302927 7
2eje.

UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO

ESCUELA DE QUIMICA

"EVALUACION BIOLOGICA DE
Haematoxylon campechianum"

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE LIC. EN
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MA. DEL ROSARIO REYES ELIZALDE

MEXICO, D. F. 1984

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO

J U R A D O A S I G N A D O

Presidente:	M.en C. Verónica Rodríguez López.
1er. Vocal:	QFB. Alma Miriam Novelo Torres.
Secretario:	QFB. Raúl Díaz Tagle.
Suplente:	QFB. Agustín Palma de la Cruz.
Suplente:	QFB. Misael González Ibarra.

Sitio donde se desarrolló el tema:

LABORATORIO DE FITOQUIMICA DEL DEPTO. DE FARMACIA.
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLOGICAS. IPN.

Director de tesis:

M.en C. Verónica Rodríguez López.

Asesor externo:

M.en C. Lourdes Hernández de Jesús.

Sustentante:

María del Rosario Reyes Elizalde.

A GLORIA Y ALFONSO

Quienes me dieron la vida
y la oportunidad de vivirla.

XOCHITL, LUPITA, DANIEL, SALVADOR Y HUGO:

Por todo lo que me han ayudado,
algo de ustedes está en este trabajo
gracias.

A G R A D E C I M I E N T O S

Al Dr. Robert Bye del Jardín Botánico de la UNAM por su valiosa contribución para la clasificación botánica de la planta.

Al Departamento de Asistencia Técnica de la ENCB por proveer las cepas microbiológicas, así como al Dr. Ramón Cruz Camarillo y a la sección de Tecnología farmacéutica por todas sus facilidades.

A la M.en C. Alejandra Rojas de la Universidad Autónoma de Querétaro por la donación de la corteza.

A la Q.F.B. Alma Miriam Novelo Torres por sus valiosas aportaciones.

De manera muy especial, deseo expresar mi agradecmiento a la M.en C. Lourdes Hernández de Jesús del Departamento de Farmacia de la ENCB del IPN, por darme la opotunidad de desarrollar éste trabajo, por haberlo dirigido constantemente hasta el fin y por sus valiosas enseñanzas.

Agradezco a la M.en C. Verónica Rodríguez López Directora de la carrera de QFB de la UFM (UVM), por brindarme su confianza, su apoyo y su estímulo incondicional para la realización de este trabajo, por su gran calidad profesional y humana gracias..

A mis compañeras y amigas del Laboratorio del Departamento de fitoquímica de la ENBC, Lourdes Barbosa, Luz María Ponce y Ana Claudia por haber estado conmigo incondicionalmente.

El presente trabajo fué realizado en el laboratorio de Fitoquímica del Departamento de Farmacia de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo el asesoramiento de la M. en C. Ma. de Lourdes Hernández de Jesús y de la M. en C. Verónica Rodríguez López.

I N D I C E

LISTA DE ABREVIATURAS I

INTRODUCCION II

I. ANTECEDENTES

1.1 Generalidades de la familia *Leguminosae*. 1

1.2 Especie de la familia *Leguminosae* que presentan actividad antimicrobiana. 9

1.3 Antecedentes botánicos de la corteza de *Haematoxylon campechianum*. 12

1.4 Antecedentes etnobotánicos de la corteza de *Haematoxylon campechianum*. 15

1.5 Antecedentes fitoquímicos de *H. campechianum* . . 16

1.6 Antecedentes de evaluaciones biológicas de *H.campechianum*. 22

1.7 Usos e importancia económica de la corteza de *H. campechianum*. 24

II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS 25

III. PARTE EXPERIMENTAL 28

3.1 Material vegetal. 28

3.2 Bioensayo de la toxicidad (*Artemia salina L*). . 28

3.2.1 Preparación de la muestra 28

3.2.2 Ensayo citotóxico con el crustáceo 28

3.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana . . . 29

3.3.1 Microorganismos de prueba 29

3.3.2 Preparación de los inóculos 30

3.4 Análisis cualitativo antimicrobiano 30
3.4.1 Preparación de la muestra 30
3.4.2 Procedimiento de ensayo 31
3.5 Ensayo preliminar de los extractos 31
3.6 Extracción del material vegetal 32
3.7 Resolución del extracto mediante partición cromatográfica 34
IV. RESULTADOS 35
V. DISCUSION Y CONCLUSION DE RESULTADOS 41
VII. BIBLIOGRAFIA 45

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt:	acetato de etilo
$BaCl_2$:	cloruro de bario
Cl_{50}:	Concentración letal media
$CHCl_3$:	cloroformo
CC:	cromatografía en columna
CCF:	cromatografía en capa fina
C_6H_{14}:	hexano
H_2SO_4:	ácido sulfúrico
Kg:	kilogramos
MeOH:	metanol
MHz:	megahertz
mcg:	microgramos
mm:	milímetros
mg:	miligramos
ml:	mililitros
nm:	nanómetros
ppm:	partes por millón
pKa:	constante de acidez
1H-NMR:	resonáncia magnética nuclear de hidrógeno
μl:	microlitros

I N T R O D U C C I O N

El avance en el estudio de antibióticos ha llegado a invadir el vasto y prometedor campo de las sustancias antibacterianas que suelen encontrarse en las plantas superiores, cuyos extractos han sido utilizados para curar o aliviar diversas enfermedades ya sea en una forma empírica o científica, llegando a tener verdadera impotancia y aceptación (Mendez, 1953).

Muchos antibióticos y quimioterápicos, considerados anteriormente como de primera elección ante diversas infecciones, han pasado a ser de segunda, tercera o han sido eliminados de la lista en uso de los cuadros de medicamentos esenciales. Por el contrario, algunos antimicrobianos descartados hace tiempo, vuelven a tomar su lugar inicial ya que los sustitutos se han inutilizado, dejando de ser activos (Kumate, 1979).

En México, una consideración que justifica la tarea de intentar una actualización en el campo de los antimicrobianos es el gasto excesivo por la adquisición de éstos, que es mayor al producido por los demás medicamentos (Kumate, 1979).

En los últimos años han aparecido numerosos trabajos sobre diversas familias de plantas superiores (Lester, 1979; Biyiti, 1988; HIroshi, 1988) en cuyos extractos se ha demostrado la presencia de sustancias

antibacterianas, llegando en varios casos a la plena identificación química de esa sustancia y que llega a ser utilizada para diversos fines farmacéuticos.

Se ha reportado, que la especie de *Haematoxylon* presenta actividad antimicrobiana (Mendez, 1953), por lo que resulta importante comprobar si la especie de *Haematoxylon campechianum*, que se encuentra ampliamente distribuida en el sureste de México, tambien presenta este tipo de actividad. Para realizar la evaluación biológica de esta corteza se obtuvieron los extractos metanólico, clorofórmico, hexánico y de acetato de etilo, previa trituración del material vegetal; una vez obtenidos los diferentes extractos se evaluó su potencial antimicrobiano utilizando el método de difusión en agar utilizando dos bacterias gramnegativas, dos bacterias grampositivas y una levadura.

Adicionalmente, se evaluó el potencial citotóxico de la especie en estudio mediante el método de la toxicidad contra el crustáceo *Artemia salina*, ya que se ha comprobado que tiene correlación con otras actividades más complejas. Este método es un bioensayo que detecta un amplio rango de actividades biológicas y una gran diversidad de estructuras químicas. Las larvas del crustáceo marino *Artemia salina* se han utilizado en diferentes ensayos biológicos de entre los cuales destacan el análisis de residuos plaguicidas (Michael,

1956; Areekul, 1960), micotoxinas (Brown, 1968; Wilmont, 1979), anestésicos (Robinson, 1965), compuestos relacionados con morfina (Richter, 1970), y ésteres carcinogénicos de Forbol (Kighorn, 1989). Su empleo en los estudios de las plantas medicinales es reciente y se recomienda en la detección y evaluación de compuestos antihelminticos y antipalúdicos (Marles, 1989; Camacho, 1990) y de poderosos agentes citotóxicos (McLaughlin, 1989; Anderson, 1989).

El procedimiento determina los valores de CL_{50} expresados en mcg/ml, de los compuestos y extractos activos. La actividad se manifiesta como el efecto tóxico letal para las larvas del crustáceo *Artemia salina*.

Los resultados de esta investigación son la pauta para realizar otros estudios más profundos de la planta como son los de obtención y elucidación de principios activos, además de contribuir al conocimiento existente sobre la familia de *Haematoxylon*.

I A N T E C E D E N T E S

1.1 GENERALIDADES DE LAS LEGUMINOSAS.

La familia de las leguminosas (Fabáceas) ocupa el segundo lugar en magnitud de especies con flores, ya que comprende 600 géneros y más de 18,000 especies. De esta familia se han aislado drogas vegetales de gran importancia medicinal. Se divide en tres subfamilias: Papilionáceas, Mimosiodeas y Cesalpinoideas que comprenden alrededor de 377, 40 y 133 géneros respectivamente (Polhill, 1981).

