

1  
24.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

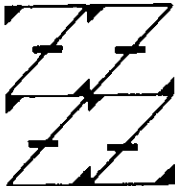
FAULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS CON  
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS PARTES  
AEREAS DE *HELANTHEMUM GLOMERATUM* LAG.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
MARCIAL MANUEL AGUILAR ORTIGOZA

UNAM  
FES  
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE  
DE NUESTRA REFLECCION

MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

257866



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES "ZARAGOZA"**

JEFATURA DE LA CARRERA DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACION DE SINODALES

**ESTIMADOS MAESTROS:**

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

**AGUILAR ORTIGOZA MARCIAL MANUEL**

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: Aislamiento de los compuestos con actividad antimicrobiana de las partes aéreas del Helianthemum glomeratum Lag.

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE	Q.B.P. MA. LUISA DELGADO BRISEÑO
VOCAL	M. C. FERNANDO CALZADA BERMEJO
SECRETARIO	DR. ANDRES NAVARRETE CASTRO
SUPLENTE	Q.F.B. MA. DEL ROCIO BRECEDA HERNANDEZ
SUPLENTE	Q.F.B. MA. GALIA MARTINEZ FLORES

ATENTAMENTE.  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
México, D.F. a, 9 de Octubre de 1997.

*P. a. Ramos*  
Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES  
JEFE DE LA CARRERA

c.c.p. Departamento de Control de Egresados  
c.c.p. Interesado

**Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales a cargo del M. C. Fernando Calzada Bermejo en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS.**

**A la memoria de mi Padre**

## AGRADECIMIENTOS

Al M. C. Fernando Calzada por su confianza y Asesoría.

A la Q. Mariana Meckes jefe de la Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales.

Por aceptarme en su grupo de trabajo.

Al Dr. Javier Torres jefe de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Parasitarias y su grupo de colaboradores por la realización de la actividad antimicrobiana.

Al Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI., IMSS por las facilidades otorgadas durante el desarrollo del presente estudio

A mis amigos de la E.N.E.P., ahora F.E.S., Zaragoza, por todo lo compartido.

A todas aquellas personas que desinteresadamente y de distinta forma contribuyeron en la elaboración del presente.

Y a mi familia... por todo.

## “¡HAY COSAS QUE NOS HA ENSEÑADO LA VIDA!”

Palabras de una campesina curandera

“Aquí desde mi ignorancia, yo les puedo decir que muchos, zacates son curativos y que cada enfermo tiene su remedio”.

Si no sabes para que sirve una medicina, no la uses.

Primero hay que reconocer al enfermo: si uno no se da tiempo, se hacen las cosas mal.

Antes casi nadie se moría de azúcar, de la presión, del corazón, de cáncer, de los nervios,...

¡hay nuevas enfermedades! La gente desordena cada vez más su vida...

Tenemos que curar de corazón, sin asco...

El que no soba bien, descompone.

No está usted para saberlo, pero nuestra generación ya entendió que los errores enseñan mucho.

Yo tengo más aprecio a la amistad que al dinero: conozco parteras y conozco dineradas.

Yo soy de la raza india, y ustedes ya están traumatados porque llegaron los gachupines...

“El cariño consiste en llamarle la atención a la gente, decirle que hay problemas...”

Tomado del libro acerca de la medicina tradicional mexicana.

Dr. Salomón García Jiménez.

**“Si tus proyectos son para un año, siembra grano.**

**Si son para diez años, planta un árbol.**

**Si son para cien años, instruye al pueblo.**

**Sembrando grano una vez, recogerás una vez.**

**Plantando un árbol, recogerás diez veces.**

**Instruyendo a un pueblo, recogerás cien veces”.**

**Kuan-Tsu.**



# CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE ESQUEMAS.....	iii
LISTA DE ESPECTROS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
I. RESUMEN.....	1
II. FUNDAMENTO TEORICO.....	2
II.1. GENERALIDADES DE LAS DIARREAS INFECCIOSAS PROVOCADAS POR BACTERIAS.....	2
II.2. GENERALIDADES DE <i>HELLANTHEMUM GLOMERATUM</i> LAG.....	13
II.2.1. Nombres comunes y distribución.....	13
II.2.2. Composición química y actividad biológica.....	14
II.3. GENERALIDADES DE LAS PROANTOCIANIDINAS TIPO B.....	15
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29

IV. OBJETIVOS.....	30
IV.1. OBJETIVO GENERAL.....	30
IV.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	30
V. HIPOTESIS .....	31
VI. PARTE EXPERIMENTAL .....	32
VI.1. Materiales, reactivos, equipos y bacterias.....	32
VI. 2. METODOS .....	34
VI.2.1. Material vegetal y extracción.....	34
VI.2.2. Fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico.....	34
VI.2.2.1. Análisis cromatográficos.....	37
VI.3. EVALUACION BIOLOGICA.....	39
VI.3.1. Determinación de la actividad antibacteriana <u>in vitro</u> contra agentes causantes de diarrea aguda.....	39
VI.3.2. Bioensayo. ....	40
VI.4. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS COMPUESTOS <u>21</u> , <u>24</u> Y <u>25</u> .....	40
VI.4.1. Aislamiento y purificación del tilirosido <u>21</u> . ....	40
VI.4.2. Aislamiento y purificación de $\beta$ -D-gluco- $\beta$ -sitosterol <u>24</u> . ....	40
VI.4.3. Aislamiento y purificación del compuesto <u>25</u> .....	41

VII. RESULTADOS Y DISCUSION.....	44
VII.1. IDENTIFICACION DE LOS COMPUESTOS AISLADOS: <u>21</u> , <u>24</u> Y <u>25</u> .....	47
VII.1.1. Identificación del tilirósido <u>21</u> .....	47
VII.1.1.1. Reacción de hidrólisis de tilirósido.....	47
VII.1.2. Identificación del $\beta$ -D-gluco- $\beta$ -sitosterol <u>24</u> .....	49
VII.3. Identificación del compuesto galocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina <u>25</u> .....	51
VIII. CONCLUSIONES.....	60
RECOMENDACIONES:.....	61
IX. BIBLIOGRAFIA.....	62

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1 .- Antibióticos utilizados en el tratamiento de diarreas infecciosas provocadas por bacterias.....	3
Tabla 2. - Ensayos biológicos para determinar actividad antibiótica.....	11
Tabla 3.- Clasificación de las proantocianidinas con base a la unidad flavan-3-ol.....	17
Tabla 4.- Ejemplos de proantocianidinas tipo B con base a su unidad flavan-3-ol.....	19
Tabla 5.- Proantocianidinas tipo B y su actividad biológica.....	25
Tabla 6.- Resultados de la actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas en el reparto del extracto metanólico.....	36
Tabla 7.- Sistema de eluyentes utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.....	37
Tabla 8 .- Agentes cromogénicos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.....	38
Tabla 9.- Resultados de la actividad antibacteriana del precipitado III (compuesto <u>25</u> ) y fracciones F <sub>4-1</sub> y F <sub>4-2</sub> .....	41
Tabla 10.- Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna abierta de la fracción F <sub>4</sub> .....	42
Tabla 11.- Resultados de la actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas del fraccionamiento en CCA de la fracción F <sub>4</sub> .....	43
Tabla 12.- Rendimiento de los compuestos aislados de las partes aéreas de <i>Helianthemum glomeratum</i> Lag.....	44

Tabla 13.- Resultados de la actividad antibacteriana in vitro del compuesto

galocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina 25.....46

Tabla 14.- Constantes espectroscópicas y espectrométricas del compuesto

galocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina 25.....52

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Ejemplar de herbario de *Helianthemum glomeratum* Lag.....13

Figura 2.- Compuestos aislados previamente de *Helianthemum glomeratum* Lag.....14

Figura 3.- Unidad flavan-3-ol y unidad flavanvan-3,4-diol.....15

Figura 4.- Biosíntesis de las proantocianodinas tipo B.....16

Figura 5.- Principales reacciones empleadas para identificar proantocianidinas tipo B.....23

Figura 6.- Cromatograma del precipitado III (EPIDOX 23) y la fracción f-10

(EPIDOX30).....45

Figura 7.- Reacción de hidrólisis del tilirósido.....47

Figura 8.- a) Ampliación IR entre 1534 a 1104 cm<sup>-1</sup> del compuesto 25, b y c) ejemplos de

otros compuestos ilustrando su IR y su estructura.....53

Figura 9.- Patrón de sustitución en los anillos B, E, C y F.....55

Figura 10.- a) Ampliación IR a 1534 cm<sup>-1</sup> del compuesto 25, b) Ampliación IR a 1534 cm<sup>-1</sup>

de la galocatequina-(4→8)-epigalocatequina y c) Ampliación IR a 1534 cm<sup>-1</sup> de

la catequina-(4 $\beta$ →8)-catequina.....56

Figura 11.- a) Ampliación del IR entre 800 a 730 cm<sup>-1</sup> del compuesto 25 y b-e ejemplos

de otros compuestos ilustrando su IR y la estructura molecular.....57

Figura 12.- Estructura del compuesto <u>25</u> indicando la principal fragmentación observada en el espectro FAB.....	59
--	----

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.- Diagrama de extracción y fraccionamiento del extracto metanólico de las partes aéreas de <i>Helianthemum glomeratum</i> Lag.....	35
---	----

## LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1.- RMNP del tilirósido <u>21</u> .....	48
Espectro 2.- IR del $\beta$ -D-gluco- $\beta$ -sitosterol <u>24</u> .....	50
Espectro 3.- IR de la galocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina <u>25</u> .....	54

**LISTA DE ABREVIATURAS.**

E = *Escherichia*.

V = *Vibrio*.

S = *Salmonella*.

Sh = *Shigella*.

C = *Campylobacter*.

Htg = *Helianthemum glomeratum* Lag.

CCA = Cromatografía en columna abierta.

CCF = Cromatografía en capa fina.

CLAP = Cromatografía líquida de alta presión.

MeOH = Alcohol metílico.

EtOH = Alcohol etílico.

HCOOH = Acido fórmico.

AcOEt = Acetato de etilo.

CHCl<sub>3</sub> = Cloroformo.

CH<sub>3</sub>COOH = Acido acético.

H<sub>2</sub>O = Agua.

KBr = Bromuro de potasio.

TMS = Tetrametil silano.

R.A = Reactivo analítico.

eV = Electrón volt.

dif = Diferentes.

UV = Ultravioleta.

IR = Infrarojo.

RMNP = Resonancia magnética nuclear protónica.

RMN<sup>13</sup>C = Resonancia magnética nuclear de carbono 13.

CIM = Concentración inhibitoria mínima.

l = Litro.

ml = Mililitro.

μl = Microlitro.

Kg = Kilogramo.

g = Gramo.

mg = Miligramo.

μg = Microgramo

gpo = Grupo.

nm = Nanómetro.

m/z = Relación masa-carga.

δ = Desplazamiento químico.

% = Por ciento.

DMSO = Dimetilsulfóxido.

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = Sulfato de sodio.



$\text{NaHCO}_3$  = Carbonato ácido de sodio.

$\text{C}_6\text{H}_{14}$  = Hexano.

$\text{Me}_2\text{CO}$  = Acetona.

$\text{HCl}$  = Acido clorhídrico.

$\text{CH}_2\text{N}_2$  = Diazometano.

$\text{OH}$  = Hidróxilo.

% T = Por ciento de transmitancia.

N = Normal.

PM = Peso molecular.

P. f. = Punto de fusión.

$^\circ\text{C}$  = Grados centígrados.

Hrs = Horas.

$\text{cm}^{-1}$  = Centímetros a la menos uno.

mm = Milímetros.

CMN = Centro Médico Nacional.

CD = Dicroísmo circular.

$\phi$  = Fenilo trisustituido.

P = Precipitado.

## I. RESUMEN

Como parte de un estudio sistemático sobre plantas utilizadas para tratar las diarreas infecciosas en la medicina tradicional de los altos de Chiapas, se realizó el estudio fitoquímico biodirigido de la especie de las partes aéreas de *Helianthemum glomeratum* Lag. Esta investigación permitió el aislamiento y caracterización de un flavonoide (tilirósido), un esteroide ( $\beta$ -D-glucosido- $\beta$ -sitosterol) y una proantocianidina tipo B (galocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina).

La galocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina representa un nuevo producto natural y el compuesto con mayor actividad antimicrobiana.

## II. FUNDAMENTO TEORICO

### II.1. GENERALIDADES DE LAS DIARREAS INFECCIOSAS PROVOCADAS POR BACTERIAS.

En México como en los países en vías de desarrollo, las diarreas provocadas por bacterias constituyen un problema de salud pública y son unas de las primeras causas de morbi-mortalidad en los grupos de población menor de cinco años (Vázquez, 1987; Díaz del Castillo, 1988; Gotuzzo *et al.*, 1991; S.S.A., 1993; Torres *et al.*, 1995).

A nivel mundial se ha demostrado que anualmente cerca de 750 millones de niños se enferman de diarrea aguda y mueren aproximadamente de 10,000 a 12,000 niños. En el caso particular de México se presentan en promedio de tres a cuatro episodios de diarrea por año en niños menores de cinco años con duración de tres días en la gran mayoría de los casos (Vázquez, 1987; S.S.A., 1993; Mendoza- Michaus, 1996).

En la etiología del extenso grupo de enfermedades conocidas como diarreas infecciosas hay numerosos agentes etiológicos entre los que destacan las bacterias: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Klebsiella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *Clostridium difficile*, *Salmonella ssp*, *Shigella ssp*, *Yersinia enterocolitica*, entre otras (Kroeger-Luna, 1987; Díaz del Castillo, 1988; Salas *et al.*, 1990; Olarte, 1992).

En México se han aislado más comúnmente en niños con diarrea infecciosa, las siguientes bacterias: *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* productora de toxinas tipo shiga (SCT) I y/o II, *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva. *E. coli* 0157:H7, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *Shigella spp*, *Sh. flexneri*,

*Sh. boydii*, *Sh. sonnei*, *Sh. dysenteriae*, *Salmonella spp*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* (Benítez *et al.*, 1991; Olarte, 1992; S.S.A., 1993; Suárez *et al.*, 1993; Torres *et al.*, 1995; Mendoza-Michaus, 1996).

Para el tratamiento de las diarreas infecciosas provocadas por bacterias en la actualidad se cuenta con fármacos bactericidas y bacteriostáticos: cloranfenicol 1, tetraciclina 2, doxiciclina 3, ampicilina 4, trimetoprima 5, sulfametoxazol 6, eritromicina 7, gentamicina 8, sulfisoxazol 9, neomicina 10, rifampicina 11, ácido nalidíxico 12, estreptomycin 13, kanamicina 14, nitrofurantoína 15, cefalotina 16, amoxicilina 17 y lomefloxacina 18 (Kuschinnky-Lullmann, 1975; Mandel-Sande (Goodman-Gilman's), 1990; S.S.A., 1984; U.N.A.M., 1984; Harrison, 1986; Kroeger-Luna, 1987; Diaz del Castillo, 1988; Salas *et al.*, 1990; Gotuzzo *et al.*, 1991; S.S.A., 1993; Mosquera-Galdos, 1994). En la tabla 1 se ilustran los antibióticos utilizados en el tratamiento de diarreas infecciosas provocadas por bacterias.

Tabla 1.- Antibióticos utilizados en el tratamiento de diarreas infecciosas provocadas por bacterias.

ESTRUCTURA	BACTERICIDA	BACTERIOSTATICO
<p><u>1</u></p>	-----	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella spp.</i>

Tabla 1.- (Continuación). Antibióticos utilizados en el tratamiento de diarreas infecciosas provocadas por bacterias.

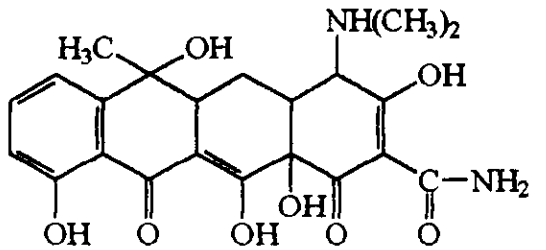
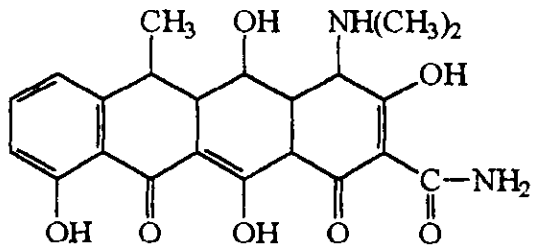
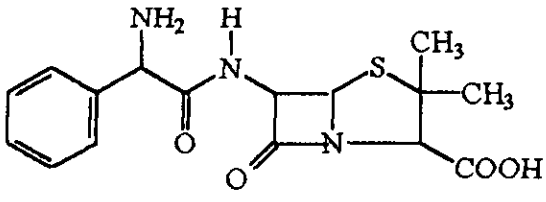
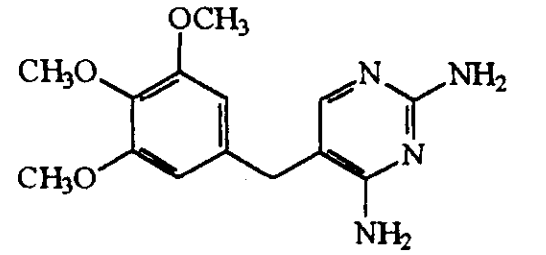
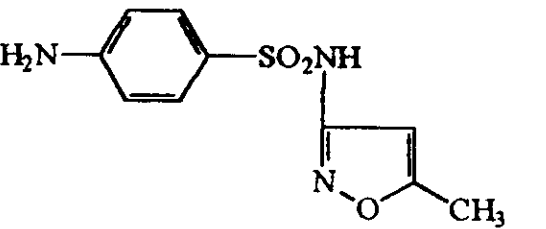
ESTRUCTURA	BACTERICIDA	BACTERIOSTATICO
<p>2</p> 	-----	<i>Escherichia coli,</i> <i>Vibrio cholerae.</i>
<p>3</p> 	-----	<i>Vibrio cholerae.</i>
<p>4</p> 	<i>Salmonella spp, S. typhi,</i> <i>Shigella spp.</i>	-----
<p>5</p> 	<i>Salmonella spp, Shigella</i> <i>spp, Vibrio cholerae.</i>	-----
<p>6</p> 	<i>Salmonella spp, Shigella</i> <i>spp, Vibrio cholerae.</i>	-----

Tabla 1.- (Continuación). Antibióticos utilizados en el tratamiento de diarreas infecciosas  
provocadas por bacterias.

