



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

CAMPUS "IZTACALA"

400282



61060

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
DE LA RAIZ DE *Buddleia cordata*

B01224/96

Ej. 2

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

ELSA HAIDE ORTIZ ZEPEDA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Dedico la presente tesis a mi familia la cual me ha apoyado siempre para la conclusión de mi carrera, es decir a

mi padre JAIME ORTÍZ HERMANDEZ,

mi madre MARGARITA ZEPEDA Y MALAGON,

mi hermana CYNTHIA PENÉLOPE ORTÍZ ZEPEDA y

mi hermano ALEJANDRO ULISES ORTÍZ ZEPEDA.

¡Los quiero mucho!.

A RODRIGO CELISEO SANTAMARÍA a quién amo. Gracias por cruzarte en mi camino.

A todos mis FAMILIARES y AMIGOS que aportaron mucho en mi formación académica y personal.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las siguientes instituciones y personas el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

Al Sistema Nacional de Investigadores, por la ayuda económica prestada.

A DGAPA, ya que esta tesis es uno de los trabajos que se realizaron dentro del proyecto IN 204794.

Al Instituto de Química de la UNAM por permitirme usar sus recursos para la realización de la parte química de éste trabajo.

Al Laboratorio de Productos Naturales de la U.N.A.M., campus Iztacala por dejarme realizar la parte microbiológica de la tesis.

Al Dr. Alfonso Romo de Vivar por que fue director de esta tesis en toda la extensión de la palabra ya que siempre me apoyo, por sus consejos, por sus enseñanzas y sobre todo, por su gran calidad humana.

Al Biol. Guillermo Ávila Acevedo quién participo como codirector, gracias por sus comentarios y compartir conmigo su conocimientos.

A las maestras Amira Arciniegas Arciniegas y Ana Lidia Pérez Castorena por enriquecer con sus conocimientos y comentarios la parte experimental de esta tesis.

Al Biol. Hugo Castro Cortés por su gran ayuda en la toma de diapositivas de este trabajo, y sobretodo por ser un amigo.

Al M. en C. Rodrigo Celiseo Santamaría por su infinita ayuda en toda la elaboración de la presente tesis.

INDICE

Abreviaciones.	1.
Resumen.	2.
Introducción.	3.
Justificación.	5.
Antecedentes.	6.
I. Descripción botánica de <i>Buddleia cordata</i> .	6.
II. Antecedentes etnobotánicos de <i>Buddleia cordata</i> .	7.
III. Antecedentes químicos del género <i>Buddleia</i> .	8.
IV. Antecedentes de actividad biológica del género <i>Buddleia</i> .	9.
V. Antecedentes bacterianos.	10.
VI. Síntesis bioquímica del AV.	17.
Área de colecta.	19.
Objetivos.	22.
Metodología.	23.
Resultados.	27.
Análisis de resultados.	33.
Conclusiones.	37.
Referencias.	38.
Apéndices.	45.
I. Técnicas microbiológicas.	46.
2. Síntesis de ácido vainillínico por fusión alcalina.	51.
3. Acetilación de la glucosa.	52.
4. Compuestos aislados del género <i>Buddleia</i> .	53.
5. Espectros.	59.

ÍNDICE DE FIGURAS.

FIG. 1. Esquema anatómico de <i>Buddleia cordata</i> .	7.
FIG. 2. Ubicación de la zona de colecta.	21.
FIG. 3. Diagrama de flujo de la metodología.	26.
FIG. 4. Compuestos aislados de la raíz de <i>Buddleia cordata</i> .	29.
FIG. 5. Diagrama de flujo de los resultados.	32.
FIG. 6. Verificación de la concentración del inóculo madre por diluciones sucesivas.	48.
FIG. 7. Técnica para determinar la MIC y CBM por el método de macrodilución en caldo.	49.

ABREVIACIONES

AcOEt	acetato de etilo
AV	ácido vainillínico
CBM	concentración bactericida media
HCl	ácido clorhídrico
AIA	ácido indolacético
MIC	concentración mínima inhibitoria
pf	punto de fusión
pH	potencial de hidrógeno
PM	peso molecular
RMN H ⁺	resonancia magnética nuclear de protones
RMN ¹³ C	resonancia magnética nuclear de carbono 13
IR	infrarrojo
NaHCO ₃	bicarbonato de sodio
Na ₂ SO ₄	sulfato de sodio
UFC	unidades formadoras de colonias

RESUMEN

En el mundo existen aproximadamente 250 000 especies de plantas con flor, de las cuales, sólo un pequeño porcentaje se ha utilizado con fines medicinales y la proporción de plantas de las que se conocen sus metabolitos secundarios es aún menor.

Por otro lado, en México las dos primeras causas de mortalidad son la enteritis y otras enfermedades diarreicas y dentro de estas tenemos el cólera y la shigelosis, que en nuestro medio tradicional, son tratadas con plantas.

Por tales motivos es importante realizar estudios en especies vegetales que no han sido analizadas y más aún si la etnobotánica nos las ha reportado con propiedades antisépticas. Una de estas especies es *Buddleia cordata*, conocida popularmente como tepozán.

En este estudio se colectaron en el Pedregal de San Ángel, un ejemplar de *Buddleia cordata*. De la corteza radical, se obtuvieron los extractos hexánico y metanólico, con los cuales se realizó la prueba Kirby-Bauer con 10 cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 4012) y *S. epidermidis* (aislado de piel), *Shigella boydii* (ATCC 8700), *Vibrio cholerae* biotipo *el tor*, serotipo INBA, cepas INDRE 206, CDCV 12 y *Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico, *Salmonella tify* ATCC 19430, *Pseudomonas aeruginosa* (aislada de un caso clínico), *Enterobacter sp* (aislado de cloacas) y *E. agglomerans* ATCC 27155. Sólo el extracto metanólico resultó activo con *Shigella boydii* (ATCC 8700), *Vibrio cholerae* INDRE 206, CDCV 12 y un C. C., las cuales presentaron una MIC de 12.8 mg/ml.

El extracto metanólico se cromatografió y se aislaron 5 compuestos: glucósido de β -sitosterol, glucosa, aucubina, O-metil catalpol y ácido vainillínico. Todos los compuestos aislados ya habían sido reportados en otras sp de *Buddleia*, con excepción del ácido vainillínico, por lo que se considera el primer reporte de esta sustancia en el género *Buddleia*.

Todos los compuestos aislados con excepción del AV fueron inocuos para la cepa *Vibrio cholerae* INDRE 206. Por el contrario, las cepas *Shigella boydii* (ATCC 8700), *Vibrio cholerae* INDRE 206, CDCV 12 y un C. C., fueron sensibles al ácido vainillínico, con una MIC de 3200, 1600, 1600, 3200 μ g/ml y una CBM de 6400, 6400, 3200, 3200 μ g/ml respectivamente.

Se discute sobre el posible papel del AV en la bioquímica de la planta y el mecanismo de acción del AV en la muerte bacteriana, relacionándolo con su poder de partición y su similitud química con el fenol. Se sugieren futuros estudios específicos para conocer estos mecanismos.

INTRODUCCIÓN

En la antigüedad, el hombre usaba ciertos remedios que contenían antibióticos aún sin sospecharlo. Los chinos, hace más de 2500 años, ya conocían las propiedades terapéuticas de la cáscara enmohecida de soya contra forúnculos; los antiguos egipcios utilizaban pan de trigo mohoso contra enfermedades infecciosas; el Talmud aconseja "Tomad un poco de tierra de la parte sombreada del retrete y mezcladla con miel" para curar el pus de la garganta; el humus de los bosques y las orillas de los ríos era ingerido por creyentes de cultos geófagos (ahora sabemos que esos abonos están infestados con cepas de *Streptomices* y Actinomicetos, productoras de antibióticos). Las hierbas como el hisopo y resinas vegetales como la mirra, fueron ampliamente conocidos por sus efectos medicinales (Koneman, 1985); posteriormente, en 1619, aparece el primer registro del tratamiento de la malaria con un extracto de corteza de cinchona; pero fue hasta 1877 cuando se obtuvo el primer registro científico de una actividad antibiótica, gracias a Pasteur, quien comunicó que no se había desarrollado el carbunco en animales inyectados con bacterias comunes del aire, después Tyndal en 1881 observó unos tubos con inóculo bacteriano contaminados con *Penicillium glaucum* en los cuales las bacterias cayeron al fondo del tubo, Tyndal infirió que el oxígeno no llegaba a las bacterias por la película formada por el moho (Evans, 1991 y Koneman, 1985).

Todos estos hechos ayudaron a reconocer el fenómeno de antibiosis (contrario a la vida) (Tyler, 1979) y con él, el término antibiótico, el cual se define como una sustancia química elaborada por un microorganismo, que a pequeñas concentraciones tiene la propiedad de inhibir y hasta destruir a otros microorganismos, pero en la actualidad debe ampliarse la definición para incluir sustancias activas existentes en algunas plantas (Evans, 1991., Tyler 1979). Ejemplo de ello son:

La allicina, que ha sido aislada del ajo (*allium sativum*); anemonina y protoanemonina contenidas en *Anemone pulsatilla* y otras Ranunculáceas; plumbagina (2-metil-5-hidroxil-1,4 naftoquinona) que se encuentra en *Plumbago europea* (Evans, 1991); *Arctium minus* contiene arctina; *Cheiranthus cheiri*, cheirolina; *Pinus silvestris*, pinosilbina; *Rhaphanus sativus*, rafanina; *Pirus aucuparias*, ácido para-sórbico; *Datisca cannabina*, datisceína; *Crepis tarraxifolia*, crepina; *Juglans regia*, juglona; Tomate, tomatina; *Monade fistulosa*, timoquina, entre otras (San Martín, 1977).

Aunque se conocen compuestos antibióticos presentes en algunas especies vegetales, aún falta conocer los existentes en otras, de hecho del número de plantas con flor que se estima entre 200 000 y 250 000 especies, solo se ha estudiado a nivel de metabolitos secundarios un pequeño porcentaje, quedando, por lo tanto, un amplio campo de investigación (Evans, 1991).

Con toda esta cantidad de organismos vegetales sería muy laborioso probar la actividad antimicrobiana de todas las especies que faltan por estudiar, por lo que se puede hacer una selección de plantas con posible actividad antimicrobiana a través de estudios etnobotánicos, ya que todos los pueblos primitivos, han hecho esta selección a lo largo del tiempo (Hill, 1965).

Por otro lado, cabe señalar que a partir de mayo de 1978, se ha propiciado el estudio de las plantas medicinales debido a que la Organización Mundial de la Salud (OMS), por medio de la Resolución de la XXXI Asamblea General, determinó iniciar un programa donde se evaluaran y utilizaran los métodos de medicina popular. Se llegó a esta conclusión porque el empleo de medicamentos industrializados no puede estar al alcance de todos debido a su elevado costo, tanto para el consumidor individual como para las entidades de salud pública, en cambio las plantas medicinales están al alcance de la mayoría de los presupuestos (Três, 1984).

En México, la población que utiliza la medicina tradicional se calcula entre 15 y 20 millones de personas, que se encuentran al margen de los sistemas médicos profesionales (estatal o paraestatal y medicina privada) (Laurell, 1975).

Dentro de las enfermedades que sufre la población en nuestro país es de notar, que la enteritis y otras enfermedades diarreicas ocupan las dos primeras causas de mortalidad (Kumate, J. 1982).

Además muchas cepas bacterianas han sido expuestas a antimicrobianos comunes que provocaron una aceleración de la selección de cepas resistentes sobre las sensibles (Guiney, 1986).

JUSTIFICACIÓN

Por tal motivo, es de suma importancia que se realicen estudios fitoquímicos de especies botánicas no analizadas y aun más sí estas han sido nombradas por la etnobotánica como antisépticas, sobretodo contra las bacterias que provocan infecciones gastrointestinales como el cólera y la shigelosis. Esto con la finalidad de aislar antibacterianos nuevos a los cuales las cepas no sean resistentes.

Una de estas especies es *Buddleia cordata* conocida popularmente como tepozán, planta a la que se le atribuyen una gran cantidad de propiedades medicinales, entre las que destaca la de tener actividad antiséptica como veremos más adelante.

ANTECEDENTES

I. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

La especie estudiada, pertenece a la familia Longaniaceae¹, ésta contiene 32 géneros y unas 800 especies. En el Valle de México solo se encuentra el género *Buddleia*. Este género es de distribución pantropical principalmente, en México existen unas 20 especies y 5 de ellas en el Valle de México.

Buddleia cordata HBK spp. *cordata* (*B. humboldtiana* J. A. & J. H. Schultes, *B. macrophylla* Kunth)

Árbol o arbusto de 1 a 20 m de alto, dioico; tallos tetragonales y densamente tomentoso-estrellados en las ramas jóvenes; hojas con líneas estipulares o en ocasiones con estípulas foliosas, peciolo de 1 a 7 cm de largo, limbo lanceolado, oblongo, ovado o elíptico, de 5.5 a 24 cm de largo por 1.5 a 10.5 cm de ancho, ápice agudo, acuminado o muy acuminado, margen entero, serrado, serrulado, irregularmente serrulado o en ocasiones dentado, base obtusa, cuneada, cordada, truncada o raramente atenuada u oblicua, venación muy prominente en el envés, textura algo coriácea, pubescencia de pelos estrellados aplicados y pelos extrellados laxos, grandes candelabrifformes muy densa en el envés, de color blanco brillante, caduca con el tiempo; inflorescencia formada por grandes panículas terminales de (4)14 a 25 (32) cm de largo ramificadas por 2 a 4 veces y con brácteas en cada ramificación; corola amarillenta, generalmente con un toque anaranjado en la garganta flores campanuladas; cáliz tomentoso, de 1.5 a 3 mm de largo; corola de 3 a 4 mm de largo con lóbulos mas largos que el tubo, oblongos y extendidos, imbricados en el botón, pubescentes interna y externamente; estambres subsésiles o con filamentos cortos y fuertes; ovario ovoide, estilo conspicuo, estigma claviforme, muy ligeramente bilabiado; fruto ovoide-eclipsoide, de 2.5 a 6 mm de largo por 1.5 a 4 mm de diámetro, con dehiscencia septicida y loculicida, con numerosas semillas aladas de 1 a 1.5 mm de largo por 0.2 a 0.4 mm de ancho.

Esta subespecie se encuentra ampliamente distribuida en el Valle de México. Altitud 2250-3000 msnm. Matorrales, pastizales y bosques, pero preferentemente en la vegetación secundaria y en lugares intensamente perturbados, incluyendo zonas urbanas (Rzedowski, 1985).

¹ Actualmente hay otros autores que consideran al genero *Buddleia* o también llamado *Buddleja* dentro de la familia *Buddlejaceae* (Houghton, 1984).

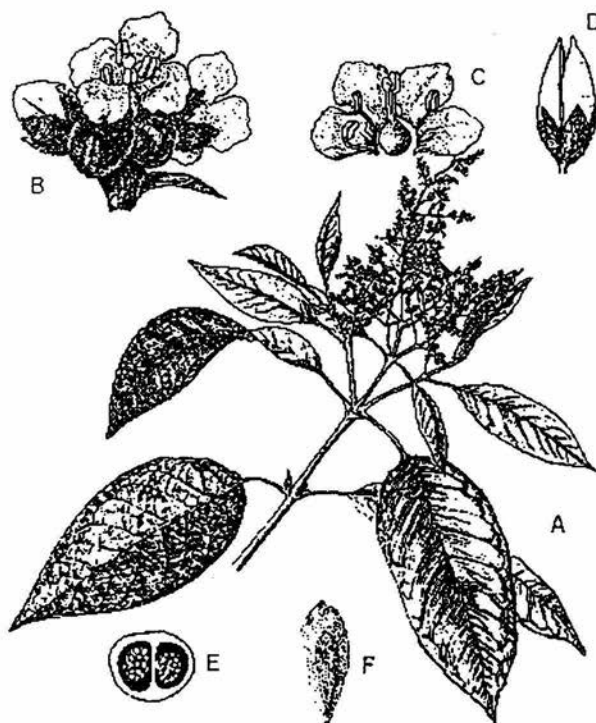


Fig. 1. *Buddleia cordata* HBK ssp *cordata*: A. rama con inflorescencias; B. aspecto de un grupo de botones y dos flores; C. flor abierta; D. fruto maduro; E. corte de ovario; F. semilla.

II. ANTECEDENTES ETNOBOTANICOS

El género *Buddleia* es famoso mundialmente por sus características medicinales, una especie de interés es *B. cordata*, a la cual se le atribuyen los mismos efectos curativos de *B. americana* : analgésico, reparador del colapso uterino, contra pasmo, enfermedades de los ojos, ayuda a sanar tumores, cortadas y úlceras, para el tratamiento de cirrosis, reparación de la función biliar, se utiliza como eupéptico, diurético, antipirético, purifica el cuerpo, astringente, hipnótico y antiséptico (Houghton, 1984; I.M.E.P.L.A.M., 1976). Esta última propiedad fue el tema central de esta investigación.

III. ANTECEDENTES QUÍMICOS

No se encontraron antecedentes químicos de la especie *Buddleia cordata*, así que mencionaremos la fitoquímica del género *Buddleia*.

Se han aislado los siguientes compuestos:

I. ESTEROLES: sitosterol (1a)², condriasterol (1b), estigmasterol (2) (Houghton, 1984).

II. FLAVONOIDES: linarina (3b) (Houghton, 1984), kaempferol (3a), quercetina (3c), el aglicón acacetina libre (3d), luteolina (3e), 6-hidrosiluteolina (3f) (Harborne, 1971); epigenina-7-O-glucósido (3g), rutina (3h), escutellareina-7-O-glucósido (3i) (Marín, 1979); pectolarigenina (3j), salvigenina (3k) (Houghton, 1984), acacetin-7-O-rutinósido (3l), quercetin-3-O-rutinósido (3m) (López, 1979).

III. TRITERPENOS: β -amirina (4a), β -amirina acetato (4b) (López, 1979), 11-ceto- β -amirina (4c) (Houghton, 1984), glutinol (5) (López, 1979); lupeol (6) (Marín, 1979).

IV. LIGNANOS: compuestos tipo lignano (7), (8) (Houghton, 1984).

V. SESQUITERPENOS TIPO CARIOFILENO: los piscicidas buddledina A (9a), buddledina B (9b) (Yoshida *et al.*, 1978-1), y buddledina C (9c), otros sesquiterpenos no tóxicos buddledina D (10a) y buddledina E (10b) (Yoshida *et al.*, 1978-2).

VI. FENIL ETANOIDES: 2-(4-hidroxifenil) etanol éster de ácido lignocérico (11a), éster de 2-(4-hidroxifenil) etanol éster de ácido decosanoico (11b), éster de ácido lignocérico y alcohol 4-hidroxicinámico (12a), éster del alcohol 4-hidroxicinámico y ácido decosanoico (12b) (Houghton, 1989).

VII. FENIL PROPANOIDES: los ácidos cafeico (13a), ferúlico (13b) y p -cumárico (13c), coniferaldehído (14), americanina A (15), (Houghton, 1984); balanofonina (16), buddlenol A (17a), buddlenol B (17b), buddlenol C (18a), buddlenol D (18b), buddlenol E (18c), buddlenol F (18d) (Houghton, 1985); **verbascósido** (3,4-

² Las fórmulas químicas de todos los compuestos citados en esta sección se encuentran en el apéndice 4.

dihidroxi- β -feniletíl) O-a-L-ramnopiranosil [(1-3)- β -D-(4-O-cafeoil) glucopiranosil] (19a) (Pardo, 1993); Orobranchido (19b) (Houghton, 1989), kaempferol 7- β -D-(6"-p-coumaroil)glucósido) (20), los inhibidores de enzima tirosinasa: Buddlenoides A (21a) y B (21b) (Kubo, 1992); glucósidos feniletanoides: (22a), (22b), (22c), (23a), plantainósido C (23b), acteósido (23c), isómero de acteósido (23d), leucosceptósido A (23e), martinósido (23f), isomartinósido (23g), jionósido D (23h), angorósido C (23i), leucosceptósido B (23j), (Yamamoto, 1993).

VIII. IRIDOIDES: aucubina (24), catalpol (25a), metilcatalpol (25b), (Houghton, 1984).

IX. IRIDOIDES UNIDOS A LIGNANOS: 6-feruloil ajugol (26); complejos del tipo dihidrobenzofurano lignano unido al C-6 de un medio ajugol como un éster (27), tipo 2-fenoxi-1,3-propadienol lignano unido a ajugol (28) (Yamamoto, 1993).

Aunque se reportó la presencia de alcaloides en algunas especies (Hultin E., 1965), posteriormente se demostró que ciertos lignanos (17,18) presentaban falsos positivos en la prueba Dragendorff (Houghton, 1985).

IV. ANTECEDENTES DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Las sustancias que han presentado actividad antibiótica son óxidos de β -cariofileno, citranelol y α -cariofileno (Garg, 1992).

También se sabe que la aucubina sujeta a una hidrólisis ácida se descompone en dos sustancias: glucosa y **aucubigenina**, esta última tiene actividad antifúngica y antibacteriana (Rombouts, 1956).

El **verbascósido** es muy interesante, ya que se le han encontrado varias propiedades, como inhibir el hambre en gusanos del género *Spodoptera* (Cooper, 1980), actuar como agente antineoplásico (Pettit, 1990) y la característica más importante para nosotros, su actividad antibacteriana (Pardo, 1993).

V. ANTECEDENTES BACTERIANOS

La descripción de las siguientes especies bacterianas se debe a que fueron sensibles al extracto metanólico de la planta en estudio.

SHIGELLA BOYDII

HISTORIA

Disentería fue el término usado por Hipócrates para indicar una condición caracterizada por la frecuente eliminación de heces con sangre y moco acompañada de defecaciones forzadas y dolorosas (Mandel, 1991). A diferencia de la disentería amebiana, la bacilar es de corta duración, las complicaciones extraintestinales son raras y las epidemias son comunes

DESCRIPCIÓN Y CLASIFICACIÓN

Shigella boydii es el agente causal de la disentería bacilar, son organismos gramnegativos inmóviles, no capsulados, facultativamente anaerobios, quimoorganotrofos, miembros de la familia Enterobacteriaceae, tribu Escherichieae, género *Shigella*.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

Este género está entre las enterobacterias menos reactivas bioquímicamente. Son negativas para adonitol, citrato, DNAsa, gas a partir de glucosa, H₂S, lisina, movilidad, fenilalanina, sacarosa, ureasa, Voges-Proskauer, inositol, KCN, lactosa, malonato, salicina y xilosa. *Shigella boydii* es manitol positiva, ONPG y ornitina, aunque ocasionalmente, el 10 % de las cepas son positivas para la prueba ONPG (Lennette, 1987)

HUÉSPED

Shigella es patógeno del hombre y de otros primates, hay reportes ocasionales de infecciones en perros mientras que otros animales son resistentes a la infección. Con solo 200 células viables se produce la enfermedad en un adulto sano (Mandel, 1991).