Los miembros de la subfamilia Papilionáceae son herbáceas, arbustivas o arbóreas; de hojas simples o compuestas; flores zigomorfas o papilionáceas; con 10 estambres, monoadelfos o diadelfos; fruto y legumbre.

De la subfamilia Mimosoidea sus miembros son árboles o arbustos con hojas generalmente bipinnadas, flores regulares; cáliz generalmente gamosépalo; estambres en número igual al de pétalos, doble o numerosos; fruto y legumbre.

La mayor parte de los miembros de la subfamilia Cesalpinoideas son árboles o arbustos; hojas pinadas o bipinnadas, hojas zigomorfas; fruto, legumbre o tomento. El número de pétalos y estambres es generalmente reducido; las drogas crudas de esta subfamilia son las hojas y frutos del sen y frutos de cassia y tamarindo, leños de campeche y sapani, raíz de rafania y copaiba

(Trease, 1989).

Desde el punto de vista taxonómico se han propuesto numerosas clasificaciones y dos de las más aceptadas son las propuestas por Bentham y Tauber (Harborne, 1971). Estas clasificaciones se resumen en los cuadros **1 y 2.**

Los diversos estudios químicos que se han realizado en plantas de esta familia, permiten establecer el perfil fitoquímico (Harborne, 1971) que se resume en el cuadro 3. Es de hacer notar que para cada tipo de compuesto, sólo referencias representativas son citadas (Hernández, 1989).

Son importantes las leguminosas en la alimentación por la abundancia de fécula y albuminatos: las habas, los garbanzos, guisantes y lentejas; por sus raíces tuberosas varias *Psoroleas, Lathyrus, Pachyrrhizus*; por sus legumbres o vainas verdes varios guisantes, habas y judías; como sucedáneos del café las semillas de *Cassia occidentalis, Gymnocladus canadensis, Astragalus boeticos* (Claus, 1968).

Como forraje se utilizan las semillas de altramuz, lenteja, guisante, cacahuate; para el encebamiento el heno, el trebol, alfalfa y meliloto.

Las maderas de construcción y de ebanistería, proceden de muchas Mimosoideas, Cesalpinoideas y Dalbergicas y algunas otras Papilionadas; palos de tinte del Campeche, Caesalpinia, Copaifera; en textiles

CUADRO 1. CLASIFICACION DE LAS LEGUMINOSAS SEGUN BENTHAM

PAPILIONACEAE*		CAESALPINIAE *		MIMOSAE *	
TRIBUS	SUBTRIBUS	TRIBUS	SUBTRIBUS	TRIBUS	SUBTRIBUS
Podalyrieae	26	Sclerolobieae	10	Parkieae	2
Genisteae	56	Eucaesalpinieae	16	Adenanthereae	12
Trifoloeae	6	Cassieae	11	Eumimoseae	5
Loteae	4	Bauhinieae	3	Acacieae	1
Galageae	54	Amherstieae	23	Ingeae	8
Hedysareae	46	Cynomereae	10		
Bicieae	6	Dimorphandreae	3		
Phaseoleae	47				
Dalbergieae	25				
Sophoreae	30				
Swarrtzieae	5				

* SUBFAMILIA

CUADRO 2 . CLASIFICACION DE LAS LEGUMINOSAS SEGUN TAUBERT

I MIMOSOIDEAE *	II CAESALPINIOIDEAE *	III PAPILIONATAE *
TRIBUS	TRIBUS	TRIBUS
Ingeae	Dimorphandreae	Sophoreae
Acacieae	Cynometreae	Podalyrieae
Eumimoseae	Amherstieae	Genisteae
Adenanthereae	Bauhinieae	Trifolieae
Piptadenieae	Cassieae	Loteae
Pankieae	Kramerieae	Galegeae
	Eucaesalpinieae	Hedysareae
	Sclerolobieae	Dalbergieae
	Swartzieae	Vicieae
		Phaseoleae

* SUBFAMILIA

CUADRO 3. PERFIL FITOQUIMICO DE LA FAMILIA LEGUMINOSAE.

TIPO DE COMPUESTO	VARIACION ESTRUCTURAL	REFERENCIA
ALCALOIDES:		
- Quinolizidinas	a) SImples o tipo Lupinas	Hart *et al*, 1968a,
	b) Citisina	Orjales y Ribas, 1969.
	c) Esparteína	Goldberg *et al*, 1969.
	d) Matrina	Arthur y Loo, 1967.
	e) Ornosia	Faugeras y Paris, 1968.
- Pirrolizidinas		Crout, 1969.
- B-Feniletilaminas		Ghosal y barnejee, 1969.
- Tetrahidroisoquinolinas		Faugeras, 1969.
- Eritrinas		Barton *et al*, 1966.
- Piperidinas		Faugeras y Paris, 1965.
- Diterpénicos		Lindwall *et al*, 1965.
- Alquilaminas		Stepanova, 1967.
- Piridinas		Lythgoe y Vernego, 1967.
- Indólicos	Triptaminas simples	Barnejee y Ghosal, 1969.

CUADRO 3. PERFIL FITOQUIMICO DE LA FAMILIA LEGUMINOSAE. (continuación).

TIPO DE COMPUESTO	VARIACION ESTRUCTURAL	REFERENCIA
ALCALOIDES		
	B-carbolinas	Banerjee y Ghosal, 1969.
	Eserina	Robinson, 1968.
- Pirrolidinas simples		Ackermann y Appel, 1939.
- Quinazolidinas		Schreiber *et al*, 1962.
- Imidazólicos		Fitzgerald, 1964.
- Otros		Singh *et al*, 1959.
FLAVONOIDES:		
- Flavonoles		Saxena *et al*, 1968.
- Flavanonoles		Ayoub, 1985.
- Flavonas		Heerden *et al*, 1981.
- Catequinas		Foo *et al*, 1981.
- Auronas		Imperato, 1982.
- Chalconas		Imperato, 1982.
- Antocianidinas		Deshpande *et al*, 1981.

CUADRO 3. PERFIL FITOQUIMICO DE LA FAMILIA LEGUMINOSAE. (continuación).

TIPO DE COMPUESTO	VARIACION ESTRUCTURAL	REFERENCIA
FLAVONOIDES:		
- Proantocianidinas		Clark-Lewis *et al*, 1968.
- Leucoantocianidinas		Yeap Foo, 1985.
- Flavanonas		Saeedii-Ghami *et al*, 1984.
- Biflavonoides		Foo *et al*, 1986.
- Triflavonoides		Viviers *et al*, 1983.
- Tetraflavonoides		Young *et al*, 1985.
- Peltoginonides		Heerden *et al*, 1981.
FENOLES SIMPLES:	C6	Constantinew *et al*, 1966.
	C6-C1	Haslam, 1967.
	C6-C3 (Fenil Propanoides)	Harborne and Corner, 1961
CUMARINAS	Antraquinonas	Fairbain, 1961
QUINONAS	Benzoquinonas	Harborne *et al*, 1971.
	Naftoquinonas	Lister *et al*, 1955.

CUADRO 3. PERFIL FITOQUIMICO DE LA FAMILIA LEGUMINOSAE. (continuación).

TIPO DE COMPUESTO	VARIACION ESTRUCTURAL	REFERENCIA
4-FENIL CUMARINAS	Dalberginas	Donelly *et al*, 1969.
XANTONAS		
TERPENOIDES:		
- Diterpenos	Kauranos	Hugel *et al*, 1965.
	Labdanos	Ekong y Okogun,1967.
	Sandacopimaranos	Laidlaw y Morgani, 1963.
- Triterpenos	Oleananos	Birk, 1969.
	Lupanos	Kanner, 1958.
- Tetraterpenoides	Carotenoides	Neamtu y Bodea, 1969.
ESTEROIDES	Esteroles	Neamtu y Bodea, 1969.
	Saponinas tipo Diosgenina	Vanshney, 1969.
NITRILOS	Cianoglicósidos	Conn y Butler, 1969.
		Seigler *et al*, 1983.

encontramos a la *Crotolaria juncea*, *Serbania cannabina*, *Erythrina suberosa*; y para la industria del papel se utiliza la *Parkisonia aculeata*.

De las tres subfamilias, las Mimosoideae y Caesalpinoideae son principalmente plantas tropicales, mientras que las Papilionaceae se desarrollan tanto en regiones tropicales como templadas.

Entre los componentes de las leguminosas encontramos heterósidos cianogenéticos, saponinas, taninos, mucilagos, antocianos y alcaloides (Trease, 1989).

