



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

2

"EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE TRES  
ESPECIES DE PLANTAS DEL GÉNERO  
*Gnaphalium* Y CARACTERIZACIÓN DE LOS  
PRINCIPIOS ACTIVOS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS  
(QUÍMICA FARMACÉUTICA)

P R E S E N T A:

QUIM. MARICRUZ SÁNCHEZ ZAVALA



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.

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo

Vocal Dr. José Serafín Calderón Pardo

Secretario Dr. Mariano Martínez Vázquez

Primer Suplente Dr. Andrés Navarrete Castro

Segundo Suplente Dra. Isabel Aguilar Laurents

Sitio Donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 121, Conjunto E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM. Y Laboratorio de Química Orgánica, Centro de Investigaciones Químicas, UAEH.

Asesor Dra. Ofelia Espejo González

Sustentante Quim. Maricruz Sánchez Zavala

# **DEDICATORIAS**

Dedico el presente trabajo con todo cariño y respeto:

A mis padres, Luis y Socorro, con especial atención a mi madre, por todo el apoyo que siempre recibí para todo lo que he hecho en mi vida.

A mis hermanas, Magdalena y Nadia, porque de cada una he aprendido una gran lección en la vida.

A la memoria de mi hermano Francisco.

A mis sobrinos, Ana Laura, Alejandra y Toño, por ser tan lindos y cariñosos conmigo.

A mis amigas de toda la vida, Veronica, Dauss, Martha y Jose, por ser lo que son.

Y muy especialmente a Victor Hugo, mi esposo, porque sin su gran paciencia e infinito amor, probablemente esto no habría sido posible.

# **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a todas las personas que de una u otra forma participaron en el desarrollo del presente trabajo, en especial:

A la Dra. Ofelia Espejo González, por su asesoría en el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. J. Roberto Villagomez Ibarra, por brindarme además de asesoría y apoyo técnico para la realización de este trabajo, su amistad y acertados consejos.

A la M. en C. Armida Zuñiga Estrada, por el apoyo y asesoría en la determinación de las pruebas biológicas.

Al Personal de CINVESTAV, IPN y del Instituto de Química de la UNAM, que realizaron los espectros de Resonancia Magnética Nuclear y masas.

Al personal del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, que realizaron los espectros de masas e IR.

Al Dr. Martín Torres Valencia, por sus sugerencias y comentarios.

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios en la revisión del presente trabajo.

A mis maestros de Maestría, por todos sus conocimientos compartidos conmigo.

Al M. En C. Alfonso Lira Rocha, por todas sus atenciones y apoyo brindado.

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez, por sus conocimientos compartidos y sus acertados consejos.

A mis compañeros de maestría, por todos los momentos que compartimos, especialmente a Mini, Pily, Bere, Hugo, Isabel y Jose Luis.

A la M. en C. Minarda de la O Arciniega, por todo el tiempo que me obsequió, sus comentarios y su amistad.

Al CONACYT, por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de posgrado.

## RESUMEN

Diversas especies de plantas del género *Gnaphalium* (*Asteraceae*), son utilizadas en diferentes estados de nuestro país para atender padecimientos de las vías respiratorias, tales como irritación de garganta, bronquitis y tos.

Algunas especies de este género han sido estudiadas desde el aspecto químico, sin embargo, son pocos los estudios biológicos que se han realizado. En el presente trabajo se realizó un estudio fitoquímico biodirigido, que permitió aislar compuestos con actividad antimicrobiana.

Los extractos hexánicos de las partes aéreas de *Gnaphalium oxyphyllum* D. C. var. *oxyphyllum*, *G. liebmanni* Sch. Bip. Var. *monticola* y *G. viscosum* Kunth mostraron actividad antimicrobiana significativa contra bacterias gram positivas y bacterias gram negativas, al ser evaluados por el método de difusión en agar. De estos extractos se aislaron y caracterizaron, empleando técnicas cromatográficas y espectroscópicas convencionales los diterpenos zoapatlina, ácido kaurenico, 13-epiesclareol y los esteroides  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol.

El extracto metanólico de las flores de *G. oxyphyllum* D. C. var. *oxyphyllum* mostró considerable acción antimicrobiana contra bacterias gram positivas. De este extracto se aislaron los flavonoides luteolina y 3-metoxi quercetina.

De las tres especies estudiadas, *G. oxyphyllum* D. C. var. *oxyphyllum*, fue la que mostró la mayor actividad antimicrobiana.

---

## ÍNDICE

Resumen .....	i
Índice .....	ii
Índice de tablas .....	v
Índice de figuras .....	vii
Índice de espectros.....	viii
Lista de abreviaturas .....	ix
<b>I.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II.- ANTECEDENTES DEL GÉNERO <i>Gnaphalium</i>.....</b>	<b>4</b>
2.1.- Antecedentes Botánicos .....	4
2.2.- Antecedentes Etnobotánicos .....	7
2.3.- Antecedentes Químicos .....	9
2.4.- Antecedentes Farmacológicos .....	17
<b>III.- OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
3.- Objetivo general .....	18
3.1.- Objetivos Específicos.....	18
<b>IV.- JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>20</b>
<b>V.- PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>21</b>
5.- Materiales y Métodos .....	21
5.1.- Material Vegetal.....	21
5.1.1.- <i>G. oxyphillum</i> D.C. variedad <i>oxyphillum</i> .....	21



5.1.2.- <i>G. liebmannii</i> Sch. Bip. var. <i>monticola</i> .....	21
5.1.3.- <i>G. viscosum</i> Kunth .....	21
5.2.- Parte Química .....	22
5.2.1.- Análisis cromatográfico .....	22
5.2.2.- Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos aislados.....	22
5.2.3.- Extracción.....	24
5.3.- Aislamiento y purificación de los compuestos con actividad biológica.....	26
5.3.1.- <i>G. oxyphillum</i> D.C. variedad <i>oxyphillum</i> .....	26
5.3.2.- <i>G. liebmannii</i> Sch. Bip. var. <i>monticola</i> .....	29
5.3.3.- <i>G. viscosum</i> Kunth .....	32
5.4.- Determinación de la actividad antimicrobiana .....	33
5.4.1.- Microorganismos de prueba .....	33
5.4.2.- Medios de cultivo .....	33
5.4.3.- Preparación del inóculo.....	34
5.4.4.- Testigos positivos.....	34
5.4.5.- Preparación de las placas.....	35
5.4.6.- Bioensayo .....	35
5.4.7.- Determinación de la MIC.....	35
<b>VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>37</b>
6.1.-Determinación estructural de los compuestos aislados.....	37
6.1.1.-Compuesto 1 .....	37
6.1.2.- Compuesto 2 .....	40
6.1.3.- Compuesto 3 .....	43
6.1.4.- Compuestos 4 y 5 .....	48
6.1.5 Compuestos 6 y 7.....	55

6.2- Actividad antimicrobiana.....	57
6.2.1.- <i>G. oxyphyllum</i> D.C. variedad <i>oxyphyllum</i> .....	57
6.2.2.- <i>G. liebmannii</i> Sch. Bip. var. <i>monticola</i> .....	61
6.2.3.- <i>G. viscosum</i> Kunth .....	63
6.2.4- Compuestos puros.....	65
<b>VII.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>68</b>
<b>VIII.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>70</b>
<b>IX.- ANEXO.....</b>	<b>79</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No. 1 Metabolitos aislados de plantas del género <i>Gnaphalium</i> .....	10
Tabla No. 2 Sistemas de elución empleados para los análisis	
Cromatográficos.....	23
Tabla No. 3 Agentes cromógenos utilizados para los análisis de	
cromatografía .....	23
Tabla No. 4 Extractos obtenidos de <i>G. oxyphillum</i> D. C. var. <i>oxyphillum</i> .....	24
Tabla No. 5 Extractos obtenidos de <i>G. liebmannii</i> var. <i>monticola</i> .....	24
Tabla No. 6 Extractos obtenidos de <i>G. viscosum</i> Kunth .....	26
Tabla No. 7 Fracciones obtenidas del extracto hexánico de flores de <i>G.</i>	
<i>oxyphillum</i> D. C. var. <i>oxyphillum</i> .....	27
Tabla No. 8 Fracciones obtenidas del extracto metanólico de flores de <i>G.</i>	
<i>oxyphillum</i> D. C. var. <i>oxyphillum</i> .....	28
Tabla No. 9 Fracciones obtenidas del extracto hexánico de hojas de <i>G.</i>	
<i>oxyphillum</i> D. C. var. <i>oxyphillum</i> .....	29
Tabla No. 10 Fracciones obtenidas del extracto hexánico de hojas de <i>G.</i>	
<i>liebmannii</i> var. <i>monticola</i> .....	30
Tabla No. 11 Fracciones obtenidas del extracto hexánico de flores de <i>G.</i>	
<i>liebmannii</i> var. <i>monticola</i> .....	31
Tabla No. 12 Fracciones obtenidas del extracto hexánico de flores de <i>G.</i>	
<i>viscosum</i> Kunth.....	32
Tabla No. 13 Testigos positivos empleados en el ensayo de actividad .....	34
Tabla No. 14 Datos de RMN <sup>13</sup> C de la zoapatlina .....	39
Tabla No. 15 Datos de RMN <sup>1</sup> H de la zoapatlina .....	40
Tabla No. 16 Datos de RMN <sup>13</sup> C del ácido kaurenico .....	42

Tabla No. 17 Datos de RMN <sup>1</sup> H del ácido kaurenoico .....	43
Tabla No. 18 Datos de RMN <sup>1</sup> H del 13-epiesclareol.....	46
Tabla No. 19 Datos de RMN <sup>13</sup> C del 13-epiesclareol.....	47
Tabla No. 20 Datos de RMN <sup>1</sup> H de la 3-metoxiquercetina .....	54
Tabla No. 21 Datos de RMN <sup>1</sup> H de la luteolina .....	54
Tabla No. 22 Compuestos aislados .....	56
Tabla No. 23 Evaluación antimicrobiana de los diferentes extractos de <i>G.</i> <i>oxyphyllum</i> D. C. var. <i>oxyphyllum</i> .....	58
Tabla No. 24 Evaluación antimicrobiana de las fracciones de Flores-hexano de <i>G. oxyphyllum</i> D. C. var. <i>oxyphyllum</i> .....	59
Tabla No. 25 Evaluación antimicrobiana de las fracciones de Flores-metanol de <i>G. oxyphyllum</i> D. C. var. <i>oxyphyllum</i> .....	59
Tabla No. 26 Evaluación antimicrobiana de las fracciones de Hojas-hexano de <i>G. oxyphyllum</i> D. C. var. <i>oxyphyllum</i> .....	60
Tabla No. 27 Evaluación antimicrobiana de los diferentes extractos de <i>G.</i> <i>liebmannii</i> var. <i>monticola</i> .....	61
Tabla No. 28 Evaluación antimicrobiana de las fracciones de Hojas-hexano de <i>G. liebmannii</i> var. <i>monticola</i> .....	62
Tabla No. 29 Evaluación antimicrobiana de las fracciones de flores-hexano de <i>G. liebmannii</i> var. <i>monticola</i> .....	63
Tabla No. 30 Evaluación antimicrobiana de los diferentes extractos de <i>G.</i> <i>viscosum</i> Kunth.....	64
Tabla No. 31 Evaluación antimicrobiana de las fracciones de flores-hexano de <i>G. viscosum</i> Kunth.....	65
Tabla No. 32 Concentración Mínima Inhibitoria de los compuestos Aislados.....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I. Obtención de los extractos.....	25
Figura II. Fragmentación de flavonoides.....	51
Figura III. Fragmentación de flavonoides .....	52
Figura IV. Fragmentación de flavonoides.....	53

## ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro No. 1	Espectro de IR de la zoapatlina .....	80
Espectro No. 2	Espectro de masas de la zoapatlina .....	81
Espectro No. 3	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la zoapatlina .....	82
Espectro No. 4	Espectro de RMN <sup>13</sup> C de la zoapatlina .....	83
Espectro No. 5	Diagrama HETCOR de la zoapatlina .....	84
Espectro No. 6	Diagrama HETCOR de la zoapatlina .....	85
Espectro No. 7	Espectro de IR del ácido kaurenoico .....	86
Espectro No. 8	Espectro de masas del ácido kaurenoico .....	87
Espectro No. 9	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del ácido kaurenoico .....	88
Espectro No. 10	Espectro de RMN <sup>13</sup> C del ácido kaurenoico .....	89
Espectro No. 11	Diagrama HETCOR del ácido kaurenoico .....	90
Espectro No. 12	Diagrama HETCOR del ácido kaurenoico .....	91
Espectro No. 13	Espectro de IR del 13-epiesclareol .....	92
Espectro No. 14	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del 13-epiesclareol .....	93
Espectro No. 15	Espectro de RMN <sup>13</sup> C del 13-epiesclareol .....	94
Espectro No. 16	Espectro de masas del 13-epiesclareol .....	95
Espectro No. 17	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la luteolina y 3-metoxiquercetina .....	96
Espectro No. 18	Espectro de masas de la luteolina y 3-metoxiquercetina .....	97
Espectro No. 19	Cromatograma de la mezcla de $\beta$ -sitosterol y Estigmasterol .....	98
Espectro No. 20	Espectro de masa del $\beta$ -sitosterol .....	99
Espectro No. 21	Espectro de masa del estigmasterol .....	100
Espectro No. 22	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la mezcla de $\beta$ -sitosterol y Estigmasterol .....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS

$[\alpha]_D$	rotación específica
$^{\circ}\text{C}$	grados centígrados
$\text{CDCl}_3$	cloroformo deuterado
$\text{CHCl}_3$	cloroformo
cm	centímetros
$\text{cm}^{-1}$	centímetros a la menos uno
d	señal doble
$\delta$	desplazamiento químico
EMIE	espectometría de masas por impacto electrónico
eV	electronvolts
g	gramos
mL	mililitro
$\mu\text{L}$	microlitro
HETCOR	correlación espectroscópica heteronuclear $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ bidimensional
Hz	hertz
IR	infrarrojo
J	constante de acoplamiento
Kg	kilogramo
m/z	masa/carga
$\text{M}^+$	ión molecular
MeOH	metanol
AcOEt	acetato de etilo
No.	número
OH	grupo hidroxilo
Ome	grupo metoxilo
pf	punto de fusión

---

ppm	partes por millón
RMN <sup>13</sup> C	resonancia magnética nuclear de carbono
RMN <sup>1</sup> H	resonancia magnética nuclear de hidrógeno
s	señal simple
t	señal triple
MIC	concentración mínima inhibitoria
mm	milímetros
MHz	megahertz
TMS	tetrametilsilano
DMSO	dimetilsulfóxido
FHo	extracto hexánico de flores de <i>G. oxyphyllum</i>
FMo	extracto metanólico de flores de <i>G. oxyphyllum</i>
HHo	extracto hexánico de hojas de <i>G. oxyphyllum</i>
Hex	hexano
HHI	extracto hexánico de hojas de <i>G. liebmannii</i>
FHI	extracto hexánico de flores de <i>G. liebmannii</i>
var.	variedad
FHv	extracto hexánico de flores de <i>G. viscosum</i>
lb	libra
cm <sup>2</sup>	centímetros cuadrados
TSA	soya y triplicaseína



## **I. INTRODUCCIÓN**

El empleo de las plantas con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempo inmemorial. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso de que disponían los médicos. Muchas de las especies vegetales utilizadas por sus virtudes curativas entre los antiguos egipcios, griegos y romanos pasaron a formar parte de la terapia medieval, que más tarde se vio enriquecida por los aportes del Nuevo Mundo. Dichas plantas medicinales y los remedios que entonces se utilizaban se siguen usando hoy en día.

Se estima que, mundialmente más de la mitad de la población hace uso de remedios tradicionales para la atención de algún problema de salud<sup>1</sup>. Esta tendencia es mayor en los países subdesarrollados, sin embargo, en forma extraordinaria, actualmente, en los países industrializados cada vez se están empleando más las plantas medicinales, quizás como consecuencia de la alta incidencia de problemas iatrogénicos ocasionados por medicamentos sintéticos, que como se sabe suelen producir múltiples efectos indeseables. En la última década, en estos países industrializados, el 25% de los medicamentos prescritos fueron derivados de plantas superiores.<sup>2</sup>

Actualmente, en México la medicina tradicional es una práctica común para la atención de diversas enfermedades. Esto hace necesario estudiar estas plantas desde un punto de vista científico para validar su uso y para

tratar de establecer las relaciones entre la estructura química de sus componentes y la actividad biológica y terapéutica de las plantas<sup>3</sup>.

El descubrimiento de compuestos biológicamente activos de fuentes naturales, tiene un gran interés, pues ha permitido encontrar nuevas fuentes de fármacos útiles en el tratamiento de diversas enfermedades, entre las que se incluyen las infecciosas<sup>4</sup>. La investigación en plantas medicinales puede realizarse de forma fitoquímica convencional o en forma biodirigida. La primera implica el aislamiento del mayor número de metabolitos secundarios y luego evaluar su actividad farmacológica, sin embargo, los compuestos obtenidos de este modo pueden o no tener la actividad farmacológica de la planta o extracto crudo, de tal forma que esto contribuye al estudio de las plantas medicinales, aunque no siempre cumple con el objetivo de aislar compuestos con actividad biológica.

Los métodos biodirigidos permiten el aislamiento de sustancias activas, ya que desde el fraccionamiento de los extractos se van descartando aquéllos que no muestran actividad y los que muestran actividad se separan y purifican. Para realizar este tipo de estudio pueden tomarse dos criterios básicos: Uno mediante un cernimiento o "*screening*" farmacológico, o mediante la validación del efecto terapéutico tradicional.<sup>5</sup>

El "*screening*" farmacológico es un proceso selectivo que implica probar gran número de plantas medicinales con objeto de determinar si tienen o no una actividad farmacológica determinada. También puede realizarse utilizando un grupo de pruebas para evaluar algunos tipos concretos de actividad. Para este tipo de estudio, la selección de las plantas a probar puede efectuarse mediante diversos criterios, ya sea mediante la

selección completamente al azar, en función del contenido de tipos de compuestos químicos, o bien, con base en el uso reportado en la medicina tradicional.

Para validar el efecto terapéutico tradicional de las plantas medicinales, es necesario someterlas a diversos ensayos farmacológicos, tanto en sistemas *in vitro* como en sistemas *in vivo*. Este trabajo se realiza en forma interdisciplinaria basado principalmente en la etnobotánica, farmacología y fitoquímica.

El "*screening*" farmacológico permite encontrar plantas con actividad biológica, sin embargo, la validación del efecto terapéutico tradicional contribuye a evaluar la seguridad y eficacia de las plantas medicinales<sup>5</sup>.

En años recientes se han realizado diversos estudios de plantas medicinales relacionados con la evaluación antimicrobiana<sup>3,6-10</sup>. En el presente trabajo se realizó un estudio biodirigido de tres plantas del género *Gnaphalium*, para encontrar compuestos con actividad antimicrobiana. La evaluación biológica se realizó empleando la técnica de difusión en agar y la elucidación estructural de las sustancias bioactivas mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales.

## II. ANTECEDENTES DEL GÉNERO *Gnaphalium*

### 2.- ANTECEDENTES BOTÁNICOS.

Las plantas del género *Gnaphalium*, conocidas popularmente con el nombre de "gordolobo", pertenecen a la familia de las compuestas o *Compositae*, la cual, es una de las familias de angiospermas más numerosas: comprende 1100 géneros y 25000 especies, la mayoría de sus miembros son arbustos o hierbas de hojas persistentes, plantas herbáceas vivaces con raíces tuberosas, anuales o bianuales. Se distribuyen por todo el mundo a excepción de los territorios antárticos. Están bien representadas en las regiones semiáridas de los trópicos y subtrópicos como la región mediterránea, México, región del cabo en África del sur y sabanas arboladas, arbustivas y herbáceas de África, Sudamérica y Australia. Las plantas de la familia *Compositae* tienen hojas alternas y opuestas, raramente verticiladas, sin estípulas, simples, con nervaduras pinnadas o palmeadas, sentadas o pecioladas, en su mayoría con base auriculada o envainadora aunque bien pueden ser dentadas. Esta familia se caracteriza por tener canales resiníferos o vasos laticíferos<sup>11, 12</sup>.

El género *Gnaphalium* comprende 230 especies distribuidas por todo el mundo<sup>13</sup>. Son subarbustos o hierbas anuales, bianuales o perennes, lanosas o lanoso-glandulosas, de tallos erectos, procumbentes o decumbentes, nula o profusamente ramificados; con hojas alternas, enteras, generalmente sésiles, frecuentemente decurrentes, semiamplexicaules o semiamplexicaules y decurrentes, de lineares a oblongas lanceoladas u obovadas, bicoloras o concoloras; poseen inflorescencia compuesta de cabezuelas solitarias o más

frecuentemente de glomérulos de cabezuelas arreglados en forma solitaria, corimbosa, corimbosa-paniculada, paniculada o espiciforme; involucre cilíndrico a globoso, con bracteadas escariosas e imbricadas arregladas en varias series, lanosas o globosas, de color blanquecino, amarillento, café o rojizo, hialinas y brillantes u opacas; receptáculo desnudo, plano o convexo; con flores en número mayor que 10, tubulosas, las centrales hermafroditas, gruesas, pentadentadas en el ápice, las periféricas femeninas, filiformes, 3-4-dentadas en el ápice, con corolas amarillas, cafés, verdoso-blanquecinas, blancas o rojizo-purpúreas, anteras sagitadas y candadas en la base; ramas del estilo de las flores hermafroditas delgadas y truncadas en el ápice, aquenios de 0.5 a 1.5 mm de largo, estrechamente elípticos, obovados u oblongos, cilíndricos o comprimidos, con pelos blanquecinos o glabros, vilano formado de cerdas capilares blanquecinas o doradas, libres, o bien, unidas en grupos o todas a manera de anillo en la base<sup>14, 15</sup>.

En nuestro País se les encuentra predominantemente en sitios montañosos, alpinos o en zonas semisecas, frecuentemente como elementos de vegetación secundaria o francamente como malezas, encontrándose la mayor diversidad en las zonas montañosas, en coincidencia con los patrones generales de distribución y diversidad de las compuestas<sup>16</sup>.

*G. oxyphyllum* D.C. var. *oxyphyllum*, es una hierba anual o perenne hasta de 60 cm de alto, con tallos de indumento hirsuto-glanduloso-aracnoideo que generalmente no imparte un color blanquecino al tallo; hojas en roseta basal y caulinares o solamente caulinares oblongas u oblongo-lanceoladas de 1 a 10 cm de largo, ápice romo a agudo, borde plano o repando, base auriculada y brevemente o no decurrente, concoloras o levemente bicoloras, con indumento hirsuto esparcido o hirsuto aracnoideo

laxo en el envés, éste en ocasiones glabro. Ampliamente distribuída en las zonas montañosas más húmedas, de 2500 a 3000 m de altura. Bosques de coníferas y encinares. Se distribuye desde el sur de Estados Unidos hasta Guatemala<sup>14</sup>.

*G. liebmannii* Sch. Bip. var. *monticola*, es una hierba anual o perenne de 10 a 150 cm de alto, de ramificación nula o profusa, en ocasiones rizomatosa; tallo con indumento lanoso o aracnoideo; roseta basal presente o ausente, sus hojas pecioladas a sésiles, estrechamente elípticas u oblanceoladas, de 2 a 9 cm de largo y de 0.5 a 1.5 cm de ancho, ápice romo a agudo, base atenuada, concoloras, con indumento lanoso, margen liso, sésiles, no auriculadas ni decurrentes, concoloras; inflorescencia glomerular simple o corimbosa congesta; cabezuelas acampanadas, de 3 a 9 mm de largo y 2.5 a 7 mm de diámetro, de color café dorado, café-rojizo o café – amarillento. Altura de 2400-4200 m. Bosques de pino, praderas alpinas. Se distribuye de la parte central de México a Costa Rica<sup>14</sup>.

*G. viscosum* Kunth, es una hierba anual o bianual de 20 a 80 cm de alto, tallos simples o medianamente ramificados, densamente hojosos por lo general; tallos erectos de indumento hirsuto-glanduloso en su mayor parte y aracnoideo-hirsuto en su parte posterior; hojas estrechamente sagitadas, linear-lanceoladas, oblongo-lanceoladas o raras veces oblanceoladas, de 15 a 80 mm de largo y de 1 a 5 mm de ancho, ápice agudo a acuminado o raras veces obtuso apiculado, margen generalmente revoluto, base decurrente a largamente decurrente, bicoloras, con el haz verde densa a escasamente hirsuto-glanduloso y el envés blanco con indumento lanoso; inflorescencia glomerular simple o corimbosa; cabezuelas anchamente acampanadas, de 4 a 5 mm de alto y 5 a 7 mm de diámetro, con 4 a 5 series brácteas, cuyo

número varía entre 39 y 60, las exteriores ovado-lanceoladas a espatuladas, de ápice agudo a obtuso, lanosa, las interiores linear-lanceoladas a oblongas o casi espatuladas, de ápice agudo a acuminado, lanosas, todas las brácteas de color amarillo claro o blanquecino amarillento, translúcidas y lustrosas; con 5 a 25 flores hermafroditas y 170 a 280 flores femeninas, ambos tipos de  $\pm 3$  mm de largo, de corola amarilla, en ocasiones con el ápice café; aquenios oblongos a estrechamente obovados, de 0.5 a 0.7 mm de largo, de color café, comprimidos de textura papilada. Especie ampliamente distribuida en el Valle de México, en alturas de 2250-3000 m<sup>14</sup>.

## 2.1.- ANTECEDENTES ETNOBOTÁNICOS.

Dentro de los estudios etnobotánicos realizados en México de plantas de éste género se describen las siguientes especies como medicinales:<sup>17, 18.</sup>

- *G. conoideum* HBK, conocida como gordolobo en el estado de Sinaloa, es empleada contra el dolor de garganta, diarrea y tos.
- *G. inornatum* D. C. Conocida como gordolobo en Villa Hgo., Oaxaca, es utilizada para el dolor en general.
- *G. viscosum* Kunth, es utilizada contra la úlcera en Quimixtlan, Puebla y se le conoce como conelilia.
- *G. semiamplexicaule* se utiliza contra la tos, principalmente, en el centro del país, aunque también se emplea en la bronquitis e irritación de garganta.

