	Dolor y Analgésico	Control	Dolor	Dolor y Analgésico
Frecuencia	54	123	58	87	134	104	54	16	57
Tiempo (minutos)	191	392	184	291	200	326	118	8	80
Porcentaje	31.86	65.34	30.66	48.44	33.33	56.07	19.69	1.33	13.27
Duración Promedio (minutos)							2	0.5	1
Latencia (minutos)							35	494	40

Dolor: Se administró 3 mg de 6-epi-desacetil-laurenobiólida en 0.2 ml de aceite de maíz, vía intraarticular de pata posterior derecha.

Dolor y Analgésico: Se administró 3 mg de 6-epi-desacetil-laurenobiólida en 0.2 ml de aceite de maíz, vía intraarticular de pata posterior izquierda y 0.3 mg de Tioana (Analgésico) en 0.5 ml de aceite de maíz, vía intraperitoneal.

## HIPNOGRAMAS



Comparación de las diferentes etapas del ciclo vigilia-sueño de rata bajo tres condiciones diferentes.  
V= vigilia. SL= sueño lento. MOR= movimiento ocular rápido (sueño paradójico)

El sueño normal parece ser un hábito de protección orgánica. El sueño periódico es una de las necesidades fundamentales de la vida. Se ha visto que los perros mueren antes si se les priva del sueño que si se les suprime la alimentación. En algunos estados patológicos el sueño es superficial desde el comienzo hasta el fin sin que exista el período normal durante el que es más profundo. Esto indica la necesidad de proporcionar el sueño a los enfermos que por causas tales como dolores persistentes, no han podido conciliarlo durante algún tiempo (39).

El dolor constituye el mayor desafío para cualquier doctor y aliviarlo resulta su mayor problema. Ante los ojos de muchos de sus pacientes es inclusive la única justificación de su existencia. Todo lo que desean es que les quite el dolor.

Hay muchas condiciones patológicas diferentes que ocasionan dolor crónico, tales como artritis reumatoide, fibrositis y enfermedades degenerativas de las articulaciones. El dolor generalmente causa alteración en el sueño manifestado como más tiempo en el comienzo de la latencia de sueño, frecuente despertar durante los períodos de sueño, aumento en la cantidad de vigilia y disminución en el tiempo total de sueño. Estas alteraciones también resulta en excesiva fatiga en el día (40).

En la tabla 8 se presentan las pruebas que se consideraron de interés y sus resultados.



**Tabla 8**  
**Actividad Biológica de**  
**6-epi-desacetil-laurenobiólida**

Prueba	Dosis	Efecto
Sobre germinación en semillas de lechuga.	200 ppm	Retraso en la germinación de 48 hrs. 40% de germinación a 72 hrs.
Antibiótica sobre: <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	10 mg	Ø (cm) de halo de inhibición 2.5 2.2
Sobre <i>Artemia salina</i>	50 ppm	CL <sub>50</sub> muerte en el 50% de los organismos con respecto al control
Moluscicida sobre <i>Physella sp.</i>	25 ppm 5 ppm	100% de mortalidad a las 6 hrs. 90% de mortalidad a las 24 hrs.
Toxicidad Aguda preliminar en ratón	LD <sub>50</sub> = 200 mg/kg 50 < LD <sub>50</sub> < 100 mg/kg	LD <sub>50</sub> preliminar I.P. LD <sub>50</sub> preliminar Subcutánea
Efecto sobre ciclo vigilia-sueño	9 mg/kg	Principalmente sobre el sueño MOR, tanto en número como en duración de cada episodio.

## CONCLUSIONES.

- Se verifica la hipótesis planteada, al haber presentado actividad en varias pruebas biológicas y confirmando que la presencia del grupo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona que posee 6-epi-desacetil-laurenobiólida la caracteriza como un producto natural citotóxico.
- Las propiedades antibiótica y moluscicida que también presentó el producto natural extraído de *M. grandiflora* son de especial interés dentro de la importancia económica y social de las enfermedades parasitarias, porque los parásitos atacan indistintamente a vegetales, animales y al hombre.
- Con los resultados preliminares obtenidos en la actividad sobre la germinación, podemos inferir que desde un punto de vista ecológico tiene importancia este tipo de producto natural, pues al quedar en el suelo a diferentes concentraciones, es posible que actúe sobre semillas de la misma especie o de diferente especie, regulando el establecimiento de plantas y la composición de las comunidades vegetales.
- Aprovechando el efecto que causa la administración de 6-epi-desacetil-laurenobiólida a animales en los cuales se pueden evaluar ciertas modificaciones en la conducta, el dolor en este caso, resulta interesante continuar un estudio enfocado a proponerlo como un modelo para provocar dolor crónico para el estudio de analgésicos.