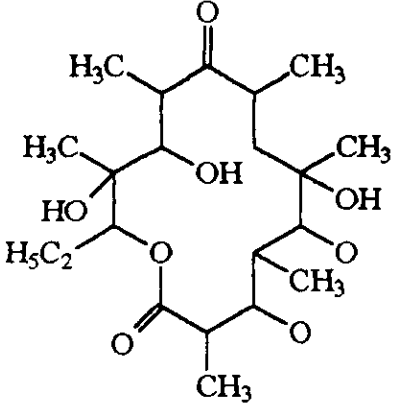
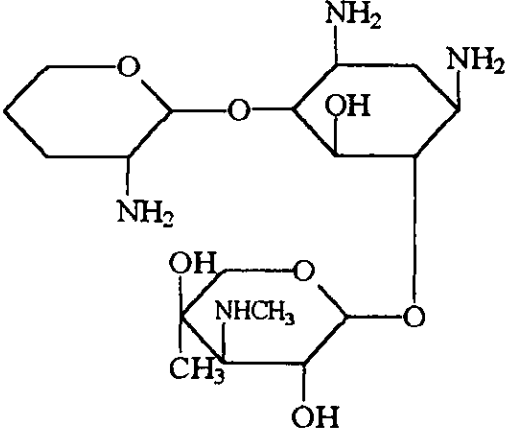
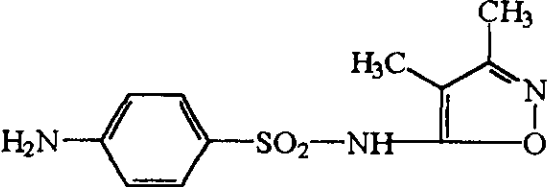
ESTRUCTURA	BACTERICIDA	BACTERIOSTATICO
<p>7</p> 	-----	<i>Vibrio cholerae.</i>
<p>8</p> 	<i>Escherichia coli,</i> <i>Salmonella spp, Shigella</i> <i>spp.</i>	-----
<p>9</p> 	<i>Salmonella spp, Shigella</i> <i>spp.</i>	-----

Tabla 1.- (Continuación). Antibióticos utilizados en el tratamiento de diarreas infecciosas provocadas por bacterias.

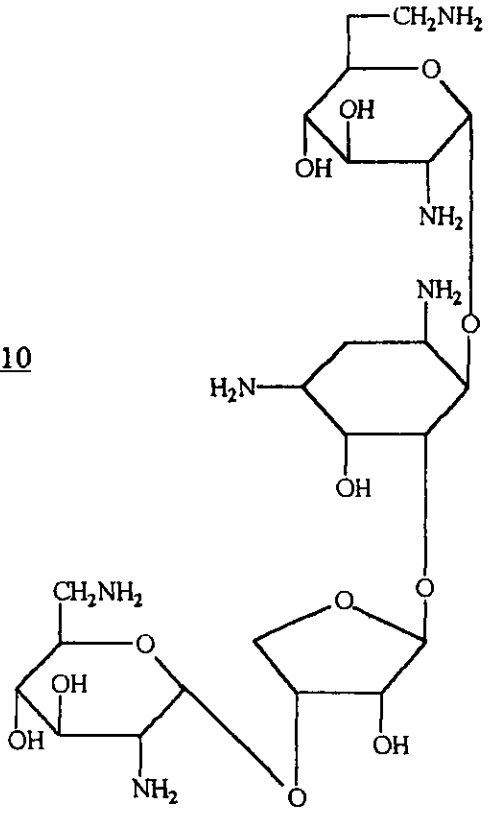
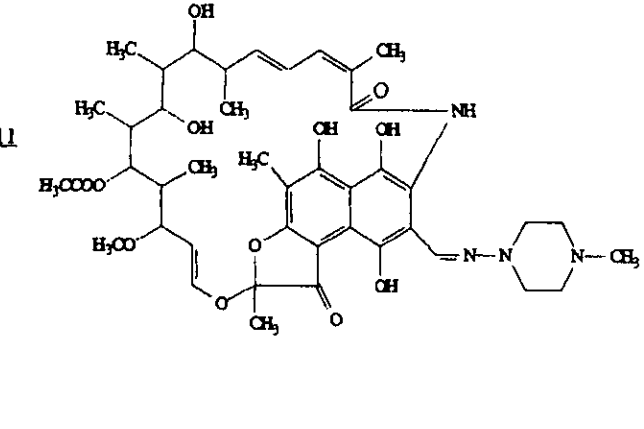
ESTRUCTURA	BACTERICIDA	BACTERIOSTATICO
<p>10</p> 	<p><i>Escherichia coli,</i> <i>Salmonella spp,</i> <i>Shigella spp,</i> <i>Vibrio cholerae.</i></p>	<p>-----</p>
<p>11</p> 	<p><i>Escherichia coli,</i> <i>Salmonella spp,</i> <i>Shigella spp.</i></p>	<p>-----</p>

Tabla 1.- (Continuación). Antibióticos utilizados en el tratamiento de diarreas infecciosas provocadas por bacterias.

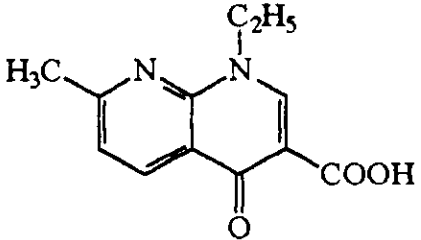
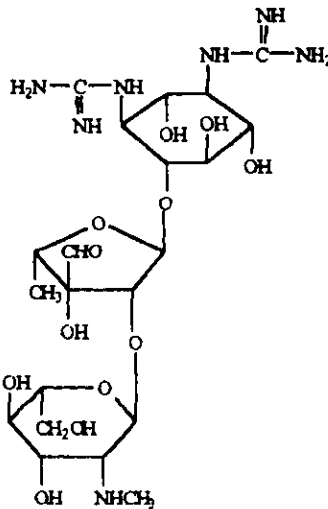
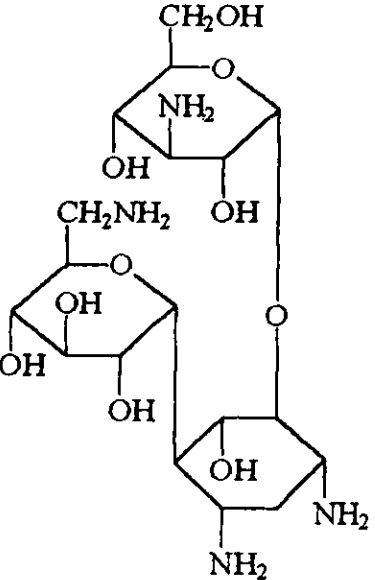
ESTRUCTURA	BACTERICIDA	BACTERIOSTATICO
<p>12</p>  <p>The structure shows a pyrimidine ring system with an ethyl group (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) at position 5, a methyl group (H<sub>3</sub>C) at position 2, a methyl group (H<sub>3</sub>C) at position 6, and a carboxylic acid group (COOH) at position 4. A carbonyl group (C=O) is attached to the ring at position 2.</p>	<p><i>Escherichia coli</i>, <i>Salmonella spp.</i></p>	<p>-----</p>
<p>13</p>  <p>The structure consists of a central β-D-glucopyranosamine ring with an N-ethyl group (NHCH<sub>3</sub>) at C2. It is linked via an O-glycosidic bond at C4 to a 2-deoxy-2-acetyl-β-D-glucopyranosyl ring. The latter is further linked via an O-glycosidic bond at C1 to a 2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl ring.</p>	<p><i>Escherichia coli.</i></p>	<p>-----</p>
<p>14</p>  <p>The structure consists of a central β-D-glucopyranosamine ring with an N-ethyl group (NHCH<sub>3</sub>) at C2. It is linked via an O-glycosidic bond at C4 to a 2-amino-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl ring. The latter is further linked via an O-glycosidic bond at C1 to a 2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl ring.</p>	<p><i>Escherichia coli</i>, <i>Salmonella spp.</i>, <i>Shigella spp.</i></p>	<p>-----</p>



Tabla 1.- (Continuación). Antibióticos utilizados en el tratamiento de diarreas infecciosas provocadas por bacterias.

	ESTRUCTURA	BACTERICIDA	BACTERIOSTATICO
15		-----	<i>Salmonella spp.</i>
16		<i>Salmonella spp,</i> <i>shigella spp, Klebsiella</i> <i>spp.</i>	-----
17		<i>Salmonella spp.</i>	-----
18		<i>Salmonella spp, S.</i> <i>typhi, Shigella spp, Sh.</i> <i>flexneri, Vibrio</i> <i>cholerae, Yersina</i> <i>enterolytica,</i> <i>Helicobacter jejuni.</i>	-----

Es de mencionar que el uso y abuso indiscriminado de los fármacos mencionados ha provocado la aparición de cepas resistentes de manera endémica o epidémica y efectos colaterales indeseables en la población: alérgias, aplásias a médula ósea, síndrome urémico-hemolítico, trastornos gastrointestinales, síndrome de Stevens-Johnson, vasculitis, fiebre, hepatotoxicidad, nefritis, reacción de Herxheimer, hematuria, neuritis, ototoxicidad, anemias, nefrotoxicidad, etc. (Kuschinky-Lullmann, 1975; Rivas, 1983; Rodríguez, 1984; S.S.A., 1984; U.N.A.M., 1984; Salas *et al.*, 1990; Calva *et al.*, 1993; S.S.A., 1993; Mosqueda-Galdos, 1994; Torres *et al.*, 1995).

En Japón se han aislado cepas de *Shigella* resistentes a estreptomicina, tetraciclinas, sulfonamidas y cloranfenicol. En Londres, Inglaterra, *Salmonella typhimurium* es resistente a sulfonamidas, estreptomicina, tetraciclinas, cloranfenicol, kanamicina y neomicina. En Vietnam, fue aislada *Salmonella typhi* multiresistente a estreptomicina, cloranfenicol, tetraciclina y sulfonamida. En Lima, Perú, *Salmonella typhi* es resistente a cloranfenicol, ampicilina, sulfonamida y trimetoprima. En Estados Unidos en infecciones de *Salmonella* hay un incremento de resistencia hacia los antimicrobianos: tetraciclina, estreptomicina, gentamicina, kanamicina, sulfisoxazol, trimetoprima-sulfametoxazol, ampicilina, cloranfenicol, cefalotina, nitrofurantoina, colistina y ácido nalidíxico. En Bangladesh, *Vibrio cholerae* es resistente a tetraciclina. En México, *Salmonella typhi* es resistente a cloranfenicol, ampicilina, *Escherichia coli* a trimetoprima y a trimetoprima-sulfametoxazol, *Shigella* a ampicilina y algunas cepas de *Vibrio cholerae* a tetraciclinas (Lepetit, 1973; Olarte-Galindo, 1973; Murray-Rensimer, 1983; Golstein *et al.*, 1986; Olarte, 1992; Calva *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1994; Torres *et al.*, 1995).

En la actualidad, ha resurgido notablemente el interés por los agentes antimicrobianos derivados de plantas. El uso de técnicas microbiológicas modernas ha permitido demostrar que los extractos de plantas superiores de diversos géneros y familias poseen una actividad significativa en contra de numerosas bacterias (Mitscher *et al.*, 1987; Farnsworth *et al.*, 1989; Hamburger-Hostettmann, 1991; Vanden-Vlietinck, 1991; Barrientos-Gutiérrez, 1994; Meckes *et al.*, 1995).

En este reciente interés por los agentes antimicrobianos de origen vegetal, la medicina tradicional ha desempeñado un papel muy importante como criterio para selección de plantas con principios antimicrobianos (Contreras-Mier, 1986; Mitscher *et al.*, 1987; Ríos *et al.*, 1988; Vanden-Vlietinck, 1991).

Los agentes antimicrobianos aislados de plantas superiores, la mayoría pertenecen a la clase de metabolitos secundarios que incluyen: alcaloides, cumarinas, cromonas, dihidrofenantrenos, flavonoides, quinonas, saponinas y terpenos entre otros (Mitscher *et al.*, 1987).

Para la obtención de compuestos a partir de plantas se cuenta con dos estrategias: estudios fitoquímicos convencionales y estudios fitoquímicos biodirigidos, siendo este último el más utilizado.

1. Estudios fitoquímicos convencionales: se aíslan y caracterizan los metabolitos de las plantas y posteriormente se someten a ensayos biológicos. Este método tiene la desventaja de que generalmente se aíslan los metabolitos que se encuentran en cantidades relativamente altas y no necesariamente son los responsables de la

actividad biológica. (Navarrete, 1987; Merfort-Wendisch, 1993 ; Hosokawa *et al.*, 1995; Toki *et al.*, 1995).

2. Estudios fitoquímicos biodirigidos: el aislamiento de los principios activos se realiza guiando el estudio de un ensayo biológico apropiado. Estos ensayos son específicos (Tabla 2) y tienen la ventaja de permitir el aislamiento de sustancias bioactivas, aún cuando estas se encuentran presentes en pequeñas cantidades y que de otra forma no pueden ser detectadas, además debe mencionarse que estos estudios son de carácter interdisciplinario donde participan químicos, biólogos y farmacólogos entre otros (Farnsworth, 1989; Hamburger-Hostettman, 1991; Calzada *et al.*, 1995; Cordell, 1995; Mata, 1996).

Tabla 2. Ensayos biológicos para determinar actividad antibiótica.

Tipo de ensayo	Tipo de sistema	Presunto efecto útil
Actividad antibacteriana	Cultivo bacteriano	Antibiótico
Inhibición de la biosíntesis de ácidos nucleicos	<i>In vitro</i> cultivo celular	Antibiótico
Inhibición de la biosíntesis de proteínas	<i>In vitro</i> cultivo celular	Antibiótico

Finalmente es de hacer notar que México debido a su situación ecológica altamente variable cuenta con una riqueza vegetal, existen más de 30,000 especies y se estima que al menos el 50% de ellas es utilizada para satisfacer alguna necesidad humana, entre las cuales, las plantas medicinales ocupan el principal porcentaje; por otro lado se tienen registradas un poco más de 3,200 como medicinales, de las cuales solo han sido estudiadas cerca del 5% para verificar científicamente su efecto farmacológico (Estrada, 1992).

Por lo antes expuesto es necesario continuar con la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos que sean más potentes, que no creen resistencia y efectos colaterales. En este sentido las plantas usadas en la medicina tradicional de México constituyen una alternativa, para el hallazgo de nuevos compuestos con propiedades antibacterianas y así coadyuvar a la solución de problemas de salud en el país.

## II.2. GENERALIDADES DE *HELIANTHEMUM GLOMERATUM* LAG.

### II.2.1. Nombres comunes y distribución.

*Helianthemum glomeratum* Lag. es una planta perteneciente a la familia de las Cistáceas a la que se le conoce con los nombres de cenicillo, cenicilla, chinilla, hierba del loro, tacato y tan vomol, (Figura 1) es una especie que es endémica de México y que se le puede encontrar en el Edo. México, Chiapas y Michoacán. En las prácticas médicas populares el té del tallo y hojas es usado contra diarreas infecciosas (Aguilar *et al.*, 1994).



Figura 1.- Ejemplar de herbario de *Helianthemum glomeratum* Lag.

## II.2.2. Composición química y actividad biológica.

Un estudio fitoquímico biodirigido de *Helianthemum glomeratum* Lag. (Calzada *et al.*, 1995), permitió el aislamiento de tres flavonoides: camperol 19, quercetina 20 y tilirósido 21.

En este trabajo se demostraron las propiedades antiprotozoarias de camperol y tilirósido en contra de *Entamoeba histolytica*.

Más recientemente se demostraron las propiedades antimicrobianas del extracto metanólico en contra de *S. aureus*, *Escherichia coli* y de fracciones polifenólicas contra las siguientes bacterias: *Shigella flexneri*, *Sh. boydii*, *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae inaba* y *V. cholerae ogawa* (Meckes *et al.*, 1995; Meckes *et al.*, 1997).

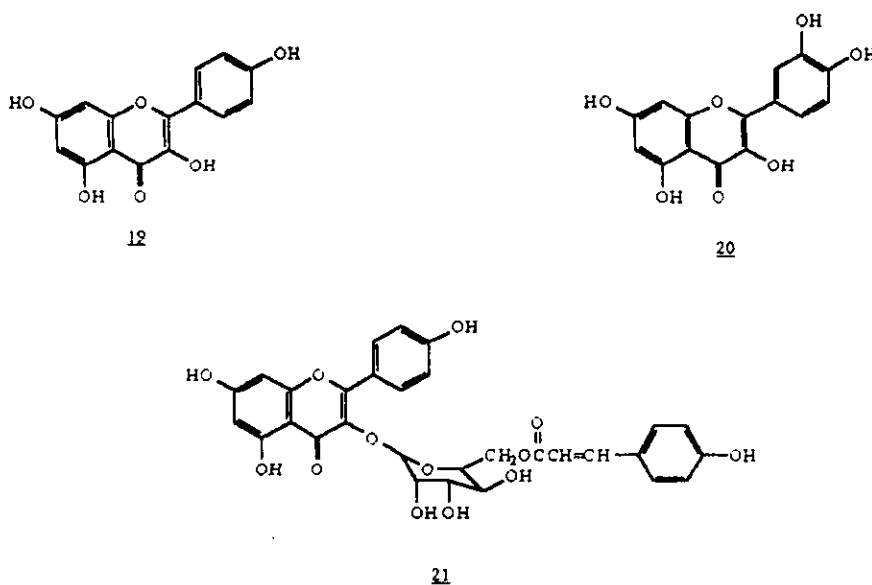


Figura 2.- Compuestos aislados previamente de *Helianthemum glomeratum* Lag.

### II.3. GENERALIDADES DE LAS PROANTOCIANIDINAS TIPO B

Considerando que el constituyente antimicrobiano de *Helianthemum glomeratum* Lag. aislado en este trabajo es una proantocianidina de tipo B, a continuación se darán algunos antecedentes de esta clase de compuestos.

Las proantocianidinas diméricas y poliméricas (taninos condensados) constituyen la segunda clase más abundante (después de los lignanos) de compuestos fenólicos naturales. El estudio de estos compuestos es esencialmente por su significancia biológica, protectores de la planta contra depredadores (insectos y herbívoros), por su utilidad como fármacos y conservadores de maderas (Steynberg *et al.*, 1995).

Las proantocianidinas son un grupo de compuestos fenólicos de la clase  $(C_6C_3C_6)_n$  que son biosintetizados a partir de una unidad flavan-3-ol (unidad iniciadora) 22 (Figura 3). Que forma un carbocatión en  $C_4$  que reacciona con el  $C_8$  o  $C_6$  de otra unidad flavan-3-ol ó flavan-3,4-diol (cadena terminal) 23 (Figura 3). En la Figura 4 se ilustra la biosíntesis de una proantocianidina tipo B (Czochanska *et al.*, 1980; Vennat *et al.*, 1987; Hemingway-Karchesy, 1989; Okuda *et al.*, 1990; Ferreira-Bekker, 1996).