- *G. attenuatum* D. C., se emplea en Michoacán para quitar el dolor de estómago y el espasmo, en Oaxaca contra la gastritis y en Puebla para aliviar el dolor de estómago. Se utiliza también contra trastornos respiratorios como tos, ronquera y gripa.
- *G. chartaceum greenmax*, se utiliza en el centro del país contra la tos junto con mercadela. El cocimiento de la planta sola se utiliza en infusión para lavar heridas.
- *G. conoideum* Kunth se emplea en el estado de México y Michoacán y se indica su uso en enfermedades respiratorias, como tos, gripa o bronquitis. Su uso implica hacer un cocimiento de las flores y hojas que se endulza con miel y se toma caliente de preferencia por las noches.
- *G. oxyphyllum* D. C., se emplea en los estado de Hidalgo, Morelos, Puebla, Tlaxcala, Michoacán y Sonora, contra la tos, infecciones de la garganta y bronquitis. Se emplea también en algunos trastornos gástricos, tal como el tratamiento de úlceras, dolor y parásitos intestinales.
- *G. salicifolium* conocida como gordolobo y originaria de México y Guatemala, es empleada en la medicina tradicional para disminuir hinchazones, calambres y tos, así como para curar heridas<sup>19</sup>.

En otros lugares fuera de México también se han realizado estudios etnobotánicos en plantas del género *Gnaphalium*, tales son los casos de:

- *G. pellitum*, es usada como planta ornamental en Colombia y en la medicina tradicional se emplea para reducir la inflamación<sup>20</sup>.



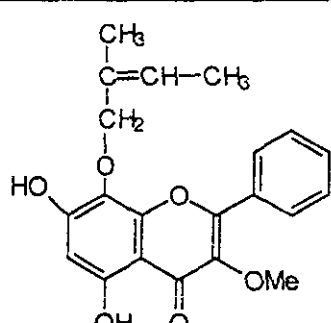
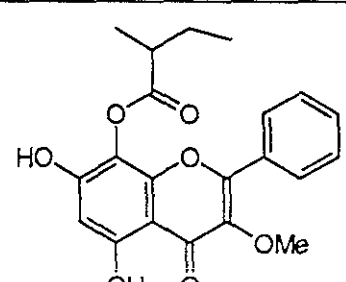
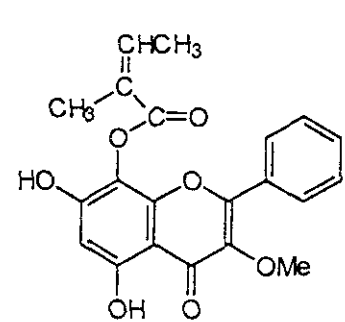
- *G. graveolens*, también de origen Colombiano y conocida popularmente con el nombre de Vira- vira es empleada para curar infecciones de la piel y como antiinflamatorio<sup>20</sup>.
- *G. elegans* HBK, originaria de Colombia, es comúnmente empleada para disminuir la inflamación de próstata y contra el cáncer<sup>21</sup>.

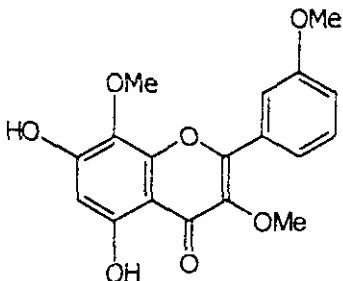
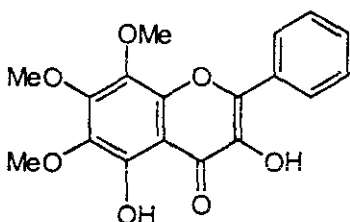
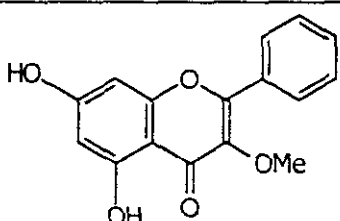
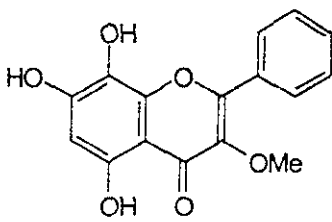
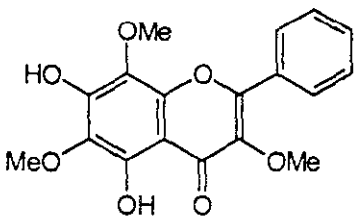
## 2.2.- ANTECEDENTES QUÍMICOS.

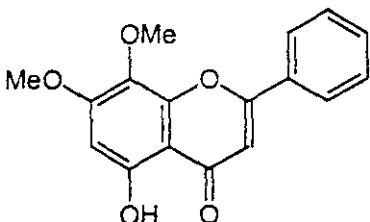
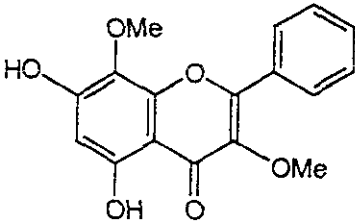
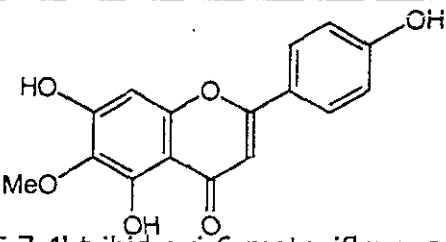
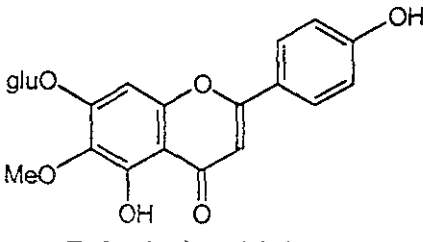
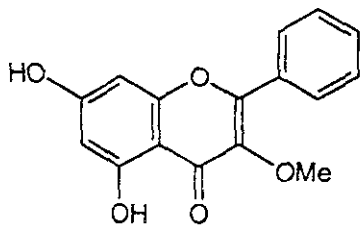
Diversas especies del género *Gnaphalium* han sido estudiadas desde el punto de vista fitoquímico. Sin embargo de estas especies estudiadas, la gran mayoría no han sido colectadas en México. Así, del exudado resinoso de *G. robustum* se han aislado diversas flavonas<sup>22, 23</sup>; de *G. elegans* se aisló una flavona<sup>21</sup>; de *G. pellitum* se han aislado diterpenos<sup>20</sup> y flavonas<sup>24, 25</sup>, de *G. graveolens* se aislaron diterpenos<sup>20</sup>; de *G. lanuginosum*, se aisló gnaphaliina<sup>26</sup>; de *G. rufescens* se aislaron diterpenos y flavonoides<sup>27</sup>; de *G. antennarioides*, se aisló hispidulina y el derivado 7-glicósido<sup>27</sup>; de *G. undulatum* se han aislado derivados acetilénicos, diterpenos y sesquiterpenos<sup>28</sup>, de *G. oligandrum*, se aislaron diterpenos y sesquiterpenos<sup>29</sup>, de *G. declinatum* se aislaron derivados acetilénicos<sup>29</sup>, de *G. gracile* HBK se aislaron flavonas<sup>30</sup>, de *G. cheriranthifolium* se aislaron flavonoides<sup>31</sup>.

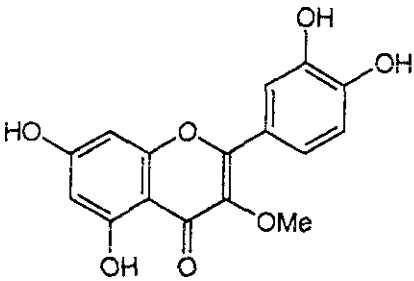
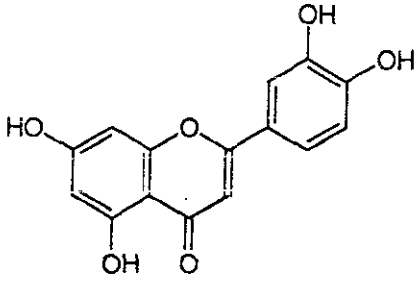
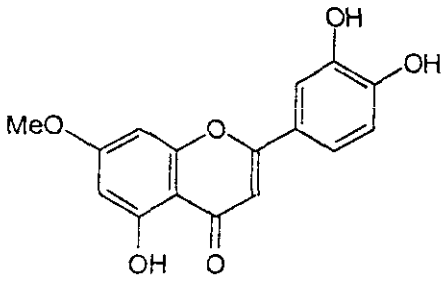
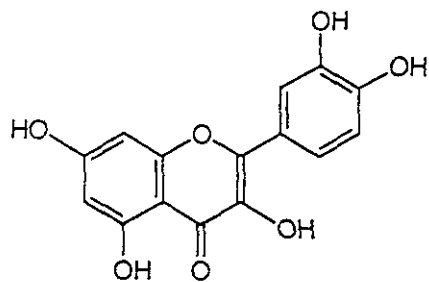
En la tabla No. 1 se indican los compuestos químicos que se han aislado de plantas del genero *Gnaphalium*.

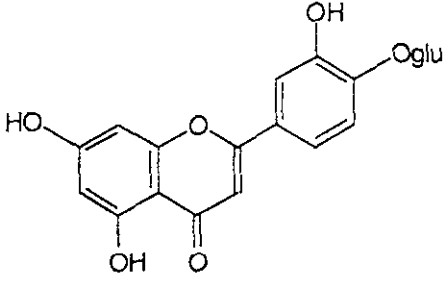
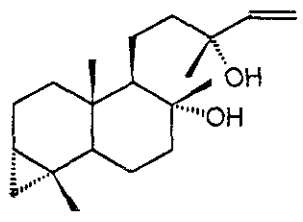
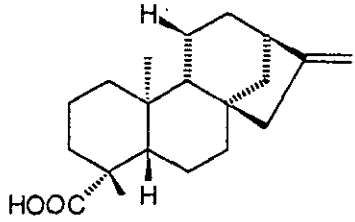
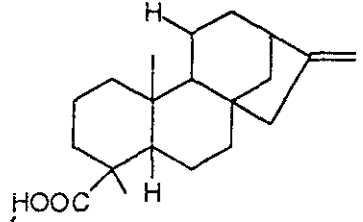
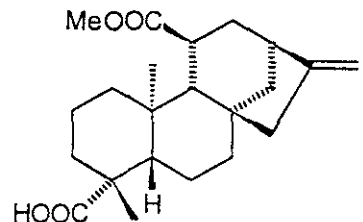
**TABLA NO. 1 METABOLITOS AISLADOS DE PLANTAS DEL GENERO *Gnaphalium***

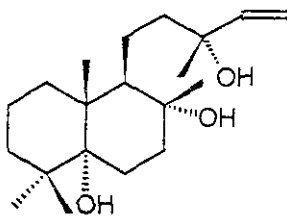
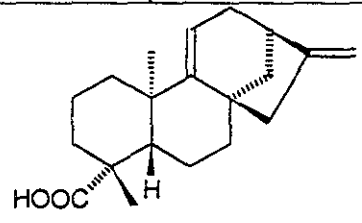
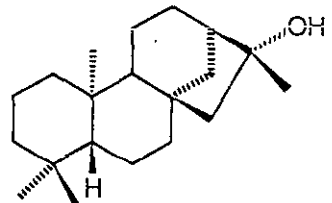
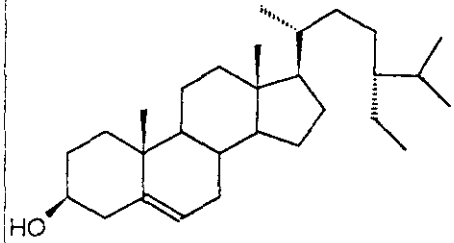
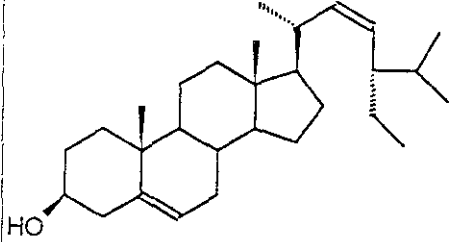
COMPUESTO	ESPECIE	ORIGEN	REF.
 <p>8-O-(2-metil-2-butenoil)-5,7-dihidroxi-3-metoxiflavona</p>	<i>G. robustum</i>	Chile	26
 <p>8-O-(2-metilbutirato)-5,7-dihidroxi-3-metoxiflavona</p>	<i>G. robustum</i>	Chile	22
 <p>8-O-[(Z)-2-metil-2-butenato]-5,7-dihidroxi-3-metoxiflavona</p>	<i>G. robustum</i>	Chile	22

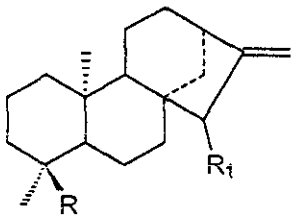
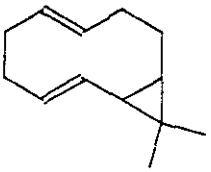
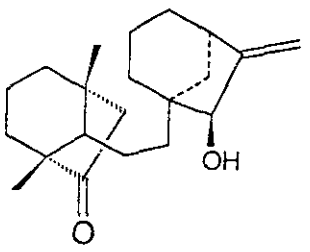
COMPUESTO	ESPECIE	ORIGEN	REF.
 <p>3'-metoxignaphaliina</p>	<i>G. robustum</i>	Chile	22
 <p>3,5-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona</p>	<i>G. robustum</i>	Chile	22
 <p>3-metoxigalangina</p>	<i>G. robustum</i>	Chile	22
 <p>5,7,8-trihidroxi-3-metoxiflavona</p>	<i>G. robustum</i>	Chile	22
 <p>5,7-dihidroxi-3,6,8-trimetoxiflavona</p>	<i>G. elegans</i>	Colombia	21

COMPUESTO	ESPECIE	ORIGEN	REF.
 <p>5-hidroxi-7,8-dimetoxiflavona</p>	<i>G. pellitum</i>	Colombia	24 25
 <p>5,7-dihidroxi-3,8-dimetoxiflavona (gnaphalliina)</p>	<i>G. lanuginosum</i> <i>G. gracile HBK</i> <i>G. semiamplexicaule D.C.</i> <i>G. robustum</i> <i>G. cheranthifolium</i>	Colombia Colombia México Chile Bolivia	26 30 16 22 31
 <p>5,7,4'-trihidroxi-6-metoxiflavona (Hispidulina)</p>	<i>G. antennarioides</i>	Colombia	27
 <p>7-O-glu-hispidulina</p>	<i>G. antennarioides</i>	Colombia	27
 <p>5,7-dihidroxi-3-metoxiflavona</p>	<i>G. gracile HBK</i>	Colombia	30

COMPUESTO	ESPECIE	ORIGEN	REF.
 <p>3-metoxiquercetina</p>	<p><i>G. pellitum</i></p> <p><i>G. gracile HBK</i></p>	<p>Colombia</p> <p>Colombia</p>	<p>25</p> <p>30</p>
 <p>Luteolina</p>	<p><i>G. rufescens</i></p>	<p>Colombia</p>	<p>27</p>
 <p>7-metoxiluteolina</p>	<p><i>G. rufescens</i></p>	<p>Colombia</p>	<p>27</p>
 <p>Quercetina</p>	<p><i>G. pellitum</i></p>	<p>Colombia</p>	<p>25</p>

COMPUESTO	ESPECIE	ORIGEN	REF.
 <p>4'-O-glucósido de luteolina</p>	<i>G. cheranthifolium</i>	Bolivia	31
 <p>13-epicicloesclareol</p>	<i>G. pellitum</i> <i>G. graveolens</i> <i>G. viscosum kunt</i>	Colombia Colombia México	 20 32
 <p>Ácido-(-)-16-kauren-19-oico</p>	<i>G. pellitum</i> <i>G. graveolens</i> <i>G. oligandrum</i>	Colombia Colombia	29 20
 <p>Ácido-(+)-16-kauren-19-oico</p>	<i>G. rufescens</i>	Colombia	27
 <p>Ácido-(-)-11(β)-acetoxi-16-kauren-19-oico</p>	<i>G. pellitum</i> <i>G. rufescens</i> <i>G. semiamplexicaule</i> D.C.	Colombia Colombia México	20 27 32

COMPUESTO	ESPECIE	ORIGEN	REF.
 13-epiesclareol	<i>G. pellitum</i> <i>G. graveolens</i> <i>G. viscosum</i> Kunt	Colombia Colombia México	20 32
 Ac.-(-)-11,16-kauradien-19-oico	<i>G. oligandrum</i>		29
 Kauranol	<i>G. semiamplexicaule</i> <i>G. rufescens</i>	México Colombia	32 27
 β-sitosterol	<i>G. pellitum</i> <i>G. graveolens</i> <i>G. semiamplexicaule</i>	Colombia Colombia México	20 32
 Estigmasterol	<i>G. pellitum</i> <i>G. graveolens</i> <i>G. semiamplexicaule</i>	Colombia Colombia México	20

COMPUESTO	ESPECIE	ORIGEN	REF.
(+)-pinitol	<i>G. pellitum</i>	Colombia	25
 <p>R COOH CHO</p> <p>R<sub>1</sub> OH OH</p>	<i>G. undulatum</i>		28
	<i>G. undulatum</i>		29
	<i>G. undulatum</i>		29



### 2.3.- ANTECEDENTES FARMACOLÓGICOS.

Aunque algunas plantas del género *Gnaphalium*, se han estudiado desde el punto de vista químico, son muy pocos los estudios que permiten validar su uso tradicional. Solamente las siguientes especies se han estudiado desde el punto de vista farmacológico.

- De *G. robustum*, una especie de origen chileno, se aisló 8-O-(2-metil-2-butenoil)-5,7-dihidroxi-3-metoxi flavona y se comprobó que tiene actividad antimicrobiana contra *E. coli*.<sup>23</sup>.
- *G. stramineum* y *G. viscosum*, conocidas popularmente en Guatemala con el nombre de sanalotodo, inhiben el crecimiento de *S. aureus* la primera, y *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* la segunda<sup>10</sup>.
- Los extractos etéreos de *G. gracile* inhiben el crecimiento de *S. aureus*<sup>30</sup>.
- El extracto etanólico de *G. indicum* inhibe la concepción en ratas en un 50%.<sup>33</sup>.
- *G. semiamplexicaule* se estudio como posible antitusígeno, encontrándose que no tiene efectos significativos como tal<sup>34</sup>.

### III. OBJETIVOS

#### 3. OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos y compuestos puros aislados de *Gnaphalium oxyphyllum* D.C. var. *oxyphyllum*, *Gnaphalium liebmannii* Sch. Bip. var. *monticola* y *Gnaphalium viscosum* Kunth.

#### 3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Documentar los aspectos generales, etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos de las especies *G. oxyphyllum* D.C. var. *oxyphyllum*, *Gnaphalium liebmannii* Sch. Bip. var. *monticola* y *Gnaphalium viscosum* Kunth.
- Preparar los extractos del material vegetal, de las especies de *Gnaphallium* antes mencionadas.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos del material vegetal.
- Realizar el fraccionamiento de los extractos que muestren actividad antimicrobiana.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas a partir de los extractos crudos.

- Separar y purificar los compuestos presentes en las fracciones activas mediante el empleo de técnicas cromatográficas convencionales.
- Realizar la determinación estructural de los compuestos presentes en las fracciones activas, mediante el empleo de métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de los compuestos puros.

## IV. JUSTIFICACIÓN

El empleo de las plantas con fines medicinales es probablemente tan antiguo como el hombre mismo. Desde tiempos remotos se han utilizado extractos vegetales y productos derivados de estos para atender diversas enfermedades infecciosas. Aunque el uso de estas disminuyó debido a la gran cantidad de antibióticos derivados de microorganismos y sus análogos semisintéticos, en años recientes ha resurgido el interés por los agentes antimicrobianos derivados de plantas. De tal modo que empleando técnicas de microbiología se puede demostrar que los extractos de plantas de varios géneros y familias poseen actividad antimicrobiana.

En México existen plantas empleadas en la medicina tradicional para el tratamiento de diversos padecimientos infecciosos. En relación con el género *Gnaphalium* se ha evaluado la actividad antimicrobiana de algunas especies, tales como *G. gracile* HBK<sup>21</sup>, *G. stramineum*<sup>10</sup>, las cuales muestran actividad contra *S. aureus* y *G. viscosum*<sup>10</sup>, que es activa, además, contra *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*. Sin embargo en estos trabajos no se determinaron los metabolitos responsables de dicha actividad. Por otra parte, las especies del género *Gnaphalium* seleccionadas para trabajar, son abundantes en los municipios de Epazoyucan y Mineral del Monte, estado de Hidalgo y ampliamente usadas por la población para atender problemas de vías respiratorias, tales como tos e irritación de garganta. Considerando que éstas pueden ser causada por algún proceso infeccioso<sup>35-38</sup>, como en la laringitis, bronquitis y neumonía, se decidió efectuar un estudio químico biodirigido para encontrar el metabolito o metabolitos responsables de dicha actividad antimicrobiana.

## V. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.- MATERIALES Y MÉTODOS

#### 5.1.- MATERIAL VEGETAL

##### 5.1.1.- *G. oxyphyllum* D.C. var. *oxyphyllum*

Esta planta fue colectada en el municipio de Mineral del Monte, estado de Hidalgo. Se colectaron tallos, hojas y flores, el día 8 de octubre de 1997. Una muestra de esta planta fue depositada en el herbario nacional (MEXU), en el Instituto de Biología de la UNAM.

##### 5.1.2.- *G. liebmanii* Sch. Bip. var. *monticola*

Esta planta fue colectada en el municipio de Mineral del Monte en el Estado de Hidalgo. Se colectaron tallos, hojas y flores, el día 14 de marzo de 1998. Una muestra de esta planta fue depositada en el herbario nacional (MEXU), en el Instituto de Biología de la UNAM.

##### 5.1.3.- *G. viscosum* Kunth

Esta planta fue colectada en el municipio de Epazoyucan en el Estado de Hidalgo. Se colectaron tallos, hojas y flores, el día 16 de septiembre de 1998. Una muestra de esta planta fue depositada en el herbario nacional (MEXU), en el Instituto de Biología de la UNAM.

## **5.2.- PARTE QUÍMICA**

### **5.2.1.-Análisis cromatográfico**

Para la cromatografía en columna se utilizó gel de sílice 60, tamaño de partícula 0.063-0.2 mm, como fase estacionaria, en columnas de vidrio de diferentes capacidades, siguiendo las técnicas convencionales.

Para el análisis cromatográfico cualitativo en capa fina, se emplearon placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck) con un espesor de 0.25 mm con indicador de fluorescencia. Para desarrollar los cromatogramas se utilizaron diversos sistemas de elución y agentes cromógenos como reveladores, los cuales se resumen en las tablas 2 y 3.

### **5.2.2.- Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.**

Los puntos de fusión (°C) fueron obtenidos en un equipo Büchi B-545 y no están corregidos.

Las rotaciones ópticas se determinaron en un polarímetro Perkin-Elmer modelo 241, a 18°C, en celdas de 10 mL y empleando CHCl<sub>3</sub> como disolvente.

Los espectros de masas se determinaron en un equipo Hewlett Packard 5890 serie II, con un voltaje de 70 eV para el registro, acoplado a un cromatógrafo de gases.

Los espectros de resonancia magnética de protones se determinaron en un equipo Varian XL-300 GS a 300 MHz. Para la resonancia magnética de carbono se empleo el mismo equipo a 75 MHz, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y como disolvente cloroformo deuterado, agua deuterada y dimetil sulfóxido deuterado, según se indique en cada caso.

**TABLA 2.-** Sistemas de elución empleados para los análisis cromatográficos

COMPOSICIÓN	PROPORCIÓN
Hexano	100%
Hexano-acetato de etilo	Diversas
Acetato de etilo-metanol	Diversas
Cloroformo-metanol	Diversas

**TABLA 3.-** Agentes cromógenos utilizados para los análisis de cromatografía en capa fina

AGENTE CROMÓGENO	REACTIVOS	REFERENCIA
Sulfato cérico	12 g de sulfato cérico 22 mL de ácido sulfúrico 350 g de hielo	39
Yodo	Yodo elemental	40
Luz ultravioleta	Lámpara de luz ultravioleta Spectroline, Modelo CX-20 (254 y 365 nm).	40

Los espectros de infrarrojo se determinaron en un espectrofotómetro FT-IR Perkin-Elmer 200, en película y en pastilla de bromuro de potasio.

### 5.2.3.- EXTRACCIÓN.

El material vegetal secado a temperatura ambiente y molido en un molino eléctrico de cuchillas, se sometió al proceso de extracción mediante maceración con diferentes disolventes en orden de polaridad ascendente a temperatura ambiente por un periodo de 3 días cada uno, como se indica en la figura No. 1, obteniéndose los extractos indicados en las tablas 4, 5, y 6, después de evaporar el disolvente por destilación a presión reducida.