PATOGENIA

Después de 12 a 72 hs siguientes a la ingesta de shigelas virulentas (tiempo que tardan en recuperarse del pH ácido del contenido gástrico), las bacterias se multiplican en el recto e intestino grueso (hasta concentraciones de 10⁷ a 10⁹ viables/ml de contenido luminal), y en casos severos hasta la parte terminal del

íleon. La lesión típica es inflamación y ulceración del epitelio, en raras ocasiones avanza a la lámina propia (Mandel, 1991; Starr, 1981; Krieg, 1984).

A menudo, cuando hay una localización colónica difusa de las bacterias, se producen tenesmos y deposiciones sanguinolentas mucoides (disentería). Se forman microabscesos que se unen para formar otros más grandes que se desprenden, produciendo úlceras mucosas (Mandel, 1991). Durante la enfermedad los organismos son excretados en las heces en concentraciones de 10^3 a 10^9 células viables/ g de materia fecal. (Starr, 1981).

DIAGNOSTICO

Los primeros síntomas pueden ser fiebre (hasta 41°C), ruidos abdominales hiperactivos y dolores abdominales seguidos por deposiciones acuosas, voluminosas y sanguinolentas posteriormente hay una disminución de la fiebre y un aumento de las deposiciones con menor volumen (Mandel, 1991).

TRATAMIENTO

La mayoría de los casos no requiere terapia antibiótica y el tratamiento se basa en mantener el balance electrolítico y de hidratación (Starr, 1981).

Cuando se usan antibióticos, se recurre a la ampicilina y tetraciclina, aunque comúnmente se desarrolla resistencia después del tratamiento. En cepas resistentes se utiliza trimetoprima y sulfametoxazol, si aún se encuentra resistencia se utiliza ciprofloxacina o norfloxacina (Mandel, 1991).

La motilidad intestinal es importante en la recuperación de la infección así como para prevenir la invasión de la mucosa por un agente bacteriano. En este caso la diarrea es un mecanismo protector y su inhibición por medio de fármacos no es prudente (Mandel, 1991).

Si no se trata la enfermedad, en general dura de un día a un mes con un promedio de 7 días. La mortalidad no es común (Mandel, 1991).

Las complicaciones son inusuales, consisten en una severa deshidratación, convulsiones febriles, septicemia y/o neumonía debida a microorganismos coliformes (generalmente no es *Shigella*), queratoconjuntivitis, iritis, y poliartritis, estas complicaciones aparecen en los días 10-14. Las complicaciones crónicas incluyen neuritis periferal y estenosis intestinal (Mandel, 1991 y Starr, 1981).

EPIDEMIOLOGÍA

La disentería bacilar tiene una distribución global, pero la mayor incidencia se encuentra en áreas con condiciones de baja higiene, notablemente estas áreas son

países en desarrollo de los trópicos, donde la disentería se combina con mala nutrición provocando una alta mortalidad, sobre todo en niños menores de 7 años (Starr, 1981).

La mayor frecuencia en la enfermedad se encuentra en niños de 6 meses a 10 años, los adultos se contagian por los niños. Los lactantes son altamente resistentes a la disentería.

Esta enfermedad es de verano y pueden transmitirse por moscas. Los principales vectores de transmisión son el agua y los alimentos contaminados, estos se pueden evitar con la adecuada cloración del agua (Mandel, 1991).

VIBRIO CHOLERAE

ANTECEDENTES

La palabra cólera, usada por primera vez por Hipócrates, significa flujo de bilis. En el siglo XVII, Sydenham diferenció la enfermedad CHOLERA MORBUS del estado colérico, persistió el primer nombre como justificación de que un exceso de bilis irritaba al estómago y a los intestinos, que se expulsaba como vómito y diarrea.

ORIGEN

Bangladesh, India es una tierra fértil, lo que provocó una alta densidad humana en condiciones insalubres donde la carencia de agua potable y las peregrinaciones en el Bajo Ganges ("Río de la Fe"), favorecieron la aparición y diseminación del cólera. De Bangladesh pasó al resto del mundo desde 1817.

Actualmente nos encontramos en la séptima pandemia causada por el tipo *El tor* (Kumate, 1993; Lennette, 1987).

GENERALIDADES

Robert Koch aisló el germen en 1884 (Lennette, 1987), posteriormente Pacini en 1854 describió a *Vibrio cholerae* como una bacteria gramnegativa anaerobia facultativa, en forma de bastón, en ocasiones ligeramente encorvada; en un tiempo se le llamó "*Vibrio comma*".

La especie *Vibrio cholerae* es agente causal del cólera, bacilo aerobio, gramnegativo, curvo, de 0.5-0.8 μm de ancho por 1.4-2.6 μm de alto, oxidasa positivo, no forma microquistes o endosporas, en medio líquido es monotrico; anaerobio facultativo, el oxígeno molecular es su aceptor electrónico, es quimioorganotrofo (Krieg, 1984), puede crecer en un medio carente de NaCl (aunque su género se considera halofílico), puede crecer en condiciones moderadamente alcalinas (pH 9), aunque es sensible a un pH menor de 4 y mayor de

11, un medio selectivo es TCBS (agar de tiosulfato citrato con sales biliares y sucrosa) en el crece en colonias con un tamaño pequeño y de color amarillo, tiene más de 90 serogrupos y algunas cepas de esta especie son bioluminiscentes (Krieg, 1984), pertenece al grupo 01 que a su vez se divide en 3 serotipos o serovares Ogawa, Inaba e Hikojima. Estas se reagrupan en los biotipos o biovares “clásico” y “*El tor*”, este último provoca hemólisis.

Es una bacteria frágil es sensible a los antibióticos y desinfectantes como el cloro (1 mg/ml durante 30 minutos), no resiste la alta temperatura (60°C durante 10 minutos y a 100°C en 1 minuto). No puede sobrevivir por largos periodos fuera del organismo, aunque el biotipo *El tor* sobrevive mas tiempo en el agua (5 días en condiciones ideales) y alimentos, característica por la cual se disemina con mayor facilidad (Kumate, 1993).

TIPIFICACION SEROLOGICA

V. cholerae 01 son las cepas patógenas productoras de la toxina colérica (Kumate, 1993).

El serotipo 01 tiene solo tres determinantes, que son los antígenos “O” o somáticos:

SEROTIPO

Ogawa

Inaba

Hikojima

ANTÍGENOS O

A, B

A, C

A, B, C

(Mandell, 1991).

HUÉSPED

El reservorio principal es el hombre, sin embargo se sugiere la existencia de reservorios en el ambiente, como respuesta a la sobrevivencia del microorganismo durante periodos interepidémicos.

Se considera que la susceptibilidad es universal aunque existen factores que favorecen la infección como la baja acidez gástrica. *V. cholerae* se destruye a un pH 5, por lo tanto la aclorhidria gástrica aumenta el riesgo de padecer la enfermedad.

El cólera afecta principalmente a personas de bajo nivel socioeconómico con higiene personal deficiente y sin servicios sanitarios adecuados.

El número de organismos que se necesitan para producir la enfermedad es alrededor de 1×10^8 . Con pH neutro *V. cholerae* 01 biotipo clásico necesita 1×10^4 , en cambio *V. cholerae* 01 biotipo *El tor* necesita 1×10^3 (Kumate, 1993).

PATOGÉNESIS

El organismo es ingerido y algunas células sobreviven al pH ácido del estómago, pasando al intestino delgado, el microorganismo coloniza al epitelio de revestimiento, donde se secreta una solución alcalina, rica en bilis que aporta el medio de crecimiento ideal (Davis, 1973), se desarrolla y produce la toxina termolábil colérica. Dicha toxina (peso molecular de 84 000), se compone de una unidad A formada por la subunidad A1 (p.m. 21 000), la cual está unida por un puente disulfuro a la subunidad A2 (P.M. 7 000) y cinco subunidades B (P.M. de cada una de 10 000) las cuales forman un pentámero donde se aloja la subunidad A. La subunidad B, se fija a un receptor específico, el gangliósido G1 de la membrana celular de las células intestinales del huésped.

Se hidroliza la unidad A, la subunidad A1 penetra la membrana citoplásmica hasta la proteína Gs (esta en condiciones normales estimula la actividad de la adenilatociclasa por medio de receptores que responden a hormonas y diversos efectores extracelulares). y provoca que la subunidad α -s (esta junto con las subunidades β y γ constituyen a la proteína Gs) se une a ADP-ribosa (la subunidad α -s normalmente une GTP y lo hidroliza, liberando GDP, la ADP-ribosilación impide que α -s catalice esta reacción), la subunidad α -s ADP ribosilada provoca que la adenilatociclasa con gasto de ATP libere AMPc.

Los niveles intracitoplásmicos de AMPc aumentan hasta 100 veces la concentración basal, lo que provoca la hipersecreción de sales y agua. Los resultados netos son la eliminación masiva de heces líquidas con la consiguiente deshidratación, típica del cólera (Lennette, 1987; Kumate, 1993).

CUADRO CLÍNICO

La infección se inicia con un período de incubación de unas horas hasta 5-6 con promedio de 2-3 días, después de los cuales se manifiesta la enfermedad. Se caracteriza inicialmente por sensación de plenitud abdominal y pérdida de apetito; voz ronca, hay mareo con disminución de la temperatura en partes dístales de extremidades; inflamación intestinal, en forma simultánea aparece la diarrea, con evacuaciones que gradualmente se vuelven líquidas, aumenta su frecuencia y llegan a presentarse de 20 a 25 en 24 hs.; el volumen excretado llega a ser de 250 a 500 ml por cada una (perdiéndose un promedio de 8 l de agua al día), así no es raro que una persona elimine el equivalente a su peso en 4-7 días de diarrea.

La toxina colérica provoca la exagerada salida de líquidos y solutos que rápidamente sobrepasa la capacidad de absorción de las células provocando deshidratación severa.

Otro síntoma es el vómito que se inicia después de manifestarse la diarrea, que en un principio contiene restos alimenticios, después sólo es líquido. Una vez

aplicado algún antibiótico este cesa de 12 a 18 hs, por lo que no debe de emplearse ningún antiemético.

En casos graves se presentan "manos de lavandera", pérdida de la elasticidad de la piel, anuria (Lennette, 1987), calambres en la pared abdominal y en miembros inferiores. Esto se relaciona con la depleción de potasio intracelular, que puede provocar en casos graves, arritmias cardíacas.

Un adulto excreta por litro de evacuación 135 mEq de sodio, 15 mEq de K , 100 mEq de Cl y 45 mEq de bicarbonato. Esta pérdida provoca primeramente signos de deshidratación para después convertirse en acidosis y estado de choque.

La principal complicación es la deshidratación frecuentemente acompañada de debilidad, hipopotasemia, hipoglucemia, hiponatremia o hipernatremia, alteraciones de la conciencia y convulsiones, con estas dos últimas complicaciones, hipocalcemia, acidosis metabólica que puede provocar hiperventilación severa con dificultad respiratoria, puede sobrevenir el estado de choque, también puede presentarse insuficiencia renal causada por la deshidratación grave no tratada, si se prolonga puede ocurrir necrosis tubular y la muerte en un lapso de 18-24 hs o días (para casos no tratados) (Davis, 1973).

TRATAMIENTO

Se deben de reemplazar las pérdidas hidrosalinas en las heces en cantidades y concentraciones comparables. La reposición puede lograrse por la vía oral, excepto en los casos más severos donde se requiere tratamiento intravenoso. Se deben de suministrar paquetes de sales y una sustancia transportadora (de iones y agua a través de la mucosa intestinal) como glucosa tan pronto como sea evidente que la diarrea puede poner en peligro la vida (Davis, 1973).

ANTIBIÓTICOS

El antibiótico usual para el tratamiento es la tetraciclina al cual con raras excepciones no son sensibles los bacilos. Otros antibióticos usados son ampicilina, cloramfenicol, gentamicina, kanamicina, estreptomycinina y sulfonamidas (Krieg, 1984)

Actualmente la rehidratación oral de pacientes graves ha reducido la mortalidad hasta 1%. En nuestro país a finales de 1991 ocurrieron 34 defunciones.

EPIDEMIOLOGÍA

V. cholerae El tor es el agente causal de la presente pandemia, en la que el porcentaje de infecciones asintomáticas es mayor (75%) suguiéndole los casos leves (18%), moderados (5%) y graves (2%). Cuando la infección es causada por el

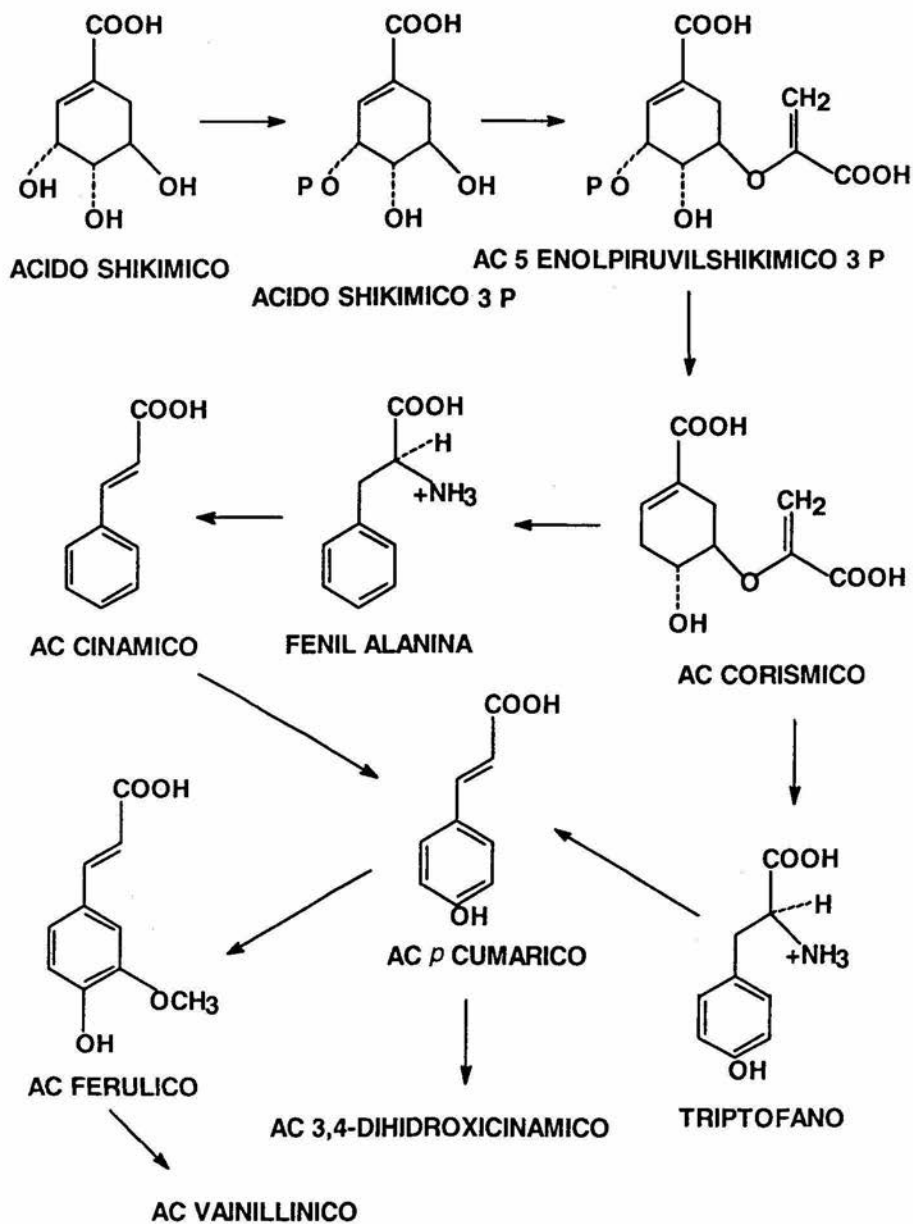
biotipo clásico disminuyen los casos asintomáticos (59%) y aumentan los casos graves (11%) por lo tanto, este biotipo es más virulento y produce infecciones clínicas más graves.

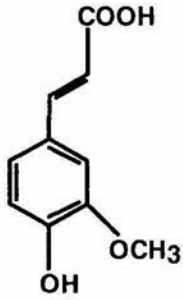
La información colectada del inicio de la epidemia hasta el 31 de diciembre de 1991 muestra un total de 2 690 casos confirmados mediante estudios bacteriológicos, de los cuales 56.3% corresponden al sexo masculino y 43.7% al femenino. Esto se ha vinculado con la mayor exposición a diversas fuentes de contagio fuera del hogar, en conexión con actividades laborales.

También se demostró que el 68.3% de los casos estaban en edad productiva, los niños menores de un año que padecían esta enfermedad era bajo (1.4%), este comportamiento es de un brote epidémico.

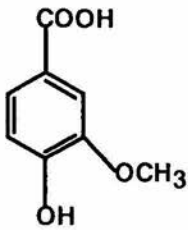
Del total de casos, el 71.6 % presentaron evacuaciones líquidas sin alteración de las mismas en el 28.4 % restante, además se verificó que el 75.1% presentaron una frecuencia de 5 evacuaciones en 24 hs. La hospitalización fue necesaria en el 34.0% de los pacientes, los restantes no requirieron tratamiento intrahospitalario (Kumate, 1993).

VI. SÍNTESIS BIOQUÍMICA DEL ÁCIDO VAINILLÍNICO.

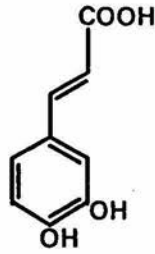




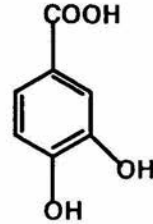
AC FERULICO



ÁCIDO VAINILLÍNICO



AC 3,4 DIHIDROXICINAMICO



AC PROTOCATEQUICO



Biosíntesis vegetal del ácido vainillínico (Conn, 1985; Said *et al.*, 1974).

ÁREA DE COLECTA

Se eligió esta área de colecta por que en ella se disponía de la materia prima, es decir de árboles de *Buddleia cordata*.

LOCALIZACIÓN

En la mitad meridional de la República Mexicana se encuentra el Distrito Federal (figura 2), al sur de este encontramos al Pedregal de San Ángel. El pedregal colinda al sur con el cerro del Ajusco, hacia el oeste con la Sierra de las Cruces, al norte con el Cerro de la Estrella, la Sierra de Santa Catarina y el Cerro del Pino, por último, al este colinda con la Sierra Nevada.

Dentro de esta zona está la Ciudad Universitaria, cuyas coordenadas geográficas son 19° 20' 00" y 19° 19' 20" latitud norte y 99° 10' 40" y 99° 11' 20" longitud oeste.(CETENAL, topográfica, 1980). Esta es la región donde se colectó la planta en estudio.

El pedregal de San Ángel tiene una altitud de 2250-2400 m.s.n.m., es una región formada por una gruesa capa de lava, producto de la erupción del volcán Xitle y cráteres adyacentes hace 2500 años (Terciario) (Arnold and Libby, 1951; CETENAL, Geológica, 1978).

Esta formado por roca ígnea, basalto de olivino con microcristales, arena volcánica y material piroclástico es de color gris oscuro. El manto en su superficie presenta un aspecto compacto en algunas regiones y en otras es de aspecto versiculoso, consecuencia del desprendimiento de gases. El espesor de la lava varía entre 6 y 10 m de acuerdo al lugar.

La topografía es muy accidentada, presenta cuevas, hondonadas y promontorios rocosos.

La erosión eólica es escasa y por lo tanto su fracturamiento. (Rzedowski, 1954; CETENAL, Geológica, 1978).

SUELO

Los suelos son escasos, se hallan por encima de la capa de lava, son de origen eólico y orgánico principalmente. La acumulación del suelo ocurre en las grietas y depresiones del terreno, formando una capa de pocos centímetros. Este suelo es de tipo Litosol de textura arenosa-limosa, moderadamente ácido; posee gran cantidad de materia orgánica, potasio y calcio, así como escaso en nitrógeno y fósforo aprovechable (Rzedowski, 1954 ;CETENAL, Edafológica, 1979).

CLIMA

Es de tipo C(W2) (W)bi es decir templado, subhúmedo con lluvias en verano. Presenta vientos dominantes del NO (García, 1973).

TEMPERATURA

La temperatura varía en función de la altitud alrededor de 0.6°C por cada 100 m. La temperatura media anual varía de 14° a 17°C. La temperatura máxima del año corresponde al mes de mayo y la mínima a enero habiendo una diferencia de 5° a 7°C (García, 1973).

PRECIPITACIÓN

Tiene una estación de lluvias muy marcada, con precipitación de junio a octubre y una seca que va de noviembre a mayo, teniendo un promedio anual de 500 a 700 mm (Rzedowski, 1954; García, 1973).

HUMEDAD ATMOSFÉRICA

En la época seca tiene un promedio de 45-55 %, en la lluviosa su promedio es de 75-81 % y su valor promedio anual varía entre 60 y 70 % (Rzedowski, 1954).

VEGETACIÓN

Debido a todas las características anteriores y a que es una zona de transición entre las regiones biogeográficas neártica y neotropical, contiene elementos florísticos y faunísticos de gran riqueza (Alvarez, 1982).

La especie dominante del estrato arbustivo es *Senecio praecox*, además se han reportado otras 319 especies, entre ellas:

Especies perennes: *Agava ferax*, *Buddleia cordata*, *Cardiospermum halicacabum*, *Cassia laevigata*, *Dedonaea viscosa*, *Echeveria gibbiflora*, *Mammillaria sanangelansis*, *Opuntia tomentosa*, *Pasiflora subpeltata*, *Plumbago pulchella*, *Salvia mexicana*, *Schinus molle* y *Wigandia urens*

En el estrato arbustivo y semiarbóreo encontramos a: *Eysenhardtia polystachia* y *Verbesina virgata*.

En el estrato herbáceo encontramos a *Aegopogon cenchroides*, *Asclepias linaria*, *Bouvardia ternifolia*, *Montanoa tomentosa*, *Muhlenbergia robusta*, *Panicum bulbosum*, *Setaria ganiculata*, *Prive mexicana* y *Stevia salicifolia*.