1.2 ESPECIES DE LA FAMILIA CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

El análisis de agentes antimicrobianos es seguido por muchos laboratorios fitoquímicos utilizando métodos de difusión y de dilución con algunas modificaciones para obtener mejores resultados.

En todos estos métodos los resultados obtenidos de las muestras evaluadas son comparados con estándares positivos que son antibióticos susceptibles a los microorganismos de prueba.

Algunos de estos métodos empleados para la evaluación antimicrobiana de extractos, fracciones o compuestos puros son los siguientes:

I. Método de difusión

a) Método de disco

b) Método del halo en placa

c) Método de cilindro

d) Método bioautográfico

II.Método de dilución

a) Método turbidimétrico

b) Método de dilución en agar

c) Método de dilución en caldo

Cada uno con sus respectivas ventajas y desventajas son utilizados para determinar la actividad antimicrobiana (Betina, 1973; Rios, 1988; Recio, 1989; MacFoy, 1990; Karting, 1991; Rojas, 1992).

Algunas de las plantas pertenecientes a la familia de las leguminosas con actividad biológica reportada, en especial la antimicrobiana se resume en el cuadro 4 (Lester, 1978; Lozoya, 1988; Schmitt, 1991; Morales, 1988; Waage, 1984; Osawa, 1992).

CUADRO 4. ESPECIES DE LEGUMINOSAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

Nombre de la planta	Parte de la planta	Tipo de extracto	Microorganismos (mg/ml)								REF.
			Sa	Ec	Sg	Kn	Ms	Ca	Bs	Pa	
Amorpha fruticosa	semillas	Etanólico	+	i	i	i	+	i			35,36
Amorpha nana	Hojas	Etanólico	+	i	i	i	+	i		+	37
Erythrina x bidwilli	raíz	Acetonico	+	+					Sm		56
Erythrina crista-galli	raíz,corteza	Etanólico	+	i	i	i	+	i		i	38,39
Erythrina milbraedii	raíz	Etanólico	+	i	i	i	+	i		i	40
Erythrina sigmoidea	corteza	Cloroformico	+					+	+		41
Flemingia stricta	raíz	hexánico	+	i	i	i	+	i		i	42,70
Glycyrrhiza lepidota	planta	Etanólico	+	i	i	i	+	+			24,43
Glycyrrhiza glabra	raíz	Etanólico	+	i	i	i	+	+			32
Glycyrrhiza glabra	hojas	Metanólico	+	i				+	+		32
Glycyrrhiza inflata	raíz	Licor	+	+				+		+	55
Indigofera microcarpa	hojas	Metanólico									71
Lasiobema japonica	hojas	Metanólico		+							73
Machaerium floribundum	corteza	Etanólico							En	Pm	44
Mimosa tenuiflora	corteza	Acuoso	+	+				+	+	+	69
Psorolea juncea	hojas	Etanólico	+				+	+			31
Prosopis juliflora	hojas		+	+		+		+	+	+	4
Swartzia polyphylla	corteza	Metanólico							Sm	Sc	57,74

(Sa)Staphylococcus aureus, (Ec)Escherichia coli, (Sg)Salmonella gallinarum, (Kn)Klebsiella pneumoniae, (Ms)Mycobacterium smegmatis, (Ca)Candida albicans (Bs)Bacillus subtilis, (Pa)Pseudomonas aeruginosa, (En)Enterobacter cloacae (Pm)Pseudomonas maltophilia, (Sm)Staphylococcus mutans,(Sc)Staphylococcus cricetus.

\+ actividad reportada

i = inactividad reportada

1.3 ANTECEDENTES BOTANICOS DE LA CORTEZA DE *Haematoxylon campechianum L.*

Haematoxylon campechianum L. pertenece a la familia de las Leguminosas, es un árbol muy apreciado que crece en las regiones trópicales de América como Honduras, Santo Domingo, Jamaica, y México; siendo el más estimado en el comercio, el originario de Yucatán, Campeche, Tabasco y Veracruz.

El hábitat de éste árbol, que se desarrolla en asociaciones casi puras llamadas tintales, son tierras húmedas y arcillosas susceptibles de inundarse periódicamente. El palo de tinte, otro nombre por el cual se le conoce, es un árbol espinoso que puede alcanzar 15 metros de altura, tiene un tronco acanalado y retorcido de 60 a 80 centimetros de diámetro; su corteza es grisácea y áspera, sus hojas compuestas y alternas están dispuestas en espiral con 304 pares de folioles sesiles. Las flores se encuentran en racimos axilares o terminales, son aromáticas por tener el cáliz color blanco púrpureo y la corda amarilla y membranosa que contiene de 1 a 2 semillas aplanadas y morenas (Echenique, 1977; Peniche, 1983).(Figura 1).

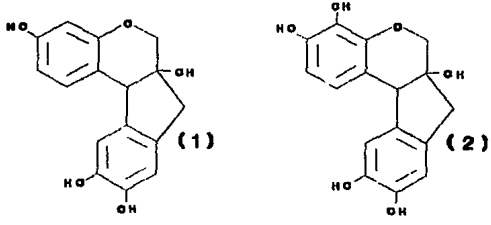
El conocimiento que el pueblo mexicano o indigena posee, se demuestra al estudiar la nomenclatura que se usa para referirse a las plantas que conoce y utiliza, la formación de nombres da lugar a una nomenclatura no solamente determinativa, sino asociada a verdaderos

Figura 1. Esquema vegetal del palo de campeche

conceptos de agrupación taxonómica.

Entre los diversos nombres que se le han dado a *Haematoxylon campechianum*, según localidades como Campeche, Tabasco y Yucatán, se encuentran los de "palo de campeche", "palo de tinte", "palo sanguineo", "palo de las indias", "palo tinto"; y en maya está registrado con el nombre de "ek" que significa el color casi negro que toma el corazón de ésta madera (Youngken, Giral, 1959, Diaz J, 1976, Barrera, 1976).

La especie ésta intimamente relacionado botanica y químicamente con *Haematoxylon braziletto*, *Caesalpinia echinata*, *Caesalpinia brasiliensis* y *Caesalpinia crista*, ya que estas 4 plantas contienen una sustancia soluble llamada brazilina (1) que es similar a la hematoxilina (2) que presenta el palo de campeche (Pratt R, 1959).



Brazilina (1) y Hematoxilina (2)

1.4 ANTECEDENTES ETNOBOTANICOS DE *Haematoxylon campechianum L.*

Una de las finalidades de la etnobotánica es la de encargarse de estudiar las plantas en relación con el uso que de ellas se obtiene.

Una de las formas más empleadas de *Haematoxylon* se prepara a partir de un extracto que es utilizado en grandes cantidades por la industria textil ya que contiene 12 % de materia colorante. Su extracto sirve para el tinte del algodón, la lana, la seda y el cuero; presentando un color amarillo rojizo al contacto de ácidos y un encarnado violeta con los álcalis, la presencia de las sales de hierro da al campeche un hermoso color negro (Gerardin, 1904).

Además de utilizarse como tinte, la hematoxilina se utiliza para preparar tintas para escribir, como indicador de ánalisis cuantitativos y en especial en trabajos de histología por la propiedad que tiene de teñir selectivamente los núcleos de las células animales (Adrosko, 1968).

El corazón de la madera constituye un producto natural oficial en la farmacopea americana, se usa como astringente, especialmente en la diarrea y disentería. Esta propiedad es ampliamente conocida en México, en donde tiene un uso local muy extendido.

Es empleado para lavarse los dientes (Martinez, 1944), e industrialmente se utiliza en la elaboración de

licores dentrificos.

La madera se ha empleado desde el pasado como leña ya que se dice que es un buen carburante.

Las semillas en ocasiones se usan como saborizantes o dulcificantes, ya que la hematoxilina aislada se caracteriza por esta propiedad (Echenique, 1977).

Es tambien empleada la madera de esta leguminosa, en la medicina tradional, en problemas relacionados con el corazón como la circulación sanguinea, varices, nervios y presión; para aumentar el número de glóbulos rojos y en problemas renales ; en baños para enfermos de tirisia (Martinez, 1936; Pahlow, 1979).

1.5 ANTECEDENTES FITOQUIMICOS DE *Haematoxylon campechianum*

Contiene aproximadamente de 10 a 12 % de taninos, su corteza es dura, pesada y compacta, de 0.95 a 1.0 de gravedad especifica. Cuando se seca al aire, su textura va de mediana a fina con grano irregular, obteniendose acabados muy lisos que se pueden pulir fácilmente. Es una madera muy fuerte, pero vidriosa y quebradiza; teniendo la ventaja de ser muy resistente a la pudrición (Echenique, 1977).