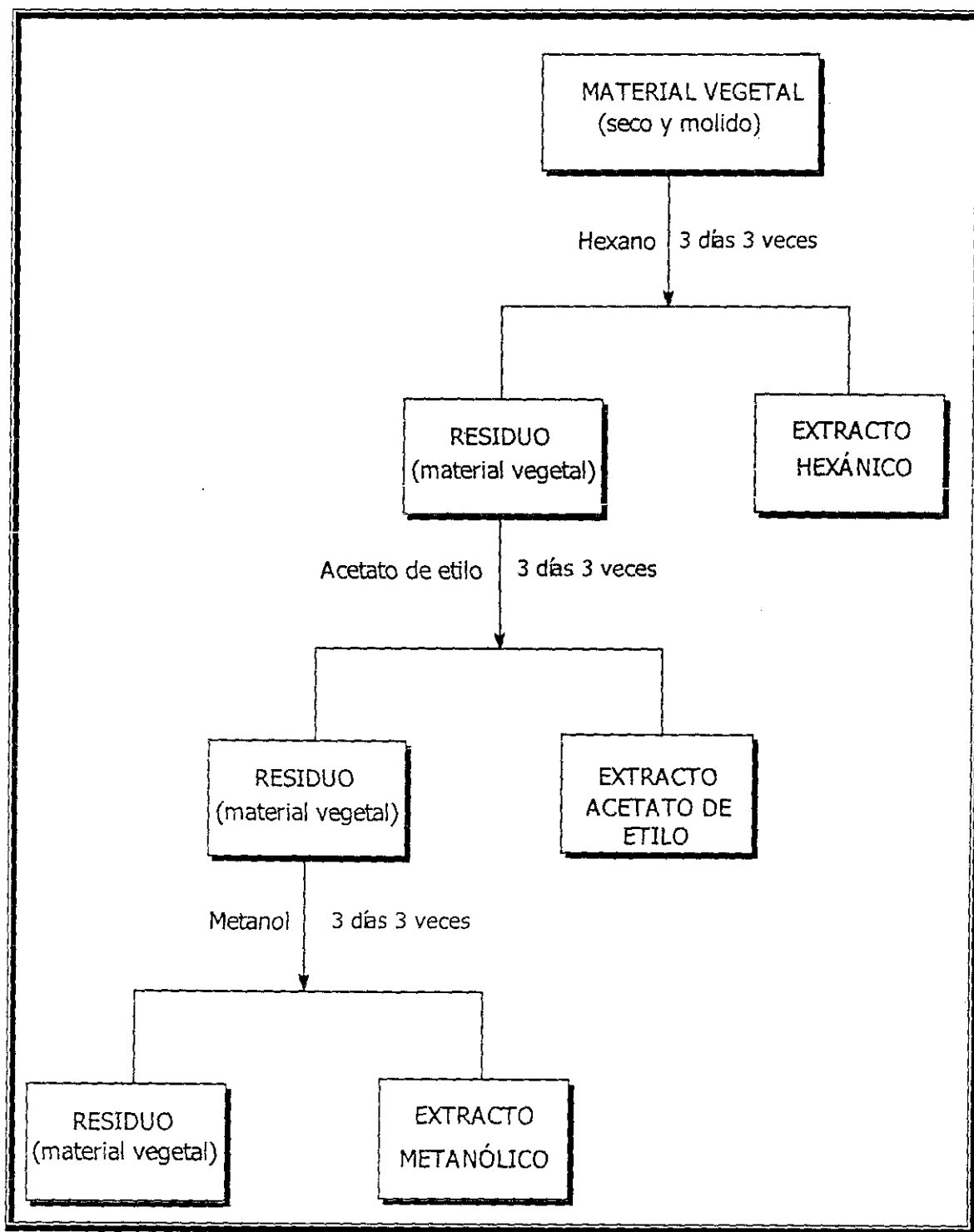
**TABLA 4.-** Extractos Obtenidos de *G. oxyphyllum* DC. var. *oxyphyllum*

Disolvente	Hojas secas (1168g)	Tallos secos (1150g)	Flores secas (150g)
Hexano	18.4g	5.1g	12.3g
AcOEt	28.1g	6.2g	1.3g
MeOH	35.7g	15.4g	45.7g

**TABLA 5.-** Extractos Obtenidos de *G. liebmannii* Sch. Bip. var. *monticola*

Disolvente	Hojas secas (566g)	Tallos secos (874g)	Flores secas (235g)
Hexano	19.1g	10.043g	6.96g
AcOEt	8.812g	6.7396g	3.02g
MeOH	13.9981g	18.8012g	59.5g



**FIGURA No. 1** Obtención de los extractos

**TABLA 6.-**Extractos Obtenidos de *G. viscosum* Kunth

Disolvente	Hojas secas (752g)	Flores secas (685g)
Hexano	31.8743 g	32.18 g
AcOEt	22.2882 g	14.615 g
MeOH	53.833 g	103.748 g

### 5.3.- AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

#### 5.3.1.- *G. oxyphyllum* D. C. var. *oxyphyllum*.

Los extractos que mostraron actividad antimicrobiana cualitativa por el método de difusión en agar fueron los siguientes:

Flores, extraídas con hexano (FHo)

Flores, extraídas con metanol (FMo)

Hojas, extraídas con hexano (HHo)

#### • EXTRACTO HEXÁNICO DE FLORES:

10 g de extracto hexánico de las flores se fraccionaron en una columna cromatográfica utilizando como adsorbente 120 g de gel de sílice. El proceso de elución se realizó con hexano y hexano-acetato de etilo en diferentes proporciones. Se colectaron 117 fracciones de 125 mL cada una. Cada una de las fracciones se analizó por cromatografía en capa fina y se combinaron todas aquéllas con similitud cromatográfica, lo cual originó 6 fracciones, indicadas en la tabla No. 7.

**TABLA No. 7.**-Fracciones obtenidas del extracto hexánico de flores de  
*G. oxyphyllum* D.C. var. *oxyphyllum*

ELUYENTE	PROPORCIÓN ( % )	No. DE FRACCIÓN	FRACCIONES REUNIDAS	CLAVE
Hexano	100	1-19	1-12	FHo-1
Hex/AcOEt	90-10	20-36	13-43	FHo-2
Hex/AcOEt	80-20	37-74	44-76	FHo-3
Hex/AcOEt	70-30	75-85	77-90	FHo-4
Hex/AcOEt	60-40	86-95	91-114	FHo-5
Hex/AcOEt	50-50	96-105	114-117	FHo-6
Hex/AcOEt	40-60	106-110		
Hex/AcOEt	30-70	111-113		
Hex/AcOEt	20-80	113-116		
Hex/AcOEt	10-90	117		

De las fracciones FHo-2 se aisló el compuesto (1) y de FHo-3 se aislaron un compuesto un puro (2) y una mezcla de dos compuestos (6 Y 7).

#### • EXTRACTO METANÓLICO DE FLORES:

41.3 g de extracto metanólico de las flores se fraccionaron en una columna cromatográfica utilizando como adsorbente 250 g de gel de sílice. El proceso de elución se realizó con cloroformo y cloroformo-metanol en diferentes proporciones. Se colectaron 214 fracciones de 250 mL cada una. Cada una de las fracciones se analizó por cromatografía en capa fina y se combinaron todas aquéllas con similitud cromatográfica, lo cual originó 10 fracciones, indicadas en la tabla No. 8.

**TABLA No. 8.**-Fracciones obtenidas del extracto metanólico de flores de  
*G. oxyphyllum* D.C. var. *oxyphyllum*

ELUYENTE	PROPORCIÓN ( % )	No. DE FRACCIÓN	FRACCIONES REUNIDAS	CLAVE
Cloroformo	100	1-30	1-54	FMo-1
Cloroformo/MeOH	98-2	31-48	55-93	FMo-2
Cloroformo/MeOH	97-3	49-76	94-102	FMo-3
Cloroformo/MeOH	96-4	77-109	103-125	FMo-4
Cloroformo/MeOH	95-5	110-130	126-169	FMo-5
Cloroformo/MeOH	90-10	131-165	170-214	FMo-6
Cloroformo/MeOH	80-20	166-186	183-214	FMo-7
Cloroformo/MeOH	70-30	187-199		
Cloroformo/MeOH	50-50	200-208		
Cloroformo/MeOH	10-90	209-214		

De la fracción FMo-2 se aisló el compuesto (4) y el compuesto (5).

• **EXTRACTO HEXÁNICO DE HOJAS:**

16 g de extracto hexánico de las hojas se fraccionaron en una columna cromatográfica utilizando como adsorbente 160 g de gel de sílice. El proceso de elución se efectuó con hexano y hexano-acetato de etilo en diferentes proporciones. Se colectaron 125 fracciones de 150 ml cada una. Cada una de las fracciones se analizó por cromatografía en capa fina y se combinaron todas aquellas con similitud cromatográfica, lo cual originó 7 fracciones, indicadas en la tabla No. 9.

**TABLA No. 9.-** Fracciones obtenidas del extracto hexánico de hojas de  
*G. oxyphyllum* D.C. var. *oxyphyllum*

ELUYENTE	PROPORCIÓN ( % )	No.DE FRACCIÓN	FRACCIONES REUNIDAS	CLAVE
Hexano	100	1-6	1-7	HHo-1
Hex/AcOEt	90-10	7-12	8-14	HHo-2
Hex/AcOEt	80-20	13-29	15-18	HHo-3
Hex/AcOEt	70-30	30-47	19-39	HHo-4
Hex/AcOEt	60-40	48-61	40-59	HHo-5
Hex/AcOEt	50-50	62-75	60-95	HHo-6
Hex/AcOEt	40-60	76-81	96-125	HHo-7
Hex/AcOEt	30-70	82-87		
Hex/AcOEt	20-80	88-99		
Hex/AcOEt	10-90	100-115		
AcOEt	100	116-121		
AcOEt/MeOH	90-10	122-125		

De la fracción HHo-2 se aislaron dos compuestos (1 y 2). De HHo-3, se aisló la mezcla de compuestos (6 Y 7) y de HHo-5 se aisló el compuesto (3).

### 5.3.2.- *G. liebmannii* Sch. Bip. var. *monticola*

Los extractos que mostraron actividad cualitativa antimicrobiana significativa por el método de difusión en agar fueron los siguientes:

Hojas, extraídas con hexano (HHI)

Flores, extraídas con hexano (FHI)

• **EXTRACTO HEXÁNICO DE HOJAS:**

17.3 g de extracto hexánico de las hojas se fraccionaron en una columna cromatográfica utilizando como adsorbente 170 g de sílica gel. El proceso de elución se realizó con hexano y hexano-acetato de etilo en diferentes proporciones. Se colectaron 78 fracciones de 150 mL cada una. Cada una de las fracciones se analizó por cromatografía en capa fina y se combinaron todas aquéllas con similitud cromatográfica, lo cual originó 6 fracciones, indicadas en la tabla No. 10.

**TABLA No. 10.-** Fracciones obtenidas del extracto hexánico de hojas de *G. liebmannii* Sch. Bip. var. *monticola*

ELUYENTE	PROPORCIÓN ( % )	No.DE FRACCIÓN	FRACCIONES REUNIDAS	CLAVE
Hexano	100	1-9	1-14	HHI-1
Hex/AcOEt	90-10	10-22	15-21	HHI-2
Hex/AcOEt	80-20	23-41	22-39	HHI-3
Hex/AcOEt	70-30	42-51	40-50	HHI-4
Hex/AcOEt	60-40	52-61	51-70	HHI-5
Hex/AcOEt	50-50	62-67	71-78	HHI-6
Hex/AcOEt	40-60	68-72		
Hex/AcOEt	30-70	73-74		
Hex/AcOEt	20-80	75-77		
Hex/AcOEt	10-90			

De la fracción HHI-2 se aislaron los compuestos 1 y 2, de HHI-4, se aisló el compuesto 3 y de HHI-3, se aisló la mezcla de compuestos 6 Y 7.

• **EXTRACTO HEXÁNICO DE FLORES:**

4.6 g de las flores se fraccionaron en una columna cromatográfica utilizando como adsorbente 50 g de gel de sílice. El proceso de elución se realizó con hexano y mezcla de hexano-acetato de etilo a diversas proporciones. Se colectaron 91 fracciones de 125 mL cada una. Estas fracciones se analizaron por cromatografía en capa fina y se reunieron todas aquéllas de similitud cromatográfica, lo cual originó 5 fracciones, indicadas en la tabla número 11.

**Tabla No. 11-** Fracciones obtenidas del extracto hexánico de flores de *G. liebmannii* Sch. Bip. var. *monticola*

ELUYENTE	PROPORCIÓN ( % )	No.DE FRACCIÓN	FRACCIONES REUNIDAS	CLAVE
Hexano	100	1-7	1-10	FHI-1
Hex/AcOEt	90-10	8-14	11-33	FHI-2
Hex/AcOEt	80-20	15-26	34-51	FHI-3
Hex/AcOEt	70-30	27-35	52-77	FHI-4
Hex/AcOEt	60-40	36-45	78-91	FHI-5
Hex/AcOEt	50-50	46-49		
Hex/AcOEt	40-60	50-55		
Hex/AcOEt	30-70	56-65		
Hex/AcOEt	20-80	66-78		
Hex/AcOEt	10-90	78-91		

De la fracción FHI-2 se aislaron, el compuesto 2 y la mezcla de compuestos 6 y 7.

### 5.3.3- *G. viscosum* Kunth

De esta planta solamente las flores extraídas con hexano (FHv) mostraron actividad antimicrobiana cualitativa significativa por el método de difusión en agar.

#### EXTRACTO HEXÁNICO DE FLORES.

29.8 g del extracto hexánico de las flores se fraccionaron en una columna cromatográfica utilizando como adsorbente 150 g de gel de sílice. El proceso de elución se realizó con hexano y mezcla de hexano-acetato de etilo a diversas proporciones. Se colectaron 57 fracciones de 500 mL cada una. Cada una de las fracciones se analizó por cromatografía en capa fina y se reunieron todas aquéllas de similitud cromatográfica, lo cual originó 7 fracciones, indicadas en la tabla número 12.

**Tabla No. 12.-** Fracciones obtenidas del extracto hexánico de flores de *G. viscosum* Kunth

ELUYENTE	PROPORCIÓN ( % )	No.DE FRACCIÓN	FRACCIONES REUNIDAS	CLAVE
Hexano	100	1-10	1-11	FHv-1
Hex/AcOET	90-10	11-29	12-13	FHv-2
Hex/AcOET	80-20	30-38	14-18	FHv-3
Hex/AcOET	70-30	39-50	19-28	FHv-4
Hex/AcOET	60-40	51-57	29-34	FHv-5
			35-50	FHv-6
			51-57	FHv-7



De la fracción FHv-2 se aislaron los compuestos (1 y 2) y de la fracción FHv-6 se aisló el compuesto (3).

## **5.4.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

### **5.4.1.- Microorganismos de prueba**

#### **Cepas empleadas:**

##### **Gram negativas**

*Escherichia coli* ATCC 8739

*Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031

*Pseudomonas aeruginosa*

*Salmonella typhimurium* ATCC 309927

*Aeromona hydrophila*

##### **Gram positivas**

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

*Bacillus cereus* ATCC 11778

Las cepas fueron donadas por el Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional y se mantuvieron en refrigeración en tubos con agar de soya y tripticaseína inclinados, resemebrándose cada dos meses en el mismo medio.

### **5.4.2.- Medios de cultivo**

Los medios de cultivo se prepararon de acuerdo con las indicaciones de la casa comercial y se esterilizaron en autoclave a 121°C y 15 lb/cm<sup>2</sup>, durante 15 minutos. Estos medios fueron Caldo y Agar de Müller-Hinton y agar de soya y tripticaseína (Bioxon).

#### **5.4.5.-Preparación de las placas.**

El ensayo se realizó en cajas petri de 10 X 100 mm que contenían 20 mL de agar de Müller-Hinton estéril.

#### **5.4.6.- Bioensayo**

La técnica empleada fue la de Kirby-Bauer modificada<sup>41</sup>. En la superficie de las placas estériles con agar de Müller-Hinton se colocaron 0.5 mL del inóculo, previamente ajustado al tubo 0.5 del nefelómetro de Mc Farland, distribuyéndolo uniformemente con la ayuda de una varilla de vidrio en forma de "L" estéril, para obtener un crecimiento uniforme. Se dejó reposar por dos minutos y se procedió a realizar las perforaciones de 6 mm de diámetro con un horador de metal estéril. En cada uno de los pozos hechos se colocó 0.1 mL de cada uno de los extractos a 10, 20 y 50 mg/mL, en una emulsión tween 80-agua al 1 % para los extractos de hexano y acetato de etilo y metanol-agua 1:1 para los extractos metanólicos, así como el testigo positivo y un blanco. Se dejó reposar una hora a temperatura ambiente y posteriormente se incubó a 37°C por 18 horas. Todas las pruebas se realizaron por duplicado y se repitieron tres veces, los resultados indicados son el promedio de estas determinaciones.

#### **5.4.7.- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)**

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de los compuestos puros, se empleó el método de difusión en agar<sup>41-44</sup>. En la superficie de las placas estériles con agar de Müller-Hinton se colocaron 0.5

mL del inóculo, previamente ajustado al tubo 0.5 del nefelómetro de Mc Farland, distribuyéndolo uniformemente con la ayuda de una varilla de vidrio en forma de "L" estéril, para obtener un crecimiento uniforme. Se dejó reposar por diez minutos y se procedió a colocar los discos de papel filtro Wathman No. 1 de 6 mm de diámetro previamente impregnados con 10  $\mu$ L del compuesto a ensayar a concentraciones de 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125  $\mu$ g/mL, así como un testigo positivo que contiene sulfato de estreptomicina. Las cajas se incuban a 37° por 18 horas. Todas las pruebas se realizaron por duplicado y se repitieron tres veces, los resultados indicados son el promedio de estas determinaciones.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el desarrollo del presente trabajo se consideró primeramente, la selección e identificación taxonómica del material vegetal. La selección de las plantas del género *Gnaphalium* se realizó con base en el criterio más utilizado para la búsqueda de nuevos agentes medicinales: el etnobotánico, ya que diversas especies de plantas de este género se utilizan para padecimientos de vías respiratorias, las cuales pueden ser causadas por bacterias y virus.

### 6.1. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS AISLADOS

#### 6.1.1- COMPUESTO 1

Este compuesto fue aislado del extracto hexánico de flores y del extracto hexánico de hojas del *G. oxyphyllum*, del extracto hexánico de hojas del *G. liebmannii* y del extracto hexánico de flores del *G. viscosum*. Son agujas blancas de punto de fusión 171-173°C y rotación óptica  $[\alpha]^{18}_D = -20.1^\circ$  (C = 0.8, CHCl<sub>3</sub>).

En el espectro de infrarrojo se observan las bandas de absorción a 1770 cm<sup>-1</sup> correspondiente al carbonilo de una  $\gamma$ -lactona, y a 1600 y 880cm<sup>-1</sup> las señales de un metileno exocíclico (Espectro No. 1).

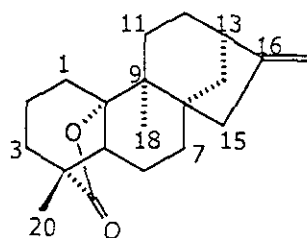
El espectro de masas por impacto electrónico presentó un ión molecular M<sup>+</sup> de relación m/z 300 (56), correspondiente a una fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>, 285 (10), 258 (30), 257 (100), 241 (25), 148 (35), 109

(45), 107 (25), 105 (40), 91 (54), 79 (40), 55 (30) y 41 (40) (Espectro No. 2).

En el espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  (espectro No. 3) se observan dos señales simples a 1.18 ppm y 1.09 ppm que integran para tres protones cada una, señales que corresponden a dos metilos cuaternarios. Dos señales simples anchas a 4.78 y 4.74 ppm, que integran para un protón cada una, correspondiente a dos protones vinílicos. Señales características de los diterpenos de tipo kaurénico<sup>45-47</sup>.

En el espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$ , (espectro No. 4) se observan en total 20 señales, lo cual sugiere que se trata de un diterpeno. De estas señales, 17 corresponden a carbonos  $\text{sp}^3$ , una señal a 180.5 ppm, correspondiente a un carbonilo de ester, ya que se observa la señal a 88.6 ppm, que indica la unión de un carbono a oxígeno de ester y dos señales correspondientes a carbonos  $\text{sp}^2$ , una en 155.7 ppm y otra en 103.5 ppm, ésta última, corresponde a un metileno exocíclico<sup>46,47</sup>, lo cual puede corroborarse en el diagrama Hetcor (espectro No. 5), ya que se observa el acoplamiento de esta señal con los protones vinílicos. Así mismo, en la ampliación de este diagrama (espectro No. 6) se observa el acoplamiento de los metilos con los correspondientes carbonos.

De acuerdo con esta información se propuso la siguiente estructura para este compuesto, la cual corresponde a la zoapatlina (1). Compuesto previamente aislado de *Montanoa tomentosa*<sup>48</sup> y de *Tetrachyron orizabaensis*<sup>45</sup>.



ZOAPATLINA

En las tablas No. 14 y 15 se muestran los resultados observados, comparados con los reportados en la literatura<sup>45,48</sup>.

**Tabla 14.** Datos de RMN<sup>13</sup>C, en CDCl<sub>3</sub>, de la zoapatlina

<b>No. C</b>	<b>REPORTADO<sup>45</sup></b> ( $\delta$ en ppm)	<b>OBSERVADO</b> ( $\delta$ en ppm)
1	43.1	43.0
2	18.6	18.6
3	31.8	31.7
4	42.3	42.2
5	51.4	51.3
6	20.5	20.4
7	35.4	35.4
8	44.5	44.4
9	48.3	48.2
10	88.6	88.5
11	30.1	30.0
12	30.4	30.3
13	42.3	42.42
14	33.5	33.4
15	47.1	47.0
16	155.8	155.7
17	103.5	103.4
18	19.1	19.0
19	180.5	180.4
20	17.2	17.2

**Tabla 15.** Datos de RMN<sup>1</sup>H, en CDCl<sub>3</sub>, de la zoapatlina

No. H	REPORTADO <sup>45,48</sup> (δ en ppm)	OBSERVADO (δ en ppm)
15	2.53 (2H) s ancho	2.58 y 2.0
17	4.77 (2H) s ancho	4.78 (2H) d
18	1.18 (3H) s	1.18 (3H) s
20	1.08 (3H) s	1.09 (3H) s

### 6.1.2.- COMPUESTO 2

Este compuesto fue aislado del extracto hexánico de las hojas y flores de *G. liebmanni*, del extracto hexánico de las flores de *G. viscosum*, del extracto hexánico de hojas de *G. oxyphyllum* y del extracto hexánico de flores de *G. oxyphyllum*. Tiene un punto de fusión de 170-172°C y una rotación óptica de  $[\alpha]_D^{18} = -111.8^\circ$  (C = 0.2, CHCl<sub>3</sub>).

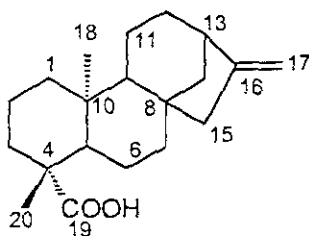
En el espectro de infrarrojo se observan las bandas de absorción en 1690 cm<sup>-1</sup>, correspondiente a carboxilo y en 1600 cm<sup>-1</sup>, correspondiente a doble enlace de metileno exocíclico (Espectro No. 7).

El espectro de masas por impacto electrónico presentó un ión molecular M<sup>+</sup> de 302 (60), que corresponde a la fórmula molecular (C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>), presentando el siguiente patrón de fragmentación 287 (35), 259 (45), 131 (100), 105 (70), 91 (92) (Espectro No. 8).

En el espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  (espectro No. 9), se observan dos señales simples en 0.97 ppm y 1.24 ppm que integran para tres protones cada una, correspondientes a metilos sobre carbonos cuaternarios cuaternarios; una señal simple en 4.76 ppm que integra para dos protones vinílicos y otra señal ancha en 2.63 ppm, que integra para un protón, correspondiente al protón de la posición No.13, son señales características de los diterpenos de tipo kaurénico<sup>45-47</sup>.

En el espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  (Espectro No. 10) se observan 17 señales correspondientes a carbonos  $\text{sp}^3$ , una señal a 184.76 ppm correspondiente a un carboxilo y dos señales correspondientes a carbonos  $\text{sp}^2$ , una en 155.8 ppm y otra en 102.9 ppm, la cual corresponde a un metileno exocíclico<sup>46,47</sup>, lo cual puede corroborarse en el diagrama Hetcor (espectro No. 11) ya que se observa el acoplamiento de estas señales con los protones vinílicos.

De acuerdo con esta información se propuso la siguiente estructura para el compuesto, la cual corresponde al ácido kaurenoico (2). Éste ha sido aislado previamente de *Gnaphalium pelleitum*, *G. graveolens* y *G. oligandrum*<sup>20 y 29</sup> así como de *Xylopia aethiopica*<sup>49</sup>.



Ácido kaurenoico

Al comparar los datos observados, con los reportados en la literatura, se confirma la estructura del compuesto. Los valores reportados en la literatura son  $\text{pf} = 167\text{-}171^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_{\text{D}}^{18} = -110^\circ$  ( $\text{C} = 0.2$ ,  $\text{CHCl}_3$ )<sup>49</sup>.



Las tablas 16 y 17, muestran los datos obtenidos, comparados con los reportados en la literatura <sup>49,50</sup>.

**Tabla 16.-** Datos de RMN<sup>13</sup>C, en CDCl<sub>3</sub>, del ácido kaurenoico

<b>No. C</b>	<b>REPORTADO<sup>50</sup></b> <b>(<math>\delta</math> en ppm)</b>	<b>OBSERVADO</b> <b>(<math>\delta</math> en ppm)</b>
1	40.7	40.7
2	19.1	19.1
3	37.8	37.8
4	43.8	43.8
5	57.1	57.1
6	21.8	21.8
7	41.3	41.3
8	44.2	44.2
9	55.1	55.1
10	39.7	39.7
11	18.4	18.4
12	33.1	33.1
13	43.9	43.9
14	39.7	39.7
15	49.0	49.0
16	155.9	155.8
17	103.0	103.0
18	29.0	29.0
19	184.6	184.7
20	15.6	15.6

**Tabla 17.-** Datos de RMN<sup>1</sup>H, en CDCl<sub>3</sub>, del ácido kaurenoico

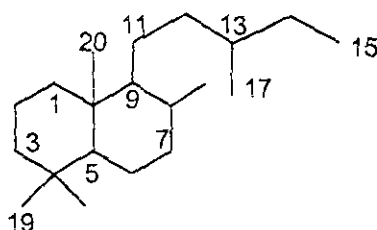
No. H	REPORTADO <sup>49</sup> ( $\delta$ en ppm)	OBSERVADO ( $\delta$ en ppm)
13	2.65 (1H)	2.63 (1H)
17	4.77 (2H)	4.76 (2H) d.
18	0.97 (3H) s	0.95 (3H) s
20	1.25 (3H) s	1.24 (3H) s

**6.1.3.- COMPUESTO 3.**

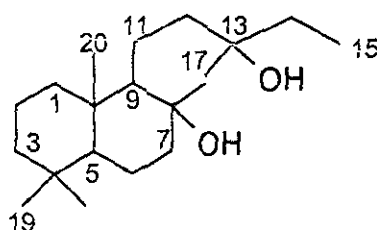
Este compuesto fue aislado del extracto hexánico de hojas de *G. oxyphillum*, del extracto hexánico de hojas de *G. liebmannii* y del extracto hexánico de las flores de *G. viscosum*. Es un sólido blanco de punto de fusión 129-130°C. Tiene una rotación óptica  $[\alpha]^{18}_D = +9^\circ$  (C = 0.41, CHCl<sub>3</sub>).