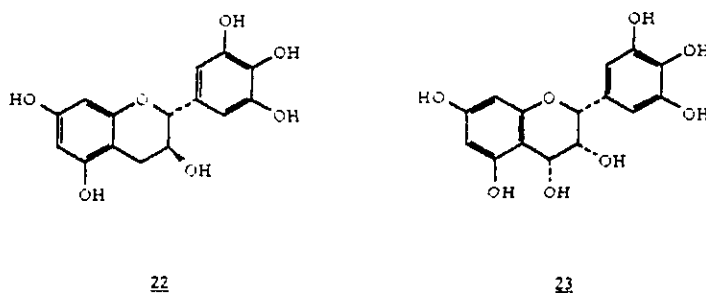
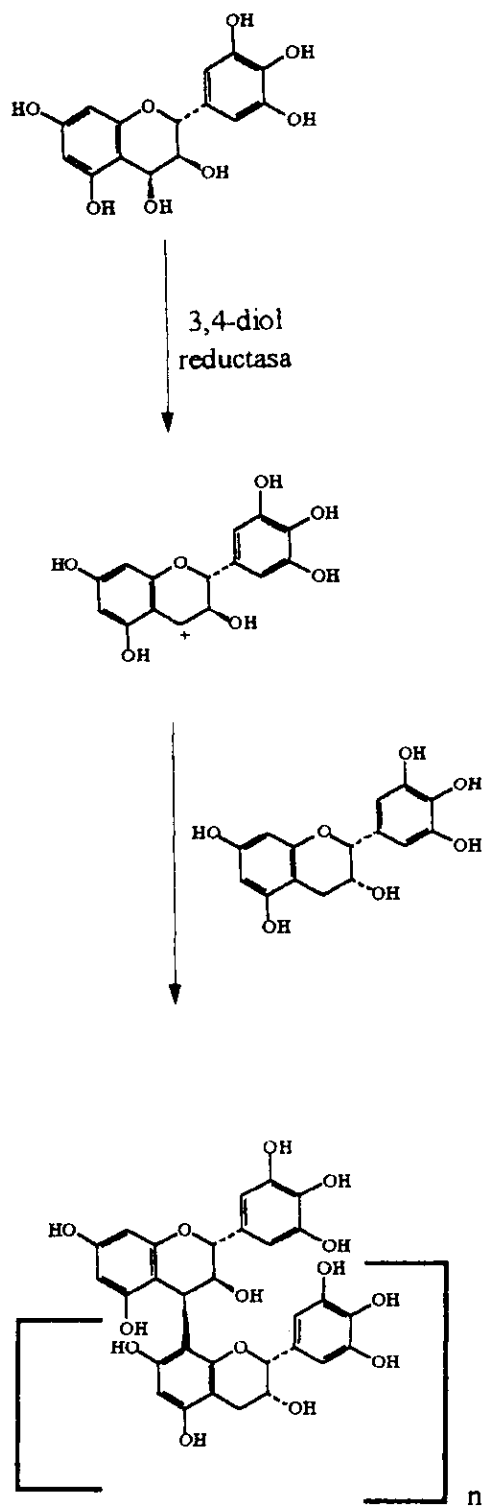


Figura 3.- Unidad flavan-3-ol 22 y unidad flavan-3,4-diol 23.





$n = 1, \dots, 18$

Figura 4.- Biosíntesis de las proantocianidinas tipo B

Desde el punto de vista estructural las proantocianidinas se pueden clasificar con base al flavan-3-ol ó unidad monomérica (ver Tabla 3). En la Tabla 4 se ilustran algunos ejemplos de proantocianidinas tipo B en base a su unidad flavan-3-ol.

Tabla 3.- Clasificación de las proantocianidinas con base a la unidad flavan-3-ol.

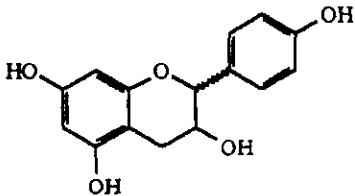
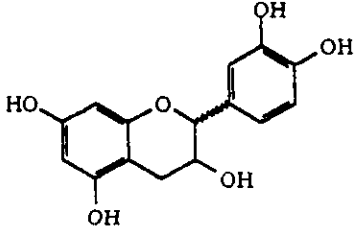
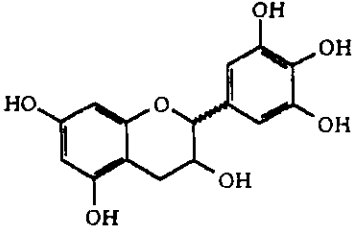
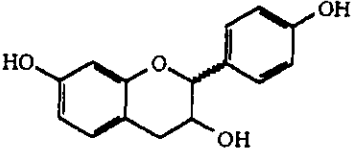
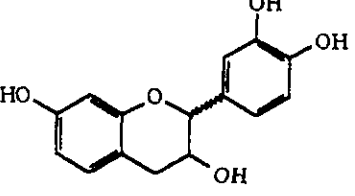
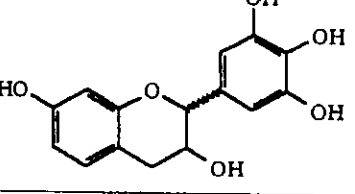
Clase	Tipo de hidroxilación	Compuesto
Propelargonidina (Epiáfzelequina)	3,4',5,7	
Procianidina (Catequina y epicatequina)	3,3',4',5,7	
Prodelfinidina (Galocatequina y epigalocatequina)	3,3',4',5,5',7	
Proguibourtinidina	3,4',7	
Profisetinidina (Fisetinidol)	3,3',4',7	
Prorobinetinidina (Robinetinidol)	3,3'.4'.5'.7	

Tabla 3.- (Continuación). Clasificación de las proantocianidinas con base a la unidad flavan-3-ol.

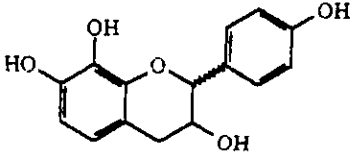
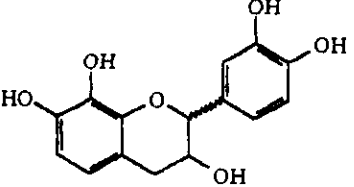
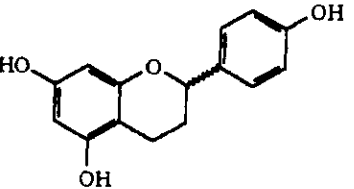
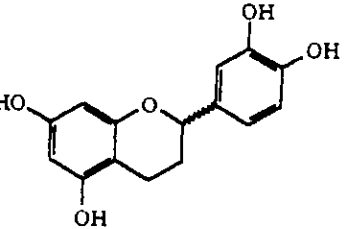
Clase	Tipo de hidroxilación	Compuesto
Proteracacidina (Epioritina)	3.4'.7.8	
Promelacacidina	3.3'.4'.7.8	
Proapigeninidina	4'.5.7	
Proluteolinidina	3'.4'.5.7	

Tabla 4. - Ejemplos de proantocianidinas tipo B con base a su unidad flavan-3-ol.

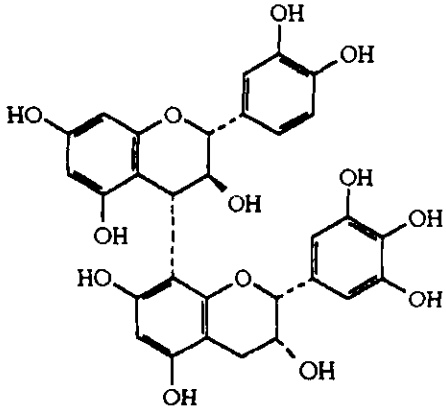
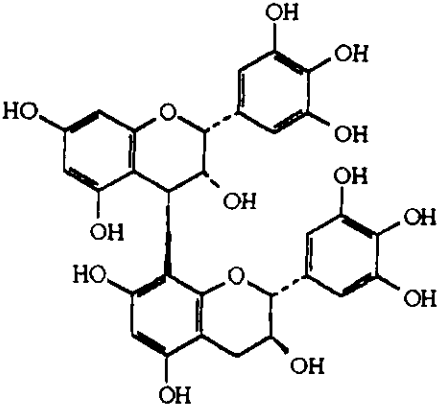
Clasificación	Nombre/Estructura
Procianidina	<p data-bbox="843 395 1310 426">Catequina-(4<math>\alpha</math>→8)-epigalocatequina</p> 
Prodelfinidina	<p data-bbox="843 951 1353 982">Epigalocatequina-(4<math>\beta</math>→8)-galocatequina</p> 

Tabla 4.- (Continuación). Ejemplos de proantocianidinas tipo B con base a su unidad flavan-3-ol.

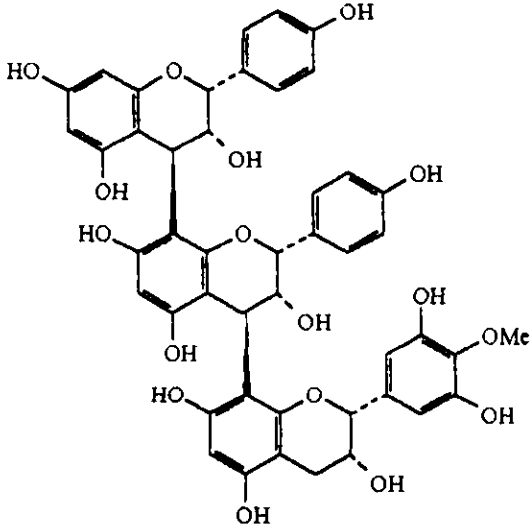
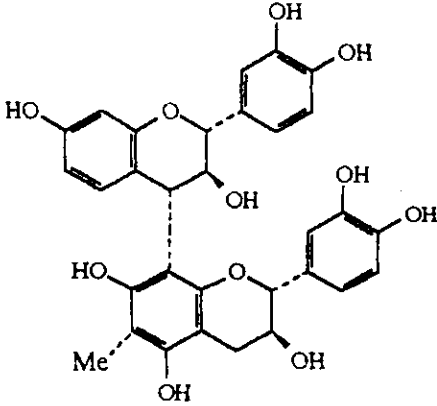
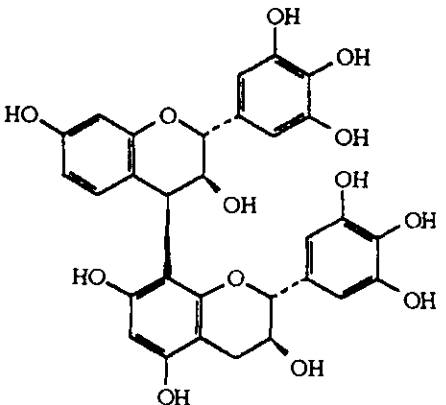
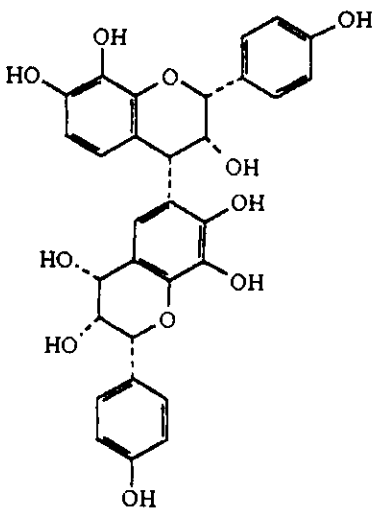
Clasificación	Nombre/Estructura
Propelargonidina	<p data-bbox="788 468 1287 499">Epiáfzelequina-(4<math>\beta</math>→8)-epiáfzelequina</p> <p data-bbox="788 544 1240 576">(4<math>\beta</math>→8)-4-O-metilepigalocatequina</p> 
Profisetinidina	<p data-bbox="788 1214 1255 1245">Fisetidinol-(4<math>\alpha</math>→8)-6-metilcatequina</p> 

Tabla 4.- (Continuación). Clasificación de las proantocianidinas con base a la unidad flavan-3-ol.

Clasificación	Nombre/Estructura
Prorobinetinidina	<p data-bbox="859 472 1329 513">Robinetinidol-(4<math>\beta</math>→8)-galocatequina</p> 
Proteracacinidina	<p data-bbox="859 1019 1329 1060">Epioritina-(4<math>\beta</math>→6)-epioritina-4<math>\alpha</math>-ol</p> 

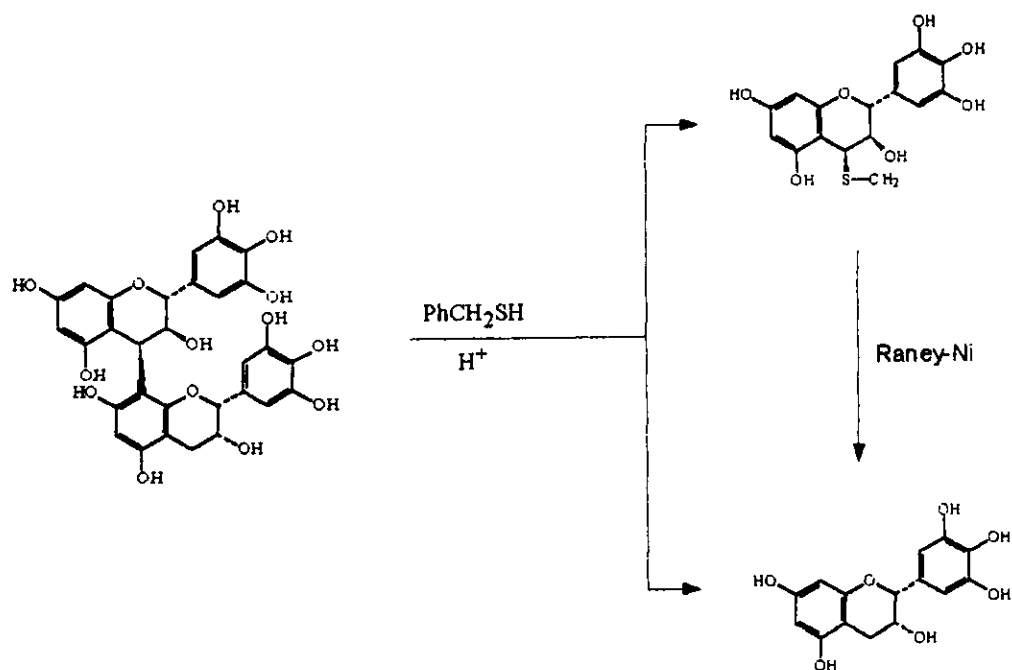
Las proantocianidinas tipo B se encuentran ampliamente distribuidas en las familias: Geraniaceae, Rubiaceae, Rosaceae, Leguminosae, Castañaceae y Mextaceae (Okuda, *et al.*, 1990; Ferreira-Bekker, 1996).

Las proantocianidinas tipo B son compuestos polares, inestables y sensitivos al calor, por lo que su extracción a partir del material vegetal, se hace a temperaturas bajas y generalmente se emplea una mezcla de acetona-agua (7:3) como disolvente de extracción (Foo-Porter, 1978; Czochanska, *et al.*, 1980; Foo-Porter, 1980; Danne, *et al.*, 1994; McMurrugh-Madigan, 1996)

Para su fraccionamiento y purificación se emplean métodos de reparto, cromatografía en contra corriente y cromatografía en columna, en ambos casos se emplean como soportes: Toyopearl HW-40, MCI-gel CHP-20 P y Sephadex LH-20. También se usa CLAP preparativa con columnas RP18 (Foo-Karchesy, 1989; Scholz-Rimpler, 1989; Yoshida, *et al.*, 1989; Okuda, *et al.*, 1990; Foo-Karchesy, 1991; Lee, *et al.*, 1992; Danne, *et al.*, 1994; Bae, *et al.*, 1994; De Mello, *et al.*, 1996; Ferreira-Bekker, 1996).

Para su identificación y caracterización estructural se emplean métodos espectroscópicos (I.R, RMNP, RMN<sup>13</sup>C y sus modalidades COSY, DEPT, HETCOR NOESY, etc), espectrométricos (EM-FAB y EM-Electro spray), en conjunto con reacciones químicas (acetilación, metilación, tiolización y formación de aductos de fluoroglucinol). En la figura 5 se ilustran estas reacciones (Czochanska, *et al.*, 1980; Foo, 1981; Newman, *et al.*, 1987; Ferreira, *et al.*, 1992; Koupai-Abyazani-Bohm, 1993; Helsper, *et al.*, 1993; Pallensbach, *et al.*, 1993; Balas-Vercauteren, 1994; Steynberg, *et al.*, 1995; Balas-Vercauteren, 1995; Ferreira-Bekker, 1996; Matthews, *et al.*, 1997).

## Reacción de tiolización



## Reacción de acetilación

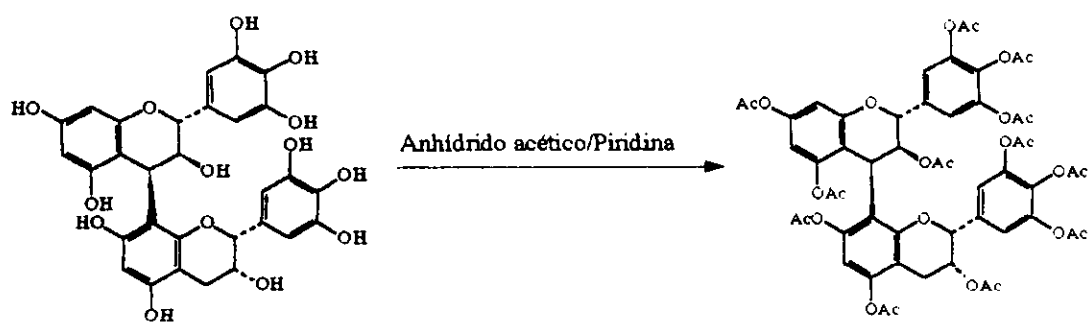
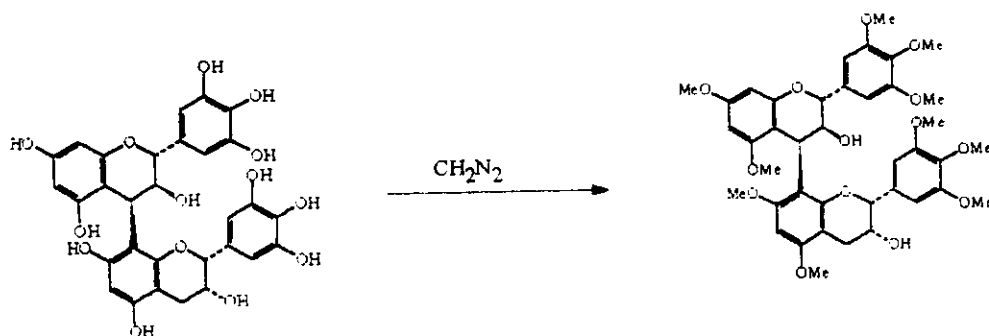


Figura 5- Principales reacciones empleadas para identificar proantocianidinas tipo B



## Reacción de metilación



## Reacción con fluoroglucinol

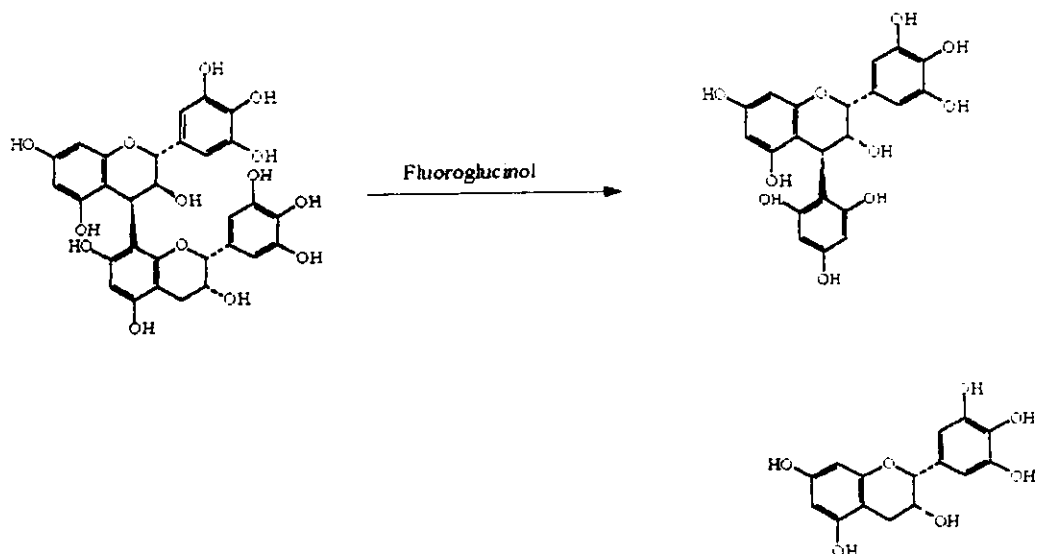


Figura 5.- (Continuación). Principales reacciones empleadas para identificar proantocianidinas tipo B.

