



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

11661

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

COORDINACION GENERAL DE POSGRADO

VALORACION DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA
HORMINONA Y ALGUNOS DE SUS DERIVADOS
QUIMICOS, EN BACTERIAS QUE GENERAN
ENFERMEDADES EN FRUTOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS
(MICROBIOLOGIA)**

PRESENTA LA BIOLOGA

MARTHA BEATRIZ VILCHIS ARGUETA

DIRECTORES:

M. en C. NIDIA ARAGON SALGADO

DR. RENE MIRANDA RUVALCABA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

2008



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARTA DE VOTOS APROBATORIOS

**Coordinación General de Estudios de Posgrado
FES-Cuautitlán
Presente.**

Por medio de este conducto nos permitimos comunicar a usted que revisamos la tesis titulada **"Valoración del efecto antimicrobiano de la horminona y algunos de sus derivados químicos, en bacterias que generan enfermedades en frutos"** que presenta la alumna **MARTHA BEATRIZ VILCHIS ARGUETA** registrada con el número de cuenta **7127776-9** y con el número de expediente **100941011** para obtener el grado de **Maestra en Microbiología**. Consideramos que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el Examen de Grado correspondiente, otorgamos el voto aprobatorio.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

_____ a _____ de _____ del _____

NOMBRE DE LOS SINODALES

Presidente: **DR. TIRSO RIOS CASTILLO**

Vocal: **DR. ARMANDO CABRERA ORTIZ**

Secretario: **M.C. CAROLINA MORENO RAMOS**

Primer Suplente: **DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA**

Segundo Suplente: **DR. VICTOR R. TENORIO GUTIERREZ**

El presente trabajo se realizó en los Laboratorios de: Bacteriología en la Unidad de Posgrado y el L-122 de Química Orgánica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la M en C Nidia Aragón Salgado y el Dr. René Miranda Ruvalcaba.

DEDICATORIAS

- ♦ A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitir mi formación académica y brindarme la oportunidad de ser parte de ella.
- ♦ A mis hijos Gustavo, Alfonso y Fadua que con su amor me animaron cuando más lo necesite.
- ♦ A mi compañero René Miranda por su invaluable apoyo.
- ♦ A la memoria de mi madre Guadalupe Argueta.
- ♦ Principalmente a Dios por su sabiduría.

Jamás es perdido el bien que se hace...

AGRADECIMIENTOS

- ◆ M en C Nidia Aragón Salgado por su confianza y amistad.
 - ◆ Dra. Susana E. Mendoza Elvira por su valiosa amistad y apoyo.
 - ◆ A los sinodales por sus atinados comentarios.
 - ◆ M en C Andrea Becerril Osnaya y a M en C Benjamín Velasco Bejarano por su apoyo académico.
 - ◆ De manera especial, a las personas que de alguna forma influyeron en mi para poder realizar esta etapa de mi vida: Fadia Kuri Harcuch, Carolina Hernández, Consuelo Olivares, Celia Bacilio.
 - ◆ Finalmente, hago extensivos mis agradecimientos por el apoyo técnico que me proporcionaron eficientemente los siguientes profesionales.
-
- ◆ Ing. Luis Velasco Ibarra Espectrometría de Masas
 - ◆ M en C Javier Pérez López Espectrometría de Masas
 - ◆ M en C Gabriel Arroyo Razo Informática
 - ◆ QFB Roberto Osnaya M. Informática

INDICE

RESUMEN	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANTECEDENTES	
1.1.1. CONSIDERACIONES GENERALES	3
1.1.2. BACTERIAS FITOPATÓGENAS	5
1.1.2.1. <i>Clavibacter</i>	5
1.1.2.2. <i>Erwinia</i>	6
1.1.2.3. <i>Xanthomonas</i>	7
1.1.2.4. <i>Pseudomonas</i>	8
1.1.3. FITOQUÍMICA	10
1.1.3.1. Terpenos	12
1.1.3.2. Diterpenos	13
1.1.3.3. Horminona	14
1.1.4. ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS	16
1.1.4.1. Clasificación	16
1.1.4.2. Pared celular	16
1.1.4.3. Membrana citoplasmática	17
1.1.4.4. Síntesis de proteínas	17
1.1.4.5. Tetraciclinas	18

1.2. JUSTIFICACIÓN	23
1.3. HIPÓTESIS	23
2. OBJETIVOS	24
3. METODOLOGÍA	
3.1. OBTENCIÓN DE LA HORMINONA Y SUS DERIVADOS	26
3.1.1. MATERIAL VEGETAL	26
3.1.2. EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA HORMINONA	26
3.1.3. PRODUCTO DE DESHIDRATACIÓN	28
3.1.4. PRODUCTO DE ACETILACIÓN	28
3.1.5. PRODUCTO DE BENZOILACIÓN	28
3.1.6. PRODUCTO DE METILACIÓN	29
3.2. CARACTERIZACIÓN DE LA HORMINONA Y SUS DERIVADOS QUÍMICOS	29
3.3. AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS	30
3.4. SELECCIÓN DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN FRUTOS SANOS	30
3.5. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS AISLADOS	31
3.6. VALORACIÓN “IN VITRO” DE LA ACCIÓN BACTERICIDA DE	

LA HORMINONA Y SUS DERIVADOS CONTRA BACTERIAS PATÓGENAS	31
3.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA	33
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS	33
4. RESULTADOS	
4.1. OBTENCIÓN DE LA HORMINONA Y SUS DERIVADOS	34
4.2. OBTENCIÓN DE LAS CEPAS FITOPATÓGENAS	34
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	
5.1. PARTE QUÍMICA	48
5.2. PARTE MICROBIOLÓGICA	51
6. CONCLUSIONES	
7. GLOSARIO	55
8. APÉNDICE	57
9. REFERENCIAS	69

RESUMEN

Debido a las pérdidas, que por ataque bacteriano, se presentan en algunos frutos y tubérculos comestibles, es necesario el desarrollo de métodos nuevos enfocados a resolver el problema. Al respecto, en esta tesis se presentan y discuten los resultados de estudiar el efecto antibacteriano de la horminona, un metabolito secundario, así como el de cuatro de sus derivados químicos, contra algunas bacterias fitopatógenas. Las actividades realizadas fueron las siguientes: de la raíz de *Salvia reptans* Jacq. se aisló e identificó a la horminona, posteriormente a partir de ésta se prepararon algunos derivados vía química, y, a la serie de moléculas obtenidas, se le estimó su efecto bactericida en cepas fitopatógenas aisladas de pepino, jitomate, calabaza, papa y chile pimiento, así como en algunas bacterias ATCC. Los resultados emanados de esta investigación, indican que las moléculas empleadas son eficaces contra bacterias Gram positivas.

ABSTRACT

Bacterial attack wreak havoc upon several species of edible fruits and tubercles, thus it is necessary to evolve new methods in order to solve this problem. In this sense, the aim of this thesis was to analyze the antibacterial effects of horminone, a secondary metabolite, as well as four of its chemical derivatives upon phytopatogen bacterias. The natural bactericide agent under test, was isolated from the roots of *Salvia reptans* Jacq.; once, it was obtained and identified by spectroscopical means, it was then chemically modified obtaining four analogous moieties. All the molecules in our hands were assayed upon phytopatogen stains isolated from cucumber, tomato, zucchini, pepper-chili and potato, as well as with some ATCC bacterias.

The acquired results, demonstrated that horminone and its derivatives are efficient bactericides against Gram positive bacterias.

1. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, el hombre ha buscado satisfacer algunas de sus necesidades con productos que genera la naturaleza. Tal es el caso de aliviar sus enfermedades y dolencias, con diferentes plantas que ha tenido a su alcance. Así, entre los primeros registros de las civilizaciones China, India, Sudamericana, Mesoamericana y Mediterránea, se encuentra la descripción de los efectos terapéuticos de varias plantas o mezclas de éstas, cuyos granos, raíces o cortezas,¹ se empleaban en forma de infusiones, ungüentos o emplastos.²

El estudio de los metabolitos secundarios de vegetales, tiene un valor considerable dentro de la investigación química en México y en el mundo. En nuestro país esto se debe en parte a la gran riqueza y diversidad de su vegetación, así como por los antecedentes de la Medicina Tradicional Indígena en conjunto con la Herbolaria, lo cual se puede confirmar si se toma en cuenta que el 25 % de los medicamentos prescritos en la actualidad son sustancias obtenidas de las plantas.³

Entre los múltiples trabajos fitoquímicos existentes, se desea resaltar que de manera reciente se llevó a cabo un estudio de la raíz de *Salvia reptans* Jacq., aislándose de ésta a la horminona, una quinona diterpénica de tipo abietánico. Como complemento, es apropiado comentar que con esta molécula en conjunto con cuatro de sus derivados químicos, se llevó a cabo una investigación de Relación Estructura Actividad,⁴ con cepas de bacterias Gram positivo y negativo de colección ATCC⁵ así como con la Oxitetraciclina; la cual se empleó como patrón de referencia. Al respecto, es importante mencionar que al modificar químicamente las posiciones 7 y 12 de la horminona, (vía: acetilación, benzoilación, metilación y deshidratación), la actividad antimicrobiana se vio modificada.

Por consiguiente para contribuir con esta línea de investigación, en el presente trabajo se realizó un estudio de relación estructura actividad microbiológica, mediante la serie de moléculas mencionadas con bacterias fitopatógenas de referencia (ATCC), así como con cepas silvestres que dañan a frutos y hortalizas como jitomate, chile pimiento, calabaza y papa entre otros. La validación de las pruebas se realizó utilizando normas aceptadas por la U.S.P,⁶⁻⁸ empleando como referencia a la oxitetraciclina, antibiótico comercial de espectro amplio.

Los resultados obtenidos demostraron que la horminona al igual que el derivado acetilado, presentaron actividad con cepas bacterianas Gram positivo en cambio, el compuesto metilado sólo tuvo actividad en bacterias Gram negativo sin embargo los productos de deshidratación y benzoilación no se observó actividad antimicrobiana.

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. CONSIDERACIONES GENERALES

Las enfermedades causadas en los frutos y hortalizas postcosecha, no han recibido la atención que la magnitud del problema merece, inclusive las pérdidas raramente se calculan durante la etapa en la cual la fruta es cosechada y transportada. Lo anterior también es válido con los productos utilizados en restaurantes, verdulerías y cocinas económicas.

Al respecto, las bacterias suelen ser la causa de una gran proporción de los daños a vegetales y algunos frutos como pepinos, jitomates, chiles pimientos entre otros; sin embargo es adecuado mencionar, que la gran mayoría de los frutos suele ser afectado más bien por los hongos, esto probablemente debido al valor bajo del pH (4.5) de los especímenes vegetales, lo cual inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias capaces de degradar los tejidos de las plantas.

Asimismo, existe poca información respecto a la cantidad de desechos resultantes debido a la descomposición bacteriana. Algunos datos provienen de los informes realizados en relación a frutos y vegetales, muestreados en las ciudades de Nueva York y Chicago, tanto a nivel comunidad como de centrales de abastos.

Por otro lado en algunos acopios australianos, más del 75 % de frutos y vegetales fueron destruidos por bacterias las cuales provocaron pudrición suave, lo anterior en algunos embarques, exportados por el Reino Unido; es conveniente comentar que las pérdidas más severas se dieron particularmente en papa, debido a la presencia de bacterias, mediante pudrición suave.⁹

A nivel mundial, particularmente en países subdesarrollados, las pérdidas se estiman en 50 % de la cosecha, éstas son aún mayores como consecuencia de la

carencia de una refrigeración adecuada, en conjunto con los malos hábitos de higiene.⁹

Complementariamente, es pertinente mencionar que los frutos y hortalizas suelen enfermarse tanto en el campo estando la planta o el árbol en pie, por entre sus aberturas naturales, como las lenticelas y los estomas, o a través de heridas, las cuales son provocadas por el mal manejo en los centros de acopio, en los almacenes así como en las centrales de abastos. Frecuentemente el daño se produce cuando son lavados con agua que no es renovada ni desinfectada; en éstas la cantidad de bacterias y hongos es elevada, por lo tanto, los frutos y hortalizas son invadidos por los microorganismos. Estos daños también se difunden de fruta a fruta en los contenedores así como en los cuartos de pelado o de limpieza.^{9,10, 13}

Las enzimas bacterianas provocan maceración en los tejidos y pérdida de agua, plasmólisis, colapsos y finalmente la muerte.¹⁰ Las bacterias al invadir los tejidos del vegetal, causan daños como son la marchitez, la cual es inducida en la mayoría de los casos por el bloqueo de agua que resulta del taponamiento de los vasos del xilema con los exudados y concentraciones de la células bacterianas; pudriciones suaves o húmedas, las cuales se caracterizan por el colapso aguanoso de los tejidos parenquimatosos afectados. Las pudriciones frecuentemente se extienden inicialmente a través del xilema en el estadio inicial del desarrollo de la enfermedad, las manchas foliares, ocasionadas por gotas de agua, son el síntoma inicial de las enfermedades de manchas bacterianas en las hojas. El síntoma aparece después de 4-5 días de la infección y particularmente es conspicuo bajo condiciones de humedad, las lesiones gradualmente se tornan de color amarillo a café oscuro y eventualmente se vuelven necróticas. La infección se presenta usualmente en la porción basal de los pecíolos de la hoja y retoños, pudiéndose formar escurrimientos en la superficie del tallo infectado.¹³

1.1.2. BACTERIAS FITOPATOGENAS.

Las bacterias fitopatógenas más comunes son las pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Corynebacterium*, este último con las innovaciones taxonómicas basadas en la genética molecular y una gama de características bioquímicas, se subdividió en: *Rhodococcus*, *Clavibacter*, *Cortobacterium* y *Arthronacter*.^{13, 14, 15}

1.1.2.1. *Clavibacter*: Son bacilos irregulares, curvos o en cuña, Gram positivos, móviles o inmóviles, sus colonias son pequeñas de crecimiento lento, mucoides, convexas de color amarillo al naranja incluso, rosas o rojas, no forman endosporas, son aerobios estrictos, catalasa positivo, oxidasa negativo y frecuentemente presentan gránulos metacromáticos.¹¹⁻¹⁵

Dentro de las especies importantes se encuentran *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, se le asocia con un sólo hospedero perteneciente al género *Solanaceum* principalmente el chile pimiento y tomate, a éste último le produce el denominado cáncer bacteriano, el cual se ha convertido en un problema en plantíos de tomate pequeños y comerciales. Esta enfermedad puede producir lesiones o tumores en algunas porciones de la planta, incluyendo los frutos, dando como resultado el marchitamiento de la misma. Se manifiesta primeramente en las hojas del vegetal, tornándose amarillentas, marchitas, secas y quebradizas, hasta que se desprenden de la planta, estas manchas se pueden desarrollar en los peciolo de las hojas, tallos e internamente en el xilema, formándose pequeñas depresiones circulares, los llamados tumores. En los frutos, el cáncer bacteriano se distingue por la presencia de manchas, las cuales están rodeadas por halos de color blanco entre 3 a 6 mm de diámetro, estas suelen desaparecer cuando el fruto madura. Las lesiones en el fruto del chile pimiento pueden ser como pústulas las cuales se manifiestan en el fruto maduro.

Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicum. Causa la pudrición anular de la papa. En la actualidad se estima que esta enfermedad se encuentra distribuida mundialmente en todas las áreas donde se cultiva la papa. Estos organismos se conservan principalmente en los tubérculos infectados ya sea en el almacenaje o en los que han quedado en el campo después de la cosecha. Las bacterias invernan principalmente en los tubérculos infectados en forma de un mucílago seco sobre maquinaria, canastas y costales, nunca en el suelo. Sin embargo se disemina con facilidad a partir de los cuchillos utilizados para cortar los tubérculos. Los síntomas empiezan con manifestaciones de marchitez en hojas y tallos, a partir de la mitad del período vegetativo de la planta. Generalmente, son las hojas inferiores las primeras en marchitarse, se enrollan ligeramente en los márgenes, adquiriendo un color verde pálido. A medida que progresa la marchitez se desarrollan áreas de color amarillento en los espacios intervenales. Los síntomas característicos de la enfermedad aparecen en los tubérculos antes o después de la cosecha y pueden manifestarse en sólo algunos de los tubérculos de una planta. La infección comienza a desarrollarse en el extremo del tallo y continúan avanzando a través de los tejidos vasculares. Cuando se hace un corte de un tubérculo, puede observarse inicialmente un anillo de manchado vascular de color amarillo claro y cierta cantidad de exudado bacteriano que aumenta al ejercer presión sobre éste. Al avanzar la enfermedad, en la región del anillo vascular se desarrolla una pudrición gaseosa de color café claro o amarillo cremoso y cuando se presiona el tubérculo, en las zonas dañadas, sale un exudado pulposo y blando, en tanto que la pudrición de los tejidos del área vascular forman un anillo de cavidades más o menos continuo. Esta pudrición puede incrementarse por la acción de algunas bacterias secundarias como *Bacillus polymyxa*.