En el espectro de infrarrojo (Espectro No. 13) se observa una banda de absorción ancha en 3450 cm<sup>-1</sup>, característica para un grupo oxhidrilo. A 900 cm<sup>-1</sup> se observa una banda característica para doble enlace carbono-carbono (HC=CH<sub>2</sub>) y a 2800-3000 cm<sup>-1</sup> se observa una banda característica para el estiramiento C-H alifático.

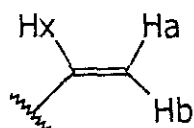
En el espectro de RMN<sup>1</sup>H (Espectro No. 14) se observan cinco señales simples a 1.26, 1.14, 0.78, 0.86 y 0.76 ppm, que integran para tres protones cada una, señales que corresponden a metilos unidos a carbonos totalmente sustituidos. También se observan señales múltiples a campo alto que integran para 16 protones, señales características para diterpenos tipo labdano<sup>20</sup>.



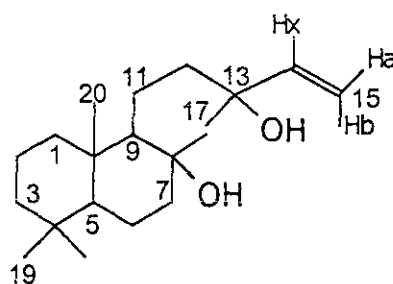
Como todas las señales para metilos son simples y, dado que en el infrarrojo se observa la señal para oxhidrilos, se puede pensar que en los carbonos 13 y 8 se encuentren estos grupos, por el desplazamiento de los metilos a campo bajo.



Por otro lado se observan tres señales dobles de dobles que integran para un protón cada una, formando un sistema ABX, a 5.06 ppm ( $J_{AX}=10.65$  Hz y  $J_{AB}=1.5$  Hz), en 5.2 ppm ( $J_{BX}=17.25$  Hz,  $J_{AB}=1.5$  Hz) y en 5.89 ppm ( $J_{BX}=17.4$  Hz y  $J_{AX}=10.8$  Hz). Estas señales corresponden a protones vinílicos, lo cual indica la existencia de un fragmento de alqueno terminal.



Como no se observa el patrón metilo-metileno, podemos pensar que el sistema ABX se encuentra unido al núcleo de labdano en la siguiente forma:

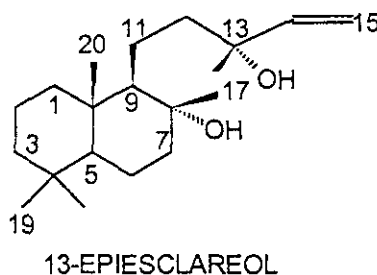


En el espectro de RMN<sup>13</sup>C (Espectro No.15) se observan 18 señales de carbonos con hibridación  $sp^3$  y 2 señales para carbonos con hibridación  $sp^2$ , lo cual confirma la existencia del diterpeno<sup>20, 51</sup>.

En el espectro de masas (Espectro No. 16) se observa el fragmento de  $m/z = 290$  (15) señal que corresponde al  $[M^+ - H_2O]$ , 257 (10), 191 (33), 177 (90), 163 (15), 137 (28), 123 (40) 109 (70), 95 (85), 71 (40), 69 (60), 43 (100) y 41 (45). Con estos datos, se puede pensar que se trate de un esclareol.

El punto de fusión reportado para este compuesto es de 130-131.5°C y la rotación óptica es de  $[\alpha]_D^{18} = +7.2^\circ$ <sup>20</sup>.

Al comparar los datos anteriores con los reportados en la literatura, se confirma que se trata del 13-epiesclareol. Estos datos se observan en las tablas 18 y 19.



**Tabla 18.-** Datos de RMN<sup>1</sup>H, en CDCl<sub>3</sub>, del 13-epiesclareol

<b>No. H</b>	<b>REPORTADO<sup>20</sup> (<math>\delta</math> en ppm)</b>	<b>OBSERVADO (<math>\delta</math> en ppm)</b>
1 ax	0.98 ddd	0.96
1 eq	1.6	1.6
2 ax	1.6	1.6
2 eq	1.4	1.41
3 ax	1.14	1.14
3 eq	1.4	1.41
5	0.94 dd	0.95
6 ax	1.6	1.6
6 eq	1.3	1.26
7 ax	1.4	1.41
7 eq	1.82 ddd	1.81
9	1.18	1.18
11	1.45	1.45
	1.3	1.26
12	1.65	1.65
14	5.87 dd	5.89 dd
15 trans	5.23 dd	5.2 dd
15 cis	5.06 dd	5.06 dd
Me 16	1.26 s	1.26 s
Me 17	1.15 s	1.15 s
Me 18	0.78 s	0.78 s
Me19	0.86 s	0.86 s
Me 20	0.77 s	0.76 s

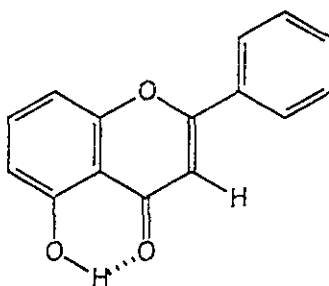
**Tabla 19.-** Datos de RMN<sup>13</sup>C, en CDCl<sub>3</sub>, del 13-epiesclareol

<b>No. C</b>	<b>REPORTADO<sup>20</sup></b> <b>(δ en ppm)</b>	<b>OBSERVADO</b> <b>(δ en ppm)</b>
1	39.7	39.7
2	18.4	18.4
3	42.0	42.0
4	33.2	33.2
5	56.0	56.0
6	20.5	20.5
7	44.1	44.0
8	74.9	74.9
9	61.8	61.8
10	39.3	39.3
11	19.1	19.1
12	44.8	44.8
13	74.1	74.1
14	145.2	145.2
15	111.8	111.8
16	29.1	29.2
17	24.5	24.5
18	21.5	21.5
19	33.4	33.4
20	15.6	15.4

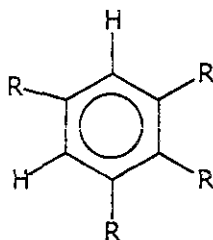
#### 6.1.4.- COMPUESTOS 4 y 5.

Polvo amarillo pálido, soluble en metanol. Punto de fusión 250-254 °C y 290-296 °C (descompone). Estos puntos de fusión nos indican que hay una mezcla de compuestos.

En el espectro de RMN<sup>1</sup>H (Espectro No. 17) se observan dos señales simples a 12.7 y 13 ppm que integran para un protón cada una, señales que pueden corresponder a protón de aldehído, de ácido carboxílico o de un protón quelatado al carbonilo de un flavonoide, lo cual se confirma por la existencia de una señal simple a 6.7 ppm que integra para un protón, característica del protón de la posición 3 de una flavona. Además se observan varias señales en la región de protones aromáticos, lo cual sugiere la existencia de un compuesto de tipo flavonoide como se muestra a continuación.



En la región de los protones aromáticos, se observan 4 señales dobles a 6.17 ppm ( $J = 1.9$  Hz), a 6.22 ppm ( $J = 2.1$  Hz), a 6.38 ppm ( $J = 1.19$  Hz) y a 6.47 ppm ( $J = 2.1$  Hz). Cada señal integra para un protón. Los valores de las constantes de acoplamiento indican que se trata de un sistema aromático tetrasustituído con el siguiente patrón de sustitución:

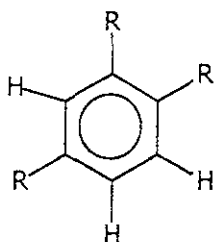


Como ya se mencionó, de la determinación de los puntos de fusión se puede pensar que se trata de dos compuestos, y como cada par de señales tienen la misma constante de acoplamiento, podemos pensar que este sistema se encuentra dos veces ( en dos compuestos).

Se observan también las siguientes señales, que integran para un protón cada una:

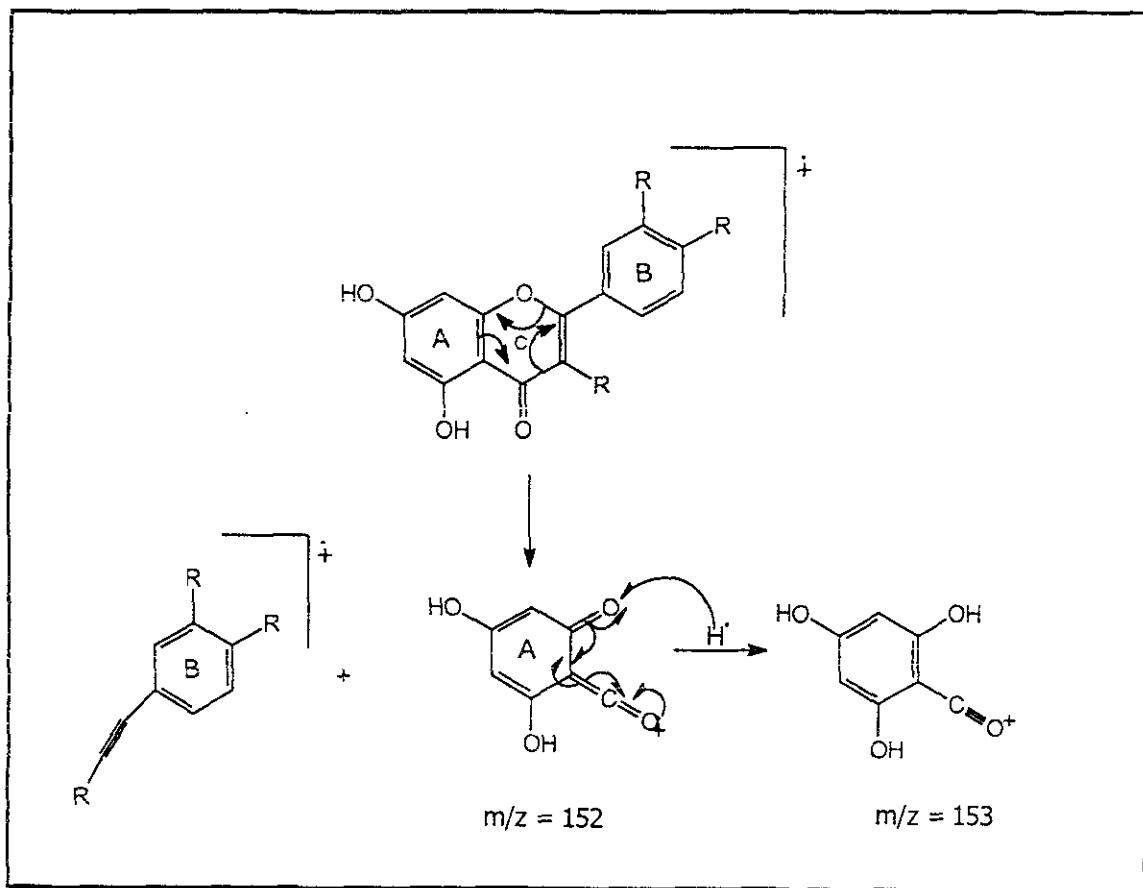
Una señal doble a 7.5 ppm ( $J = 2.2$  Hz), una señal doble a 7.4 ppm ( $J = 2.1$  Hz), una señal doble a 6.8 ppm ( $J = 8.5$  Hz), una señal doble a 6.9 ppm ( $J = 9$  Hz), una señal doble de dobles a 7.5 ppm ( $J = 2.1$  y 9 Hz), una señal doble de dobles a 7.4 ppm ( $J = 2.2$  y 8.5 Hz).

Esto sugiere la existencia de un anillo aromático con el siguiente patrón de sustitución:



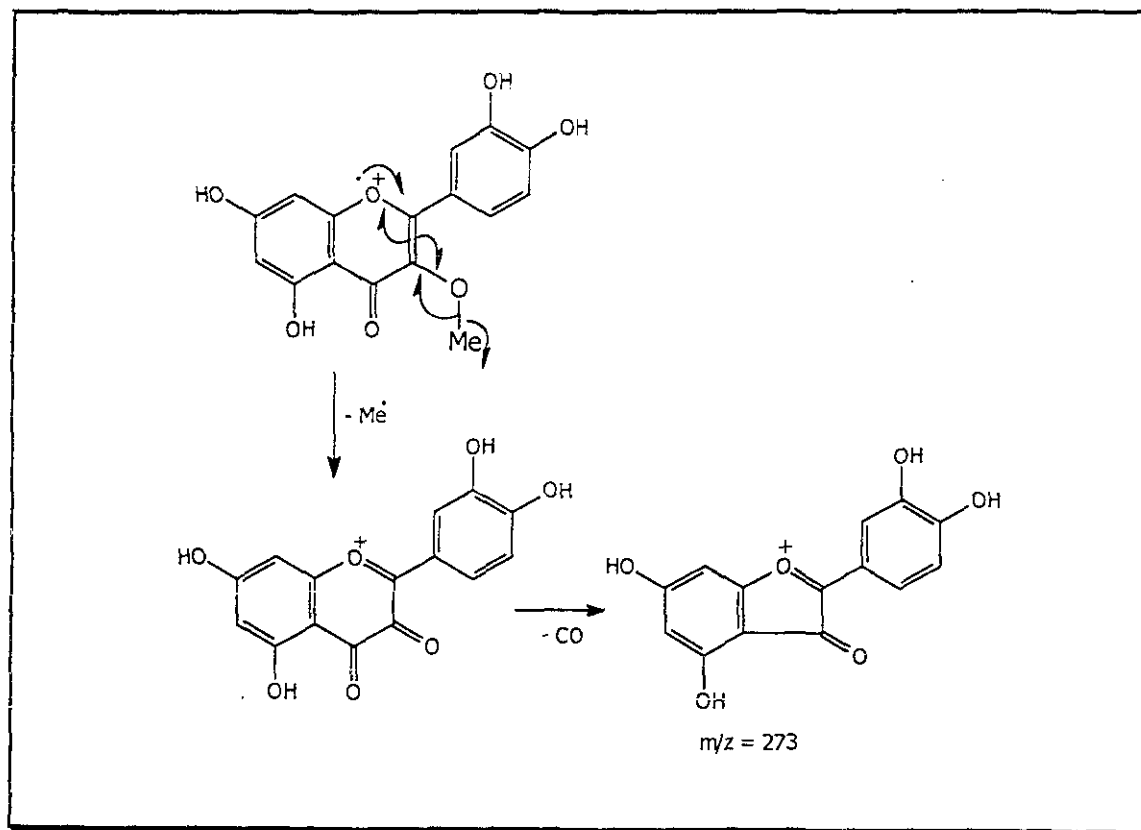


Sin embargo, la posición 7 se descarta al observarse en el espectro de masas el pico  $m/z$  153 (25), correspondiente al fragmento del anillo A de un flavonoide, producto de la fragmentación de tipo Retro Diels-Alder según la figura no. II.

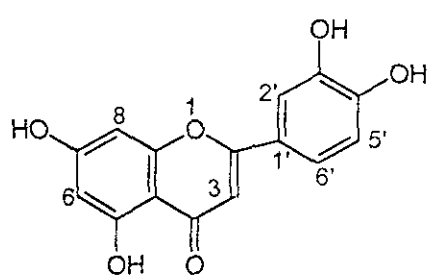


**Figura No. II.** Fragmentación de flavonoides

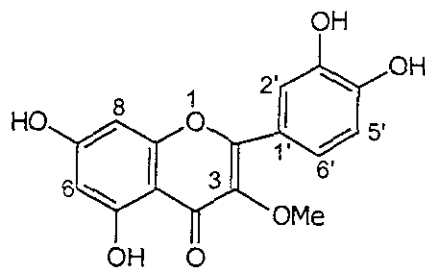
En el espectro se observa el pico de  $m/z$  137 (30), éste confirma que en el anillo B se encuentran 2 oxhidrilos <sup>52, 53</sup>, según el mecanismo de fragmentación indicado en la figura No. III.



**Figura No. IV.** Fragmentación de flavonoides



LUTEOLINA (4)



3-METOXIUERCETINA (5)

Tanto la luteolina, como la 3-metoxiquercetina han sido previamente aisladas de plantas del género *Gnaphalium*. Finalmente, se compararon los datos de resonancia observados, con los reportados en la literatura para

estos dos compuestos y se observa que sí corresponden a estos compuestos. Esta comparación se indica en las tablas 20 y 21.

**Tabla 20.** Datos de RMN<sup>1</sup>H, en DMSO, de la 3-metoxiquercetina

<b>No. H</b>	<b>REPORTADO<sup>55,56</sup></b> <b>(<math>\delta</math> en ppm)</b>	<b>OBSERVADO</b> <b>(<math>\delta</math> en ppm)</b>
6	6.17 d ( $J = 1.9$ )	6.17 d ( $J = 2.03$ )
8	6.38 d ( $J = 1.9$ )	6.39 d ( $J = 2.03$ )
2'	7.52 d ( $J = 2.2$ )	7.52 d ( $J = 2.2$ )
5'	6.9 d ( $J = 8.5$ )	6.88 d ( $J = 8.5$ )
6'	7.42 dd ( $J = 2.2$ y 8.5)	7.42 dd ( $J = 2.2$ y 8.5)
MeO 3		3.79 s
OH 5	12.6 s ancho	12.7 s

**Tabla 21.** Datos de RMN<sup>1</sup>H, en DMSO, de la luteolina

<b>No. H</b>	<b>REPORTADO<sup>55,56</sup></b> <b>(<math>\delta</math> en ppm)</b>	<b>OBSERVADO</b> <b>(<math>\delta</math> en ppm)</b>
3	6.69 s	6.7 s
6	6.22 d ( $J = 2.1$ )	6.2 d
8	6.47 d ( $J = 2.1$ )	6.46 d
2'	7.43 d ( $J = 2.1$ )	7.42 d
5'	6.92 d ( $J = 9.0$ )	6.9 d
6'	7.44 dd ( $J = 2.1$ y 9.0)	7.5 dd
OH 5	13.0 s	13.0 s

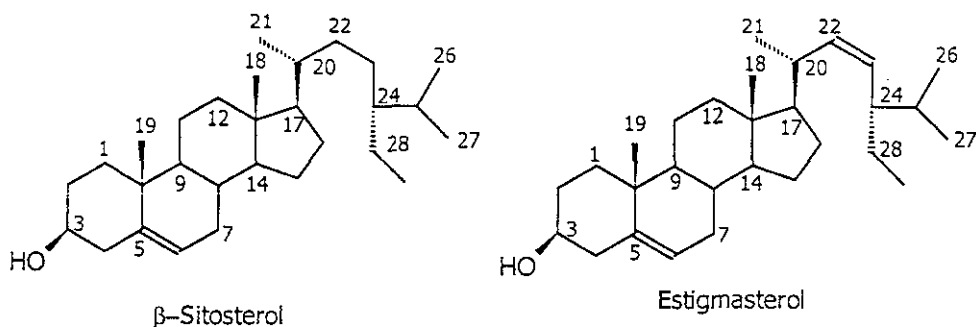
### 6.1.5.- COMPUESTOS 6 Y 7

Estos compuestos fueron aislados del extracto hexánico de hojas de *G. oxyphilum*, del extracto hexánico de las hojas y del extracto hexánico de las flores de *G. liebmannii*.

El punto de fusión fue de 130-136 °C.

El espectro de masas por impacto electrónico, acoplado a gases, reveló la existencia de dos compuestos como se observa en el cromatograma. (No. 19). En el primer espectro de masas (Espectro No. 20) se observa el ión molecular  $m/z$  de 414 (35), el cual corresponde al  $\beta$ -sitosterol, según comparación con la base de datos "wiley 138" y cuyos principales fragmentos son: 329 (35), 255 (20), 213 (25), 145 (35), 107 (40), 81 (50), 55 (65), 43 (100). En el segundo espectro de masas (Espectro No. 21) se observa el ión molecular  $m/z$  de 412 (30), el cual corresponde al estigmasterol, según la comparación con la base de datos "wiley 138" y cuyos principales fragmentos son: 351(15), 300(30), 271 (42), 255 (40), 159 (38), 133(36), 105 (36), 83 (60), 55 (100).

En el espectro de RMN<sup>1</sup>H (Espectro No.22), se pueden observar las señales características para ambos compuestos.



En la tabla No. 22 se indica el resumen de los compuestos aislados.

**TABLA No. 22.** Compuestos aislados

COMPUESTO	ESPECIE	PARTE	SOLVENTE	CANTIDAD
Zoapatlina (1)	<i>G. oxyphyllum</i>	Flor	Hexano	147 mg
		Hoja	Hexano	64 mg
	<i>G. liebmannii</i>	Hoja	Hexano	10.3 mg
	<i>G. viscosum</i>	Flor	Hexano	55 mg
Ácido kaurenoico (2)	<i>G. oxyphyllum</i>	Flor	Hexano	63 mg
		Hoja	Hexano	354 mg
	<i>G. liebmannii</i>	Flor	Hexano	28 mg
		Hoja	Hexano	258 mg
	<i>G. viscosum</i>	Flor	Hexano	24 mg
13- epiesclareol (3)	<i>G. oxyphyllum</i>	Hojas	Hexano	68 mg
	<i>G. liebmannii</i>	Hojas	Hexano	448 mg
	<i>G. viscosum</i>	Flores	Hexano	245 mg
Luteolina y 3-metoxiquercetina (4 y 5)	<i>G. oxyphyllum</i>	Flores	Metanol	68 mg
$\beta$ -sitosterol y estigmasterol (6 y 7)	<i>G. oxyphyllum</i>	Flor	Hexano	155 mg
		Hoja	Hexano	14 mg
	<i>G. liebmannii</i>	Hoja	Hexano	18 mg
		Flor	Hexano	8.9 mg
	<i>G. viscosum</i>	Flor	Hexano	21 mg

## 6.2.- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Una vez determinadas las plantas a estudiar, así como su identificación taxonómica, se procedió a preparar los extractos por maceración, para evaluar la actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión en agar según la técnica de Kirby-Bauer modificada <sup>41</sup>.

### 6.2.1.- *G. oxyphyllum* D.C. var. *oxyphyllum*.

Los extractos de *G. oxyphyllum* D. C. var. *oxyphyllum* de las hojas-acetato de etilo, de la hojas-metanol, tallos-hexano, tallos-acetato de etilo y tallos-metanol no muestran actividad antimicrobiana contra ningún organismo de prueba, los extractos restantes, que si mostraron actividad, se indican en la tabla No. 23.

La evaluación de las fracciones de los extractos de flores-hexano, flores-metanol, así como las hojas-hexano contra *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* y *S. typhimurium*, se indican en las tablas 24, 25 y 26.

**Tabla No. 23.** EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE LOS  
DIFERENTES EXTRACTOS DE *G. oxyphyllum*.

EXTRACTO Conc. mg/mL	Diámetro del halo de inhibición en mm						
	1	2	3	4	5	6	7
Flor-hexano	50	5.1	3.1	3.6	5.0	-	-
	20	4.7	2.7	2.1	3.4	-	-
	10	4.1	2.1	1.7	1.9	-	-
Flor-AcOEt	50	1.1	1.2	-	-	-	-
	20	-	0.8	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-
Flor-metanol	50	6.2	5.8	-	-	-	-
	20	5.4	3.9	-	-	-	-
	10	3.8	3.1	-	-	-	-
Hoja-hexano	50	4.8	5.2	4.5	-	-	-
	20	4.1	4.6	3.1	-	-	-
	10	3.8	4.0	2.5	-	-	-
Control Positivo		3.3 <sup>a</sup>	8.0 <sup>b</sup>	4.5 <sup>a</sup>	3.0 <sup>a</sup>	2.0 <sup>c</sup>	9.9 <sup>d</sup>
Blanco		-	-	-	-	-	-

**Cepas empleadas:** 1) *S. aureus* 2) *B. cereus* 3) *E. coli* 4) *S. typhimurium* 5) *K.*

*pneumoniae* 6) *P. aeruginosa* 7) *A. hydrophila* **Control Positivo:** a) estreptomicina

0.1mg/mL b) estreptomicina 0.05 mg/mL c) ampicilina 1 mg/mL d) gentamicina 2 mg/mL

(-), significa que no hubo inhibición.

**Tabla No. 24.** EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE LAS  
FRACCIONES DE FLORES-HEXANO DE *G. oxyphyllum*.

FRACCIÓN 20 mg/ml	Diámetro del halo de inhibición en mm			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S typhimurium</i>
FHo-1	-	-	-	-
FHo-2	4.5	2.7	1.9	3.2
FHo-3	4.1	2.1	1.1	3.4
FHo-4	-	-	-	-
FHo-5	0.8	-	-	-
FHo-6	0.5	1.1	-	0.5
Control	3.3 <sup>a</sup>	8.0 <sup>b</sup>	4.5 <sup>a</sup>	3.0 <sup>a</sup>
Blanco	-	-	-	-

**Control Positivo:** a) estreptomicina 0.1mg/mL b) estreptomicina 0.05 mg/mL  
(-), significa que no hubo inhibición.

De FHo-2 se aisló zoapatlina, y de FHo-3 se aisló ácido kaurenoico y una mezcla de  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol.

**Tabla No. 25.** EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE LAS  
FRACCIONES DE FLORES-METANOL DE *G. oxyphilum*.