Dentro de las trepadoras encontramos a *Cissus sicyoides* y *Cynanchum kunthii*. La epífita *Tillandaia recurvata*.

Las especies endémicas son *Blatia urbana* y *Mammillaria sanangelensis*. (Rzedowski, 1954).

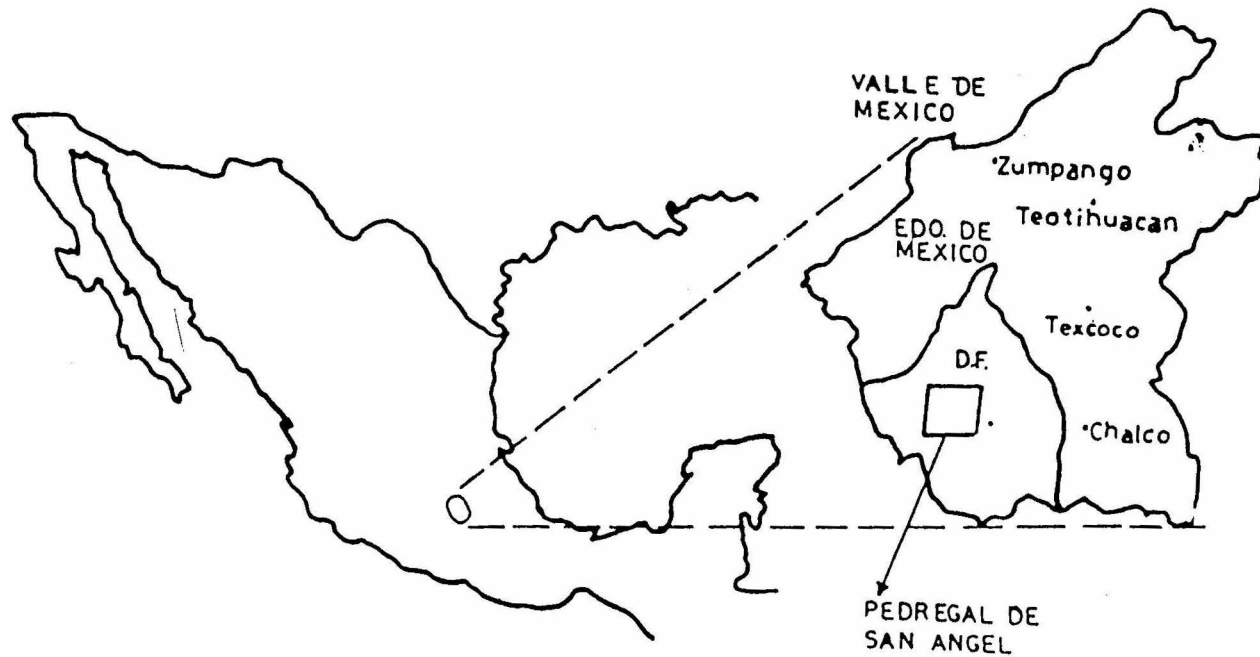


Figura 2 Ubicación del Pedregal de San Angel. Zona de colecta.

OBJETIVOS

- Evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de la corteza de raíz de *B. cordata* contra diez cepas bacterianas patógenas para el hombre. Bacterias grampositivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 4012) y *S. epidermidis* (aislado de piel). Y gramnegativas, *Shigella boydii* (ATCC 8700) , *Vibrio cholerae* biotipo *el tor*, serotipo INBA, cepas INDRE 206, CDCV 12 y *Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico, , *Salmonella tiphy* ATCC 19430, *Pseudomonas aeruginosa* (aislada de un caso clínico), *Enterobacter sp* (aislado de cloacas) y *E. agglomerans* ATCC 27155.
- Fraccionar el extracto metanólico de la corteza radical de *B. cordata* por medio de cromatografía en columna y evaluar la actividad antibacteriana de las fracciones eluidas.
- Recromatografiar las fracciones que resultaran ser activas hasta aislar el compuesto con actividad antibacteriana e identificarlo mediante técnicas de espectroscopía.

METODOLOGÍA

RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La raíz de *Buddleia cordata* spp *cordata* (25060 Herbario Iztacala), se colectó en Septiembre de 1992 en los alrededores de Ciudad Universitaria, U.N.A.M.¹ se separó la corteza y se dejó secar a temperatura ambiente.

PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

La corteza seca se sumergió con hexano durante un día a temperatura ambiente, después se filtró; se repitió este procedimiento dos veces más, el hexano se concentró en rotavapor, y se obtuvo el extracto hexánico.

Posteriormente, la misma corteza se extrajo con metanol, repitiéndose el mismo proceso, para obtener el extracto metanólico.

Ambos extractos se pesaron.

PRUEBAS BACTERIOLÓGICAS PRELIMINARES

Para indagar si los extractos hexánico y metanólico tenían actividad antibacteriana se realizó la prueba de Kirby-Bauer² o "Método de difusión en agar" sobre cepas bacterianas de *Shigella boydii* ATCC 8700 (USA), *Vibrio cholerae* biotipo *el Tor* serotipo INBA, cepas INDRE 206 (Instituto Nacional de Diagnóstico Referencial Epidemiológico, México), CDCV 12 (aislado de aguas) y un caso clínico aislado de materia fecal; *Staphilcoccus aureus* ATCC 4012, *S. epidermidis* (aislado de piel), *Salmonella tiphy* ATCC 19430, *Pseudomonas aeruginosa* (aislada de un caso clínico), *Enterobacter sp* (aislado de cloacas) y *E. agglomerans* ATCC 27155.

A las bacterias que fueron sensibles se le determinó la Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) mediante la técnica de dilucion en agar².

Se procedió a cromatografiar los extractos con actividad antibacteriana para tratar de aislar el principio activo.

¹ Ver área de estudio.

² Para la descripción de estas técnicas ver apéndice # 1.

AISLAMIENTO POR LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

Con esta técnica podemos separar los compuestos que hay en un extracto. El extracto disuelto con la mínima cantidad de disolvente se absorbió en celita y se dejó evaporar en un baño maría, una vez seco se montó sobre un columna de **sílica** para placa fina³ en una relación 20 g de sílica por cada gramo del compuesto problema, posteriormente se eluyó con una mezcla de disolventes (hexano, acetato de etilo, cloroformo, acetona o metanol⁴).

El volumen de las fracciones obtenidas dependió de la variedad y polaridad de los compuestos eluidos, éstos se monitorearon por medio de cromatografía en placa⁵, los cuales se revelaron con sulfato cérico al 1 % en ác. sulfúrico 2N y luz ultravioleta. Aquellas fracciones que presentaron compuestos similares fueron reunidas.

SEGUIMIENTO DEL PRINCIPIO ACTIVO POR SENSIBILIDAD BACTERIANA

Las fracciones obtenidas del extracto activo se sometieron a la técnica de "difusión en agar" sobre la cepa *Vibrio cholerae* INDRE 206 (debido a que presentó mayor sensibilidad que las demás cepas). Aquellas que resultaron tener actividad antibacteriana fueron recromatografiadas hasta obtener compuestos puros, de los cuales se elucidó su estructura por medio de características físicas y de técnicas de espectrometría.

ELUCIDACIÓN DE LA ESTRUCTURA QUÍMICA

Se determinó la estructura química de los compuestos puros por medio de sus características físicas y espectrometría.

- Características físicas: se determinó el punto de fusión de los compuestos en un aparato de Fisher-Jones y se reportan sin corregir.
- Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, Mod 283 empleando la técnica en pastilla (KBr), película (nujol) y el espectrómetro Nicolet FT-IR5-SX con la técnica de solución.
- Los espectros de RMN H⁺ se realizaron en el aparato Varian Gemini-200 a 200 Mhz. Como referencia se uso el tetrametil silano (TMS).

³ La sílica utilizada en todas las columnas fue 60 GF₂₅₄ art. 7730, Kieselgel, marca Merck.

⁴ Los disolventes utilizados se compraron a granel y se destilaron.

⁵ Se cromatografiaron en folios de sílica Gel SILG-UV 254 de 0.25 mm de espesor: de 4.5 x 4.5 cm.

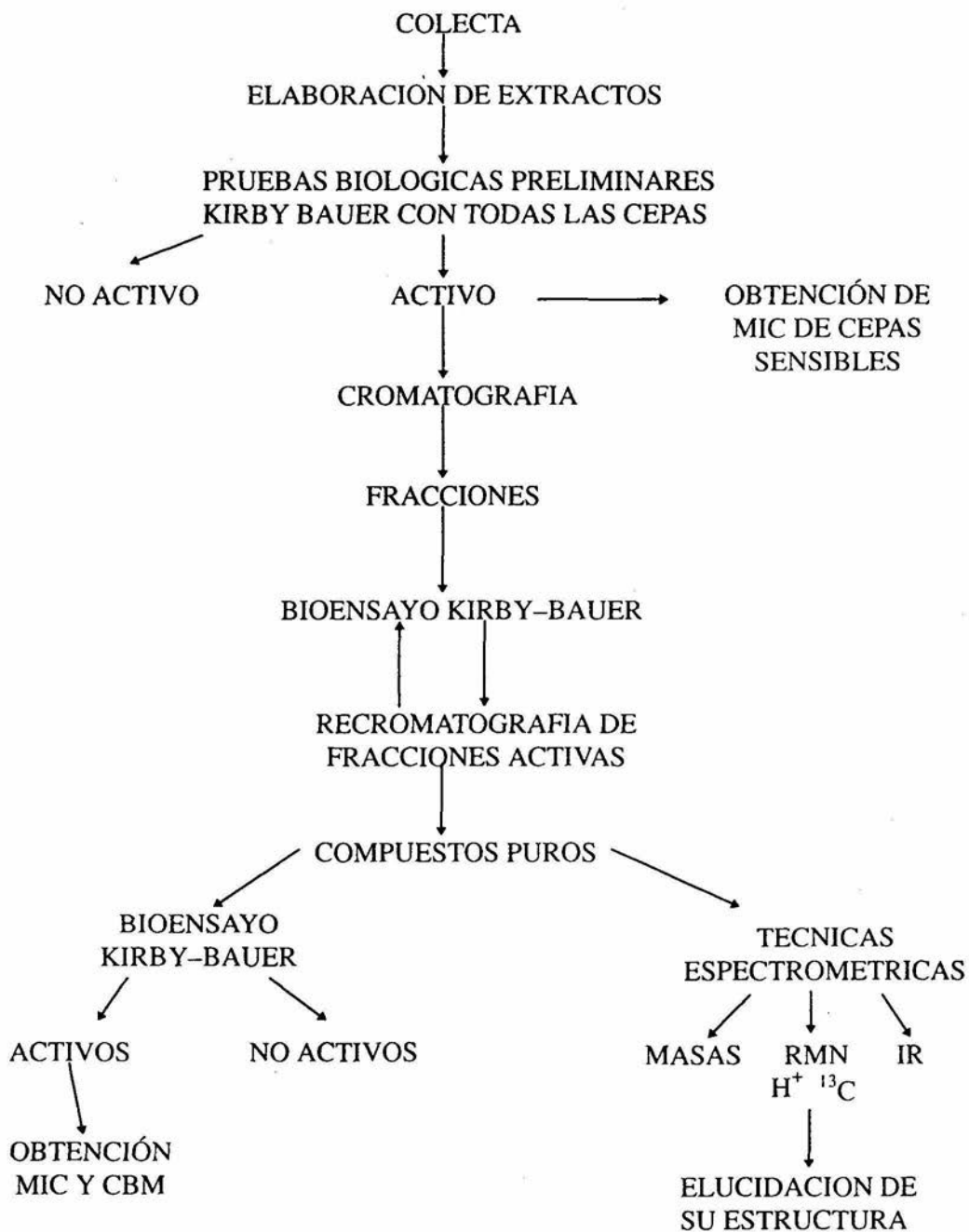
- Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 RMN ^{13}C se realizaron en el aparato Varian-300 S.
- El aparato de Espectrometría de masas (EM) fue un Hewlett Packard 5985 B, mediante la técnica de impacto electrónico.

PARÁMETROS BACTERIOLÓGICOS DEL COMPUESTO ACTIVO.

Por último, los compuestos identificados se sometieron a la técnica de Kirby Bauer sobre la cepa *Vibrio cholerae* INDRE 206 (debido a que presentó mayor sensibilidad).

Una vez identificado el compuesto activo se determinaron las MIC y CBM, mediante la técnica de macrodilución en caldo de todas las cepas sensibles.

FIG. 3 DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGIA



RESULTADOS

De la corteza seca de *Buddleia cordata* se obtuvieron las siguientes cantidades de extracto hexánico y metanólico

Tabla 1 Cantidades obtenidas de los extractos.

CORTEZA SECA	EXTRACTO HEXANICO	EXTRACTO METANOLICO
1015.00 g	14.00 g	81.13 g

Con los extractos hexánico y metanólico se aplicó la prueba de difusión en agar con las 10 cepas mencionadas obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 2. Resultados de la prueba de Kirby-Bauer (en mm) de los extractos hexánico y metanólico sobre todas las cepas probadas. Se observó actividad sólo sobre las siguientes bacterias:

BACTERIAS	EXT. MeOH (8mg/disco)	EXT. HEXANICO (8mg/disco)	C ⁺ (Kanamicina 30µg/disco)	C ⁻ 200µl MeOH
<i>Shigella boydii</i> ATCC 8700	+ 10	-	+17	-
<i>Vibrio cholerae</i> CDCV 12	+9	-	+18	-
<i>Vibrio cholerae</i> INDRE 206	+10	-	+18	-
<i>Vibrio cholerae</i> C.C.	+ 8	-	+16	-

A estas cepas se les determinó la MIC mediante la técnica de dilución en agar

Tabla 3. Resultados de MIC por placa. del extracto metanólico sobre las bacterias sensibles y el conteo de cada una de las cepas.

CEPA	6400 µg/ml (3)	12.8 mg/ml (3)	C ⁻ (1280 µl MeOH) (3)	C ⁺ ampicilina 10 µg/ml (3)	bact/ml 1x10 ⁶
<i>Shigella boydii</i> ATCC 8700	-	+ MIC	-	+	15.5
<i>Vibrio cholerae</i> CDCV 12	-	+ MIC	-	+	19.5
<i>Vibrio cholerae</i> C.C.	--	+ MIC	-	+	9.5
<i>Vibrio cholerae</i> INDRE 206	-	+ MIC	-	+	29

A continuación el extracto metanólico se cromatografió por columnas en forma biodirigida, es decir las fracciones eluidas de una columna se sometieron a la prueba Kirby Bauer sobre la cepa *V. cholerae* INDRE 206, esto con la finalidad de seguir cromatografiando aquellas fracciones que resultaron ser activas hasta aislar compuestos puros. Gracias a la cromatografía de 11 columnas se aislaron los siguientes compuestos:

*β-D-GLUCÓSIDO DE β-SITOSTEROL Se obtuvieron 320 mg de unos sólidos blancos poco solubles en cloroformo, con un p.f. 289°-290°C, identificados por comparación con una muestra auténtica (espectro # 1)¹.

* O-METIL-CATALPOL De la columna 1, fracciones 179 a 188 (O) se obtuvieron 0.6591 g de unos cristales grandes, blancos y opacos, con p.f. de 230°C a 235°C. Concluyéndose su identidad por la similitud en los valores de R.f., p.f. y espectro IR con los de una muestra auténtica (espectro # 2).

*AUCUBINA. Cristalizó en forma de rosetas un compuesto (0.1316 g) con p.f. de 180°C a 184° C. Se comprobó la identidad del compuesto al comparar su R.f, p.f. y espectro de IR con los de una muestra auténtica (espectro # 3).

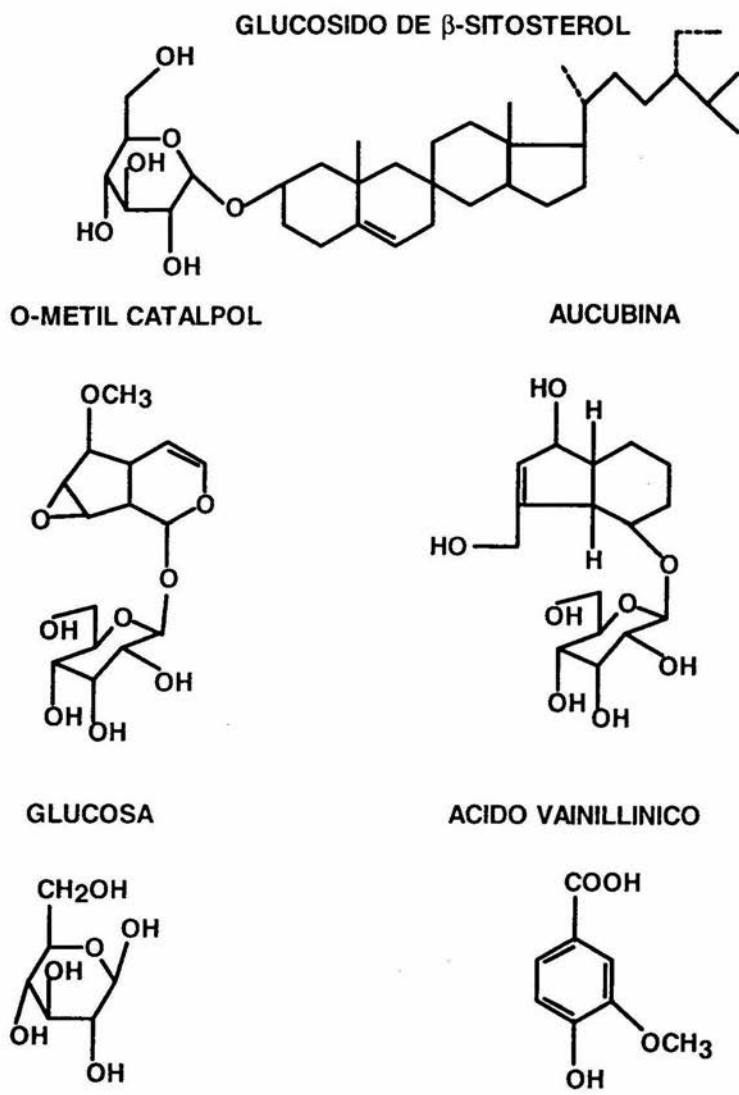
*D-GLUCOPIRANOSA. Se aislaron 313.2 mg de unos cristales con p.f. 155°C-157° C; se sospechó que era un azúcar y para comprobarlo se acetiló².

¹ Los espectros se encuentran en el apéndice 6.

² Para conocer el proceso de acetilación, remitirse al apéndice 3.

Se obtuvieron unas agujas perladas (tetraacetil glucosa) con p.f. 110°C–112 °C, se concluyó que era d-GLUCOPIRANOSA por similitud de p.f., espectros de IR, masas y RMN H⁺ con los de una muestra auténtica (espectros # 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11).

FIG. 4.- COMPUESTOS AISLADOS DE LA RAÍZ *Buddleia cordata*



ÁCIDO VAINILLÍNICO. Se obtuvo 53.9 mg de unos cristales blancos en forma de aguja, con p.f. de 203°C a 204°C. Se infirió su estructura por análisis y comparación de sus espectros de IR, masas y RMN H⁺ (espectros # 12, 13, 14, 15, 16), con los reportados en la literatura (Sadler, 1970).

Las compuestos obtenidos se sometieron a la prueba Kirby– Bauer con la cepa *V. cholerae* INDRE 206.

Tabla 4. Halos de inhibición (diámetro en mm) de los compuestos eluidos del extracto metanólico (8 mg/disco) en la prueba de Kirby–Bauer con la cepa *V. cholerae* INDRE 206 y el conteo de esta cepa.

O–metil catalpol	aucubina	glucosa	ácido vainillínico	C ⁻ (100 µl de CHCl ₃)	C ⁺ (kanamicina 30 µg/disco)
-	-	-	+ 13	-	+ 16

Conteo bacteriano de *V. cholerae* INDRE 206: 8.5 x 10⁸ bacterias

Glucósido de β–sitosterol	C ⁻ (120 µl de MeOH– CHCl ₃ 1:1)	C ⁺ (kanamicina 30 µg/disco)
-	-	+ 23.0

Conteo bacteriano de *V. cholerae* INDRE 206: 2.5 x 10⁸ bacterias/ml.

El único compuesto activo fue el ácido vainillínico. Por el escaso rendimiento del mismo y debido a que no se obtuvo la suficiente cantidad para realizar las próximas pruebas bacterianas se sintetizó más compuesto, a partir de vainillina con la reacción reportada por Pearl (1950)³.

Una vez que se obtuvo la suficiente cantidad del ácido vainillínico se realizaron las pruebas biológicas sobre las cuatro bacterias que originalmente habían sido sensibles al extracto crudo.

³ Para mayor detalle ver el apéndice 2.

Tabla 5. Resultados de la prueba de Kirby–Bauer del AV con las siguientes cepas bacterianas y el conteo de estas. Los resultados se expresan en diámetro (mm) del halo de inhibición.