Desde el punto de vista biológico diversas proantocianidinas tipo B poseen propiedades antiinflamatorias, inmunoestimulantes, antivirales, antimicrobianas, inhibidoras de la proteína cinasa y de la tripsina, antihelmínticas, antialérgicas, antidiarreicas y antihipertensivas (ver Tabla 5) (Kiuchi, *et al.*, 1988; Okuda, *et al.*, 1989; Scholz-Rimpler, 1989; Pallenbach, *et al.*, 1993; Polya-Foo, 1994; De Mello, *et al.*, 1996).

Tabla 5.- Proantocianidinas tipo B y su actividad biológica.

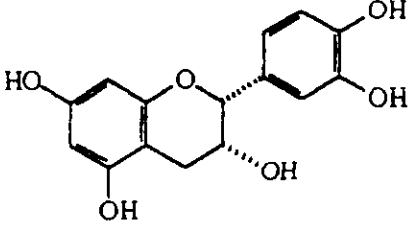
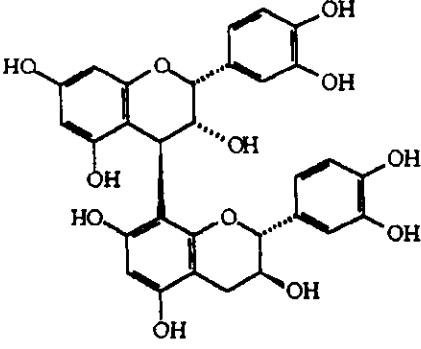
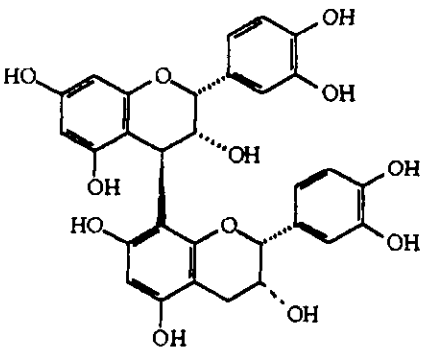
ESTRUCTURA	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIA
<p data-bbox="169 375 318 406">Epicatequina</p> 	<p data-bbox="631 375 895 406">Inhibición de la tripsina</p> <p data-bbox="631 437 733 468">Antiviral</p> <p data-bbox="631 499 1063 592">Actividad antiinflamatoria y actividad antialérgica</p>	<p data-bbox="1078 375 1306 406">Helspert <i>et al.</i>, 1993</p> <p data-bbox="1078 426 1298 457">Takechi <i>et al.</i>, 1985</p> <p data-bbox="1078 499 1313 592">Kakegawa <i>et al.</i>, 1985</p>
<p data-bbox="169 731 232 762">PB-1</p> 	<p data-bbox="631 731 801 762">Antihelmíntica</p>	<p data-bbox="1078 731 1306 762">Kiuchi F <i>et al.</i>, 1989</p>
<p data-bbox="169 1203 232 1234">PB-2</p> 	<p data-bbox="631 1203 801 1234">Antihelmíntica</p> <p data-bbox="631 1265 981 1297">Inhibidora de la proteína cinasa</p> <p data-bbox="631 1328 942 1359">Inhibidor del receptor 5HT1</p> <p data-bbox="631 1390 733 1421">Antiviral</p> <p data-bbox="631 1452 1063 1545">Actividad antiinflamatoria y actividad antialérgica</p>	<p data-bbox="1078 1203 1306 1234">Kiuchi F <i>et al.</i>, 1989</p> <p data-bbox="1078 1255 1266 1286">Polya-Foo, 1994</p> <p data-bbox="1078 1328 1306 1359">Min Zhu <i>et al.</i>, 1997</p> <p data-bbox="1078 1390 1298 1421">Takechi <i>et al.</i>, 1985</p> <p data-bbox="1078 1452 1313 1545">Kakegawa <i>et al.</i>, 1985</p>

Tabla 5.- (Continuación). Proantocianidinas tipo B y su actividad biológica.

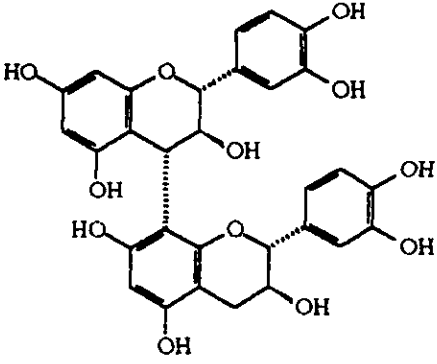
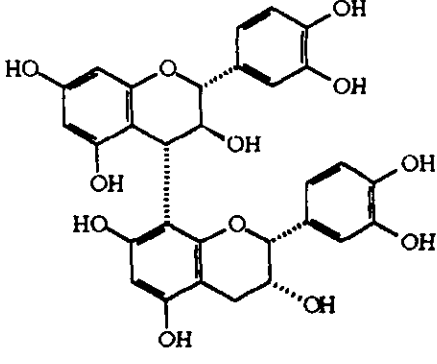
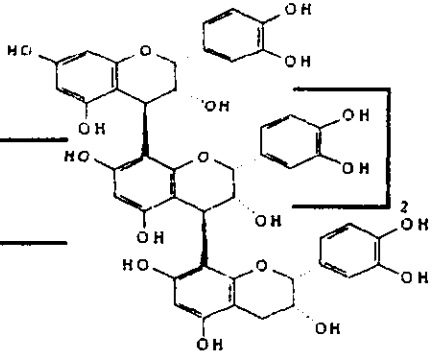
ESTRUCTURA	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIA
<p>PB-3</p> 	<p>Antihelmíntica</p> <p>Inhibición de la tripsina</p> <p>Inhibidor del receptor 5HT1</p>	<p>Kiuchi F <i>et al.</i>, 1989</p> <p>Helspert <i>et al.</i>, 1993</p> <p>Min Zhu <i>et al.</i>, 1997</p>
<p>PB-4</p> 	<p>Inhibición de la tripsina</p> <p>Inhibidor del <math>\alpha 1</math>-adrenoreceptor</p> <p>Inhibidor del <math>\alpha 2</math>-adrenoreceptor</p> <p>Inhibidor del receptor 5HT1</p>	<p>Helspert <i>et al.</i>, 1993</p> <p>Min Zhu <i>et al.</i>, 1997</p>
<p>Epicatequina-(4<math>\beta</math>→8) (epicatequina(4<math>\beta</math>→8))<sub>2</sub> - epicatequina</p> 	<p>Inhibidora de la proteína cinasa</p>	<p>Polya-Foo, 1994</p>

Tabla 5.- (Continuación). Proantocianidinas tipo B y su actividad biológica.

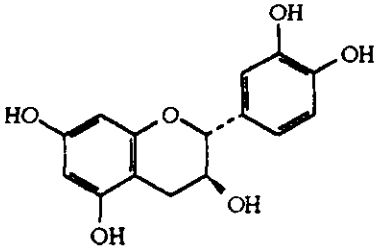
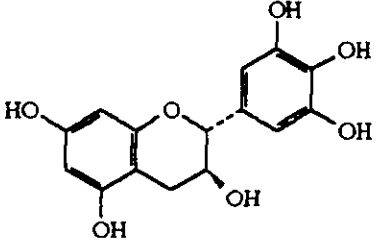
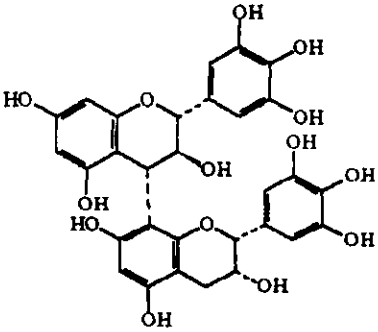
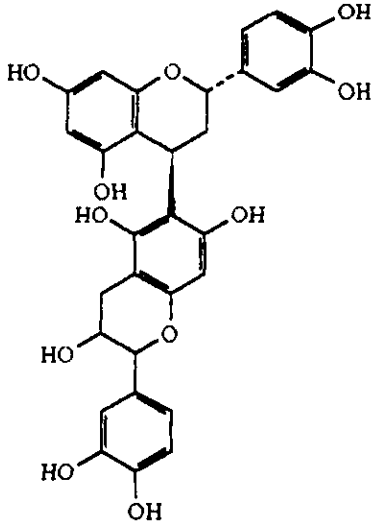
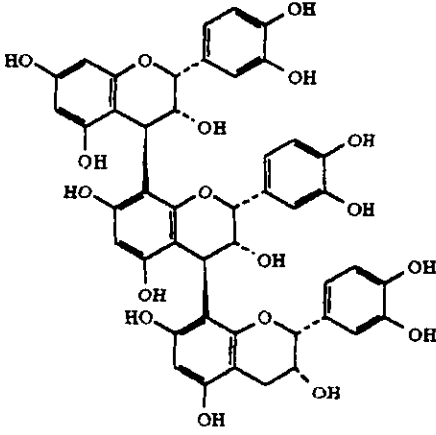
ESTRUCTURA	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIA
<p data-bbox="174 348 290 379">Catequina</p> 	<p data-bbox="652 348 1058 379">Incrementa ligeramente la fagocitosis</p> <p data-bbox="652 410 1110 503">Actividad antiinflamatoria y actividad antialérgica</p>	<p data-bbox="1127 348 1364 379">Scholz-Rimpler, 1989</p> <p data-bbox="1127 410 1364 441">Kakegawa <i>et al.</i>, 1985</p>
<p data-bbox="174 731 337 762">Galocatequina</p> 	<p data-bbox="652 731 812 762">Antibacteriana</p>	<p data-bbox="1127 731 1270 762">Hemingway-</p> <p data-bbox="1127 793 1293 824">Karchesy, 1989</p>
<p data-bbox="174 1104 624 1135">Galocatequina-(4<math>\alpha</math>→8)-epigallocatequina</p> 	<p data-bbox="652 1104 909 1135">Inhibición de la tripsina</p>	<p data-bbox="1127 1104 1340 1135">Helsper <i>et al.</i>, 1993</p>

Tabla 5.- (Continuación). Proantocianidinas tipo B y su actividad biológica.

ESTRUCTURA	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIA
<p>PB-7</p> 	Antihelmíntica	Kiuchi F <i>et al.</i> , 1989
<p>Epicatequina-(4<math>\beta</math>→8)-(epicatequina(4<math>\beta</math>→8))-epicatequina</p> 	Inhibidora de la proteína cinasa	Polya-Foo, 1994

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México las diarreas infecciosas causadas por bacterias son un problema de salud en la población menor de cinco años.

Por otro lado se ha demostrado que el uso y abuso de los antibióticos ha provocado resistencia bacteriana y tiene efectos colaterales indeseables.

El *Helianthemum glomeratum* Lag. es una especie medicinal a la que se le ha demostrado propiedades antibacterianas y cuyos principios activos antimicrobianos no han sido aislados.

Por lo que puede ser una fuente potencial de agentes antibacterianos.

Por lo antes expuesto es necesario realizar la investigación química y biológica de esta Cistácea para aislar los compuestos con propiedades antimicrobianas. Este estudio es más relevante si se considera la urgente necesidad de encontrar nuevos agentes antimicrobianos que sean más potentes, que no induzcan resistencia bacteriana y que no presenten efectos secundarios en el tratamiento de diarreas infecciosas.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1. OBJETIVO GENERAL.

Aislar los compuestos con actividad antimicrobiana de las partes aéreas de *Helianthemum glomeratum* Lag.

### IV.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

Con el propósito de satisfacer al objetivo general planteado se propone los siguientes objetivos específicos

- 2.1 Recopilar la información bótica, química, etnobotánica y farmacológica de *Helianthemum glomeratum* Lag.
- 2.2 Efectuar las operaciones preliminares (secado, molienda, etc.), propias a la preparación del extracto metanólico.
- 2.3 Preparar el extracto metanólico de acuerdo a la metodología descrita por Meckes y cols. (Meckes *et al.*, 1995).
- 2.4 Realizar la evaluación confirmatoria de la actividad potencial antimicrobiana del extracto metanólico.

- 2.5 Fraccionar el extracto metanólico, mediante métodos fitoquímicos apropiados (CCA y/o métodos de reparto). Y usar como guía biológica la determinación de la actividad antimicrobiana in vitro, contra las enterobacterias: *Escherichia coli* ATCC, *E. coli* LT<sup>+</sup>/ST<sup>-</sup>, *Salmonella gpo B<sub>1</sub>*, *S. gpo B<sub>2</sub>*, *S. gpo D*, *S. tiphy*, *Vibrio cholerae ogawa*, *V. cholerae inaba*, *V. parahaemolyticus*, *Shigella flexneri T<sub>2</sub>*, *Sh. sonnei*, *Sh dysenteriae T<sub>3</sub>*, durante todo el proceso fitoquímico biodirigido.
- 2.6 Separar y purificar los constituyentes de la fracción activa F<sub>4</sub> obtenida en el proceso de reparto del extracto metanólico, mediante métodos fitoquímicos apropiados ( CLAP, CCF preparativa y/o reparto).
- 2.7 Determinar la actividad antimicrobiana de cada compuesto aislado de la fracción activa F<sub>4</sub>.
- 2.8 Identificar mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos los compuestos antimicrobianos aislados.

## V. HIPOTESIS

EL EXTRACTO METANOLICO DE *Helianthemum glomeratum* Lag. CONTIENE COMPUESTOS CON PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS. EN CONTRA DE *Escherichia coli* ATCC, *E. coli* LT<sup>+</sup>/ST<sup>-</sup>, *Salmonella gpo B<sub>1</sub>*, *S. gpo B<sub>2</sub>*, *S. gpo D*, *S. tiphy*, *Vibrio cholerae ogawa*, *V. cholerae inaba*, *V. parahaemolyticus*, *Shigella flexneri T<sub>2</sub>*, *Sh. sonnei*, *Sh dysenteriae T<sub>3</sub>*, QUE PUEDEN SER AISADOS MEDIANTE UN METODO FITOQUIMICO BODIRIGIDO.



- 2.5 Fraccionar el extracto metanólico, mediante métodos fitoquímicos apropiados (CCA y/o métodos de reparto). Y usar como guía biológica la determinación de la actividad antimicrobiana in vitro, contra las enterobacterias: *Escherichia coli* ATCC, *E. coli* LT<sup>+</sup>/ST<sup>-</sup>, *Salmonella gpo B<sub>1</sub>*, *S. gpo B<sub>2</sub>*, *S. gpo D*, *S. tiphy*, *Vibrio cholerae ogawa*, *V. cholerae inaba*, *V. parahaemolyticus*, *Shigella flexneri T<sub>2</sub>*, *Sh. sonnei*, *Sh dysenteriae T<sub>3</sub>*, durante todo el proceso fitoquímico biodirigido.
- 2.6 Separar y purificar los constituyentes de la fracción activa F<sub>4</sub> obtenida en el proceso de reparto del extracto metanólico, mediante métodos fitoquímicos apropiados ( CLAP, CCF preparativa y/o reparto).
- 2.7 Determinar la actividad antimicrobiana de cada compuesto aislado de la fracción activa F<sub>4</sub>.
- 2.8 Identificar mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos los compuestos antimicrobianos aislados.

## V. HIPOTESIS

EL EXTRACTO METANOLICO DE *Helianthemum glomeratum* Lag. CONTIENE COMPUESTOS CON PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS. EN CONTRA DE *Escherichia coli* ATCC, *E. coli* LT<sup>+</sup>/ST<sup>-</sup>, *Salmonella gpo B<sub>1</sub>*, *S. gpo B<sub>2</sub>*, *S. gpo D*, *S. tiphy*, *Vibrio cholerae ogawa*, *V. cholerae inaba*, *V. parahaemolyticus*, *Shigella flexneri T<sub>2</sub>*, *Sh. sonnei*, *Sh dysenteriae T<sub>3</sub>*, QUE PUEDEN SER AISADOS MEDIANTE UN METODO FITOQUIMICO BODIRIGIDO.

## VI. PARTE EXPERIMENTAL

### VI.1. Materiales, reactivos, equipos y bacterias.

#### MATERIAL :

- Columnas de vidrio para cromatografía
- en columna abierta ( CCA ).
- Soportes universales.
- Pinzas de 3 dedos.
- Refrigerante.
- Matraz elermeyer de dif. capacidades.
- Matraz balón de dif. capacidades.
- Pipeta graduada de dif. capacidades.
- Probeta de dif. capacidades.
- Cajas petri.
- Fracos viales de 5 y 10 ml.
- Placas para CCF de sílica gel, celulosa y alúmina neutra.
- Sephadex LH-20
- Sílica gel.
- Columna Merk 50943.
- Columna Lichrocart 125-4.

#### REACTIVOS:

- Sulfato cérico amoniacal.
  - Tricloruro de aluminio.
  - Vainillina.
  - Agua destilada.
  - Agua desionizada.\*
  - C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>.
  - MeOH.\*
  - MeOH.
  - Me<sub>2</sub>CO.
  - CHCl<sub>3</sub>.
  - HCOOH.
  - AcOEt.
  - Agar Mueller-Hinton
- Todos los solventes empleados
- \* son grado CLAP
- y Merck.

-Columna Lichrospher 100 RP-18 (5 mm).

#### EQUIPOS:

-Bomba para vacío Büchi B-160 y B-171.

-Rotavapor Büchi B-480 y 461.

-Cromatógrafo de líquidos de alta presión (Perkin-Elmer Binary. Bomba 250 y Detector Array 235).

-Equipo de Fisher Johns.

-Espectrómetro analítico (Varian XR-300).

-Espectrofotómetro (Perkin-Elmer 283-B).

-Espectrómetro de masas (HP 5985-B).

#### BACTERIAS:

-*Escherichia coli* ATCC, *E. coli* LT<sup>+</sup>/ST<sup>-</sup>.

-*Salmonella gpo B<sub>1</sub>*, *S. gpo B<sub>2</sub>*, *S. gpo D*, *S. tify*.

-*Vibrio cholerae ogawa*, *V. cholerae inaba*, *V. parahaemolyticus*.