1.1.2.2. Erwinia: Son bacilos Gram negativo con flagelos peritricos, forman colonias blancas o blanco grisáceo, su consistencia varía de húmeda a mucoide, circulares convexas o pulvinadas su diámetro puede oscilar entre 2-5 mm, catalasa positiva, oxidasa negativa, anaerobias facultativas, fermentan la glucosa, reducen los

nitratos, producen la β -galactosidasa y el ácido sulfhídrico. Utilizan la L-arabinosa, D-galactosa, D-glucosa, glicerol, D-mannosa, D-ribosa y la sacarosa; sin embargo otras cepas utilizan la L-ramnosa y el D-mannitol, pero no las dextranas.¹¹⁻¹⁵

Algunas especies como *Erwinia carotovora* y *Erwinia amylovora* causan daños en chile pimiento, jitomate, calabaza y papa, produciendo pudrición suave, marchites y tizones. En los tubérculos, provocan pudriciones blandas y pie negro, el daño se presenta generalmente en la base del tallo, manifestándose como un maceramiento del tejido (pudrición) el cual se torna de una coloración café oscura o negro. Este daño, bajo condiciones de alta humedad y bajas temperaturas, puede seguir avanzando, provocando pudrición de estolones y tubérculos. Esta infección, reviste gran importancia en los campos de producción de semillas de papa ya que en las zonas en donde se produce, las condiciones son muy favorables para su desarrollo (alta humedad y bajas temperaturas) característica importante de esta patógeno es que puede estar presente en la planta sin manifestar síntomas, lo cual se denomina infección latente. Lo anterior es de suma importancia ya que al no presentar los signos, los tubérculos y semillas son portadores de la enfermedad.¹⁵

1.1.2.3. Xanthomonas: Hay más de 100 especies dadas a conocer en todo el mundo. Son bacilos Gram negativo, de 0.4-0.7 por 0.7-1.8 μm con un flagelo polar, a veces dos, forman colonias amarillas convexas, (a veces blancas como *X. albilineans*), mucoides y brillantes, su diámetro oscila entre 1-5 mm. Producen cantidades considerables de xantanas, la mayoría son lipolíticas, siendo su temperatura óptima de crecimiento de 25 a 27 °C; así mismo, son aerobias, catalasa positiva y no reducen los nitratos.¹¹⁻¹⁵

Xanthomonas campestris afecta a los jitomates provocando pudriciones blandas, marchitez y manchas foliares, otras especies provocan tizón en yuca, frijol y algodón. La enfermedad denominada mancha bacteriana profunda, es causada por

Xanthomonas campestris p.v. *vesicatoria*, y esta distribuida ampliamente en Estados Unidos, Sudamérica, Europa, África y México en diferentes regiones de Sinaloa y Sonora.¹⁶ Pueden afectar hojas y frutos de pepinos, tomates y belladonas, el desarrollo de la infección es favorecida por temperaturas que oscilan entre 23 a 30 °C y humedad elevada, se distingue porque las manchas son aproximadamente de 2 mm, ligeramente realzadas y tienen un margen bien definido, cuando el fruto madura, las manchas generalmente llegan a hundirse formando pozos ya que el tejido sano se desarrolla más rápido que el tejido infectado, las zonas del tejido sano que rodea a las manchas, permanecen verdes por más tiempo al resto del fruto en maduración.

Xanthomonas campestris p.v. *campestris*. Esta bacteria se ha reportado en Estados Unidos, Europa y América Latina, especialmente en México en los Estados de Michoacán, Puebla, Estado de México y Tlaxcala. Ataca cultivos de repollo, coliflor, nabo, col de brucas, colinabo, y calabaza. Cuando esta enfermedad afecta las plantas jóvenes, produce achaparramiento, crecimiento desigual y caída de las hojas de la parte inferior. Sin embargo, los primeros síntomas aparecen en forma de grandes manchas cloróticas con frecuencia en forma de "v" en los bordes de las hojas que avanza hasta la costilla de la misma. Mientras se produce el ennegrecimiento de algunas nervaduras, el manchado avanza hasta el tallo y desde ahí hacia las demás hojas, desarrollándose hasta las raíces de la planta. Las hojas son invadidas sistemáticamente por las bacterias, se desplazan en forma ascendente a través de la nervadura de la vena media. Al observarse un tallo atacado en corte transversal muestra un empardecimiento y ennegrecimiento de los tejidos vegetales y con frecuencia pequeñas gotitas mucilaginosas amarillas. La bacteria también ataca e invade la cabezuela de la col y de la coliflor así como las raíces carnosas del nabo.

1.1.2.4. Pseudomonas: Son bacilos rectos o curvos Gram negativo de 0.5-1.0 por 1.5-4.0 μm , tienen tres flagelos polares, sus colonias son blanco grisáceo,

transparentes o blanco lechoso opacas, pueden o no producir pigmentos verde fluorescente difusibles al medio, catalasa positiva, oxidasa positivo/negativo y aerobias estrictas. Las especies de las cuales se sabe son fitopatógenas pertenecen a las siguientes especies, *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syringae* y *Pseudomonas glumae* entre otras.^{11-15 y 18}

Las especies fitopatógenas son *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syringae* y *Pseudomonas glumae* entre otras, producen pudrición suave y ulceraciones en papas, pepinos y calabazas. *Pseudomonas syringae* p.v. *tomato* causa la mancha bacteriana o peca en tomate, su desarrollo es favorecido por temperaturas de 17 a 23 °C y humedad elevada. La enfermedad se manifiesta al principio en frutos inmaduros y pequeños, después se observan manchas oscuras realzadas rodeadas por un borde húmedo, como el fruto se expande, la mancha se nota como un pozo con un diámetro aproximado de 8 mm. Es importante señalar que esta bacteria se ha encontrado en semillas almacenadas durante 10 o 20 años a temperatura ambiente.¹⁷

Pseudomonas solanacearum Esta bacteria causa la marchitez bacteriana de las solanaceas, afecta a un gran número de plantas, por lo que la enfermedad que ocasiona es conocida por muchos nombres populares, incluidos los de la marchitez del tabaco y podredumbre de la patata. En Estados Unidos se halla muy extendida en la zona del sureste, especialmente sobre el tomate, tabaco, papa, berenjena, pimiento y cacahuate.

La bacteria es muy frecuente en muchos de los países tropicales. En Indonesia ataca tabaco y papa, en las Islas Filipinas destruye muchos cultivos de tabaco, tomate y berenjena. En México fue descrita por primera vez en 1955, por E. F. Smith, y se encontró que afecta cultivos de papa, jitomate y plátano. Se ha determinado que puede atacar también a frijol, zanahoria, cacahuate camote, chile col, berenjena y soya.

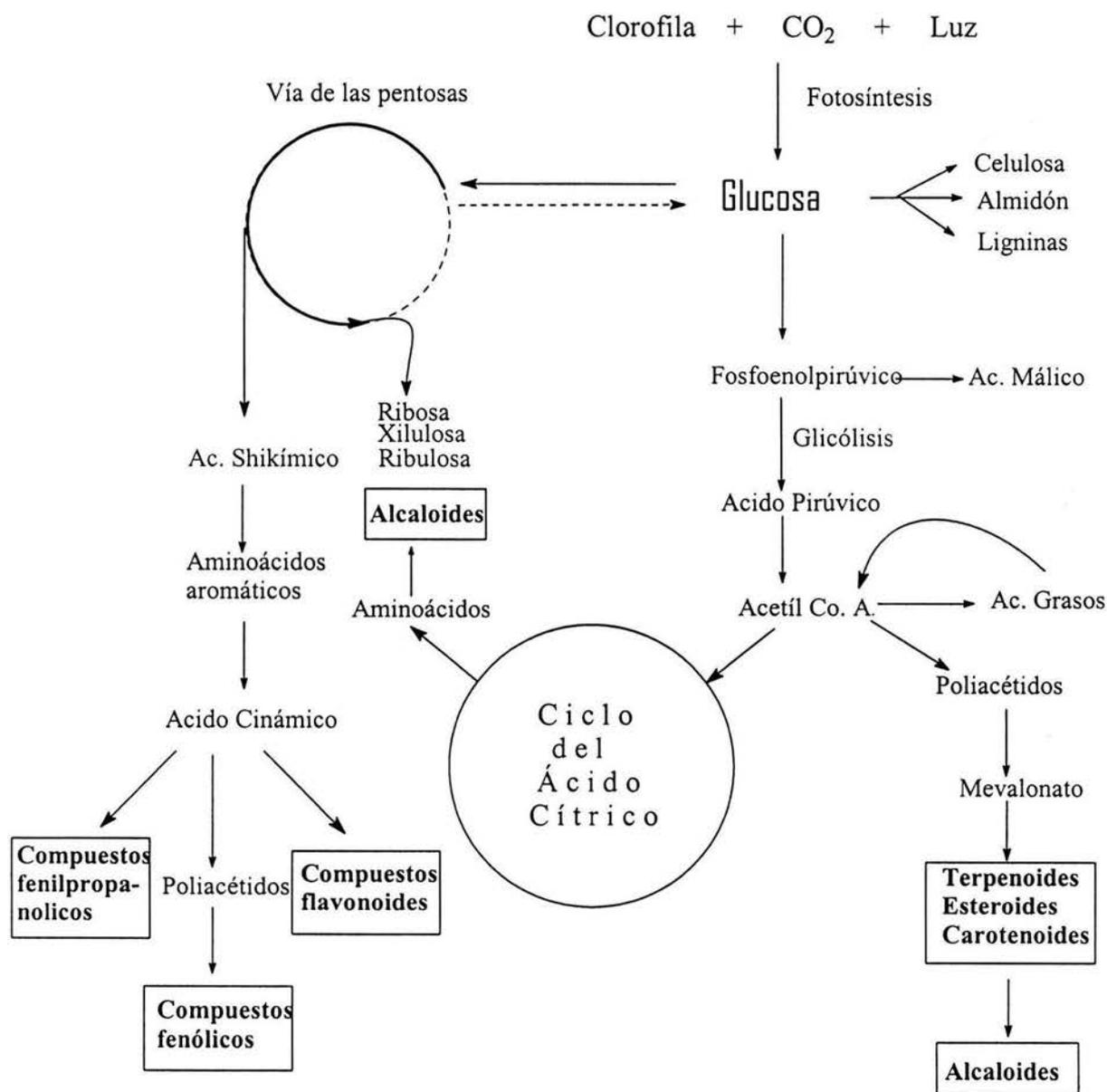
1.1.3. FITOQUÍMICA

La información en la literatura es amplia en relación a los metabolitos presentes en diversas especies vegetales, que muestran actividad antimicrobiana. Como consecuencia, se ha generado un reto a los investigadores, encontrarles un uso o aplicación a esos productos naturales, que en base al tipo de estructura molecular pudieran tener aplicación como: insecticidas, fármacos, colorantes, herbicidas, conservadores de alimentos, fungicidas e incluso bactericidas. Sin embargo, el camino de su implementación es largo y difícil, porque es indispensable realizar pruebas o bioensayos específicos para cada caso, sin omitir la confirmación correspondiente en fases diferentes.

Existen en la naturaleza un sin número de vegetales que como parte de su metabolismo primario y secundario producen diferentes compuestos; al respecto, en términos muy generales, el metabolismo primario se considera el generado a partir de luz blanca, bióxido de carbono y agua, biosintetizándose tanto la D - (+) – glucosa en conjunto con otras clases de moléculas como aminoácidos, proteínas, ácidos orgánicos. Estos últimos, son empleados como fungicidas o fungistáticos produciendo también un intenso efecto inhibitorio al crecimiento de muchas bacterias, tal es el caso del ácido cítrico localizado en gran variedad de frutos, éste, inhibe el crecimiento tanto de bacterias termófilas así como de las *Salmonellas*. Por otro lado, los ácidos succínico, málico y tartárico suelen inhibir el crecimiento de algunas bacterias y levaduras.¹⁹

En sincronía, los vegetales presentan otra actividad metabólica, en forma complementaria, sintetizando metabolitos secundarios²⁰ (Esquema 1); algunos de ellos tienen actividad relevante, tal es el caso de las giberelinas y las auxinas que funcionan como sustancias reguladoras del crecimiento. Otros ejemplos lo constituyen las humulonas y lupulonas (terpenoides) las cuales presentan actividad

antimicrobiana en bacterias gram negativas.¹⁹ Otro caso son algunas resinas o gomas tanto de naturaleza terpenoica como polisacárica, las cuales son tóxicas para insectos, hongos e incluso otras plantas.¹⁹⁻²¹ Al respecto es conveniente mencionar que los metabolitos secundarios de los vegetales suelen ser moléculas de peso molecular alto y de estructuras relativamente complejas.



Esquema 1. Ruta biogénica propuesta para los metabolitos secundarios

1.1.3.1. Terpenos. Dadas la característica estructural de las moléculas estudiadas en este trabajo, se consideró apropiado comentar respecto a los terpenos; estos dada su composición están relacionados a un origen y a una estructura común, ($C_5, C_{10}, C_{15}, C_{20}, C_{25}, C_{30}$ etc.). Al respecto, se ha sugerido que se forman mediante el acoplamiento de varias unidades del 2-metil-1,3-butadieno, comunmente conocido como isopreno (Figura 1).

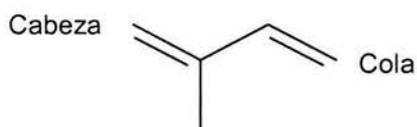


Figura 1

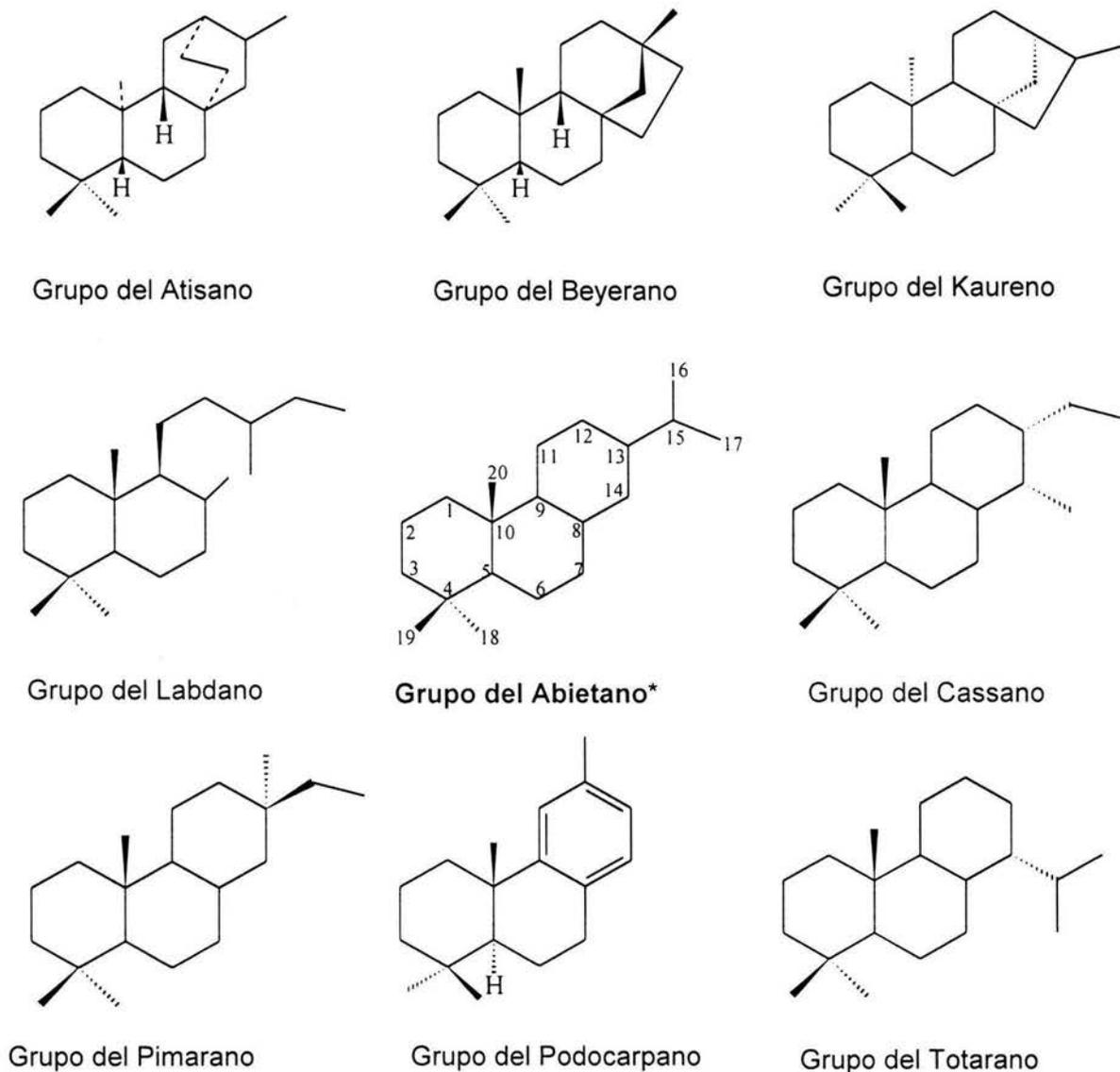
Actualmente para estos compuestos se emplea la clasificación indicada en la Tabla 1; a la forma descriptiva de ésta, se le conoce como la regla del isopreno, originalmente propuesta por Ruzicka.²² En este contexto, se considera la condensación de unidades isoprenoides para mostrar no sólo la formulación del caucho y de los monoterpenos sino también de otros metabolitos análogos.

Tabla 1. Clasificación de los terpenoides.

GRUPO	NC	UI	FC
Hemiterpenos	5	1	C_5H_8
Monoterpenos	10	2	$C_{10}H_{16}$
Sesquiterpenos	15	3	$C_{15}H_{24}$
Diterpenos	20	4	$C_{20}H_{32}$
Sesterterpenos	25	5	$C_{25}H_{40}$
Triterpenos	30	6	$C_{30}H_{48}$
Tetraterpenos	40	8	$C_{40}H_{64}$
Politerpenos	$(5)_n$	$n > 8$	$(C_5H_8)_n$

NC Número de átomos de carbono; UI Número de unidades isoprenicas; FC Fórmula condensada.

1.1.3.2. Diterpenos. Incluidos como parte de los terpenoides están los diterpenos, constituidos por cuatro unidades isoprénicas, éstos se presentan con diversos esqueletos (Esquema 2) así como con funcionalidades químicas diversas.



Esquema 2. Algunos esqueletos diterpenoicos representativos.

Al respecto, y de especial interés para esta tesis son los diterpenos con esqueleto de **abietano***, los cuales se encuentran en gran número de vegetales,

particularmente en el género *Salvia*, el cual es de gran importancia debido a que muchas de sus especies se emplean en medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades.^{2, 23-27} A raíz de lo anterior, no debe sorprender que en la literatura química se informe de muchas moléculas análogas al ácido abiético (Figura 2); en la Tabla 2 se presenta una serie de ejemplos que fortalecen el comentario anterior.^{4, 28-40}

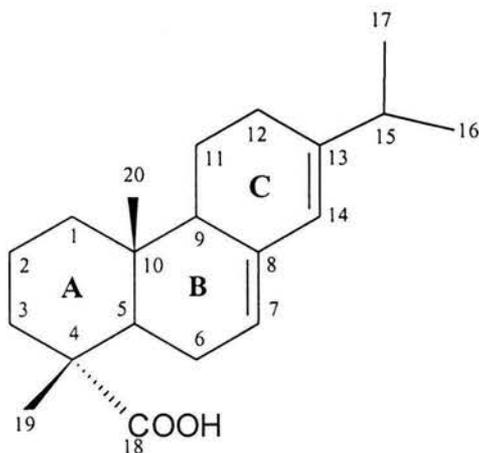


Figura 2

1.1.3.3. Horminona. Entre la clase de moléculas orgánicas anteriormente mencionadas se encuentra la horminona (Figura 3), de la cual se conoce su propiedad inhibitoria del crecimiento *in vitro* de *Trypanosoma cruzi*; ésta es diez veces más activa que la tingenona, un triterpeno con el cual se le ha comparado con anterioridad.⁴

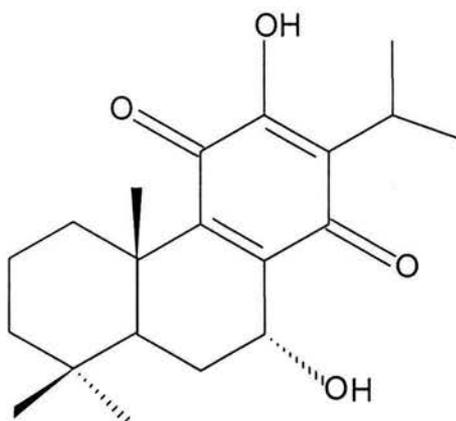


Figura 3

Tabla 2 . Actividad biológica de algunos compuestos abietánicos de tipo quinoidal.