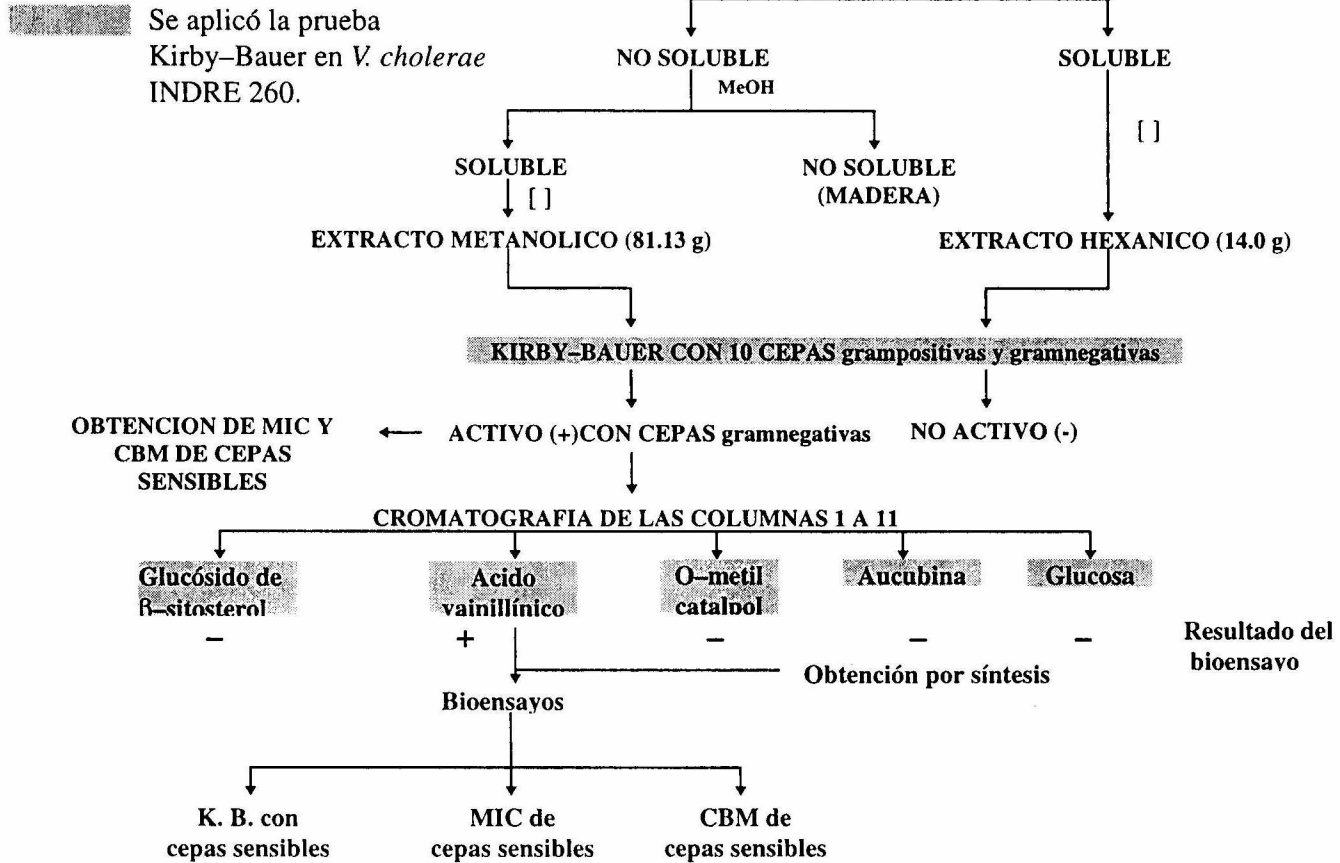
BACTERIA	ác.vainillínico (8 mg/disco) (prom.de 3)	C ⁺ (kanamicina 30 µg/disco)	C ⁻ (100 µl de MeOH)	Conteo bacteriano (bact/ml)
<i>Shigella boydii</i> ATCC 8700	12.3	17	-	7 x 10 ⁸
<i>V. cholerae</i> INDRE 206	11.66	18	-	18 x 10 ⁸
<i>V. cholerae</i> C.C.	11.66	18	--	1.8 x 10 ⁷
<i>V. cholerae</i> CDCV 12	9.66	18	-	2 x 10 ⁸

Al ver que las cepas fueron sensibles al ácido vainillínico se determinó MIC y CBM.

Tabla 6. Obtención de MIC y CBM del AV con las siguientes cepas bacterianas y el conteo de estas

BACTERIA	(MIC) (3) [µg/ml Ác. vainillínico]	(CBM) [µg/ml Ác. vainillínico]	C ⁻ (128 µl de MeOH)	C ⁺ (kanamicina 20 µg/disco)	Conteo bacteriano (bact/ml).
<i>Shigella boydii</i> ATCC 8700	3200	6400	-	+	3.5 x 10 ⁸
<i>V. cholerae</i> CDCV 12	1600	3200	-	+	1.0 x 10 ⁸
<i>V. cholerae</i> INDRE 206	1600	3200	-	+	5.0 x 10 ⁸
<i>V. cholerae</i> C.C.	3200	3200	-	+	2.0 x 10 ⁸

FIG. 5 DIAGRAMA DE FLUJO DE RESULTADOS.



ANÁLISIS DE RESULTADOS

Vemos en la tabla 2 que las bacterias *Shigella boydii* ATCC 8700, *Vibrio cholerae* cepas INDRE 206, CDCV 12 y C.C., son sensibles al extracto metanólico, el cual tiene una MIC de 12.8 mg/ml para las cuatro cepas (Tabla 3). Esto es interesante porque todas estas bacterias son gramnegativas.

De las sustancias que se encontraron, la aucubina, glucosa y el *O*-metilcatalpol ya se han reportado en otras especies de *Buddleia*, en el caso del glucósido de β -sitosterol, sólo se tienen registros de su aglucona (Houghton, 1984).

Este trabajo es el primer reporte de ácido vainillínico (AV) en el género *Buddleia*. (no se encontraron citas anteriores).

Como se observa en la Tabla 4 la cepa de *V. cholerae* INDRE 206 no fue sensible a la aucubina, ni al *O*-metil catalpol ni al glucósido de β -sitosterol, ni a la glucosa. En cambio lo fue para el ácido vainillínico.

En la tabla 5 se aprecia que las cepas *Shigella boydii* ATCC 8700, *V. cholerae* CDCV 12 y C.C. también fueron sensibles al AV, con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 1600 μ g/ml en *V. cholerae* CDCV 12 e INDRE 206 y de 3200 μ g/ml en *Shigella boydii* ATCC 8700 y en *V. cholerae* C.C. (tabla 6). Además la concentración bactericida media (CBM) fue de 3200 μ g/ml en las tres cepas de *V. cholerae* y de 6400 μ g/ml en *Shigella boydii* ATCC 8700. Esto significa que la concentración de AV para matar fue el doble que la necesaria para inhibir a los organismos, excepto para *V. cholerae* C.C donde la MIC y la CBM tuvieron el mismo valor.

También se observa que las cepas más sensibles fueron la CDCV 12 e INDRE 206 de *V. cholerae*, seguida por *V. cholerae* C.C y la cepa más resistente fue *Shigella boydii* ATCC 8700.

Podemos suponer que estos niveles de sensibilidad se deben al genotipo primigenio que tienen, resultante de la adaptación al medio y mutaciones al azar, que se dieron antes de la exposición al antibiótico. En el caso de la cepa *V. cholerae* C.C, la sensibilidad intermedia probablemente se deba a que se aisló de un caso clínico, por lo que es posible que haya estado expuesta a antibióticos, lo que tal vez hayan acelerado la selección de cepas resistentes sobre las sensibles (Guiney, 1986).

La MIC observada para el extracto metanólico (12.8 mg/ml) fue mayor que la del AV (1600-3200 μ g/ml), por lo que se supone que en el extracto la concentración real de AV era menor, por lo tanto, fue necesaria una mayor cantidad de extracto que de AV para causar inhibición del crecimiento bacteriano.

Además, no debemos pensar que la actividad antibacteriana de todo el extracto se debió solo al AV, ya que dentro de los compuestos que encontramos es

de notar la aucubina, la cual por hidrólisis vegetal forma su aglucona, esta última ha demostrado tener actividad antibacteriana (Rombouts, 1956). Aunque nosotros no aislamos la aglucona referida, es posible que se haya encontrado en el extracto metanólico en baja cantidad.

Los resultados concuerdan con la actividad antibacteriana del AV reportada por Balansard *et al.*, (1980) y García y Marhueda (1985). El primero aisló ácido vainillínico (del látex de *Alafia multiflora* Stapf) y lo probó contra *Staphylococcus aureus*, obteniendo una MIC de 0.8 g/ml. En el segundo trabajo se aisló el mismo ácido (de la parte aérea de la planta *Ononis natrix*.) y se probó contra las especies *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*, observándose que son sensibles a concentraciones entre 250-1500 µg/disco, dependiendo de la cepa.

En este trabajo el AV no se probó contra *Staphylococcus aureus* porque el extracto original no tuvo efecto en esta cepa, ahora sabemos que ésta si es sensible al AV y explicamos éste fenómeno porque en el extracto hay muchos compuestos que pueden provocar que el AV actúe de una forma sinérgica o antagónica (Rasmussen J. A., 1979).

Con base a la actividad del extracto y de su constituyente el AV podemos considerar que se justifica el uso etnobotánico que se le da al tepozán. A continuación se menciona la probable función del AV para la planta de Tepozán.

-COMO UNA RESPUESTA A LAS INFECCIONES.

La concentración de ácidos fenólicos (entre ellos el AV) aumenta en los tejidos vegetales como una respuesta a las infecciones, esto provoca una disminución en la germinación de esporas y en el crecimiento de patógenos fungales. Los ácidos fenólicos se incorporan en la lignina de los tejidos afectados, actuando entonces como una barrera mecánica (Cahill y McComb, 1992; Nicholson *et al.*, 1986).

-COMO AGENTE ALELOPATICO:

Algunos compuestos alelopáticos, han sido identificados como ácidos fenólicos, entre ellos el AV (Blum *et al.*, 1984). Se sabe que este compuesto promueve la apertura estomática, provocando la deshidratación vegetal (Purohit *et al.*, 1992), además de inhibir la germinación, reduce el desarrollo general, el foliar y el radicular, por lo tanto el peso seco de diversas plantas (Blum *et al.*, 1984, Mersie y Singh en 1988, McPherson *et al.*, 1971; Sathiyamoorthy, 1990; Chiji *et al.*, 1980; Blum *et al.*, 1985; Kobayashi *et al.*, 1984; Maureen *et al.*, 1982).

El ácido. vainillínico actúa de forma sinérgica o antagónica del crecimiento vegetal, dependiendo de su concentración (Larson ,1989; Maureen *et al.*, 1982).

Se ha visto que afecta los niveles de AIA (sustancia que estimula la división celular, la síntesis de ác. nucleicos y proteínas entre muchas otras funciones (Fosket, 1994; Maureen *et al.*, 1982)), sobre la enzima auxina oxidasa (Larson, 1989).

La AIA oxidasa necesita de cofactores como el ácido *p*-cumárico y probablemente el AV. (Vaughan y Ord, 1990; Wilkins, 1984).

Hay una concentración umbral de AIA que provoca un crecimiento vegetal y radicular, a partir de esta concentración la cantidad de crecimiento aumenta como una función lineal respecto al incremento en la concentración de la hormona, sin embargo llega a un punto supraóptimo donde la cantidad de AIA cesa de promover el crecimiento y su acción se vuelve inhibitoria. La cantidad umbral así como la supraóptima son específicas para cada tejido y especie (Fosket, 1994).

Por otro lado, se ha visto que el AV afecta el flujo de nutrientes, la fosforilación oxidativa (Maureen *et al.*, 1982), los cambios del potencial de la membrana celular (Larson, 1989; Maureen *et al.*, 1982; Stowe y Osborn, 1980), la elongación y división celulares (Blum *et al.*, 1984; Vaughan y Ord, 1990.), la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Maureen *et al.*, 1982); reduce significativamente el contenido foliar de N, Fe, Zn y P, el contenido de clorofila en el tomate (Mersie y Singh, 1988), la absorción de K^+ y provoca la pérdida de iones existentes (Jalal y Read, 1983) y de otros metabolitos (Glass, 1973).

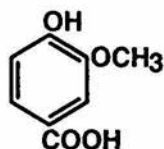
Esto último también se ha observado con sustancias similares al AV en algunos hongos (Jalal y Read, 1983) y es posible que también afecte a otros microorganismos, como las bacterias que probamos en este trabajo. Si nuestra hipótesis es cierta, las bacterias pudieron haber sido afectadas por la siguiente razón:

El poder tóxico de los ácidos fenólicos está muy relacionado con su coeficiente de partición, ya que cuando aumenta éste, su poder inhibitorio es menor debido a que tiene varios grupos hidroxilos y por lo tanto son menos solubles en lípidos; en cambio, cuando el coeficiente de partición es menor, el poder inhibitorio de las moléculas aumentan gracias a que los grupos metoxi son más numerosos y por lo tanto su solubilidad en lípidos se incrementa (Glass, 1973; Kobayashi *et al.*, 1984; Stowe y Osborn, 1980; Jalal y Read, 1983). La membrana plasmática contiene lípidos y los ácidos fenólicos pudieran disolverse en ella afectando procesos relacionados con la permeabilidad membranal (Glass, 1973).

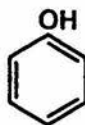
Además el AV tiene cierta acción oxidante (Onyeneho, 1992) por lo que es probable que actúe sobre los grupos -SH y S-S de las enzimas y los componentes de la membrana bacteriana (Davis, 1984).

También podemos relacionar el poder bactericida del AV por su similitud estructural con el fenol (Ver siguiente figura).

ácido vainillínico



fenol



El fenol penetra en la pared celular, rompiéndola y precipitando a los aminoácidos y al ácido glutámico, es decir causa un daño físico que afecta la permeabilidad de la pared celular. Además es un detergente, es citotóxico; desnaturaliza proteínas celulares, anula sistemas enzimáticos activadores del succinato, fumarato, piruvato y glutamato y parcialmente a los de lactato, glucosa, formiato butanos; también, afecta la actividad de las enzimas: deshidrogenasa, oxidasa y catalasa. Su acción bactericida implica lisis celular.

La actividad antibacteriana del fenol se incrementa mediante la sustitución en el anillo con alquilos que aumentan la solubilidad del grupo -OH fenólico (esto es, su coeficiente de partición), convirtiendo a la molécula en más hidrófoba, lo cual aumenta su poder bactericida. (Davis, 1984 y Block, 1983). La unidad reactiva de la molécula fenólica es el grupo -OH. (Block, 1983).

El presente análisis se hizo con la finalidad de dar una posible explicación al papel que desempeña el AV en la bioquímica vegetal en un estado normal y de estrés por infección y por otro lado para tratar de comprender el mecanismo de acción a nivel molecular del AV sobre la muerte bacteriana.

Para conocer el exacto mecanismo en ambos procesos se sugiere hacer una investigación específica del AV para cada caso.

CONCLUSIONES

- El extracto metanólico de la corteza de raíz de *Buddleia cordata* var *cordata* presenta actividad antibacteriana contra algunas bacterias gramnegativas: *Shigella boydii* ATCC 8700, *V. cholerae* INDRE 206, CDCV 12 y C.C.
- Se aislaron del extracto metanólico de la corteza de raíz de *Buddleia cordata* var *cordata*: glucósido de β -sitosterol, ácido vainillínico, O-metil catalpol, aucubina y glucosa. Estos compuestos con excepción del ácido vainillínico ya se habían aislado del género *Buddleia*.
- Por primera vez se aisló ácido vainillínico del género *Buddleia*.
- Los compuestos glucósido de β -sitosterol, O-metil catalpol, aucubina y glucosa no presentaron actividad antibacteriana.
- Uno de los principios activos presente en este extracto es ácido vainillínico.
- La acción bactericida del AV puede estar relacionada con su coeficiente de partición y con su similitud estructural con el fenol. Para conocer el exacto mecanismo de acción se propone realizar la investigación específica.

REFERENCIAS

- ALVAREZ F. J., CARABIAS J., MEAVE J., MORENO-CASASOLA P., NAVA D., RODRÍGUEZ F., TOVAR C. Y VALIENTE A. (1982). Proyecto para la creación de una reserva en el Pedregal de San Ángel. Lab. de Ecología, Fac. de Ciencias, U.N.A.M. México 49 pp.
- BAILEY, SCOTT, FINEGOLD M. S., BARON J. E. (1989). Diagnóstico microbiológico. 7ª Ed. Panamericana. Argentina, pp 191-201.
- BALANSARD G., ZAMBLE D., DUMENIL G. Y CREMIEUX A. (1980) Mise en évidence des propriétés antimicrobiennes du latex obtenu par incision du tronc de *Alafia Mulriflora* Staf. Identification de l'acide vanillique. Plantes Médicinales et Phytothérapie 24(2):99-104.
- BLOCK S. (1983) Disinfection, sterilization and preservation. 3ª Ed. Copuright. U.S.A. pp 197-224.
- BLUM U., DALTON R. B. AND RAWLINGS O. J. (1984) Effects of ferulic acid and some of its microbial metabolic products on radicle growth of cucumber. Journal of Chemical Ecology 10(8): 1169-1191.
- BLUM U., DALTON R. B. AND SHANN R. J. (1985) Effects of various mixtures offerulic acid and some of its microbial metabolic products on cucumber leaf expansion and dry matter in nutrient culture. Journal of Chemical Ecology 11(5): 619-641.
- CAHILL M. D. AND MCCOMB A. J. (1992) A comparison of changes in phenylalanine ammonialyase activity, lignin and phenolic synthesis in the roots of *Eucalyptus calophylla* (field resistant) and *E. marginata* (susceptible) when infected with *Phytophthora cinnamomi*. Physiological and Molecular Plant Pathology 40, 315-332.
- CETENAL, carta Edafológica (1979) E 14 A 39, Ciudad de México. Escala 1:50 000, 2ª impresión. México.
- CETENAL, carta Geológica (1978) E 14 A 39, Ciudad de México. Escala 1:50 000. México.

- CETENAL, carta Topográfica (1980) E 14 A 39, Ciudad de México. Escala 1:50 000, 2ª Ed. México.
- CHIJI H., TANAKA S. AND IZAWA M. (1980) Phenolic germination inhibitors in the seed balls of red beet (*Beta vulgaris* L. var. *rubra*). Agriculture Biological Chemistry, 44(1): 205-207:
- CONN E. E. (1985) Recent advances in phytochemistry. volumen 20. the shikimic acid pathway. Ed. Plenum Press. pp 83-88, 163-200.
- COOPER R., SOLOMON H. P., KUBO I., NAKANISHI K. (1980) Myricoside, an african armyworm antifeedant: separation by droplet countercurrent chromatography. Journal of American Chemistry Society. 102: 753-755.
- DAVIS B. D., DULBECCO R., EISEN H. N., GINISBERG H. S., WOOD W. B. (1973). Microbiology including immunology and molecular genetics. 2ª Ed. Harper international. USA. pp 779-782.
- DAVIS B. D., DULBECCO R. EISEN H. N., GINISBERG H. S. (1984). Tratado de microbiología 3ª Ed. Salvat. México. pp 1028-1030.
- EVANS W. C. (1991) [1989] Farmacognosia Trease-Evans 13ª Ed. Interamericana-Mc Graw Hill. México. pp 728-730.
- FOSKET D. E. (1994) Plant growth and development. A molecular approach. Academic Press. USA. pp 298-304.
- GARCÍA E. (1973) Modificaciones al sistema de clasificación climática de koppen. México. U. N. A.. M. México 185 pp.
- GARCÍA M. D. Y MARHUEDA E. (1985) Isolement et activité antimicrobienne de l'acide vainillique et de l'acide p-hydroxy-benzoïque, constituants d'*Ononis natrix*. Fitoterapia. 56(6): 349-350.

–GARG S. C., DENGRE S. L. (1992) Composition of the essential oil from the leaves of *Buddleja asiatica* Lour. Flavour and Fragrance Journal 7 (3): 125–127. tomado de BIOSIS CD-ROM 1992.

–GLASS, A. D. M. (1974). Influence of phenolic acids upon ion uptake. III. Inhibition of potassium absorption. Journal of Experimental Botany, 25(89):1104–1113.

–GUINEY, G. D. (1986). Resistance to antimicrobial drugs. In: infectious diseases and medical microbiology. Braude A I., Davis C. E. and Ferrer J. 2^a Ed. Saunders Company. USA.

–HARBORNE J.B. AND WILLIAMS C. (1971) 6-hydroxyluteolin and scutellarein as phyletic markers in higher plants. Phytochemistry 10: 367–378.

–HOUGHTON P.J. (1984) Ethnopharmacology of some *Buddleja* species. Journal of Ethnopharmacology. 11: 293–308.

–HOUGHTON P.J. (1985). Lignans and neolignans from *Buddleja davidi* Franch. Phytochemistry, 24 (4): 819–826.

–HOUGHTON J. P. (1989). Phenolic fatty acid esters from *Buddleja globosa* stem bark. Phytochemistry 28 (10): 2693–2695.

–HULTIN E. AND TORSSELL K. (1965) Alkaloid-screening of swedish plants. Phytochemistry, (4): 425–433.

–INSTITUTO MEXICANO PARA EL ESTUDIO DE LAS PLANTAS MEDICINALES A.C. (IMEPLAM). (1976). Usos de las plantas medicinales de México, Monografías Científicas II, Ed José Luis Díaz. México

–JALAL M. A. F. AND READ D. J. (1983). The organic acid composition of calluna heathland soil with special reference to phyto- and fungitoxicity. Isolation and identification of organic acids. Plant Soil, 70(2):257–272.

–KOBAYASHI S., ARIGA M., OZAWA T. AND IMAGAWA H. (1984). Pollen growth inhibitors in *Pinus densiflora* pollen: isolation, biological activities, and

structure-activity relationship. Agriculture Biological Chemistry, 48(2):389-395.

-KONEMAN W. E., ALLEN D. S., DOWELL R. V., SOMMERS M. H. (1985) Diagnóstico microbiológico. Ed. Panamericana. México, pp 380-394.

-KRIEG R. N., HOLT G. J.(1984) Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 1 Ed. Cophyright. U.S.A.. pp 423-427, 518-542.

-KUBO I., YOKOKAWA Y. (1992) Two tyrosinase inhibiting flavonol glycosides from *Buddleja coriacea*. Phytochemistry. 31 (3): 1075-1077.

-KUMATE, J. (1982) Las enfermedades infecciosas en México. en: "Vida y muerte del mexicano". Ortíz Quesada, F. Ed. FOLIOS EDICIONES, S.A., México.

-KUMATE J., SEPÚLVEDA J.Y GUTIERREZ G. (1993) El colera. Epidemias, endemias y pandemias. Ed. Interamericana Mc Graw Hill pp 1-271.

-LARSON L. J. (1989). Effect of phenolic acids on growth of *Chlorella pyrenoidosa*. Hydrobiologia, 183:217-222.

-LAURELL C. Medicina y capitalismo en México en Cuadernillos políticos, México, Julio-Sept 1975: 80-93.

-LENNETTE H. E., BALOWS A., HAUSLER J.W., SHADOMY H. J. (1987) Manual de microbiología clínica. 4ª Ed. Médica Panamericana. Argentina, pp 336-352, 358-382, 1192, 1200-1245.

-LÓPEZ J., SIERRA J., VEGAZO M. E. Y CORTÉS M. (1979) Chemical constituents of *Buddleja globosa* Lam. Fitoterapia 50: 195-198.

-MANDELL G. L., DOUGLAS R. G.Y BENNERR J. E. (1991). Enfermedades infecciosas. Principios y prácticas. Vol II Ed. Médica Panamericana. Argentina, pp 1731-1738.