FRACCION 20 mg/mL	Diámetro del halo de inhibición en mm			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S typhimurium</i>
FMo-1	-	-	-	-
FMo-2	5.0	4.1	-	-
FMo-3	-	-	-	-
FMo-4	3.8	3.9	-	-
Control	3.3 <sup>a</sup>	8.0 <sup>b</sup>	4.5 <sup>a</sup>	3.0 <sup>a</sup>
Blanco	-	-	-	-

**Control Positivo:** a) estreptomicina 0.1mg/mL b) estreptomicina 0.05 mg/mL  
(-), significa que no hubo inhibición.



### 6.2.2.- *G. liebmanii* Sch. Bip. var. *monticola*

De *G. liebmannii*, los extractos de acetato de etilo y metanol, tanto de hojas como tallos no muestran actividad antimicrobiana contra ningún organismo de prueba, los tallos-hexano, tampoco muestran actividad, las flores, tanto de acetato de etilo, como metanol, presentan una actividad muy poco significativa (sólo contra *B. cereus* y menor a 2.5 mm de diámetro del halo de inhibición). Los extractos más activos son los de hexano, tanto de flores como de hojas. Los resultados se muestran en la tabla No. 27.

**Tabla No. 27.** EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE *G. liebmannii*.

EXTRACTO Conc. mg/mL	Diámetro del halo de inhibición en mm	
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
Flor-hexano	50	6.1
	20	4.3
	10	4.1
Flor-AcOEt	50	5.3
	20	4.4
	10	3.5
Flor-metanol	50	-
	20	1.7
	10	1.3
Hoja-hexano	50	-
	20	1.3
	10	0.9
Control Positivo	50	-
	20	-
	10	-
Blanco	50	5.2
	20	4.2
	10	3.7
Control Positivo	50	4.7
	20	3.7
	10	2.9
Control Positivo	50	3.3 <sup>a</sup>
	20	8.0 <sup>b</sup>
	10	-
Blanco	50	-
	20	-
	10	-

**Control Positivo:** a) estreptomycin 0.1mg/mL b) estreptomycin 0.05 mg/mL.  
(-), significa que no hubo inhibición.

Los extractos de *G. liebmannii*, son activos específicamente contra bacterias gram (+). De estos extractos se fraccionaron solamente los extractos de hexano de hojas y flores, ya que los extractos de flores de acetato de etilo y metanol, mostraron una actividad muy poco significativa. Los resultados de las pruebas de los extractos antes mencionados se muestran en las tablas 28 y 29.

**Tabla No. 28.** EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE LAS  
FRACCIONES DE HOJAS-HEXANO DE *G. liebmannii*.

FRACCION 20 mg/mL	Diámetro del halo de inhibición en mm	
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
HHI-1	-	-
HHI-2	4.3	3.0
HHI-3	3.9	3.5
HHI-4	4.2	3.2
HHI-5	-	-
HHI-6	-	-
Control	3.3 <sup>a</sup>	8.0 <sup>b</sup>
Blanco	-	-

**Control Positivo:** a) estreptomicina 0.1mg/mL b) estreptomicina 0.05 mg/mL.

(-), significa que no hubo inhibición.

De las fracciones activas se aislaron los compuestos zoapatlina y ácido kaurenoico, de la fracción HHI-2, la mezcla de  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol, de la fracción HHI-3 y 13-epiesclareol de la fracción HHI-4.

**Tabla No. 29.** EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE LAS  
FRACCIONES DE FLORES-HEXANO DE *G. liebmannii*.

FRACCION 20 mg/mL	Diámetro del halo de inhibición en mm	
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
FHI-1	-	-
FHI-2	4.9	2.8
FHI-3	-	0.6
FHI-4	-	-
FHI-5	-	-
Control	3.3 <sup>a</sup>	8.0 <sup>b</sup>
Blanco	-	-

**Control Positivo:** a) estreptomicina 0.1mg/mL b) estreptomicina 0.05 mg/mL.

(-), significa que no hubo inhibición.

De la fracción activa, se aisló ácido kaurenico y la mezcla de  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol.

### 6.2.3.-*G. viscosum* Kunth

De *G. viscosum*, sólo se evaluaron los extractos de flores y hojas de los tres disolventes: hexano, acetato de etilo y metanol, de éstos solamente las flores de hexano mostraron actividad significativa. Los resultados se muestran en la tabla No. 30.

**Tabla No. 30.** EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE LOS  
DIFERENTES EXTRACTOS DE *G. viscosum*.

EXTRACTO Conc. mg/ml	Diámetro del halo de inhibición en mm	
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
Flor-hexano	50	3.3
	20	2.9
	10	2.4
Flor-AcOEt	50	-
	20	-
	10	-
Flor-metanol	50	-
	20	-
	10	-
Hoja-hexano	50	-
	20	-
	10	-
Hoja-AcOEt	50	-
	20	-
	10	-
Control Positivo	3.3 <sup>a</sup>	8.0 <sup>b</sup>
Blanco	-	-

**Control Positivo:** a) estreptomicina 0.1mg/mL b) estreptomicina 0.05 mg/mL

(-), significa que no hubo inhibición.

De los resultados obtenidos se fraccionaron solamente las flores-hexano, dando los resultados indicados en la tabla No. 31.

## VII.- CONCLUSIONES

De los resultados del presente trabajo se concluye lo siguiente:

- 1.- Los diterpenos zoapatlina, ácido kaurenoico y 13-epiesclareol, además de los esteroides  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol, son constituyentes del extracto hexánico de las partes aéreas de *G. oxyphyllum* D.C. var *oxyphyllum*, *G. liebmannii* Sch. Var. *monticola* y *G. viscosum* Kunth.
- 2.- Los flavonoides luteolina y 3-metoxiquercetina son constituyentes del extracto metanólico de las flores de *G. oxyphyllum* D.C. var *oxyphyllum*.
- 3.- La evaluación antimicrobiana demostró que los extractos activos de las plantas estudiadas son los hexánicos principalmente, y sólo en el caso del extracto metanólico de flores de *G. oxyphyllum*, se observó actividad antimicrobiana considerable. Así mismo, se demostró que los extractos de *G. oxyphyllum* D.C. var *oxyphyllum*, *G. liebmannii* Sch. Var. *monticola* y *G. viscosum* Kunth son activas contra *E. coli* ATCC 8739, *S. typhimurium* ATCC 309927, *S. aureus* ATCC 25923 y *B. cereus* ATCC 11778 y son inactivas contra *K. pneumoniae* ATCC 10031, *A. hydrophila* y *P. Aeruginosa*.
- 4.- La mezcla de  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol es la más activa contra *E. coli* ATCC 8739, *S. typhimurium* ATCC 309927, *S. aureus* ATCC 25923 y *B. cereus* ATCC 11778.

5.- Zoapatlina, ácido kaurenoico y 13-epiesclareol muestran mayor actividad contra bacterias gram positivas, mientras que tienen menor actividad contra las gram negativas.

6.- Los flavonoides luteolina y 3-metoxiquercetina son inactivos contra *E. coli* ATCC 8739, *S. typhimurium* ATCC 309927, *S. aureus* ATCC 25923 y *B. cereus* ATCC 11778.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

1.- Lara, O. y Márquez, A. C. (1996). Plantas Medicinales de México, Composición, Usos y Actividad Biológica. UNAM, México.

2.- Hamburger, M., Hostettmann, K. (1991). Bioactivity in Plantas: The link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*. 30, 12, 3864-3874.

3.- Dimayuga, R. E., Keer-García, S. (1991). Antimicrobial Screening of Medicinal Plants from Baja California Sur, México. *Journal of Ethnopharmacology*. 31, 181-192.

4.- Mitscher, L.A.; Drake, S.; Gollapudi, S. R. Y Okwte, S. K. (1987). A Modern Look at Folkloric use of anti-infective agents. *J. of Natural Products*. 50 (6), 1025-1040.

5.- Navarrete, C. A. (1992). Evaluación Farmacológica de las Plantas medicinales. En Estrada, E. (ED.) *Las Plantas Medicinales de México. Introducción a su Estudio*. Universidad Autónoma de Chapingo. 255-268.

6.- Rahalison, L., Hamburger, M, Monod, M. Frenk, E. and Hostettmann, K. (1991). *Pytochemical Anal.* 2, 199.

7.- Moskalenko, S. A. (1986). Preliminary Screening of Far Eastern Ethnomedicinal Plants for Antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 15 (3), 231-259.

8.- Amade, P., Pesando, D. And Chevolot, L. (1982). Antimicrobial activities of marine sponges from French Polynesia and Britany. *Marine Biology*. 70, 223-228.

9.- Anderson, L. Lindgren, G., Bohlin, L., Magni, L., and Ogren, S. (1983). Studies of Swedish marine organisms. Screening of biological activity. *Acta Pharmaceutica Suecia* 20 (6) 401-414.

10.- Caceres, A.; Alvarez, A. V.; Ovando, A. E. And Samayoa, B: E: (1991). Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against Gram-positive bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*. 31 193-208.

11.- Heyword, V.H. (1985). *Las Plantas con Flores*. Ed. Reverté. Barcelona, España.

12.- Cronquist, O.F.(1977). *Introducción a la Botánica*. Segunda edición. Compañía editorial Continental. S. A. México, D.F.

13.- Drury, D. G. (1970). A fresh aproach to the classification of the genus *Gnaphalium* with particular reference to the species present in New Zealand Inuleae. *Compositae*. *New Zealand Jour., Bot.* 9, 157-185.

14.- Rzedowski, J y Rzedowski, G. (1972). *Flora Fanerogámica del Valle de México*. Vol. II. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN e Instituto de Ecología. México.



- 15.- Martínez, M. (1992). Las plantas Medicinales de México. Ed. Botas, México. Pp 124.
- 16.- Alcántara, S. G. (1997). Estudio de algunas actividades biológicas de una flavona aislada de *Gnaphalium semiamplexicaule* D. C. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- 17.- Aguilar, A.; Camacho, J.R.; Chino, S.; Jaquez, P.; López, M. E. (1994) Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. IMMS. México, D. F.
- 18.- Instituto Nacional Indigenista (1994). Atlas de la medicina Tradicional Mexicana (II). 672-681.
- 19.- Martínez-Alfaro, M. A. Oliva, V.; Mendoza, M.; Toledo, G., Wong, A. (1996). Cuadernos, 27. Catálogo de plantas útiles de la Sierra Norte de Puebla.
- 20.- Torrenegra, R. D.; Pedrozo, J. A.; Robles, J.; Waibel, R, y Achenbach, H. (1992). Diterpenes from *Gnaphalium pellitum* and *Gnaphalium graveolens*. Phytochemistry. 31, (7):2415-2418.
- 21.- Torrenegra, R. D.; Escarria, S.; Raffelsberg, B. Y Achenbach, H. (1980). 5,7-dihydroxy-3,6,8-trimethoxyflavone from the flowers of *Gnaphalium elegans*. Phytochemistry. 19, 2795-2796.
- 22.- Urzua, A. Y Cuadra, P. (1990): Acylated Flavonoid aglycones from *Gnaphalium robustum*. Phytochemistry, 29, (4): 1342- 1343.

38.- Mc Brybe, C.; Blacklow, R. (1980). Sígnos y Síntomas. Quinta edición. Editorial Interamericana. México.

39.- Lowery, C. (1993). Reagent Chemicals. Merican Chemical Society specifications editors, Washington D.C. 90-91.

40.- Touchstone, J. C. (1992). Practice of Thin Layer Chromatographyc. John Wiley and Sons. InC. USA. 157.

41.- Ríos, J. L. Recio, M. C. Villar, A. (1988) Screening Methods for Natural Products with Antimicrobial Activity: A review of the literature. Journal of Ethnopharmacology, 23, 127-149.

42.- Lennette E.H., Balows, A. Hausler, W.J.; Shadomy, H.J. (1989). Manual de Microbiología Clínica. 4ª. Edición. Editorial Panamericana. Argentina.

43.- Tabata, M., Tsukada, M. y Fukui, H. (1982). Antimicrobial Activity of quinone derivatives from *Echium lycopsis* callus cultures. Planta Medica 44, 234-236.

44.- Koneman, E. K., Allen, S. D., Dowell, V. R., Janda, W. M., Somers, H. M., Win, W. C. (1998). Diagnóstico Microbiológico. 3a. Edición, ed. Panamericana, México.

45.- Ohno, N., Mabry, T.J., Zabel, V., Watson W. H. (1979). Tetrachyrin, a new rearranged Kaurenoid lactone, and diterpene acids from

*Tetrachyron orizabaensis* and *Helianthus debilis*. Pytochemistry, 18,1687-1689.

46.- Pinto, C. A., Pinchin, R. y Do-Prado, S. K. (1983). Three ent-kaurene diterpenes from *Vellozia caput-ardeae*. Phytochemistry, 22, 9, 2017,2019.

47.- Bolhmann, F.; Ziesche, J.; King, R. M. y Robinson, H. (1981). Eudesmanolides and diterpenes from *Wedelia trilobata* and a ent-kaurenoic acid derivative from *Aspilia parvifolia*. Phytochemistry, 20 (4): 751-756.

48.- Caballero, Y., y Walls, F. (1970). Productos naturales del zoapatle. Boletin del Instituto de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, 22, 79-102.

49.- Hasan, C. M.; Healey, T. M.; Waterman, P. G. (1982). Kolvane and Kaurene diterpenes from the syem bark of *Xylopia Aethipica*. Phytochemistry, 21,6, 1365-1368.

50.- Hutchison, M., Lewr, P. Macmillan, J., (1984). J. Chem. Soc. Perkin Trans I. 2363-2366.

51.- Wu, Y. ; Hung, Y., Chang, F.; Cosentino, M. ; Wang, H.; Lee, K.; (1996) J. of Natural Products, 59, 635-637.

52.- Voirin, B., Jay, M. (1974). Sur la Présence de methyl-3 Quercétine Chez *Asplenium viride*. Phytochemistry. 13, 275-276.

53.- Audier, H. (1966). Étude des composés flavoniques par spectrométrie de masse. Bull. Soc. Chim. France. 9, 2892-2899.

54.- Kingston, D. G. I. (1971) Mass Spectrometry of Organic Compounds – IV. Electron Impact of Flavonoids Compounds. Tetrahedron 27, 2691,-2700.

55.- Markham, K. R., Geiger, H. (1993).  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide. En: The Flavonoids: Advances in research since 1986. Ed. Harborne, J.B. Chapman & Hall. London. 10, 441-473.

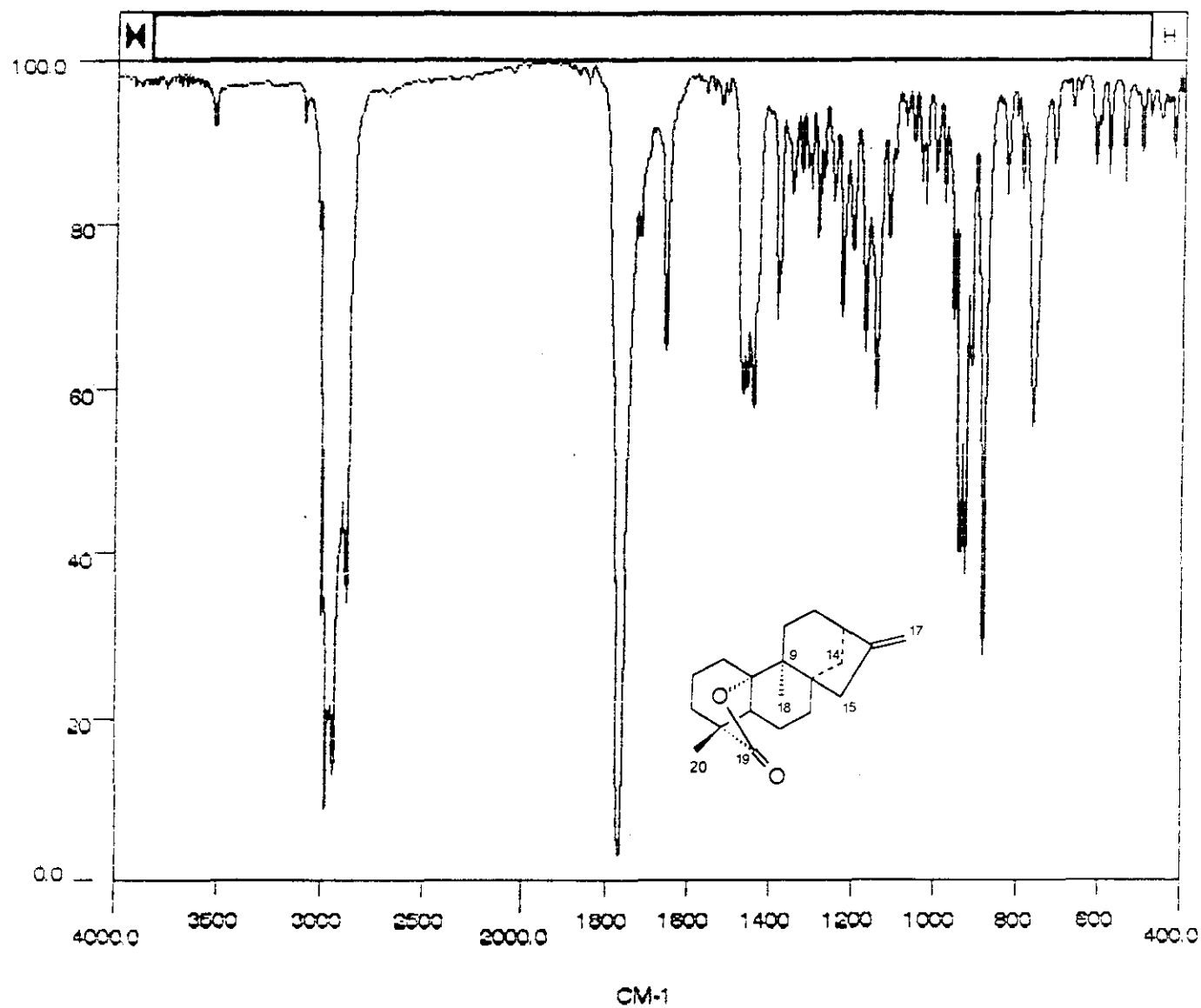
56.- Groujller, A., Pacheco, H.(1967). Étude des spectres RMN de quelques O-glucosyl-flavonoids, de leurs aglycones et de trois mono-et di-O-glucosyl flavanones synthétiques. Bull. Soc. Chim. Franc. 6. 1938-1943.

57.- Slomp, G., MacKellar, F. A. (1962). Nuclear Magnetic Resonance Studies on Some Hydrocarbon Side Chains of Steroids. J. Am. Chem. Soc. 84, 204-206.

58.- Thompson, M. J., Dutky, S. R., Patterson, G. W., Gooden, E. L. (1972). NMR Spectra of C-24 Isomeric Sterols. Phytochemistry, 11, 1781-1790.

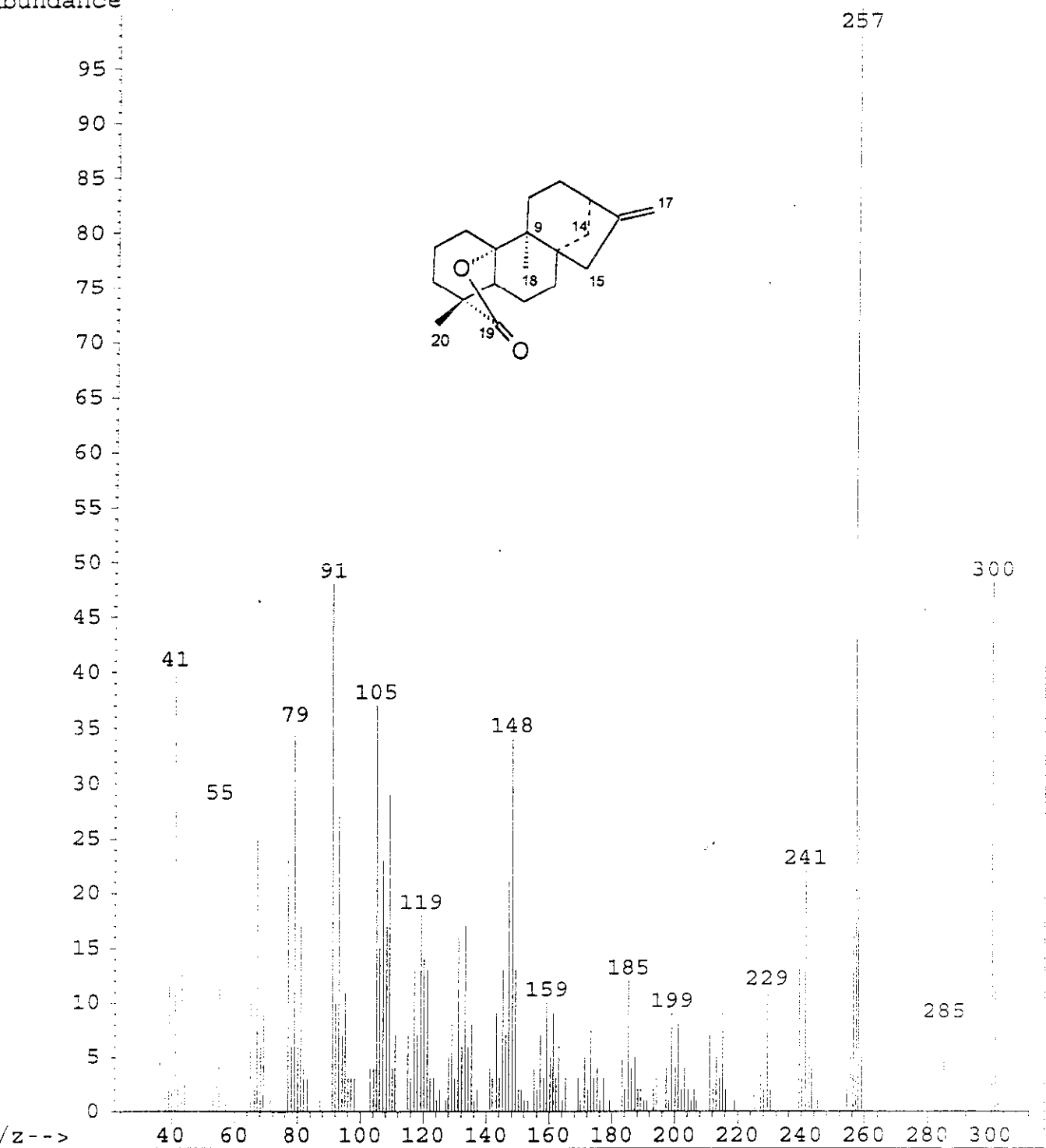
59.- Rojas, A., Hernández, L., Pereda-Miranda, R. Y Mata, R. (1992) A Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 35, 275-283.