ESPÉCIMEN	COMPUESTO	ACTIVIDAD
<i>Salvia albocaeruleae</i>	Sugiol y el 15-hidroxi-17abieta-8,11,13-trieno	Antibiótico sobre <i>S. aureus</i> y <i>B. subtilis</i> . y moderada actividad sobre <i>C. Albicans</i>
<i>Salvia balloteafora</i>	Conacytona, icetoxona romulogarzona	Tratamiento en problemas estomacales
<i>Salvia canariensis</i>	Rosmaquinona, ácido-11-acetoxi carnosico	Inhibidor del crecimiento de <i>S. aureus</i> y <i>B. Subtilis</i>
<i>Salvia hypargeia</i>	Hypargenina A y B	Antibiótico sobre <i>S. aureus</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Salvia hypargeia</i>	Hypargenina C y D.	Antibiótico sobre <i>Bacillus subtilis</i>
<i>Salvia hypargeia</i>	Hypagenina F	Antibiótico sobre <i>S. epidermidis</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Salvia candidissima</i>	Horminona	Efecto sobre el receptor de unión radioligante en cerebro de rata
<i>Salvia microstegia</i>	Ferruginol, pisiferal	Diurético, antiséptico
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Furonaftoquinona	Tratamiento de afecciones cardíacas anormalidades hemáticas y hepatitis
<i>Salvia officinalis</i>	12-hidróxi-7,20-dioxo-seco-abieta-8,11,13-trien-6,11-olido	Disminuye el crecimiento del VSV
<i>Salvia officinalis</i>	11,12-dihidroxi-20-nor-5(10),8,11,13-abietatrien-1-ona	Inactiva a los virus de la estomatitis vesicular (VSV) y a los Herpes simple tipo 1 (HSV)
<i>Lepechinia bullata</i>	Horminona	Citotóxica sobre células cancerígenas. Inhibe el crecimiento de <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>in vitro</i>)
<i>Taxodium distichum</i> Y <i>Salvia phlomoides</i>	Taxodiona y taxodona	Efectos citotóxicos sobre carcinoma 256 en ratas y humano
<i>Salvia reptans</i>	Horminona	Inhibe el crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538 y 25923, <i>Streptococcus faecalis</i> 8043 y 10741, <i>E coli</i> 25922 y <i>Bacillus cereus</i> 11778 (<i>in vitro</i>)

Asimismo se ha dado a conocer que la 7-O-metilhorminona, aislada de *Lepechinia bullata*^{36,37} presenta tanto actividad antineoplásica como acción citotóxica sobre células de leucemia. Además se ha propuesto que la modulación de la actividad anticancerígena se debe particularmente al tipo de sustituyentes entre las posiciones C7, C8 y C14 de dicha molécula.

En conexión con lo anterior, y como parte de una de las líneas de trabajo de un grupo de investigación de nuestra Facultad, recientemente se informó del aislamiento de horminona a partir de la raíz de *Salvia reptans* Jacq.,³⁶ con la cual de manera complementaria se le realizaron pruebas de actividad antimicrobiana.³⁷

1.1.4. FORMA DE ACCION DE LOS ANTIBIOTICOS

1.1.4.1. Clasificación. La clasificación de los antibióticos se realiza atendiendo a su forma de acción y por su estructura química. Por su forma de acción, se proponen dos grupos, bactericidas y bacteriostáticos, con los cuales se llevan a cabo mediante mecanismos diferentes, alteraciones en: la pared celular, membrana celular, síntesis de proteínas, así como la síntesis de ácidos nucleicos.

1.1.4.2. Pared Celular. La concentración de iones y metabolitos dentro de las bacterias es mucho mayor que en el medio que las rodea. Estas concentraciones altas son necesarias para que las células puedan funcionar normalmente, para fabricar energía, sintetizar macromoléculas así como para crecer y multiplicarse. Tales concentraciones intracelulares determinan la existencia de una presión osmótica alta en el interior de las células. La delicada membrana celular que rodea y contiene al citoplasma no posee suficiente fuerza para soportar estas presiones y se tienen que proteger con la pared celular, situada en su exterior.

La pared celular es una estructura rígida compuesta de varias macromoléculas, siendo los peptidoglicanos los más importantes. Las bacterias

Gram positivo contienen 40-90 % de estas sustancias mientras que las Gram negativo sólo 4-10 %. El proceso formativo de la pared bacteriana está integrado por numerosos pasos sucesivos en cada uno de los cuales puede actuar un antibiótico, impidiendo la síntesis adecuada de la misma.

1.1.4.3. Membrana Citoplasmática. La membrana citoplasmática forma una extensa barrera que controla la entrada y salida de las moléculas disueltas y proporciona un lugar en donde se unen la pared celular y las capas extramurales. Estas funciones hacen que la membrana sea vulnerable a una gran cantidad de agentes. Las alteraciones de las membranas con frecuencia son letales. Varios grupos de agentes antimicrobianos producen sus efectos actuando sobre la membrana celular alterando la permeabilidad.

1.1.4.4. Síntesis Proteica. Es fundamental la producción de proteínas para la vida bacteriana. Las proteínas tienen funciones celulares diferentes, algunas son estructurales, ayudando a mantener la integridad y forma de los componentes celulares como la membrana celular, otras actúan como enzimas controlando la actividad metabólica. Durante el crecimiento normal y la división celular se necesitan proteínas y tienen que fabricarse de una forma controlada en el momento exacto en cantidades adecuadas y con la estructura química específica para realizar su función.

La mayoría de los antibióticos actúan como inhibidores de la síntesis proteica. Al analizar la acción de los antibióticos sobre el ribosoma, el primer paso consiste en determinar si el antibiótico en cuestión actúa sobre la subunidad mayor o sobre la subunidad menor del ribosoma. Los inhibidores ribosómicos pueden clasificarse de acuerdo con su capacidad de interferir con el proceso de reconocimiento, con la transferencia del péptido, con la translocación, o con la iniciación. El ribosoma en realidad es un conjunto de macromoléculas que presentan numerosas interacciones entre sí, por lo cual la alteración producida en una región puede afectar a más de una

función. Además a lo largo de su ciclo, el ribosoma varía su estructura y posiblemente las distintas estructuras no reaccionen de forma idéntica frente a un antibiótico determinado. En realidad, numerosos antibióticos se unen con toda facilidad a los ribosomas libres que se encuentran en proceso de iniciación, uniéndose de forma mucho menos firme (en algunos casos, sin llegar siquiera a unirse) a los ribosomas polisómicos cuya flexibilidad estructural se encuentra limitada por su unión al pp-RNAt y al RNAm).⁴²⁻⁴⁷

1.1.4.5. Tetraciclinas. Es conveniente indicar que las tetraciclinas son moléculas con cierta correlación estructural con la horminona (Figura 4).⁴⁸⁻⁵⁴ Estas son de amplio espectro bacteriostático llevando a cabo la inhibición inmediata y reversible de la síntesis de proteínas; Además penetran a la célula bacteriana a través de la membrana en forma coordinada con los iones Mg^{+2} ; en los Esquemas 3 y 4 se muestra la etapa del proceso de síntesis de una proteína así como el lugar en donde intervienen las tetraciclinas.

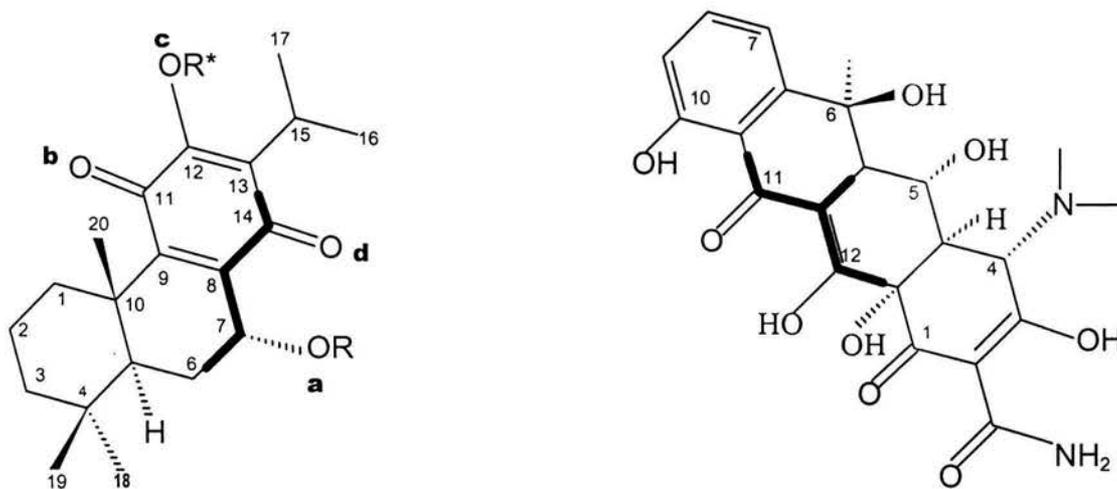
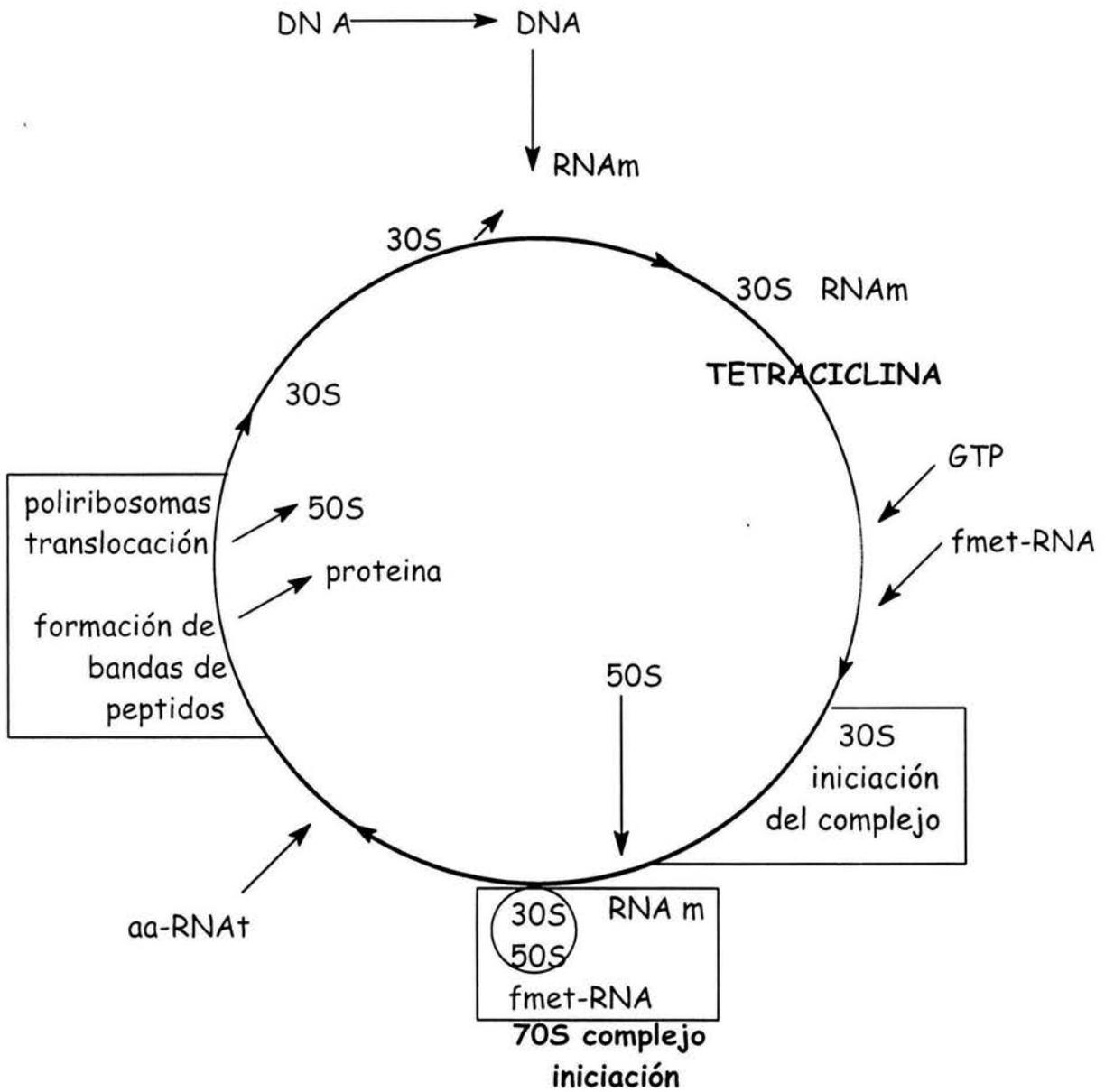
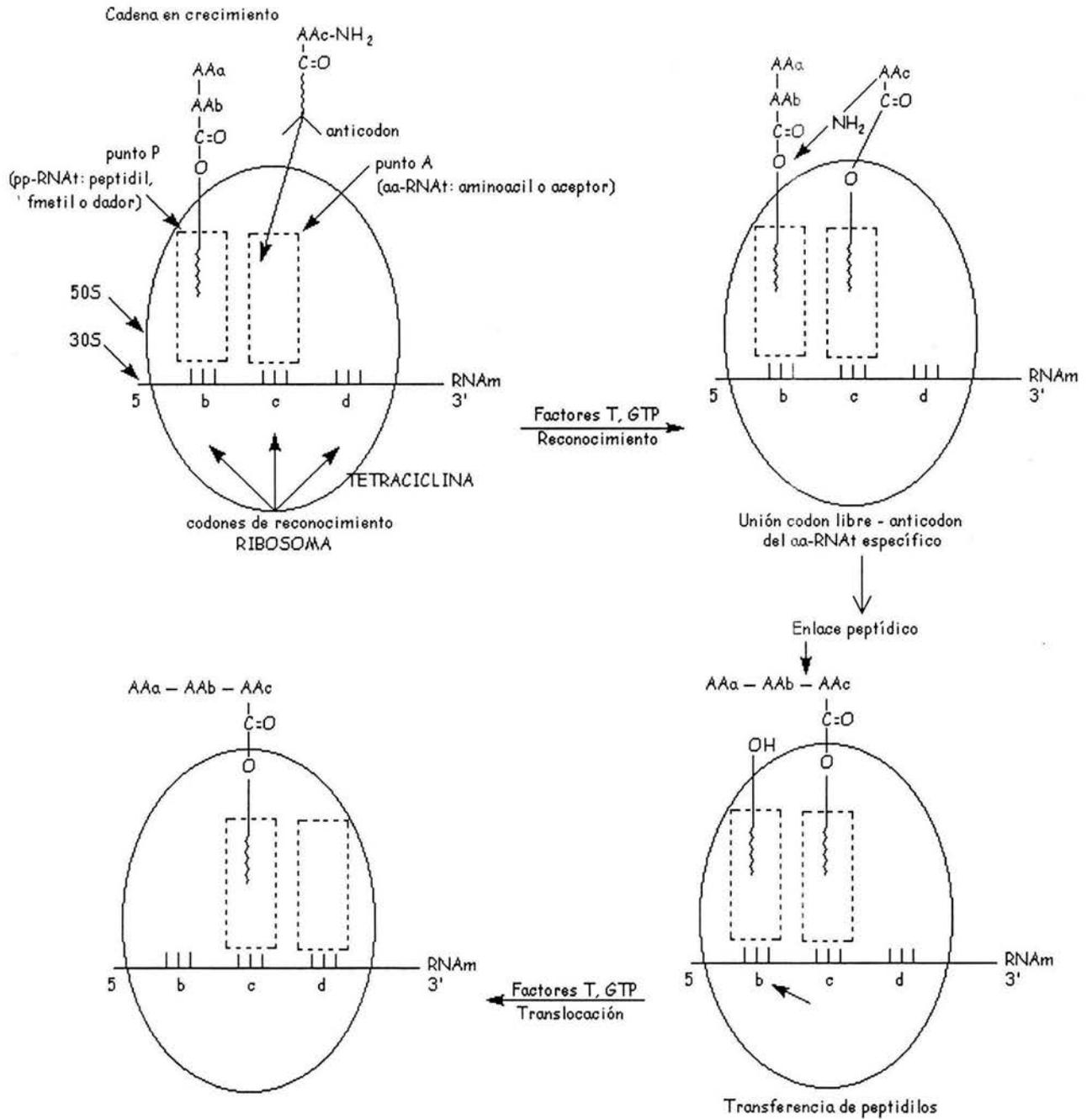


Figura 4. Correlación estructural de Oxitetraciclina (derecha) con la horminona (izquierda).



Esquema 3. Ciclo ribosómico. ^{43, 50}

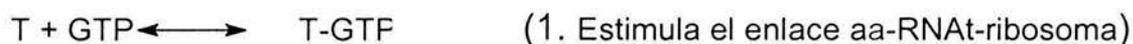


Movimiento del pp-RNAt junto con la región correspondiente del RNAm del punto A al punto P, con liberación del RNAt, por lo tanto (d) todavía no traducido es trasladado al punto A, en estos momentos el ribosoma se halla dispuesto para repetir la fase.