-*Shigella flexneri T<sub>2</sub>*, *Sh. sonnei*, *Sh dysenteriae T<sub>3</sub>*,

## VI.2. METODOS

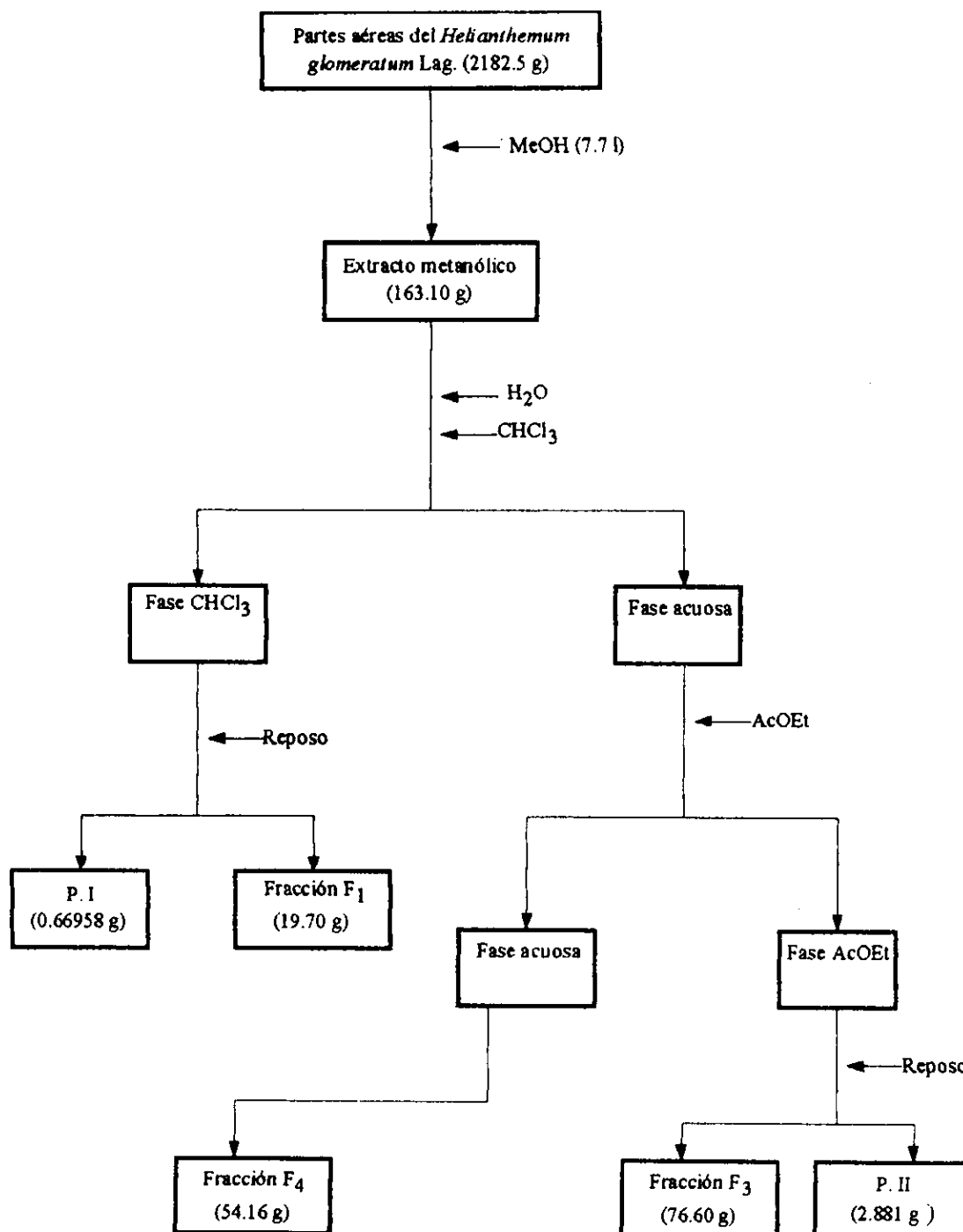
### VI.2.1. Material vegetal y extracción.

El material vegetal colectado en el estado de Querétaro (2182.5 g) seco y molido, se extrajo exhaustivamente vía maceración con 7.7 l de MeOH (Merck) en periodos de 72 hrs., eliminándose el disolvente por destilación a presión reducida. Obteniéndose 178.10 g de extracto metanólico.

### VI.2.2. Fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico.

Una parte del extracto metanólico (163.10 g), se disolvió con una mezcla de 283 ml de MeOH y 932 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada y posteriormente se fraccionó mediante repartos sucesivos con CHCl<sub>3</sub> (600 ml x 5 veces F<sub>1</sub>) y AcOEt (900 ml x 3 veces F<sub>3</sub>). De la F<sub>1</sub> y F<sub>3</sub> precipitaron de manera espontánea P I, P II respectivamente. (Esquema 1).

A las fracciones y precipitados obtenidos se les determinó la actividad antimicrobiana, como la fracción F4 presentó la mayor actividad (Tabla 6) se decidió separarla en sus constituyentes individuales.



Esquema 1.- Diagrama de extracción y fraccionamiento del extracto metanólico de las partes aéreas de *Helianthemum glomeratum* lag.

Tabla 6.- Resultados de actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas en el reparto del extracto metanólico.

Muestra	Htg	F <sub>1</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	P. I	P. II
Bacterias	CIM (mg/ml)					
<i>Salmonella gpo B</i>	> 20	> 20	> 20	5	>25	>25
<i>Salmonella typhi</i>	> 20	5	> 20	5	>25	>25
<i>Escherichia coli</i> ATCC	> 20	> 20	> 20	20	>25	>25
<i>Escherichia coli</i> LT <sup>+</sup> /ST <sup>-</sup>	2.5	> 20	> 20	2.5	>25	3
<i>Shigella flexneri</i> T <sub>2</sub>	10	2.5	> 20	2.5	>25	3
<i>Shigella sonnei</i>	> 20	> 20	> 20	> 20	>25	>25
<i>Vibrio cholerae inaba</i>	> 20	> 20	> 20	20	>25	>25
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	> 20	> 20	20	20	>25	>25

### VI.2.2.1 Análisis cromatográficos.

Los análisis en capa fina se realizaron en placas de sílica (DC-Fertigplatten Kiesegel 60), placas de celulosa (DC-Alufolien 25) y placas de alúmina (DC-plastifolien Aluminiumoxido 60). Usando varios sistemas de eluyentes y diferentes agentes cromogénicos los cuales se encuentran resumidos en la tabla 7 y 8.

Tabla 7.- Sistemas de eluyentes utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

SISTEMA DE ELUYENTES	COMPOSICION	PROPORCION
I	AcOEt:HCOOH:CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH:H <sub>2</sub> O	100:11:11:27
II	CHCl <sub>3</sub> :MeOH:H <sub>2</sub> O	62:31.5:6.5
III	t-butanol:MeOH: CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH: HCOOH:H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	7:7:0.1:0.2:1.2
IV	AcOEt: HCOOH: CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH:H <sub>2</sub> O <sup>2</sup>	14:0.2:0.1:5.9
V	CHCl <sub>3</sub> :MeOH	8:2
VI	n-butanol: CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH:H <sub>2</sub> O	4:1:1
VII	AcOEt:MeOH:H <sub>2</sub> O	7:2:1

<sup>1</sup> Wagner-Zgainski. 1984.

<sup>2</sup> Agitar y utilizar la parte superior.

Tabla 7.- (Continuación) Sistemas de eluyentes utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

VIII	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt: HCOOH	3:6:1
IX	t-butanol:CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH:H <sub>2</sub> O	3:1:1
X	n-butanol:CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH:H <sub>2</sub> O	40:10:20
XI	Iso-butanol:CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH:H <sub>2</sub> O	3:1:1
XII	CHCl <sub>3</sub> :MeOH	9:1
XIII	AcOEt:Acetona	50:50

Tabla 8.- Agentes cromogénicos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

AGENTES CROMOGENICOS*		
REACTIVO	COMPOSICION	REFERENCIA
Sulfato cérico A	12 g. sulfato cérico 22.2 ml. ac. sulfúrico conc. 350 g. hielo	Stahl, 1969
Tricloruro de aluminio B	Solucion 5% de tricloruro de aluminio	Markham, 1982
Vainillina- ac. sulfúrico C	5% ac. sulfúrico etanólico 1% vainillina etanólica	Wagner <i>et al.</i> , 1984

\*En todos los casos antes de revelar con el agente cromogénico se procedió a visualizar las placas con luz UV de una lámpara modelo UV GL-58 a longitudes de onda de 254 y 365 nm.



El análisis por CLAP se realizó en un equipo Perkin Elmer Binary con varias columnas (Merk 50943, Lichrospher 100 RP-18 (5  $\mu\text{m}$ ), La fase móvil fue ácido fórmico al 5% en agua y metanol al 100% (isocráticamente).

### VI.3. EVALUACION BIOLOGICA

VI.3.1. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro contra agentes causantes de diarrea aguda.

La determinación de la actividad antimicrobiana in vitro del extracto(s), fracción(es) combinada(s) y compuesto(s) puro(s), se hizo en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI. De acuerdo a la técnica de Woos y Washington (Murray, 1995).

Las cepas utilizadas en el ensayo fueron: *Escherichia coli* ATCC, *E. coli* LT<sup>+</sup>/ST<sup>-</sup>, *Salmonella gpo B*<sub>1</sub>, *S. gpo B*<sub>2</sub>, *S. gpo D*, *S. tiphy*, *Vibrio cholerae* ogawa, *V. cholerae* inaba, *V. parahaemolyticus*, *Shigella flexneri* T<sub>2</sub>, *Sh. sonnei*, *Sh dysenteriae* T<sub>3</sub>.

La preparación del inóculo se hizo en un medio líquido de Mueller-Hinton el cual se ajustó a una concentración de 0.5 McFarland transmitancia equivalente a un inóculo de  $150 \times 10^6$  colonias (Murray, 1995).

Las muestras se disolvieron en el disolvente apropiado (DMSO, acetona-agua 7:3) se ajustaron con el medio de cultivo a las concentraciones de 20-0.125 mg/ml y se adicionaron a cajas petri que contenían 10 ml del medio.

### VI.3.2. Bioensayo

A las cajas anteriormente preparadas se les adicionó el inóculo de prueba, se incubaron a 35 °C durante 48 Hrs. y se determinó la CIM. Se emplearon como testigos positivos *ampicilina*, *carbenicilina* y *amikacina*.

## VI.4 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS COMPUESTOS 21, 24 Y 25.

### VI.4.1. Aislamiento y purificación del tilirósido 21.

El precipitado II, obtenido en el proceso de reparto del extracto metanólico con acetato de etilo (ver esquema 1). De esta fase cristalizó de manera espontánea el compuesto 21, como un sólido de color amarillo limón.

### VI.4.2. Aislamiento, purificación $\beta$ -D-gluco- $\beta$ -sitosterol 24.

600 mg del precipitado inactivo I, obtenido en el proceso de reparto del extracto metanólico con cloroformo (ver esquema 1). Se purificó mediante una cromatografía en columna abierta (78 x 2.5 cm), utilizando como soporte 228.5 g de sílica gel (0.063-0.200 mm Merck) y como eluyentes acetato de etilo, metanol y acetona en diferentes proporciones. Obteniéndose un total de 468 fracciones de 50 ml c/u, las que se concentraron a presión reducida, cada fracción fue analizada en CCF, combinándose aquellas que son similares en cuanto a su  $r_f$ , lo que dio por resultado la obtención de 15 fracciones combinadas. A partir de las fracciones combinadas (13-43) y (84-160), eluidas con AcOEt 100%, AcOEt-acetona 95:5, 90:10 y 85:15. Cristalizó de manera espontánea el compuesto 24, como un sólido de color blanquecino.

### VI.4.3. Aislamiento y purificación del compuesto 25.

La fracción F<sub>4</sub>, obtenido en el proceso de reparto del extracto metanólico agua (ver esquema 1). Se purificó mediante dos técnicas: a) precipitación con MeOH y b) cromatografía en columna abierta.

- a) La fase F<sub>4</sub> (2 g) se disolvió con 40 ml de H<sub>2</sub>O y posteriormente se precipitó con 4 ml de MeOH, al compuesto 25, la fase acuosa remanente se extrajo con C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> (40 ml x 3 veces, F<sub>4-1</sub>) y AcOEt (40 ml x 3 veces, F<sub>4-2</sub>). El precipitado obtenido (P. III). se recrystalizó con una mezcla de Me<sub>2</sub>CO:MeOH 1:1 Oteniendose el compuesto 25 como un sólido rojizo. El compuesto 25 y las fracciones obtenidas se evaluaron con la prueba biológica y los resultados se presenta en la Tabla 9.

Tabla 9.- Resultados de la actividad antibacteriana del precipitado III (compuesto 25) y fracciones F<sub>4-1</sub> y F<sub>4-2</sub>.

Muestra	P. III	Acuoso	F <sub>4-1</sub>	F <sub>4-2</sub>
Bacterias	CIM (mg/ml)			
<i>Salmonella gpo B<sub>1</sub></i>	0.2	>2.11	>0.5	>1
<i>Salmonella typhi</i>	0.2	>2.11	>0.5	>1
<i>Salmonella B<sub>2</sub></i>	0.2	>2.11	>0.5	>1
<i>Salmonella D</i>	0.2	>2.11	>0.5	>1
<i>Shigella dysenteriae T<sub>3</sub></i>	0.2	2.11	>0.5	1
<i>Shigella flexneri T<sub>2</sub></i>	0.125	2.11	>0.5	1
<i>Vibrio cholerae inaba</i>	0.2	>2.11	>0.5	>1
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.125	2.11	>0.5	1

= no se evaluó

b) Purificación de la fracción F<sub>4</sub> mediante cromatografía en columna abierta.

7.0 g. de la fracción bioactiva F<sub>4</sub>, se purificó por cromatografía en columna abierta utilizando como soporte 100 g de sephadex LH-20. El proceso de elución se realizó utilizando como disolventes metanol, acetona y agua en diferentes proporciones. De este fraccionamiento se obtuvieron un total de 320 fracciones de 20 ml c/u, las que se concentraron a presión reducida, cada fracción fue analizada en CCF y CLAP, combinándose aquellas que fueron similares en cuanto a su cromatograma, permitiendo la obtención de 10 fracciones combinadas. Así mismo cada una de estas fracciones fueron evaluadas biológicamente para determinar su actividad antimicrobiana. En la (Tabla 10 y 11), se resumen los sistemas de eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con cada uno de ellos, las fracciones combinadas y los resultados obtenidos en la prueba biológica. De la fracción f-10 se aislo el compuesto 25 como un sólido rojizo.

Tabla 10.- Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna abierta de la fracción F<sub>4</sub>.

Eluyente	Proporción %	Número de fracciones	Fracciones combinadas
MeOH	100	1-60	f-1 (1-24)
			f-2 (25-31)
			f-3 (32-40)
			f-4 (41-54)
MeOH:H <sub>2</sub> O	90:10	61-120	f-5 (55-111)
			f-6 (112-126)

Tabla 10.- (Continuación). Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna abierta de la fracción F<sub>4</sub>.

Eluyente	Proporción %	Número de fracciones	Fracciones combinadas
MeOH:H <sub>2</sub> O	80:20	121-150	f-7 (127-140)
MeOH:H <sub>2</sub> O	50:50	151-185	f-8 (141-173)
Me <sub>2</sub> CO:H <sub>2</sub> O	7:3	186-303	f-9 (174-195) f-10 (196-320)
H <sub>2</sub> O	100	304-320	

Tabla 11.- Resultados de la actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas del fraccionamiento en CCA de la fracción F<sub>4</sub>.

Muestra	f-1	f-2	f-3	f-4	f-5	f-6	f-7	f-8	f-9	f-10	a	b	c
Bacteria	CIM (mg/ml)												
1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	**	>1	0.2	-	-	-
2	>1	1	1	1	>1	>1	>1	**	>1	0.2	0.008	0.064	0.008
3	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	**	>1	0.2	0.008	0.032	0.004
4	>1	0.5	0.5	0.5	>1	>1	>1	**	>1	0.2	-	-	-
5	>1	>1	>1	>1	0.5	1	0.5	**	0.5	0.125	0.008	0.064	0.008
6	>1	>1	0.25	>1	>1	>1	>1	**	>1	>1	-	-	-
7	>1	>1	>1	>1	0.125	0.125	0.125	**	0.125	0.125	0.256	0.064	0.008
8	>1	0.5	0.25	0.25	-	-	-	-	-	0.2	0.008	0.064	0.008
9	-	-	-	-	0.5	0.1	0.5	**	>1	0.5	0.008	0.128	0.008

- = no evaluada \* = 1. *Salmonella gpo B*, 2. *Salmonella typhi*, 3. *Escherichia coli* ATCC, 4. *Escherichia coli* LT<sup>+</sup>/ST, 5. *Shigella flexneri* T<sub>2</sub>, 6. *Shigella sonnei*, 7. *Vibrio parahaemolyticus*, 8. *Vibrio cholerae inaba*, 9. *Vibrio cholerae ogawa*, a = ampicilina, b = carbenicilina y c = amikamicina, \*\* = poca cantidad

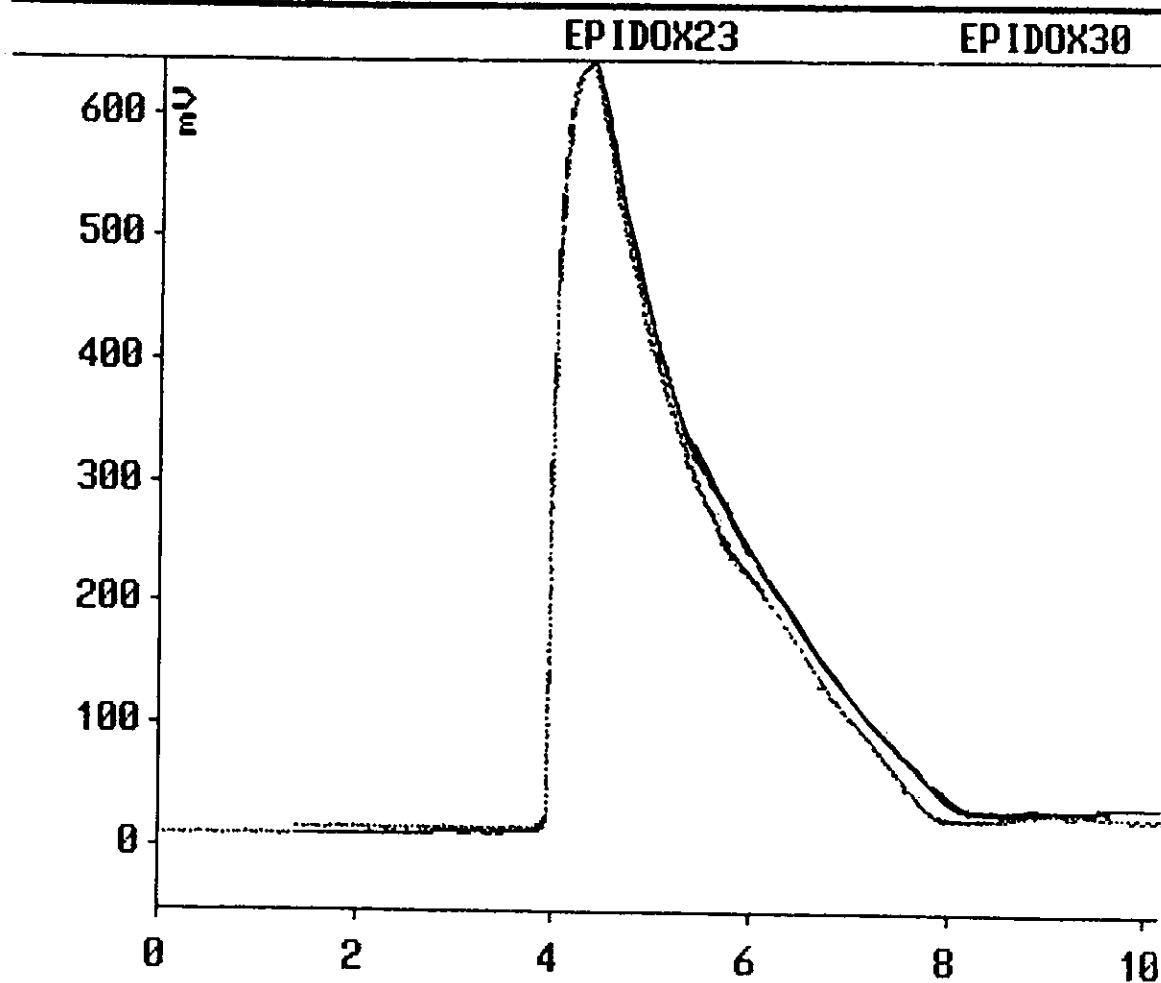
## VII. RESULTADOS Y DISCUSION

El estudio biodirigido del extracto metanólico de las partes aéreas de *Helianthemum glomeratum* Lag., usando como prueba monitora la determinación de la actividad antimicrobiana in vitro contra: *Escherichia coli* ATCC, *E. coli* LT<sup>+</sup>/ST<sup>-</sup>, *Salmonella gpo* B<sub>1</sub>, *S. gpo* B<sub>2</sub>, *S. gpo* D, *S. tiphy*, *Vibrio cholerae* ogawa, *V. cholerae* inaba, *V. parahaemolyticus*, *Shigella flexneri* T<sub>2</sub>, *Sh. sonnei* y *Sh dysenteriae* T<sub>3</sub>, condujo al aislamiento y caracterización de una proantocianidina de tipo B (galocatequina-(4β→8)-epigalocatequina 25), un flavanol (tilirósido 21) y un esteroil (β-D-gluco-β-sitosterol 24). El rendimiento de los compuestos aislados se ilustra en la tabla 12. Del precipitado III y fracción f-10 se aisló el compuesto 25 ( En la figura 6 se ilustran los cromatogramas obtenidos en CLAP del precipitado III y fracción f-10).