## RECOMENDACIONES.

- Debido al interés de continuar investigando en ciertas áreas, como por ejemplo realizar estudios de campo sobre la actividad moluscicida y la propuesta del modelo de dolor crónico, es recomendable calcular la concentración del producto natural por individuo.
- Las lactonas sesquiterpénicas, son sustancias que al ser sintetizadas por las plantas es probable que realicen ellas alguna o varias funciones determinadas. La mayoría se han extraído de Compuestas y muy interesante será probar sus efectos morfogenéticos en las mismas especies vegetales de donde se extrajeron.
- Sería conveniente continuar el estudio sobre otras cepas de bacterias patógenas que causan problemas sociales y económicos, así como determinar la concentración mínima inhibitoria.
- En la investigación sobre la actividad moluscicida se recomienda en uso de caracoles que no contienen opérculo, ya que éste sirve de protección a los organismos que lo poseen.

## REFERENCIAS

1. Romo de Vivar, A. 1981. La Química de Productos Naturales en México: Lactonas Sesquiterpénicas. *Ciencia*, **32**: 163-189.
2. Litter, M. 1986. Compendio de Farmacología. Ed. El Ateneo. Buenos Aires, Argentina. 709 pp.
3. Streitwieser, A. y Heathcock, H. C. 1979. Química Orgánica. Nueva Editorial Interamericana. México. 1258 pp.
4. Romo de Vivar, A. 1985. Productos Naturales de la Flora Mexicana. Ed. Limusa. México. 220 pp.
5. Vázquez, M. 1989. Structure elucidation of secondary metabolites from *Rudbeckia* species by spectroscopic techniques and review of sesquiterpene lactones. (Tesis doctoral, part. B.). Louisiana State University. U.S.A. 158 pp.
6. Heywood, V.H., Harborne, J.B. and Turner, B.L. 1977. An overture to the Compositae. In: The biology and chemistry of the Compositae. Heywood, V.H., Harborne, J.B. and Turner, B.L. (eds.) New York. pp. 1-20.
7. Wagner, H. 1977. Pharmaceutical and economic uses of the Compositae. In: The biology and chemistry of the Compositae. Heywood, V.H., Harborne, J.B. and Turner, B.L. (eds.) New York. pp. 411-433.
8. Téllez-Martínez, J., Taboada, J. y González-Diddi, Manuel. 1980. Citotoxicidad de algunas lactonas sesquiterpénicas "in vitro". *Arch. Invest. Méd.* **11**: 435-444.
9. Rodriguez, E., Towers, G.H.N. and Mitchell, J.C. 1976. Biological Activities of Sesquiterpene Lactones. *Phytochem.* **15**: 1573-1580.

10. Iino, Y., Tanaka, A. and Yamashita, K. 1972. Plant Growth Inhibitory Activities of Synthetic  $\alpha$ -Methylene- $\gamma$ -butyrolactones. *Agr. Biol. Chem.* **36**: 2505-2509.
11. Kupchan S.M., Eakin, M.A. and Thomas, A.M. 1971. Tumor Inhibitors. 69. Structure-Cytotoxicity Relationships among the Sesquiterpene Lactones. *Jour. Med. Chem.* **14**: 1147-1152.
12. Lee, K., Ibuka, T., Wu, R. and Geissman, T. 1977. Structure-antimicrobial activity relationships among the sesquiterpene lactones and related compounds. *Phytochem.* **11**: 1177-1180.
13. Quijano, L., Calderón, J., Gómez, F., López, J., Ríos, T. y Fronczek, F. 1984. The crystal structure of 6-epi-desacetyllaurenobiolide, a germacra-1(10),4-diene-12,8 $\alpha$ -olide from *Montanoa grandiflora*. *Phytochem.* **23**: 1971-1974.
14. Santiago Azpiazu, Norma del Rocío. 1985. Determinación de la estructura molecular de la grandiflorida una nueva lactona sesquiterpénica aislada de *Montanoa grandiflora*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma de Puebla. Puebla. 31 pp.
15. Rzedowski, J. y Rzedowski, G. 1985. Flora Fanerogámica del Valle de México, Vol. II Dicotyledoneae (Euphorbiaceae-Compositae) IPN e Instituto de Ecología. México. 674 pp.
16. Lozoya, J. y Lozoya, M. 1982. Flora Medicinal de México. 1a. Parte: Plantas Indígenas. IMSS. México. 309 pp.
17. Vidales, D. P. 1990. Estudio químico-biológico de *Hyptis urticoides* y *Senecio tolucanus* (plantas con propiedades insecticidas). (Tesis de Licenciatura). UNAM. México. 97 pp.
18. Cronquist, A. 1981. Introducción a la Botánica. Ed. CECSA. México. 568 pp.