Cuando *Haematoxylon* es derribado, su tronco tiene un color cafe-amarillento, el cual al exponerse en la atmósfera desarrolla gradualmente en su superficie un color cafe-rojizo característico, la forma en la que el leño sea cortado dependerá de su uso, ya

que puede ser cortado en astillas, polvo o en trozos no tan finos.

Los extractos de *Haematoxylon*, son obtenidos por tratamiento de las astillas de la madera con agua en recipientes al vacío, concentrandose únicamente el líquido a presión muy baja. La cantidad de extracto es aproximadamente el 15 % de el peso de la madera (Romo de Vivar, 1985).

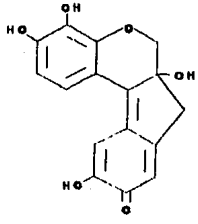
Las astillas frescas contienen de un 5 a un 10 % de componentes que varían de color; la Haematoxilina, la actual materia colorante, fue aislada por Chevreul en 1812 en forma de cristales prismáticos blancos (Bettinger y Zimmermann, 1991).

La Hematoxilina (2) es ligerammente soluble en agua fría pero es soluble en agua caliente, alcohol,éter y súlfuro de carbono; es definidamente dextrorotatoria, a 1% en solución acuosa da una rotación de 1.85 grados en un tubo de 200 mm; también reduce soluciones de Fehling, nitrato de plata en frío, da coloración rosa con el aluminio; y en contacto con hidróxidos, ésta produce ácido pirogálico, $C_6H_3(OH)_3$.

La Hematoxilina tiene propiedades de ácido débil no es un glucósido no posee poder colorante pero; en la presencia de alcalis, rápidamente absorbe oxigeno y se convierte en Hemateína, el verdadero colorante. Este cambio es llevado a cabo durante el llamado envejecimiento de la madera, proceso que consiste en

exponer los troncos humedecidos a la oxidación atmosférica en un cuarto caliente.

La Hemateina (3) se encuentra bajo la forma de cristales cafe-rojizos que son casi insolubles en agua fria, pero solubles en agua caliente o alcohol, comportándose como un ácido débil y formando sales solubles con sodio, potasio y amoniaco, los cuales dan coloraciones púrpuras.



Hemateina (3)

Los análisis elementales de Haematoxilina fueron determinados primeramente por Erdmann en el año de 1842, y más tarde fueron confirmados por Hesse y colaboradores en 1859. La estructura molecular elucidada por Perkin y Robinson en 1907 determina a la hematoxilina (1) como un polihidroxibenzindenopirano; la estereoquímica fué establecida mediante el uso de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^{1}H-NMR) la cual se

reportó en 1965 por Cymerman Craig y colaboradores; publicando el primer espectro de resonancia magnética nuclear protónica de la hematoxilina realizada en un instrumento a 60 MHz. Más tarde, en 1972 Marshall y Horobin reportan el espectro a 100 MHz, sin embargo la calidad de estos espectros fué deteriorada por signos de solventes e impurezas. En 1991, Bettinger y Zimmermann realizan un nuevo espectro para hematoxilina mediante resonancia magnética nuclear a 250 MHz en acetona-deuterada (**figura 2**) (Bettinger y Zimmermann, 1991).

En este último trabajo se reportó el espectro de luz visible y de ultravioleta de la Hematoxilina (**figura 3**) y de la Hemateína en Metanol (**figura 4**), y Agua destilada a diferentes valores de pH, en donde se calculó el coeficiente de extinción molar en bandas de absorción de longitud de onda a 292 nm en Metanol a 25°C; valores de pKa para la primera disociación ácida dependiendo de las soluciones buffer tomadas para el espectro de absorción.

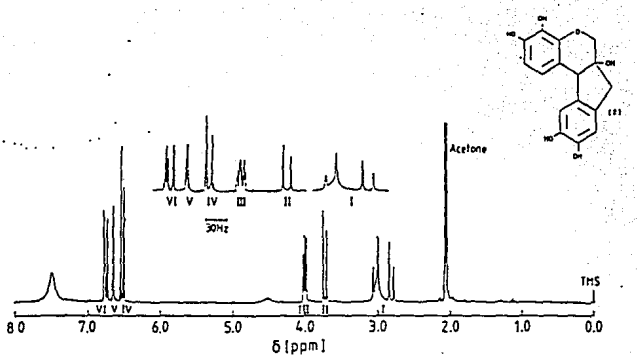


Figura 2. Espectro 1H-MNR de Hematoxilina.

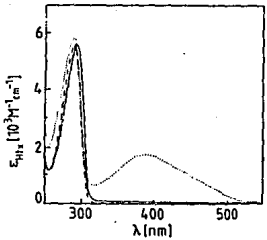


Figura 3. Espectro visible-ultravioleta de Hematoxilina

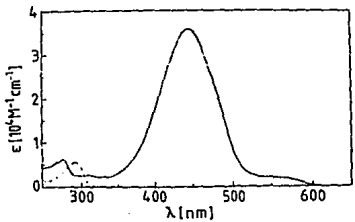
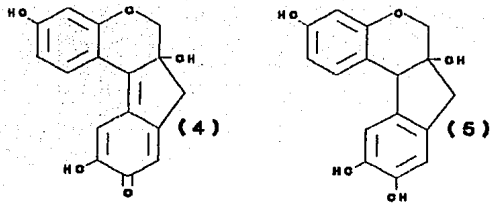


Figura 4. Espectro visible-ultravioleta de Hemateína

1.6 ANTECEDENTES DE EVALUACIONES BIOLOGICAS

En el año de 1953, en el Instituto Politécnico Nacional se realizó un trabajo cuyo objetivo fué el de reportar la evaluación de un estudio de propiedades antibacterianas de 9 tipos de extractos crudos, efectuados en cada una de 5 especies de plantas contra cepas bacterianas, entre ellas *Haematoxylon* sp. Sin embargo, la especie de ésta corteza no está determinada botánicamente y el disolvente con el cual se preparó el extracto fué éter (Mendez, 1953). Este trabajo de tésis da como información que en 1952 se aisló ETIL GALATO a partir del extracto etílico de *Haematoxylon campechianum* y que este compuesto presentó una pronunciada actividad antagónica contra *Mycobacterium tuberculosis* (Little, 1952).

Más tarde es estudiada la corteza Mexicana de *Haematoxylon braziletto* por Pratt y colaboradores a partir de un extracto acuoso, obteniendo una sustancia que a determinadas concentraciones era bactericida para *Salmonella typhosa* ATTC 6539 *y Micrococcus pyogenes* var *aureus,* y que es considerado como bacteriostático para *Escherichia coli* ATTC 6522. En esta investigación el principio activo no fué identificado , pero se sugirió que la acción bactericida se presentaba debido al pigmento que esta corteza contiene, la Brazileina (4) o su derivado la Brazilina (5) (Pratt, 1959).



Brazileína (4) y Brazilina (5)

En 1977, en el Instituto farmacéutico de la Universidad de Tohoku, Japón es estudiada *Haematoxylon campechianum* junto con *Caesalpinia sappan* Linné (Leguminosae), para ser evaluadas con respecto a procesos antiinflamatorios ya que ambas son utilizadas en medicina tradicional oriental en ese sentido (Hikino, 1977).

De la madera de *Caesalpinia* obtienen la brazileina (4) y de la de *Haematoxylon* obtienen la hematoxilina (2), ambas son evaluadas mediante el método del huevo fertil descrito por D'arcy y Howard en 1967 (Hikino, 1977).

1.7 USOS ACTUALES DE LA CORTEZA *H. campechianum*

Actualmente la corteza se vende en los mercados de la ciudad de México donde se sigue utilizando por sus propiedades como antidiarréico y astringente.

En los pueblos indígenas es mas utilizado como materia prima para sacar colorantes y teñir la hilaza con la que se hacen infinidad de artesanías.

El uso principal de esta especie estriba en la obtención de Hematoxilina, colorante muy utilizado en la histología vegetal y aún animal para la tinción de placas (García, 1974).

Se utiliza la corteza que es muy resistente para construcciones nativas o como carburante (Martínez, 1969).

Haematoxylon campechianum, ha tenido importancia medicinal en muchos países y ha sido estudiada desde épocas muy antiguas, evidencia de ésto se encuentra en el ARCHIVO GENERAL DE LAS INDIAS de SEVILLA en 1577 (Peniche R, 1983). La información de los principales usos terapéuticos y componentes químicos atribuidos a ésta planta se muestran en el cuadro 5:

CUADRO 5. HAEMATOXYLON CAMPECHIANUM L . (LEGUMINOSAE)

NOMBRES COMUNES	COMPONENTES QUIMICOS	PARTE UTILIZADA	USOS
Palo de campeche	Hematoxilina	corazón de la	Astringente
Leño de campeche	Aceite volátil	madera	Antidiarreico
Palo sanguíneo	Taninos		Tinte,colorante
Palo de las indias	Huellas de hemateína		Dulcificante
Palo de nicaragua	Oxalato de calcio		Usos de corteza
Palo tinto	Hematoxylol		
ek (maya)			
Logwood (inglés)		Semillas	Saborizante

(García, 1974; Youngken, 1959; Hernández, 1989; Cymerman, 1965).

II JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

Es inevitable negar el hecho de que en México existe una gran variedad de plantas con un amplia diversidad genética que aún no han sido investigadas y que pueden contener metabolitos secundarios con propiedades medicinales. Muchas de estas plantas en la actualidad tienen un amplio uso popular para el cuidado de la salud; si le sumamos, el hecho de que la mayor parte de esta información se ha transmitido de generación en generación por curanderos , sacerdotes, hechiceros y determinados individuos que estan en contacto con la naturaleza, se destaca la necesidad e importancia de rescatar y validar dicha información.

El estudio de las plantas medicinales contribuye a su vez a la obtención de principios activos nuevos o conocidos, con los cuales se pueden sustituir importaciones de materias primas; a su vez, se aportan conocimientos que ayudan no sólo al avance de la medicina, sino también al desarrollo de nuevas series de compuestos sintéticos más efectivos y menos tóxicos.

Uno de los propósitos fundamentales en toda investigación fitoquímica es el aislamiento de constituyentes nuevos y principios activos. Sin embargo, los metabolitos bioactivos algunas veces son difíciles de aislar y con frecuencia un gran número de compuestos obtenidos no presentan ningún tipo de actividad

biológica.

Debido al elevado costo de operación, al prolongado tiempo de ejecución, y a la controversia suscitada por el empleo de animales de laboratorio en los ensayos *in vivo*, en la última década la necesidad de desarrollar nuevos métodos para la detección preliminar de compuestos bioactivos constituye uno de los retos más importantes para las investigaciones biológicas.

En consecuencia, se han incorporado a los estudios fitoquímicos convencionales técnicas sencillas que permiten la evaluación de la actividad del extracto orgánico vegetal y, de esta manera, la detección preliminar de metabolitos secundarios bioactivos. De tal suerte, que la actividad biológica de la planta en estudio puede ser analizada al inicio y durante todo el proceso de fraccionamiento para poder, así, identificar a los compuestos responsables de ésta.

La utilidad de estos bioensayos radica en que representa una metodología de fácil implementación, bajo costo, alta capacidad de operación y de rápidez en la obtención de resultados.

Finalmente el conocimiento del potencial económico de nuestros recursos, en este caso, el potencial terapéutico de las plantas medicinales, contribuye como un mecanismo de preservación de nuestros recursos naturales y del ecosistema al cual pertenecemos.

El objetivo del presente trabajo es determinar la actividad antimicrobiana y la toxicidad contra el crustáceo *Artemia salina* (Leach), de los extractos metanólico, clorofórmico, hexánico y de acetato de etilo de la corteza de *Haematoxylon campechianum*.

Los objetivos pertinentes para el cumplimiento de las metas propuestas son los siguientes:

- Realizar una revisión bibliográfica que comprende la información de la corteza de *Haematoxylon campechianum*.
- Determinar el extracto que demuestre actividad antimicrobiana y toxicidad contra el crustáceo *Artemia salina* (Leach).

II PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAL VEGETAL

Se utiliza corteza de *Haematoxylon campechianum* obtenida en el mercado de Sonora de la ciudad de México en Abril de 1992, e identificada por comparación con la colección de cortezas de utilidad medicinal del Dr. Robert Bye, Investigador del Jardin Botánico del Instituto de Biología de la UNAM.

3.2 BIOENSAYO DE LA TOXICIDAD (*Artemia salina* Leach.)

3.2.1 PREPARACION DE LA MUESTRA

El extracto de prueba se prepara disolviendo 20 mg de extracto concentrado en 2 ml de disolvente apropiado. Se transfieren a viales en forma independiente 500, 50, y 5 mcl de la solución original, con la finalidad de obtener concentraciones de 1000, 100 y 10 mg al final del ensayo. Se deja evaporar el disolvente durante 24 hrs. La evaluación de las muestras se realiza por triplicado.

3.2.2 ENSAYO CITOTOXICO CON EL CRUSTACEO

Los huevecillos de *Artemia salina* se colocan en agua salada a una temperatura de 25°C y bajo la luz artificial, durante 48 horas.

Las larvas en crecimiento (10 especímenes) son

depositadas en cada uno de los viales aforando con agua salada hasta 5 ml. Se dejan reposar bajo las mismas condiciones de crecimiento y transcurridas 24 horas, se registra la cantidad de organismos sobrevivientes y se determinan los valores de concentración letal media (Cl_{50}) mediante el método estadístico Finney utilizando un programa de cómputo.

3.3 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La evaluación preliminar del potencial antimicrobiano del extracto original, así como de cada una de las diferentes fracciones obtenidas durante los procedimientos de separación, se realiza utilizando las técnicas microbiológicas cualitativas de difusión en agar (Hufford, 1975).

3.3.1 MICROORGANISMOS DE PRUEBA.

Las siguientes cepas se utilizan como organismos de prueba para las evaluaciones primarias y secundarias:

Microorganismos	ATCC* No.	Clasificación
Bacillus subtilis	6633	Gram positivo
Staphylococcus aureus	6538	Gram positivo
Escherichia coli	8739	Gram negativo
Pseudomona aeruginosa	9739	Gram negativo
Candida albicans	10231	Levadura

* ATCC (American type culture collection)

3.3.2 PREPARACION DE LOS INOCULOS

Las bacterias empleadas en estos estudios, se prepararan mediante incubación en caldo nutritivo (Bioxon) durante 24 horas a 37°C. *Candida albicans* se cultiva en caldo glucosa 2% Saboraud (Bioxon) y se incuba por 48 horas a 28°C (Hernández, 1991).

La concentración final de microorganismos en cada uno de los cultivos preparados se ajusta mediante una dilución en solución salina isotónica (NaCl 0.9%) hasta obtener la mitad de la turbidez equivalente al estándar No. 1 de McFarland (0.1 ml de $BaCl_2$ 1% y 9.9 ml de H_2SO_4 1%) (Barley, 1986), correspondiente a un número aproximado de 10^8 celulas/ ml (Rojas, 1991).

3.4 ANALISIS CUALITATIVO ANTIMICROBIANO

3.4.1 PREPARACION DE LA MUESTRA

Las muestras a evaluar se suspenden en una solución acuosa de tween 80 al 1%, con un poco de calentamiento.

Los extractos y las fracciones se evaluan a una concentración de 100 y 50 mg/ ml, respectivamente.

Los controles positivos se prepararan utilizando 1 mg/ml de sulfato de estreptomicina y 30 mg/ml de nistatina en solución acuosa.

3.4.2 PROCEDIMIENTOS DE ENSAYO

Un mililitro de la suspensión bacteriana se siembra de manera uniforme en cada caja petri de prueba, conteniendo 15 ml de agar-antibiotico no.1 o agar sabouraud según fuera requerido. Con un oradador cilíndrico se remueve el agar de las placas para producir tres perforaciones de un diámetro aproximado de 11 mm.

Posteriormente, se adicionan 100 μl de el control positivo en una de las perforaciones; 100 μl y 50 μl de la solución muestra se adiciona de manera independiente en las cavidades restantes. Las placas así preparadas se mantienen por un periódo de 1 a 2 horas a temperatura ambiente para facilitar la difusión de las muestras. Tanscurrido ese tiempo, las placas se incuban por 24 horas a 37°C para las bacterias y durante 48 horas a 28°C para la levadura. Para cada muestra de prueba el ensayo se realiza por duplicado.

La actividad antimicrobiana se registra midiendo el diámetro, en mm, de la zona de inhibición que circunda a cada una de las perforaciones.