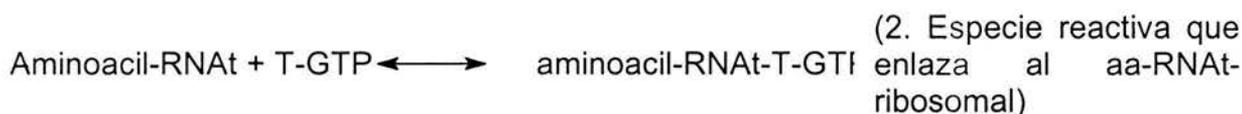
Esquema 4. Sitio de acción de las tetraciclinas⁴⁷

Para que se inicie la fabricación de proteínas es necesario contar con los siguientes factores:

a) Formación del complejo:



b) Unión del aa-RNAt al complejo:



T = factor

Aminoacil---RNAt = fenilalanil---RNAt

(---)= enlace lábil no reconocido

Se ha descrito que existe una interacción física (más que covalente) de atracción electrostática entre tetraciclina-ribosoma y los iones Mg^{+2} se unen al ribosoma (Mg^{+2} -ribosoma), también los iones Mg^{+2} se unen a los fosfatos (PO_4^{-3}) del RNA; además la tetraciclina con Mg^{+2} forma un complejo fuertemente coordinado. La tetraciclina exhibe dos tipos de enlace, una interacción fuerte en donde una molécula es enlazada al ribosoma y una interacción débil en donde se lleva a cabo una asociación reversible mediante el cual 300 moléculas de tetraciclina se enlazan al ribosoma. El enlace fuerte de las tetraciclinas al ribosoma 70s involucra coordinación al RNAt. Se sugiere que en promedio un grupo PO_4^{-3} vía Mg^{+2} en la tetraciclina es enlazada al ribosoma 50S pero es aproximadamente tres veces más enlazada a 30S.

La coordinación es importante para inhibir la función de los ribosomas. Es imposible que un solo ion Mg^{+2} simultáneamente se enlace a una tetraciclina y a un centro cargado (-) del ribosoma (puente). También, se ha demostrado que la tetraciclina no se enlaza al ADN o albúmina en ausencia de iones divalentes,

sugiriendo de esta manera que el metal tiene un papel de puentear. Se forma un complejo en donde electrostáticamente se une al Mg^{+2} , así mismo a la parte negativa del ribosoma, esto es una consecuencia del equilibrio de enlace y no la razón directa del efecto inhibitorio de la tetraciclina.

La inhibición de un ribosoma se lleva a cabo por una molécula de tetraciclina, por lo que la coordinación requiere de una interacción con el Mg^{+2} , altamente estereoespecífica. Presumiblemente el papel del Mg^{+2} en los ribosomas es mantener esencialmente la estructura secundaria del RNAr y estabilizar las interacciones electrostáticas RNA-proteína. La estabilización de la estructura ribosomal quizás sea importante para la acción inhibitoria de la tetraciclina, el ribosoma es conformacionalmente flexible y esta flexibilidad es importante en la función de enlace del aa-RNAt, el cual es bloqueado por la tetraciclina, quizás requiera de un arreglo estructural, porque al incrementar la estabilidad es antagonizada por el fármaco. Alta concentración de Mg^{+2} en la síntesis de polifenilalanina es disminuida en ausencia de tetraciclina, ésta no tiene acción inhibitoria, por consiguiente la inhibición de niveles altos de Mg^{+2} quizá refleje una sobre estabilización de la estructura, evitando de esta manera el requerimiento conformacional para la síntesis de polipéptidos. La tetraciclina no tiene mas incremento estabilizante necesario para provocar una inhibición ribosomal.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Debido a las pérdidas, que por ataque bacteriano, se generan en algunos frutos y tubérculos comestibles, es necesario desarrollar métodos nuevos que contribuyan a resolver dicho problema. En relación a los productos comerciales con acción bactericida, éstos son escasos y de bajo espectro, ocasionando con ello precios elevados y resultados poco efectivos. Asimismo, se sabe de muchos vegetales que debido a su manipulación postcosecha son dañados mecánicamente, por el transporte y el cambio de temperaturas, lo cual favorece el desarrollo de manchas y pudriciones reflejándose en consecuencia sobre la calidad final del producto. Por ende, para contribuir a la resolución del problema planteado fue que se establecieron los objetivos de este trabajo,

1.3. HIPÓTESIS

Si la horminona así como algunos de sus derivados presentan similitud estructural con las tetraciclinas, entonces estos derivados diterpénicos deberán tener actividad bactericida en cepas bacterianas fitopatógenas.

2. OBJETIVOS

2.1. GENERAL

Por medio de la técnica de Kirby-Bauer, determinar el efecto antimicrobiano de la horminona y de cuatro de sus derivados químicos para ver si estas presentan actividad bactericida contra algunas bacterias fitopatógenas.

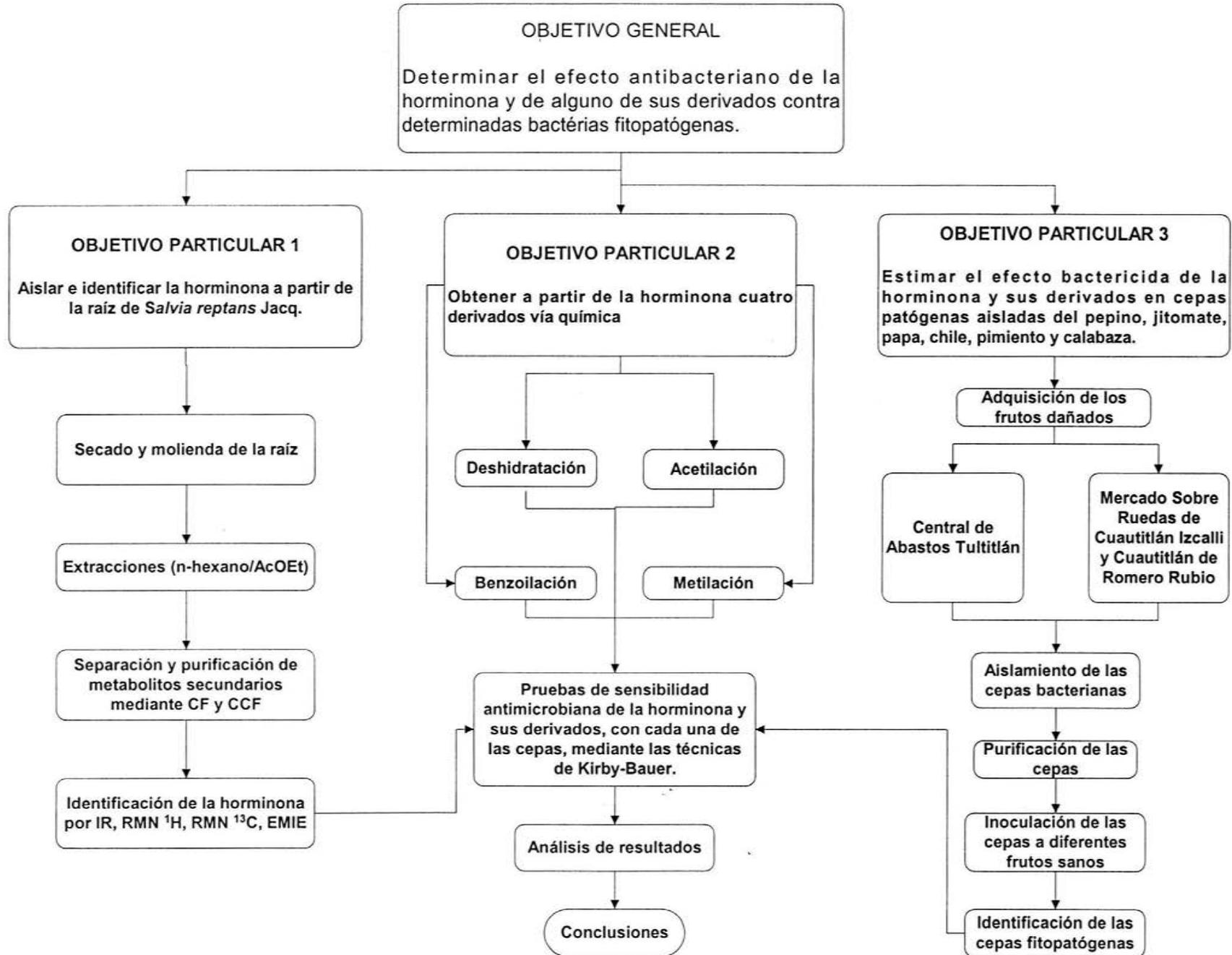
2.2. PARTICULARES

2.2.1. Aislar horminona de la raíz de *Salvia reptans* Jacq.

2.2.2. Preparar a partir de horminona, vía química, algunos derivados.

2.2.3. Determinar el efecto bactericida de la horminona y sus derivados empleando cepas fitopatógenas aisladas de pepino, jitomate, papa, calabaza y chile pimiento.

CUADRO METODOLÓGICO



3. METODOLOGIA

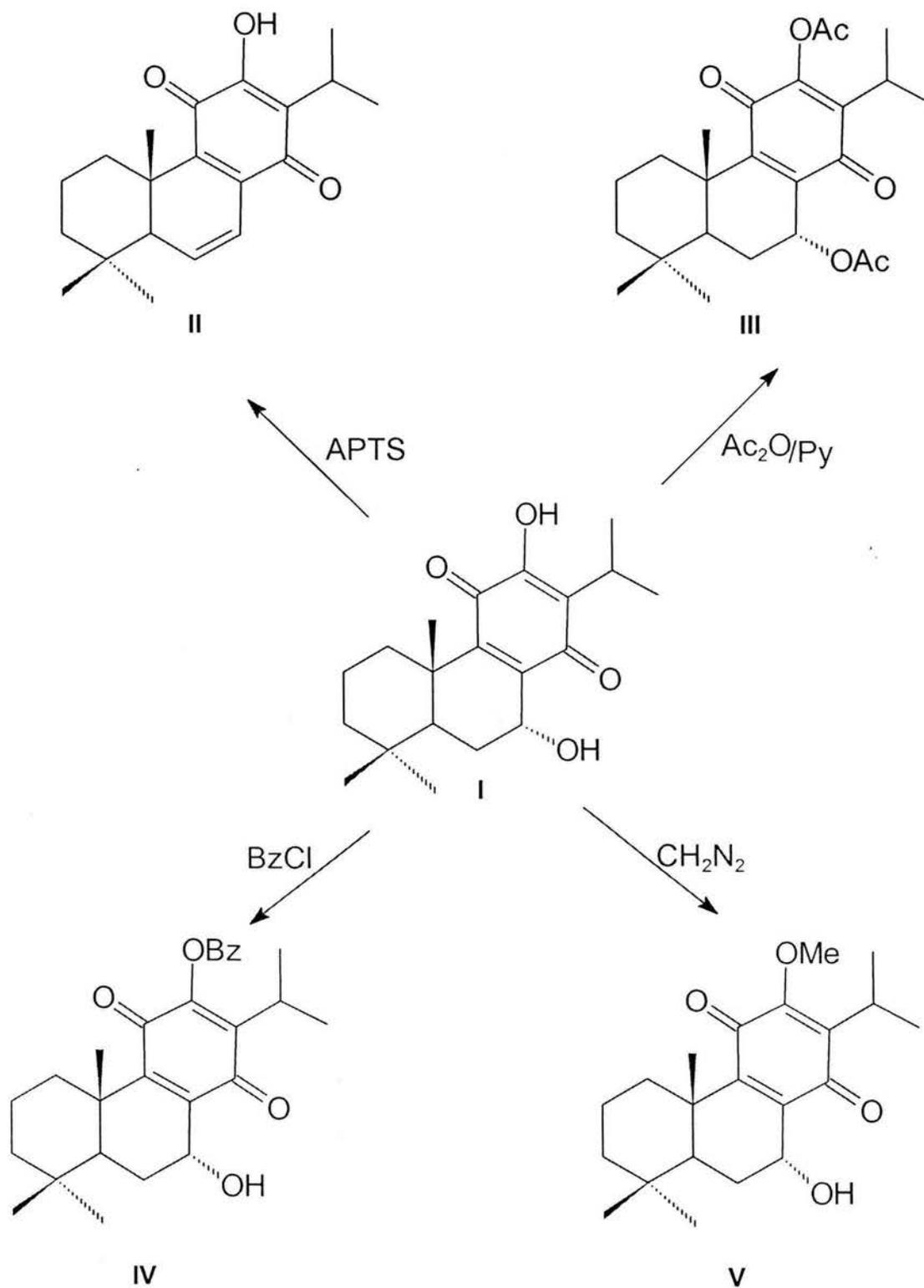
Para cumplir con los objetivos planteados en este proyecto, se estableció un desarrollo experimental en dos fases: en la parte química se efectuó el aislamiento de un metabolito secundario (horminona) de la raíz de *Salvia reptans* así como la síntesis y caracterización física y espectroscópica de cuatro derivados de ésta (Esquema 5); y, en la segunda fase se evaluó el efecto antibacteriano de las moléculas obtenidas.

3.1. OBTENCION DE HORMINONA Y SUS DERIVADOS

3.1.1. MATERIAL VEGETAL. El espécimen *Salvia reptans* Jacq. se recolectó en octubre de 1993 en Arcos del Sitio Tepotzotlán, Estado de México, se trata de una hierba azul, aproximadamente de 40 a 90 cm de altura, se desarrolla en suelos arcillosos y climas cálido húmedo, su época de floración es de mayo a octubre y su fruto es una cápsula. Un ejemplar *voucher* (**FES-C RE 21**) fue depositado e identificado en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

3.1.2. EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA HORMINONA I. La raíz de *Salvia reptans*, se seco al aire libre por un periodo de dos semanas. Acto seguido, la muestra seca (1 Kg) y molida, se colocó dentro de un matraz de bola de 5 L donde se llevaron a cabo tres extracciones sucesivas con un 1 L de *n*-hexano a temperatura de reflujo con reposo de un día. Posteriormente el extracto se filtró, y concentró a presión reducida para después, determinar el peso del extracto crudo 40 g. Este se soportó en celita antes de proceder a la separación de sus compuestos, por medio de una columna cromatográfica empleando sílice como soporte, y el sistema *n*-hexano/AcOEt 95:5, como eluyente. Las fracciones con horminona (*ccf*) se reunieron, procediéndose a purificar la molécula objetivo con una serie de recristalizaciones de *n*-hexano.

Esquema 5.- Productos de transformación de la horminona.



3.1.3. PRODUCTO DE DESHIDRATACIÓN DE LA HORMINONA (DESHIDROHORMINONA) II. 300 mg de I se disolvieron con 5 mL de tolueno, en presencia de unos gránulos de ácido *p*-toluensulfónico, la mezcla se sometió a reflujo durante 6 horas. Concluido el tiempo de reacción (*ccf*), se evaporó el tolueno, y el residuo se disolvió en 30 mL de acetato de etilo, a continuación se realizaron tres lavados de 10 mL cada uno, con una disolución de carbonato de sodio al 1%. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro para posteriormente evaporar el disolvente en un rotavapor. Por último, el producto se separo y purifico mediante cromatografía en columna técnica "flash", con las siguientes características: SiO₂ Kieselgel 60 G; *n*-hexano/AcOEt 9:1.

3.1.4. PRODUCTO DE ACETILACIÓN DE LA HORMINONA (DIACETILHORMINONA) III. 300 mg de horminona se mezclaron con 10 mL de anhídrido acético y 5 mL de piridina, esta disolución se sometió a baño de vapor por aproximadamente 1 hr. Terminada la reacción (*ccf*) la mezcla resultante se disolvió en 30 mL de acetato de etilo procediéndose posteriormente a realizar tres lavados de 10 mL cada uno con sulfato de cobre (II) al 1 %; a continuación se lavó la fase orgánica con agua y finalmente 2 veces con 10 mL de una disolución de bicarbonato de sodio al 5 %, después al extracto orgánico se le evaporó el disolvente a presión reducida. Por último el producto se purificó empleando de cromatografía en columna, con el sistema: SiO₂; *n*-hexano/AcOEt 8:2.

3.1.5. PRODUCTO DE BENZOILACIÓN DE LA HORMINONA (MONOBENZOILHORMINONA) IV. 300 mg de I se disolvieron con 5 mL de cloruro de benzoilo y 3 gotas de piridina. La mezcla se sometió a agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. Cuando finalizó la reacción (*ccf*), el residuo se disolvió en 30 mL de acetato de etilo, para posteriormente realizar un lavado con 10 mL de disolución de sulfato de cobre (III) al 1%, después la fase orgánica se lavó con H₂O y con disolución de hidróxido de sodio al 5 %, así el extracto

orgánico correspondiente se secó, con Na_2SO_4 , antes de evaporarse el disolvente a presión reducida, obteniéndose un

producto oleoso que fue purificado por medio de una columna cromatográfica, técnica "flash", con las siguientes características; SiO_2 Kieselgel 60 G; *n*-hexano/AcOEt 9:1. Por último el producto se purificó por medio de una cromatoplaque preparativa, empleando el mismo sistema cromatográfico.

3.1.6. PRODUCTO DE METILACIÓN DE LA HORMINONA (METILHORMINONA)

V. A un matraz con aproximadamente 15 mg de diazometano (preparado *in situ*) se le adicionaron 100 mg (0.301 moles) previamente disuelto en éter etílico, la mezcla resultante se sometió a agitación durante 24 hr. Transcurrido este tiempo, el residuo, previa evaporación del disolvente, se disolvió en una cantidad mínima de acetona a efecto de soportarse en celita después purificar el producto requerido por medio de cromatografía en columna técnica flash empleándose las condiciones siguientes: SiO_2 Kieselgel 60 G; *n*-hexano/AcOEt 9.7:0.3.

3.2. CARACTERIZACION DE LA HORMINONA Y SUS DERIVADOS QUIMICOS.

Los puntos de fusión de la horminona y los de sus derivados se determinaron en un aparato Fisher-Jones y no están corregidos. La pureza de los productos y el avance de las reacciones se determinó por *ccf* empleando cromatofolios Macherey-Nagel Düren, y como reveladores: CeSO_4 al 1% en H_2SO_4 2N, irradiación UV a λ 365 nm, así como vapores de yodo metálico.

Para la determinación de los espectros de masas mediante el método de bombardeo con átomos rápidos (FAB) así como para los experimentos de alta resolución, se emplearon espectrometros de masas JEOL JMS-SX 102 y JEOL JMS-AX 505 HA; En el caso de los experimentos de tipo FAB, el objetivo se bombardeo con átomos de xenón acelerados a 10 eV, utilizando alcohol nitrobenzilico como matriz.

3.3. AISLAMIENTO, PURIFICACION E IDENTIFICACION DE CEPAS BACTERIANAS

En base a la información referente a la importancia económica se seleccionaron las especies vegetales: jitomate, chile pimiento, pepino, calabaza y papa, considerando los signos característicos de un ataque bacteriano en tres muestreos diferentes: en la Central de Abasto de Tultitlán (02 de noviembre y 26 de diciembre de 1994, así como el 30 de abril de 1995), en el mercado sobre ruedas de Cuautitlán Izcalli (el 26 de diciembre de 1994) así como en el mercado municipal de Cuautitlán de Romero (26 de diciembre de 1994, así como el 30 de abril de 1995).