Tabla 12.- Rendimientos de los compuestos aislados de las partes aéreas de *Helianthemum glomeratum* Lag.

Compuesto	Cantidad obtenida	% en relacion al peso, seco de la planta
Galocatequina-(4β→8)-epigalocatequina <u>25</u>	16.733 g	0.766
β-D-gluco-β-sitosterol <u>24</u>	0.0387 g	0.0018
Tilirósido <u>21</u>	3.14 g	0.144

## File System Display Options



\_\_\_\_\_ EPIDOX23

----- EPIDOX30

Figura 6.- Cromatograma del precipitado III (EPIDOX23) y la fracción f-10 (EPIDOX30).

La galocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina 25 fue el compuesto que mostró mejores propiedades antimicrobianas (ver Tabla 13). El compuesto resultó ser menos potente comparado contra los tres antibióticos de referencia, excepto para el caso de ampicilina con el *Vibrio parahaemolyticus*.

Tabla 13.- Resultados de la actividad antibacteriana in vitro del compuesto galocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina 25.

Compuesto	<u>25</u>	Ampicilina	Carbenicilina	Amikamicina
Bacterias	CIM ( $\mu$ g/ml)			
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	125	256	64	8
<i>Shigella flexneri</i> T <sub>2</sub>	125	8	64	8
<i>Vibrio cholerae</i> ogawa	500	8	128	8
<i>Vibrio cholerae</i> inaba	200	8	64	8
<i>Escherichia coli</i> ATCC	200	8	32	4
<i>Escherichia coli</i> LT <sup>+</sup> /ST <sup>-</sup>	200	-	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	200	8	64	8
<i>Salmonella gpo</i> B <sub>1</sub>	200	-	-	-
<i>Salmonella gpo</i> B <sub>2</sub>	200	-	-	-
<i>Salmonella gpo</i> D	200	-	-	-
<i>Shigella dysenteriae</i> T <sub>3</sub>	200	-	-	-

A continuación se discuten las evidencias que permitieron identificar galocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina como constituyente antimicrobiano presente en las partes aéreas de *Helianthemum glomeratum* Lag.



## VII.1. IDENTIFICACION DE LOS COMPUESTOS AISLADOS: 21, 24 y 25.

### VII.1.1. Identificación del tilirósido 21.

El compuesto 21 se aisló como un sólido de color amarillo limón con un punto de fusión que se descompone a 220°C, que por comparación cromatográfica (CCF y CLAP), IR, RMNP (Espectro 1) y punto de fusión mixto con una muestra autentica se identificó como tilirósido.

#### VII.1.1.1. Reacción de hidrólisis de tilirósido

A 5 mg de muestra se le adicionó 0.625 ml de HCl 2N y 0.625 ml de agua destilada, dejando la reacción a reflujo por una hora. Una vez que terminó la reacción se analizó en CCF para identificar el azúcar utilizando estándares de referencia (glucosa, galactosa, ramnosa) y CLAP para identificar los aglicones (ácido p-cumárico, camperol y tilirósido)

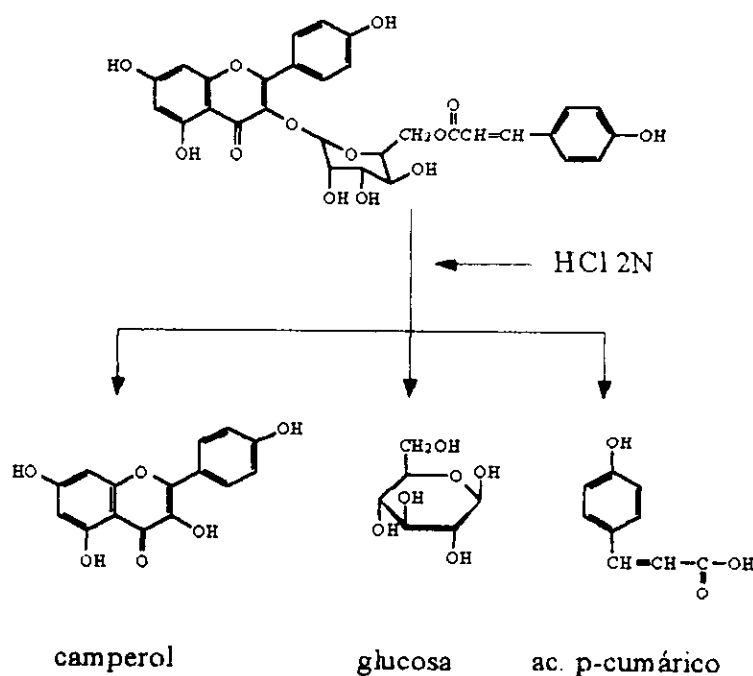
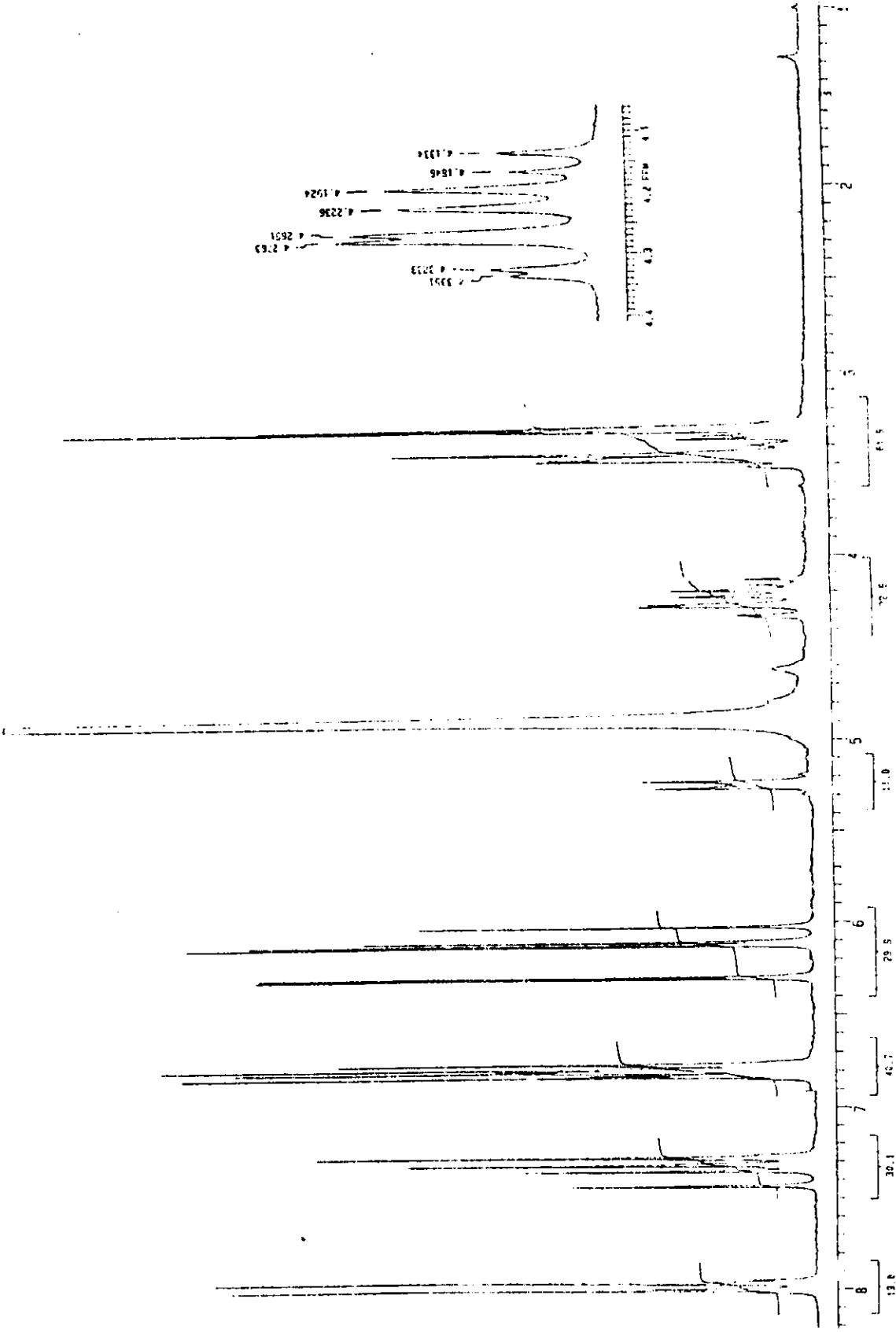


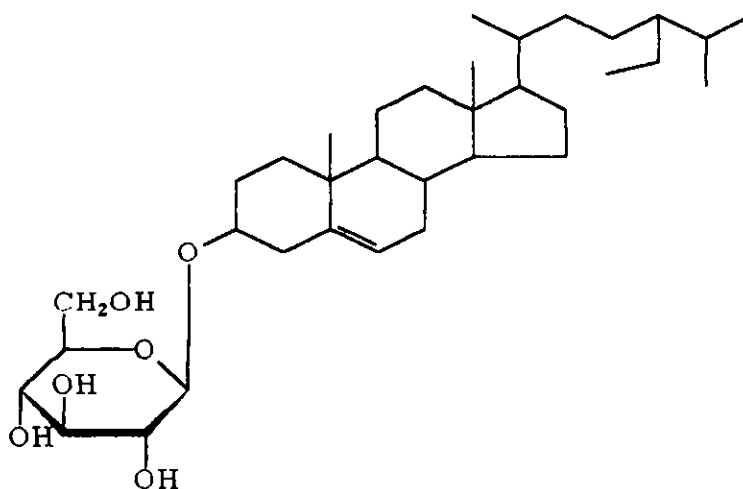
Figura 7.- Reacción de hidrólisis del tilirósido.



Espectro 1.- RMNP del tiorósido 2L.

### VII.1.2. Identificación del $\beta$ -D-gluco- $\beta$ -sitosterol 24.

El compuesto 24, se aisló como un sólido de color blanquecino con un punto de fusión de 295-298 °C que por comparación cromatográfica (CCF y CLAP), IR, (Espectro 2) y punto de fusión mixto con una muestra autentica se identificó como  $\beta$ -D-gluco- $\beta$ -sitosterol (31.77 mg).



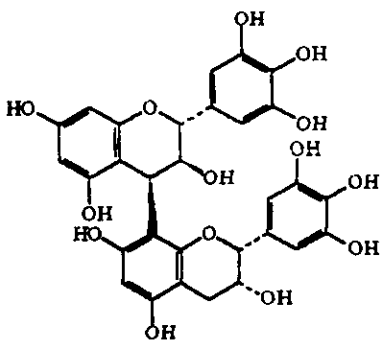


### VII.1.3.- Identificación del compuesto galocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina 25.

El compuesto 25 de fórmula molecular  $C_{30}H_{26}O_{14}$ , establecida por espectrometría de masas modalidad FAB se obtuvo como un sólido de color rojizo, que funde con descomposición a 215 °C, soluble en acetona-agua 7:3 y metanol. Sus constantes espectroscópicas y espectrométricas se incluyen en la tabla 14. El análisis global de los datos de la tabla 14 permitió caracterizar a este sólido como la proantocianidina tipo B: galocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina 25

El comportamiento cromatográfico en capa fina usando los sistemas de elución I, IV, V, VII, y el reactivo específico C (Tabla 7), así como los máximos del espectro de U.V. indicaron en principio que el compuesto 25 era una proantocianidina tipo B (Wagner-Zgainski, 1984; Matthews *et al.*, 1997).

Tabla 14.- Constantes espectroscópicas y espectrométricas del compuesto galocatequina-  
(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina 25

	
PM	610.52
P.f	215 °C (con descomposición)
UV $\lambda^{\text{MeOH}}$	275.5 y 298. 0
$[\alpha]_D^{25}$	+ 95.33
CD (MeOH)	- 4.46761 x 10 <sup>3</sup> (207.5 )
$\Delta E$ (nm)	+ 7.52548 x 10 <sup>3</sup> (230.0 ) - 0.418014 x 10 <sup>3</sup> (281.5 )
IR $\nu^{\text{KBr}}$ (cm <sup>-1</sup> )	3386, 1610, 1534, 1444, 1368, 1204, 1104, 1034, y 764
FAB m/z (%)	[M+H] <sup>+</sup> 611 (10), 459 (98), 458 (85), 352 (48), 306 (69), 305 (54), 199 (35), 153 (100), 152 (60).

Su IR (Espectro 3), mostro máximos de absorción para hidróxilo a  $3396\text{ cm}^{-1}$  y para anillos aromáticos a  $1610$  y  $1534\text{ cm}^{-1}$ . El análisis detallado del espectro IR permitió confirmar:

1) Que se trataba de una proantocianidina tipo B ya que se observaron absorciones características de esta clase de compuestos entre  $1534$  a  $1104\text{ cm}^{-1}$  (ver Figura 8a).

