

60
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

CAMPUS IZTACALA

**"AISLAMIENTO Y DETERMINACION ESTRUCTURAL
DE NUEVOS COMPONENTES DE *Montanoa speciosa*"**

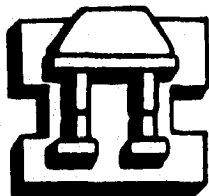
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MIRIAM PIÑA COBOS



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEXICO

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVO A CABO EN EL INSTITUTO DE QUIMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO Y EL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES CAMPUS IZTACALA (UNAM), BAJO LA DIRECCION DE LOS DOCTORES: LEOVIGILDO QUIJANO Y TIRSO RIOS CASTILLO Y LA ASESORIA DEL BIOLOGO: GUILLERMO AVILA ACEVEDO, CON UNA AYUDA ECONOMICA PROPORCIONADA POR EL SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES.

DEDICATORIA.

A MIS PADRES

HIPOLITO PIÑA JUAREZ y MARGARITA COBOS RAMOS.

Con gratitud y el respeto que se merecen, les dedico este trabajo conciente de que el esfuerzo ha sido compartido y de que he recibido mi herencia, solo que para mí tiene más valor, siendo una herencia invaluable e imperecedera.

A mi niña sonriente, por tu paciencia, ternura y cariño. Te amo
ALITZEL BERENICE.

A MIS HERMANOS: Ausencia, Marcial, César, Samuel, y en especial a mi querida hermana Oralia y su familia quienes me brindaron apoyo incondicional en los momentos difíciles.

A MIS SOBRINOS: con la idea de transmitir en ellos el valor de lograr todo lo que se propongan.

A BILLY: porque te has empeñado en animarme a no ceder ante las dificultades y tropiezos, por tu presencia excepcional en mi vida.

A ELSA, COCO Y GABY por todos los momentos compartidos.

¡Porque tú, oh Dios, eres mi esperanza, seguridad mía desde mi juventud, de ti será siempre mi alabanza!

AGRADECIMIENTOS.

DR. LEO:

Con profunda admiración y respeto, por ser mi director de tesis en toda la extensión de la palabra, por apoyarme para realizar una de mis metas más preciadas y sobretodo por su generosidad.

¡GRACIAS!

DR. RIOS.

Por su optimismo, estímulo constante a seguir adelante, y principalmente por brindarme su amistad.

A mis compañeros de laboratorio 2-6 y a todo el personal del Instituto de Química (UNAM).

A el Biólogo Guillermo Avila Acevedo y al Médico veterinario Zootecnista Andrés Martínez cortés por su valiosa ayuda en la realización de la parte microbiológica de esta tesis.

Al Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la UNAM a cargo del Maestro Javier Taboada y a la bióloga Carmen Gutiérrez por su ayuda en la prueba de toxicidad sobre *A. salina*.

A la Bióloga marina Laura E. Vazquez por su ayuda y comentarios en la realización del presente trabajo.

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron en mi formación personal y profesional.

INDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

INTRODUCCION

1

ANTECEDENTES

3

I. Familia Compositae (Asteraceae)

3

II. Género *Montanoa* Cervantes

4

III. Especie: *M. speciosa*.

7

IV. Terpenos

9

V. Antecedentes bacterianos

13

OBJETIVOS

18

MATERIAL Y METODOS

19

RESULTADOS Y DISCUSION

31

Aspecto químico

31

Aspecto biológico

38

CONCLUSIONES

45

REFERENCIAS

46

GLOSARIO

51

APENDICE: ESPECTROS

52

ABREVIATURAS

RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
EM	Espectrometría de masas
IR	Infrarrojo
pf	Punto de fusión
DMSO	Dimetil sulfóxido
pH	Potencial de Hidrógeno.
UFC	Unidades formadoras de colonias
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MBC	Concentración bactericida media
DE ₅₀	Dosis efectiva media 50
PS	Células de Leucemia linfocítica
KB	Células de carcinoma nasofaríngeo
WI	Carcinosarcoma Walker 256
H.EP.2	Carcinoma epidermoide de Laringe humano.
WI8Va2	Virus Simian 40-células transformadas de origen humano.

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó el estudio fitoquímico de *Montanoa speciosa*, aislándose compuestos previamente reportados en dicha planta y otros ampliamente distribuidos en la naturaleza.

Además se aislaron cuatro nuevos componentes, los cuales no habían sido reportados anteriormente en *Montanoa speciosa*, estos son: 3-epi-isotelekina, 11,13-dihidro-3-epi-isotelekina, virginina y galactiaincanina "A".

Como parte complementaria del trabajo se evaluó la actividad antibacteriana de cinco de los compuestos aislados y un extracto diclorometánico de hojas de la planta, los cuales se probaron sobre bacterias Gram positivas: *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* y Gram negativas: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella boydii*, y *Vibrio cholerae*, obteniendo resultados positivos únicamente para encelina, la cual mostró actividad antibacteriana contra *Staphylococcus epidermidis* y *Vibrio cholerae*, presentando una MIC de 200 µg/ml y 32 µg/ml, respectivamente. Este mismo compuesto al ser utilizado en una prueba de toxicidad sobre *Artemia salina*, presentó una DL₅₀ de 50 ppm, siendo considerado un compuesto citotóxico.

El aislamiento de los componentes ya conocidos, así como de los no reportados anteriormente, y los resultados sobre actividad antibacteriana obtenidos en este estudio, son importantes como un aporte al conocimiento del género *Montanoa*.

INTRODUCCION.

Los procesos metabólicos de los diferentes organismos son variados y complejos; sin embargo, hay muchos productos finales o intermediarios del metabolismo que son compuestos orgánicos relativamente fáciles de aislar. Todos estos compuestos se agrupan bajo el encabezado de productos naturales.

Existen muchas clases diferentes de productos de origen natural, varios de ellos, tales como las grasas, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos, junto con una cantidad relativamente pequeña de sustancias relacionadas, están presentes en casi todos los organismos y se denominan metabolitos primarios.

Existe una segunda clase de productos naturales conocidos como metabolitos secundarios; no se trata de que sean de importancia secundaria en el organismo, sino que su distribución dentro de la naturaleza tiende a ser más específica, razón por la cual se han usado exitosamente en algunos casos como marcadores en estudios quimiotaxonómicos (Streitwieser y Heathcock, 1979).

La flora mexicana siempre se ha caracterizado por ser una de las más abundantes y diversas, lo cual aunado a la riqueza de los conocimientos empíricos de la gente ha motivado que investigadores en México y en otros países se interesen en estudiar la gran variedad de especies vegetales que presentan propiedades medicinales, con el fin de aislar y determinar la estructura molecular de los principios activos y lograr la optimización en el uso terapéutico de estos productos naturales.

En este aspecto, la investigación química ha sentado las bases para el aislamiento e identificación de los compuestos químicos (principalmente metabolitos secundarios), provenientes de extractos vegetales (diclorometánico, metanólico, de acetato de etilo, etc.) en los cuales se busca un mejor aprovechamiento, ya que se ha encontrado una amplia variedad de actividades biológicas de utilidad en el campo de la medicina, agricultura, así como otros usos a nivel industrial.

Cada día se incrementa el número de nuevos productos naturales aislados de vegetales; sin embargo en muchos casos, la única información que se posee de estos metabolitos secundarios es su estructura química, de ahí el interés de realizar estudios sobre actividad biológica a partir de pruebas sencillas, económicas y rápidas, obteniendo resultados que proporcionen información preliminar, la cual sirva de base para dirigir trabajos posteriores más detallados dentro de las distintas áreas de investigación involucradas, logrando de este modo un adecuado aprovechamiento tanto del recurso mismo, como de los recursos materiales y/o económicos (Romo de Vivar, 1985).

ANTECEDENTES

I. FAMILIA COMPOSITAE (ASTERACEAE).

La familia de las compuestas es muy numerosa dentro de las angiospermas, se encuentra más diversificada y mejor representada en el Norte y Centro de la República Mexicana. Esto se debe principalmente a factores ecológicos, pues el clima húmedo y caliente es el menos favorable para este grupo de plantas que alcanzan su máxima representación en sitios secos y lugares frescos de las regiones montañosas.

Es una familia formada por 14 tribus en donde cada una de estas presenta diferentes subtribus, y de las cuales algunas no presentan grupos sino que se deriva inmediatamente el género.

TABLA No. I: TRIBUS DE LA FAMILIA DE LAS COMPUESTAS.

VERNONIEAE	SENECIOEAE
EUPATORIEAE	CALENDULEAE
ASTEREAE	ARCTOTIDEAE
INULEAE	MUTISIEAE
HELIANTHEAE	CYNAREAE
HELENIEAE	CHICHORIEAE
ANTHEMIDEAE	TAGETEAE

En México Heliantheae forma la tribu dominante de la familia, prevaleciendo en zonas de clima templado y cálido.

La familia de las compuestas está constituida por hierbas, arbustos y árboles, con hojas alternas y opuestas, simples o divididas en forma diversa, sin estípulas, las flores son hermafroditas unisexuales o estériles, actinomorfas, con cáliz ausente o sustituido por el papus o vilano que sirve para la diseminación de los frutos. El fruto es de una semilla, indehiscente, casi siempre seco, llamado cápsula.

Las flores se encuentran en cabezuelas compactas o capítulos en forma racemosa indeterminada y las más externas maduran primero. Estas poseen un involucre formado por brácteas, en receptáculo plano convexo o globoso sobre el que se encuentran implantadas las flores, protegidas por brácteas llamadas páleas. Las cabezuelas pueden ser homógamas o heterógamas (Rzedowski, 1985).

En relación con el número de componentes que tienen, las compuestas son fuente de relativamente pocos productos de importancia económica y médica. Sin embargo, como resultado de una investigación sistemática, quimiotaxonomía y farmacéutica se ha renovado la importancia de esta familia en las aplicaciones biológicas y terapéuticas (Romo de Vivar, 1985).

II. GENERO *Montanoa* Cervantes.

Todos los miembros pertenecientes a este género son leñosos, la mayoría son arbustos; sin embargo la variación del tamaño dentro del género va desde enredaderas (4 especies) a árboles de 20 metros de altura (5 especies).

El género esta constituido por 25 especies, en su gran mayoría mexicanas, se extiende a través de América Latina y varias especies son cultivadas en partes cálidas del mundo.

Algunas especies son objeto de cultivo como ornamentales; en el Valle de México se ven en esta calidad con cierta frecuencia *M. grandiflora* Alamán y *M. speciosa* A.P. de Candolle (Funk, 1982).

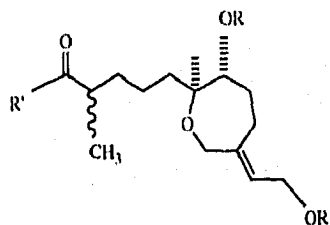
Algunas otras especies se usan como plantas medicinales, por ejemplo, *Montanoa tomentosa* (Domínguez, 1973).

ANTECEDENTES ETNOBOTANICOS DEL GENERO *MONTANOA*.

El uso del "zoapatle" en tiempos prehispánicos, se encuentra descrito en varias obras clásicas sobre medicina indígena del México colonial, entre ellas la obra del médico indígena Martín de la Cruz, escrita en náhuatl y traducida al latín por Juan Badiano en 1552 como "Libellus de Medicinalibus Indorum Hervis" mejor conocido como el código de la Cruz-Badiano en el cual mencionan a la planta del género *Montanoa* conocida como "zoapatle, hierba de la mujer o cihuapatli" confiriéndole propiedades abortivas, inductora de contracciones uterinas durante el parto, para el tratamiento de algunos desórdenes del sistema reproductivo de la mujer o con fines estomáticos, diuréticos y pectorales (Lozoya, 1982).

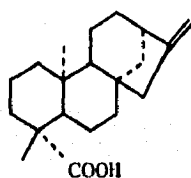
Posteriormente fueron numerosos los trabajos tendientes a esclarecer el mecanismo de acción y propiedades de la infusión (Té) preparada a partir de las hojas de dicha planta.

Al iniciar la década de 1970, la investigación química retoma interés en los metabolitos secundarios del género *Montanoa*, aislándose una amplia diversidad de componentes entre los que se encuentran: compuestos aromáticos de tipo de los flavonoides y coumarinas, triterpenos, esteroides, compuestos alifáticos, diterpenos derivados del oxepano como montanol (1), zoapatanol (2) etc. así como derivados del kaurano por ejemplo ácido kaurenico (3), sesquiterpenos entre los que se encuentran varias lactonas entre ellas la tomentosina (4), primera lactona sesquiterpénica aislada del género *Montanoa*, encontrada en las flores y hojas de *Montanoa tomentosa* (Lozoya, 1982).

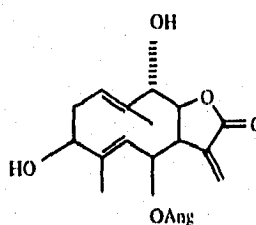


(1) R= H, R' = (CH₃)₂C=CHCH₂

(2) R= H, R' = (CH₃)₂CHC(CH₃)=CH



(3)



(4)

Actualmente, de las 25 especies que constituyen el género *Montanoa* (Compositae: Heliantheae), 16 de ellas han sido objeto de estudios fitoquímicos, 20 crecen en México y sólo 7 se han sometido a pruebas de actividad biológica (Rzedowski, 1985).

Los estudios sobre actividad biológica que se han llevado a cabo han sido principalmente en relación con efectos uteroconstrictores; se reportan 6 especies de *Montanoa* capaces de inducir estos efectos si se administran en forma de extractos acuosos de sus hojas, estas especies son: *M. frutescens*, *M. tomentosa ssp tomentosa*, *M. leucantha ssp arborescens*, *M. leucantha ssp leucantha*, *M. grandiflora* y *M. mollissima*, sin embargo, la intensidad de los efectos depende del grado de crecimiento vegetal, del suelo donde crece y de la época en que se cosecha (Estrada, 1983).

III. ESPECIE *Montanoa speciosa*

M. speciosa es un atractivo arbusto, comúnmente cultivado en México, de 1-4 metros de altura, hojas relativamente consistentes de bordes pentagonales, margen completamente aserrado, superficie adaxial densa a moderadamente pubescente, tricomas menores a 1.0 mm de largo, blancos, dando una coloración verde brillante a la superficie, cabezuelas de 2 cm de diámetro en floración y de 3 a 4 cm en fructificación, pocos o varios frutos en inflorescencias, en ramas opuestas o alternas componiendo corimbus. Superficie adaxial densamente glandular y pubescente (Funk, 1982).

DISTRIBUCION.

En forma silvestre esta distribuido en la Sierra Madre del Sur, en los Estados de Michoacán, México, Morelos, Oaxaca, Puebla y Guerrero; en bosques tropicales, laderas áridas, y bordes herbáceos de algunas carreteras, a altitudes de 140-1400 metros, encontrándose a menores elevaciones en Guerrero y Oaxaca. Su período de floración comprende de octubre a noviembre y cuando es tardío de noviembre a enero (Funk, 1982).

TABLA No. 2: CLASIFICACION BOTANICA.

REINO	VEGETAL
DIVISION	ESPERMATHOPYTA
SUBDIVISION	ANGIOSPERMA
CLASE	DICOTILEDONEAE
ORDEN	ASTERALES
FAMILIA	ASTERACEAE (COMPOSITAE)
TRIBU	HELIANTHEAE
SUBTRIBU	MONTANONINAE
GENERO	MONTANOA
ESPECIE	<i>M. speciosa</i>

ANTECEDENTES QUIMICOS Y BIOLOGICOS
DE *Montanoa speciosa*.