Al respecto, se marcaron en las zonas a muestrear de los frutos dañados, tomándose pequeñas áreas de aproximadamente 0.5 cm de la parte periférica de estas, las muestras fueron sometidas a un lavado de 1 minuto con una disolución de hipoclorito de sodio al 5 % para posteriormente lavarse con agua destilada estéril y se colocaron en medios de cultivo de agar papa dextrosa, agar nutritivo y agar Saboraud procediendo a su incubación a 27 °C de 24-48 horas y humedad relativa del 60 %.

3.4. SELECCION DE BACTERIAS PATOGENAS EN FRUTOS SANOS

De las bacterias aisladas y purificadas se procedió a la inoculación "in vivo" en frutos sanos con el fin de seleccionar aquellos que son causantes de las enfermedades en los respectivos frutos.

La inoculación en frutos se llevó a cabo de la siguiente manera: de los cultivos puros se hicieron crecer en caldos nutritivos a una concentración bacteriana de 10^8 bacterias por mililitro y 0.5 mL del cultivo fueron empapados en algodón estéril y colocada en el fruto sano al cual previamente se le practicó una incisión.

Los frutos fueron colocados en recipientes de plástico con humedad relativa de 60%, tapados e incubados a temperatura ambiente para después ser examinados cada 24 horas por cuatro días.

De los frutos que presentaron daños causados por las bacterias inoculadas, se volvieron a aislar e identificar

3.5. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS AISLADOS

Para llevar a cabo la identificación de los microorganismos patógenos se tomaron en cuenta primeramente la morfología colonial, las pruebas bioquímicas primarias (Gram, morfología colonial y celular, formación o no de esporas, motilidad, catalasa, oxidasa, respiración, producción o no de pudrición).

Las pruebas bioquímicas secundarias que se utilizaron fueron: degradación de pectato, licuefacción de gelatina, producción de acetoina, sensibilidad a la eritromicina, formación de gas a partir de: D-lactosa, maltosa, α -metil glucósido, trealosa, ribosa, sorbitol, melobiosa, celobiosa, palatinosa y la utilización de el malonato, acetato y el galacturonato, hidrólisis de caseína y esculina entre otras.

3.6. VALORACION "IN VITRO" DE LA ACCION BACTERICIDA DE LA HORMINONA Y SUS DERIVADOS CONTRA BACTERIAS PATÓGENAS

El ensayo se realizó pesando 8.7 mg de cada derivado puro y se disolvió en 1 mL de CHCl_3 grado espectroscópico, posteriormente se impregnaron discos de papel filtro (Watman Cat. 1002 125) de 0.5 mm de diámetro con 10 μL de estas disoluciones en condiciones asépticas.

Se prepararon cajas de petri con agar Muller Hinton de aproximadamente 3-5 mm de espesor. Cada una de las cepas fueron crecidas a una concentración

bacteriana de 10^8 UFC/mL. Posteriormente cada uno de los cultivos fueron sembrados en las cajas con ayuda de un hisopo estéril.

Una vez sembradas las cajas se procedió a colocar los discos de papel filtro, empezando con la horminona y sus derivados; las cajas fueron incubadas a 27 °C por 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo se observó la presencia de halo de inhibición, los cuales se midieron uno a uno.

Las bacterias que se utilizaron en el ensayo de la actividad biológica de la horminona y sus derivados fueron las que se muestran en las siguientes Tablas 3 y 4.

Tabla 3: Cepas ATCC utilizadas como referencia.

MICROORGANISMOS	ATCC No.	GRAM
<i>Clavibacter michiganense</i> subsp. <i>sepedonicum</i>	9850	+
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	15359	-
<i>Pseudomonas syringae</i> van Hall pathovar <i>tomato</i>	10862	-
<i>Xanthomonas campestris</i>	13951	-

Tabla 4: Bacterias aisladas de los frutos afectados.

MICROOORGANISMOS	GRAM
<i>Erwinia carotovora</i>	-
<i>Pseudomonas syringae</i>	-
<i>Xanthomonas campestris</i>	-

3.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.

A las cepas que presentaron halo de inhibición en la prueba preliminar, se procedió a cuantificar la concentración inhibitoria mínima de la horminona y sus derivados de la siguiente manera:

De la concentración original 8.7 mg/mL se hicieron diluciones decimales (1:10; 1:100; 1:1000; 1:10 000) y se procedió de igual manera descrita anteriormente para cada una de las cepas. Al encontrar la dilución mínima capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, se prepararon diluciones dobles con la finalidad de determinar la concentración inhibitoria mínima y medir el diámetro del halo de inhibición.

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos obtenidos fueron analizados mediante la prueba de análisis de varianza trifactorial, considerando diferencias entre dosis utilizadas, compuestos y cajas.

4. RESULTADOS

4.1. OBTENCIÓN DE LA HORMINONA Y SUS DERIVADOS

4.1.1. EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE I.- De 1 Kg de raíz seca del espécimen estudiado, se obtuvieron mediante extracción tres veces con un litro de *n*-hexano, 40 g de extracto crudo. Después de someter a éste, a un proceso de cromatografía en columna se aislaron 6 g de horminona con algunas impurezas, la cual después se recristalizó en tres ocasiones sucesivas, obteniéndose 5.92 g del metabolito puro.

4.1.2. PROPIEDADES FÍSICAS Y ESPECTROSCÓPICAS DE:

4.1.2.1. Horminona. Cristales de color amarillo; pf 172-174 °C; PM 332.1988 g/mol, composición elemental C₂₀H₂₈O₄ (EMAR-FAB); FAB⁺ m/z (% ar): 333 (50) [M+H]⁺, 332 (18) M⁺, 316 (62) [M+H-(OH)]⁺, 315 (92) [M+H-H₂O]⁺, espectro 1.

4.1.2.2. Deshidrohorminona. Cristales de color anaranjado; pf 167-169 °C; PM (EMAR) 315.1960 g/mol, composición elemental C₂₀H₂₇O₃ (EMAR-FAB); FAB⁺ m/z (% ar): 315 (32) [M+H]⁺, 314 (17) M⁺, espectro 2.

4.1.2.3. Diacetilhorminona. Agujas finas de color amarillo; pf 120-122 °C; PM 416 g/mol, composición elemental C₂₄H₃₂O₆ (EMAR-FAB) 417.2277 g/mol; FAB⁺ m/z (% ar): 417 (7) [M+H]⁺, 373 (11) [M-Ac]⁺, 357 (43) [M+H-Ac-Me]⁺, 43 (87) [Ac]⁺, espectro 3.

4.1.2.4. Benzoilhorminona. Cristales color amarillo; pf 189.5-191 °C; PM (EMAR) 437.2328 g/mol composición elemental C₂₇H₃₃O₅ (EMAR-FAB); FAB⁺ m/z (% ar):

437(24) $[M+H]^+$, 436 (15) M^{+} , 420 (42.5) $[M+H-(OH)]^{+}$, 419 (40.2) $[M-(OH)]^+$, espectro 4.

4.1.2.5. Metilhorminona. Agujas finas de color amarillo; pf 138-139 °C; PM 346.2144 g/mol, composición elemental $C_{21}H_{30}O_4$ (EMAR-FAB); FAB⁺ m/z (% ar): 347(63) $[M+H]^+$, 346 (57) M^{+} , 330 (43) $[M+H-(OH)]^{+}$, 329 (75) $[M-(OH)]^+$, espectro 5.

4.1.3. OBTENCIÓN DE LAS CEPAS FITOPATÓGENAS

Los microorganismos aislados a partir de los frutos dañados se muestran en Tabla 5.

Tabla 5. Bacterias fitopatógenas aisladas de diferentes frutos.

CEPAS AISLADAS DE LOS FRUTOS AFECTADOS	GRAM
<i>Erwinia carotovora</i>	-
<i>Pseudomonas syringae</i>	-
<i>Xanthomonas campestris</i>	-

La identificación de los géneros y especies de las bacterias antes mencionadas, se realizó basándose en las tablas 7-12.

En la tabla 6 se reportan los resultados obtenidos de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la horminona y sus derivados así como de la oxitetraciclina (compuesto de referencia).

Tabla 6. Espectro antimicrobiano de la horminona, derivados de la horminona y la oxitetraciclina MIC ($\mu\text{g/mL}$)

CEPAS	I	II	III	IV	V	VI
<i>Clavibacter michiganense</i> subsp. <i>sepedonicum</i> 9850	0.435	-	0.870	-	-	0.870
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> 15359	0.435	-	-	-	-	0.435
<i>Pseudomonas syringae</i> van Hall pathovar <i>tomato</i> 10862	-	-	-	-	0.870	0.870
<i>Xanthomonas campestris</i> 13951	-	-	-	-	0.870	0.870
<i>Erwinia carotovora</i>	0.870	-	-	-	-	0.435
<i>Pseudomonas syringae</i>	-	-	-	-	0.870	0.870
<i>Xanthomonas campestris</i>	-	-	-	-	0.870	0.870

I Horminona
 II Deshidrohorminona
 III Diacetilhorminona
 IV Benzoilhorminona
 V Metilhorminona
 VI Oxitetraciclina

Data : Dr R Miranda

Date : 20-Jul-95 09:46

Sample: Horminona

Note : 1111-24

Inlet : Direct

Ion Mode : FAB+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 0.80 min Scan# : (5,6)

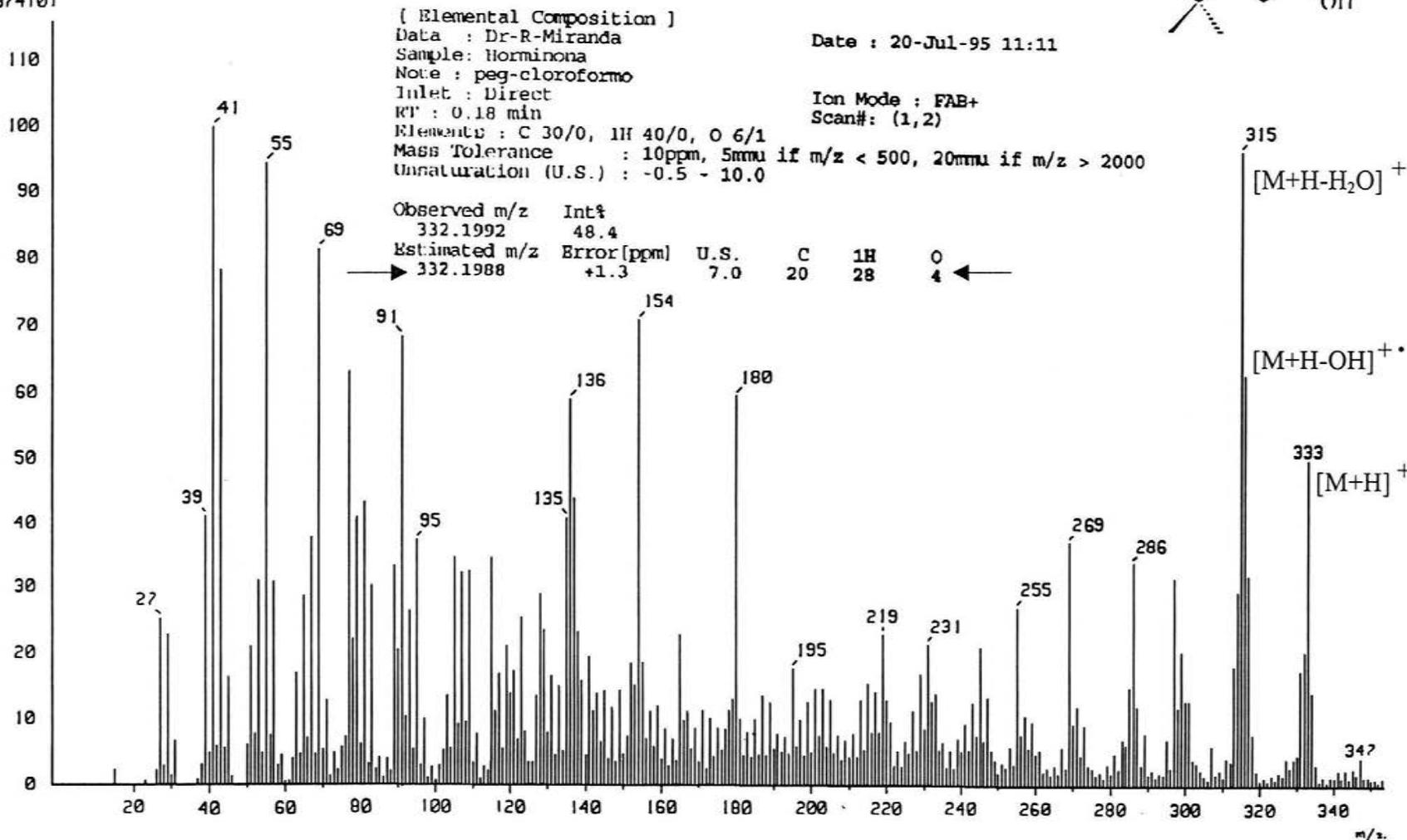
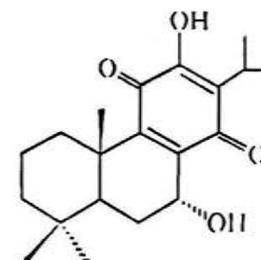
Temp : 62.8 deg.C

BP : m/z 41.0000 Int. : 30.61

Output m/z range : 0.0000 to 353.0040

Cut Level : 0.00 %

374101



Espectro 1.- Datos de EMAR y FAB⁺ de la Horminona.

[Mass Spectrum]

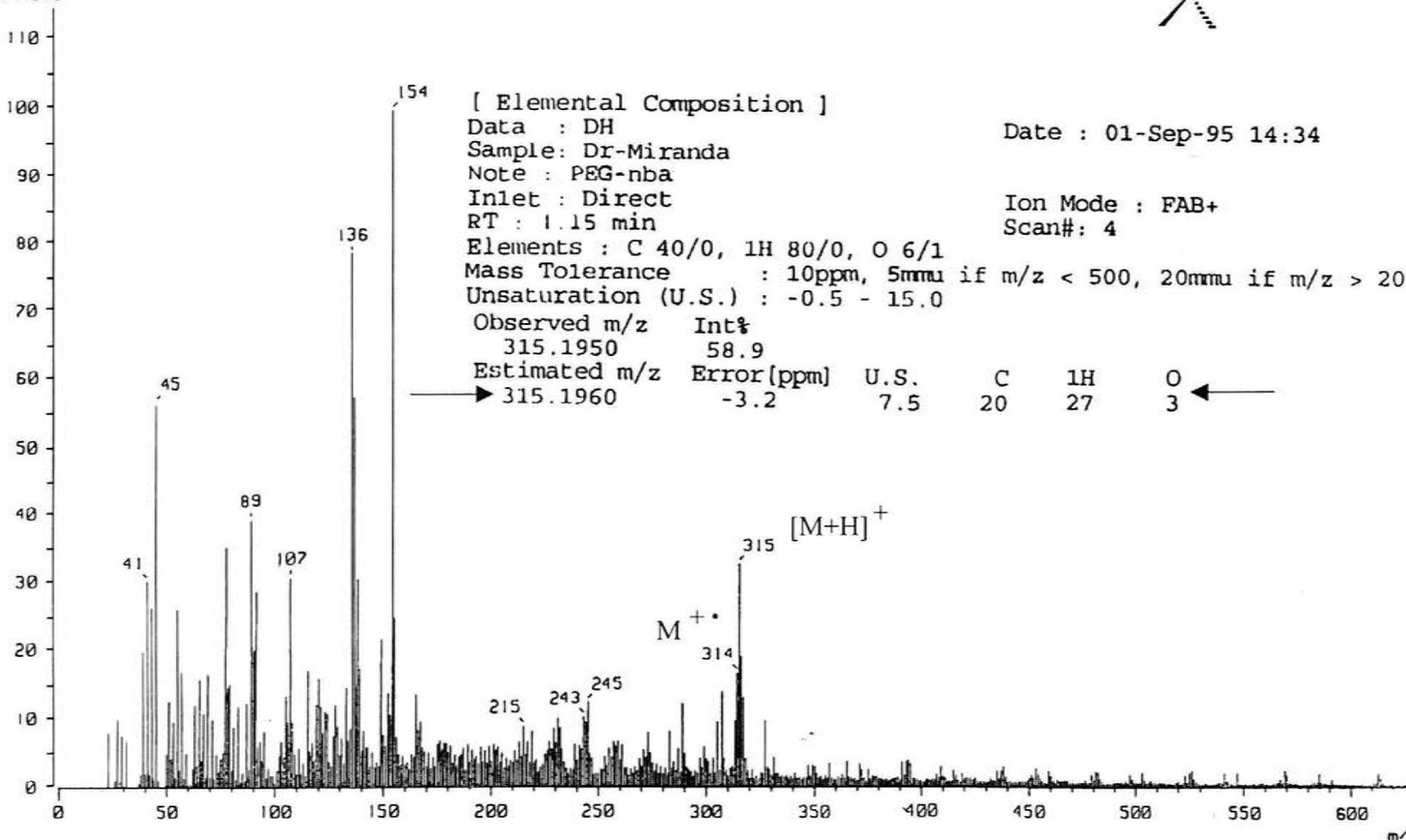
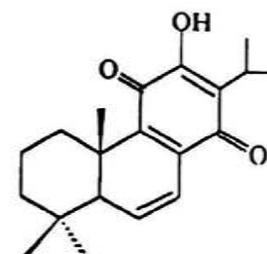
Date : 01-Sep-95 15:09
 Sample: DH
 Note : nba
 Inlet : Direct
 Spectrum Type : Regular [MF-Linear]
 RT : 0.80 min Scan# : 5
 BP : m/z 154.0000 Int. : 73.74
 Output m/z range : 0.0000 to 631.3190
 881583

Date : 01-Sep-95 15:09

Ion Mode : FAB+

Temp : 57.3 deg.C

Cut Level : 0.00 %



[Elemental Composition]

Data : DH
 Sample: Dr-Miranda
 Note : PEG-nba
 Inlet : Direct
 RT : 1.15 min

Date : 01-Sep-95 14:34

Ion Mode : FAB+
 Scan#: 4

Elements : C 40/0, 1H 80/0, O 6/1
 Mass Tolerance : 10ppm, 5mmu if m/z < 500, 20mmu if m/z > 2000
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 15.0

Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Error (ppm)	U.S.	C	1H	O
315.1950	58.9	315.1960	-3.2	7.5	20	27	3

Espectro 2.- Datos de EMAR y FAB+ de la Deshidrohorminona.