- 60.- Oguntimein, B. D. (1987) The terpenoids of *Annona reticulata*. *Fitoterapia*. LVIII, 6, 411-413.
- 61.- Slimestad, R., Marston, A., Mavi, S. y Hostettmann, K. (1995). Larvicidal constituents of *Melantheria albinervia*. *Planta Médica*. 61, 562-563.
62. Ghisalberti, E. L. (1997) *Fitoterapia* LXVIII, 4, 303-325.
- 63.- Mathur, S. B. , García Tello, P., Marcano, F., Mora –Arellano, V. (1975). Terpenoids of *Mikania monagasensis* and their biological activities. *Revista Latinoamericana de Química*, 6, 201-205.
- 64.- Ulubelen, A., Topcu, G. Eris, C. Sönmez, U. Kartal; M. Kuruku, S. Bozok-Johansson, C.(1994). Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry*. 36, 4, 971-974

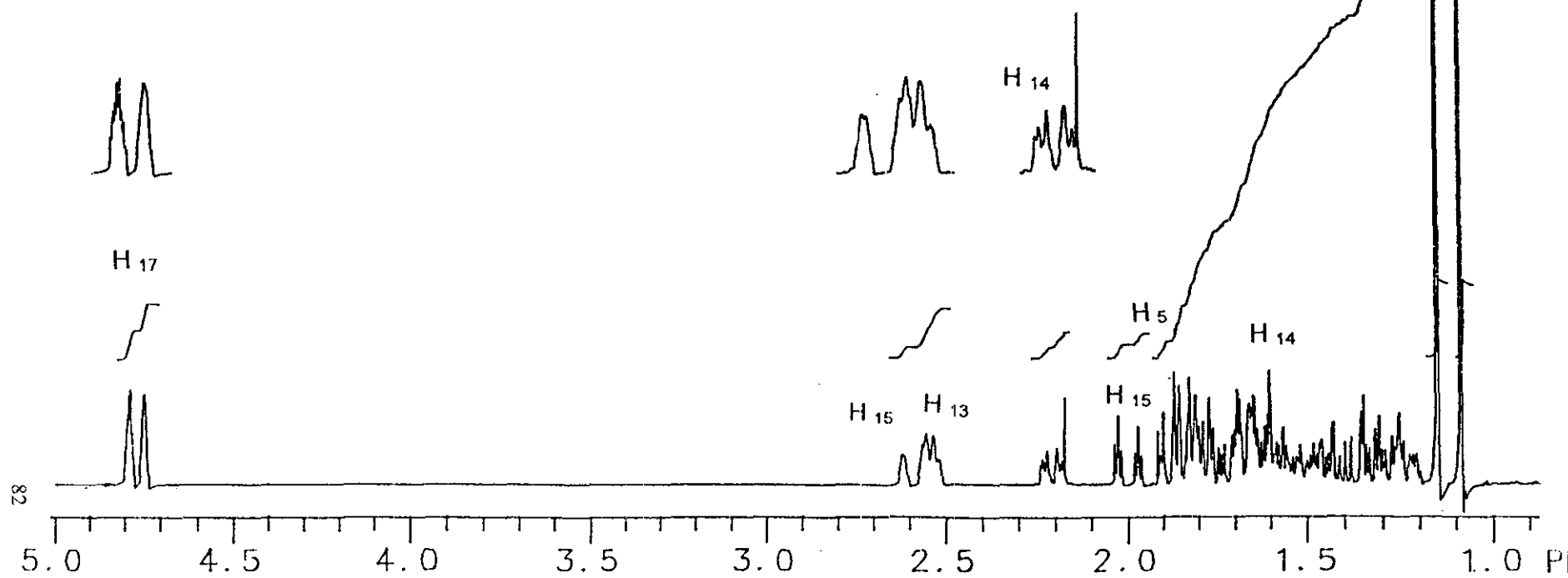
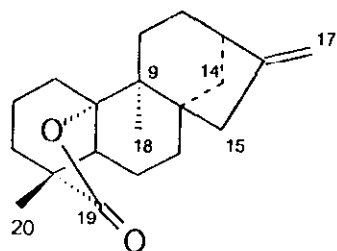


Espectro No. 1.- Espectro de Infrarrojo de la zoapatlina

abundance

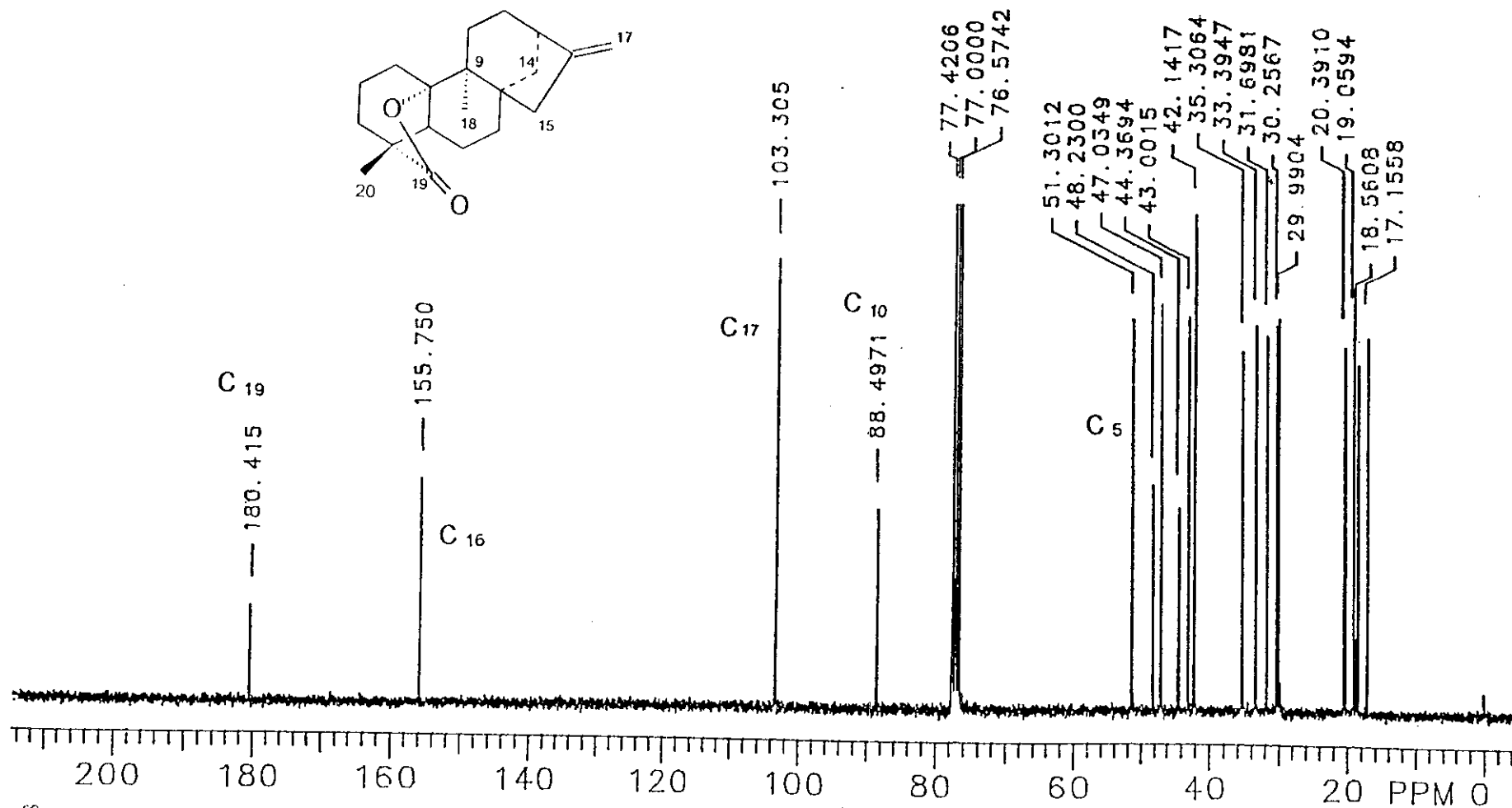


Espectro No. 2 EMIE de zoapatlina

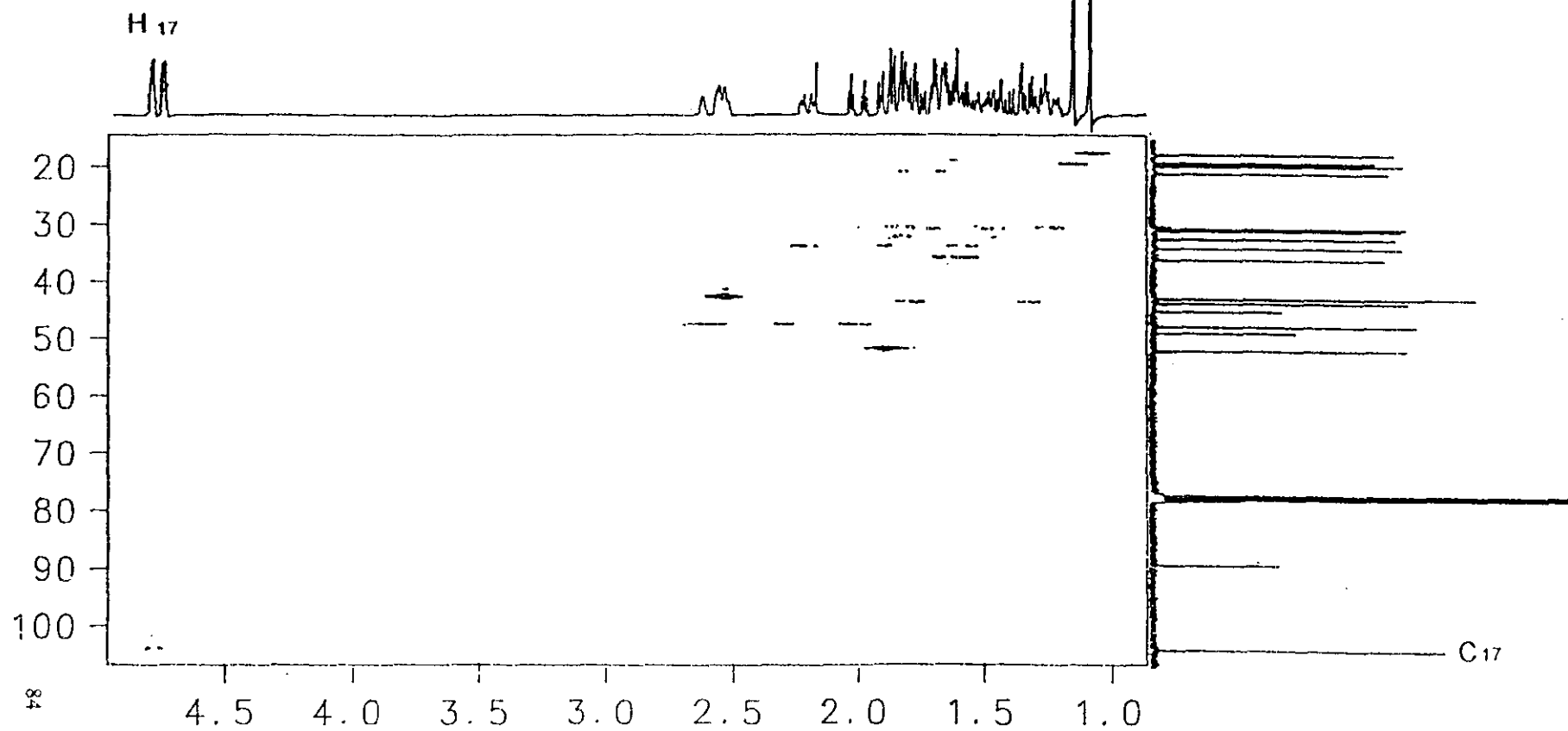
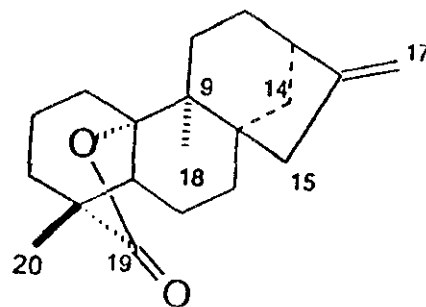


Espectro No. 3 Espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  (300 MHz) de zoapatlina en  $\text{CDCl}_3$

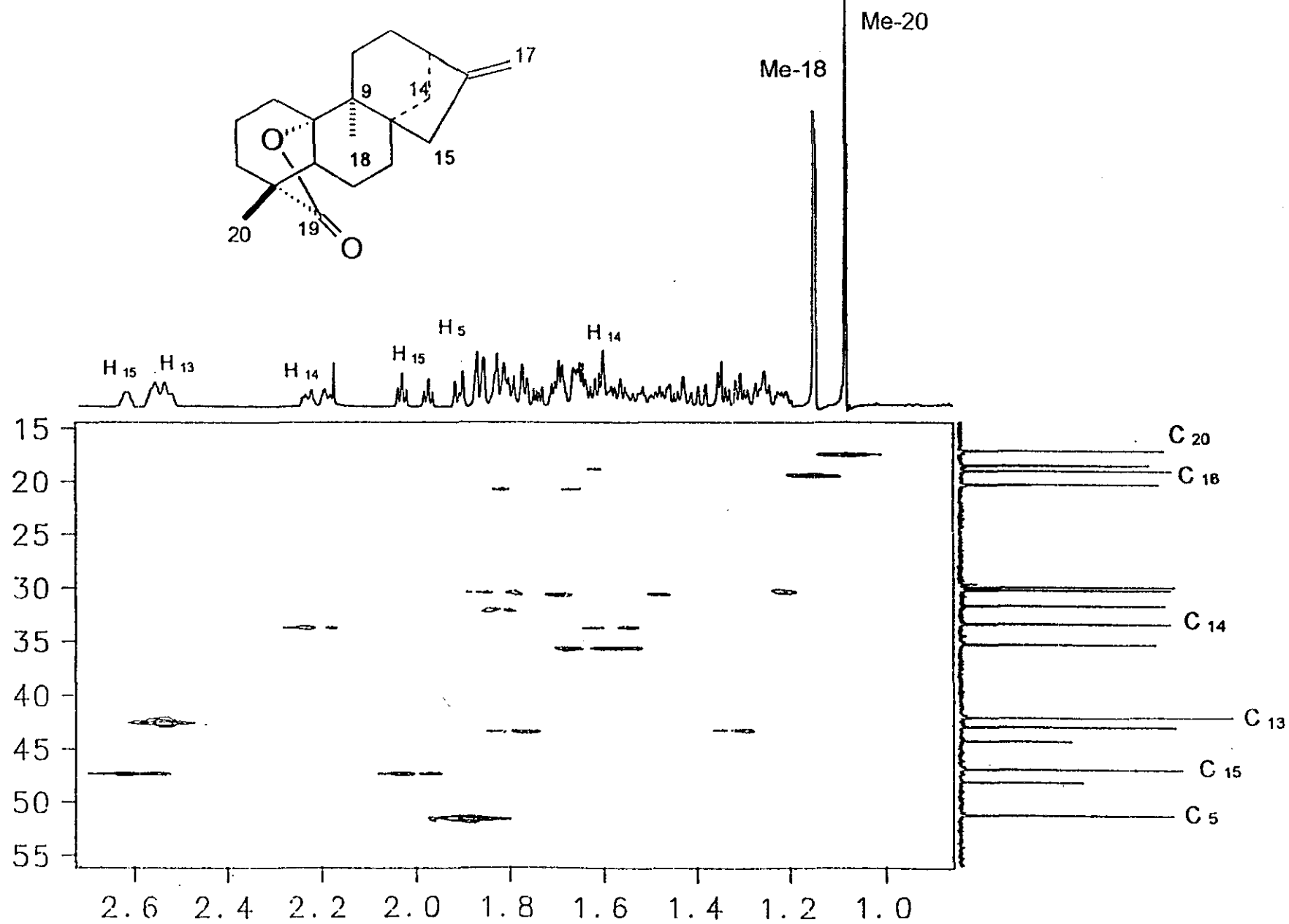
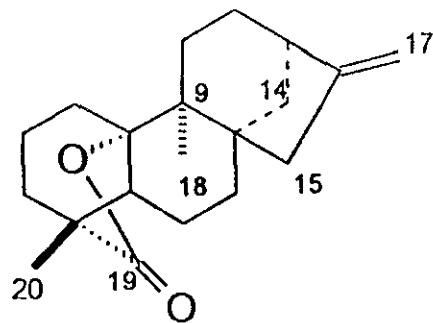




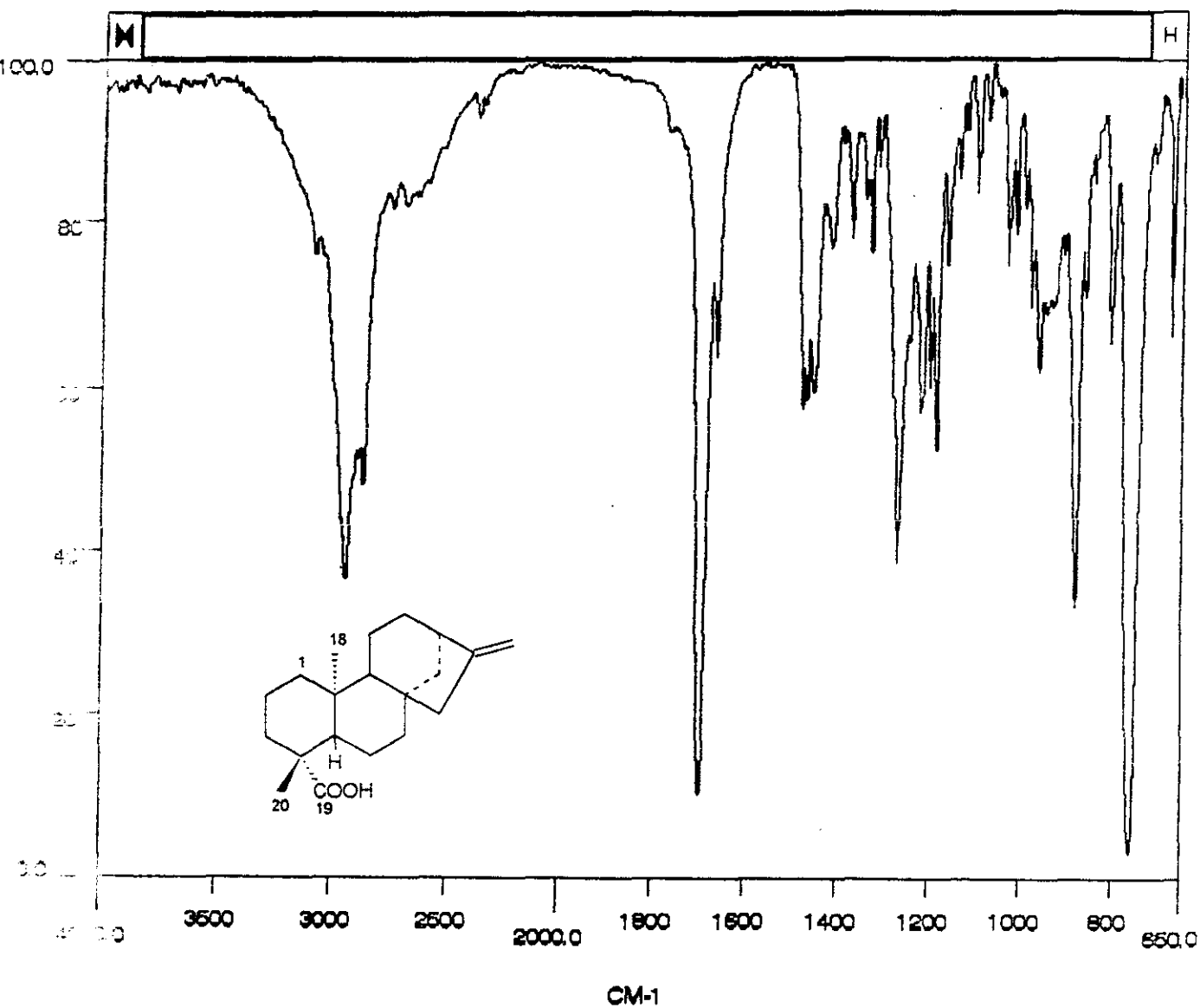
Espectro No. 4 Espectro de RMN $^{13}\text{C}$  (75.4 MHz) de zoapatlina en  $\text{CDCl}_3$



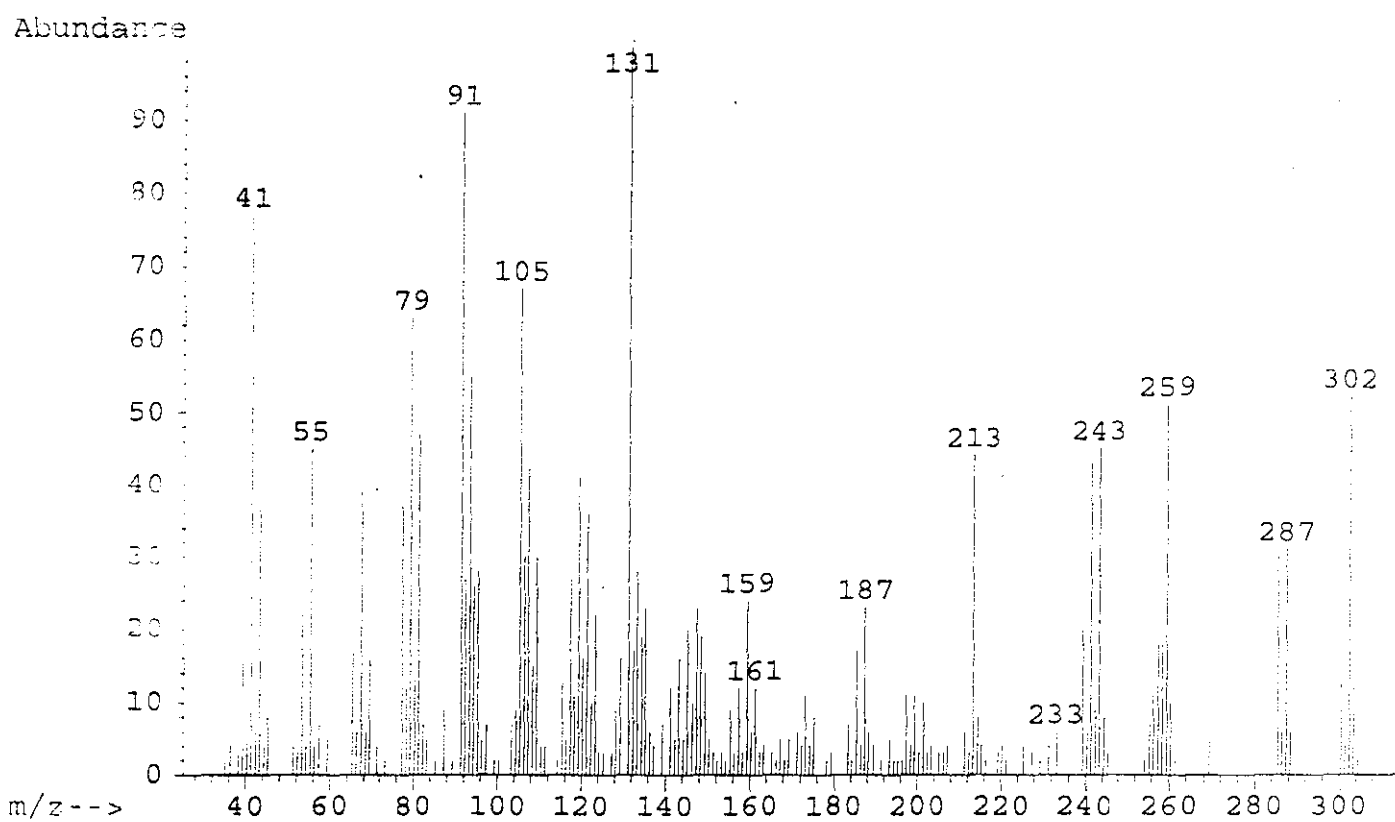
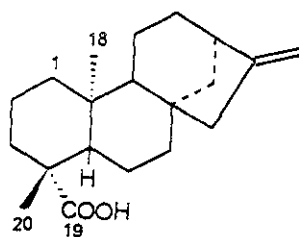
Espectro No. 5 Diagrama HETCOR (75.4 MHz) de zoapatlina en  $\text{CDCl}_3$



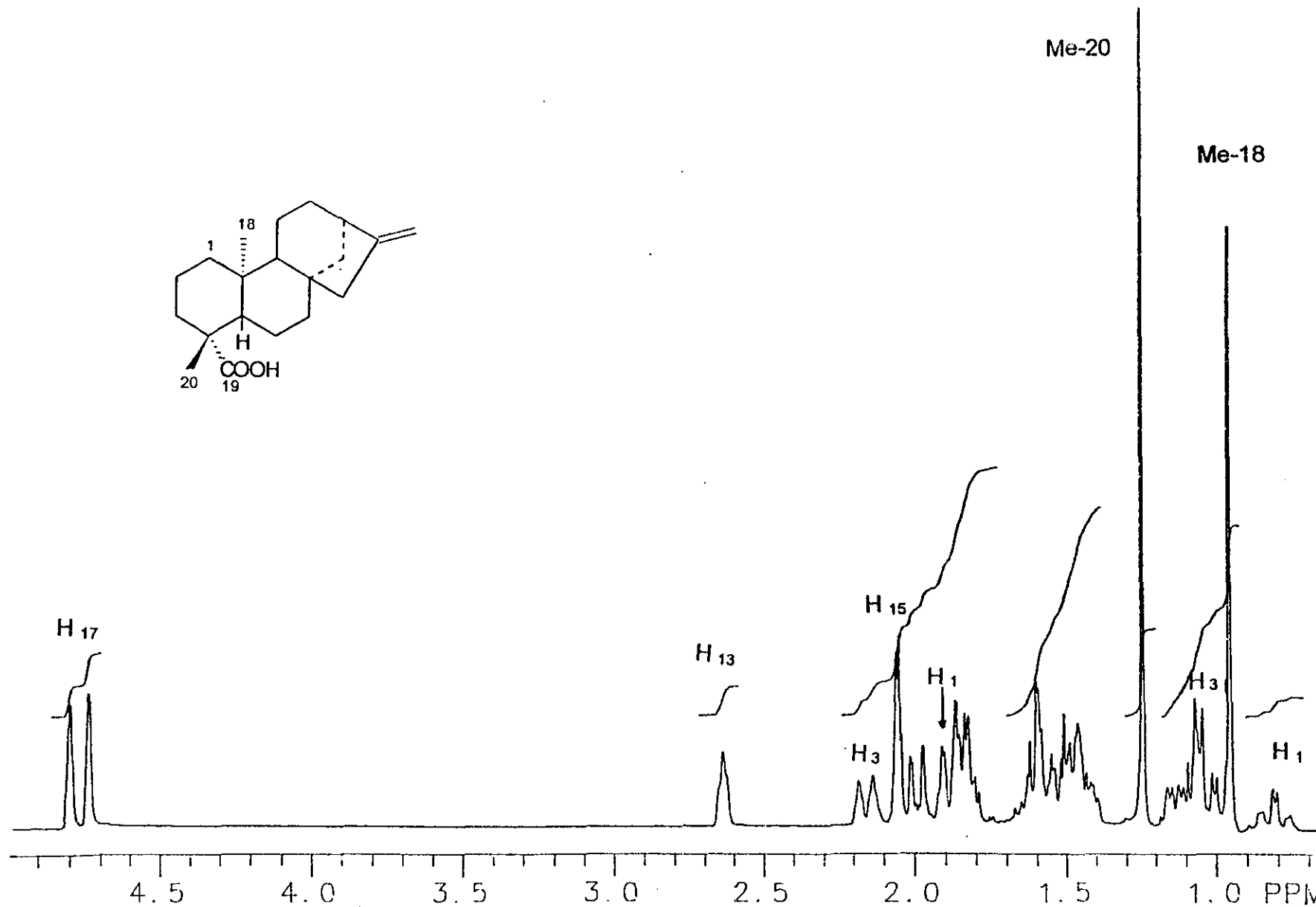
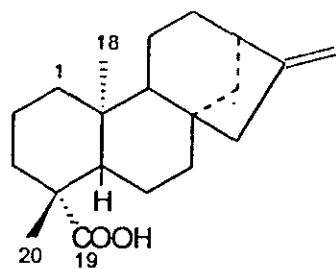
Espectro No. 6 Diagrama HETCOR (75.4 MHz) de zoapatlina en  $\text{CDCl}_3$