3.5 ENSAYO PRELIMINAR DE LOS EXTRACTOS

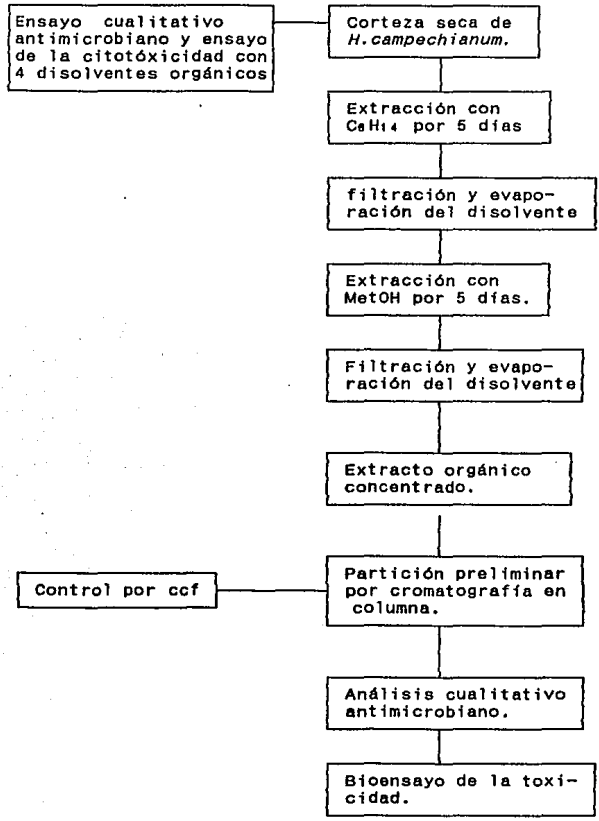
5 g de corteza de *H. campechianum* triturada en un molino de cuchillas tipo Willey Mill, se reparte en 4 matraces pequeños y se tratan por maceración exhaustiva con metanol, acetato de etilo, hexano y

cloroformo. El disolvente de extracción se decanta y se concentra a presión reducida.

Se realiza la evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana y la evalución citotóxica con el crustáceo *Artemia salina* (Leach) de cada uno de los extractos obtenidos.

3.6 EXTRACCION DEL MATERIAL VEGETAL, ELABORACION DEL EXTRACTO ORGANICO

3.0 kg de corteza seca de H. campechianum se trituran en un molino de cuchillas tipo Willey hasta obtener un polvo muy fino, el material vegetal se macera con Hexano durante 5 días a temperatura ambiente para eliminar las grasas y posteriormente con metanol durante el mismo periódo. El disolvente de extracción se decanta y se filtra para ser concentrado a presión reducida. El procedimiento efectuado se resume en el esquema 1.



Esquema 1. Estrategia propuesta para el estudio fitoquímico convencional de *H.campechianum.*

3.7 RESOLUCION DEL EXTRACTO MEDIANTE PARTICION CROMATOGRAFICA.

Una porción del extracto se fracciona en una columna empacada con 875 g de gel de sílice, utlizando como sistema de elución una mezcla de Hexano - AcOEt de polaridad creciente. Los eluatos de 500 ml cada uno se concentran a baja presión hasta sequedad, recuperándose con un poco de solvente hasta dejar evaporar.

Los eluatos seran analizados en cromatografía en capa fina (Merck), reuniendo los que presenten semejanza y homogeneidad en los constituyentes.

IV RESULTADOS

La actividad antimicrobiana de la corteza de *Haematoxylon campechianum* fué evaluada a partir de los extractos metanólico, clorofórmico y de acetato de etilo mediante el método de difusión en agar. Los resultados de esta prueba preliminar estan resumidos en la **tabla 6.**

La citotoxicidad con el crustáceo *Artemia salina* evaluada con los cuatro extractos concentrados, queda resumida en la **tabla 7**, indicándose la concentración letal para cada extracto evaluado.

A partir de extracto Metanólico concentrado, se procedió a separar mediante un fraccionamiento en columna de sílica gel (**tabla 8**), se tomaron fracciones representativas de los eluatos combinados y se evaluaron nuevamente mediante el método de difusión en agar (parte experimental 3.3) para comprobar su actividad antimicrobiana (**tabla 9**) y, su potencial citotóxico, con el crustáceo *Artemia salina* (parte experimental 3.2).

CUADRO 6. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *H. campechianum* POR EL METODO DE DIFUSION EN AGAR *

EXTRACTO	MeOH		$CHCl_3$		AcOEt		**ESTANDAR
CONCENTRAC. mcg/ml MICROORGANISMOS	100	50	100	50	100	50	100
B.subtillis	8	6	6	4	10	6	10
S. aureus	20	10	6	4	10	8	12
E. coli	-	-	-	-	-	-	10
P.aeuroginosa	-	-	-	-	-	-	10
C.albicans	-	2	3	2	-	-	20

* Los datos son expresados en milimétros de zona de inhibición.

** El estándar utilizado para los primeros 4 microorganismos es el sulfato de estreptomicina; para *C. albicans* se utiliza nistatina.

CUADRO 7. CITOTOXICIDAD CON EL CRUSTACEO *Artemia salina* Leach.*

EXTRACTO HEXANICO

Planta	*H. campechianum*		
FRACCION P.P.M.	1000	100	10
	0	8	10
	2	7	10
	0	6	10
CL50	178.63		

EXTRACTO METANOLICO

Planta	*H. campechianum*		
FRACCION P.P.M.	1000	100	10
	0	6	7
	3	6	6
	3	5	8
CL50	88.25		

EXTRACTO CLOROFORMICO

Planta	*H. campechianum*		
FRACCION P.P.M.	1000	100	10
	8	5	7
	6	6	10
	7	7	10
CL50	>1000		

EXTRACTO ACET. DE ETILO

Planta	*H. campechianum*		
FRACCION P.P.M.	1000	100	10
	4	7	9
	2	8	10
	5	8	10
CL50	479.91		

* Los datos registrados son de los crustáceos sobrevivientes

CUADRO 8. FRACCIONAMIENTO DE EL EXTRACTO METANOLICO DE *H. campechianum* MEDIANTE CROMATOGRAFIA EN COLUMNA (CC).

Sistema de elución(CC): C_6H_{14}-AcoEt	No.de eluatos	Sistema de elución (CCF):	eluatos combinados
100 : 0	1 - 11	HEX-CCL_3 (95:5)	1-6, 9-11
90 : 10	12-23	HEX-AcOET-CCL_3 (1:80:20)	12-19,20-23
80:20	24-36	AcOET-CCL_3 (80:20)	20-26,27-30 30-36.
70:30	37-361	(80:20)	37-40,41-56 57-65,66-83 83-89,90-98 99-104, 105-108, 109-128, 129-279, 280-288, 289-323, 324-350, 351-373.
60:40	362-381	AcOET-CCL_3 (80:20)	374-389.

CUADRO 8. FRACCIONAMIENTO DE EL EXTRACTO METANOLICO DE *H. Campechianum* MEDIANTE CROMATOGRAFIA EN COLUMNA (CC). (CONTINUACION)

sistema de elución (CC) C_6H_{14}-AcoEt	No.de eluatos	Sistema de elución (CCF)	eluatos combinados
50:50	388-462	AcOEt-CCl_3-MetOH (80:10:10)	390-406, 407-415, 416-420, 421-428.
40:60	462-470	(80:10:10)	429-475.
0:100	470-564	(80:20)	476-489, 490-509, 510-530, 531-532, 533-547, 548-554, 555-564.
AcOEt:MetOH 50:50	565-578	(80:20)	565-568, 569-571, 572-577, 578.

CUADRO 9. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y EL POTENCIAL CITOTOXICO DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DEL EXTRACTO METANOLICO DE *H. Campechianum*'

MICROORGANISMOS	*B. subtilis*			*S. aureus*			*A.salina*
FRACCIONES	100	50 (mcg/ml)	STAND	100	50 (mcg/ml)	STAND	CL_{50} (P.P.M.)
105	12	**	25	**	13	14	>1000
129	24	18	28	24	22	25	77.14
374	15	13	33	20	18	30	>1000
390	12	-	30	14	12	24	>1000
429	-	-	32	-	-	25	>1000
532	12	-	23	14	-	16	>1000
555	13	-	23	15	12	21	>1000
569	-	-	20	-	-	12	>1000

* Los datos son expresados en milimétros de zona de inhibición.
** El halo de inhibición no se pudo medir.
\- Hubo crecimiento alrededor de la perforación.
El estándar utilizado para ambos microorganismos es el sulfato de estreptomicina.

V DISCUSION Y CONCLUSION DE RESULTADOS

Con la finalidad de obtener constituyentes bioactivos de la corteza de *Haematoxylon campechianum* se preparon cuatro extractos de la planta: metanólico, hexánico, clorofórmico y acetato de etilo; los cuales fueron evaluados biológicamente mediante la determinación de la toxicidad para *Artemia salina* de acuerdo a la metodología descrita por Meyer en 1982, y la determinación de la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar (Hufford, 1975). Los resultados de ésta prueba preliminar, que fueron expresados en milimetros de inhibición, demostraron que el extracto que presentó una notable actividad antimicrobiana en contra de las bacterias grampositivas *S. aureus y B. subtilis* es el metanólico por comparación con el halo de inhibición presentado por el estándar de estreptomicina. El extracto de acetato de etilo y el clorofórmico presentaron una inhibición considerablemente menor (tabla 6).