-MARÍN G., GIMÉNEZ B., CORTÉS M., PARDO F., NÚÑEZ J. Y NARANJO J. (1979) Estudio fitoquímico de *Buddleja globosa* Lam. Revista Latinoamericana de Química, 10:19-21.

*-MAUREEN A., RAMIREZ E., GARRAWAY J. L. (1982). Plant growth inhibitory activity of extracts of raw and tested pig slurry. Journal of Science Food Agriculture, 33:1189-1196.

-MCPHERSON J. K. (1971). Allelopathic constituents of the chaparral shrub *Adenostoma fasciculatum*. Phytochemistry, 10(12):2925-2933.

-MERSIE W. AND SINGH M. (1988). Effects of phenolic acids and ragweed parthenium (*Parthenium hysterophorus*) Extracts on tomato (*Lycopersicon esculentum*) growth and nutrient and chlorophyll content. Weed Science, 36:278-281.

-MORENO P. N. (1984) Glosario botánico ilustrado. Ed. CECSA. México 300p.

-NICHOLSON R. Y., BUTLER L. G. AND ASQUITH T. N. (1986). Glycoproteins from *Colletotrichum graminicola* that bind phenols: implications for survival and virulence of phytopathogenic fungi. Phytopathology 76(12):1315-1318.

-ONYENEHO S. N. Y HETTIARCHCHY N. S. (1992) antioxidant activity of durum wheat bran. Journal of Agriculture Food Chemistry. 40: 1496-1500.

-PARDO F., PERICH F., VILLARROEL L. Y TORRES, R. (1993) Isolation of verbascosido, and antimicrobial constituent of *Buddleja globosa* leaves. Journal of Ethnopharmacology 39: 221-222.

-PEARL A. Y. (1950) Methods of preparation of vanillic acid. I silver oxide method & II caustic fusion method. Organic Syntheses: 101-107.

-PETTIT G. R., NUMATA A. TAKEMURA T., ODE H. R., NARULA A. S., SCHMIDT M. J., GORDON M. C. AND PASE P. C. (1990) Antineoplastic agents, 107. Isolation of acteoside and isoacteoside from *Castilleja linariaefolia*. Journal of Natural Products. 53: (2) 426-458.

-PUROHIT S., LALORAYA M., BHARTI S. Y NOZZOLILLO C. (1992) Effect of phenolic compounds on aba-induced changes in k^+ concentration of guard cells and in epidermal difussive resistance. Journal of Experimental Botany. 43(246): 103-110.

-RASMUSSEN J. A. (1979) Inhibitory effects of combinations of tree phenolic acids on grain sorghum germination. Plant Science Letters. 14:69-74.

-RZEDOWSKI, J. (1954) Vegetación del pedregal de san ángel (D. F. México). Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas I. P. N. 8:59-129.

-RZEDOWSKI, J. Y RZEDOWSKI, C. G. (1985) Flora fanerogámica del Valle de México vol.II diciledoneae (Euphorbiaceae- Compositae). Ed. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas I. P. N. e Instituto de Ecología. México. pp 212-215.

-ROMBOUS J. E. Y LINKS J. (1956) The chemical nature of the antibacterial substance present in *Aucuba japonica* Thunbg. Experientia XII (2):78-80.

-SADTLER. Research laboratories, Inc.Espectro de Infrarojo KBr, clave 8217 K, perteneciente al ácido vainillínico.

SAID Z. EL BASYOUNI, CHEN D., IBRAHIM R. K., NEISH A. C. Y TOWERS G. H. N. (1964) The biosynthesis of hydroxybenzoic acids in higher plants. Phytochemistry. 3(4):485-492.

-SAN MARTÍN C. R. (1977) Tratado de farmacognosia Ed. Científico-Médica, España.pp 1010-1015.

-STARR, STOLP, TRÜPER, SCHLEGEL (1981) The prokariotes Vol.II Ed. Springer-Verlag. U.S.A. pp 1248-1259, 1272-1281.

-SATHIYAMOORTHY P. (1990) Identification of vanillic and p-coumaric acid as endogenous inhibitors of soybean seeds and their inhibitory effect on germination. Journal Plant Physiology, 136:120-121.

-STOWE G. L. AND OSBORN A. (1980) The influence of nitrogen and phosphorus levels on the phytotoxicity of phenolic compounds. Canadian Journal Botany. 58(10):1149-1153.

-TRÊS. MUNDIAL DE TRÊS LIVROS E FASCÍCULOS LTDA. (1984). Plantas que curan. Ed. Alzugaray Domingos y Alzugaray Cátia. Brasil.

-TYLER V. E., BRANDY R. L. ROLOBERO E. J. (1979) Farmacognosia 7^a Ed. El Ateneo, Argentina.

-VAUGHAN D. AND ORD B. (1990) Influence of phenolic acids on morphological changes in roots of *Pisum sativum*. Journal Science Food and Agriculture.52:289-299.

-WILKINS B. M. (1984) Advanced plant physiology. Longman Scientific & Technical. USA. pp 1-20, 76-78.

-YAMAMOTO A., NITTA S., MIYASE T. UENO A. AN WU L. (1993) Phenylethanoid and lignan-iridoid complex glucosides from roots of *Buddleja davidii*. Phytochemistry 32 (2): 421-425.

-YOSHIDA T., NOBUHARA J., UCHIDA M., OKUDA T. (1978)-1 Studies on the constituents of buddleja species. I structures of buddledin a and b, two new toxic sesquiterpenes from *Buddleja davidii* Franch. Chemical Pharmacological Bulletin, 26 (8): 2535-2542.

-YOSHIDA T., NOBUHARA J., FIJII, N., OKUDA T.(1978)-2 Studies on the constituents of buddleja species. Ii buddledin c, d and e, new sesquiterpenes from *Buddleja davidii* Franch. Chemical Pharmacological Bulletin, 26 (8): 2543-2549.

APÉNDICES

APÉNDICE 1.

TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

Se partió de un inóculo de cada una de las cepas en caldo Mueller-Hinton¹ a una concentración de 1×10^8 bacterias/ml (Koneman, 1985). Esta concentración se determinó por comparación visual de la turbidez del medio con el estándar 0.5 de McFarland (Cuadro #1), y por conteo del número de colonias que se observaron en un subcultivo.

El subcultivo del inóculo se realizó haciendo diluciones sucesivas 1:100, en tres tubos con 9.9 ml de solución salina fisiológica (0.9 % de NaCl). De la última dilución se tomaron dos alícuotas de 0.1 ml cada una y se sembraron separadamente en dos placas de agar, las cuales se incubaron durante 18 a 24 hs (sin presión de CO₂ y a una temperatura de 35°C) para determinar el número de UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC). Se obtuvo una media y se multiplicó por el factor de dilución para obtener el número de bacterias por ml del inóculo original (Figura 6).

CUADRO # 1 Estándar de McFarland.

La turbidez de los siguientes tubos (indicado como índice) equivale a un determinado número de bacterias. La turbidez se obtiene por la suspensión que se forma al mezclar las siguientes sustancias.

ÍNDICE	TUBO NUMERO										
	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ba Cl ₂ 1% (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
H ₂ SO ₄ 1% (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
Densidad celular ($\times 10^8$)	1	3	6	9	12	15	18	20	24	27	30

Tomado de Bailey & Scoot (1989) y Koneman (1985).

¹ El caldo o agar de cultivo utilizado en todas las pruebas microbiológicas fue Mueller-Hinton marca Bioxon®.

TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN AGAR KIRBY-BAUER

Para esta técnica se prepararon con anterioridad placas con medio, procurando que su espesor no fuera mayor a los 4 mm (Lennette, 1987). También se prepararon discos de papel filtro con los posibles antimicrobianos a probar, disuelto en el líquido correspondiente. Además de un control negativo con únicamente la cantidad ocupada de disolvente y un control positivo con 30 µg de kanamicina². Los discos se dejaron secar 24 h.

Se tomó una muestra del inóculo madre y se sembraron las placas por estrías, dejando secar de 3 a 5 minutos. Posteriormente se colocaron los discos con el antimicrobiano separados unos 20 mm aproximadamente uno del otro y a 15 mm aproximadamente del borde de la caja, presionándolos ligeramente contra el agar. Todas las placas tuvieron dos repeticiones (Koneman, 1985).

Después de 15 minutos de colocados los discos, se invirtió la placa y se incubó; transcurrida la incubación se midieron los diámetros de los halos de inhibición cuando se presentaron (Koneman, 1985).

TÉCNICA DE LA PRUEBA MÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA (MIC)

A) MÉTODO DE MACRODILUCION EN CALDO.

A una serie de 9 tubos de ensayo se les agregó un ml del inóculo madre más un ml de ácido vainillínico, diluido en caldo para obtener concentraciones finales de 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 y 6400 µg/ml). Se prepararon, además, dos tubos control, uno de ellos no contenía antibiótico, solo se agregaron 1280 µl de metanol (máxima cantidad en la que se diluyo el AV), y el otro tubo 20 µg/ml de kanamicina. De todos los tubos se elaboraron dos repeticiones.

Los tubos se incubaron y a su término, se observó la presencia de desarrollo bacteriano, infiriéndolo por la turbidez del medio. El tubo con menor concentración de antimicrobiano en que no se encontró crecimiento visible, representó la Mínima concentración inhibitoria (MIC) (Figura 7).

² Se utilizó este antibiótico porque es de amplio espectro de acción.

Figura 6. VERIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL INÓCULO MADRE POR DILUCIONES SUCCESIVAS

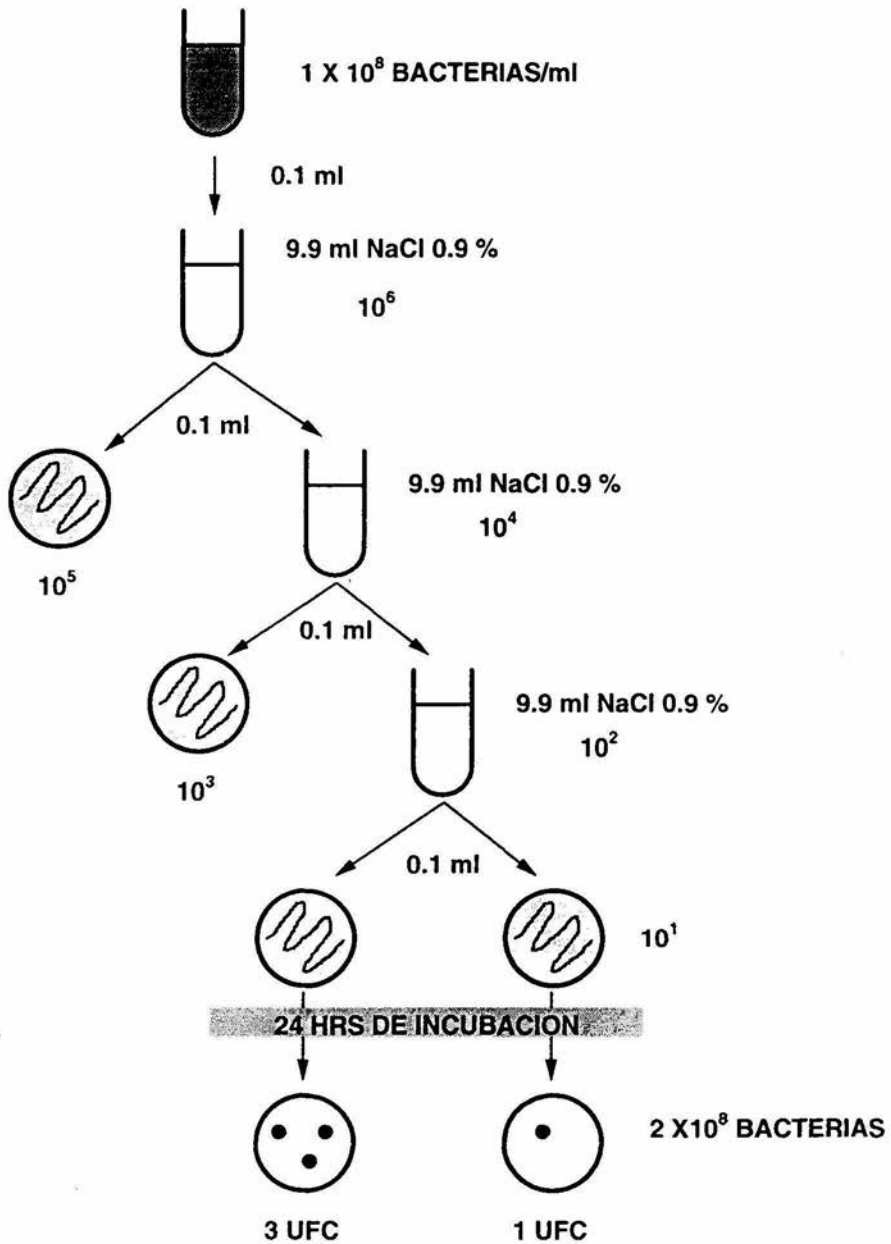
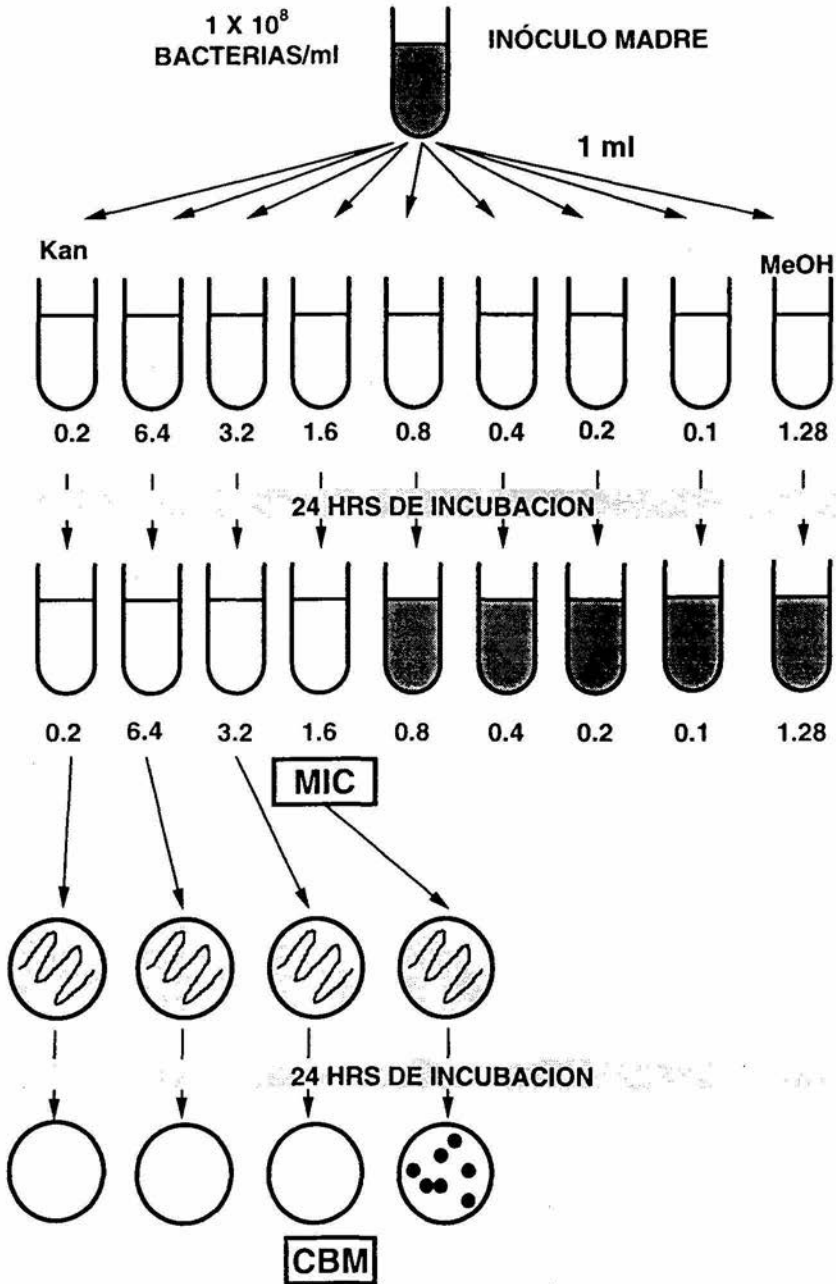


Figura 7. TÉCNICA PARA DETERMINAR LA MIC Y CBM POR EL MÉTODO DE MACRODILUCIÓN EN CALDO.



Continuando con esta técnica también determinamos la CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MEDIA (CBM) de la siguiente manera:

Se vertió el contenido de los tubos que no presentaron turbidez en placas de agar y se incubaron, después se contabilizaron las UFC. La placa con menor concentración de ácido vainillínico donde no se presentó UFC señaló la CBM (Modificado de Bailey y Scott, 1989) (esquema 7).

Para obtener la MIC del extracto metanólico que no fue soluble en el caldo se empleó la siguiente técnica:

B) MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR

Para cada bacteria se elaboraron once placas con 20 ml de agar a 50°C³ a las que se le agregó la cantidad necesaria de una solución madre de extracto metanólico para obtener cajas con una concentración final de 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400, 12800 µg/ml, así como una placa con ampicilina⁴ a 10 µg/ml, y una placa "control negativo" con el vehículo en el que se disolvió el extracto metanólico (1280 µl de metanol). Todas las placas tuvieron dos repeticiones más.

Una vez gelificado el medio, se inocularon en las placas las bacterias con turbidez 0.5 de McFarland, después se incubaron (Lennette, 1987); la caja de menor concentración de extracto metanólico en donde no se presentaron las UFC, nos señaló la MIC. La CBM no se puede determinar por esta técnica (Bailey y Scott, 1989).

³ Agregar el antimicrobiano a mayor temperatura puede deteriorarlo y si se agrega a menor temperatura se impide una mezcla adecuada.

⁴ Se utilizó este antibiótico porque es de amplio espectro de acción.

APÉNDICE 2

SÍNTESIS DEL ÁCIDO VAINILLÍNICO POR MEDIO DE UNA FUSIÓN ALCALINA

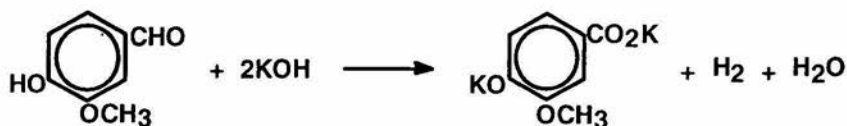
En un recipiente de acero inoxidable de 2 l de capacidad equipado con un agitador de Nicromo y calentado por una parrilla eléctrica, se vierten 90 g de NaOH al 97%, 90 g de KOH y 25 ml de agua. La mezcla se agitó y se calentó a 160° C (a esta temperatura se apagó la parrilla).

Primero se adicionaron 12.5 g de vainillina, (la temperatura por la reacción aumentó a 180-195° C) y después 63.5 g más gradualmente, en un período de 10-12 minutos a una velocidad suficiente para mantener la temperatura de la reacción (tratando de que esta no subiera a más de 200° C ya que se formaría en lugar de AV, ácido. protocatechuico). Después se sigue agitando por 5 minutos, la parrilla se quitó y se dejó enfriar agitándola continuamente, cuando se llegó a una temperatura de 150-160° C se le agregaron 750 ml de agua, se continuó con la agitación hasta que se disolvió.

La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se puso en un baño de hielo y se acidificó con 600 ml de HCl 6 N (se utilizó papel tornasol como indicador de pH).

Se lavó con 75 ml de agua fría, luego se extrajo con hexano y se filtró. Se recristalizó y se obtuvo AV con una pureza de 90-97% con un pf 209-210° C. Tomado de Pearl (1950).

OBTENCIÓN DE ÁCIDO VAINILLÍNICO POR FUSIÓN ALCALINA



APÉNDICE 3

ACETILACIÓN DE LA GLUCOSA

A 10 mg de glucosa se le agregaron 0.5 ml de piridina más 0.5 ml de anhídrido acético, los cuales reaccionaron a temperatura ambiente.

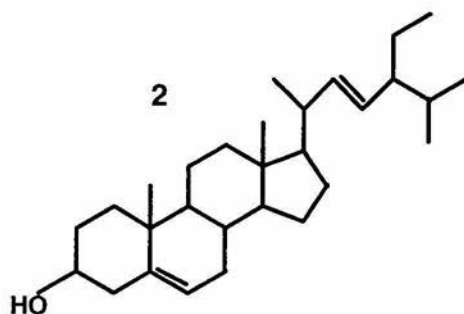
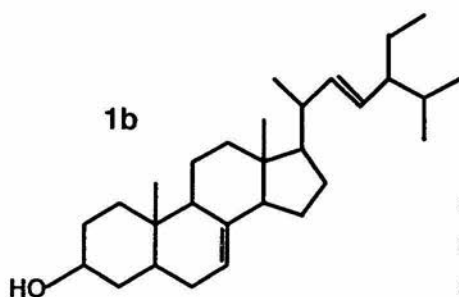
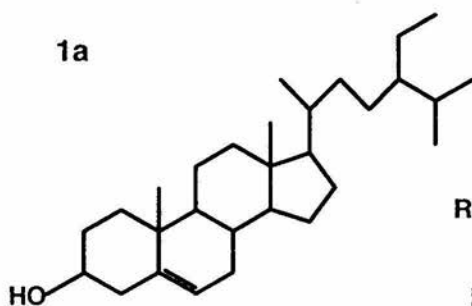
La reacción se siguió por cromatografía en capa fina, cuando esta terminó se detuvo con agua.

El producto de la reacción se extrajo con AcOEt lavándolo después con HCl al 20% hasta que se llegó a un pH ácido, posteriormente se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio hasta que la mezcla tuvo un pH neutro, finalmente se lavó con agua manteniendo el pH.

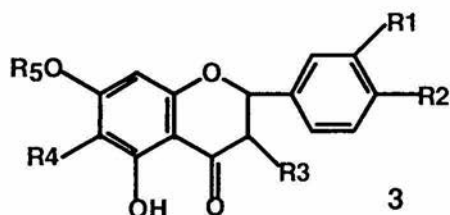
Por último se eliminaron los restos de agua de la solución con sulfato de sodio anhidro, se decantó y concentró.

APENDICE 4. COMPUESTOS AISLADOS DEL GÉNERO *Buddleia*.