En 1985, Seaman y Bencsath, publicaron la obtención de los dos principales constituyentes de dicha especie que fueron identificados como ácido ent-kaurenoico (3) y un nuevo ácido del tipo del eudesmano, 1,2-dehidro-3-oxo-cóstico (8).

Para 1991, aparece otro trabajo (Quijano *et al*), que menciona las conocidas eudesmanólidas: encelina (12), 1,2-dehidro-3-epi-isotelekina (10) y su correspondiente acetato (15), así como el derivado del eudesmano, el ácido 1,2-dehidro-3-oxo-cóstico (8) aislado anteriormente y un nuevo eudesmanólido dimérico denominado: hidrox-bis-dihidro-encelina (16).

Finalmente en 1995, Sabanero *et al.*, reportan un ensayo realizado con la lactona sesquiterpénica encelina (12), aislada de *M. speciosa*, examinando su acción sobre el desarrollo de células en *Mucor rouxii*, los resultados mostraron una acción determinante en el crecimiento y los procesos morfogénicos de estas células fúngicas.

En la actualidad, como ya se mencionó anteriormente, el género *Montanoa* es motivo de amplios estudios químicos en México como en otros países debido a la actividad biológica demostrada por algunas de estas plantas y a la gran variedad de metabolitos secundarios aislados de ellas.

Dentro de los metabolitos secundarios aislados del género, en general se encuentran: flavonoides, alcaloides, esteroides, coumarinas y terpenos.

IV. TERPENOS.

Los terpenos se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno o átomos de carbono que contiene la molécula.

TABLA No. 3. CLASIFICACION DE TERPENOS.

GRUPO	N.A.C	N.U.I	N.U.T
HEMITERPENOS	5	1	1/2
MONOTERPENOS	10	2	1
SESQUITERPENOS	15	3	1 1/2
DITERPENOS	20	4	2
SESTERTERPENOS	25	5	2 1/2
TRITERPENOS	30	6	3
TETRATERPENOS	40	8	4
POLITERPENOS	(5) _n	n>8	n

N.A.C = Número de átomos de carbono
N.U.I = Número de unidades isoprenicas
N.U.T = Número de unidades terpenicas

De acuerdo con la llamada "regla del isopreno", todos los terpenos parecen haber sido constituidos teóricamente por unidades de 5 átomos de carbono, de 2-metil-1,3-butadieno conocido como isopreno, generalmente mediante uniones "cabeza-cola" denominadas uniones regulares que se presentan comúnmente en monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos.

Actualmente se sabe que los terpenos no se originan de la polimerización del isopreno como tal, sino que el primer paso en la biosíntesis de los terpenos es la condensación de 3 unidades de acetil coenzima A, para dar lugar al ácido meválonico y éste por una posterior descarboxilación y deshidratación a un par de alcoholes isoprenílicos: el alcohol isopentenílico y el alcohol dimetilalílico (Fessenden, 1986). Esta "regla isoprénica" es por tanto teórica; sin embargo tiene la ventaja de mostrar perfectamente la unidad biosintética de la mayoría de los integrantes de este grupo.

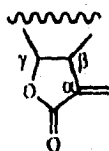
Los sesquiterpenos forman la clase más extensa de terpenos. Son compuestos generalmente insaturados que presentan en su estructura grupos funcionales como alcoholes, epóxidos, ésteres, lactonas, aldehídos, cetonas, etc. (Kupchan, 1971).

Los sesquiterpenos son de los metabolitos secundarios más útiles en la quimiotaxonomía de la familia de las compuestas, y dentro de ellos destacan las lactonas sesquiterpénicas, ya que algunas son características de tribus, géneros y en ocasiones típicas de especies (Romo de Vivar, 1985).

LACTONAS SESQUITERPÉNICAS

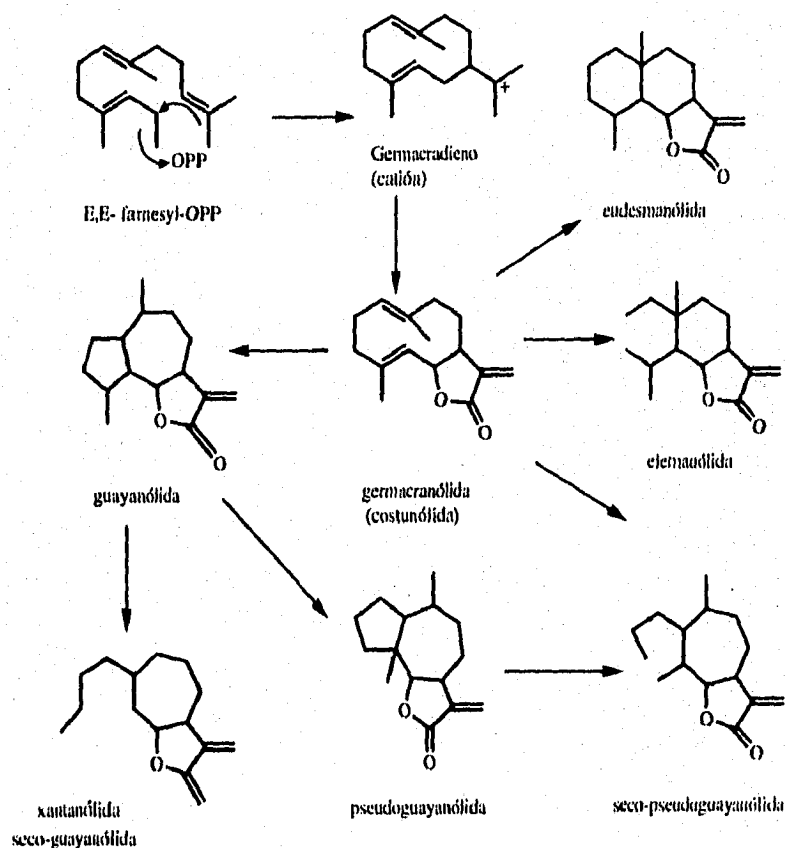
Se puede considerar que las lactonas sesquiterpénicas se forman por la condensación de 3 unidades isoprénicas para dar el pirofosfato de farnesilo (considerado el precursor biogenético de los sesquiterpenos) y subsecuentes ciclizaciones y transformaciones oxidativas, para dar el anillo γ -lactónico que puede ser unido en forma *cis* o *trans*.

α -metileno γ -lactona



La clasificación de los diferentes tipos de lactonas sesquiterpénicas está basado en el esqueleto carbocíclico en el cual el sufijo "olida" indica la presencia de la función lactónica (Fischer, 1991).

FIGURA 1. La transformación biosintética del pirofosfato de trans-trans-farnesilo conduce a la formación del germacradieno que por procesos de biooxidación y posterior lactonización da origen a las germacránolídas más simples, las cuales pueden ser consideradas precursoras de los otros tipos de esqueletos carbocíclicos de las lactonas sesquiterpénicas. La lactonización puede ser hacia las posiciones C-6 o bien C-8.



ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LACTONAS SESQUITERPÉNICAS

La actividad biológica de las lactonas sesquiterpénicas se ha relacionado estructuralmente con la presencia de la doble ligadura exocíclica conjugada con el carbonilo de la γ -lactona, la cual se ha determinado que es necesaria ya que puede formar uniones estables con los grupos sulfhidrilo (-SH) de las proteínas como se ha demostrado con la cisteína (Rodríguez *et al.*, 1976).

Algunas lactonas contienen grupos carbonilos α,β -insaturados y epóxidos, y los estudios realizados sobre estructura-actividad demuestran, que estos grupos funcionales representan receptores reactivos para nucleófilos biológicos, en particular tioles y grupos amino (-SH y -NH₂). Por lo tanto, las lactonas sesquiterpénicas pueden causar alquilaciones irreversibles de tioles esenciales y funciones amino de ciertas enzimas (Rodríguez *et al.*, 1976; Picman, 1986).

De este modo, las enzimas que contienen tioles tales como la fosfofructokinasa, la glicógeno sintetasa, DNA polimerasa y timidil sintetasa son inhibidas por lactonas. Además, ciertas lactonas suprimen la actividad de enzimas que contienen tioles en rutas biosintéticas como la glucólisis y la síntesis de proteínas (Picman, 1986).

Entre las actividades biológicas reportadas en lactonas sesquiterpénicas encontramos:

Actividad inhibidora del crecimiento microbiano (Lee *et al.*, 1977), actividad antimicótica, actividad antitumoral y citotóxica (Nezhum, 1992; Hartwell, 1969), dermatitis alérgica por contacto en humanos (Picman, 1986), envenenamiento en vertebrados (Rodríguez *et al.*, 1976), propiedades antialimentarias en insectos (Romo de Vivar, 1985; Srivastava *et al.*, 1990), propiedades alelopáticas (Duke, 1985), reguladores del crecimiento de las plantas (Fischer, 1990; Baruah, 1994) y actividad antiparasitaria.

Además se han revisado actividades farmacológicas como estimulantes de secreción intestinal, sedantes, propiedades analgésicas, anti-inflamatorias (Hall, 1980), así como estimulantes del sistema nervioso central. Muchas lactonas sesquiterpénicas también presentan efectos tóxicos en una amplia variedad de organismos, lo que sugiere que éstas lactonas juegan un papel ecológico importante debido a su interacción con otros organismos, incluyendo mamíferos, insectos, y otras plantas (Fischer, 1991).

La información resumida en líneas anteriores nos muestra la amplia variedad de actividades biológicas que presentan las lactonas sesquiterpénicas y los resultados sobre éstas actividades ha motivado a que muchos investigadores en diversas partes del mundo se interesen en su estudio.

V. ANTECEDENTES BACTERIANOS.

La descripción de las siguientes cepas bacterianas se debe a que fueron sensibles a la encelina aislada de la planta en estudio.

STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS

HISTORIA

Roberto Koch (1878) fue el primero en descubrir el estafilococo en un pus humano. Dos años después Pasteur cultivaba este germen en medio líquido, y al año siguiente Ogston mostró que era patógeno para el ratón y el cobayo. En 1884, Rosenbach describió dos especies: *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus albus* (actualmente conocida como *Staphylococcus epidermidis*), los cuales son actualmente clasificados en un género (*Staphylococcus*) de la familia micrococáceas.

GENERALIDADES

Los estafilococos son cocos grampositivos que crecen agrupándose en racimos. Son organismos inmóviles que no forman esporas, sus diámetros varían entre 0.7 y 1.2 μ . En medios sólidos con carne digerida producen colonias circulares prominentes y brillantes de 1-2 mm de diámetro. La mayoría de cepas patógenas elaboran una enzima que recibe el nombre de coagulasa y que provoca la coagulación del plasma, *S. epidermidis* no

produce coagulasa y en la especie humana su capacidad patogénica es escasa, excepto en circunstancias especiales.

Los estafilococos son anaerobios facultativos y de los gérmenes más resistentes entre las bacterias no esporuladas. Permanecen vivos durante varios meses en la superficie de las placas de agar mantenidas a 4 °C y pueden cultivarse a partir de muestras de pus después de varias semanas de su obtención. A pesar de ser muy sensibles a la acción bactericida de algunos colorantes básicos, por ejemplo violeta de genciana, son más resistentes que la mayor parte de las bacterias a otros desinfectantes como el cloruro de mercurio y fenol.

HUESPED

El hombre es el principal reservorio de estafilococos en la naturaleza. El contagio de un hombre a otro es muy frecuente y se propagan por transmisión aérea o por contacto directo. Es tal la difusión de los estafilococos entre la población que la eliminación del reservorio humano resulta virtualmente imposible.

PATOGENIA

La supuración es la característica de la enfermedad estafilocócica. Una vez que el estafilococo consigue penetrar en los tejidos profundos del cuerpo, su multiplicación causa necrosis, y eventualmente origina la formación de abscesos.

La mayor parte de las alteraciones producidas en los tejidos son localizadas y a menudo dejan cicatrices permanentes. Sólo en infecciones muy graves penetran los gérmenes a través de las barreras locales de la lesión e invaden los ganglios linfáticos y el torrente sanguíneo, *Staphylococcus epidermidis* es un huésped constante de la piel y de las mucosas.

La infección estafilocócica aparece a menudo como complicación de traumas accidentales y quirúrgicos, de quemaduras y otras lesiones importantes de la piel y de enfermedades crónicas, caquetizantes, tales como el cáncer, la diabetes mellitus y la cirrosis hepática.

Las infecciones estafilocócicas superficiales, limitadas a la piel, se observan particularmente durante la pubertad en personas con hiperactividad de las glándulas sebáceas y en individuos que están frecuentemente en contacto con aceite, grasas y otros irritantes de la piel.

Los factores que disminuyen las resistencias generales del organismo, tales como las deficiencias dietéticas, alteraciones metabólicas (incluida la diabetes), inyecciones de endotoxinas bacterianas y reacciones anafilácticas, han demostrado experimentalmente que aumentan la sensibilidad a la enfermedad estafilocócica. Incluso *Staphylococcus epidermidis* que es mucho menos virulento que *Staphylococcus aureus*, resulta capaz de infectar las válvulas cardiacas artificiales y también puede provocar infecciones del tracto urinario y endocarditis subaguda bacteriana.

TRATAMIENTO

Es esencial determinar la sensibilidad del germen infectante a los medicamentos disponibles antes de iniciar el tratamiento, ya que, principalmente en los hospitales, predominan los estafilococos resistentes a una o más sustancias antibacterianas.

El tratamiento quimioterápico en la estafilococia debe ser intenso, puesto que la resistencia al medicamento puede aparecer con gran rapidez. A veces esta indicada la administración simultánea de dos o más medicamentos.

Las lesiones con gran supuración deben drenarse a menudo a causa de la resistencia a la terapéutica antimicrobiana de los abscesos ya formados.

VIBRIO CHOLERAЕ

HISTORIA

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

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

GENERALIDADES

La especie *Vibrio cholerae* es agente causal del cólera, bacilo gramnegativo, curvo, oxidasa positivo, no forma microquistes o endosporas, en medio líquido es monotrico, anaerobio facultativo, el oxígeno molecular es su aceptor electrónico, puede crecer en un medio carente de cloruro de sodio (NaCl), 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 que crece en colonias con un tamaño pequeño y de color amarillo, tiene más de 90 serogrupos y algunas cepas de esta especie son bioluminiscentes. Hay dos grupos, el grupo O1 patógeno con 3 serotipos; Ogawa, Inaba e Hicojima, los cuales se reagrupan en los biotipos clásico y *el tor* (este último provoca hemólisis) y el NO-O1 no patógeno.

Esta bacteria 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 un minuto), no puede sobrevivir por largos períodos fuera del organismo aunque el biotipo *El tor* sobrevive más tiempo en el agua (5 días en condiciones ideales) y alimentos, característica por la cual se disemina con mayor facilidad (Kumate, 1993).

HUESPED

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 acidez gástrica.

V. cholerae se destruye a un pH de 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 necesita para producir la enfermedad es alrededor de 1×10^8 (biotipo clásico). *El tor* necesita 1×10^3 (Kumate, 1993).

PATOGENIA

El organismo es ingerido y algunas células sobreviven al pH ácido del estómago, pasando al intestino delgado, el microorganismo coloniza al epitelio del revestimiento, donde se secreta una solución alcalina, rica en bilis que proporciona el medio de crecimiento ideal (Davis, 1983), se desarrolla y produce la toxina termolábil colérica.

La infección puede iniciarse con un período de incubación de unas horas (5-6), aunque en promedio es 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 distales 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 20-25 en 24 horas; el volumen excretado llega a ser de 250 a 500 ml por cada una (perdiéndose un promedio de 8 litros 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 horas por lo que no debe 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.

La principal complicación es la deshidratación frecuentemente acompañada de debilidad, hipoglucemia, hiponatremia o hipernatremia, alteraciones de la conciencia y convulsiones, con estas dos últimas complicaciones, hipocalemia, 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 horas (Davis, 1983).