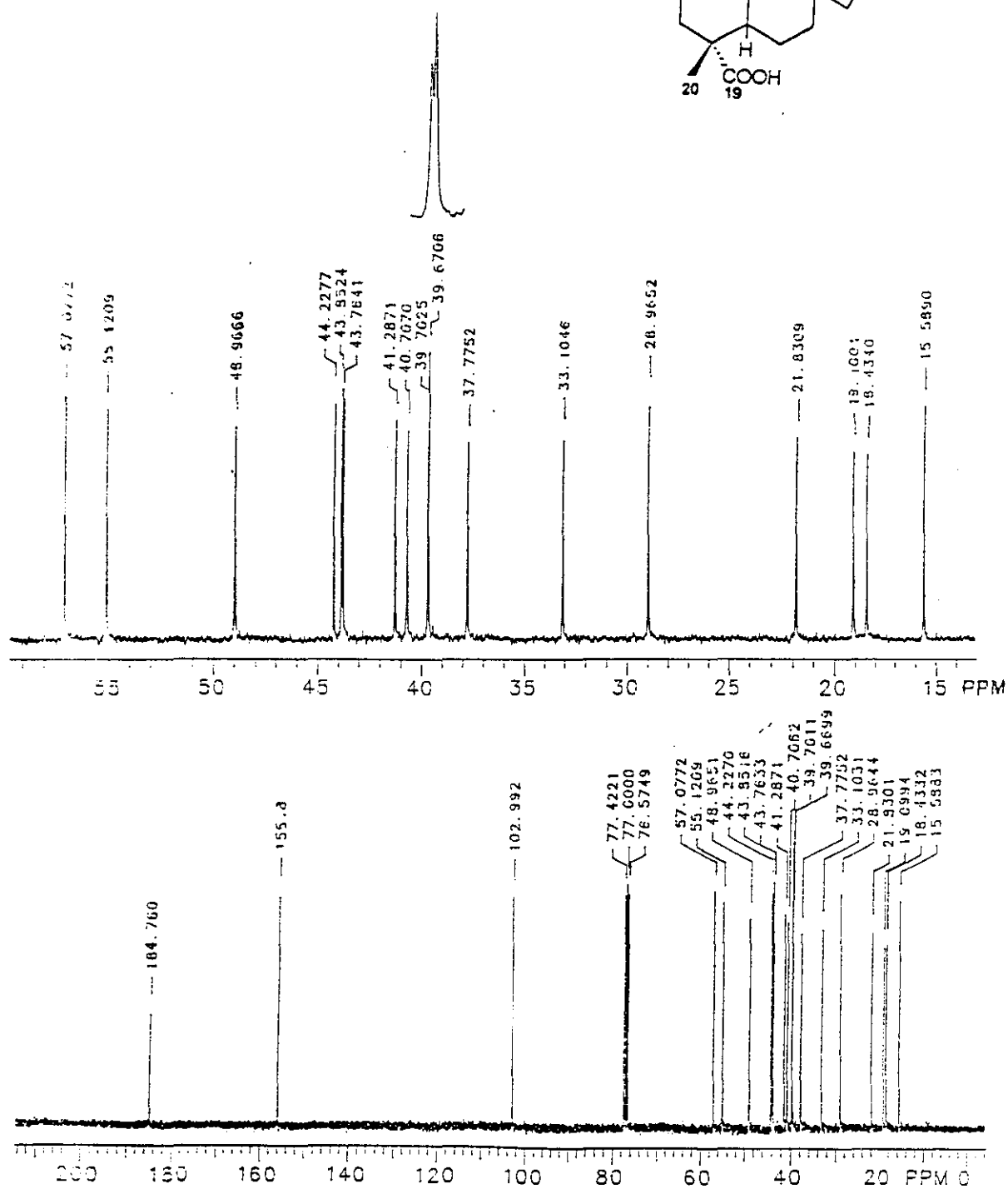
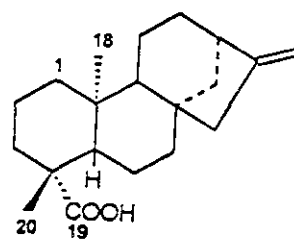
Espectro No. 7 Espectro de IR del ácido kaurenoico



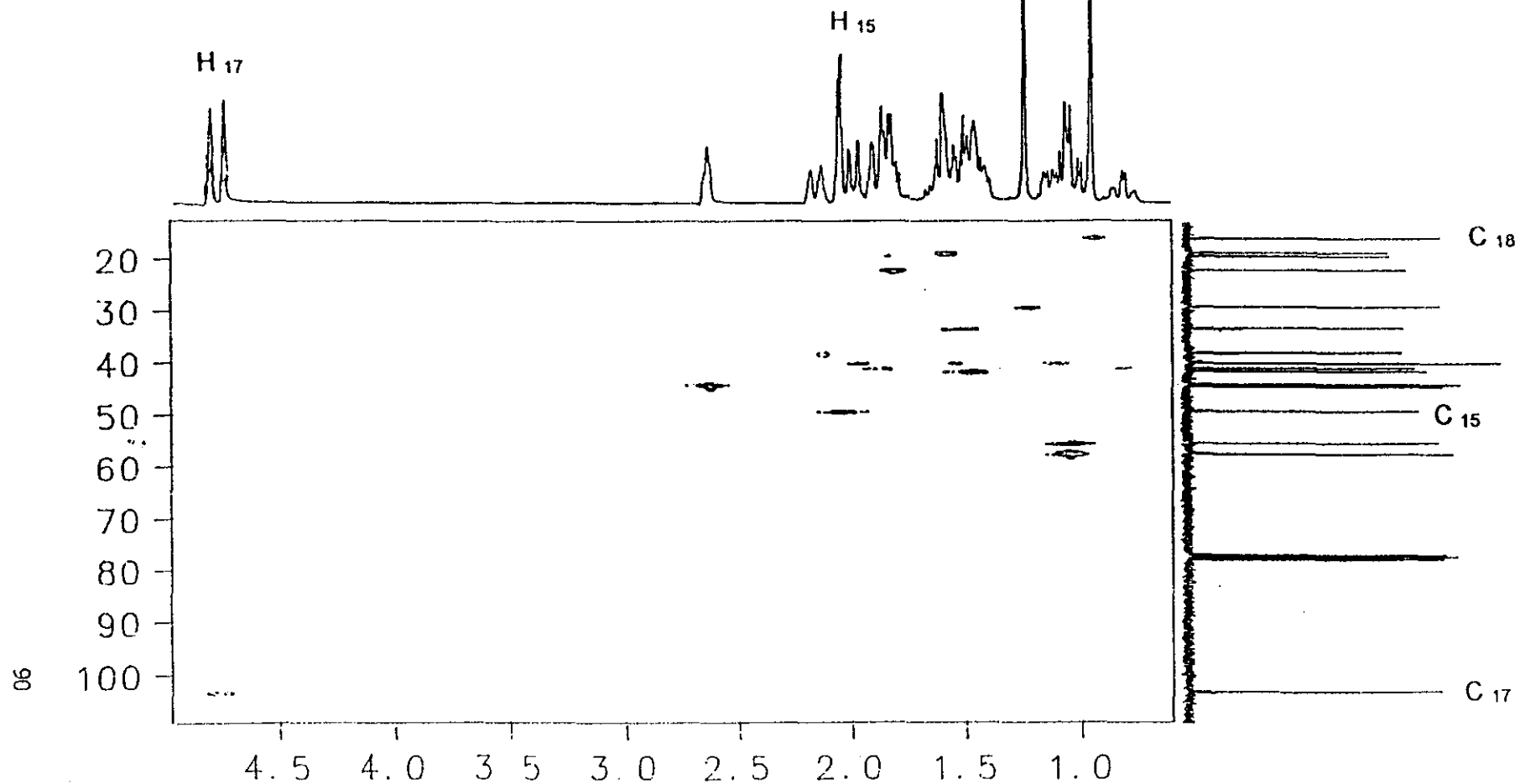
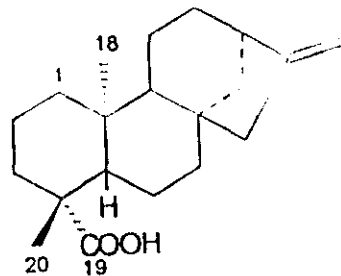
Espectro No. 8 EMIE del ácido kaurenoico



Espectro No. 9 Espectro de RMN<sup>1</sup>H (300 MHz) de ácido kaurenoico en CDCl<sub>3</sub>

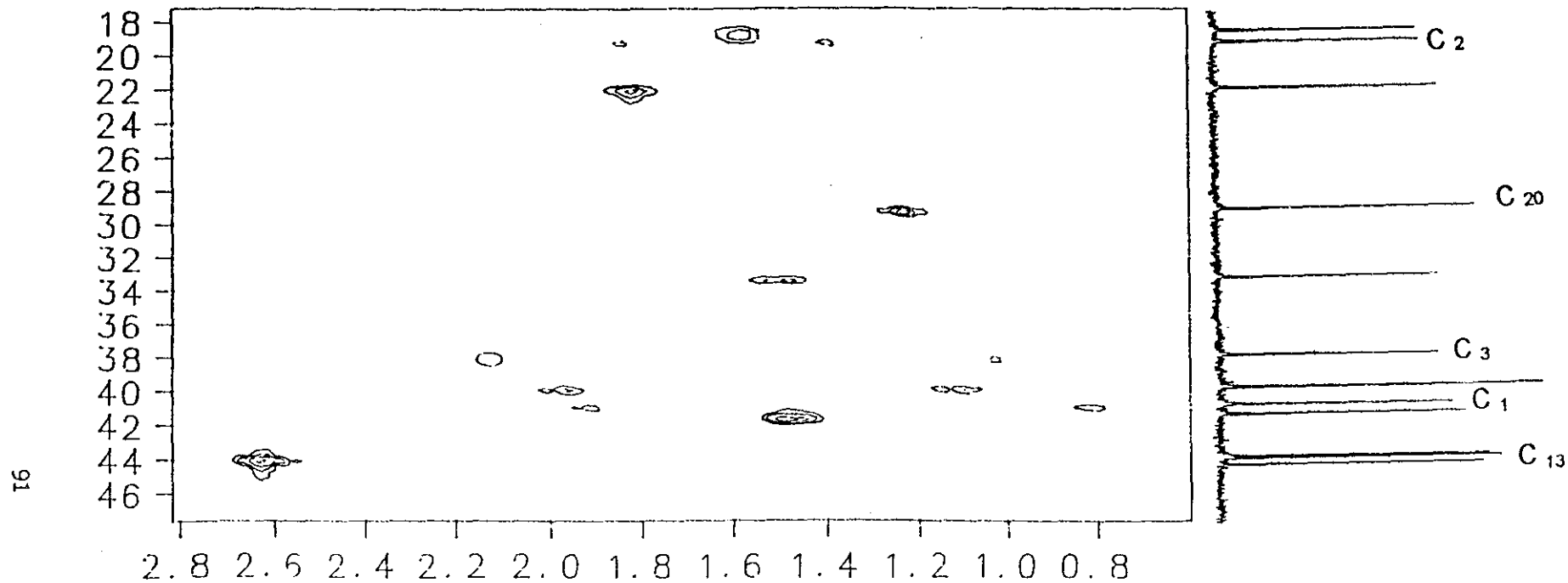
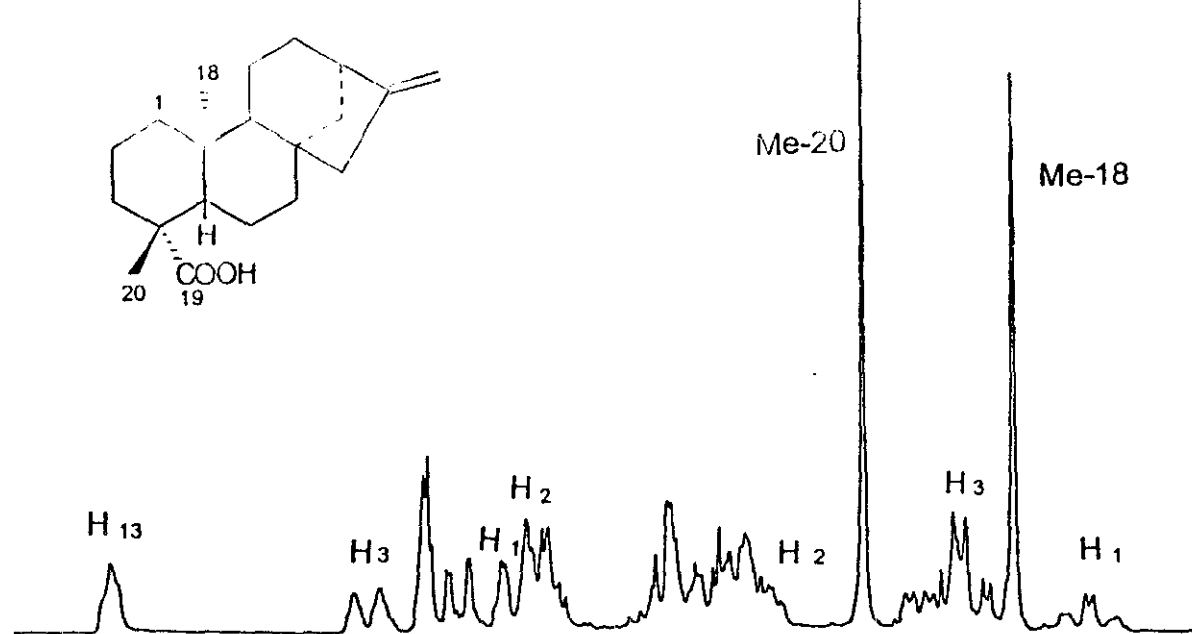
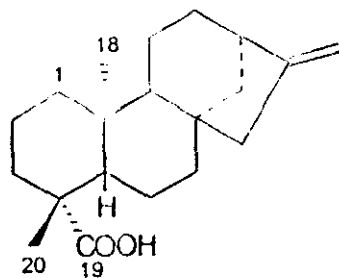


Espectro No. 10 Espectro de RMN<sup>13</sup>C (75.9 MHz) del ácido kaurenoico

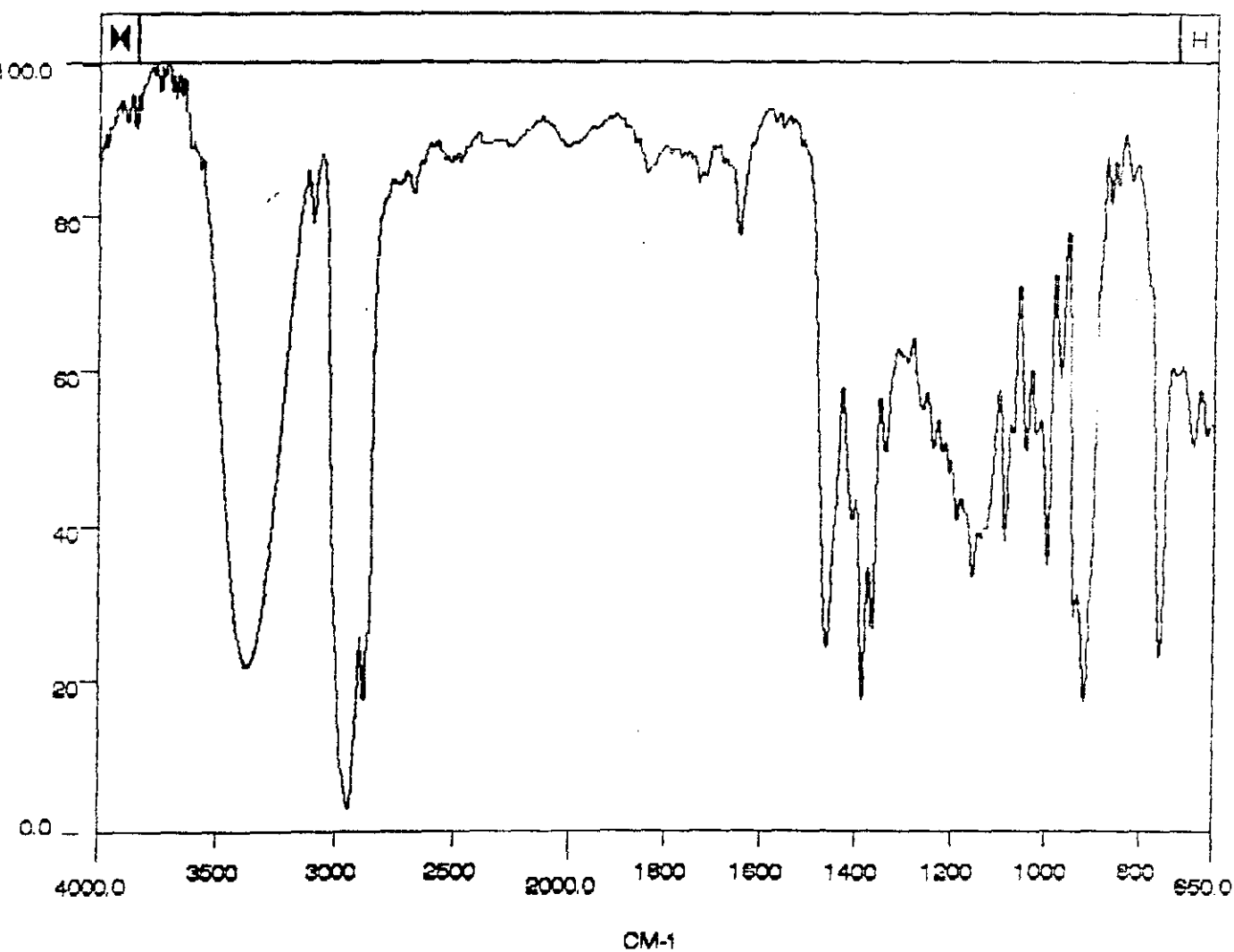
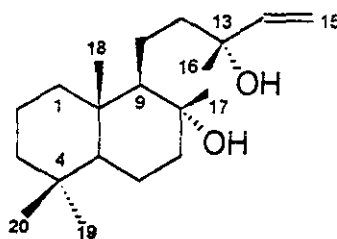


Espectro No. 11 Diagrama HETCOR (75.4 MHz) de ácido kaurenoico en  $\text{CDCl}_3$

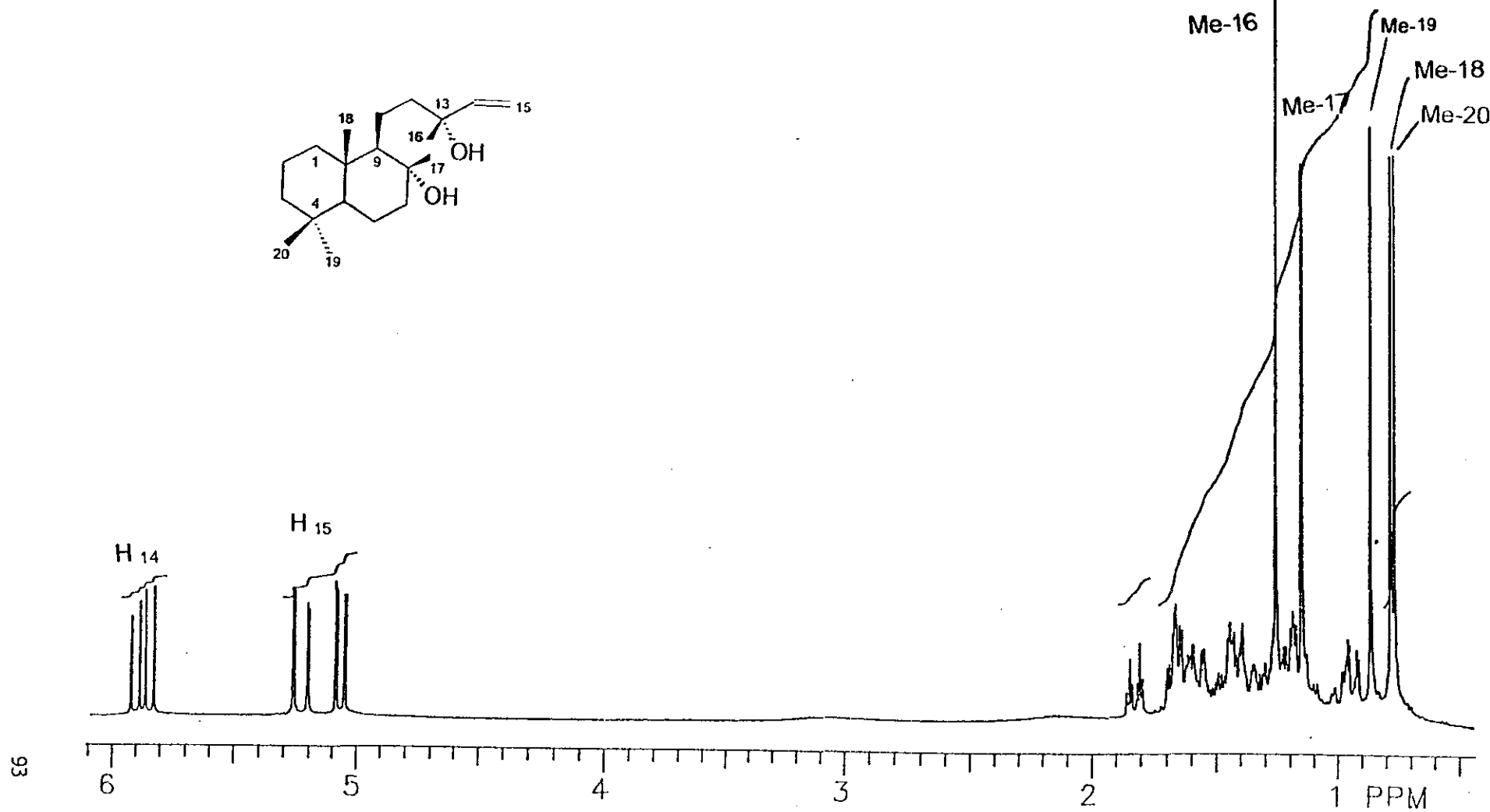
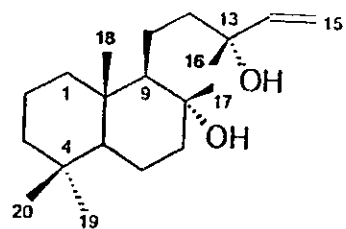




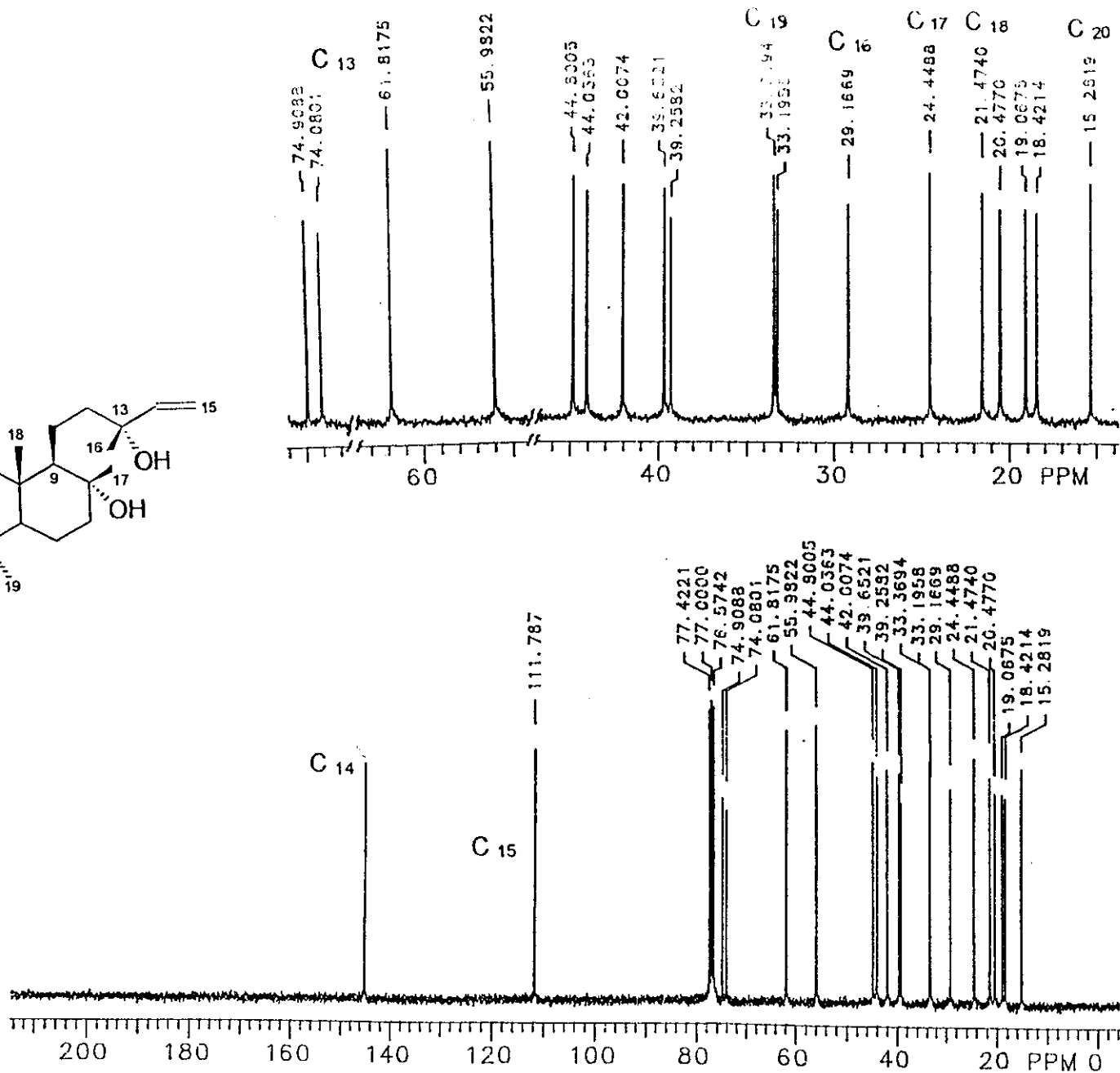
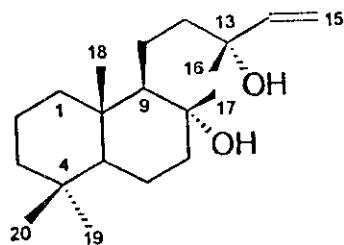
Espectro No. 12 Diagrama HETCOR (75.4 MHz) de ácido kaurenoico en CDCl<sub>3</sub>