ESTEROLES



FLAVONOIDES



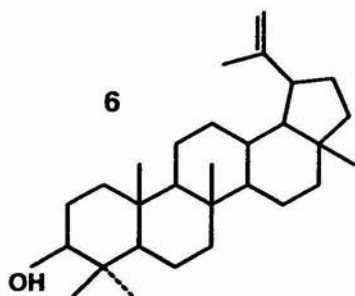
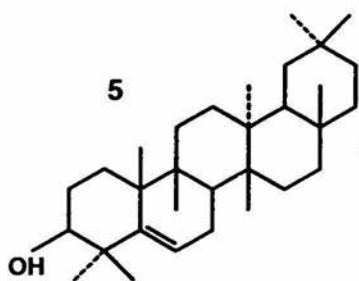
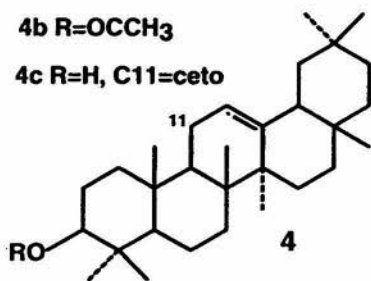
	R1	R2	R3	R4	
3a	H	OH	OH	H	H
3b	H	OCH ₃	H	H	rutinosa
3c	OH	OH	OH	H	H
3d	H	OCH ₃	H	H	H
3e	OH	OH	H	H	H
3f	OH	OH	H	OH	H
3g	H	OH	H	H	glucosa
3h	H	OH	O-rutinosa	H	H
3i	H	OH	H	OH	glucosa
3j	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H
3k	H	OCH ₃	H	OCH ₃	CH ₃
3l	H	OCH ₃	H	H	rutinósido
3m	OH	OH	O-rutinósido	H	H

TRITERPENOS

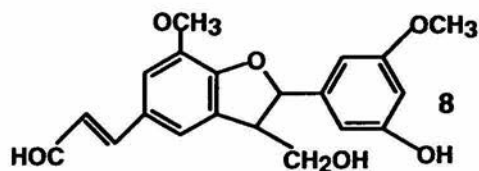
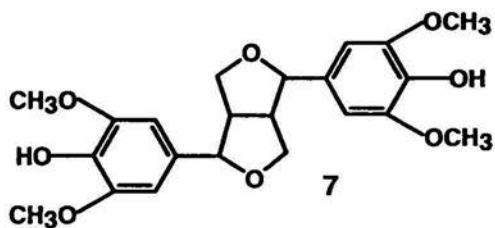
4a R=H

4b R=OCCH₃

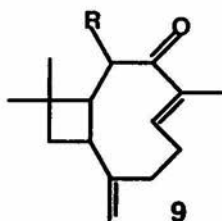
4c R=H, C11=ceto



LIGNANOS



SESQUITERPENOS TIPO CARIOFILENO



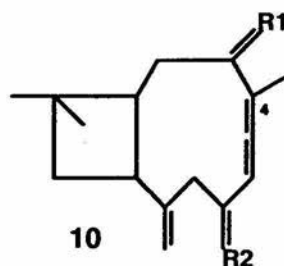
9a R= OH

9b R= H₂

9c R= H

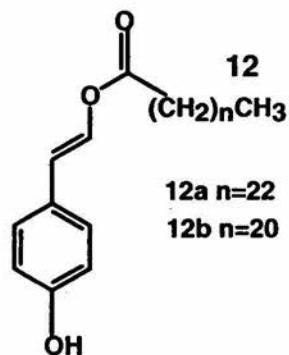
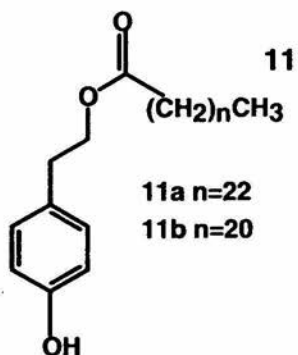
10a R1=O
R2=H₂

10b R1=H₂
R2=O

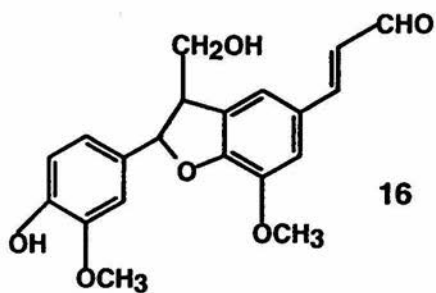
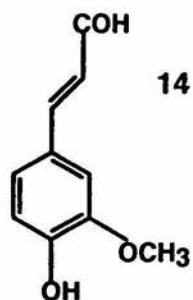
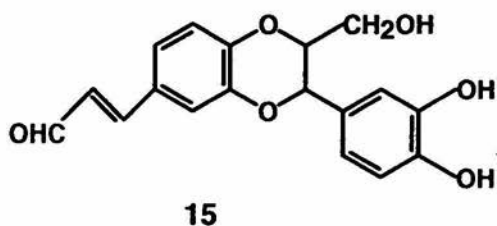
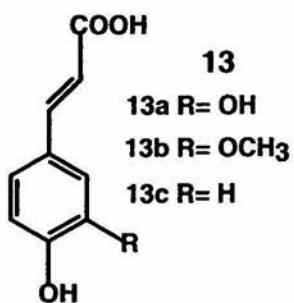


En C4-C5 no hay doble enlace

FENIL ETANOIDES



FENIL PROPANOIDES

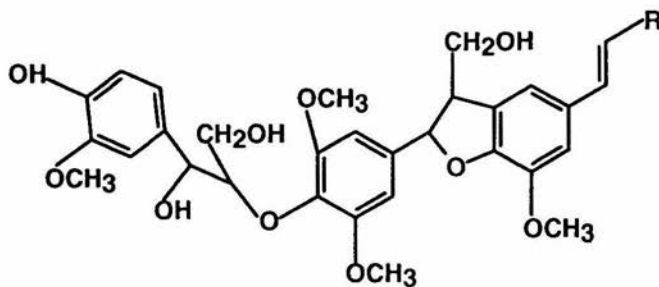


FENIL PROPANOIDES

17

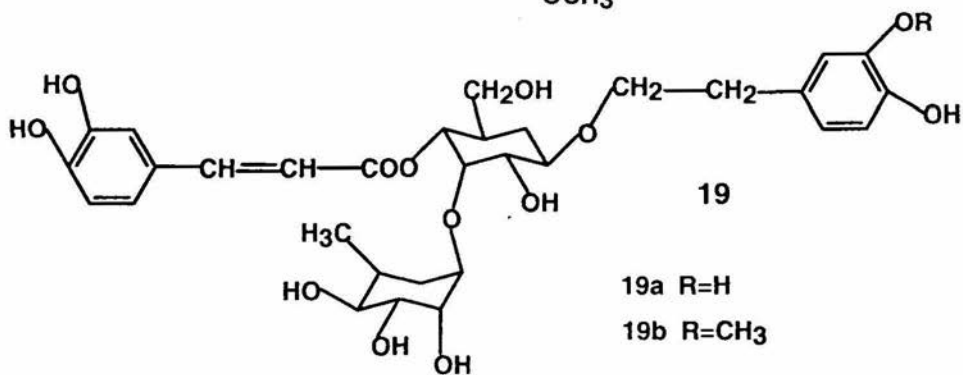
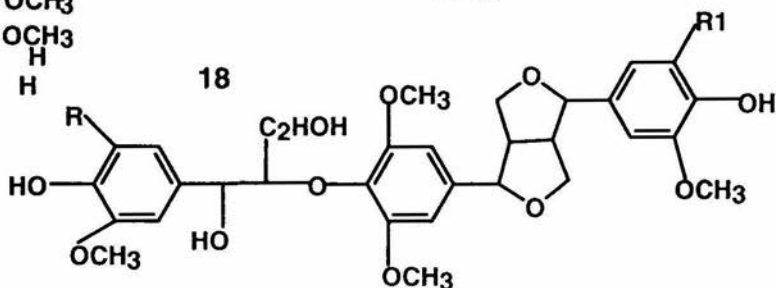
17a R=CHO

17b R=CH₂OH



	R	R1
18a	H	OCH ₃
18b	OCH ₃	OCH ₃
18c	H	H
18d	OCH ₃	H

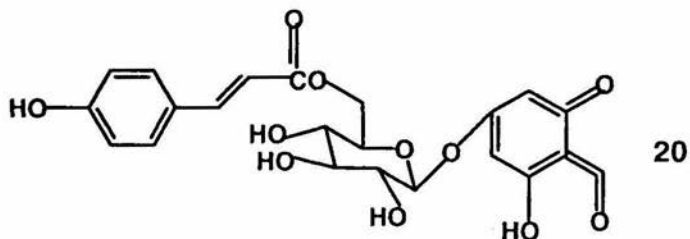
18



19

19a R=H

19b R=CH₃



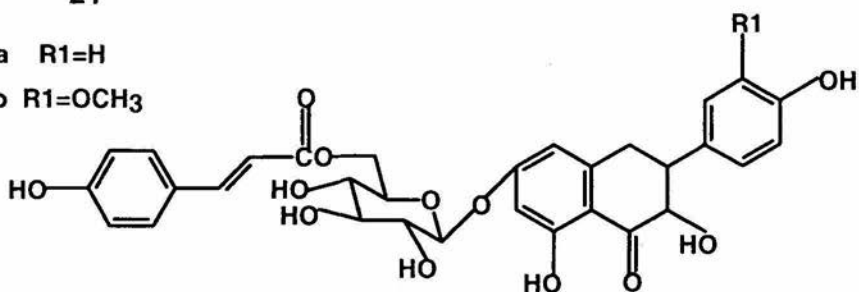
20

FENIL PROPANOIDES

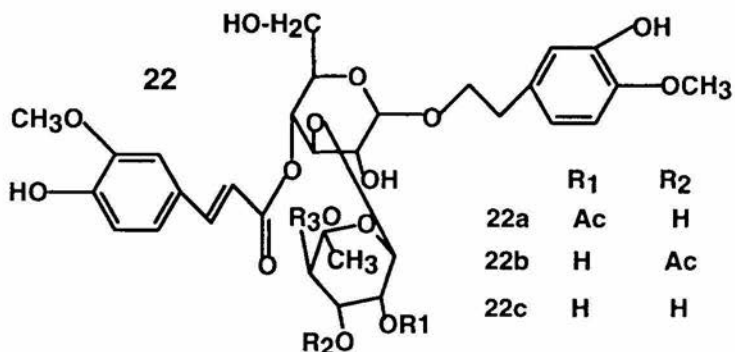
21

21a R1=H

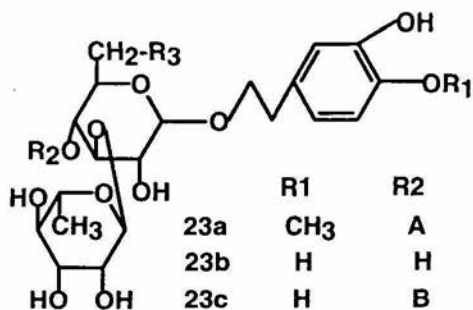
21b R1=OCH3



22

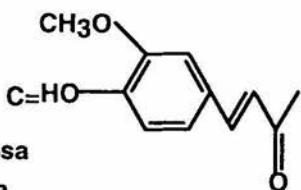
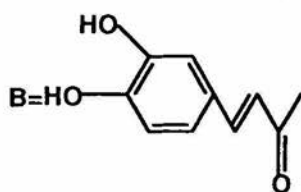
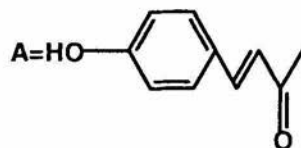


	R1	R2	R3
22a	Ac	H	H
22b	H	Ac	H
22c	H	H	Ac

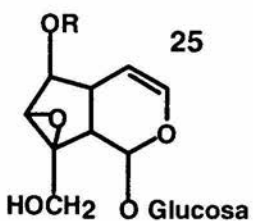
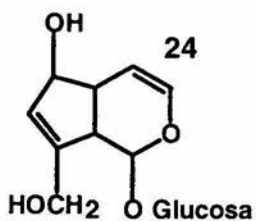


23

	R1	R2	R3
23a	CH3	A	H
23b	H	H	C
23c	H	B	H
23d	H	H	B
23e	H	C	H
23f	CH3	C	H
23g	CH3	H	C
23h	CH3	B	H
23i	CH3	C	arabinosa
23j	CH3	C	apiosa



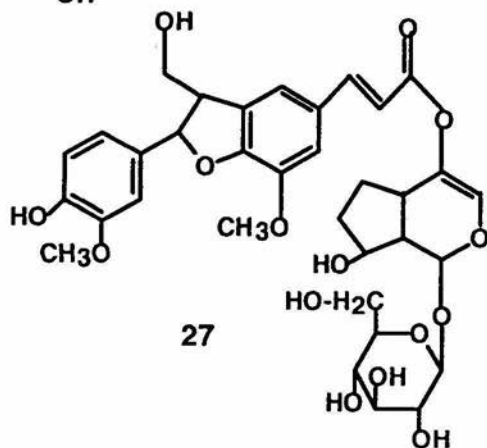
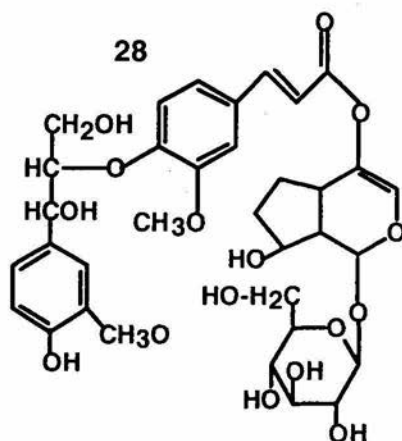
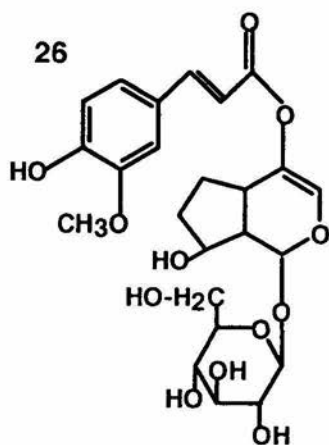
IRIDOIDES