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 un tratamiento intravenoso. Se deben de suministrar 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, 1983).

El antibiótico usual para el tratamiento es la tetraciclina, otros antibióticos usados son ampicilina, cloramfenicol, gentamicina, kanamicina, estreptomina y sulfonamidas.

En los últimos años, los compuestos quimioterapéuticos entre ellos los antibióticos, han tomado un gran auge. Por tal motivo se hace necesario realizar estudios fitoquímicos con el fin de aislar y determinar las estructuras de los componentes y en particular en aquellos que se conozca que potencialmente presenten actividad biológica antibacteriana.

Una vez reunida la información anterior se abre la posibilidad de desarrollar los recursos naturales existentes con el fin de mejorar o crear nuevos compuestos antibactericidas

OBJETIVOS

Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios de *Montanoa speciosa*.

Identificación y elucidación estructural de los metabolitos secundarios por medio de técnicas espectroscópicas modernas tales como resonancia magnética nuclear protónica (RMN ^1H), espectrofotometría de infrarrojo (IR) y espectrometría de masas (EM).

Evaluación de la actividad antibacteriana de algunos de los metabolitos secundarios de *M. speciosa* mediante pruebas de susceptibilidad ensayadas sobre cepas de bacterias patógenas en el ser humano, bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* y Gram negativas: *E. coli*, *Salmonella tify*, *Shigella boydii* y *Vibrio cholerae*.

Determinación de la toxicidad sobre *Artemia salina* de los metabolitos secundarios que presenten actividad antibacteriana.

MATERIAL Y METODOS.

RECOLECCION DEL MATERIAL VEGETAL.

Se realizó el estudio fitoquímico de la planta *Montanoa speciosa* la cual fue colectada en la Delegación Tlalpan, D.F. en enero de 1995.

El material botánico, fue colectado manualmente e identificado por comparación con un ejemplar auténtico, depositado en el Herbario del Instituto de Biología (UNAM), únicamente se utilizaron las hojas de la planta (560 g) las cuales se dejaron secar a temperatura ambiente.

PREPARACION DE LOS EXTRACTOS.

Una vez secas las hojas, se les agregó diclorometano como disolvente orgánico dejándolas reposar por un período de 48 horas aproximadamente, al cabo de las cuales se filtró y se eliminó el disolvente por destilación.

El residuo obtenido (34 g), se reunió con dos residuos existentes de la misma planta (15.5 g), previa comparación por cromatografía en capa fina, dando un residuo total de 49.5 g, el cual se preadsorbió en 125 g de sílica gel y posteriormente fraccionó en una columna empacada con gel de sílice obteniéndose tres fracciones denominadas A, B, y C al ser eluidas con los siguientes disolventes:

FRACCION	DISOLVENTE	CANTIDAD
A	éter de petróleo	12.7 g
B	diclorometano	18.5 g
C	acetato de etilo	16.6 g

AISLAMIENTO DE COMPONENTES POR LA TECNICA DE CROMATOGRAFIA EN COLUMNA Y ELUCIDACION DE SU ESTRUCTURA QUIMICA.

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

-Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns (en grados centígrados)

-Los espectros en el infrarrojo se determinaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, Mod. 283 empleando la técnica en pastilla (KBr), película (Nujol) y/o en un espectrofotómetro Nicolet Magna FT-IR SX, en solución clorofórmica.

-Los espectros en RMN se determinaron en espectrómetros analíticos Varian Gemini 200 (200 MHz), Varian Unity 300 (300 MHz) en solución de cloroformo deuterado; los desplazamientos químicos están dados en partes por millón (ppm) referidos al tetra-metil silano como referencia interna.

-Los espectros de masas fueron determinados en un espectrómetro, JEOL JMS-Ax505HA mediante la técnica de impacto electrónico.

Las cromatografías para purificar los productos se realizaron en cromatoplasmas de 20x20 cm y/o 20x10 cm con sílica gel 60 Merck F-254 de 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 mm de espesor utilizando como revelador luz ultravioleta de una lámpara modelo UVSL-25 y/o una solución de sulfato cérico al 1% de ácido sulfúrico 2N y sílica gel 60 de tamaño de partícula 0.063-0.200 mm y 0.2-0.5 mm para cromatografía en columna.

De la fracción A (12.7 g) se aislaron por cromatografía en columna parafinas y otros compuestos alifáticos que no fueron analizados.

La fracción B (18.5 g) se preadsorbió en 40 g de gel de sílice y se cromatografió en una columna empacada con 200 g de sílice gel utilizando como eluyentes éter de petróleo, diclorometano, y mezclas de ambos disolventes, así como mezclas de diclorometano-acetato de etilo incrementando gradualmente la polaridad.

Se obtuvieron 95 fracciones de aproximadamente 250 ml cada una, las cuales fueron reunidas de acuerdo a la similitud de sus componentes determinada por cromatografía en capa fina.

En las primeras fracciones (9-39) se aislaron mezclas de compuestos conocidos como: lupeol (5), taraxasterol (6) y β -amirina (7), así como mezclas de acetatos de estos triterpenos.

Las fracciones 64-95 eluidas con diclorometano-acetato de etilo (9:1, 8:2, 6:4, 2:8) se reunieron y se trataron con carbón activado en metanol caliente. Posteriormente se filtró y se eliminó el disolvente. El residuo (5.3 g) se preadsorbió en 11 g de sílice gel y recromatografió sobre 100 g de gel de sílice utilizando como eluyentes mezclas de éter de petróleo-acetato de etilo de polaridad creciente, obteniendo 33 fracciones de 500 ml cada una.

La fracción 14 (1.54 g) de la recromatografía anterior se identificó como el ácido 1,2-dehidro-3-oxo-cóstico (8) por medio de técnicas espectroscópicas.

De las fracciones 11 y 12 (200 mg) se obtuvieron cantidades adicionales del compuesto anterior que fueron sometidas a una reacción de metilación con diazometano, obteniendo el éster metílico del ácido 1,2-dehidro-3-oxo-cóstico (53.8 mg, 9).

La fracción 33 se sometió a un tratamiento similar, aislando una mezcla de pirazolinas que no fue analizada por ser muy compleja.

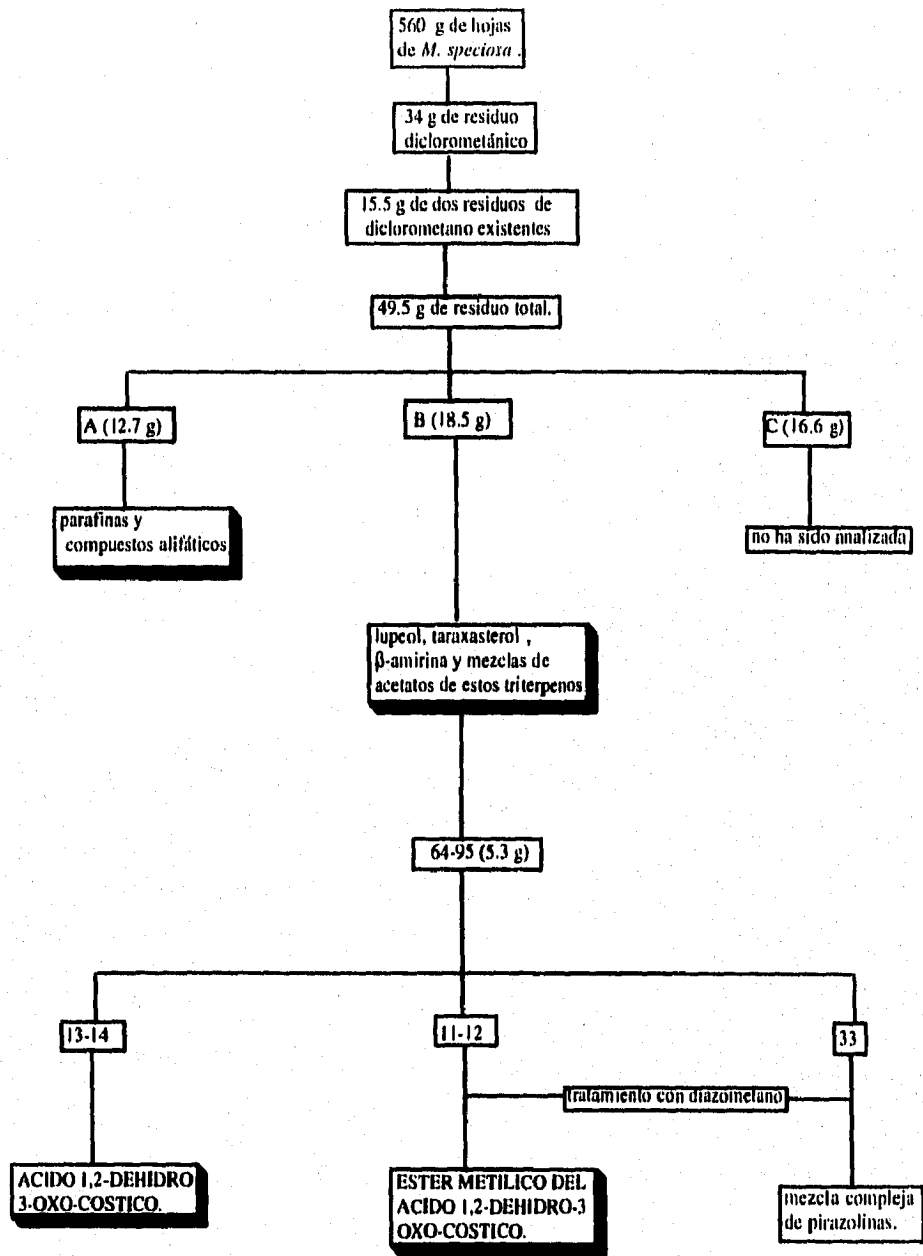


FIGURA 2. Diagrama de los componentes aislados por cromatografía en columna y capa fina de *M. speciosa*. Material recolectado en Tlalpan, D.F. Extracto de diclorometano.

En la fracción C se obtuvieron residuos de los componentes aislados en el extracto de diclorometano del ejemplar recolectado en Izúcar de Matamoros, Puebla.

Por otro lado, se trabajó un extracto de diclorometano existente del estudio anterior de *Montanoa speciosa*, la cual fue recolectada en Izúcar de Matamoros, Pue. en septiembre de 1980 (Trejo, 1988).

El residuo (12.9 g) se preadsorbió en 25 g de sílica gel y se recromatografió en una columna empacada con 120 g de gel de sílice utilizando como eluyente mezclas de éter de petróleo-acetato de etilo incrementando gradualmente la polaridad.

Se obtuvieron 70 fracciones de 100 ml cada una, las cuales, una vez eliminado el disolvente, se reunieron de acuerdo a la similitud de sus componentes determinada en cromatografía en capa fina.

De las fracciones 13-20, eluidas con éter de petróleo-acetato de etilo (8:2) se obtuvo un líquido viscoso de color ligeramente amarillo (653 mg) identificándose como el ácido 1,2-dehidro-3-oxo-cóstico (**8**) mediante técnicas espectroscópicas.

La fracción 31 cristalizó espontáneamente al evaporarse el disolvente, un producto cristalino (16.4 mg) de $pf=145-147\text{ }^{\circ}\text{C}$ (reportado $146-147\text{ }^{\circ}\text{C}$) el cual se identificó como 1,2-dehidro-3-epi-isotelekina (**10**).

De la fracción 34 (16 mg) se obtuvo un sólido cristalino de $pf=153-157\text{ }^{\circ}\text{C}$ el cual se purificó en una placa preparativa de 20x20 cm y de 0.5 mm de espesor usando como eluyente una mezcla de diclorometano-acetona (95:5) identificándose en celina (4.4 mg, **12**), 1,2-dehidro-3-epi-isotelekina (9.4 mg, **10**) y cantidades adicionales del ácido 1,2-dehidro-3-oxo-cóstico (3 mg, **8**), por métodos espectroscópicos.

De las fracciones 32 y 33 reunidas con las aguas madres de las fracciones 31 y 34 (162 mg) después de purificar por cromatografía en placa preparativa de 20x20 cm y 2 mm de espesor utilizando como eluyentes diclorometano-acetona (95:5) (2x) se obtuvieron cantidades adicionales de encelina (15.8 mg, **12**), 1,2-dehidro-3-epi-isotelekina (20.8 mg, **10**) y ácido 1,2-dehidro-3-oxo-cóstico (7.7 mg, **8**).

Las fracciones 35-37 (134 mg) se purificaron en placa preparativa en las mismas condiciones que las fracciones anteriores, obteniéndose encelina (36 mg, **12**), 1,2-dehidro-3-epi-isotelekina (14 mg, **10**) y además una flavanona (2.6 mg) la cual se identificó mediante técnicas espectroscópicas como la galactiaincanina "A" (**13**).

La fracción 40 (20.4 mg) se obtuvo como un sólido cristalino de punto de fusión=155-163 °C el cual se filtró y los cristales se purificaron en una placa preparativa de 20x20 cm y 0.5 mm de espesor usando como eluyentes diclorometano-acetona (98:2) (2x) obteniéndose encelina (12.4 mg, **12**), pequeñas cantidades de un compuesto cristalino con $pf=212$ °C (reportado 241-242 °C) que fue identificado como virginina (1.2 mg, **14**), además de la 1,2-dehidro-3-epi-isotelekina (4 mg, **10**) y su correspondiente acetato (5 mg, **15**).

Las fracciones 41-45 (772.5 mg) y las aguas madres de la fracción 40 se reunieron y recromatografiaron en columna sobre 25 g de gel de sílice eluyendo con diclorometano y mezclas de diclorometano-acetona, incrementando gradualmente la polaridad. Se obtuvieron 90 fracciones de 25 ml cada una, las cuales se reunieron de acuerdo a la similitud de sus componentes en cromatografía en capa fina.

Las fracciones 15-19 (10 mg) de la recromatografía anterior, eluidas con diclorometano se purificaron en una placa preparativa de 20x20 cm y de 0.25 mm de espesor, usando como eluyentes diclorometano-acetona (99:1) (2x) identificándose cantidades adicionales de encelina (3.3 mg, **12**) y virginina (3.2 mg, **14**).