En cuanto a la evaluación de la toxicidad contra el crustáceo *A. salina* de los cuatro extractos concentrados, nuevamente el más activo resultó ser el preparado con metanol. Estos resultados se encuentran expresados en términos de la dosis letal media (Tabla 7)

Las técnicas de evaluación seleccionadas ofrecen las ventajas de ser rápidas, de bajo costo y requerir de poca cantidad de muestra.

La determinación de la toxicidad para *A. salina* se ha empleado en varias ocasiones como guía para conducir el fraccionamiento y aislamiento de sustancias bioactivas, las cuales en múltiples ocasiones han mostrado citotoxicidad in vitro para células cancerígenas (Anderson, 1991), actividad antihelmíntica, (Camacho, 1990) y antipalúdica (Hui, 1989; Hostettmann, 1982).

En lo que se refiere a la determinación de la actividad antimicrobiana, los microorganismos de prueba empleados se eligieron de acuerdo a criterios convencionales (Hernández, 1991), con excepción de *Bacillus subtilis* todos los demás microorganismos son huéspedes normales del hombre aunque bajo ciertas condiciones pueden llegar a presentar cierta patogenicidad (Jiménez, 1992).

En virtud de estos resultados se decidió tratar la corteza con metanol, previo desengrase con hexano durante 5 días obteniéndose un aceite amarillento que no se estudió por presentar un escaso rendimiento.

El extracto Metanólico (80.5 g) concentrado, de la corteza de *Haematoxylon campechianum*, se procedió a purificar mediante un fraccionamiento en columna de silica gel, la elución de la columna se realizó con

hexano y acetato de etilo en diferentes proporciones obteniéndose un total de 578 fracciones de 500 ml cada una, las cuales se concentraban a presión reducida y se sometían por comparación en cromatografía en placa, juntando los eluatos que presentaban semejanza y homogeneidad (tabla 8).

Se tomaron fracciones representativas de los eluatos combinados y se evaluaron nuevamente mediante el método de difusión en agar para comprobar actividad antimicrobiana (Ver Parte experimental 3.3) y, la evaluación citotóxica, con el crustáceo *A. salina* (parte experimental 3.2). Esta permitió observar que la fracción 129 presentó una mejor actividad para los dos ensayos realizados (tabla 9).

La corteza de *Haematoxylon campechianum* presenta una amplia actividad antimicrobiana, comparado con el estándar de estreptomicina. Así mismo todos los extractos de ésta corteza, incluyendo el etéreo (Madronio, 1953) y el acuoso, presentan un efecto significativo sobre bacterias gram positivas principalmente.

Este análisis permite detectar cualitativamente que, efectivamente, ésta leguminosa pueda ser considerada por su actividad demostrada como antimicrobiana. Información útil y necesaria para que en estudios posteriores sea posible aislar el componente fitoquímico responsable de dicha actividad.

El bioensayo de *H. campechianum* con el crustáceo *Artemia salina* (Leach) demostró un cierto potencial significativo tóxico en sus tres concentraciones, implicando que ésta corteza pueda presentar una correlación con otras actividades más complejas como las citotóxicas, antihelmínticas y antipalúdicas.

Finalmente los resultados obtenidos en el presente estudio fitoquímico preliminar del contenido metabolico de ésta especie, permiten recomendar la realización de estudios adicionales que contribuyan a complementar el perfil químico de *Haematoxylon* y, de manera especial, a aquellos enfocados a la evaluación de otro tipo de actividades biológicas que justifiquen, en cierta medida, las aplicaciones en la medicinal tradicional de las infusiones preparadas a partir de ésta especie medicinal.

VII B I B L I O G R A F I A .

1 Adrosko, R.J. (1968). *NATURAL DYES IN THE UNITED STATES* . United states national museum bulletin 281 . Smith sonian institution press city of Washington Pág. 45-47.

2 Anderson, J.E.; Cang,C.J.; Smith, D.L.; McLaughlin, J.L. (1989). *J.NAT.PROD.* 52, 1263- 66.

3 Anderson, J.E.; Goetz, G.E.; McLaughlin, J.L. (1991). *PHYTOCHEMISTRY ANNAL.* 2, 107-108.

4 Aqeel, A. (1989). Antimicrobial activity of julifloricine isolated from Prosopis juliflora. *Arzneim.Forsch,* 39, (1) 652-55.

5 Areekul; Harwood, R.F. (1960). *J. AGRIC. FOOD. CHEM.* 8, 32-33.

6 Barrera, M.A.; Barrera, A.V.; Lopéz, F. (1976). *NOMENCLATURA ETNOBOTANICA MAYA.* Colección científica etnología, INAH. México, Pág 537.

7 Bastón, C.N. (1993). Tesis de Licenciatura. "Estudio fitoquímico de *Tephorosia mexicana* (Leguminosae)". Facultad de Química, Universidad Veracruzana.

8 Barley, (1986). *DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY* CV. Mosby company, Saint Louis, Pág. 175-800.

9 Betina, A. (1973). *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY* 78, 41-51.

10 Bettinger, CH. ; Zimmermann, H.W. (1991). New Investigations on Hematoxylin, hematein, and hematein-aluminium complexes. *HISTOCHEMESTRY,* 95, 279-288.

11 Biyiti, L.; Pesando D.; Puiseux-Dao. (1988). Antimicrobial activity of two flavanones isolated from the cameroonian plant Erythrina sigmoidea. *PLANTA MEDICA*, 126-28.

12 Brown, R.F.; Wildman, J.D.; Eppley, R.M. (1968). *J. ASSOC. OF ANAL. CHEM.* 51, 905.

13 Cabrera, L.G. (1984). *PLANTAS CURATIVAS DE MEXICO.* 2da edición. Libro-Mex editores, México, Pág.171.

14 Camacho, C.M.R. (1990). Tésis de Maestría, "Nuevos metabolitos secundarios de la Hintonia latiflora y aislamiento de compuestos bioactivos de Teloxys graveolens". Facultad de Química, U.N.A.M.

15 Claus, E.P.; Tyler, V.E. (1968). *FARMACOGNOSIA*, 5ta edición. Ed.El Ateneo, Argentina. Pág.135-38.

16 Cymerman, C.J.; Pratt, R.; Naik, A.R. (1965). Nuclear magnetic resonance spectra and stereochemistry of the Antibacterial principle from Haematoxylon braziletto. *J.ORG.CHEM.* 30, 1573-1576.

17 Echenique Manrique.; Amo S del. (1977). *INIREB-INFORMA* Comunicado 17. Palo de campeche.

18 García, B.H. (1974). *FLORA MEDICINAL DE COLOMBIA*, Tomo 1. Botánica Médica, Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional. Bogota, Colombia. Pág.459-60.

19 Gerardin, L. (1904). *LAS PLANTAS*, 4ta edición. Librería de la viuda de Ch.Bouret, Páris.

20 Habtemariam, S.; Gray, A.I.; Halbert, G.W. y Waterman, P.G. (1990). *PLANTA MEDICA*, 56, Pág.187.

21 Harborne, J.B.; Boulter, D. y Turner, B.L. (1971). CHEMATOXOMY OF THE LEGUMINOSAE, Academic Press, London, N.Y.

22 Hernández de Jésus, M.L. (1991). Tésis de Maestría, "Estrutura y estereoquímica de la Pectinólida, una nueva pirona con propiedades antimicrobianas de Hyptis pectinata (L) Poit." Facultad de Química, U.N.A.M.

23 Hernández, P.R.; Rivero, R. A. (1989). Tésis de licenciatura, "Plantas Medicinales de los Géneros *Acacia y Mimosa* (Leguminosae) utilizadas en Medicina tradicional Mexicana." Facultad de Química, U.N.A.M.

24 Hiroshi, F.; Goto, K.; y Tabata, M. (1988). Two antimicrobial flavanones from the leaves of Glycyrrhiza glabra, *CHEM. PHARM. BULL.* 36, (10) 4174-76.

25 Hikino, H.; Taguchi, T.; Fujimura, H. (1977). Antiinflamatory principles of Caesalpinia sappan wood and of Haematoxylon campechianum wood, *PLANTA MEDICA.* 31, 214-220.

26 Hostettmann, K.; Kiso, H.; Tamimori, T. (1982). *PLANTA MEDICA.* 44, 34- 37.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

27 Hui, V.H.; Rupprecht, J.K.; Liu, Y.; Anderson, J.; Smith, D.E.; McLaughlin, J.L. (1989). *JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS*. 52, 463-466.

28 Hufford, C.D.; Funderburk, M.J.; Morgan, J.M. ; y Robertson, L.W. (1975). *J. PHARM. SCI*. 64, 789.

29 Jiménez, A.M.A. (1992). Tésis de Maestría, "Reinvestigación Química y Biológica de la planta medicinal Ratibida latipallaris Richards. Aislamiento e identificación de un polialcohol de las fracciones de mayor polaridad de Cigarrilla mexicana", Facultad de Química, U.N.A.M:

30 Joklik, W.K.; Willet, H.P.; Amos, D.B. ; Zinsser. (1983). *MICROBIOLOGIA*. 17a edición, Editorial Panamericana, Buenos Aires. Pág.924.