[Mass Spectrum]

Date : 24-Oct-95 11:10

Sample : Acetilación

Note : nba-cloroformo

Inlet : Direct

Ion Mode : FAB+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 0.00 min

Scan # : (1,2)

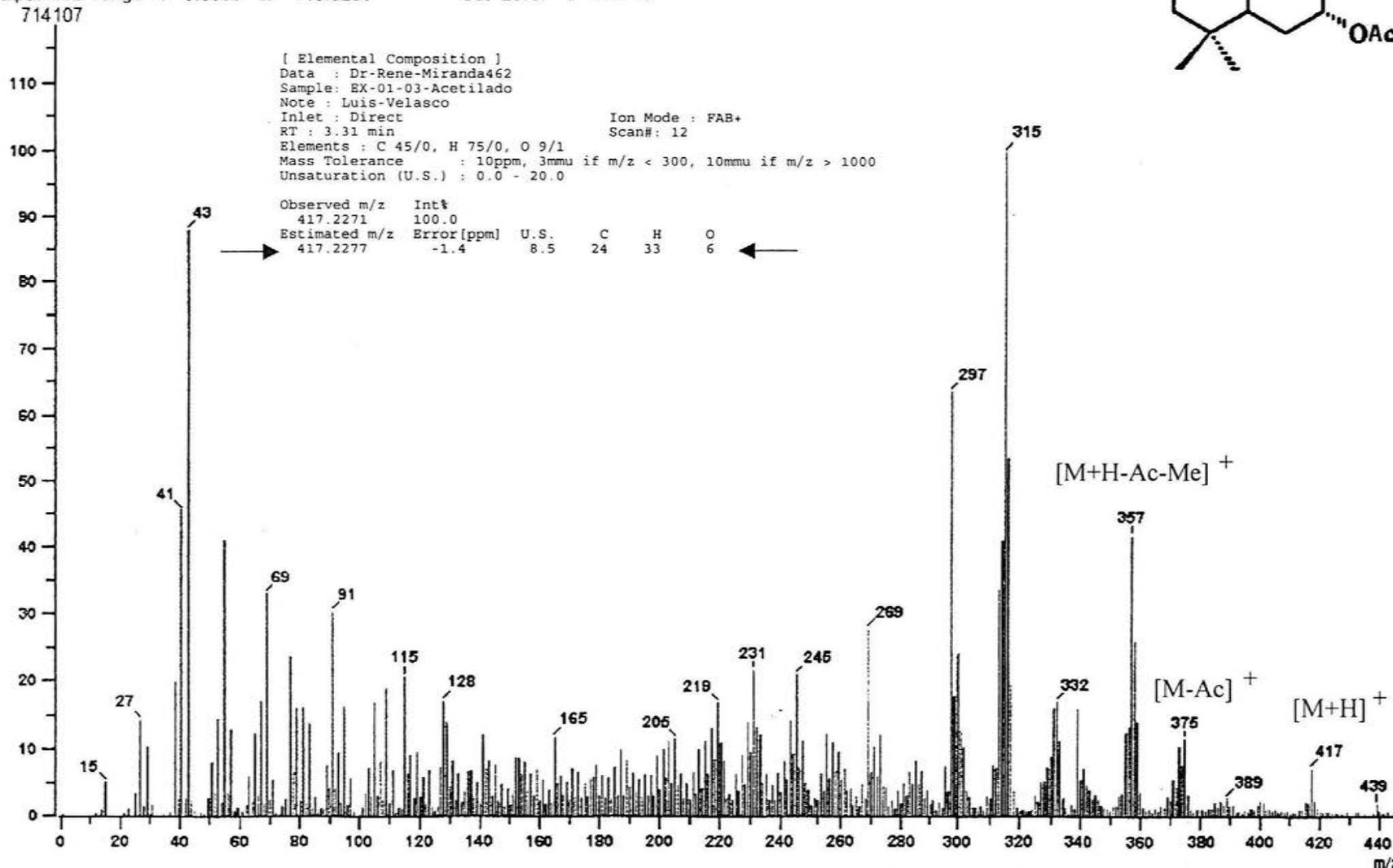
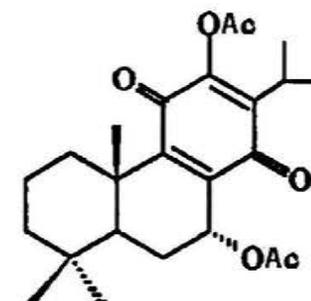
Temp : 133.9 deg. C

BP : m/z 315.0000

Int. : 57.48

Output m/z range : 0.0000 to 448.8290

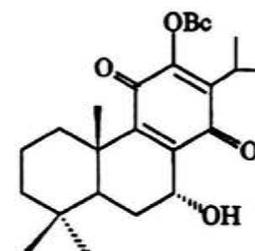
Cut Level : 0.00 %



Espectro 3. Datos EMAR y FAB⁺ de la Diacetilhorninona.

[Mass Spectrum]

Data : PRI-3 Date : 01-Sep-95 11:20
 Sample: Dr-Rene
 Note : nba
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
 Spectrum Type : Regular [MF-Linear]
 RT : 0.20 min Scan# : (2,3) Temp : 56.6 deg.C
 BP : m/z 105.0000 Int. : 383.03
 Output m/z range : 250.3000 to 458.6930 Cut Level : 0.00 %

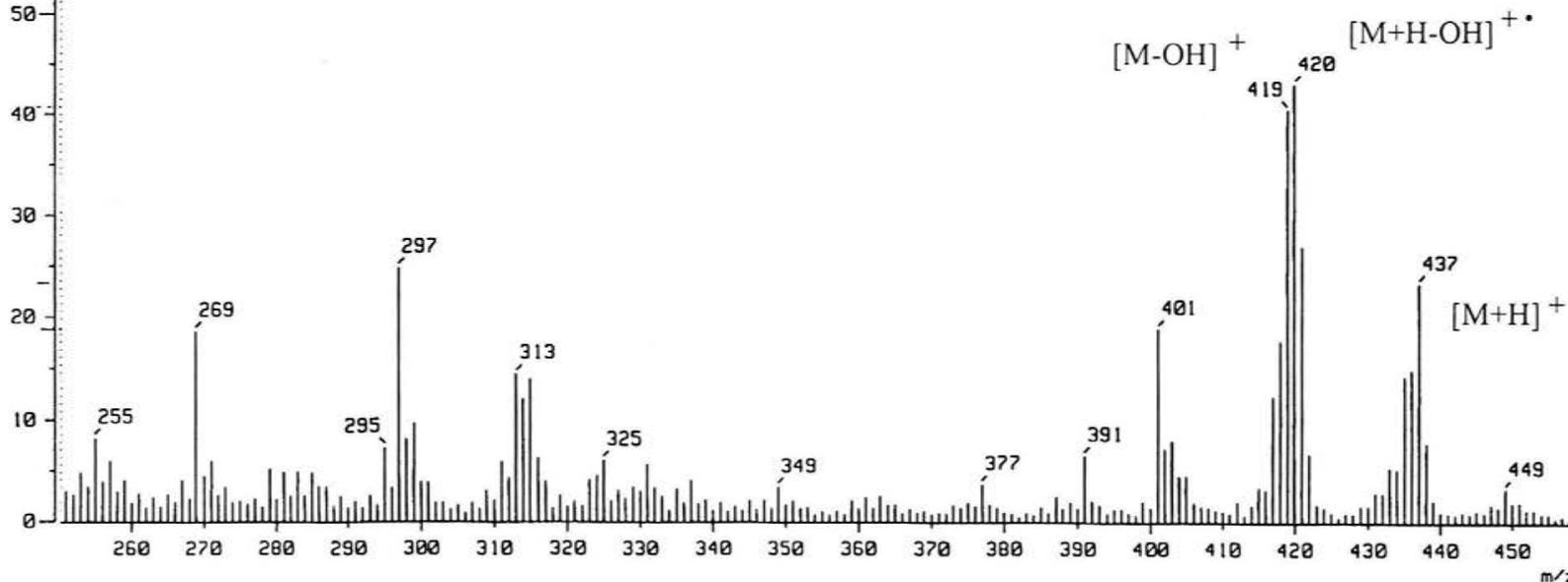


3530300 x15

[Elemental Composition]

Data : Dr-Miranda Date : 01-Sep-95 14:04
 Sample: PRI-3
 Note : PEG-nba
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
 RT : 1.51 min Scan# : (6,7)
 Elements : C 40/0, 1H 80/0, O 6/1
 Mass Tolerance : 10ppm, 5mmu if m/z < 500, 20mmu if m/z > 2000
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 15.0

Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Error [ppm]	U.S.	C	1H	O
437.2318	34.8						
437.2328	-2.2			11.5	27	33	5



Espectro 4.- Datos de EMAR y FAB⁺ de Benzoilhomoinona.

[Mass Spectrum]

Data : Pilar
 Sample: Dr-Rene-M
 Note : *
 Inlet : Direct
 Spectrum Type : Regular [MF-Linear]
 RT : 0.80 min Scan# : (5,6)
 BP : m/z 154.0000 Int. : 145.45
 Output m/z range : 0.0000 to 396.0540

Date : 07-Feb-97 16:39

Ion Mode : FAB+

Temp : 144.8 deg.C

Cut Level : 0.00 %

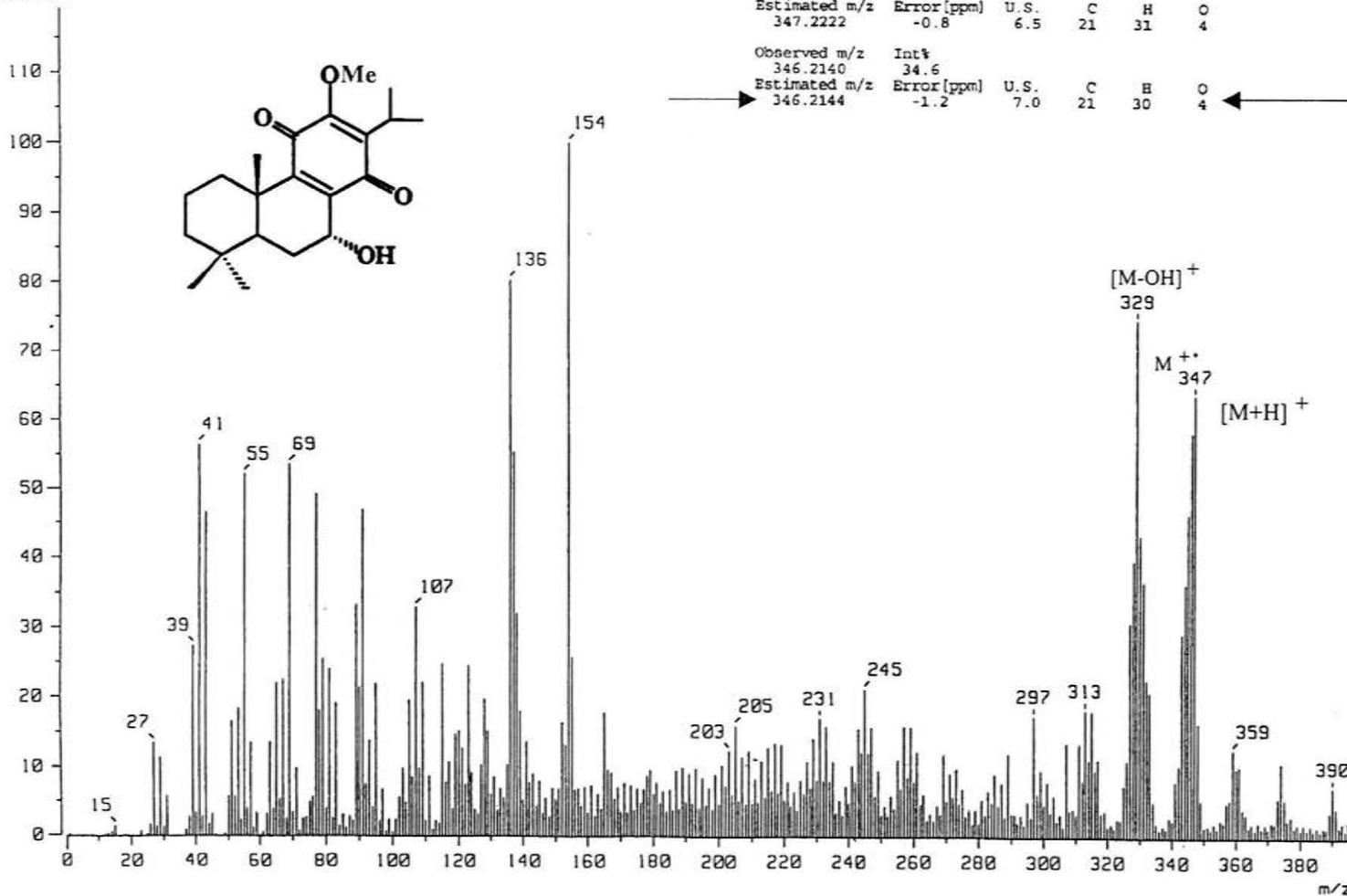
[Elemental Composition]

Data : alta-r005
 Sample: Metilacion
 Note : Dr-Rene-M
 Inlet : Direct
 RT : 0.00 min
 Elements : C 40/0, H 80/0, O 7/0
 Mass Tolerance : 10ppm, 10mmu if m/z < 1000, 20mmu if m/z > 2000
 Unsaturation (U.S.) : 0.0 - 8.0

Date : 11-Jun-97 14:49

Ion Mode : FAB+
 Scan#: 1

1816545



Espectro 5.- Datos de EMAR y FAB⁺ de la Metilhorminona.

TABLAS DE IDENTIFICACIÓN

Tabla 7. Pruebas bioquímicas para *Erwinia*, *Xanthomonas* y *Pseudomonas*

PRUEBAS	1	2	3
Gram	-	-	-
Motilidad	+	+	+
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	-	+	+
Crecimiento aeróbico	+	+	+
Crecimiento anaeróbico	+	-	-
Fluorescencia en KB	-	+	-
1.- <i>Erwinia</i>			
2.- <i>Pseudomonas</i>			
3.- <i>Xanthomonas</i>			

Tabla 8. Características bioquímicas y fisiológicas de las especies del género *Clavibacter*.

Prueba	<i>sepedonicus</i>	<i>insidiosus</i>	<i>michiganensis</i>	<i>nebraskensis</i>	<i>xyli</i> subsp <i>xyli</i>	<i>x.</i> subsp <i>cynodontis</i>
Movilidad	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a 37 °C en CNS	-	-	+	•	•	•
Máximo en NaCl	3%	3-4%	6	6-7%	•	•
Ureasa	-	-	-	•	•	•
Hidrólisis de: esculina	+	+	+	+	-	-
Caseína	-	-	-	-	-	-
Pigmento amarillo	-	+	-	-	-	+
Azul	-	+	-	-	-	-
Producción de indigoidine	-	+	-	•	•	•
Producción de ácido de:						
Manosa	d	+	+	+	•	•
Melezitosa	-	-	-	-	•	•
Manitol	+	-	-	-	•	•
Ribosa	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	-	-	+	-	-
Inulina	-	-	-	+	-	-
Utilización de: acetato	+	-	-	+	-	-
Formato	-	-	-	-	-	-
Lactato	-	-	d	+	•	•
Propionato	-	-	-	w	-	-
Succinato	+	-	+	+	•	•
Hidrólisis de almidón de papa	d	-	d	d		
H ₂ S	-	-	+	d		
Producción de levana	-	-	-	+		

(+) = La mayoría de las clonas la dan positiva; • = No conocida; d = diversa; w = resultado débil

Tabla 9. Características bioquímicas y fisiológicas de los miembros del grupo *carotovora*

Prueba	Subsp <i>carotovora</i>	Subsp <i>atroseptica</i>	Subsp <i>betavasculatorum</i>	Subsp <i>crhysanthemi</i>	Subsp <i>cyripedii</i>	Subsp <i>rhapontici</i>
Producción de ácido de:						
Lactosa	+	+	+	v	-	+
Maltosa	-	v	+	-	v	+
Trealosa	+	+	+	-	+	+
α metil glucocido	-	+	+	-	-	v
Xilosa	+	+	.	+	+	-
Rafinosa	+	+	.	d	-	+
Ducitol	-	-	.	-	-	+
Inositol	d	-	.	-	+	+
Melezitosa	-	-	.	-	-	+
Palatinosa	-	+	+	+	-	+
Producción de:						
Indol	-	-	-	v	-	-
Fosfatasa	-	-	-	+	v	v
Lecitinasa	-	-	-	v	-	-
Pigmento azul	-	-	-	v	-	-
Sustancias reductoras a partir de:						
Sacarosa	-	v	+	v	-	v
Sensibilidad a:						
Eritromicina	-	-	-	+	+	+
Crecimiento a 36°C	+	-	+	+	+	v
Crecimiento en NaCl 5%	+	+	.	-	+	+
Licuefacción de gelatina	+	+	+	v	-	-
Gas de glucosa	-	-	-	v	+	-
Pudrición de papa	+	+	+	+	-	w
Degradación de pectato	+	+	+	+	-	-

(+) = La mayoría de las razas la dan positiva; . = No conocida; d = diversa; w = resultado débil

Tabla 10. Características bioquímicas y fisiológicas de las especies del género *Pseudomonas* del grupo Fluorescente.