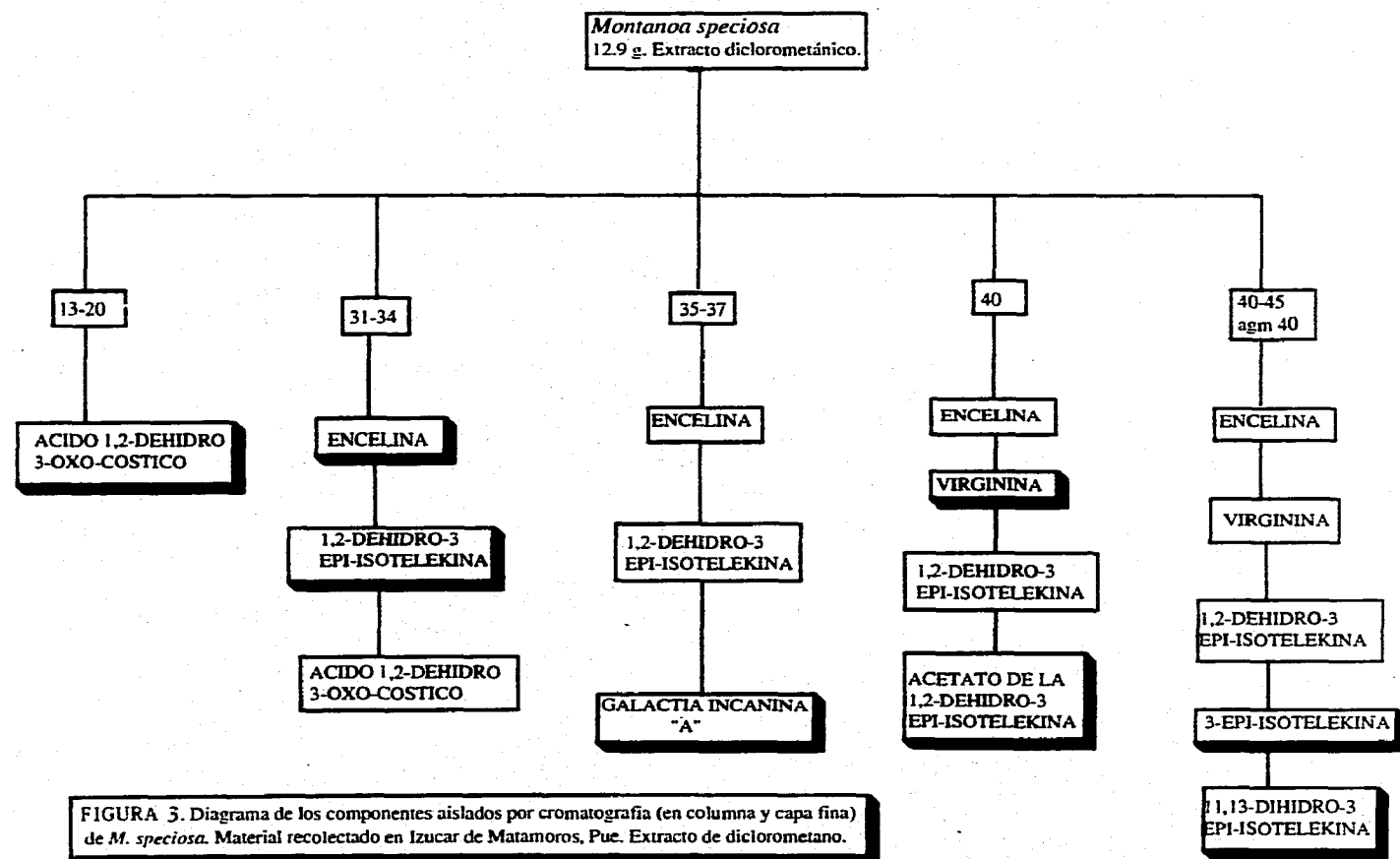
La fracción 22 (12.8 mg) se purificó en una placa preparativa de 20x20 cm y 0.5 mm de espesor. Como sistema de elución se utilizó diclorometano-acetona (98:2) y la placa se desarrollo 3 veces (3x) identificándose de esta manera la 1,2-dehidro-3-epi-isotelekina (**10**) como un sólido cristalino de $pf=147^{\circ}C$.

Las fracciones 25-31 (3 mg) de la misma recromatografía se purificaron en una placa preparativa de 20x20 cm y de 0.25 mm de espesor, utilizando como eluyentes diclorometano acetona (98:2) (2x) identificándose encelina (0.4 mg, **12**) y pequeñas cantidades (2 mg) de una mezcla de los compuestos identificados como 3-epi-isotelekina (**11a**) y 11,13-dihidro-3-epi-isotelekina (**11b**).

Las fracciones 32-43 (16 mg) eluidas con diclorometano-acetona (99:1) se purificaron en una placa preparativa de 20x20 cm y de 0.25 mm de espesor, usando como eluyentes diclorometano-acetona (98:2) (3x) aislándose encelina (1.4 mg, **12**), y una mezcla de los compuestos (4.4 mg) **10**, **11a** y **11b**.

PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS

Bioensayos sobre la actividad antimicrobiana de algunos de los productos naturales obtenidos y bioensayo de toxicidad sobre *Artemia salina* para los metabolitos secundarios cuya prueba de actividad antimicrobiana resulte positiva.



BIOENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIBIOTICA.

Este bioensayo consistió en determinar la susceptibilidad de algunas cepas de bacterias Gram negativas: *Escherichia coli*, *Salmonella tify*, *Shigella boydii*, *Vibrio cholerae* (caso clínico) y Gram positivas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* contra la actividad antibacteriana de los siguientes compuestos obtenidos: 1,2-dehidro-3-oxa-cóstico (8), éster metílico de dicho ácido (9), 1,2-dehidro-3-epi-isotelekina (10) y su correspondiente acetato (15), encelina (12) y un extracto crudo de hojas de la planta obtenido con diclorometano.

PRUEBA DE DIFUSION EN AGAR.

La prueba empleada fue la de difusión en agar, mediante la técnica de sensidiscos o también conocida como técnica de Kirby-Bauer, en la cual se determina la zona clara de inhibición del crecimiento microbiano (halo de inhibición) (Freeman,1992).

Se preparó medio Mueller-Hinton (BIOXON) según las especificaciones del fabricante. Se vertieron aproximadamente 15 ml del medio en cada caja de Petri esterilizada de 10 cm de diámetro; después que el medio se hubo solidificado, las cajas Petri se colocaron dentro de una estufa a una temperatura de 37 °C durante 24 horas, para asegurar que el medio no estuviera contaminado.

Se prepararon sensidiscos recortando discos de papel filtro Watman No. 1 de un diámetro de 5 mm con una perforadora.

Por otro lado, se disolvieron 6 mg de cada compuesto puro en 60 µl de dimetil sulfóxido (DMSO) y con la ayuda de una micropipeta se puso la solución (10 µl) en cada disco de papel, esperando unos minutos antes de aplicar nuevamente. A los discos testigo se les aplicó únicamente dimetil sulfóxido.

Observando las medidas de seguridad indicadas para el manejo de estos organismos, se realizó la siembra por estrías de cada una de las cepas en una caja de petri con Agar Mueller-Hinton, previamente esterilizado a 15 lb de presión durante 15 min.

Posteriormente, con ayuda de una pinza se colocaron en una caja Petri un disco correspondiente a cada uno de los compuestos **8, 9, 10, 12, 15**, y un extracto crudo de hojas de la planta, un disco testigo y un disco de un antibiótico conocido: kanamicina (30 µg), teniendo cuidado de que el lado que contenía la sustancia quedara en contacto con la siembra. Se introdujeron las cajas Petri en una estufa a 37 °C durante 24 horas; transcurrido este tiempo se realizó la medición del diámetro del halo de inhibición con ayuda de una regla graduada en milímetros (Litter, 1986).

Del procedimiento anterior se realizaron dos repeticiones del evento.

METODO PARA LA DETERMINACION DE MIC Y MBC POR EL METODO DE MACRODILUCION EN CALDO

Realizada la prueba de difusión en agar, se procedió a realizar la prueba de macrodilución en caldo sobre las cepas bacterianas que resultaron sensibles a alguno de los compuestos que se probaron.

Esta prueba consiste en preparar un medio de cultivo líquido, donde se adiciona al microorganismo y al antibiótico a diversas diluciones a fin de determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración bactericida media (MBC).

Se probaron diferentes diluciones preparadas seriadamente de 16 µg/ml a 3200 µg/ml. Los tubos se inocularon con una suspensión diluida del microorganismo en estudio (10^8 UFC/ml), y se incubaron a 35 °C durante 18 horas. Al final de este período los tubos se examinaron visualmente, observando la presencia de crecimiento bacteriano, infiriéndolo por la turbidez del medio que presentan los tubos problema y comparándolos con los controles preparados, que únicamente contenían medio de cultivo y microorganismo (Lennette, 1987).

El tubo con menor concentración de antimicrobiano en $\mu\text{g/ml}$ que inhibe el desarrollo in vitro de las bacterias representó la concentración mínima inhibitoria (MIC).

Por convención, la MIC se considera como la concentración de antibiótico contenida en el primer tubo de la serie, en que no se encontró crecimiento visible.

Continuando con esta técnica también se determinó la concentración bactericida media (MBC) de la siguiente manera:

Se vertió el contenido de los tubos que no presentaron turbidez en cajas de Petri con agar y se incubaron, después se contabilizaron las unidades formadoras de colonias (UFC). La caja con menor concentración de antimicrobiano donde no se presentaron UFC señaló la MBC; es decir, la menor concentración en $\mu\text{g/ml}$ que mata totalmente la bacteria en estudio.

BIENSAYO DE TOXICIDAD SOBRE *Artemia salina*.

El bioensayo es propuesto por Meyer *et al.*, 1982 como método para determinar el potencial citotóxico de extractos de plantas y compuestos químicos. Se ha visto que existe una correlación entre la DL₅₀ para *Artemia salina* y la citotoxicidad sobre células de carcinoma nasofaríngeo (KB) y de leucemia linfocítica (PS).

Cuando la DL₅₀ en *Artemia salina* es igual o menor a 1000 ppm, por lo general el metabolito en experimentación también resulta tóxico para las células KB y PS.

Se preparó el medio para el cultivo del crustáceo con solución salina al 3.5% con sal común (NaCl) y agua destilada, la cual se vertió dentro de un pequeño recipiente dividido en dos compartimentos, uno cubierto en el cual se colocaron huevos de *Artemia salina*; el recipiente se colocó dentro de una estufa con el mínimo movimiento, a una temperatura de 24 °C por un período de 48 horas.

Al finalizar este período con el mínimo movimiento posible, el pequeño recipiente se puso bajo una fuente luminosa blanca para atraer a las larvas al compartimento descubierto para su posterior manejo.

Se disolvió la encelina (12) en dimetil sulfóxido en las siguientes concentraciones 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm y 12.5 ppm. Se utilizaron tres frascos pequeños por cada concentración a probar de encelina (12), así como para los testigos que fueron solución salina con DMSO y otro con solución salina únicamente.

Primero se vertieron en cada uno de los frascos de vidrio 3 ml de solución salina, luego se colocaron 10 larvas con la ayuda de una pipeta Pasteur, y finalmente 2 ml de la solución de encelina (12) a la concentración correspondiente. Los frascos preparados se dejaron bajo una fuente luminosa por un período de 24 horas, al cabo de las cuales se cuantificó la mortalidad de los organismos para cada una de las concentraciones que se probaron y el testigo.

Para determinar la concentración letal 50 e intervalo de confianza del 95%, los datos fueron analizados con el programa Finney para computadora, el cual está incluido en la metodología propuesta (Meyer *et al.*, 1982).

RESULTADOS Y DISCUSION.

ASPECTO QUIMICO.

Del extracto diclorometánico de la parte aérea y seca de la planta *Montanoa speciosa* recolectada en Tlalpan D.F (Figura 2) se obtuvo el ácido 1,2-dehidro-3-oxo-cóstico, aislado anteriormente de la misma especie (Seaman y Bencsath, 1985; Quijano *et al.*,1991).

Este ácido ha sido aislado también de *Arctatis arctotoides* (Tsirichtzis, 1990), *Centaurea canariensis* (Bohlman, 1981), además de *Encelia actoni* y *Encelia asperifolia* (Srivastava *et al.*,1990), de las cuales se obtuvo mediante la preparación del éster metílico (9).

La reacción de metilación del compuesto (8) con una solución etérea de diazometano, dió el correspondiente éster metílico(9) confirmando de esta manera, la presencia del ácido carboxílico. Cabe señalar que este compuesto también se ha aislado en forma natural de *Centaurea arguta* (Gadeschi, 1989).

La identificación del ácido 1,2-dehidro-3-oxo-cóstico (8) y su correspondiente éster metílico (9), se llevó a cabo por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos, con los reportados previamente (Seaman y Bencsath, 1985; Trejo, 1988).

De esta manera, su espectro en el infrarrojo (IR) mostró las absorciones características que indican la presencia del ácido carboxílico el cual muestra absorciones en 3101 cm^{-1} para el grupo oxhidrilo (OH) y en 1715 cm^{-1} para el grupo carbonilo (C=O); así como la presencia del grupo carbonilo de una cetona conjugada en 1694 cm^{-1} .

El espectro de RMN ^1H (Espectro 1) mostró las señales características para los hidrógenos del grupo metilo sobre C-10, como una señal simple en 1.0 ppm, así como las señales para los protones vinílicos (H1 y H2) del doble enlace disustituido conjugado con la cetona en C-3, las cuales aparecen

como dos señales dobles centradas en 6.85 y 6.02 ppm, con constantes de acoplamiento (J) de 9.9 Hz.

Se observan además, señales para 4 protones vinílicos correspondientes a los dos metilenos conjugados. Dos señales simples anchas en 6.39 y 5.75 ppm corresponden a los hidrógenos del metileno exocíclico sobre C-4 y las otras dos señales en 6.11 y 5.19 ppm son debidas a los hidrógenos del metileno sobre C-11, conjugado con el carbonilo del ácido.

El espectro de masas (EM) del ácido **8** mostró el pico correspondiente al ion molecular de m/z 246; el cual está de acuerdo para la fórmula molecular $C_{15}H_{18}O_3$.

El espectro de RMN 1H (Espectro 2) del éster metílico (**9**), mostró claramente la señal simple aguda en 3.77 ppm correspondiente al grupo metilo del éster. Congruentemente, el espectro en el infrarrojo (IR) no muestra absorción para el oxhidrilo (OH) del ácido carboxílico y la banda de absorción del grupo carbonilo se encuentra desplazada a 1716 cm^{-1} .

Por otra parte, el espectro de masas (EM) muestra un ión molecular de m/z 260, esto es, 14 unidades de masa mayor que el ácido **8**.

Del extracto diclorometánico de hojas de la planta recolectada en Izúcar de Matamoros, Puebla (Figura 3) se aisló el ácido 1,2-dehidro-3-oxo-cóstico (**8**).

De ese mismo extracto se aislaron 3 eudesmanólidas, cuyas estructuras se encuentran íntimamente relacionadas con la isoalantolactona. Estas fueron identificadas como la encelina (**12**) aislada por primera vez de *Encelia farinosa* (Geissman, 1968), y que resultó ser el componente mayoritario; la 1,2-dehidro-3-epi-isotelekina (**10**) y su correspondiente acetato (**15**) mismas que han sido aisladas anteriormente de *Baltimora recta* (Herz y Kumar, 1979). Estas tres lactonas sesquiterpénicas también fueron aisladas en el estudio previo de *M. speciosa* (Trejo, 1988).

La identificación de estos compuestos también se llevó a cabo por comparación de sus datos espectroscópicos .

La encelina (12) mostró en su espectro de RMN ^1H (Espectro 3), las señales típicas para los protones del metileno exocíclico conjugado con la γ -lactona como dos señales dobles en 6.22 ppm ($J=1.2$ Hz) y 5.69 ppm ($J=1.1$ Hz), otras señales sobresalientes son las correspondientes a los protones vinales H_1 y H_2 en 6.82 y 6.02 ppm, y las señales de los protones del metileno exocíclico sobre C-4 en 6.14 ppm ($J=2.3$ Hz) y 5.23 ppm ($J=2.5$ Hz); además de la señal del grupo metilo sobre C-10 en 1.0 ppm. El espectro en el infrarrojo (Espectro 4) de la encelina (12) mostró dos bandas de absorción para grupos carbonilo de la γ -lactona y la cetona en 1766 y 1672 cm^{-1} respectivamente.

A diferencia de la encelina (12), el espectro en el infrarrojo (IR) de la 1,2-dehidro-3-epi-isotelekina (10) mostró una banda de absorción para grupos oxhidrilo en 3589 cm^{-1} y solo una banda de absorción para el carbonilo correspondiente a la γ -lactona en 1763 cm^{-1} . En congruencia, el espectro de RMN ^1H (Espectro 5), muestra una señal simple ancha en 4.69 ppm que debe corresponder al hidrógeno sobre el carbono 3, base del grupo OH. Esta señal se encuentra desplazada de 4.70 a 5.80 ppm en el espectro del compuesto 15 (Espectro 6), el cual muestra una señal simple aguda en 2.16 ppm que corresponde al grupo metilo del acetato en C-3.