25a R=OH

25b R=CH₃

IRIDOIDES UNIDOS A LIGNANOS



APÉNDICE 5

ESPECTROS

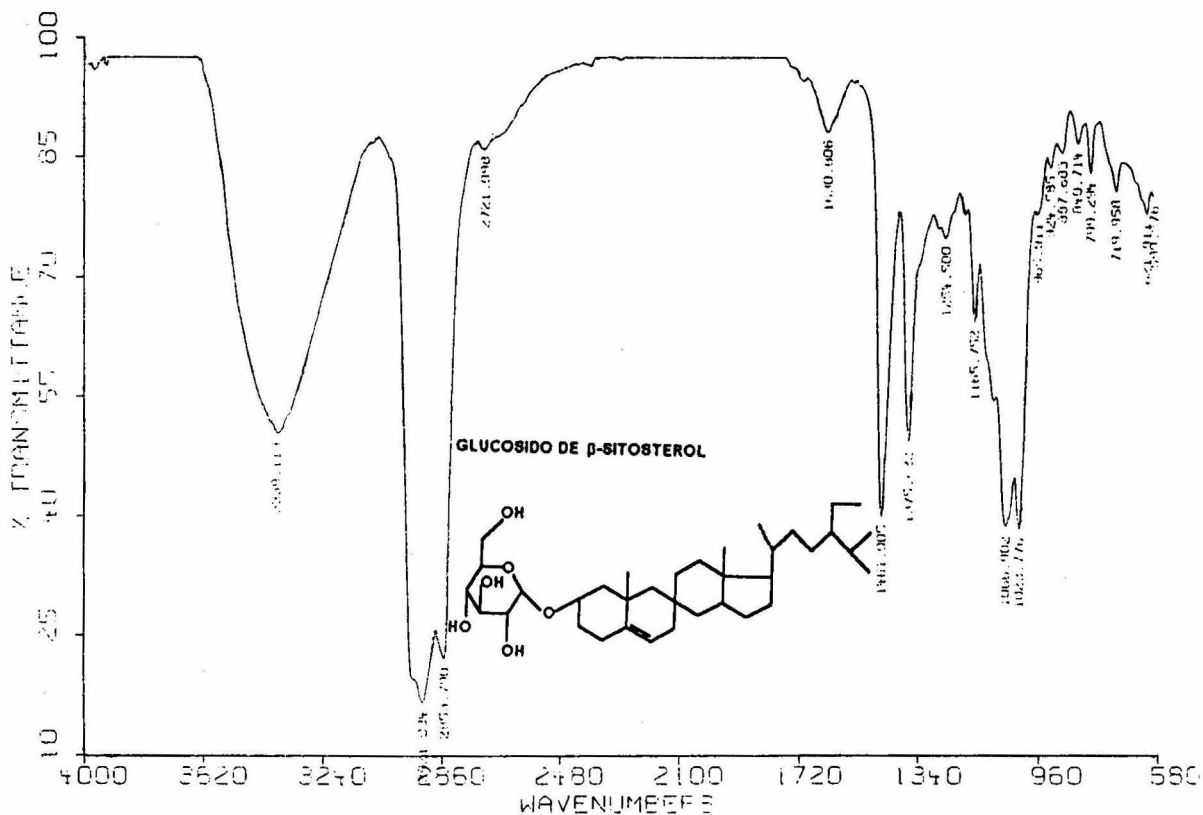
DR. A. ROMO

BCI

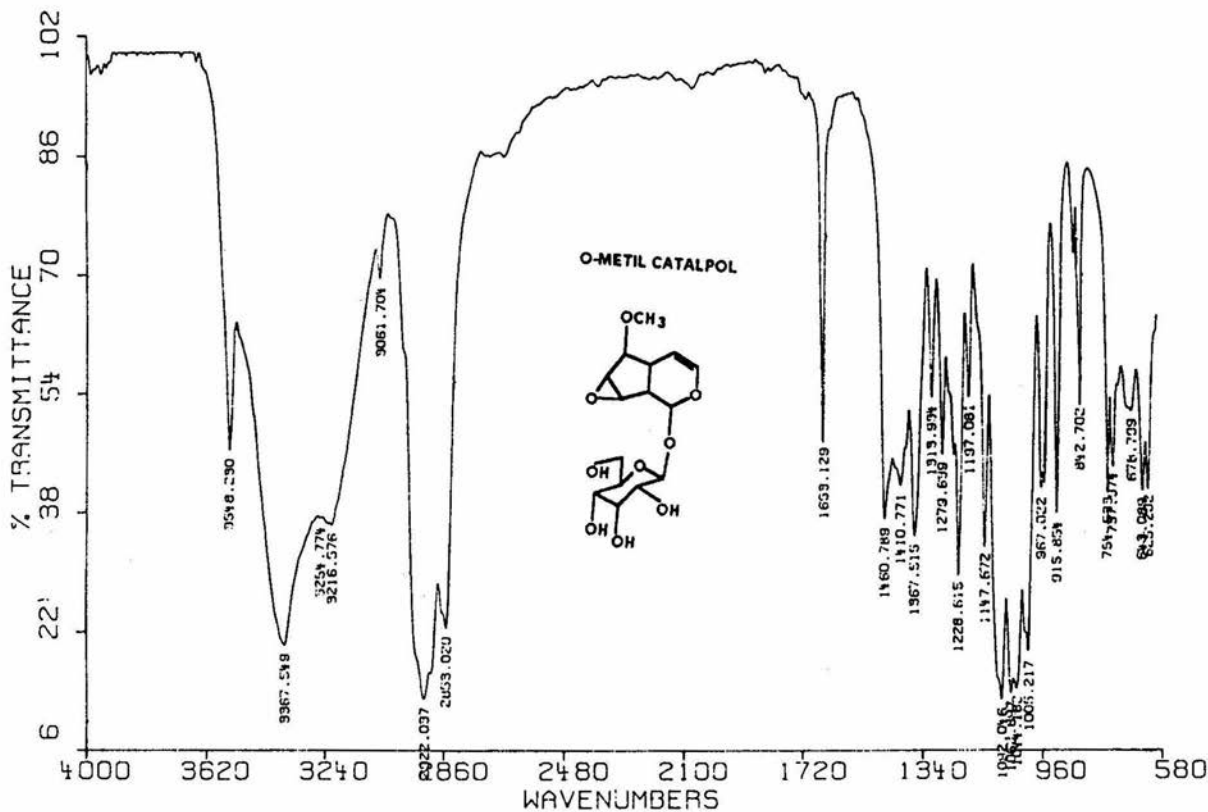
SUSP/NUJOL

12/04/94

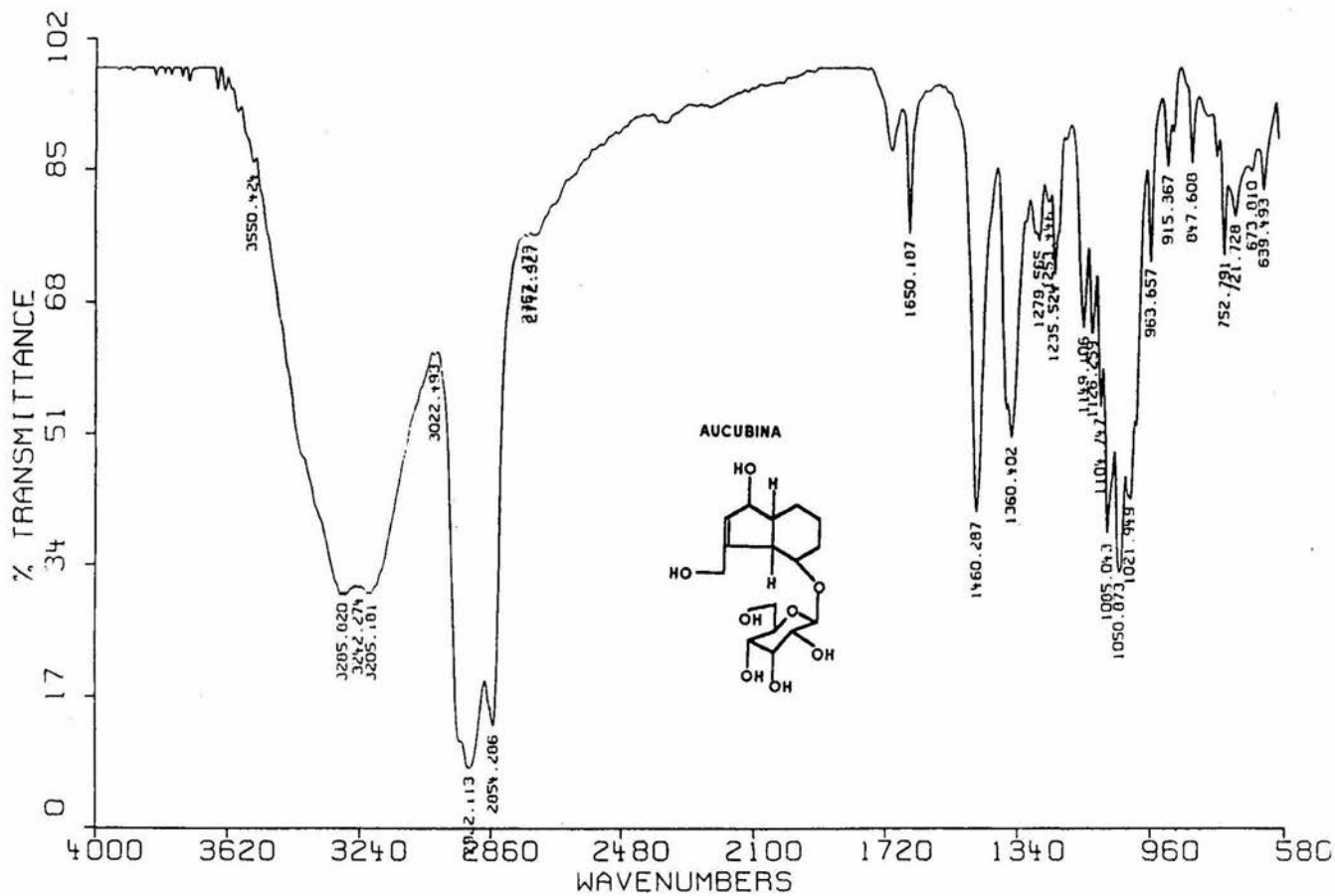
RPM



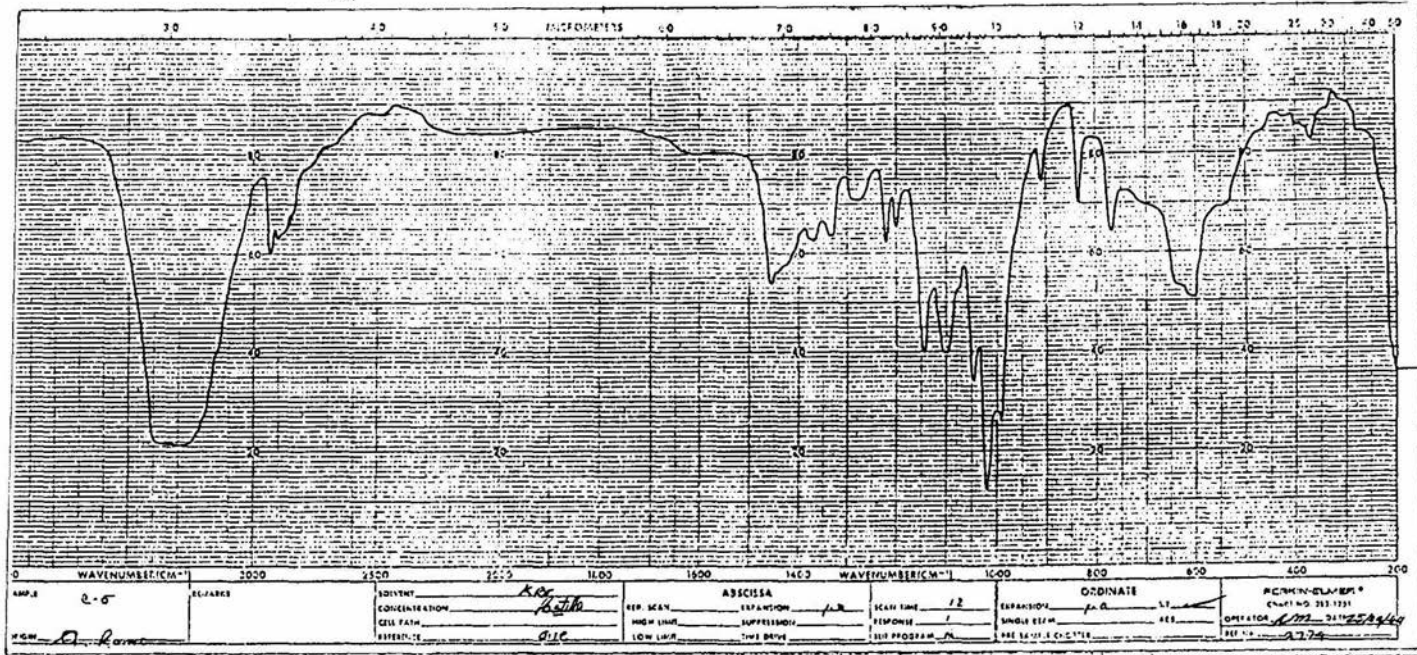
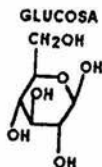
Espectro 1. Infrarrojo de glucósido de β -sitosterol.



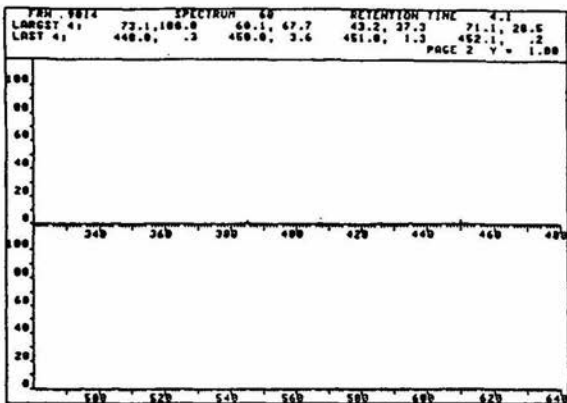
Espectro 2. Infrarrojo de O-metil catalpol.



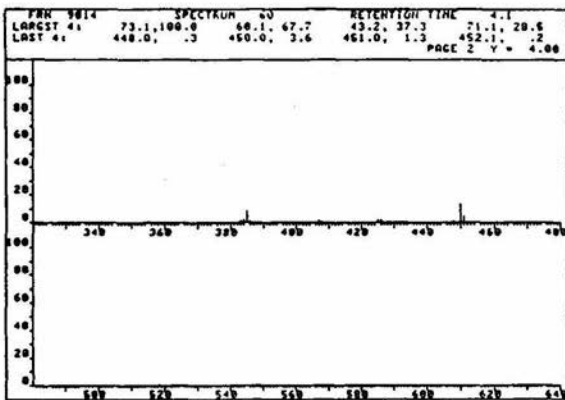
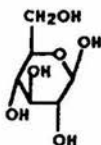
Espectro 3. Infrarrojo de aucubina.



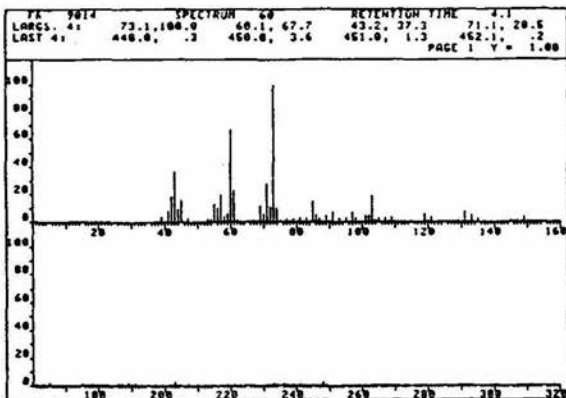
Espectro 4. Infrarrojo de glucosa.



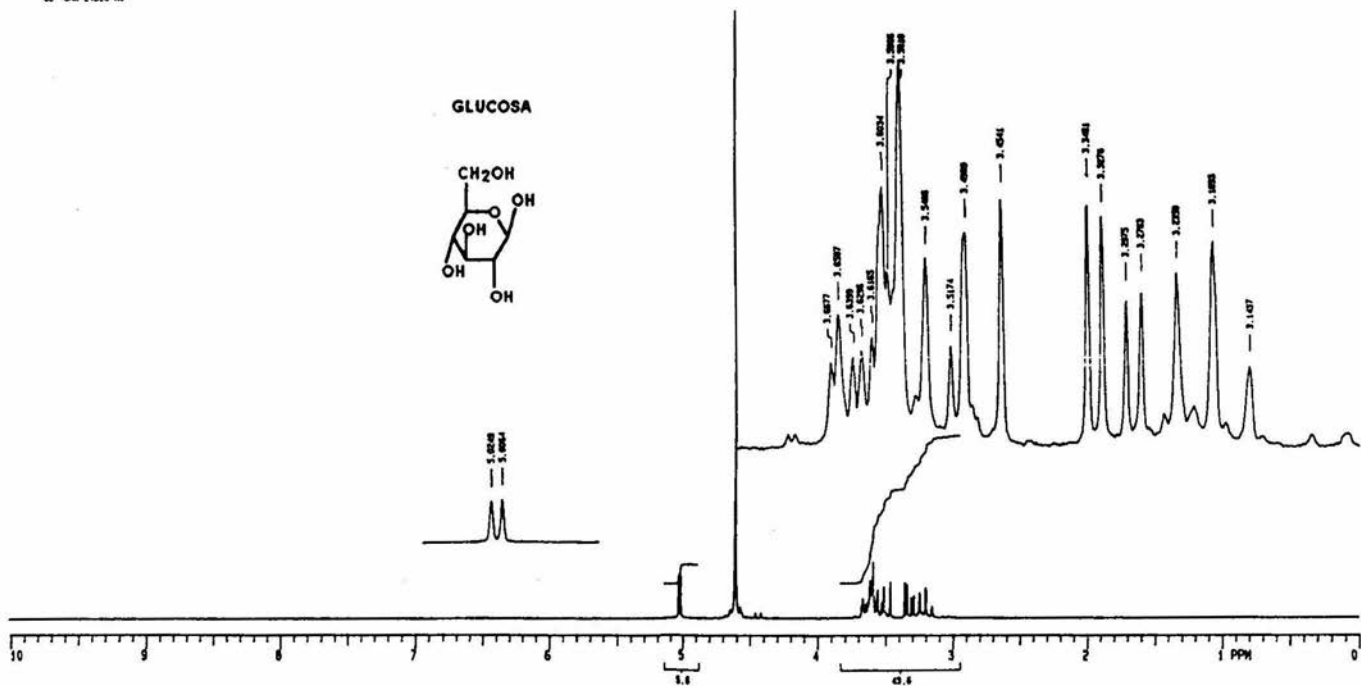
GLUCOSA



150

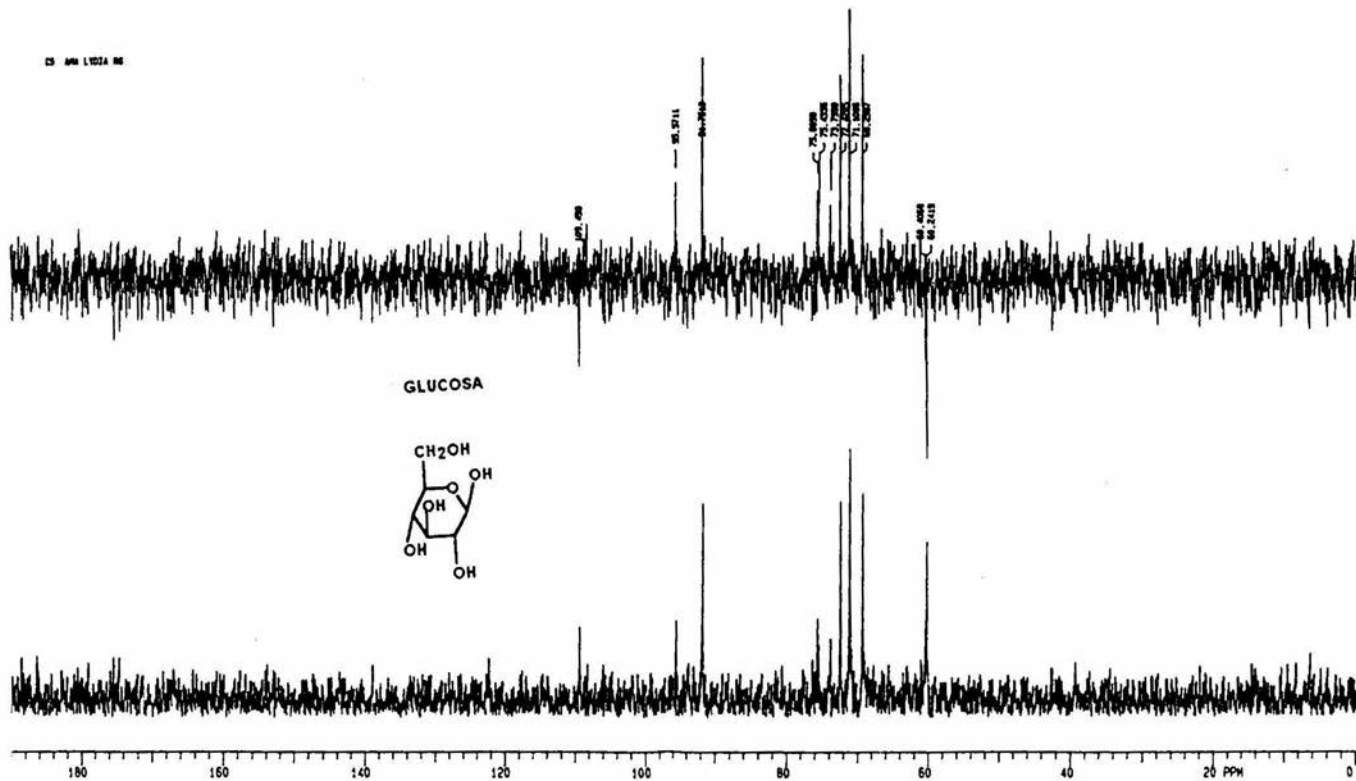


Espectro 5. Masas de la glucosa.



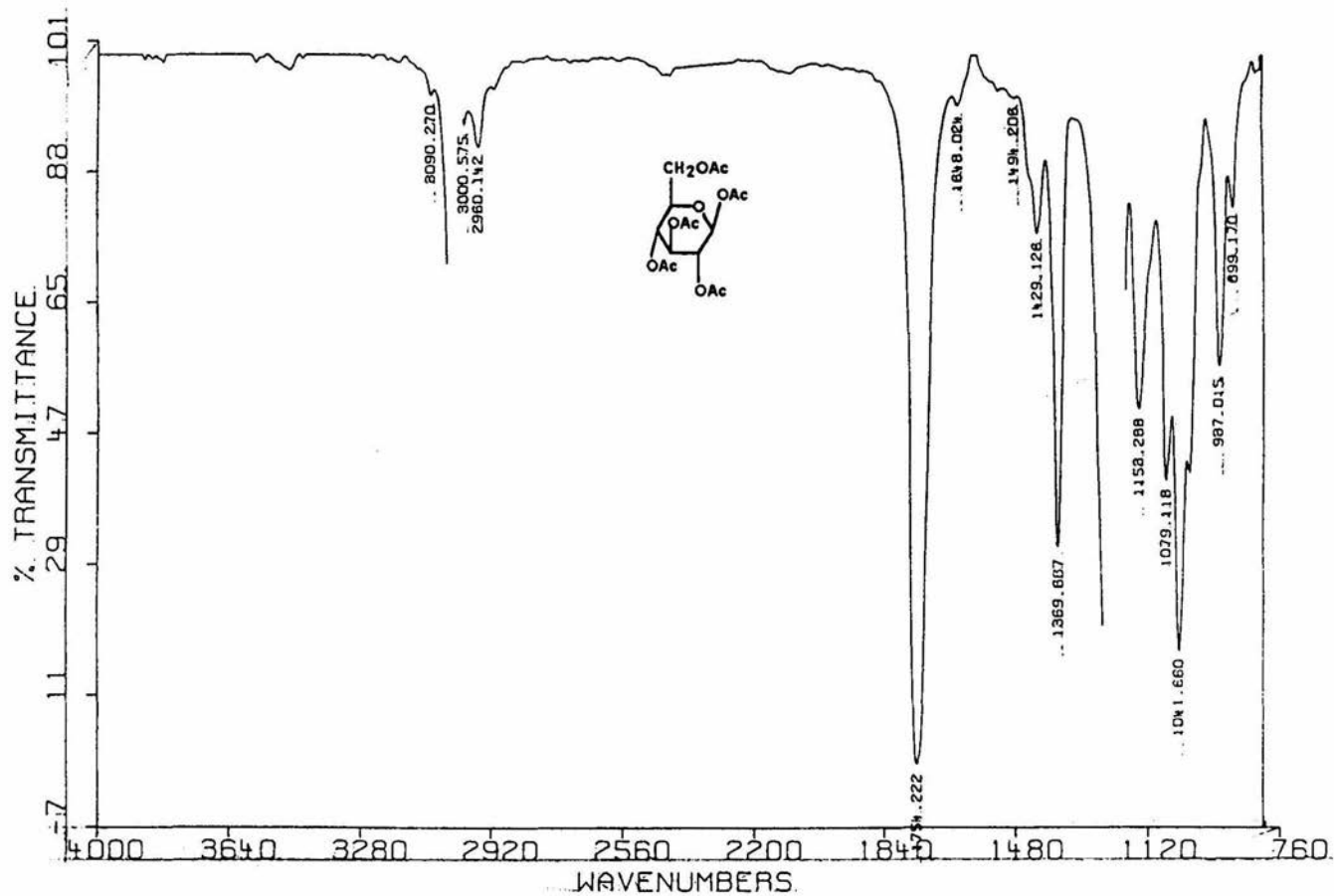
Espectro 6. RMN H⁺ de glucosa.

CS 100 1.0224 86



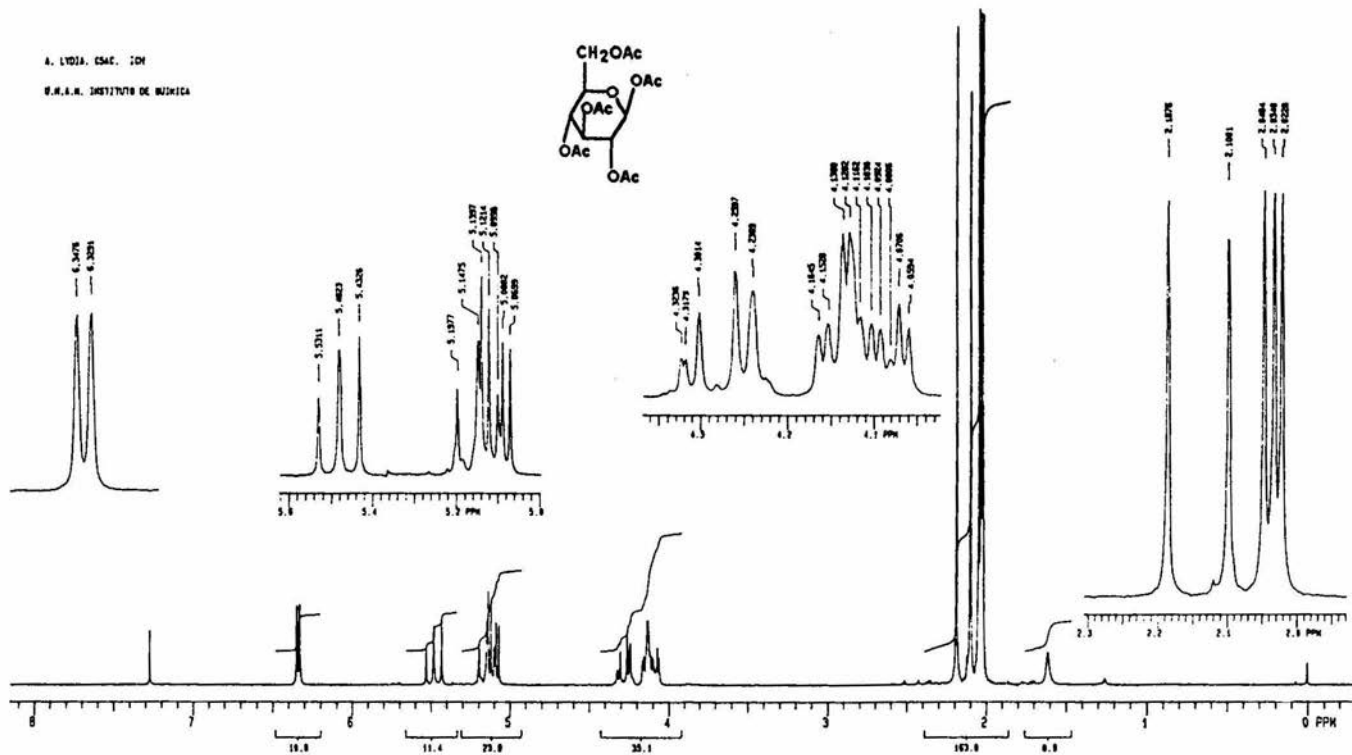
Espectro 7. RMN H^1 de glucosa.

DR. ANA LYDIA CSAC SOL/CHCL3 22/06/94 RPM



Espectro 8. Infrarrojo de glucosa acetilada.

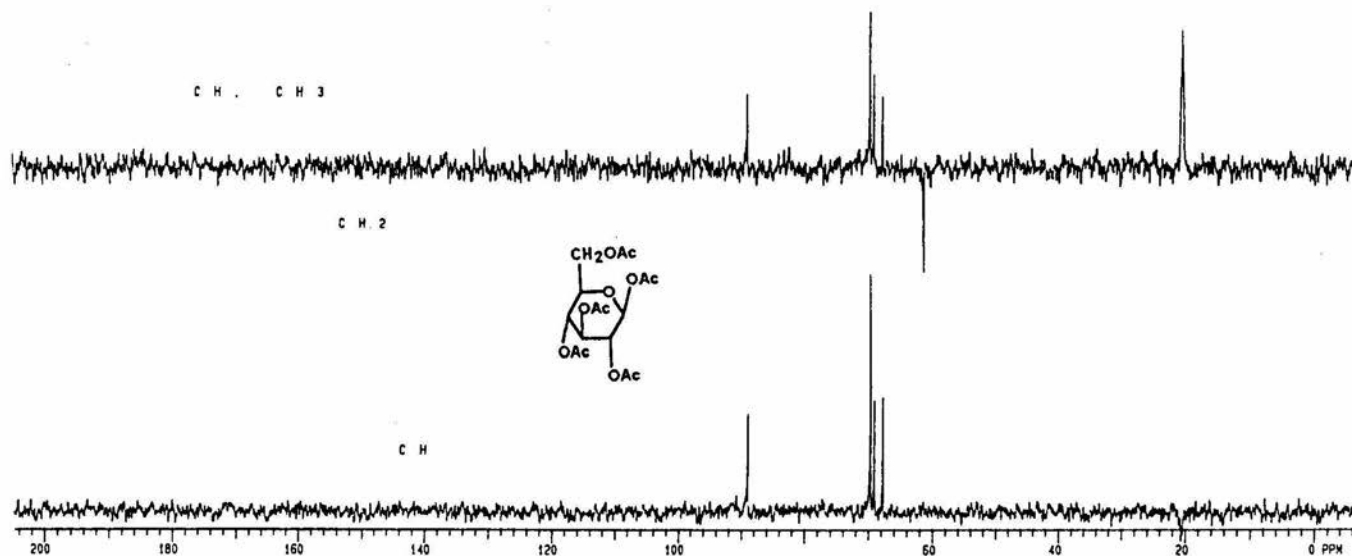
A. LYDIA, CSAC. IDH
 M.H.A.H. INSTITUTO DE QUÍMICA



Espectro 9. RMN H⁺ de glucosa acetilada.