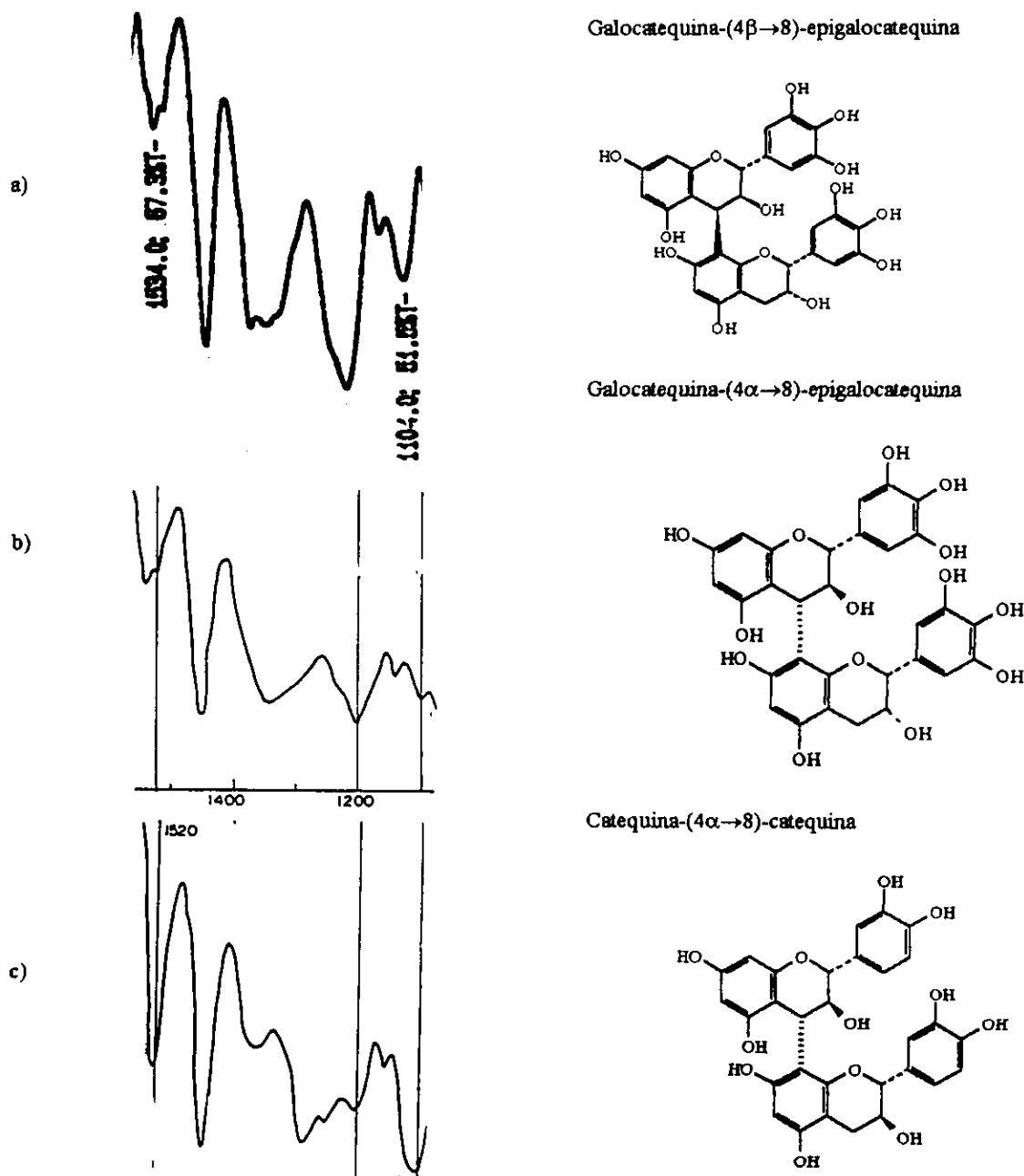
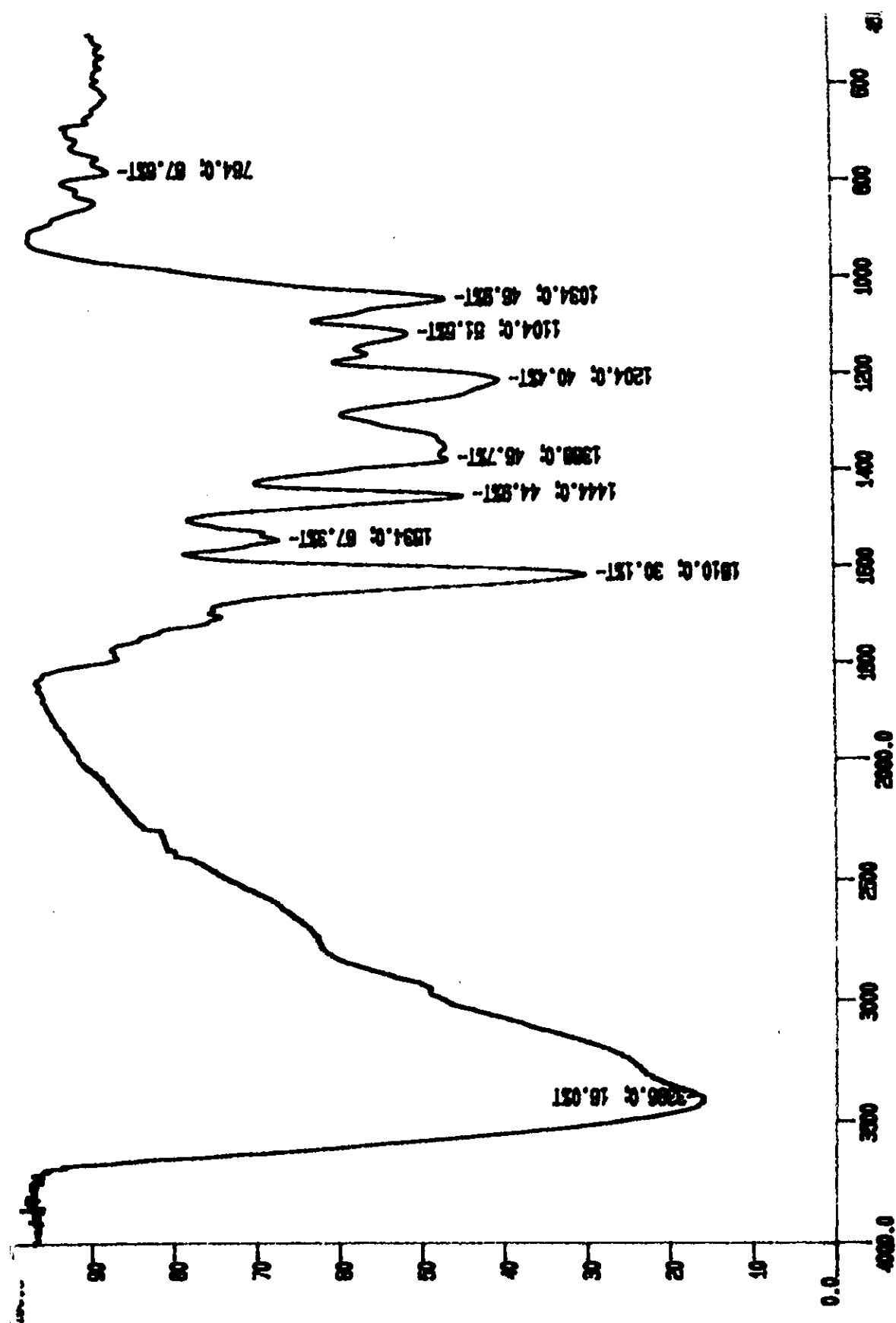


Figura 8.- a) Ampliación IR entre  $1534$  a  $1104\text{ cm}^{-1}$  del compuesto 25, b y c ejemplos de otros compuestos ilustrando su IR y su estructura (Foo, 1980).



Espectro 3.- IR de la galocatequina-(4β-8)-epigalotequina 25.



2) Que el compuesto estaba constituido por dos unidades flavan-3-ol donde los anillos aromáticos B y E eran trihidroxilados (ver Figura 9). Ya que en el IR, se observa un máximo a  $1534\text{ cm}^{-1}$  como un doblete corto que caracteriza a las proantocianidinas tipo B con anillos aromáticos B y E trihidroxilados (ver Figura 10a y 10b). En el caso de anillos aromáticos B y E dihidroxilados la absorción a  $1520\text{ cm}^{-1}$  se observa como un singlete (ver Figura 10c).

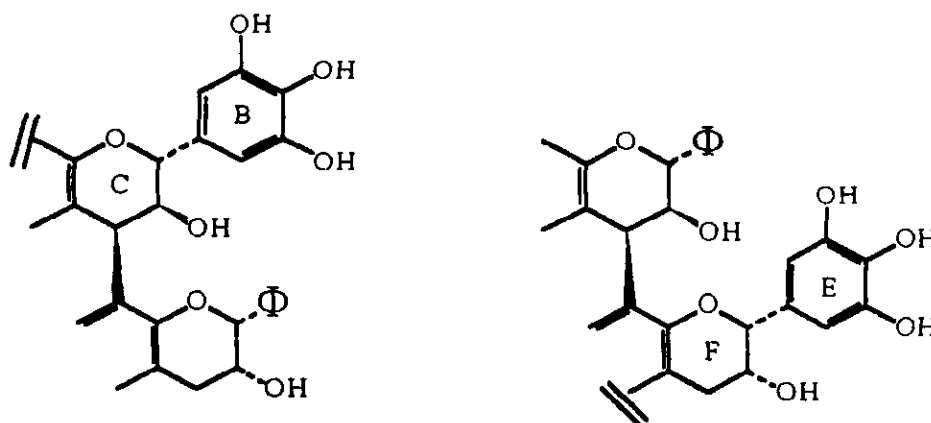


Figura 9.- Patrón de sustitución en los anillos B, E, C y F.

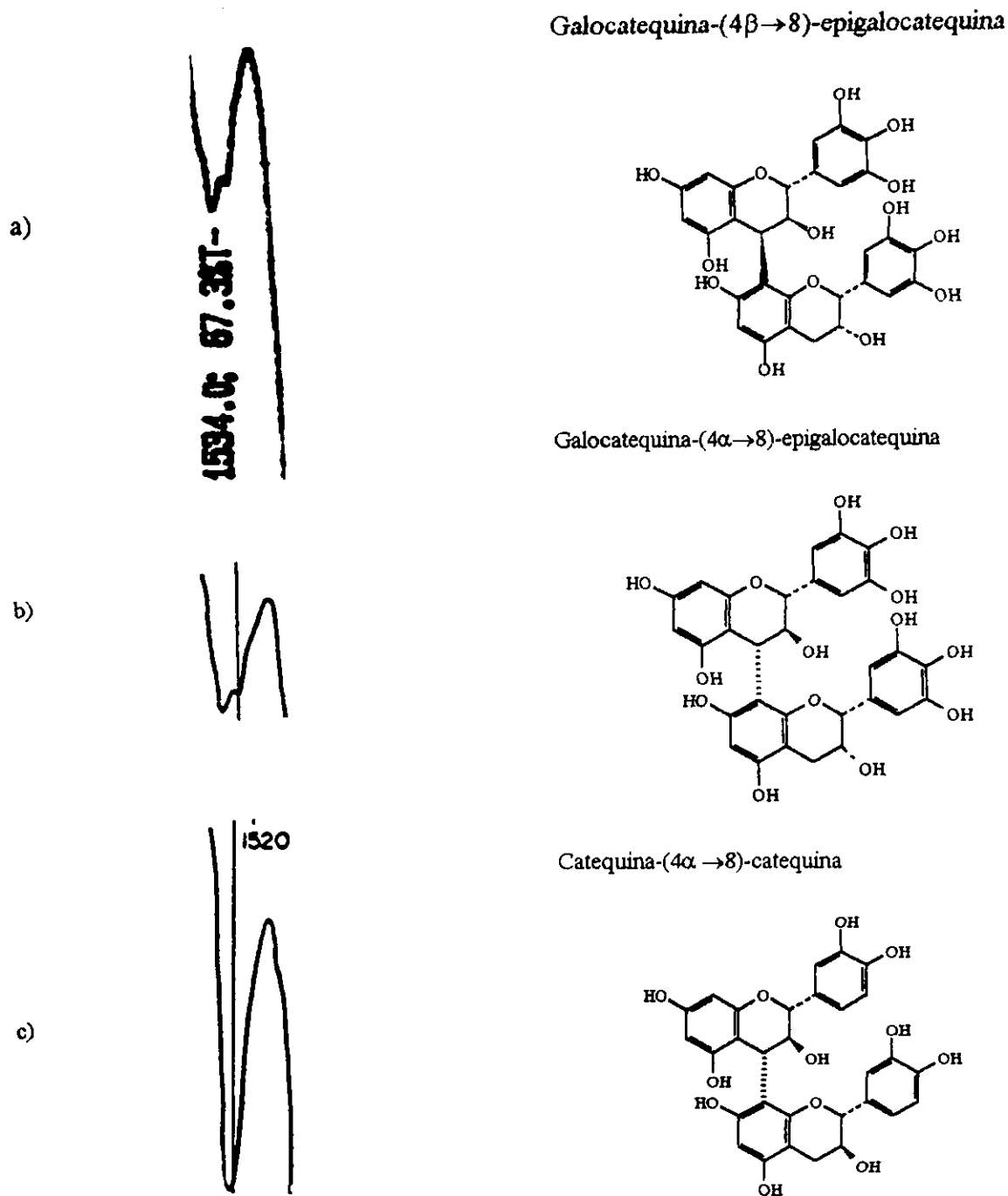


Figura 10.- a) Ampliación del IR a 1534  $\text{cm}^{-1}$  del compuesto 25. B) Ampliación del IR a 1534  $\text{cm}^{-1}$  de la galocatequina-(4 $\alpha$ →8)-epigalocatequina y c) Ampliación del IR a 1520  $\text{cm}^{-1}$  de la catequina-(4 $\alpha$ →8)-catequina (Foo, 1980).

3) Finalmente se observo una señal a  $764\text{ cm}^{-1}$  que confirma a una proantocianidina tipo B con los anillos pirano, C y F trans y cis respectivamente. Cuando la molécula tiene anillos pirano C y F 100 % trans y/o cis no se observa este máximo de absorción (Figura 11). (Foo, 1980, Foo-Porter, 1980; Vennat *et al.*, 1986).

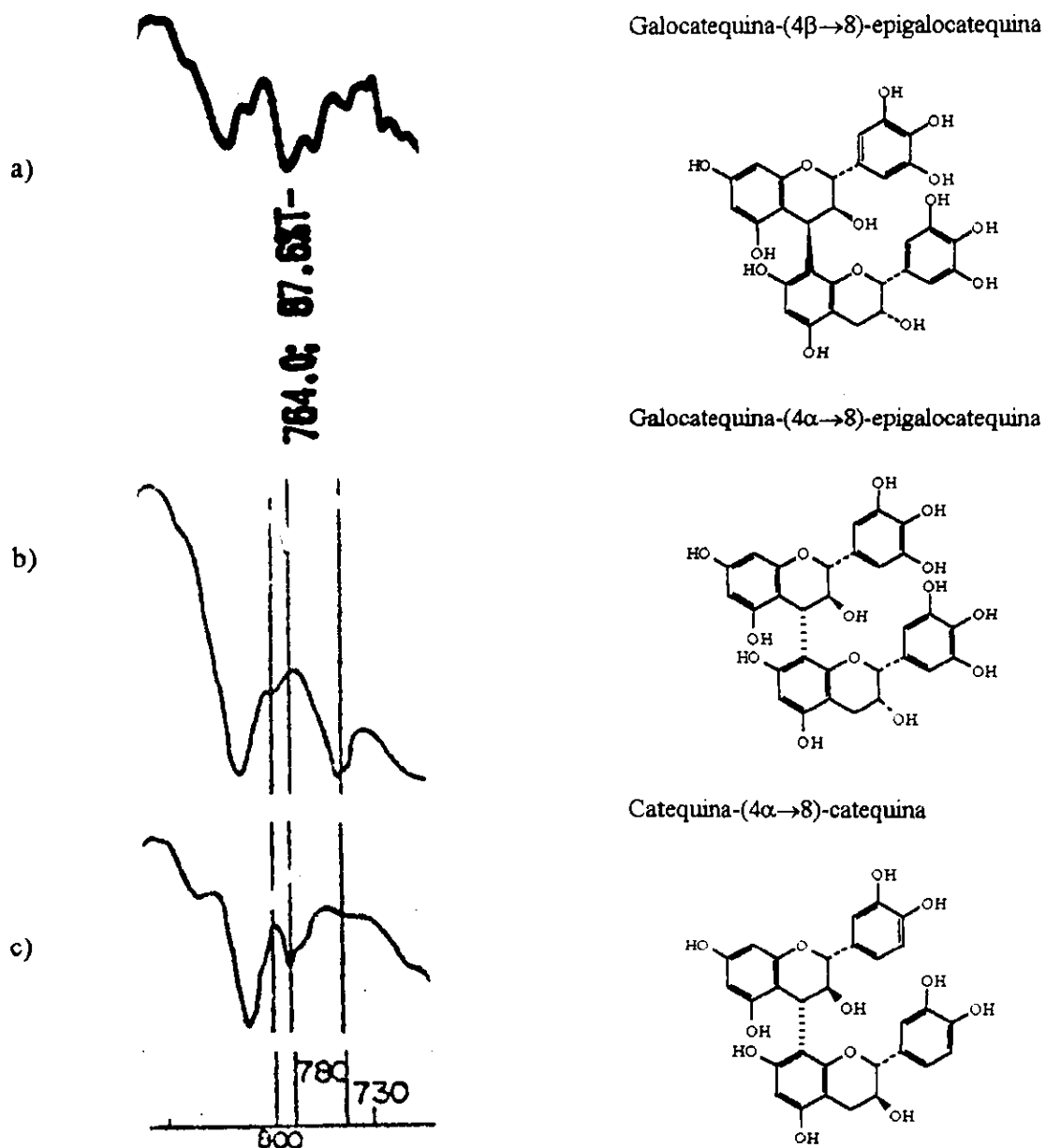


Figura 11.- a) Ampliación del IR entre  $800\text{ a }730\text{ cm}^{-1}$  del compuesto 25 y b-e ejemplos de otros compuestos ilustrando su IR y la estructura molecular (Foo, 1980).

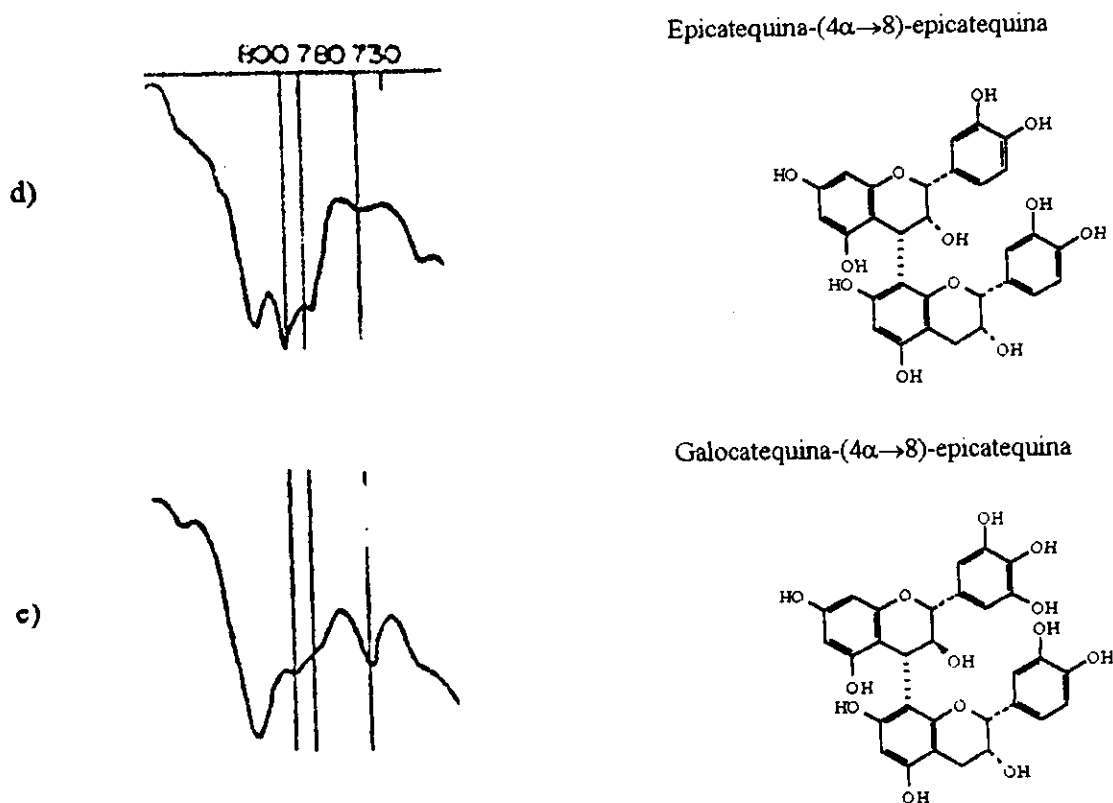


Figura 11.- (Continuación) a) Ampliación del IR entre 800 a 730  $\text{cm}^{-1}$  del compuesto 25 y b-e ejemplos otros compuestos ilustrando su IR y la estructura molecular (Foo, 1980).

La estereoquímica del centro quiral  $C_4$  se determinó como  $\beta$  por el valor de  $+7.52548 \times 10^3$  obtenido en el dicroísmo circular a 230 nm (Barret *et al.*, 1979; Steynberg *et al.*, 1991; Danne *et al.*, 1993; Danne *et al.*, 1994).

Los fragmentos de  $m/z$  612, 305 y 306 (Fig. 11) observados en el espectro de masas modalidad FAB fueron consistentes con la presencia de una unidad galocatequina y otra unidad epigalocatequina en la estructura.