Los espectros de masas (EM), también están de acuerdo con las estructuras correspondientes. Así, la encelina (12) mostró un ion molecular de m/z 244 que está de acuerdo con la fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$, mientras que la 1,2-dehidro-3-epi-isotelekina (10) dió un ion molecular de m/z 246, esto es, dos unidades más de masa. A diferencia de esta última, el espectro de masas (EM) del acetato 15, muestra un ion molecular de m/z 288 que refleja la introducción de 42 unidades de masa del grupo acetilo.

También del mismo extracto se aislaron en pequeñas cantidades 3 componentes, los cuales no habían sido aislados anteriormente de la planta en estudio. Las estructuras de estos nuevos componentes también fueron establecidas espectroscópicamente.

La virginina (**14**) cuya estructura corresponde a la 11,13-dihidro-encelina fue aislada por primera vez de *Encelia virginensis* (Sims y Berryman, 1972). En su espectro de RMN ^1H (Espectro 7) no se observan las señales características para los protones del metileno exocíclico conjugado con la γ -lactona y en su lugar se observa la señal para un grupo metilo secundario, como una señal doble en 1.29 ppm ($J=6.8$ Hz).

El espectro de masas (EM) también está de acuerdo con la estructura del dihidro derivado ya que se observa un ion molecular, dos unidades de masa más que la encelina m/z 246.

La 11,13-dihidro-3-epi-isotelekina (**11b**) fue obtenida como producto de reducción parcial con Paladio- CaCO_3 al 5% de la 3-epi-isotelekina (**11a**) aislada por primera vez de *Gaillardia aristata* (Herz, 1968). Cabe señalar que en el presente estudio, ambos compuestos se obtuvieron como productos naturales en una mezcla, por lo que su espectro de RMN ^1H (Espectro 8) muestra dos señales dobles centradas en 6.16 y 5.61 ppm correspondientes a un metileno exocíclico conjugado con la γ -lactona (**11a**) y también muestra la señal correspondiente a un grupo metilo secundario en 1.24 ppm (**11b**) en vez de las señales del metileno exocíclico conjugado con la γ -lactona.

El espectro de masas (EM) muestra un ion molecular de m/z 248 que está de acuerdo con la fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$ de **11a**, e indica el incremento de dos unidades de masa m/z 250 para **11b**.

Finalmente, se aisló una flavanona (Espectro 9) identificada como Galactiaineanina "A" (**13**), por comparación de sus datos espectroscópicos previamente reportados en *Galactia incana*, especie de la que había sido aislada anteriormente (Pavón, 1994).

TABLA No. 4. COMPONENTES AISLADOS DE *MONTANOA SPECIOSA*.

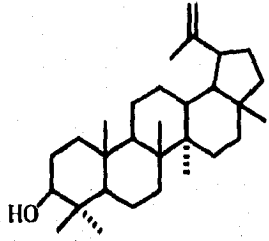
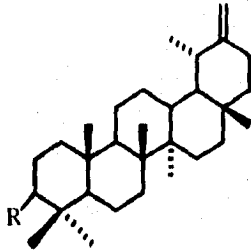
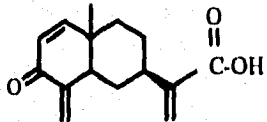
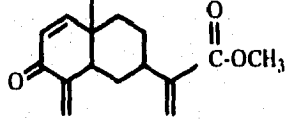
NOMBRE	OTRAS FUENTES	REFERENCIAS
 <p>lupeol (5)</p>	 <p>R= AcO R= palmitato R= OH taraxasterol (6)</p>	<p>compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza (Romo de Vivar, 1985).</p>
 <p>ácido 1,2-dehidro 3-oxo-cástico (8)</p>	<p><i>Arctotis arctoides</i></p>	<p>Tsichritzis, 1990</p>
 <p>éster metílico del ácido 1,2 dehidro-3-oxo-cástico (9)</p>	<p><i>Centaurea arguta</i> <i>Centaurea canariensis</i> <i>Encelia actoni</i> <i>Encelia asperifolia</i></p>	<p>Gadeschi <i>et al.</i>, 1989 Bohlman <i>et al.</i>, 1981 Srivastava <i>et al.</i>, 1990 Srivastava <i>et al.</i>, 1990</p>

TABLA No. 4 Continuación

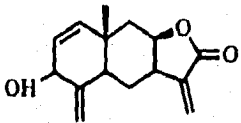
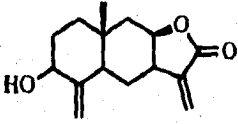
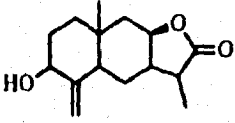
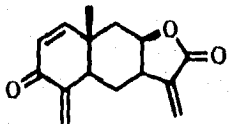
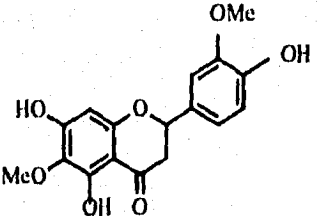
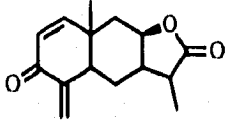
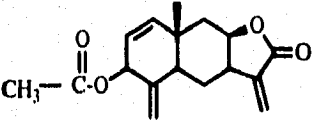
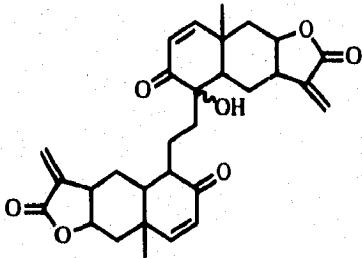
NOMBRE	OTRAS FUENTES	REFERENCIAS
 <p>1,2-dehidro-3-epi isotelekina (10)</p>	<p><i>Artemisia xerophytica</i> <i>Ferreyrantus fruticosus</i> <i>Baltimora recta</i></p>	<p>Tan <i>et al.</i>, 1991 Jakupovic, 1988 Herz y Kumar, 1979</p>
 <p>3-epi-isotelekina (11a)</p>	<p><i>Baltimora recta</i></p>	<p>Herz y Kumar, 1979</p>
 <p>11,13-dihidro-3-epi isotelekina (11b)</p>	<p><i>Gaillardia aristata</i></p>	<p>Herz <i>et al.</i>, 1968 (obtenido por reducción)</p>
 <p>encelina (12)</p>	<p><i>Encelia farinosa</i> <i>Encelia virgineas</i> <i>Ferreyrantus fruticosus</i> <i>Baltimora recta</i></p>	<p>Geissman y Mukherjee, 1968 Sims y Berryman, 1972, Jakupovic, 1988 Herz y Kumar, 1979</p>
 <p>galactaincanina "A" (13)</p>	<p><i>Galactia incana</i></p>	<p>Pavón, 1994.</p>

TABLA No. 4 Continuación

NOMBRE	OTRAS FUENTES	REFERENCIAS
 <p>virginina (14)</p>	<p><i>Encelia virginensis</i></p>	<p>Sims y Berryman, 1972</p>
 <p>acetato de la 1,2-dehidro-3-epi-isotelekina (15)</p>	<p><i>Baltimora recta</i></p>	<p>Herz y Kumar, 1979</p>
 <p>hidroxi-bis-dihidro-encelina (16)</p>		<p>Quijano <i>et al.</i>, 1991</p>

ASPECTO BIOLÓGICO.

Con el objeto de determinar la actividad antibiótica de algunos de los metabolitos secundarios aislados de *Montanoa speciosa* se realizó una prueba preliminar de antibiosis frente a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*) y Gram negativas (*E. coli*, *Shigella boydii*, *Salmonella tify*, *Vibrio cholerae*).

TABLA No. 5. La prueba de Kirby-Bauer resultó positiva únicamente para el ácido 1,2-dehidro-3-oxo-cóstico (8) y encelina (12) sobre la cepa bacteriana de *V. cholerae*. La dosis utilizada fue de 1 mg por sensidisco. Los promedios aquí indicados son el resultado de 3 repeticiones del evento.

COMPUESTO	1,2-DEHIDRO-3- OXO-COSTICO (8)	ENCELINA (12)
MICROORGANISMO	Zona de inhibición	Zona de inhibición
<i>Vibrio cholerae</i>	12 mm	10 mm

TABLA No. 6. Actividad antibacteriana de la encelina con una dosis de 2 mg por sensidisco.

COMPUESTO	ENCELINA(12)
MICROORGANISMO	HALO DE INHIBICION (mm)
<i>Vibrio cholerae</i>	10.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	11.5

La prueba de antibiosis con 1 mg/sensidisco del compuesto probado resultó positiva con encelina (12), y con el ácido 1,2-dehidro-3-oxo-cóstico (8) únicamente con *Vibrio cholerae* presentando un halo de inhibición de 10 mm y 12 mm, respectivamente.

Este último resultado, se puede explicar porque la bacteria mencionada es muy susceptible a la acidez (Lennette, 1987) y dado que el pH del ácido es de 2-3 se deduce que fue la acidez la que mató a la bacteria sin existir actividad antimicrobiana real del compuesto.

Para el caso de la encelina (12), el diámetro del halo de inhibición resultó casi idéntico utilizando 1 y 2 mg por sensidisco del compuesto (Tablas 5 y 6). Esto es importante si se tiene en cuenta que los halos de inhibición indican la sensibilidad de la cepa a un compuesto determinado y que el inverso del diámetro de inhibición representa la MIC (Isenberg, 1992), en este estudio dicha hipótesis no se cumple, lo cual podría explicarse considerando que el metabolito secundario empleado no es soluble en agua, por lo que presenta una difusión ineficiente en agar, siendo lo anterior un factor determinante del tamaño del halo de inhibición.

Este mismo compuesto (12) probado con *Staphylococcus epidermidis* con una dosis de 2 mg/sensidisco presentó un halo de inhibición de 11.5 mm (Tabla 6) siendo una bacteria Gram positiva con una pared celular más gruesa comparada con la presentada por las bacterias Gram negativas. En este aspecto se conoce que el tamaño de la zona de inhibición depende de varias propiedades fisicoquímicas de cada antibiótico, que influyen "in vitro" sobre la velocidad de difusión en agar y no están necesariamente correlacionadas con la actividad del antibiótico "in vivo".

Por otro lado, para tratar de explicar los resultados (ausencia de halos de inhibición) observados con la encelina (12) y no atribuirlos a la baja solubilidad de este compuesto que como se ha mencionado tiene dificultad para difundir en agar, se procedió a realizar una prueba de susceptibilidad por dilución en caldo utilizando una dosis de 1 mg de encelina (12) disuelta en DMSO aplicado a 0.1 ml del inóculo original (10^8 UFC/ml) en un tubo con 1 ml de caldo Mueller-Hinton, para las cepas *E. coli*, *Salmonella tiphy*, *Shigella boydii* y *Staphylococcus aureus*.

Los resultados de la prueba sugieren que la ausencia de halos de inhibición no se debe al carácter insoluble del compuesto mencionado, ya que todos los tubos mostraron turbidez debida al crecimiento bacteriano, indicando que la encelina no presenta actividad antimicrobiana para las bacterias mencionadas.

DETERMINACION DE MIC Y MBC

TABLA No. 7. Valor de MIC para la cepa bacteriana de *Staphylococcus epidermidis*. 3.0×10^7 Bacterias /ml.

TUBO No.	DISOLVENTE DMSO (µl)	COMPUESTO ENCELINA (µg)	TURBIDEZ (+/-)
1	50	1600	-
2	25	800	-
3	12.5	400	-
4	6.25	200 MIC	-
5	4.0	128	+
6	3.0	96	+
7	2.0	64	+
8 (control)	50	0	+

TABLA No. 8. Valor de MIC y MBC para la cepa bacteriana de *Vibrio cholerae* (caso clínico). 2.7×10^7 Bacterias/ml

TUBO No.	DISOLVENTE DMSO (μ l)	COMPUESTO ENCELINA (μ g)	TURBIDEZ (+/-)
1(control)	6.0	0	+
2	6.0	96	-
3	4.0	64 MBC	-
4	2.0	32 MIC	-
5	1.0	16	+

Haciendo una comparación de los valores de MIC para la encelina (12) (Tabla 9) con los valores correspondientes de antibióticos comerciales (Koneman, 1985), se encontró que el compuesto mencionado no presenta una actividad antimicrobiana potencial, sin embargo en estudios realizados con esta lactona sesquiterpénica se ha demostrado que posee actividad tóxica e inhibidora de la alimentación de insectos (Srivastava *et al.*, 1990) actividad antifúngica (Sabanero *et al.*, 1995); y actividad citotóxica y antitumoral (Lee, 1977).

Para *Staphylococcus epidermidis* únicamente se determinó la MIC en 200 μ g, en cuanto a la MBC, no se pudo determinar debido a que la encelina es un compuesto que como se ha mencionado en líneas anteriores es insoluble en agua y en dosis mayores a 200 μ g del compuesto, se desconoce la cantidad exacta de compuesto disuelto, es decir puede existir la misma cantidad de compuesto disuelto en 6.25 μ l como en 12.5 μ l.

Este fenómeno se observó cuando al sembrar en cajas Petri el contenido de los tubos 2 y 3 (400 y 800 µg respectivamente) creció un mayor número de unidades formadoras de colonias (UFC) que en el tubo 4 (200 µg) (Tabla 7), correspondiente al valor de MIC para esta bacteria, siendo totalmente contrario a lo que se esperaba, ya que a mayor dosis de la encelina (12) se presentó un mayor número de UFC.

En este caso, para 400 y 800 µg (> 200 µg), la mayor cantidad de compuesto aplicado cristaliza y solo una cierta cantidad (que desconocemos) se disuelve. Sin embargo, consideramos que la MBC esta entre 200 µg y 400 µg de encelina (12) para esta bacteria.

TABLA No. 9. Valores de MIC Y MBC para la encelina

MICROORGANISMO	MIC (µg)	MBC (µg)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	200	400
<i>Vibrio cholerae</i>	32	64

Comparando los resultados obtenidos para *Staphylococcus epidermidis* (Gram +) y *Vibrio cholerae* (Gram -) se estima que la encelina (12), es más activa para esta última bacteria en términos de MIC (Tabla 9), observando claramente que en la bacteria Gram negativa la dosis de encelina (12) fue mucho menor tanto para MIC como para MBC; en este aspecto se sabe que la membrana celular actúa como una barrera selectiva, dejando pasar algunos solutos a través de ella y excluyendo otros. En realidad, algunos compuestos son transportados activamente siendo concentrados dentro de la célula, otras sustancias se concentran en la superficie celular y pueden alterar las propiedades físicas y químicas de la membrana, impidiendo su

función normal, matando o inhibiendo de esta forma a la célula (Davis, 1983).

En el caso de la encelina (12) se desconoce su modo de acción sobre las bacterias, pese a ello, los resultados de MIC y MBC para *Staphylococcus epidermidis* y *Vibrio cholerae* podrían ser atribuidos principalmente a las diferencias que existen entre bacterias Gram negativas y Gram positivas y se hace referencia en particular a que en estas últimas el rompimiento de la membrana es difícil mientras que en las primeras es relativamente fácil (Freeman, 1992).

PRUEBA DE TOXICIDAD SOBRE *Artemia salina*.

El bioensayo se sugiere como una herramienta sencilla y económica para identificar de manera preliminar, a través de la toxicidad hacia las larvas de este crustáceo, la actividad farmacológica de extractos de plantas o productos naturales, que pudieran ser de interés en la solución de problemas específicos (Meyer *et al.*, 1982).