19. Jones, Samuel B.. 1987. Sistemática Vegetal. Ed. Mc Graw-Hill. México. 536 pp.
20. Funk, V. A. 1982. The systematics of *Montanoa* (Asteraceae, Heliantheae). Mem. New York Bot. Gard. 36: 133 pp.
21. Martínez, M. 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México. 1220 pp.
22. Asakawa, Y. 1982. Chemical Constituents of the Hepaticae. In: "Progress in the Chemistry of Organic Natural Products" W. Herz, H. Grisebach and G.W. Kirby (eds.). 42: 1-269.
23. Fischer, N.H., Olivier, E.J. and Fischer, H.D. 1979. The Biogenesis and Chemistry of Sesquiterpene Lactones. In: "Progress in the Chemistry of Organic Natural Products" W. Herz, H. Grisebach and G.W. Kirby (eds.). 38: 47-390.
24. Sood, R.P., Suri, K.A., Suri, O.P., Dhar, K.L. and Atal, C.K. 1982. Sesquiterpene Lactone from *Salmaia malbrica*. Phytochem. 21: 225-2126
25. Martínez Pérez, Rafael. 1974. Determinación en vegetales de la actividad biológica de algunas lactonas sesquiterpénicas. (Tesis de Licenciatura). UNAM. México. 58 pp.
26. Clarke, G.L. 1971. Elementos de Ecología. Ed. Omega. Barcelona. 637 pp.
27. Guerrero, C., Campos, G y Taboada, J. 1988. Estudio Químico de *Eupatorium brevipes* y Algunas Actividades Biológicas de la Brevipenina. Rev. Latinoamer. Quím. 19: 147-149.
28. Litter, Manuel. 1986. Farmacología Experimental y Clínica. Ed. Ateneo. Buenos Aires. 1872 pp.

29. Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols D.E. and McLaughlin, J.L. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Coonstituents. *Planta medica*. **45**: 31-34.
  
30. Cruz-Reyes, Alejandro, Chavarín, Carolina, Campos Arias, Martha P., Taboada, Javier y Jiménez E., Manuel. 1989. Actividad Molucicida del Piquerol A aislado de *Piqueria trinervia* (Compositae) sobre ocho especies de caracoles pulmonados. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **84**: 35-40.
  
31. Guerrero, C., Ortega, A., Camino, M. y Taboada, J. 1990. Grandifolidas A y B de *Cornutia grandifolia* (Schl et Cham) Shauer. *Rev. Latinoamer. Quím.* **21**: 88-90.
  
32. Goldstein, A., Aronow, L. y Kalman, S. M. 1979. *Farmacología*. Ed. Limusa. México. 1001 pp.
  
33. Siegmund, E., Cadmus, R. and Lu, G. 1957. A Method for Evaluating both Non-Narcotic and Narcotic Analgesics. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **95**: 729-731.
  
34. Ayala-Guerrero, F., Vargas-Reyna, L., Taboada, J., Martínez, R. y Cortés, E. 1990. Efecto de un derivado de la 1,5 benzodiazepina sobre el sueño. *Gaceta Méd. Méx.* **126**: 519-522.
  
35. Campos, A., Sanvicente, L., Ayala-Guerrero, F., Alcántara, G., Martínez, R. y Taboada, J. Anticonvulsant effect of the 7-(p-chlorophenyl)-8-phenoxi-4,5-benzo-3-aza-nonem. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **35**: 191-193.
  
36. Kupchan, S.M. 1970. Recent Advances in the Chemistry of Terpenoid Tumor Inhibitors. *Pure and Applied Chemistry.* **21**: 227-246.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

37. Obregón García, Laura. 1986. Estudio Químico de las Plantas *Zexmenia lantanifolia* y *Montanoa sp.* (Tesis de Licenciatura) ENEP Zaragoza UNAM. México. 83 pp.
38. Wilford Olsen, O. 1977. Parasitología Animal. II. Platelminos, Acantocéfalos y Nematelminos. Ed. AEDOS. Barcelona. 721 pp.
39. Clark, A.J. 1930. Farmacología Aplicada. Ed. Pubul. Barcelona. 646 pp.
40. Ayala-Guerrero, F., Guevara, L.U., Taboada, J. and Martínez, R. 1993. Effect of a Thione on Sleep disturbances Associated with Chronic Pain. Proc. West. Pharmacol. Soc. 36: 233-237.