31 Kartnig, T.; Still, F.; Reinthaler, F. (1991). *JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY*. 35, 155-257.

32 Kenzo, O.; Tamura, Y.; Yamamoto, M. (1989). Identification of antimicrobial and antioxidant constituents from licorice of Russian and Xinjiang origin, *CHEM.PHARM.BULL*. 37, (9), 2528-30.

33 Kighorn, A.D.;Marjes, K.K.; Doorenbos, N.J. (1989), *J.PHARM, SCIENCE.* 66, 1329-32.

34 Kumate J. (1979). *ANTIBIOTICOS Y QUIMIOTERAPICOS.* Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, México.

35 Lester, A.M.; Han, P.Y.; Al-Shamma, A. (1981). Amorfrutin A and B, bibenzil antimicrobial agents from Amorpha fruticosa. *PHYTOCHEMISTRY.* 20, (4) 781-785.

36 Lester, A.M.; Al-Shamma, A.; Haas, T. (1979). Antimicrobial agents from higher plants. A new rotenoid, 11-Hydrixitephrosin, from Amorpha fruticosa. *HETEROCYCLES.* 12, (8), 1033-1035.

37 Lester, A.M.; Rao, G.S.; Drake, S. (1985). Amorphastilbol, an antimicrobial agent from Amorpha nana. *PHYTOCHEMISTRY.* 24, (7), 1481-1483.

38 Lester, A,M.; Ward, J.A.; Drake, S. (1984). Antimicrobial agents from higer plants. Erycristagallin, a new pterocarpene from the roots of the bolivian coral tree, Erythrina crista-galli. *HETEROCYCLES.* 22, (8), 1673-75.

39 Lester, A,M.; Gollapudi,S.R.; Gerlach, D.C. (1988). Erycristin, a new antimicrobial petrocarpan from Erythrina crista-galli. *PHYTOCHEMISTRY*. 27, (2), 381-85.

40 Lester, A.M.; Okwute, S.K.; Gollapudi, S.R. (1988). Antimicrobial pterocarpans of nigerian Erythrina mildbraedii. *PHYTOCHEMISTRY*. 27, (11), 3449-52.

41 Lester, A.M.; Gollapudi, S.R.; Khanna, I.K. (1985). Antimicrobial agents from higher plants: Activity and structural revision of flemiflavanone-D from Flemingia stricta. *PHYTOCHEMISTRY*. 24, (12), 2885-87.

42 Lester, A.M.; Raghav, R.G.; Khanna, I. (1983). Antimicrobial agents from higher plants: Prenylated flavonoids and other phenols from Glycyrrhiza lepidota. *PHYTOCHEMISTRY*. 22, (2), 573-76.

43 Lester, A.M.; Han, P.Y.; Omoto, S. (1978). Antimicrobial agents from higher plants, Glycyrrhiza glabra L. *HETEROCYCLES*. 9, (11), 1533-37.

44 Lozoya, X.; Navarro, V. (1989). Experimental evaluation of Mimosa tenuiflora, screening of the antimicrobial propierties of bark extracts. *ARCHIV.INVEST. MED.* 20, 87-93.

45 Macfoy, C.A.; Cline, E.I. (1990). *JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY.* 28, 323-327.

46 McLaughlin, J.L. (1989). *WORKSHOP OF BIOASSAYS: AN INTRODUCTION.* Memorias de la XXX reunión anual de la sociedad Norteamericana de Farmacognosia.

47 Marles, J.R.; Farnsworth, N.R.; Neil, D.A. (1989). *J.NAT.PROD.* 52, 261-64.

48 Martinez, M. (1936). *PLANTAS UTILES DE MEXICO,* 2da edición. Editorial Botas, México.

49 Martínez, M. (1944). *LAS PLANTAS MEDICINALES DE MEXICO,* 3ra edición. México,D.F Pág.201.

50 Martínez, M. (1969). *LAS PLANTAS MEDICINALES DE MEXICO,* 5ta edición. Editorial Botas, México D.F. Pág. 656.

51 Mendieta, R. (1981). *PLANTAS MEDICINALES DE EL ESTADO DE YUCATAN.* 1ra edición , CECSA, México. Pág.167.

52 Mendez, P. M. Tésis de licenciatura, (1953). "Propiedades antimicrobianas de algunos extractos de plantas." ENCB, I.P.N. México.

53 Meyer, B.N.; Ferringi, N.R.; Putnam,J.E.; Jacobsen,L.B. (1982). Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents, *PLANTA MEDICA*. 45, 31-34.

54 Michael, A.S. ; Thompson, C.G.; Abromovits, M. (1956). *SCIENCE*. 123, 454-55.

55 Morales, E.S.; Bieber, L.W.; Chiappeta, A.A. (1988). Arylbenzofurans from Indigofera microcarpa. *PHYTOCHEMESTRY*. 27, (6), 1817-19.

56 Munekazu, I.; Tanaka, T.; Mizuno, M. (1992). Phenolic Constituents in Erythrina X bidwilli and their activity against oral microbial organisms. *CHEM. PHARM, BULL*. 40 (10), 2749-52.

57 Osawa, K.; Yasuda, H. ; Maruyama, T. (1992). Isoflavanones from the heartwood of Swartzia polypylla and their antimicrobial activity against cariogenic bacteria, *CHEM.PHARM.BULL*. 40, (11), 2970-74.

58 Pahlow, M. (1979). *EL GRAN LIBRO DE LAS PLANTAS MEDICINALES*. 3ra edición. Editorial Everest, España.

59 Peniche, R.P. (1983). *BIOTICA. INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES SOBRE RECURSOS BIOTICOS*. Xalapa, Ver. México. Vol.8 Num,1 Pág. 17.

60 Polhill, R. ; Raven P. (1981). *ADVAANCES IN LEGUME SYSTEMATICS*. Royal Botanic Gardens, Kew Botanic Gardens, Kew. Gran. Bretaña. Part I. Pág.425.

61 Pratt, R.; Yuzuriha, Y. (1959). Antibacterial activity of the heartwood of Haematoxylon braziletto. *JOURNAL OF THE AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION*. 48, (1), 69-72.

62 Rakoff, H.; Rose, N.C. (1985). *QUIMICA ORGANICA FUNDAMENTAL*. 9na reimpresión. Editorial Limusa, Máxico. Pág.624.

63 Rios, J.L. Recio, M.C; Villar, A. (1988). *JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY*, 23, 127- 149.

64 Recio, M.C.; Rios, J.L.; Villar, A. (1989). *PHYTOTHERAPY* 3, 77-80.

65 Richter, J.A.; Goldstein, A. (1970). *PSYCHOPHARMACOLOGY* 17, 327-330.

66 Robinson, A.B.; Manly, R.F.; Anthony, M.P. (1965). *SCIENCE*. 49, 1255-1260.

67 Rojas, A.; Hernández, L.; Pereda-Miranda, R.; Mata, R. (1992). *JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY*, 35, 275-283.

68 Romo de Vivar, A. (1985). *PRODUCTOS NATURALES DE LA FLORA MEXICANA*. Editorial Limusa, México.

69 Schmitt, A.; Telikepalli, H.; Lester, A.M. (1991). Plicatin B, The antimicrobial principle of Psorolea juncea. *PHYTOCHEMISTRY*. 30, (11), 3569-70.

70 Sitharaghav, R.G.; Telikepalli, H. (1989). Glepidotin C : A minor antimicrobial bibenzil from Glycyrrhiza lepidota. *PHYTOCHEMISTRY*, 28, (12), 3556-57.

71 Tetsuo, I.; Kawasaki, J.; Hase, T. (1990). An acylated flavonol glycoside from Lasiobema japonica. *PHYTOCHEMISTRY*, 29, (3), 1013-14.

72 Trease, G.E. , Evans W.C. (1987). *TRATADO DE FARMACOGNOSIA*. 12da edición. Editorial interamericana, México.

73 Waage, S.K.; Hedin, P.; Grimley, E. (1984). A Biologically-active procyanidin from Machaerium floribundum. *PHYTOCHEMISTRY*, 23, (12), 2785-87.

74 Waage, S.K.; Hedin, P. (1985). Quercetin 3-O Galactosyl (1-6) glucoside, a compound from narrowleaf vetch with antibacterial activity. *PHYTOCHEMISTRY*. 24, (2), 243-45.

75 Wilmont, D.E.; Martin, D.F. (1979). *JOURNAL PHARMACEUTICAL SCIENCE*. 68, 965-968.