**Espectro No. 13    Espectro de IR del 13-epiesclareol**

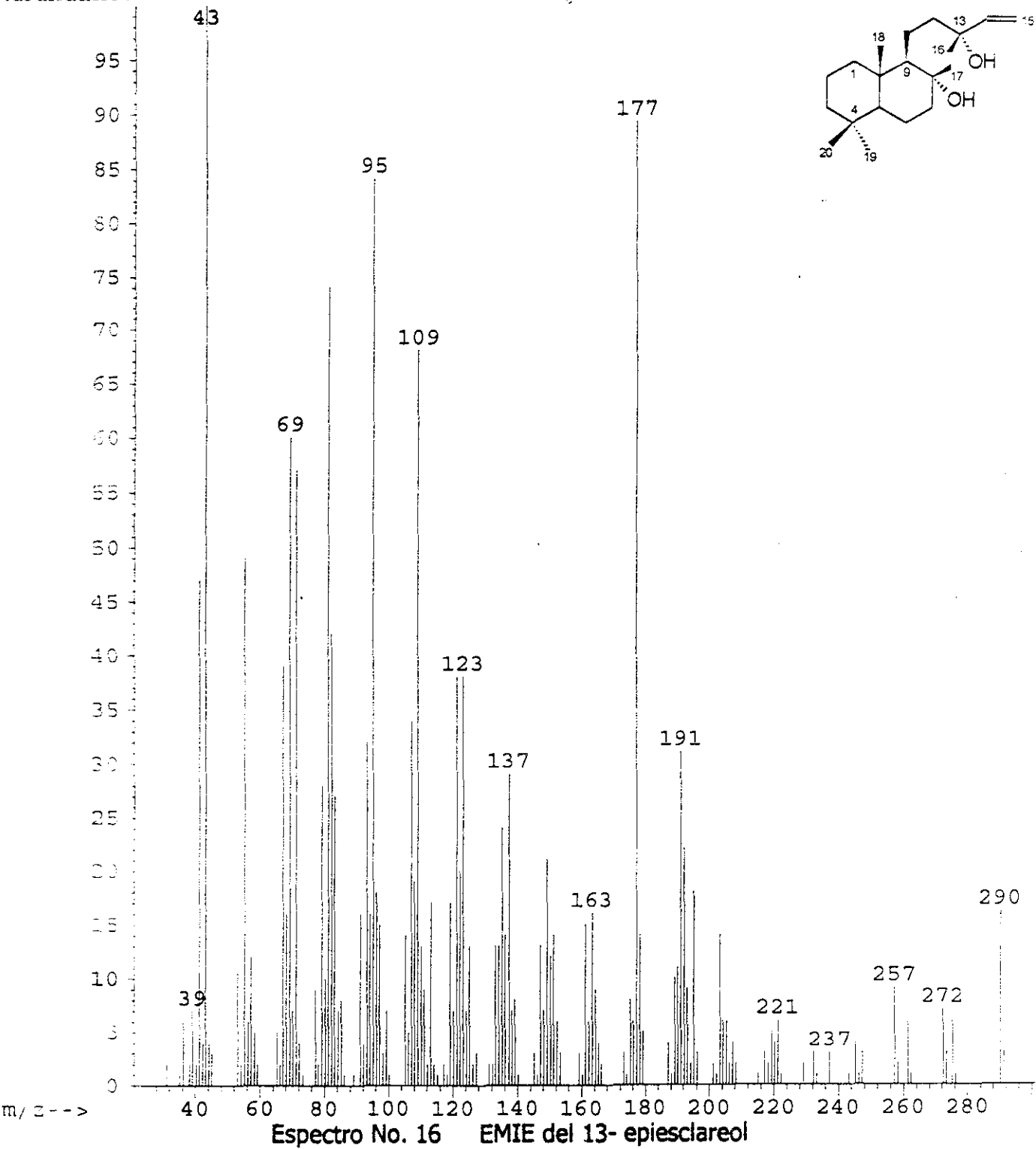


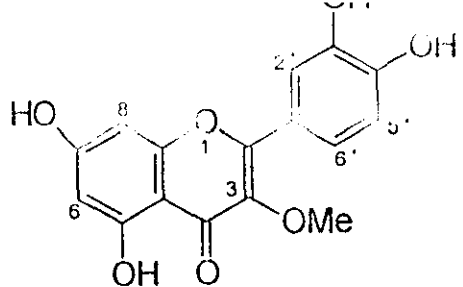
Espectro No. 14 Espectro de RMN<sup>1</sup>H (300MHz) del 13-epiesclareol en CDCl<sub>3</sub>



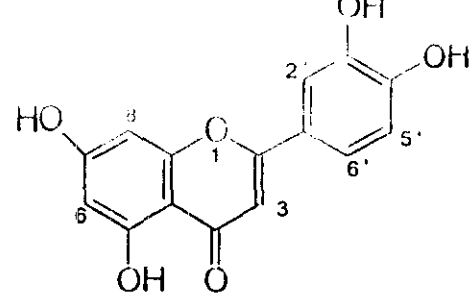
Espectro No. 15 Espectro de RMN<sup>13</sup>C (75.4 MHz) del 13-epiesclareol en CDCl<sub>3</sub>

Abundance



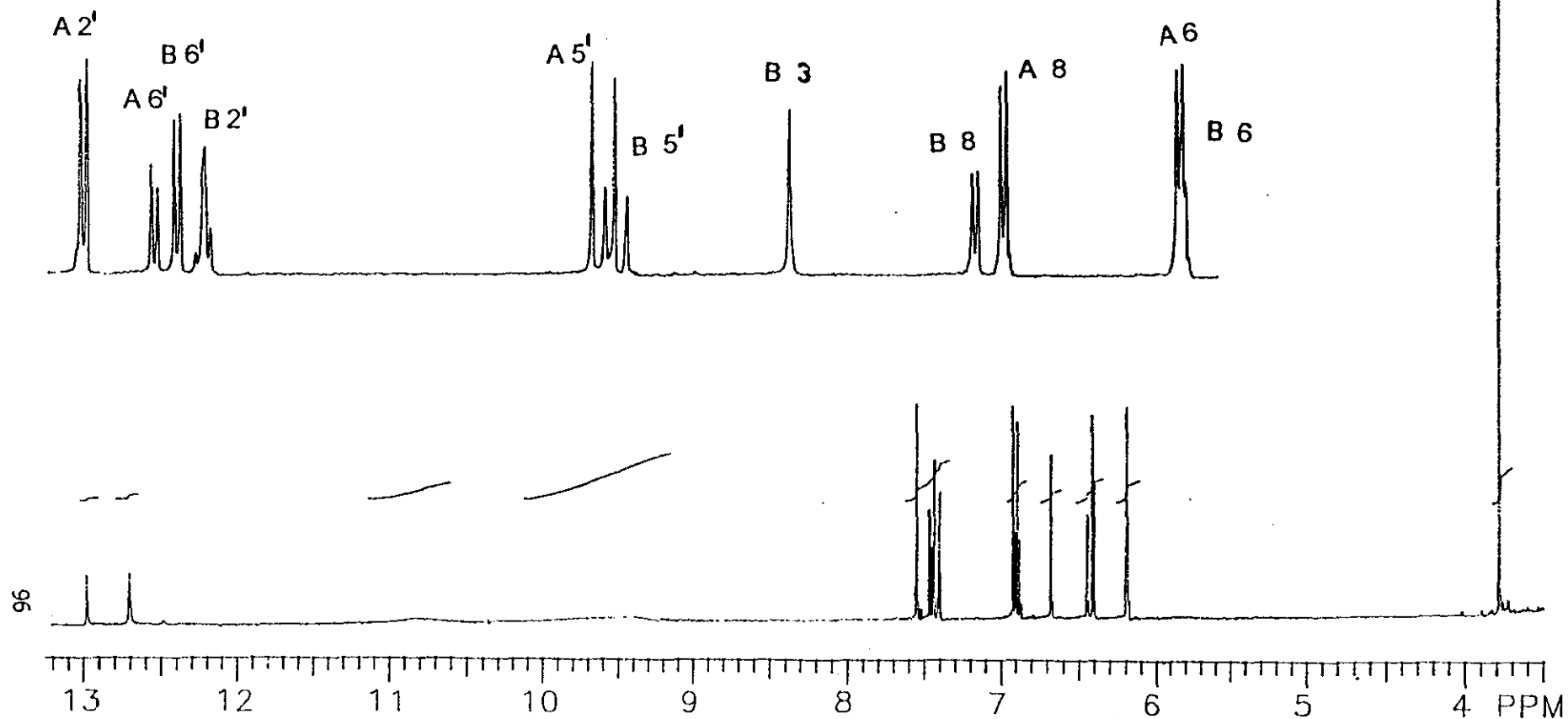


**A**

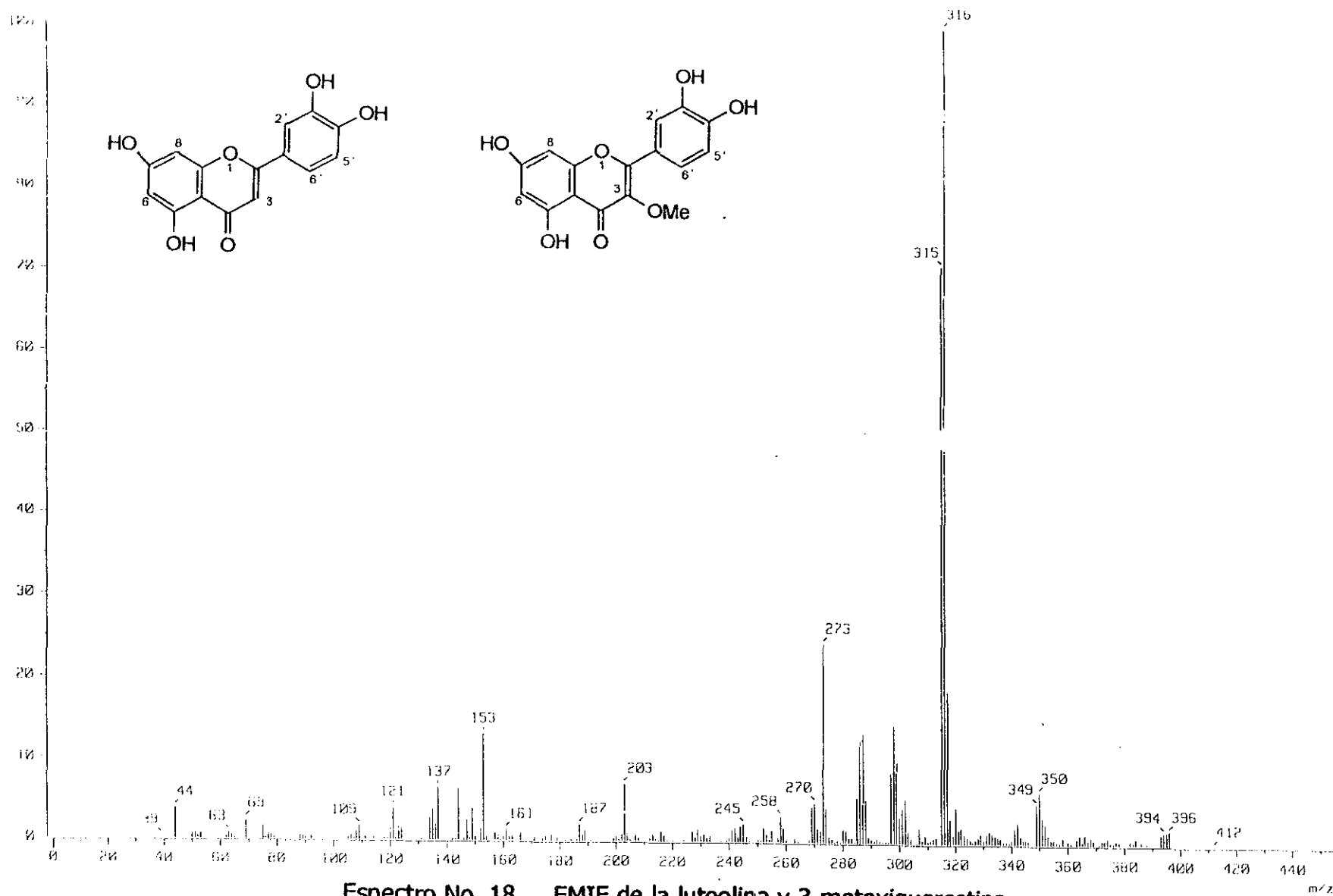


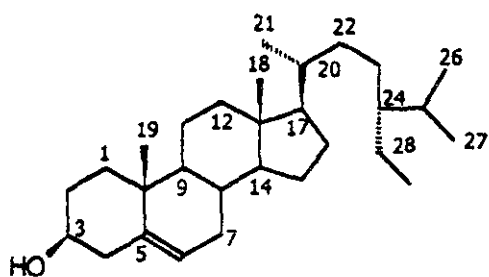
**B**

OMe

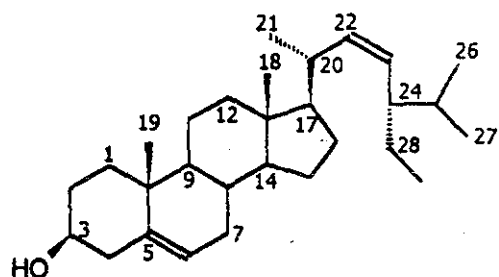


Espectro No. 17 Espectro de RMN<sup>1</sup>H (300 MHz) de luteolina y 3-metoxiquercetina en DMSO

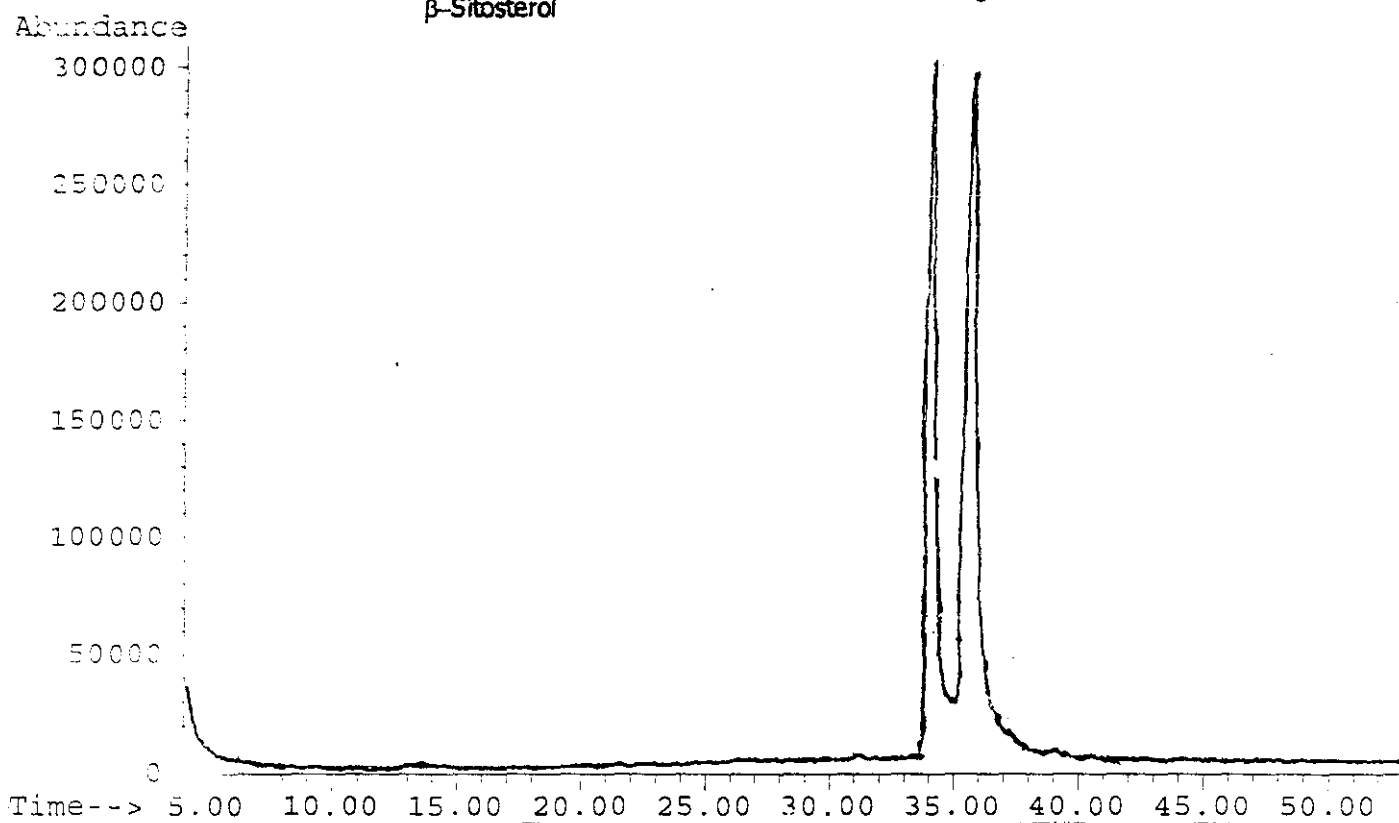




$\beta$ -Sitosterol



Estigmasterol



Espectro No. 19 Cromatograma de la mezcla de  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol



Abundance

43

95

90

85

80

75

70

65

60

55

50

45

40

35

30

25

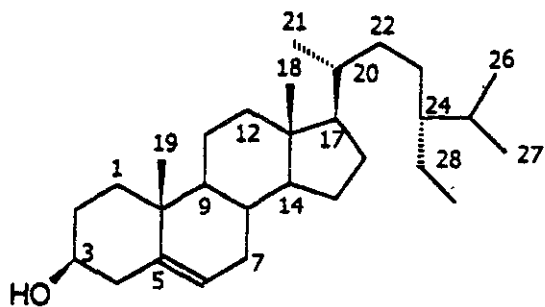
20

15

10

5

0



55

81

107

145

161

199

213

255 273

303

329

354

396

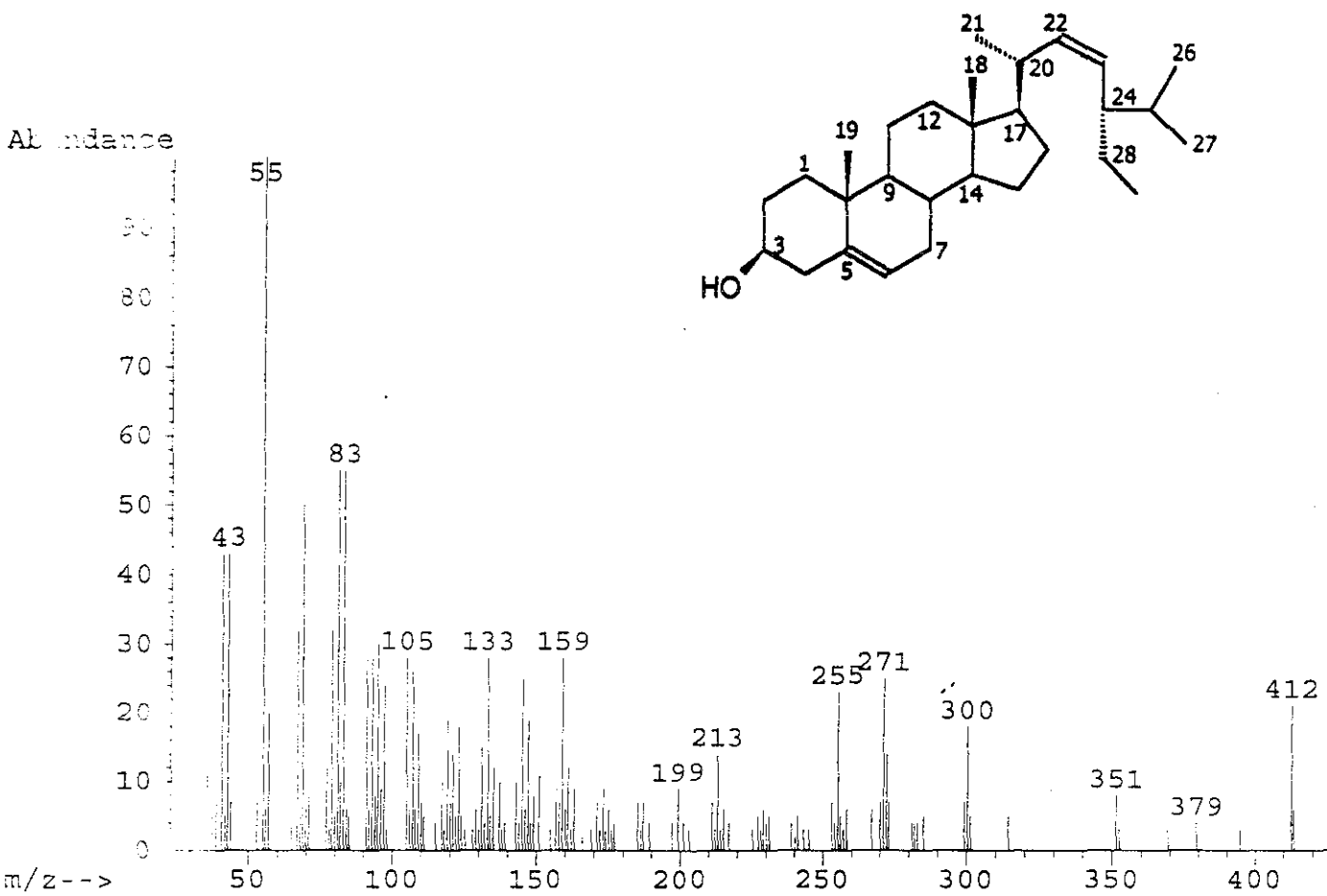
414

m/z-->

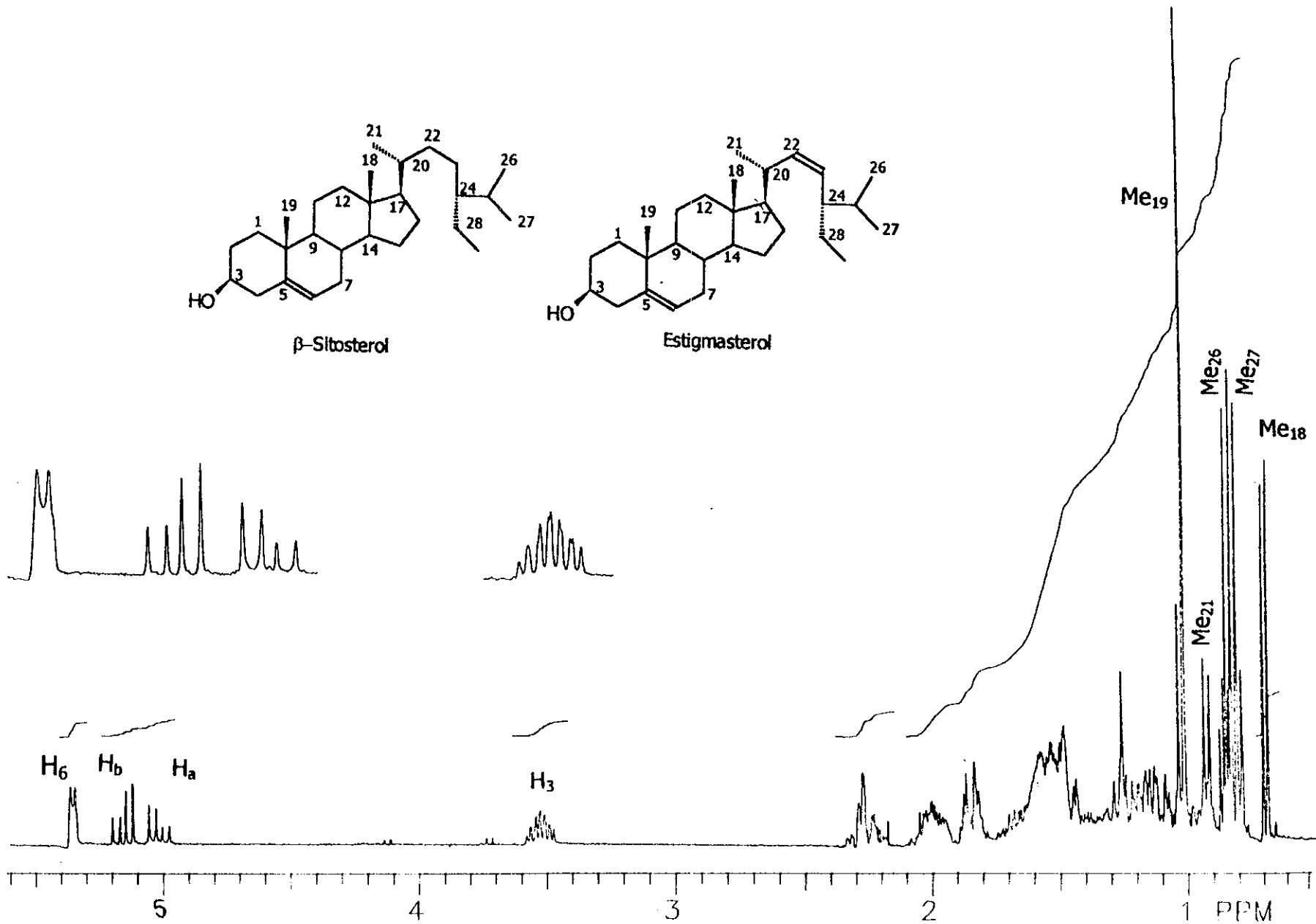
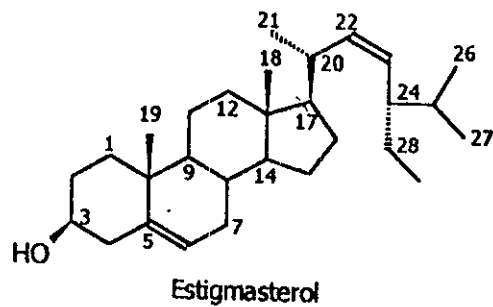
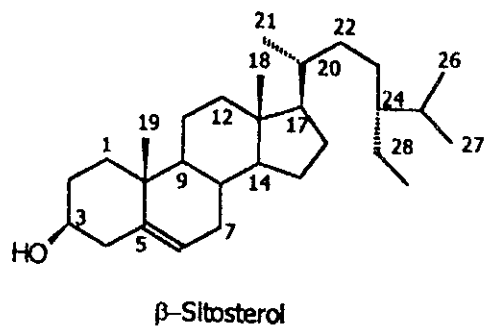
50

Espectro No. 20

EMIE del  $\beta$ -sitosterol



Espectro No. 21 EMIE del estigmasterol



Espectro No. 22 Espectro de RMN<sup>1</sup>H (300 MHz) de  $\beta$ -sitosterol y stigmasterol en CDCl<sub>3</sub>