Prueba	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. marginalis</i> *	<i>P. tolaasi</i>	<i>P. agaricae</i>	<i>P. cichorii</i>	<i>P. viridiflava</i>	<i>P. Syringae (grupo 1)</i>
Oxidasa	+	+	+	+	+	-	-
Dihidrolasa de arginina	+	+	-	-	-	-	-
Reducción de NO ₃ -N ₂	+	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a 41°C	+	-	-	-	-	-	-
Utilización de:							
Glucosa	+	•	•	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	v
Geraniol	+	-	-	-	-	-	-
Benzoato	+	-	-	+	-	-	-
Celobiosa	•	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	+	+	-	-	+	v
Trehalosa	-	+	v	-	-	-	-
<i>m</i> -Tartrato	-	v	+	-	+	+	v
D-tartrato	-	v	-	-	-	+	v
D-arabinosa	-	-	-	-	-	-	-
L-ramnosa	-	v	ND	-	-	-	-
Sacarosa	-	+	+	-	-	-	v
2-cetogluconato	+	+	•		-	-	-
<i>meso</i> -inositol	-	+	•	-	v	-	v
Geraniol	+	-	•	•	-	-	-
L-valina	d	+	•	•	-	-	-
β-alanina	+	+	•	•	-	-	-
Hidrólisis de gelatina	+	+	•	•	-	+	v
Hidrólisis de almidón	+	-	•	-	-	-	-

(+) = La mayoría de las razas la dan positiva; • = No conocida; d = diversa; w = resultado débil

* Stainer *et al* menciona que el Biovar II de *P. fluorescens*, corresponde a *P. marginalis*

Tabla 11. Características fisiológicas y bioquímicas de los patovares de *Pseudomonas syringae*

Prueba/	<i>lachrymans</i>	<i>syringae</i>	<i>tabacii</i>	<i>aptata</i>	<i>Pisi</i>	<i>antirrhini</i>	<i>morsprunorum</i>	<i>delphinii</i>	tomato	<i>erobotryae</i>	Sesami	<i>savastanoi</i>	<i>coronafaciens</i>	<i>striafaciens</i>	<i>mori</i>	<i>passiflorae</i>	<i>glycenea</i>	<i>phaseolicola</i> <i>Maculicola</i>	<i>persicae</i>	<i>cannabina</i>
Levana	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+/-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Undimiento del pectato**	4,8 ¹	-	4,8	-	-	4	4	4	4	4	4,8	4	-	ND	4	ND	4	4	4	4
β-glucosidasa	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
Utilización de:																				
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	v	-	+	-
Bataina	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	v	-	+
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-	-
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	v	+	+	+	+	+	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	v	+	+	v	+	-	-	+	-
Eritritol	+	+	+	+	v	-	v	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
L-tartrato	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	v	-	-	-	-	-	-	-	-
D-tartrato	-	v	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-lactato	-	+	-	+	v	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Antranilato	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-
Homoserina	-	-	-	-	+	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹ El hundimiento del pectato se presenta a un pH de 4.6 y 8.5

Tabla 12. Características fisiológicas y bioquímicas de especies del género *Xanthomonas*.

Prueba	<i>X. campestris</i>	<i>X. fragarie</i>	<i>X. albilineas</i>	<i>X. axonopodis</i>	<i>X. ampelina</i>	<i>X. populi</i>
Crec. A 35° C	+	-	+	+	-	-
Hidrólisis	+	-	+	+	-	·
Crecimiento mucoide	+	+	-	-	-	+
Licuefacción	v	+	v	-	-	-
Proteólisis de leche	-	-	-	-	-	ligero
H ₂ S de peptona	+	-	-	+	v	-
Ureasa	-	-	-	-	+	-
Tolerancia al NaCl	2-5%	0.5-1.0%	0.5%	1.0%	1.0%	0.4 - 0.6%
Hidrólisis de almidón	v	+	-	+	-	·
Producción de ácido						
Arabinosa	+	-	-	-	+	-
Glucosa	+	+	+	+	-	+
Manosa	+	+	+	-	-	+
Galactosa	+	-	v	-	+	+
Celebiosa	+	-	-	-	-	-
Fructuosa	+	+	-	-	-	+
Trehalosa	+	-	-	+	-	+

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1. PARTE QUÍMICA

La horminona, producto natural, empleado para su evaluación antimicrobiana así como para formar una serie de cuatro derivados químicos (II-V), se obtuvo de acuerdo con lo informado en la literatura (*vide supra*) a partir del extracto *n*-hexánico de 1 Kg de raíces secas del espécimen *Salvia reptans* Jacq., previa identificación de éste, en el Herbario del Instituto de Biología de la UNAM.

Originalmente el extracto crudo(40 g) el cual era una mezcla de horminona, con otros metabolitos sin interés para este estudio. En consecuencia se procedió a separar y por ende realizar una primera purificación de I, mediante cromatografía en columna (“flash”) con sílice como soporte y el sistema *n*-hexano/AcOEt 9.7:0.3, como eluyente, para un total de 6 gramos de horminona. A su vez, para complementar su purificación se recristalizó en varias ocasiones con *n*-hexano, obteniéndose 5.92 g de producto puro de acuerdo a una serie de análisis por cromatografía en capa fina en complemento con su punto de fusión y datos espectroscópicos.

Con respecto a la identificación de I, ésta se realizó inequívocamente, mediante la correlación de su punto de fusión, *r_f* y *ccf* con una muestra auténtica (*vide supra*), la cual fue complementada también con los datos de espectrometría de masas de alta resolución así como por la fragmentación generada mediante bombardeo con átomos rápidos. Espectro 1. Los datos de EMAR mostraron un valor *m/z* 332.1992 asignado al ion molecular ya que resultó consistente con el peso molecular y una composición elemental C₂₀ H₂₈ O₄. Otros fragmentos presentes en el espectro de I que fortalecieron la identificación fueron los siguientes:

m/z 331 asignado al *quasi* ion molecular, $[M+H]^+$, fragmento característico cuando se utiliza *EMFAB*; pérdidas de 17 y 18 umas correspondientes a m/z 315 y 316 asignadas a los iones $[M+H-H_2O]^+$ y $[M+H-(OH)]^{+*}$ de manera respectiva, indicativos de la pérdida del hidroxilo en C-7, inherentes con la estructura de la molécula objetivo.

Respecto a la serie de los cuatro derivados de horminona **II-V**, ésta se llevó a cabo en forma análoga a la de horminona, mediante la información que en forma resumida se muestra en la Tabla 13, en complemento con la serie de etapas siguientes:

- ❖ Correlacionando los puntos de fusión de los productos obtenidos con respecto a los proporcionados en la literatura química (Hensch y colaboradores 1975 y Martínez *et al* en 1998).
- ❖ Relacionando una serie de cromatografías en capa fina empleando diferentes sistemas de elusión, para cada molécula estudiada, en forma comparativa con muestras auténticas.
- ❖ Obteniendo el peso molecular exacto de cada derivado mediante el empleo de EMAR / EMFAB⁺.
- ❖ Determinando la composición elemental, de cada uno de los derivados de horminona, como consecuencia del punto anterior.

Tabla 13. Datos físicos y espectroscópicos comparativos, para identificar mediante correlación I - V.

COM- PUESTO	PUNTO DE FUSION (°C)		EMFAB ⁺		EMAR			COMPOSICIÓN ELEMENTAL		
	p	e	M ⁺	[M+H] ⁺	o	e	% error	C	H	O
I	174	172-174	332	333	332.1992	332.1988	+1.3	20	28	4
II	167	167- 169	314	315	315.1950	315.1960	-3.2	20	27	3
III	122-122.5	120 -122	416	417	417.2271	417.2277	-1.4	24	33	6
IV	189-191	189.5-191	436	437	437.2318	437.2328	-2.2	27	33	5
V	138.5-139	138-139	346	347	346.2140	346.2144	-1.2	21	30	4

p = publicado; e = experimental; M⁺ = ión molecular (peso molecular); [M+H]⁺ = *quasi ión* molecular; o = observado; e = estimado.

5.2. PARTE BIOLÓGICA

En la Tabla 6 se presenta la concentración mínima inhibitoria presentada por la horminona y 4 de sus derivados. Al realizar la prueba de ANOVA trifactorial, se encontraron los siguientes resultados Tabla 14.

Las variables analizadas fueron Dosis, Compuestos y Cajas petri.

Del ANOVA realizado se determinó que no existe diferencia significativa entre las cajas $p > 0.05$, esto nos indica el adecuado manejo de la parte experimental llevado a cabo durante la evaluación.

La Tabla 14, muestran los valores de p correspondientes a la significancia de a variable compuestos, todos ellos fueron comparados con la oxitetraciclina. En todos los casos se encuentra que hay diferencia significativa ($p < 0.001$) entre el efecto debido a los compuestos evaluados con respecto al compuesto control. De igual manera en esta misma tabla se presentan la correlación existente entre las dosis evaluadas y el efecto observado. En la mayoría de ellas hay una buena dependencia entre ambas variables.

Respecto a la sensibilidad de las bacterias utilizadas para esta evaluación y de acuerdo a los resultados obtenidos por el método del MIC, se determinó que las bacterias Gram positivas son más sensibles que las Gram negativo.

Respecto al análisis los resultados observado para el derivado V, el cambio de la función hidroxilo de la posición 12 del derivado V por un grupo metoxilo, modifica en gran medida el efecto bacteriostático de la molécula de horminona, esto puede deberse posiblemente a al cambio de polaridad generado a partir de la modificación.

Aunque con los demás derivados obtenidos, también se modifican las propiedades fisicoquímicas, el tamaño del compuesto V es menor a los compuestos III y IV, lo que podría favorecer de alguna manera que estas moléculas difundan a través de los canales hidofílicos de porinas y ejerzan su efecto en el ribosoma, esto en el caso de las bacterias Gram negativas. En el caso de las bacterias Gram positivas no se conoce a detalle el mecanismo involucrado en el transporte de tetraciclinas.^{42, 45,55}

Tabla 14. Valores de significancia p, y correlación para los compuestos activos I, III y V

CEPA	I	III	V
<i>Clavibacter michiganense</i> subsp. <i>sepedonicum</i> 9850	p < 0.001 r ² = 0.92	p < 0.001 r ² = 0.92	-
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> 15359	p < 0.001 r ² = 0.91	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> van Hall pathovar <i>tomato</i> 10862	-	-	p < 0.001 r ² = 0.91
<i>Xanthomonas campestris</i> 13951	-	-	p < 0.001 r ² = 0.82
<i>Erwinia carotovora</i>	p < 0.001 r ² = 0.79	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i>	-	-	p < 0.001 r ² = 0.91
<i>Xanthomonas campestris</i>	-	-	p < 0.001 r ² = 0.75

Los resultados mostrados por la deshidrohorminona concuerdan con lo publicado (Martínez y colaboradores en 1998), proponen que la molécula carece de actividad antimicrobiana, debido a la ausencia del grupo hidroxilo en el C7.

Así mismo, lo anterior se puede fundamentar con los estudios realizados por (Saenger *et al* 1999, Chopra 2001 y Nicolas 2002) donde se reporta que para que las tetraciclinas atraviesen la pared celular de la bacteriana y ejercer su acción antimicrobiana a nivel ribosomal, necesitan quelarse los átomos oxígenos de las posiciones 11 y 12 con ión Mg^{+2} . La deshidrohorminona al no tener un átomo de oxígeno unido en el carbono 7, no puede quelarse con el ión Mg^{+2} , por lo que la pérdida de la actividad antimicrobiana puede deberse tal vez a la anterior consideración.

Por último, es importante mencionar que no se logró aislar la bacteria del género *Clavibacter*, lo cual pudo deberse a que ésta se desarrolla lentamente, o tal vez los frutos no la contenían o el método que utilice para separarla, no fue el adecuado.

6. CONCLUSIONES

- Se aisló horminona de la raíz del espécimen vegetal *Salvia reptans* Jack.
- Se obtuvieron los derivados correspondientes de las reacciones clásicas de acetilación, benzoilación, metilación y deshidratación a partir de la horminona
- Se evaluó el efecto bactericida de la horminona y sus derivados sobre cepas patógenas de los frutos y tubérculo en cuestión, encontrándose que las bacterias ATCC *Pseudomonas syringae* van Hall *pathovar tomato* 10862, *Xanthomonas campestris* 13951, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, presentaron sensibilidad al compuesto metilado y *Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum* 9850 y *Erwinia carotovora* subsp *carotovora* 15359 y *Erwinia carotovora* fueron sensibles únicamente a la horminona, todas ellas se compararon con la oxitetraciclina obteniéndose una $p < 0.005$.
- Se propone llevar a cabo lo siguiente:
 - Pruebas de las moléculas sobre frutos para aumentar el tiempo de vida de anaquel.
 - Estudios de inocuidad de la horminona y sus derivados para que los frutos tratados puedan ser comestibles.

GLOSARIO

Ac₂O	Anhídrido Acético
AcOEt	Acetato de Etilo.
APTS	Acido <i>p</i> -Toluensulfónico.
ATCC	Colección de Cepas Tipo Americano.
BzCl	Cloruro de Benzoilo.
CF	Cromatografía en Columna Tipo "Flash".
CCF	Cromatografía en Capa Fina.
CH₂N₂	Diazometano.
C=O	Carbonilo.
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria.
DNA	Ácido Desoxirribonucléico.
ΔH	Calor de Formación.
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución.
EMIE	Espectrometría de Masas por Medio de Impacto Electrónico.
EMFAB	Espectrometría de Masas Mediante Bombardeo con Átomos Rápidos.
FRUTO	Ovario maduro de una flor de estructura comestible y jugosa, como la ciruela, manzana, uva o durazno; aunque los ejotes, calabazas pepinos y jitomates o los granos como el maíz, cebada, trigo y otros cereales también son frutos, esto desde el punto de vista botánico.
HORTALIZA	Se refiere a un vegetal, legumbre o planta comestible y/o raíz como el betabel, papa, rábano, zanahoria.
KB	Agar B de King.
Me	Metilo.
Mg⁺²	Ión Magnesio (+2).
NBY	Caldo Nutritivo Extracto de Levadura Agar.
NGA	Agar Nutritivo Glucosa
OH	Hidroxilo.

pf	Punto de Fusión.
PI	Potencial de Ionización.
PSI	Pound square inch (libras por pulgada cuadrada, unidad de presión).
Py	Piridina.
REA	Relación Estructura-Actividad.
RNA_m	Ácido Ribonucleico Mensajero
RNA_t	Ácido Ribonucleico de Transferencia
RNA_r	Ácido Ribonucleico Ribosomal
I	Horminona: (7 α ,12-dihidroxi-13-isopropil-18 α ,19 β ,20 β -trimetilabieta-8, 12-dien-11,14-diona).
II	Producto de Deshidratación: (12-hidroxi-13-isopropil-18 α ,19 β , 20 β -trimetilabieta-6, 8,12-trien-11,14-diona).
III	Producto de Acetilación: (7 α -12-diacetoxi-13-isopropil-18 α ,19 β , 20-trimetilabieta-8-12-dien-11, 14-diona).
IV	Producto de Benzoilación: (7 α -hidroxi-12-benciloxi-13-isopropil-18 α , 19 β - trimetilabieta-8, 12-dien-11, 14-diona).
V	Producto de Metilación: (7 α -hidroxi-12-metoxi-13-isopropil-18 α , 19 β , 20 β - trimetilabieta-8,12-dien-11, 14diona).
VI	Oxitetraciclina
YDC	Extracto de Levadura–Dextrosa–CaCO ₃
YNA	Agar nutritivo extracto de levadura

8. APÉNDICE

8.1. MEDIOS DE CULTIVO PARA AISLAMIENTO

<u>8.1.1 NGA-Agar nutritivo glucosa</u>	<u>g/L</u>
Extracto de carne	3.0
Peptona	5.0
Glucosa	2.5
Agar	15.0

<u>8.1.2. YNA Medio agar nutritivo-extracto de levadura</u>	<u>g/L</u>
Extracto de levadura	5
Agar nutritivo	23

Esterilizar por autoclave a 115 lb/ 11 min. Y vaciar en cajas.

Este medio generalmente se emplea para aislar bacterias del material vegetal, es útil para especies de *Xanthomonas*.^x

<u>8.1.3. NBY Caldo nutritivo-agar extracto de levadura</u>	<u>g/L</u>
Caldo nutritivo	8.0
Extracto de levadura	2.0
K ₂ HPO ₄	2.0
KH ₂ PO ₄	0.5
Glucosa	2.5
Agar	15.0

Después de esterilizar el medio, se enfría aproximadamente a 40-45 °C, se le adicionan 1 mL de solución 1 M de MgSO₄•7 H₂O (estéril).¹²

8.1.4. YGM	g/L
Extracto de levadura	2.0
Glucosa	2.5
K ₂ HPO ₄	0.25
KH ₂ PO ₄	0.25
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.1
MnSO ₄	0.015
NaCl	0.05
FeSO ₄ •7H ₂ O	0.005
Oxoid Agar No 3	15.0

Este medio es recomendado para el aislamiento de *C. m* Subsp. *sepedonicus* y *Xanthomonas*.^x

8.2. MEDIOS DE CULTIVO DIFERENCIALES

8.2.1. KB Agar B de King	g/L
Peptona proteasa	20.0
K ₂ HPO ₄	1.5
MgSO ₄ •7 H ₂ O	1.5
Glicerol	15.0
Agar	15.0

8.2.2. TTC	g/L
Peptona	10
Caseina hidrolizada	10
Glucosa	5
Agar	12

Ajustar el pH a 7 y esterilizar en la forma normal, cuando el medio alcance una temperatura de aproximadamente 45-50 °C adicionar solución acuosa de cloruro de tetrazolio al 1% para dar una concentración final de 0.005%

Con este medio de cultivo se pueden detectar las bacterias virulentas y avirulentas de *Ralstonia solanacearum* y *P. S. pv phaseolicola*. En el primer caso las bacterias virulentas forman colonias blancas, fluidas, con centro rojo y para la segunda, las cepas virulentas forman colonias rojas y las avirulentas blancas.^x

<u>8.2.3. YDC- Extracto de levadura dextrosa-CaCO₃.</u>	<u>g/L</u>
Extracto de levadura	10.0
Dextrosa	20.0
CaCO ₃ (polvo fino)	20.0
Agar	15.0

Para obtener un medio de cultivo color blanco con apariencia lechosa, el carbonato de calcio debe de utilizarse en forma de polvo muy fino, de otra manera puede formar un precipitado en la superficie.¹²

El medio se esteriliza a 10 PSI por una hora, se enfría a 50 °C en un baño María y se le adiciona el carbonato de calcio antes de vaciar a las cajas.

Este medio se utiliza para distinguir *Xanthomonas* y algunas especies de *Erwinia* de entre *Pseudomonas*, *Agrobacterium* y otras especies de *Erwinia*.¹²

8.3. MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS

<u>8.3.1. Medio D 2</u>	<u>g/L</u>
Glucosa	10
Caseina hidrolizada	4
Extracto de levadura	2
NH ₄ Cl	1
MgSO ₄ •7 H ₂ O	3

LiCl	5
Tris (Hidroximetil) amonio metano	1.2
Agar	15

Disuelva los ingredientes en el agua, ajuste el pH a 7-8 con HCl y esterilice. Cuando el medio tenga una temperatura de 50 °C adicione:

Sulfato de polimixina	40 mg (300 unidades)
Azida de sodio	2 mg

Este medio se utiliza para el aislamiento de *Corynebacterium* y se debe preparar al momento de emplearse para evitar que la azida y la polimixina se descompongan con el tiempo.