Se determinó que la concentración letal media 50 (LC 50) de la sustancia bajo estudio, calculada como aquella que produce el efecto de muerte en el 50% de todos los organismos con respecto al control fue de 50 ppm en *Artemia salina* con un intervalo de confianza del 95% de 34-47 $\mu\text{g/ml}$, encontrándose una dosis media de 40.47 $\mu\text{g/ml}$.

De acuerdo a los resultados de toxicidad sobre *Artemia salina*, se deduce que éste organismo es sensible a la actividad tóxica de la encelina (12), la cual mostró ser un compuesto con alta citotoxicidad conferida posiblemente por la presencia del grupo α -metileno- γ -lactona lo cual, cabe señalar, se ha observado en lactonas sesquiterpénicas que poseen este agrupamiento en su estructura (Kupehan, 1971).

Durante los métodos de evaluación de sustancias anticancerígenas que frecuentemente emplean las líneas celulares cancerosas PS y KB, se considera que las sustancias en experimentación tienen una actividad significativa cuando la DL50 para esas líneas celulares es igual o menor a 30 µg /ml, según lo establecido por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (Meyer *et al.*, 1982; Solis *et al.*, 1993).

De acuerdo con lo anterior se podría establecer que la encelina (12) es un compuesto con pocas posibilidades de presentar propiedades anticancerígenas, sin embargo en un estudio realizado con lactonas sesquiterpénicas entre ellas la encelina (aislada de *E. farinosa*) se demostró actividad citotóxica y antitumoral sobre el sistema WI/H.EP.2/W18Va2 (ver abreviaturas) (Lee, 1977), con esto, queda demostrada de alguna manera dicha actividad en la encelina (12), aunque para precisar el estudio se requiere de diversas evidencias (farmacológicas, toxicológicas, farmacéuticas, etc.) que corroboren de manera definitiva dicha actividad.

Por último, aunque el bioensayo con *Artemia salina* no aporta ninguna información sobre dónde y cómo actúan las sustancias en las células tumorales, nos permite sin embargo, la posibilidad de detectar rápidamente y a un bajo costo las sustancias que tengan alguna posible actividad sobre este tipo de células.

CONCLUSIONES

Se aislaron del extracto diclorometánico de hojas de *Montanoa speciosa*: ácido 1,2-dehidro-3-oxo-cóstico (8), el éster metílico de dicho ácido (9), encelina (12), 1,2-dehidro-3-epi-isotelekina (10), y su correspondiente acetato (15), compuestos que han sido reportados previamente de la planta en estudio.

Se aislaron además, 4 componentes: 3-epi-isotelekina (11a), 11,13-dihidro-3-epi-isotelekina (11b), virginina (14) y galactia incanina "A" (13) los cuales no habían sido reportados anteriormente en *Montanoa speciosa*.

Como parte complementaria del trabajo se realizaron pruebas de antibiosis con los compuestos: 8, 9, 10, 12, 15 y un extracto crudo de hojas de la planta obtenido con diclorometano, a fin de determinar la susceptibilidad de algunas cepas de bacterias Gram negativas: *E. coli*, *Salmonella tiphy*, *Shigella boydii*, *Vibrio cholerae* y Gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

De los compuestos utilizados en la prueba de actividad antibacteriana únicamente la encelina (12) mostró actividad en contra de *Staphylococcus epidermidis* y *Vibrio cholerae* (caso clínico).

Es posible que esta leve actividad antibiótica de la encelina (12) le proporcione cierto beneficio a la planta que lo sintetiza, o bien que este compuesto se conjugue con otros componentes para que la planta presente una actividad antibacteriana.

La DL₅₀ de encelina (12) sobre *Artemia salina* fue de 50 ppm con un intervalo de confianza del 95% de 34-47 µg/ml y una dosis media de 40.47 µg/ml.

Probablemente, la actividad antibacteriana y la actividad citotóxica de la encelina (12) demostrada en este estudio, se deba al agrupamiento α -metileno- γ -lactona presente en una gran diversidad de compuestos que presentan esta actividad.

REFERENCIAS

- Baruah, N.C., Sarma J.C., Sarma, S. and Sharma, R.P. 1994. Germination and growth inhibitory sesquiterpene lactones and a flavone from *Tithonia diversifolia*. Phytochemistry 36(1):29-36.
- Bohlmann, F. and Rajinder, K.G. 1981. Guayanolides from *Centaurea canariensis*. Phytochemistry 20(12):3773-3775.
- Cassady, J.M. and Suffness, M. 1980. In "Anticancer Agents Based on Natural Products Models". (J.M. Cassady and J.D. Douros eds). Academic Press. London, England. pp 201-269.
- Cronquist, A. 1981. "Introducción a la Botánica". Ed. CECSA. México. 568 p.
- Davis, D.B., Dulbecco, R., Eisen, N.H., Ginsberg, S.H y Wood, B.W. 1983. Tratado de Microbiología. 2a edición. Salvat edit. España. pp 752-763.
- Domínguez, X.A. 1973. "Métodos de Investigación Fitoquímica". Edit. Limusa. México. 281 p.
- Duke, S.O., Vaughn, K.C., Croom, E.M. and Elshuly, N.H. Weed Sci. 1985, 35:499 (citado por Baruah, *et al.*, 1994).
- Estrada, V.A., Enriquez, G.R., Lozoya, J., Bejar, E., Girón, H., Ponce-Monter, H. and Gallegos, J.A. 1983. "The zoapatle II" Biological and Ecological Determinants. Contraception 27(3):227-237.
- Fischer, H.N. 1991. "Sesquiterpenoid Lactones". In Methods in Plant Biochemistry. Vol. 7. Edited by Hostettmann. Series editors Dey, P.M and Harborne, J.B. Academic Press London, England. pp 187-211.
- Fischer, H.N., Weidenhamer, J.D., Riopel, J.L., Quijano, L. and Menelaou, N.A. 1990. Stimulation of witchweed germination by Sesquiterpene Lactones: A Structure-Activity Study. Phytochemistry 29(8):2479-2483.
- Freeman, A.D. 1992. "Microbiología de Burrows". 22a edición. Editorial Interamericana. pp 154-157.

Funk, V.A. 1982. "The Systematics of *Montanoa* (Asteraceae, Heliantheae)". Memoirs of the New York Bot. Gard. 36:133.

Gadeschi, Z.D., Massanet, G.M.J. and Luis, F.R. 1989. Two derivatives of costic acid from *Centaurea arguta*. Phytochemistry 28(8):2204-2206.

Geissman, T.A. and Mukherjee, R. 1968. Sesquiterpene lactones from *Encelia farinosa* Gray. J. Org. Chem. 33(2):656-660.

Hall, I.H., Starnes, C.O., Lee, K.H. and Waddell, T.G. 1980. Mode of action of sesquiterpene lactones as anti-inflammatory agents J. Pharm. Sci. 69:537-43.

Hartwell, J.L. and Abbott, B.J. 1969. Advan. Pharmacol. Chemother. 7:117. (citado por Rodríguez *et al.*, 1976)

Hawkey, P. and Lewis, D. 1989. "Medical Bacteriology". IRL Press, England. pp.167-171.

Herman, J.W., Merfort, I., Pabreiter, M.C. and Schmidt, J.T. 1994. Cytotoxicity of Flavonoids and Sesquiterpene Lactones from *Arnica* species against the GLC4 and the colo 320 cell lines. Planta Médica 60(5):434-437.

Herz, W. and Kumar, N. 1979. Sesquiterpene Lactones of *Baltimora recta*. Phytochemistry 18(10):1743-1745.

Herz, W., Subramaniam, M. and Geissman, T.A. 1968. 3-epiisotelekin from *Gaillardia aristata* Pursh and the structure of farinosin. J. Org. Chem. 33(10):3743-3747.

Heywood, V.H., Harborne, J.B. and Turner, B.L. 1977. "The Chemistry and Biology of the Compositae". Vol. 2. Chap. II. Academic Press. London, England. 662 p.

Isenberg, H. 1992. Clinical microbiology procedures Handbook, Vol.1 American Society for Microbiology, USA.

Jakupovic, A.J., Schuster, A., Bohlmann, F., and Dillon, M.O. 1988. Lumiyomogyn, ferreyrantholide, fruticolide and other sesquiterpene lactones. Phytochemistry 27(4):1113-1120.

Janssen, A.M., Scheffer, J.J. and Baerheim, S.A. 1987. (Review) Antimicrobial activity of essential oils: 1976-1986. Planta Médica 53(5):395-398.

Jones, S.B. 1987. "Sistemática vegetal". Ed. McGraw-Hill. México. 536 p.

Kanojia, M.R., Wachter, P.M., Levine, D.S., Adams, E.R., Chen, R., Chin, E., Cotter, L.M., Hirsch, F.A., Huettemann, R., Kane, V.V., Ostrowski, P. and Shaw, J.C. 1982. Isolation and structural elucidation of zoapatanol and montanol, novel oxepane diterpenoids from the Mexican Plant "Zoapatle" (*M. tomentosa*). J. Org. Chem. 47(7):1310-1319.

Koneman, W.E., Allen, D.S., Dowell, R.V. y Sommers, M.H. 1985. "Diagnóstico Microbiológico". Edit. Panamericana. México. pp.380-394.

Kumate, J., Sepúlveda, J. y Gutiérrez, G. 1993. El cólera. Epidemias, endemias y pandemias. Edit. Interamericana McGraw Hill. pp 1-271.

Kupchan, M.S., Eakin, M.A. and Thomas, A.M. 1971. Tumor inhibitors 69. Structure-Cytotoxicity Relationships among the Sesquiterpene Lactones. J. Med. Chem. 14(12):1147-1152.

Lee, K., Ibuka, T., Wu, R. and Geissman, T. 1977. Structure-Antimicrobial Activity Relationships among the Sesquiterpene Lactones and related compound. Phytochemistry 16(8):1177-1181.

Lennette, H., Balows, A., Hausler, J.W. and Shadomy, H.J. 1987. "Microbiología Clínica". Edit. Médica Panamericana. 4a.edición. Argentina. pp 336-352, 358-382, 1200-1245.

Levine, D.S., Adams, E.R., Chen, R., Cotter, L.M., Chin, E., Hirsch, F.A., Huettemann, R., Kane, V.V., Shaw, C., Wachter, P.M., Ostrowski, P. and Kanojia, M.R. 1979. Zoapatanol and Montanol, novel oxepane diterpenoids, from the Mexican Plant "Zoapatle" (*M. tomentosa*). J. Am. Chem. Soc. 101(12):3404-3405

Litter, M. 1986. "Compendio de Farmacología". Ed. El Ateneo. Buenos Aires, Argentina. 709 p.

Lozoya, J. y Lozoya, M. 1982. "Flora medicinal de México. la parte. Plantas indígenas. IMSS. México. 309 p.

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.

Meyer, B.N., Ferrigni, N.R. and Putnam, J.E. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Médica 45:31-34.

Moreno, P.N. 1984. Glosario Botánico ilustrado. Edit. CECSA. México. 300 p.

Nezhun Gören., Bozok-Johansson, C., Jakupovic, J., Lin, L., Cordell, A.G. and Celik, N. 1992. Sesquiterpene Lactones with Antibacterial Activity from *Tanacetum densum* ssp. *sivasicum*. Phytochemistry 31(1):101-104.

Nezhun Gören., Jakupovic, J. and Seminur Topal. 1990. Sesquiterpene Lactone with antibacterial activity from *Tanacetum argyrophyllum* Var. *argyrophyllum*. Phytochemistry 29(5):1467-1469.

Pavón, F. F. 1994. Aislamiento y determinación estructural de metabolitos secundarios presentes en *Galactia incana* (leguminosae), tesis de licenciatura Q.F.B. Universidad Veracruzana, Orizaba, ver.

Picman, A.K. 1986. Biochem. System. Ecol. 14, 255-281. (citado por Fischer *et al.*, 1979).

Quijano, L., Calderón, S.J., Gómez, G.F., Rosario, M. y Rios, T. 1985. Oxepane diterpenoids and Sesquiterpene Lactones from "Zoapatle" (*M. tomentosa*) a Mexican Plant with oxytocic activity. Phytochemistry 24(10):2337-2340.

Quijano, L., Gómez, G.F., Trejo, B.R. and Rios, T. 1991. Hidroxy-bis-dihydro-encelin a dimeric eudesmanolide and other eudesmanolides from *M. speciosa*. Phytochemistry. 30(10):3293-3295

Rodríguez, E., Towers, G.H. and Mitchell, J.C. 1976. (review) Biological Activities of Sesquiterpene Lactones. Phytochemistry. 15(11):1573-1580.

Romo de Vivar, A. 1985. "Productos Naturales de la flora mexicana". Ed. Limusa. México. 220 p.

Rzedowski, J. y Rzedowski, G. 1985. "Flora fanerogámica del Valle de México". Vol.II. Dicotyledoneae. Edit. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN e Instituto de Ecología. México. 674 p.

Sabanero, M., Quijano, L., Rios, T. and Trejo, B.R. 1995. Encelin: a fungal growth inhibitor. Planta Médica 61(2):185-186.

Seaman, F.C. and Bencsath, A. 1985. A eudesmane acid from *M. speciosa*. Phytochemistry 24(3):607-608

Sims, J.J. and Berryman, K.A. 1972. Virginin, a sesquiterpene lactone from *Encelia virginensis*. Phytochemistry 11(1):444-445.

Solis, P., Wright, M., Anderson, M., Gupta, M. and Phyllipson. 1993. A Microwell Cytotoxicity Assays ussing *Artemia salina* (Brine shrimp). Planta Médica 59(3):250-252.

Srivastava, R.P., Proskch, P. and Wray, V. 1990. Toxicity and Antifeedant Activity of Sesquiterpene Lactone from *Encelia* against *Spodoptera littoralis*. Phytochemistry 29(11):3445-3448.

Streitwieser, A. y Heathcock, H.C. 1979. "Química Orgánica". Nueva Editorial Interamericana. México. 1258 p.

Tan, R.X., Jakupovic, J., Bolhman, F., Jia, Z.J. and Huneck, S. 1991. Sesquiterpene Lactones and other constituents from *Artemisia xerophytica*. Phytochemistry 30(2):583-587.

Trejo, B.R. 1988. Estudio fitoquímico de *Montanoa speciosa* y *Montanoa sp* (compositae). Tesis de Maestría. México, D.F. (UNAM).

Tsichritzis, F; Jakupovic, J. and Bohlman, F. 1990. Sesquiterpene lactones and farnesol derivates from *Arctotis* and *Arctotheca* species. Phytochemistry 29(1):195-203.

Vanden, D.A. and Vlietink, A.J. 1991. "Screening Methods for Antibacterial and Antiviral Agents from higher plants" In *Methods in Plant Biochemistry* Vol. 6 edited by Hostettmann. series editors Dey, P.M. and Harborne, J.B. Academic Press London, England pp.47-69.

GLOSARIO

Abaxial: el envés, superficie o lado más alejado del eje principal u orientado hacia la base.

Actinomorfa: flor con simetría radial (regular).

Adaxial: el haz, superficie o lado más cercano al eje principal u orientado hacia el ápice.

Angiospermas: grupo de fanerógamas cuyas semillas se encuentran dentro de una cubierta cerrada: el fruto.

Antibiótico: sustancia química que a pequeñas concentraciones tiene la propiedad de inhibir y hasta destruir microorganismos, se amplía la definición para incluir las sustancias activas existentes en algunas plantas.

Brácteas: hoja pequeña en la inflorescencia.

Capítulo: grupo definido o indefinido de flores densas sobre un receptáculo compuesto.

Estípula: par de escamas, espinas, glándulas u otras estructuras parecidas a una hoja, en la base del pecíolo.

Hermafrodita: planta con flores perfectas únicamente.

Indehiscente: que no abre espontáneamente al madurarse.

Inflorescencia: sistema de ramificación que se resuelve en flores.