A. L. W. J. A. CSAC. 10H

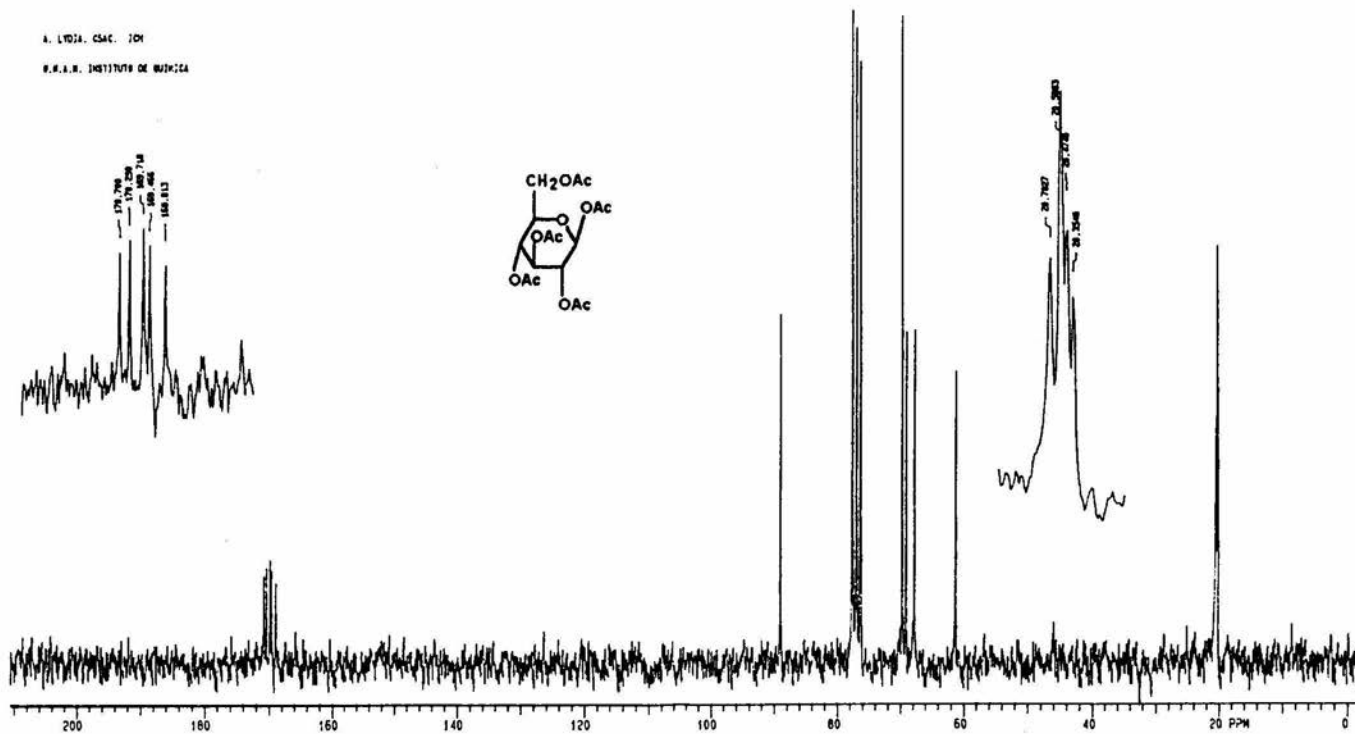
S. N. A. N. INSTITUTO DE QUÍMICA



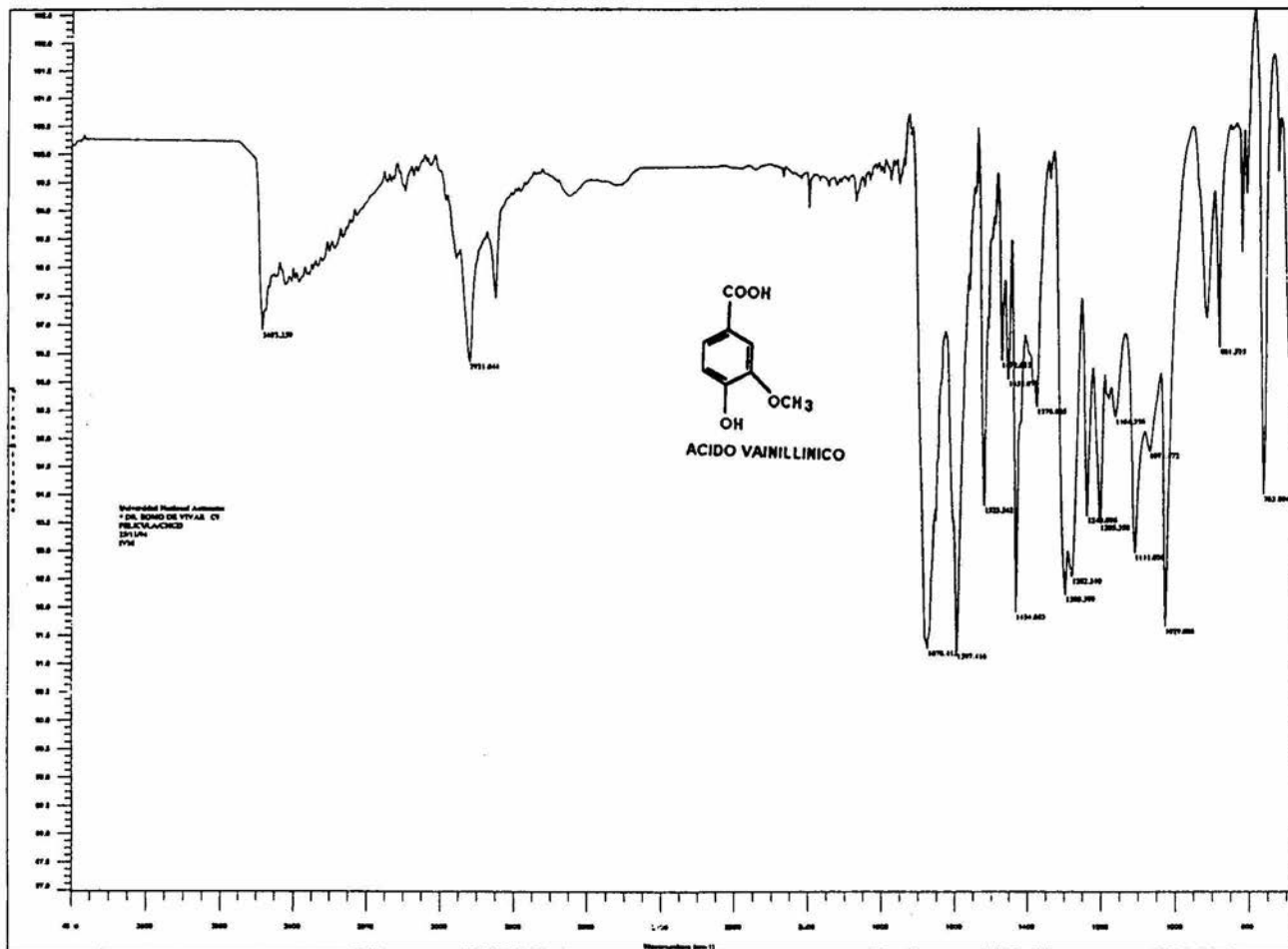
Espectro 10. RMN H^+ de glucosa acetilada.

A. LUDJA. CSAC. 19H

R.R.A.N. INSTITUTO DE QUÍMICA

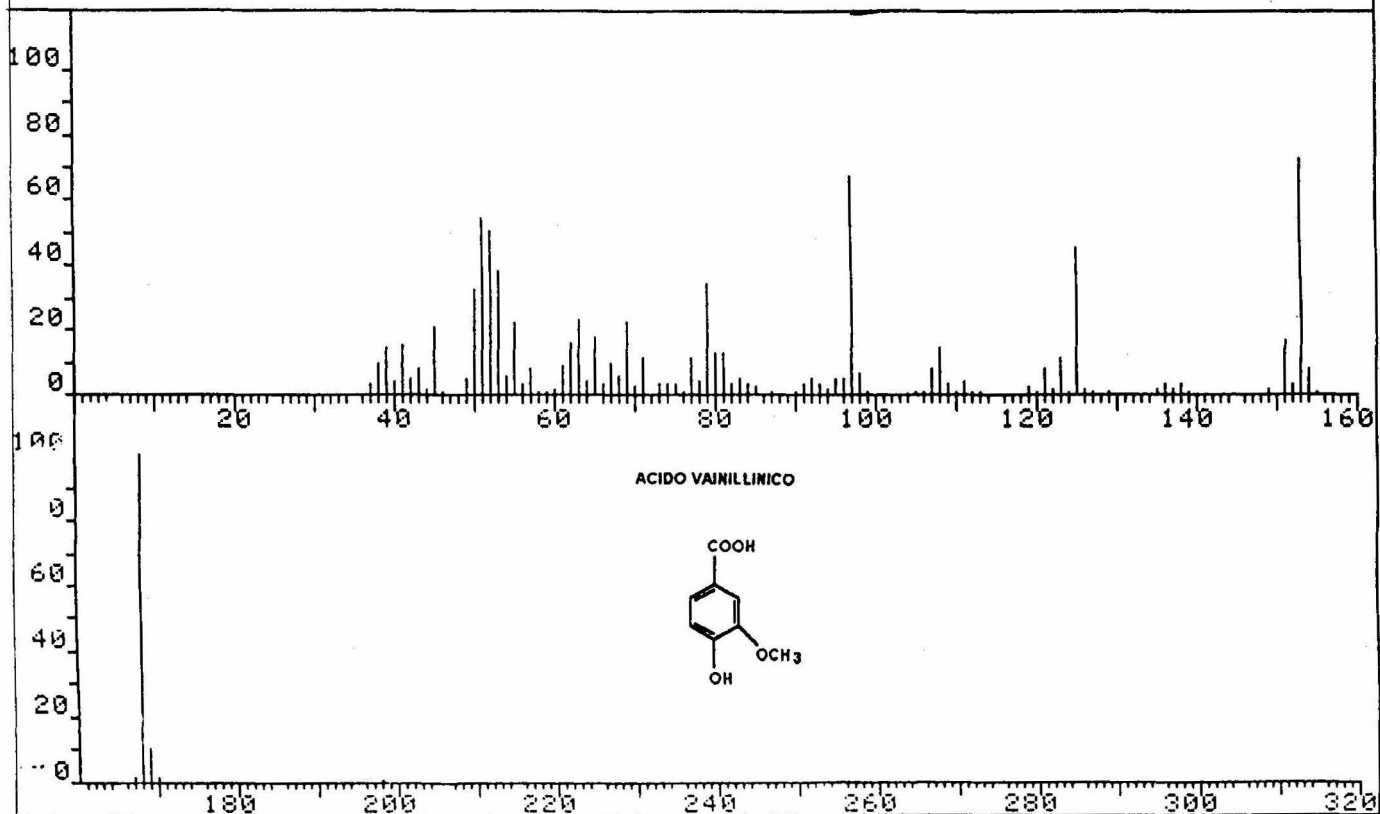


Espectro 11. RMN H^+ de glucosa acetilada.

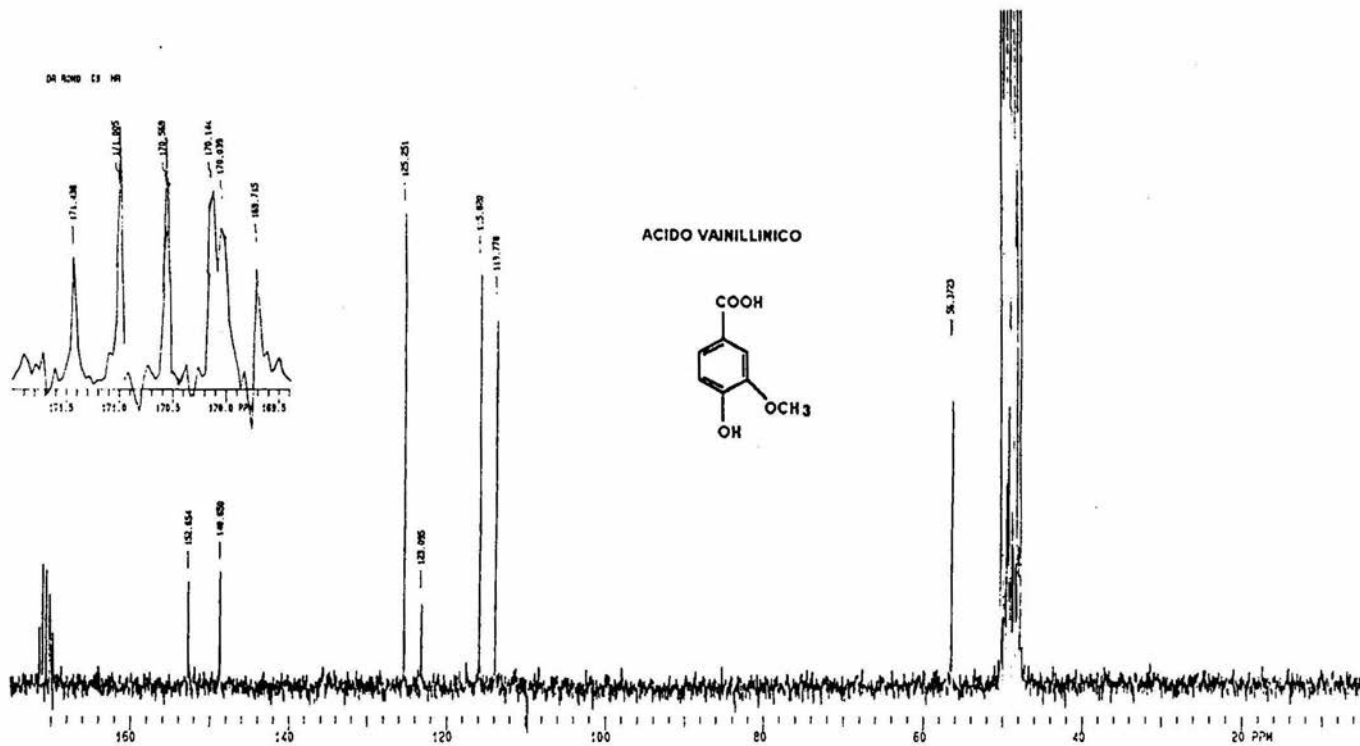


Espectro 12. Infrarrojo del ácido vainillínico.

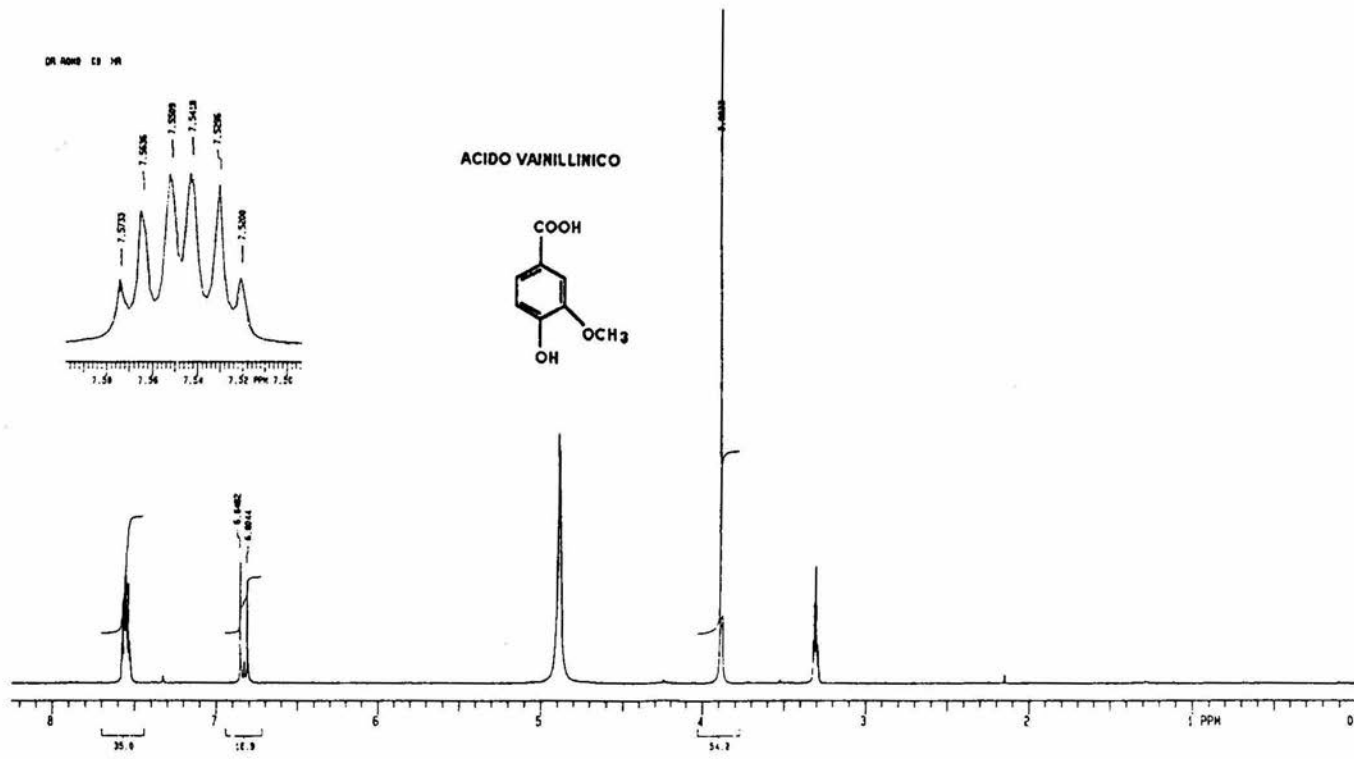
FRN 9996	SPECTRUM 34	RETENTION TIME 2.3
LARGST 4: 168.2, 100.0	153.1, 73.1	97.1, 67.7 51.1, 54.5
LAST 4: 168.2, 100.0	169.2, 10.5	170.2, 1.3 198.2, .8
		PAGE 1 Y = 1.00



Espectro 13. masas del ácido vainillínico.

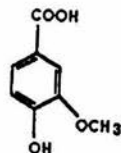


Espectro 14. RMN H⁺ del ácido vainillínico.



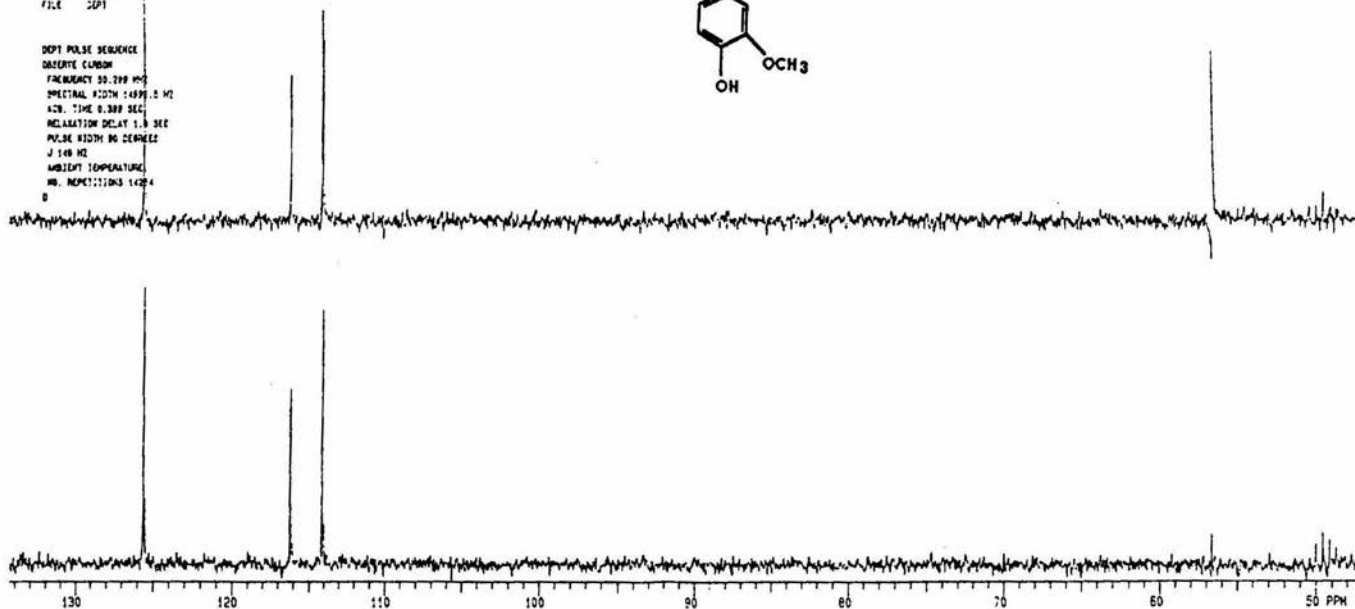
Espectro 15. RMN H⁺ del ácido vainillínico.

ACIDO VAINILLINICO



24 6300 00 40
 CPM: PULSE SEQUENCE: DEPT
 DATE: 01-03-83
 SOLVENT: CDCl3
 FILE: DEPT

DEPT PULSE SEQUENCE
 DIRECT CARBON
 FREQUENCY: 50.799 MHz
 INLET: 120.749 MHz
 ACQ. TIME: 0.380 SEC
 RELAXATION DELAY: 1.0 SEC
 PULSE WIDTH: 90 DEGREE
 J: 148 Hz
 AMBIENT TEMPERATURE:
 NO. REPEATS: 1424
 0



Espectro 16. RMN ¹³C del ácido vainillínico.