<u>8.3.2. Medio FPA</u>	<u>g/L</u>
Medio B de King	1 Litro
Polipectato de sodio	5

Esterilizar en autoclave, enfriar hasta 45 °C y adicionar una mezcla de los siguientes antibióticos en etanol al 70%.

	<u>g/L</u>
Novobiocina	45 mg
Penicilina G	75 000 unidades
Ciclohexamida	75 mg

Se incuban a 27 °C, después del crecimiento, se examinan las cajas con luz ultravioleta para marcar las colonias que producen pigmento. Posteriormente se le adiciona solución de bromuro de hexadecitrimetil amonio, para detectar las que tengan actividad pectolítica. Una vez detectado esto, las colonias se deben de sembrar inmediatamente en otro medio para evitar su muerte por el compuesto

antes mencionado. Este medio se puede usar cuando se desea aislar a *Pseudomonas marginales*, del suelo, semillas, insectos, etc. *P. syringae* también puede desarrollarse en este medio pero después de 4 o más días.

Este medio se utiliza para el aislamiento de *Pseudomonas* fluorescentes, oxidasa positiva.

8.3.3. Medio KFT

Medio B de King	1 L
Fuccina básica	9 mL
Cloruro de trifenil tetrazolio	1.4 mg

Medio útil para determinar *Pseudomonas syringae* pv *tomato* en semillas y hojas de tomate.

8.3.4. Medio SX

	<u>g/L</u>
Almidón (soluble de papa)	1
Extracto de carne	5.0
Cloruro de amonio	2
K ₂ HPO ₄	2
Violeta de metilo	1 mL*
Verde de metilo	2 mL**
Ciclohexamida	250 mg
Agar	15

* Solución al 1% en etanol al 20%

** Solución acuosa al 1%

Este medio se emplea para el aislamiento de *X. campestris* y aquellas especies que hidrolizan el almidón, ya sea a partir del material vegetal o suelo.

8.3.4. Medio CVP

Precalear un vaso de licuadora y adicionar 500 mL de agua destilada caliente, agregar los siguientes reactivos con licuadora trabajado a baja velocidad.

	<u>g/L</u>
Solución acuosa de cristal violeta al 0.07%	1
NaOH 1 N	4.5
Solución acuosa de CaCl ₂ al 10% (recientemente preparada)	3
NaNO ₃	1
Agar	2

Calentar el agua a punto de ebullición, licuar todos los ingredientes a alta velocidad durante 15 segundos y luego disminuir la velocidad y agregar 9 g de polipectato de sodio, aumentar la velocidad por otros 15 segundos. Transferir el medio a un matraz de dos litros, taparlo con papel aluminio y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos y vaciar en cajas petri.

Este medio de cultivo, es recomendable para el aislamiento de especies de *Erwinia* con actividad pectolítica.

8.3. 5. MEDIOS DE CULTIVO PARA CARACTERIZACIÓN

<u>8.3.5.1. Producción de ácido de disacáridos</u>	<u>g/L</u>
Peptona	10
Disacárido	10
Azul de bromotimol	0.02

La peptona y el indicador se disuelven en 995 mL de agua destilada. Ajuste el pH a 7 y esterilice en autoclave por 15 min a 15 libras de presión. El disacárido

(sacarosa, lactosa o maltosa) , se disuelve en 5ml de agua, se adiciona al medio, ya esterilizado a través de un filtro Millipore.

<u>8.3.5.2. Medio HUG y LEIFSON</u>	<u>g/L</u>
Peptona	2
NaCl	5
K ₂ HPO ₄	0.3
Agar	3
Azul de bromotimol	0.03
Glucosa	10

El pH se ajusta a 7.1 antes de adicionar el agar. La glucosa se esteriliza por filtración Millipore.

<u>8.3.5.3. Medio para la producción de levana</u>	<u>g/L</u>
Peptona	10
Extracto de carne	3
NaCl	5
K ₂ HPO ₄	0.3
Agar	3
Azul de bromotimol	0.03
Glucosa	10

<u>8.3.5.4. Medio para la hidrólisis de almidón</u>	<u>g/L</u>
Almidón soluble	1%
Extracto	3
Agar	16

<u>8.3.5.5. Medio para detectar actividad lipolítica</u>	<u>g/L</u>
-----------------------------------------------------------------	-------------------

Peptona	10
NaCl	5
CaCl ₂ •2H ₂ O	0.1
Tween 80	10
Agar	15

<u>8.3.5.6. Medio de gelatina</u>	<u>g/L</u>
------------------------------------------	-------------------

Peptona	5
Extracto de carne	3
Gelatina	120
K ₂ HPO ₄	0.3

La gelatina se adiciona al agua y se deja hidratar durante 15-30 minutos, luego se calienta para disolver la gelatina; posteriormente agregar y disolver los otros constituyentes. Ajustar el pH a 7, vaciar a tubos y esterilizar a 115 °C durante 20 minutos.

<u>8.3.5.7. Medio para la producción de H₂S</u>	<u>g/L</u>
-------------------------------------------------------------------	-------------------

Peptona	15
Proteosa No. 3 agar	3
Acetato de plomo	2
Tiosulfato de sodio	0.08
Agar	14

<u>8.3.5.8. Medio para la producción de indol</u>	<u>g/L</u>
----------------------------------------------------------	-------------------

Bacto riptona	10
Proteosa No. 3 agar	3

<u>8.3.5.9. Urea (Christensen)</u>	<u>g/L</u>
Peptona	1
NaCl	5
KH ₂ PO ₄	2
Agar	20

Disolver los ingredientes mediante calentamiento, ajustar el pH a 6.8, filtrar y esterilizar a 115 °C durante 20 minutos, posteriormente cuando el medio base alcance la temperatura de 45-50 °C adicionar la glucosa y el rojo de fenol y la urea, tratados previamente con vapor durante una hora y enfriar a 50-55 °C, mezclar perfectamente y distribuir en tubos con el medio base.

Glucosa	1
Rojo de fenol al 0.2%	6 mL
Urea, 20%	100

Esterilizar por filtración y agregar asépticamente a la base.

<u>8.3.5.10. Urea</u>	<u>g/L</u>
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ •H ₂ O	0.2
NaCl	5
Extracto de levadura	0.01
Rojo de fenol	0.00016
Urea	20

Todos los ingredientes se disuelven en agua con excepción de la urea y se esterilizan en autoclave. Una vez frío el medio y en condiciones asépticas se le adiciona la urea a través de un filtro Millipor, se mezcla bien y se distribuye en tubos para medio.

Una vez que los tubos han sido sembrados con la bacteria se incuban a 27 °C durante 14 días y de ser posible con agitación constante.

Un incremento en la alcalinidad indica una reacción positiva y se hace evidente por la aparición de un color rojo magenta.

<u>8.3.5.11. Arginina</u>	<u>g/L</u>
Peptona	1
K ₂ HPO ₄	0.3
L (+) hidrocloreuro de arginina	10
NaCl	5
Extracto de levadura	0.01
Rojo de fenol	3
Agar	3

<u>8.3.5.12. Nitratos</u>	<u>g/L</u>
Nitrato de potasio	1
Extracto de carne	3
Bacto peptona	5

<u>8.3.5.13. Citrato</u>	<u>g/L</u>
Citrato férrico de amonio	10
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.5
CaCl	0.2

<u>8.3.5.13. Citrato</u>	<u>g/L</u>
Citrato de sodio (anhidro)	2
K ₂ HPO ₄	1
NaCl	5

MgSO ₄ •7H ₂ O	0.2
NH ₄ H ₂ PO ₄	1
Azul de bromotimol	15 mL
Agar	20

8.3.5.14. Gluconato**g/L**

Peptona	1.5
Extracto de levadura	1
Gluconato de potasio	1
CaCl	40

8.3.5.15. Inclusiones de -β-hidroxipurato**g/L**

NH ₄ H ₂ PO ₄	1.0
KCl	0.2
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.5
DL-β-Hidroxibutirato	5
Proteosa peptona No.3	20
Ol. 1% de azul de nilo	1 mL
NaOH 1N	4.5mL
Agar	17.5

Disolver los ingredientes y ajustar el pH a 7, después de esterilizar adicionar una solución de 20 g de glucosa en 100 mL de agua, esterilizada por filtración o por autoclave.

8.3.5.16. Medio para la determinación de biovars de *Pseudomonas solanacearum***g/L**

NH ₄ H ₂ PO ₄	1.0
KCl	0.2

MgSO ₄ •7H ₂ O	1
Peptona	5
Azul de bromotimol	0.08
Agar	3

El medio se ajusta a un pH de 7-7.1 con NaOH (40%) y se distribuye en frascos de 90 mL cada uno y se esterilizan en autoclave a 121°C/30 minutos. Preparar 10 mL de solución para cada uno de los carbohidratos a una concentración de 10%.

Los alcoholes se pueden esterilizar en autoclave a 100°C por 20 minutos y la lactosa y maltosa deben ser esterilizadas por filtración.

8.3.5.17. Medio de tolerancia al cloruro de sodio.

Tubos con caldo nutritivo-glucosa con diferentes concentraciones de NaCl (por ejemplo 1, 2, 3, 4, y 5 p/v), esterilizados a 121 °C durante 15 minutos. Se siembra la bacteria en cuestión y después del período de incubación se checa si hay o no crecimiento.

8.3.5.18. Medio de tolerancia al cloruro de tetrazolio.

Agar nutritivo en volúmenes de 100mL, se esterilizan a 121 °C por 15 minutos. Cuando la temperatura del medio llega aproximadamente a 50 °C adicionar solución acuosa de cloruro de tetrazolio (esterilizar por filtración) para dar una concentración final de 0.02% y 0.1% en cada caja.

9. REFERENCIAS

1. Silverman, R., *The Organic Chemistry of Drug Design and Action*, Academic Press, USA, (1992), p. 1-20.
2. De la Rosa, F., *Plantas y Yervas Medicinales de México*, 3ª. ed. Editores Mexicanos Unidos, México, (1976).
3. Testa B., Kyburz, E., Fuhner W., and Giger R., *Perspectives in Medical Chemistry*, Hostettman K., Hamburger M., "Search for New Lead Compounds of Natural origin", Verlag Helvetica Chimica Acta, Basel, Suiza, (1993), p.447.
4. Valencia N. A. Formación de derivados de Horminona y su ensayo Microbiológico; Tesis de Licenciatura; FES-C-UNAM, México, D. F., (1995).
5. Isenberg H., *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, Vol. I, American Society for Micribiology, USA, (1992).
6. U. S. Pharmacopeia National Formulary, *The United States Pharmacopeia*, 6ª ed., 1201 Twinbook Parway, (1985).
7. Bryan L. E., *Antimicrobial Drug Resistance*, 1ª. Ed., Academic Press, U.S.A., (1984), p. 194.
8. Giono C. S., Pruebas de Bauer-Kirby para Sensibilidad a Antimicrobianos, *Infectología*, 7, 325, (1983).
9. Charles L. Wilson and Michael E. Wisniewski. *Annu. Rev. Phytopathol*, 27, 425, (1989).
10. Harrison, M. D. and Nielsen, L.W. Diseases in the Presence of Infatius Pathogens Bacteria. In: *W.J. Jooker Compendium of potato deseases American Phytopathological Society*. St. Paul. Minnesota, (1981), p 23.

-
11. Lelliott, R.A. En R.E. Buchanan and N.E. Gibbons. Eds. Bergy's Manual of Determinative Bacteriology 8th ed. Baltimore: William & Wilkins, (1974).
 12. Norman W. Schaad,. Laboratory guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria. Bacteriology Comitte for American Phytopathological Society St. Paul. Minnessota (1980).
 13. María Cristina López Fuentes. Los Caminos de la Fitobacteriología Ed. Universidad Autónoma de Chapingo, (1994), p 215.
 14. Norman W. Schaad,. Laboratory guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Ed The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota, (1988).
 15. María del Lourdes Rodríguez Mejía, Manual para la Identificación de Bacterias Fitopatógenas Ed. Universidad Autónoma de Chapingo, (2001), p. 119.
 16. Bouzar, H. Jones, J.B. Somodi, G.C. Stall, N. E. Dcouzli,. Lambe, R.C. Felix-Gastelom, Trinicad-Correa, R. Diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and papper fields of México. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **18** (1), 75-77, (1996).
 17. Cardona, R. Camino, J.M. and Hidalgo, W. Detección de *Pseudomonas syringae* pv *tomato* y *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* en muestras de semillas comerciales de tomate. *Fitopatol. Venez.* **9**, 12, (1996).
 18. Pierce, L. and M.N. Schroth. Detections of *Pseudomonas* colonies that accumulate poly- β -hydroxybutyrate on Nile Blue Medium. *Plant Dis.*, **78**: 683, (1994).
 19. Larry R. Beuchat and Golden David A., Antimicrobials Occurring Naturally in Foods, *Food Technology* ,134, (1989).
-

-
20. Williams, P., Stone, M., Hauk, P., Rahman, S. *J. Nat. Prod.*, **52**, 3, 1189, (1989).
 21. Domínguez, S. X. A., *Phytochemistry Methods Frontiers, First Special, Rev. Latinoamer. Quím.*, (1990).
 22. Ruzicka, L., *Experientia*, **9**, 357, (1953).
McGraw- Hill Interamericana, p. 1083, (1991).
 23. De la Cruz, M., *Libellus de Medicinabus Indionum Herbis (Codice Badiano)*, FCE, México. (1977),
 24. Martínez, M., *Las Plantas Medicinales de México 3ª ed.*, Batas, México, D. F. (1969).
 25. Romo de Vivar, A., González, J. Pérez, L., *Rev. Latinoamer. Quím.*, **16**, 51, (1985).
 26. *Chem. Abs.*, **110**, 1992249s, (1985).
 27. Ikeshiro, Y., Hashimoto, I., Ixamoto, Y., Mase, I., Tomita Y., *Phytochemistry*, **30**, 2791, (1991).
 28. Ibelen, A., Topcu, G., *Phytochemistry*, **30**, 2085, (1991).
 29. Pereda, M., Hjernández, L., López, R., *Planta Med.*, **58**, 223, (1992).
 30. Vanhaelen, M. J., *Pharm. Belg.*, **44**, 242, (1989).
 31. González, A., Andrés, L., Herrera, J., Luis, J., Ravello, A., *Can J. Chem.*, **67**, 208, (1989).
 32. Ulubelen, A., Everen, N., Tuzlaci, E., Johansson, C., *J. Nat. Prod.*, **51**, 1178, (1988).
-

-
33. Ulbelen, A., Topcu, G., Tan, N., *Phytochemistry*, **31**, 637, (1992).
 34. An Kong-Lee, Wo, W., Chang, W., Lin H., Chin, King, M., *J. Nat. Prod.*, **50**, 157, (1987).
 35. Tada, M., Okuno, K., Chiva, K., Ohnishi, E., Yoshii, T., *Phytochemistry*, **35**, 2, 539, (1994).
 36. Ramírez R., Estudio Fitoquímico de *Salvia reptans* Jaqc. y un Ensayo Electroquímico Microbiológico de Horminona aislada de, Tesis de Licenciatura de la FESC-UNAM, México, (1993).
 37. Jonathan, L. T., Che, C. T., Pezzuto, J. H., Fong, H. S., Farnsworth, N., *J. Nat. Prod.*, **52**, 571, (1989).
 38. Gojiman, S., Turnes, J., Marini-Bettolo, Stoppani, M., *Experientia*, **41**, 647 (1985).
 39. Kupchan, M., Karim, S., Marcks, C., *J. Org. Chem.*, **34**, 3912, (1969).
 40. Hueso-Rodríguez, J., Jimeno, M., Rodríguez, B., Sanova, G., Bruno, M., *Phytochemistry*, **22**, 2005, (1993).
 41. Martínez M., Miranda P., Valencia N., Torres L., Miranda R., Cárdenas J., Salmón, M. *Pharmaceutical Biology*, **36**, 77, (1998).
 42. Goodman-Gilman, *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, 8ª ed. McGraw-Hill Interamericana, p. 1083, (1991).
 43. Schlessinger, David; Apirion, David., *Ann. Rev. Microbiol*, **23**, 387, (1969).
 44. Hammond, Stephen M., Lambert, P. A., *Antibióticos y Acción Antimicrobiana*, ed. Ediciones Omega S.A España, p. 2, (1980).
 45. Nomura, Masayasu; *Bacteriological Reviews*, **4**, 228, (1970).
-

-
46. Kurland, C.G., *Ann. Rev. Biochem*, **41**, 377, (1972).
 47. Bretscher, M. S., *Nature Lond*, **218**, 675, (1968)
 48. Chopra, I., Howe, T.G.B., *Microbiological Reviews*, **42**, 707, (1978).
 49. McCormick, J.R.D., Jensen, Elmer R., Miller, Philip A., Doerschuk, Albert P., *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3381, (1960).
 50. Harold C., Neu, M.D., *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, **54**, 141, (1978).
 51. Stephens, C.R., Murai, K., Brunings, K.J., Woodward, R.B., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4155, (1956).
 52. Lasking, A., Last, J. A., *Antibiotics and Chemotherapy*, **17**, 1, (1971).
 53. Benbough, J. E., Morrison, G. A; *J. Gen. Microbiol.*, **49**, 469, (1967).
 54. Weinberg, Eugene. D., *Bact. Rev.*, **21**, 46, (1957).
 55. Goodman-Gilman, *Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, 9° ed. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana, p. 1193, (1996).
 56. Hensch, M., Ruedi, P., and Hans Corrad, H., Horminon, Taxochinon und weitere Royleanone aus 2 abessinischen *Plectranthus*-Spezies (*Labiatae*). *Helvetica Chimica Acta*, **58**, 7, (1975).
 57. Peter Orth, Wolfram Saenger and Winfried Hinrichs, Tetracycline-Chelated Mg^{+2} Ion Initiates Helix Unwinding in Tet Repressor Induction. *Biochemistry*, **38**, 191 (1991).
 58. Ian Chopra and Marilyn Roberts. Tetracycline Antibiotics, Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacteria Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Review*. June 2001, p.232-260.
-

59. Ines Nicolás, Martha Vilchis, Nidia Aragón, René Miranda, Germund, Hojer, Miguel Castro. Theoretical Study of the Structure and Anti-Microbial Activity of Horminone, *International Journal of Quantum Chemistry*, **93**, p. 411,(2003).