Involucro: grupo de brácteas que rodean una inflorescencia.

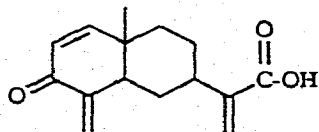
Pedícelos: soporte individual de una flor que forma parte de una inflorescencia.

Pubescente: con pelos simples, delgados y rectos; cobertura en la forma de tricomas.

Tricoma: cualquier excrecencia epidérmica, a menudo en forma de pelo.

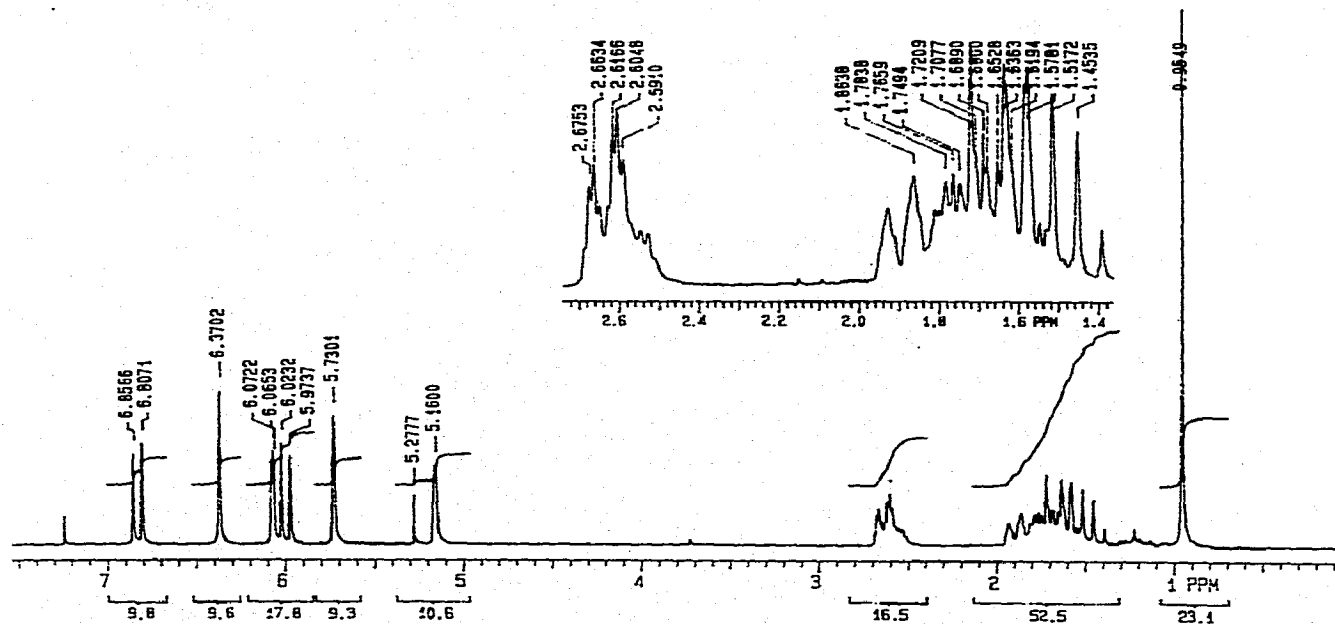
Vilano (papus): cáliz cerdoso, plumoso, escamoso o coriforme típico de la familia Compositae.

APENDICE: ESPECTROS.



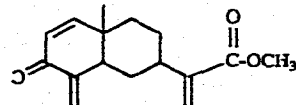
1,2-DEHIDRO-3-
OXO-COSTICO (8)

L QUIJANO F49 HR

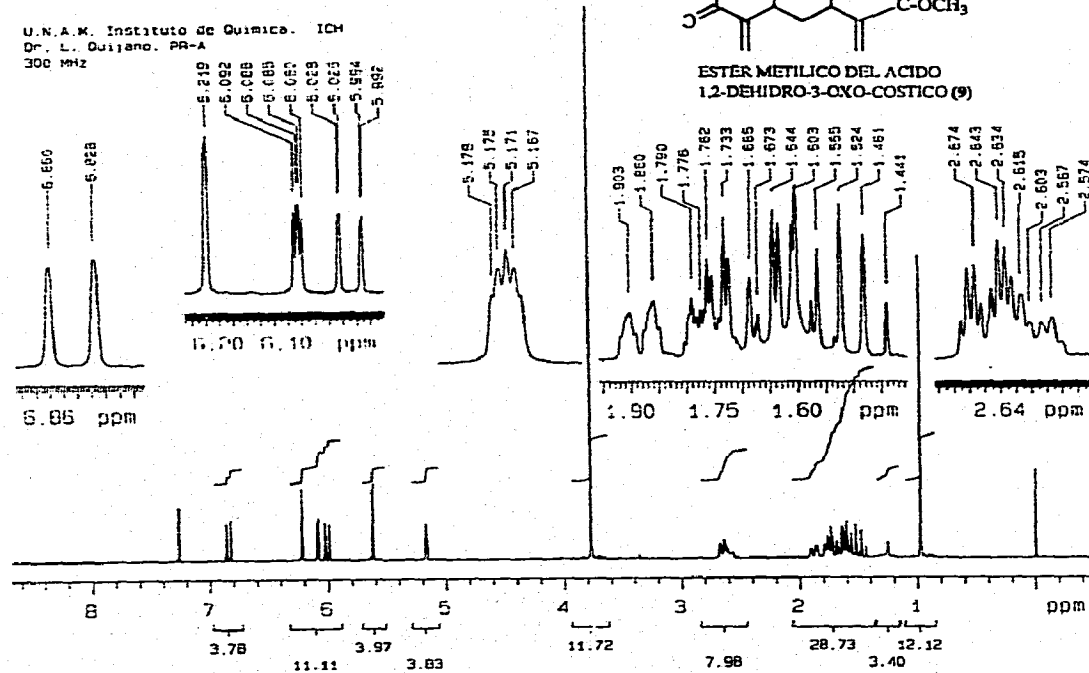


ESPECTRO 1 RMN ¹H

U.N.A.M. Instituto de Químico. ICH
 Dr. L. Quijano. PR-A
 300 MHz

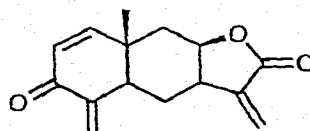


ESTER METILICO DEL ACIDO
 1,2-DEHIDRO-3-OXO-COSTICO (9)

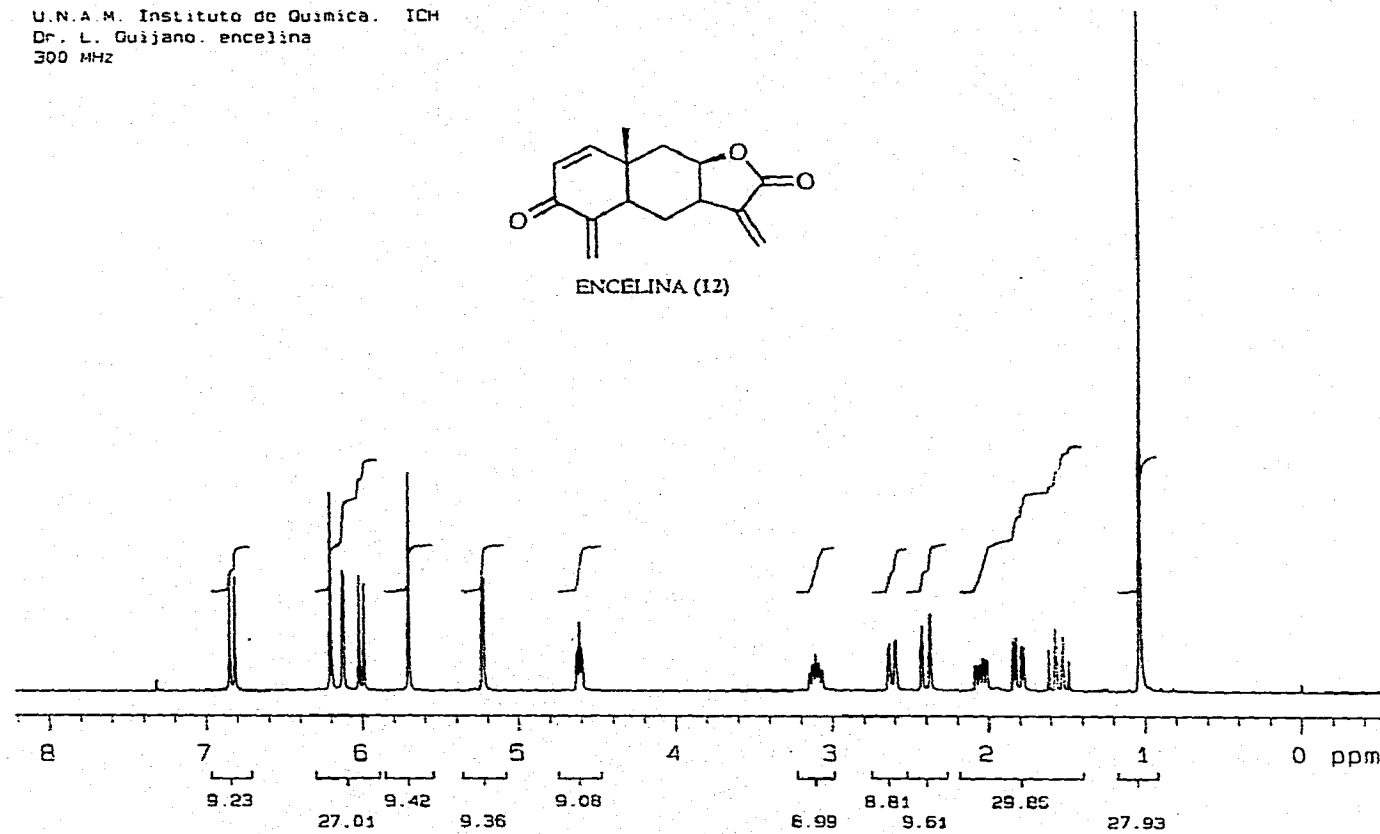


ESPECTRO 2 RMN ¹H

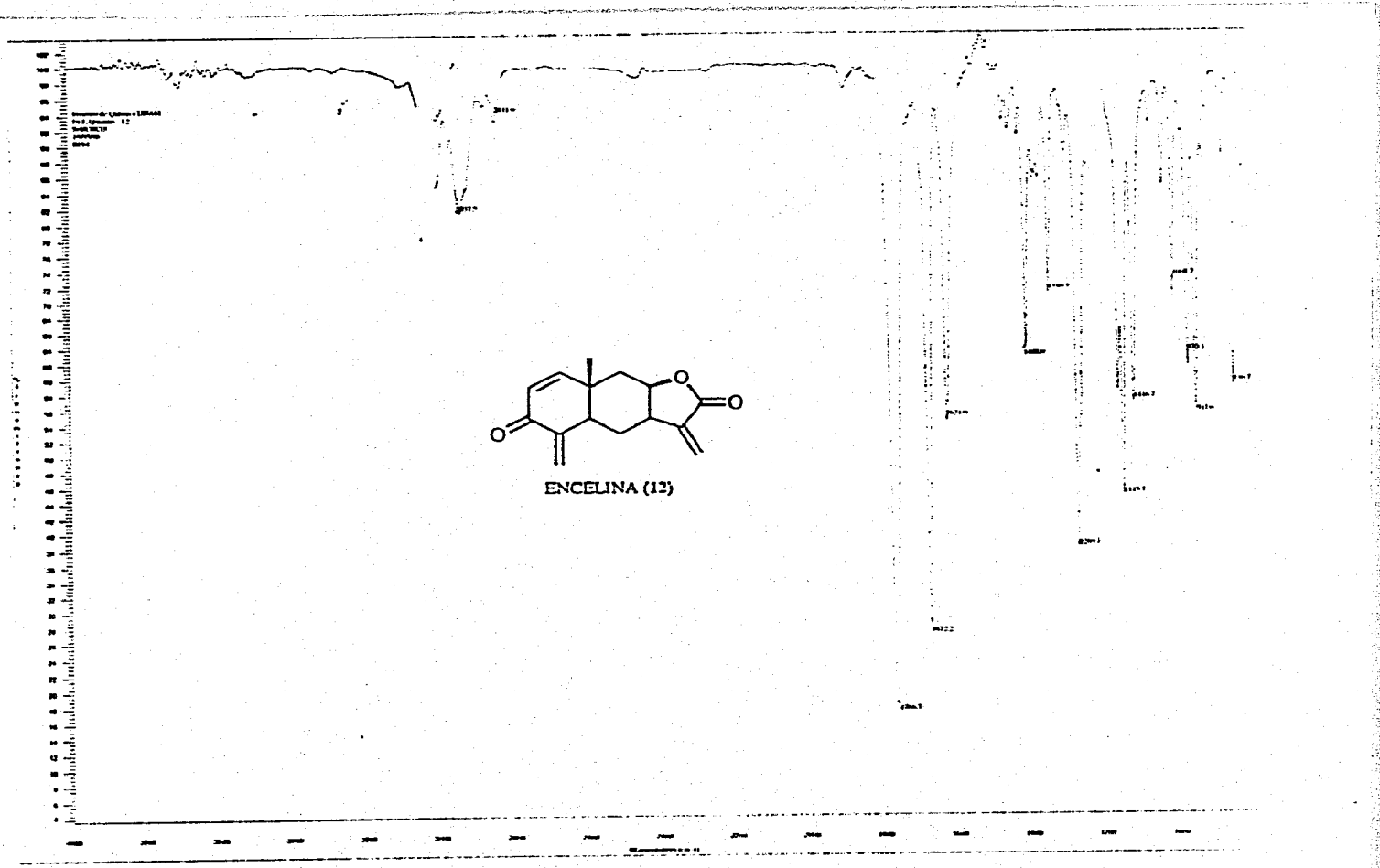
U.N.A.M. Instituto de Química. ICH
Dr. L. Guisano. encelina
300 MHz

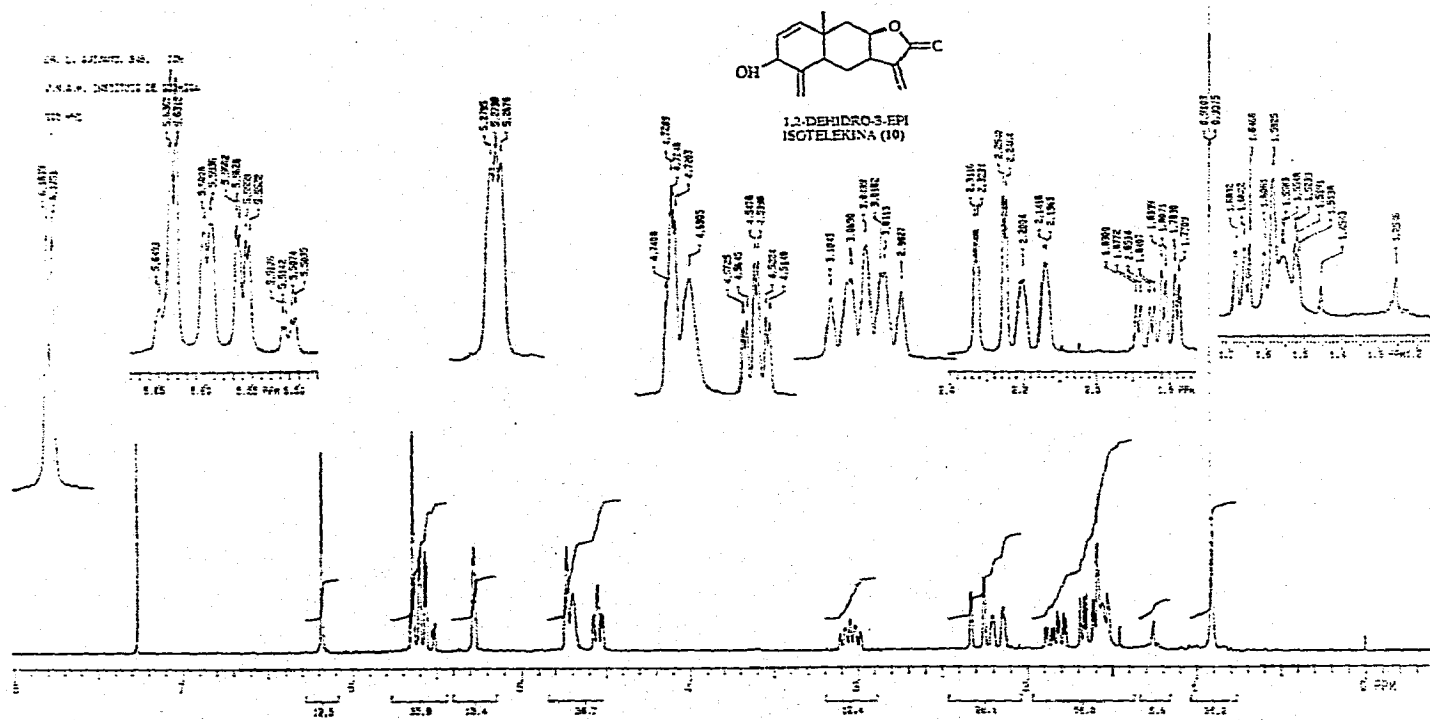


ENCELINA (12)