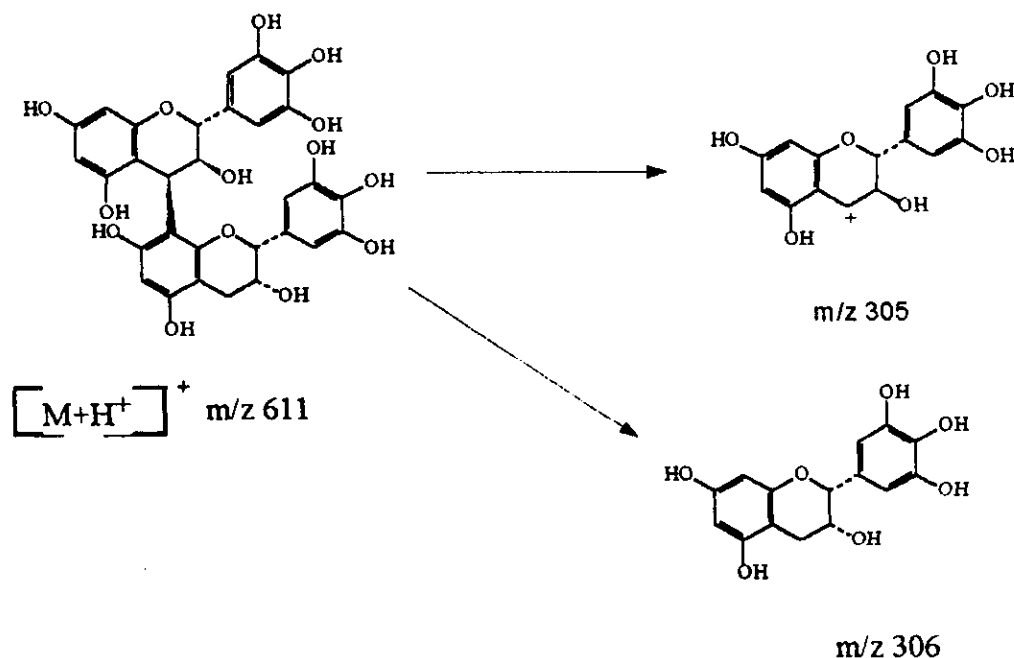


Fig. 12.- Estructura del compuesto 25 indicando la principal fragmentación observada en el espectro FAB.

En resumen las evidencias espectroscópicas permiten caracterizar al compuesto 25 como la galocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina. El compuesto resulta ser un nuevo producto natural y el responsable de la actividad antimicrobiana observada en el extracto metanólico.

## VIII. CONCLUSIONES

El estudio biodirigido del extracto metanólico de las partes aéreas de *Helianthemum glomeratum* Lag., permitió el aislamiento y la caracterización de tres compuestos: una proantocianidina tipo B (galocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina), un flavonol (tilirósido) y un esteroI ( $\beta$ -D-gluco- $\beta$ -sitosterol).

La metodología empleada permitió obtener a la galocatequina-(4 $\beta$ →8)-epigalocatequina, como único compuesto antimicrobiano y constituye un nuevo producto natural

Es la primera vez que se aísla una proantocianidina tipo B de *Helianthemum glomeratum* Lag.

Los resultados farmacológicamente sustentan las propiedades antimicrobianas de *Helianthemum glomeratum* Lag.

Colateralmente confirman las propiedades que le atribuyen los pobladores de los altos del Edo. Chiapas a *Helianthemum glomeratum* Lag., en el tratamiento de las diarreas con sangre y moco provocadas por enterobacterias.

**RECOMENDACIONES:**

- Hacer ensayos antimicrobianos *in vitro* del compuesto con otras especies de bacterias productoras de diarrea infecciosa.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- Aguilar A., Camacho R. J., Chino S. y Jázquez P. (1994). "Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social". IMSS. pp. 34.
- Bae S. Y., Burger W. F., Steynbeer P. J., Ferreira D. (1994). "Flavan and procianidin glycosides from the bark of blakjack oak", Phytochemistry. 35/2/473-478.
- Balas L. y Vercauteren J. (1995). "2 D NMR structure elucidation of: proanthocynidins: the special case of the catechin-(4 $\alpha$ →8)-catechin-(4 $\alpha$ →8)-catechin trimer", Magnetic Resonance in Chemistry. 33/85-94.
- Balas L. y Vercauteren J. (1994). "Extensive high-resolution reverse 2 D NMR analysis for the structural elucidation of procyanidin oligomers", Magnetic Resonance in Chemistry. 32/386-393.
- Barret W. M., Klyne W., Scopes M., Fletcher C. A., Porter J.L., Haslam E. (1979). "Plan proanthocianidins. Part 6. Chiroptical studies. Part 95. Circular dichroism of procyanidins", J.C.S. Perkin I. 2375-2377.
- Barrientos B. T. y Gutiérrez L. Ma. L. (1994). "Determinación de la actividad antimicrobiana y citotóxica potencial de extractos derivados de treinta especies vegetales utilizada en medicina tradicional". Fac. de Química UNAM. Tesis. QFB.
- Benítez O., Uribe F., Navarro A., Hernández D., Ruiz, J., Cravioto, A. (1991). "Etiología de diarrea con sangre en niños de una comunidad rural", Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 48/2/65-70



- Calva J. J., Ceron E., Bojalil R., Holbrook A. (1993). "Uso de antibióticos en una comunidad de la Ciudad de México. II. Encuesta de compras en farmacias", Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 50/3/145-149.
- Calzada F., López R., Meckes M., Cedillo-Rivera R. (1995). "Flavonoids of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*", International Journal of Pharmacognosy. 34/1/12.
- Calzada F., Mata R., Bye R., Linares E. (1990). "A retrochalcone from *Anredera scandens*", Phytochemistry. 29/2737-2738.
- Calzada F., Mata R., López R., Linares E., Bye R., Del Rio F. (1991). "Friedelanes and triterpenoid quinonamethides from *Hippocratea excelsa*", Planta medica. 57/194-195.
- Contreras M. I. y Mier M. N. (1986). "Recolección, selección, clasificación botánica y determinación de la actividad farmacológica de plantas medicinales con propiedad cicatrizante de la región de Coxcatlan Puebla", UAP. Tesis.
- Cordell A. G. (1995). "Changing strategies in natural products chemistry", Phytochemistry. 40/6/1585-1612.
- Czochanska Z., Foo Y. L., Newman H. R., Porter J. L. (1980). "Polimeric proanthocianidins. Stereochemistry, structural units, and molecular weight", J.C.S. Perkin I. 2278-2286.
- Danne A., Petereint F., Nahrstedt A. (1993). "Proanthocyanidins from *Cistus incanus*", Phytochemistry. 14/4/1129-1133.
- Danne A., Petereint F., Nahrstedt A. (1994). "Flavan 3-ols, prodelphidins and polyphenoles from *Cistus salvifolius*", Phytochemistry. 37/2/533-538.

- De Mello P. J., Petereint F., Nahrstedt A. (1996). "Flavan 3-ols, prodelphinidins and from *Stryphnodendron adstringens*", Phytochemistry. 41/3/807-813.
- Díaz del Castillo E. (1988). "Pediatría Perinatal", Ed. Interamericana, 3era. de México D.F. pp. 480-489.
- Estrada L. E. (1992). "Plantas medicinales de México", Universidad Autónoma Chapingo, 4ª. México. pp. VIII.
- Farnsworth R. N., Akerel O., Bingel S. A., Soejarto D. D., Guo Z. (1989). "Las plantas medicinales en la terapéutica", Bol. of Sanit. Panam. 107/4/314-329.
- Ferreira D. y Bekker R. (1996). "Oligomeric proanthocyanidins: Naturally Occurring O-heterocycles", Natural Product Reports. 411-433.
- Ferreira D., Steynber P. J., Roux G. D., Brandt V. (1992). "Diversity of structure and function in oligomeric flavonoids", Tetrahedron. 48/10/1743-1803.
- Foo Y. I. (1981). "Proanthocyanidins: gross chemical structure by infrared spectra", Phytochemistry. 20/6/1377-1402..
- Foo Y. I. y Karchessy J. J. (1989). "Procyanidin dimers and trimers from Douglas fir inner bark", Phytochemistry. 28/6/1743-1747.
- Foo Y. I. y Karchessy J. J. (1991). "Procyanidin tetramers and pentamers from Douglas fir bark", Phytochemistry. 30/2/667-670.
- Foo Y. I. y Porter J. L. (1978). "Prodelphinidin polymers: Definition of structural units", J.C.S. Perkin I. 1186-1190.
- Foo Y. I. y Porter J. L. (1980). "The phytochemistry of proanthocyanidin polymers", Phytochemistry. 19/1747-1754.

- Golstein W. F., Chumpitaz C. J., Guevara M. J., Papadopoulou B., Acar F. J., Vieu F.J. (1986). "Plasmid-mediated resistance to multiple antibiotics in *Salmonella typhi*", The Journal of Infectious Diseases. 153/2/261-266.
- Gotuzzo E., Carrillo C., Echeverria J., Ruiz R., Campos P. (1991). "Estudio comparativo: lomefloxacin vs. trimetoprima/sulfametoxazol en el tratamiento de la diarrea aguda bacteriana del adulto", Compendium de Inv. Clin. Lat. Am. 11/2/1-5.
- Hamburger M. y Hostettman K. (1991). "Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine", Phytochemistry. 30/12/3864-3874.
- Harrison. (1986). "Principios de medicina interna 1", Mc Graw-Hill. 6ta. ed. México.
- Helsper G. F., Kolodziej H., Hoogendijk M. J., Norel V. A. (1993). "Characterization and trypsin inhibitor activity of proanthocyanidins from *Vicia faba*", Phytochemistry. 14/5/1255-1260.
- Hemingway W. E. y Karchesy J. J. (1989). "Chemistry and significance of condensed tannin", Plunum Press. USA. pp. 35-37 y 56-57.
- Hori K., Satake T., Saiki Y., Murakami T., Chem M. (1988). "Chemical and Chemotaxonomical studies of filices. LXXVII, Isolation and structure of novel catechin and proanthocyanidins from *Dennstaedtia distenta* Moore", Chem. Pharm. Bull. 36/11/4301-4306.
- Hosokawa K., Fukushi E., Kawabata J., Fujii C., Ito T., Yamamura S. (1995). "Three acylated cyanidin glucosides in pink flowers of *Gentiana*", Phytochemistry. 40/3/941-944.

Kakegawa, H., Matsumoto, H., Endo, K., Satoh, T., Nonaka, G. y Nishioka, I (1985).

“Inhibitory effects of tannins on hyaluronidase activation and on the degranulation from rat mesentery mast cell”, Chem. Pharm. Bull. 33/11/5079-5082.

Kiuchi F., Tsuda Y., Kondo K., Yoshimura H., Nishioka Y., Nonaka Y. G. (1988).

“Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans. III. The bursing activity of tannins on dog roundworm larva”, Chem. Pharm. Bull. 36/5/1796-1802.

Koupai-Abyazani R. M. y Bohm A. B. (1993). “The condensen tannins of *Leptarrhena pyrolifolia*”, Phytochemistry. 33/6/1485-1487.

Kroeger A. y Luna R. (1987). “Atención primaria de salud”, OPS. México. pp. 39-40 y 190-205.

Kuschinnsky G. y Lullman H. (1975). “Manual de Farmacología”, Marín, S.A. Colombia.

Lee A. L., Puhr D. N., Maloney K. E., Bean H. N., Tauxe V. R. (1994). ““Increase in antimicrobial-resistant *Salmonella* infections in the United States, 1989-1990””, The Journal of Infectious Diseases. 170/128-134.

Lee Min-Won., Morimoto S., Nonaka Gen-Ichiro., Nishioka Y. (1992). “Flavan-3-ol gallates and proanthocyanidins from *Pithecellobium lobatum*”, Phytochemistry. 31/6/2117-2120.

Lepetit. (1973). ““La Resistencia Bacteriana””, Rassegna. 1/1/1-87.

Mandell L.G y Sande A. M. (1990). Goodman S. L. y Gilman's A. “The pharmacological Basis of Therapeutics”, Pergamon Press. eighth edition. United State of America. Pp. 1047-1145.

Markham K. R. (1982). “Techniques of flavonoid identification”, Academic Press, London, New York, 36-51, 63 y 65.

- Mata R. (1990). "Ratibinolide, a new sesquiterpene lactone from *Ratibida latpalearis*", Heterocycles. 31/1111-1114.
- Mata R. (1996). "Curso de Farmacognosia". Material Didáctico. UNAM, México, D.F.
- Mata R. y Calzada F. (1990). "Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine, XV. Sesquiterpene evoninoate alkaloids from *Hippocratea excelsa*", J. of Natural Products. 53/5/1212-1219.
- Mattehews S., Mila I., Scalbert A., Pollet B., Lapierre C., Hervé du Penhoat M. L. C., Rolando C. y Donnelly X. M. D. (1997). "Method for estimation of proanthocyanidins based on their acid depolymerization in the presence of nucleophiles", J. Agric. Food Chem. 45/1195-1201.
- McMurrrough Y. y Madigan D. (1996). "Semipreparative chromatographic procedure for the isolation of dimeric and trimeric proanthocyanidins from barley", J. Agric. Food Chem. 44/1731-1735.
- Meckes M., Torres J., Calzada F., Rivera J., Carmolinga M., Lemus H. y Rodríguez G. (1997). "Antibacterial properties of *Helianthemum glomeratum*, a plant used in Maya traditional medicine to treat diarrhoea", Phytotherapy Research. 11/128-131.
- Meckes M., Villareal M. L., Tortoriello J., Berlin B y Berlin E. A. (1995). "A microbiologica evaluation of medicinal plants used by the Maya people of Southern Mexico", Phytotherapy Research. 9/244-250.
- Mendoza S., Michaus G. (1996). "Síndrome diarreico agudo", Niños & Pediatría. 1/1/23-32.

- Merfort I. y Wendisch D. (1993). "Sesquiterpene lactones of *Arnica cordifolia*, subgenus *Austromontana*", Phytochemistry. 34/5/1436-1437.
- Mitscher A. L., Drake S., Sitaraghav R., Okwute K. S. (1987). "A modern look at folkloric use of anti-infective agents" Journal of Natural Products. 50/6/1025-1040.
- Mosquera J. M., Galdos P. (1994). "Farmacología para enfermeras", Interamericana McGraw-Hill. 2da. reimpresión. Madrid.
- Murray E. B. y Rensimer R. E. (1983). "Transfer of trimethoprim resistance from fecal *Escherichia coli* isolated during a prophylaxis study in Mexico", The Journal of Infectious Diseases. 147/4/724-728.
- Murray R. P. (1995). "Antibacterial susceptibility test dilution and disk diffusion methods". Woods, L. Gail y Washington A: John. Manual of Clinical Microbiology. ASM PRESS. Sixth ed. USA. pp. 1327-1341.
- Navarrete A. (1987). "Estudio químico de plantas mexicanas usadas en medicina tradicional: Constituyentes de *Chenopodium graveolens* Will, *Chenopodium ambrosioides* L. y *amphipterygium adstringens* shiede ex Schlecht", Fac. de Química UNAM. Tesis de maestría.
- Navarrete A., Mata R. y Delgado G. (1989). "Alkylarcardic acids from *Amphypterygrum adstringens*", Planta medica. 55/194-195.
- Newman H. R., Porter J. L., Foo Y. L. (1987). "High-Resolution <sup>13</sup>C NMR studies of proanthocyanidin polymers (condensed tannins)", Magnetic Resonance in Chemistry. 25/118-124.
- Okuda T., Yoshida T., Hatano T. (1990). "Oligomeric hydrolyzable tannins, a new class of plant polyphenols", Heterocycles. 30/2/1195-1218.

- Okuda T., Yoshida T., Hatano T. (1989). "Ellagitannins as active constituents of medicinal plants", Planta Medica. 55/117-122.
- Olarte J. (1992). "Etiología de las diarreas infecciosas viejos y nuevos agentes", Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 49/3/143-150.
- Olarte J. y Galindo E. (1973). "*Salmonella typhi* resisten to chloramphenicol, ampicillin and other antimicrobial agents: strain isolated during an extensive typhoid fever epidemic in Mexico", Antimicrob. Agents. Chemother. 4/597-601.
- Pallenbach E., Scholz E., König M. y Rimpler H. (1993). "Proanthocyanidins from *Quercus petrea* Bark", Planta Medica. 59/264-268.
- Polya M. G. y Foo Y. L. (1994). "Inhibition of eukayote signal-regulated protein kinases by plant-derived catechin-related compounds", Phytochemistry. 35/6/1399- 1405.
- Rios J. J., Recio M. C. y Villar. (1988). "Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of literature". Journal of Ethnopharmacology. 23/127-149.
- Rivas V. F. (1983). "Manual de prescripción medicamentosa", AGT Editor. México.
- Rodríguez C. R. (1984). "Vademécum académico de medicamentos 1 y 2", Fac. de Medicina. UNAM. México, D.F.
- Scholz E. y Rimpler H. (1989), "Proantocyanidins from *Krameria triandra* Root", Planta Medica. 55/379-384.
- Shriner R. L., Fuson R. C. y Cutin A. (1980). "Identificación sistemática de compuestos orgánicos", Limusa México.
- S.S.A. (1984). "Cuadro básico de medicamentos del sector salud", México. pp.241-262.

- S.S.A. (1993). "Manual de procedimientos. Guía para el manejo efectivo de niños con enfermedad diarreica y pacientes con cólera", séptima edición, México.
- Salas A. M., Loredó A. A., Ramírez M. J., Alvares N. A., Legorreta G. J. (1990). "Diagnóstico y terapéutica en Pediatría", La Prensa Médica Mexicana S.A. 5ta. reimpresión México. pp. 439-442. y 579-602.
- Stahl E. (1969). "Thin-layer chromatography, a laboratory handbook", segunda de. Springer-Verlag, New York, 861-864.
- Steynberg P. J., Brand V. E. y Ferreira D. (1991). "Conformational analysis of oligomeric flavanoids. Part 1. 4-arylflavan-3-ols", J.C.S. Perkin I. 1569-1573.
- Steynberg P. J., Brand V. E. y Ferreira D. (1995). "Conformational analysis of oligomeric flavanoids", Magnetic Resonance in Chemistry. 33/611-620.
- Suárez G., Flores J., Heredia R., Puc A., Franco J. (1993). "Prevalencia de bacterias enteropatógenas en niños con diarrea aguda con sangre", Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 50/3/151-156
- Tahara, S., Moriyama, M., Igham, J. y Mizutani, J. (1993). "Isoflavone atropisomers from *Piscidia erythrina*", Phytochemistry. 34/545-552.
- Takechi, M., Tanaka, Y., Takehara, M., Nonaka, G. y Nishioska I. (1985). "Structure and antiherpetic among the tannins", Phytochemistry. 24/2245-2250.
- Toki K., Saito N., Terahara N., Honda T. (1995). "Pelargonidin 3-glucoside-5-acetylglucoside in *Vervena* flowers", Phytochemistry. 40/3/939-940..
- Torres J., Gonzales-Arrollo S., Pérez R., Muñoz O. (1995) "Inappropriate treatment in children with bloody diarrheas clinical and microbiological studies", Arch.Med.Res. 26/1/23-29.



U.N.A.M. (1984). "Pediatría ciclos IX y X", Fac. Medicina. México. pp 173-194 y 390-407.

Vanden B. A. y Vlietinck J. A. (1991). "Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants", Methods in Plant. Biochemistry. 6/1319-1343.

Vázquez R. C. (1987). Primer Coloquio de la "Medicina tradicional" ¿Un Saber en Extinción? ENEP Zaragoza. UNAM.

Vennat B., Pourrat A., Texier O., Pourrat H. (1987). " Proanthocyanidins from the roots of *Fragaria vesca*", Phytochemistry. 26/1/261-263.

Wagner H., Bladt S., Zgainski E. M. (1984). "Plant drug analysis, a Thin-layer chromatography atlas", Springer-Verla, New York, 301, 304.

Yoshida T., Hatano T. y Okuda T. (1989). "Chromatography of the tannins", Journal of chromatography. 467/139-147