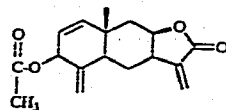
ESPECTRO 3 RMN ¹H



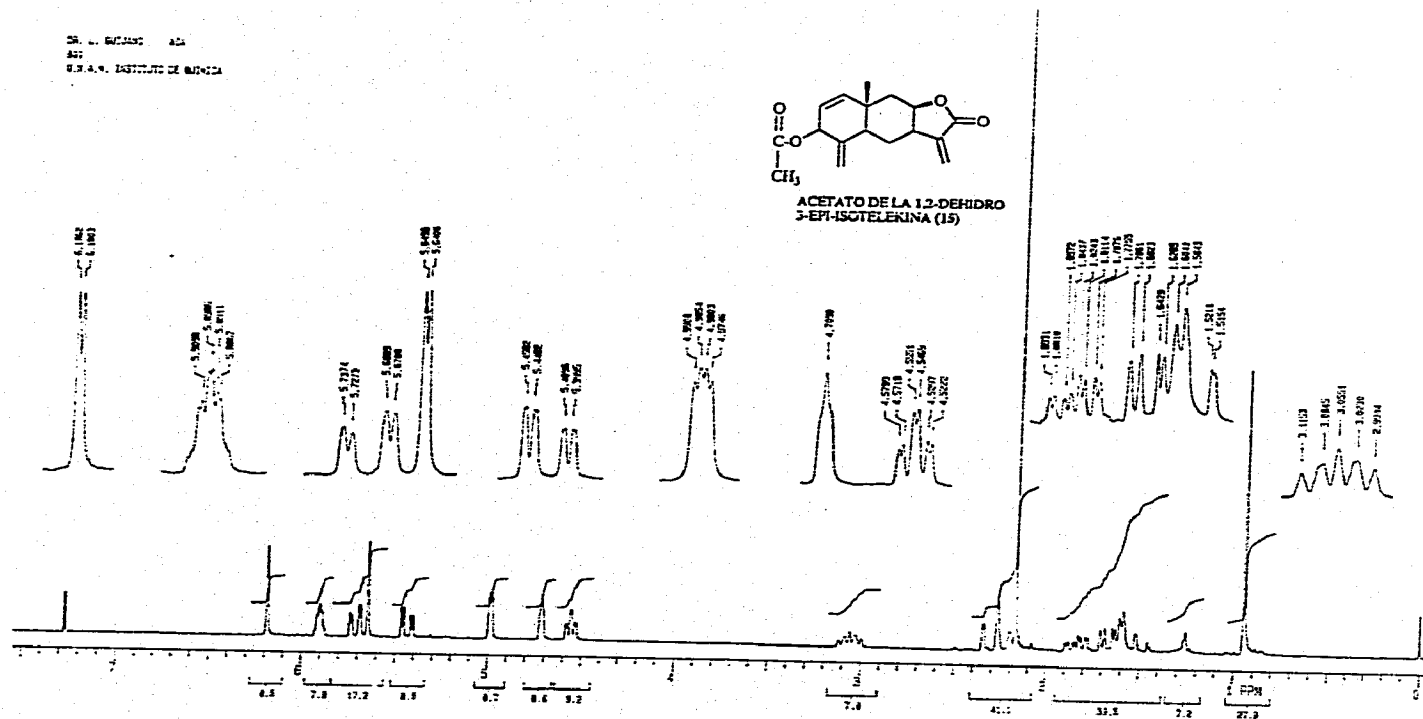


ESPECTRO -5 RMN ^1H

DR. L. BUCARZ ADJ.
INST.
I. S. A. N. INSTITUTO DE QUÍMICA

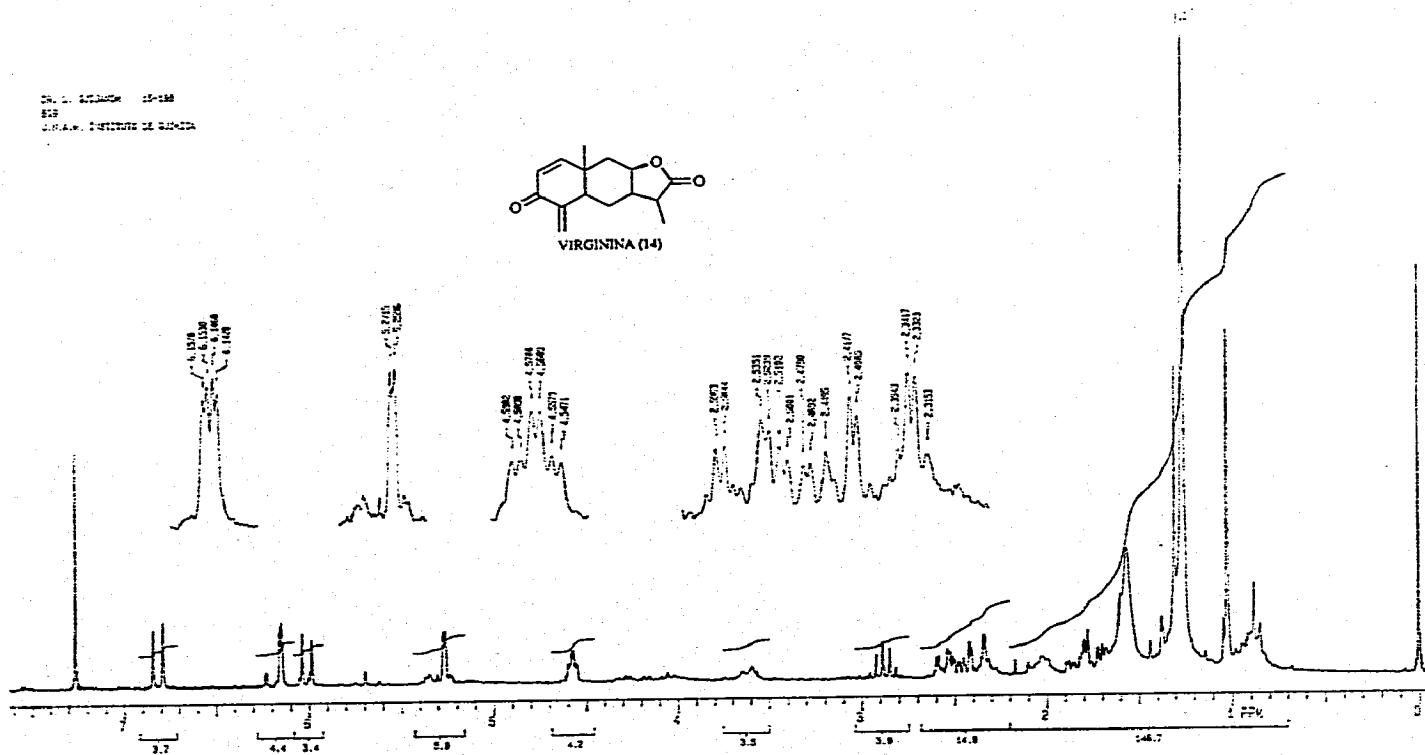
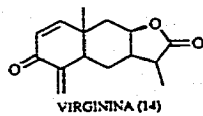


ACETATO DE LA 1,2-DEHIDRO
3-EPI-ISOTELEKINA (15)



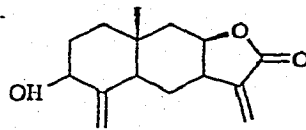
ESPECTRO 6 PMN ^1H

DR. J. L. LACOMBE 10-188
ES
C.N.A.S. INSTITUTO DE QUÍMICA

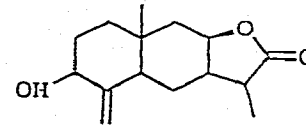


ESPECTRO 7 PPM ¹H

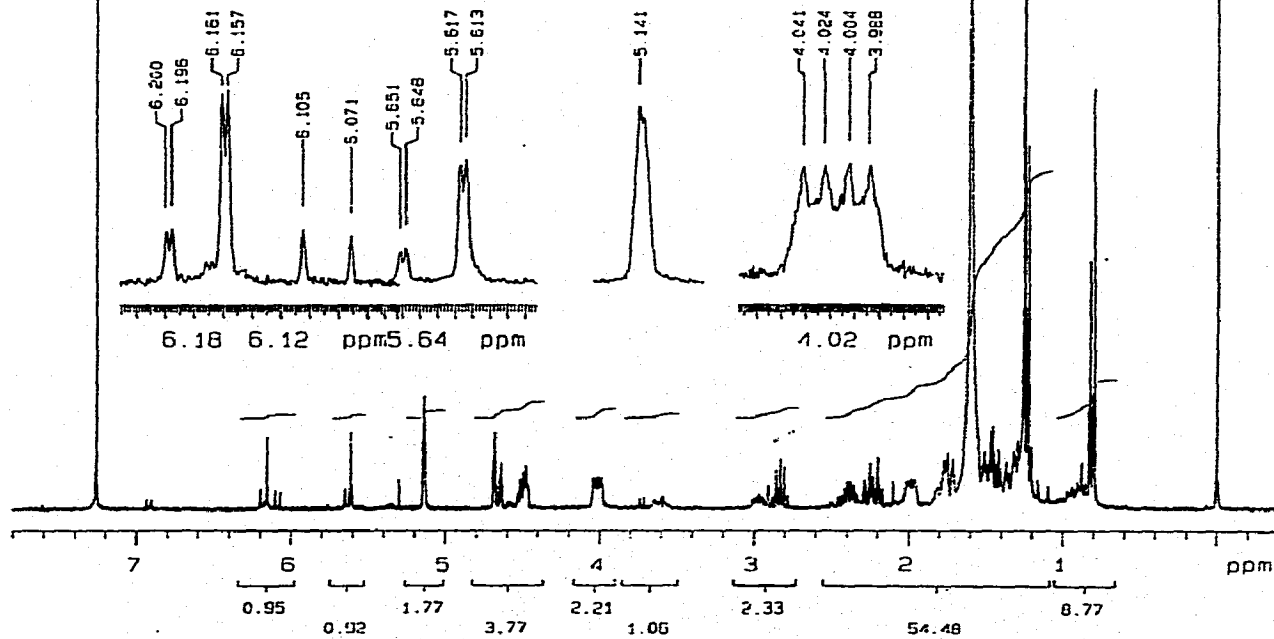
U.N.A.M. Instituto de Quimica. ICH
Dr. L. Quijano 25-31b
300 MHz



3-EPI-ISOTELEKINA (11a)

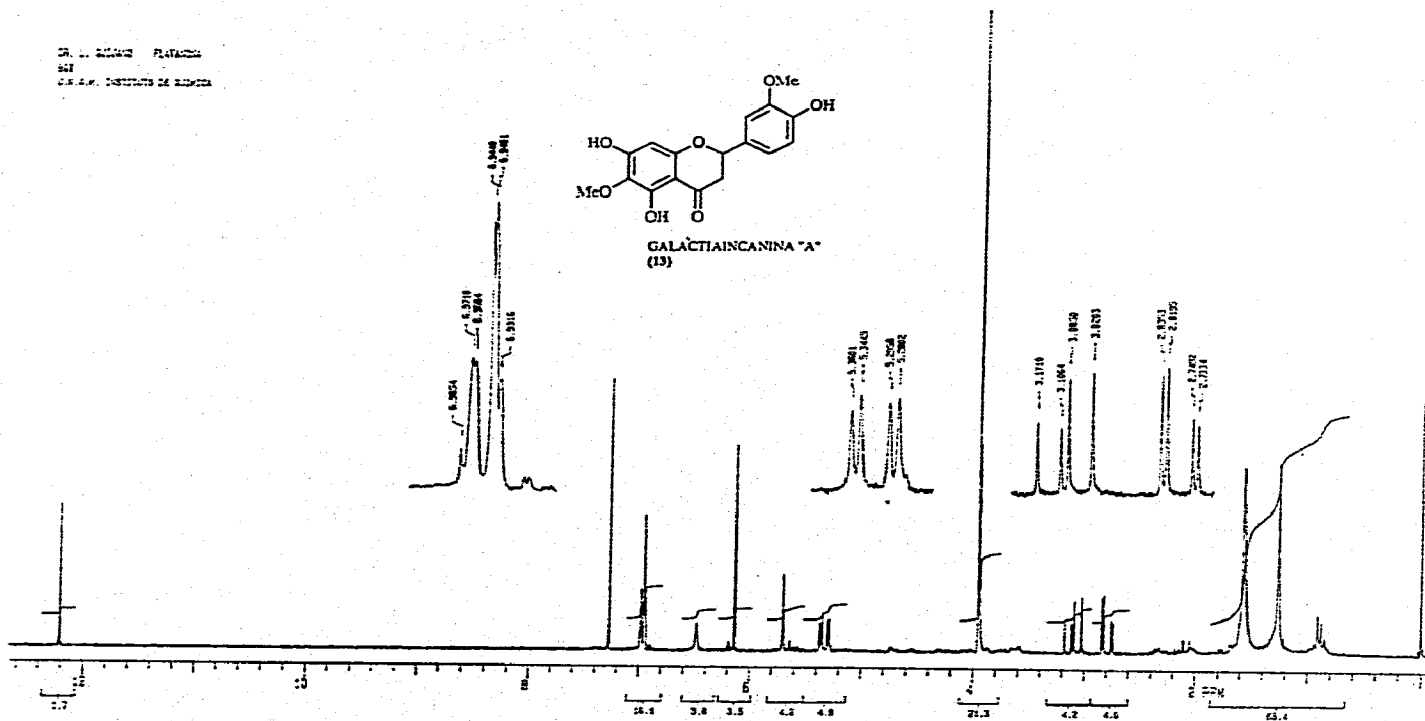
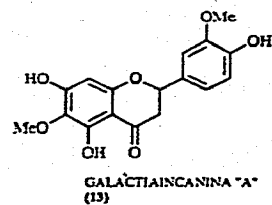


11,13-DIHIDRO-3-EPI-ISOTELEKINA (11b)



ESPECTRO 8 RMN ¹H

DR. L. BELINCE PLATANER
SRI
C.R.A.P. INSTITUTO DE QUÍMICA



ESPECTRO 9 RMN H