

302927
2^o eje

Universidad femenina
de México

UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO

INCORPORADA A LA UNAM

“EVALUACION BIOLOGICA DEL SISYRINCHIUM SCABRUM,
UNA PLANTA MEDICINAL MEXICANA ”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MA. DE LOURDES BARBOSA ROMERO

MEXICO, D. F.

1994



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD
FEMENINA
DE MEXICO

JURADO ASIGNADO :

PRESIDENTE : M. en C. Verónica Rodríguez López

VOCAL : Q.F.B. Alma Miriam Novelo Torres

SECRETARIO : Q.F.B. Esperanza Hernández Koelig

SUPLENTE : Q.F.B. Raúl Díaz Tagle

SUPLENTE : Q.F.B. Agustín Palma de la Cruz

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :

En el Laboratorio de Fitoquímica del Departamento de
Farmacia de la E.N.C.B. del I.P.N.

DIRECTOR DE LA TESIS :

M. en C. Verónica Rodríguez López

ASESOR EXTERNO :

M. en C. María de Lourdes Hernández de Jesús

SUSTENTANTE :

María de Lourdes Barbosa Romero

El presente Trabajo, fué realizado en el Laboratorio de Fitoquímica del Departamento de Farmacia de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo el Asesoramiento de la M. en C. Ma. de Lourdes Hernández de Jesús y de la M. en C. Verónica Rodríguez López.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a la OMIECH (Organización de Médicos Indígenas del Estado de Chiapas) y al Dr. Rafael Alarcón, por proporcionar la planta para la realización del presente trabajo.

A la DEPI (Dirección de Estudios de Posgrado e Investigación) por el apoyo económico para realizar la investigación. Clave Proyecto 393392.

A la Dra. Concepción Rodríguez Jiménez del Departamento de Botánica de la E.N.C.B. por haber realizado la clasificación botánica de la planta.

Al Departamento de Asistencia Técnica de la E.N.C.B. por proveer las cepas microbiológicas.

Al Dr. Ramón Cruz Camarillo y a la sección de Tecnología Farmacéutica del Departamento de Farmacia por facilitarnos su Laboratorio para realizar las pruebas microbiológicas.

A la Q.F.B. Graciela Chávez Beltran del Instituto de Química de la UNAM por el registro del espectro I.R.

A la Q.F.B. Alma Miriam Novelo Torres por sus valiosos comentarios.

De manera especial, mi más profundo agradecimiento a la M. en C. María de Lourdes Hernández de Jesús, profesora e investigadora de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, por su acertada dirección de la presente investigación, a quien hago patente mi reconocimiento por su incansable labor de enseñanza.

Agradezco sincera e infinitamente a la M. en C. Verónica Rodríguez López (profesora e investigadora) Directora de la Licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo de la Universidad Femenina de México (UVM), por haberme brindado la oportunidad de trabajar bajo su dirección, por el apoyo, confianza y estímulo para la realización de la Tesis, quien con su gran calidad profesional y humana supo guiar acertadamente la presente.

DEDICATORIAS

Llegando al término de este trabajo, quiero dedicarlo a mis seres queridos y darles testimonio de mi agradecimiento:

A mis padres, Eva y Eduardo, por su entrega durante tantos años, por darme siempre su apoyo incondicional, por haberme enseñado el valor del estudio y su amor por la vida.

A mi esposo, Fernando, por brindarme su apoyo durante mi trabajo de tesis. Por transmitirme su ánimo para salir adelante. Con todo mi amor y gratitud.

A mis hijas, Lulis y Carmelita, les dedico mi trabajo con todo mi amor.

A mi hermana, Evangelina, por brindarme su ayuda y por sus valiosos consejos.

A mis hermanos, Eduardo y Jorge, con todo mi cariño.

A todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron para la realización de este trabajo.

"Vemos en la naturaleza una
magnífica estructura que sólo
comprendemos muy someramente
y que debe llenarnos con un
sentimiento de humildad".

Albert Einstein.

INDICE

	Página
INTRODUCCION.....	I
JUSTIFICACION.....	I
OBJETIVOS.....	VI
Objetivo General.....	VI
Objetivos Particulares.....	VI
I ANTECEDENTES.....	1
I.1 LOS ALTOS DE CHIAPAS.....	1
I.1.1 Ubicación Geográfica.....	1
I.1.2 Los Indios Tzotziles de Chiapas.....	4
I.1.3 La Medicina Tradicional en el Estado de Chiapas.....	6
I.1.4 Las Plantas Medicinales.....	7
I.1.5 Plantas Medicinales de los Altos de Chiapas.....	11
I.2 GENERALIDADES DE LA FAMILIA IRIDACEAE.....	17
I.2.1 Aspectos Botánicos de la Familia.....	17
I.2.2 Aspectos Fitoquímicos de la Familia.....	17
I.2.3 Aspectos de la Actividad Biológica de la Familia.....	28
I.3 GENERALIDADES DEL GENERO SISYRINCHIUM.....	32
I.3.1 Aspectos Botánicos del Género.....	32
I.4 GENERALIDADES DE LA ESPECIE <u>Sisyrrinchium</u> <u>scabrum</u>.....	34

I.4.1 Aspectos Botánicos de <u>S. scabrum</u>	34
II METODOLOGIA	37
II.1 MATERIAL VEGETAL.....	37
II.2 EXTRACCION Y PURIFICACION DE LOS CONSTITUYENTES MAYORITARIOS DE LA RAIZ DE <u>Sisyrinchium scabrum</u>	37
II.2.1 Análisis Preliminar.....	37
II.3 EXTRACCION.....	38
II.3.1 Fraccionamiento del Extracto Total por Cromatografía en Columna.....	39
II.4 ANALISIS MEDIANTE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.....	41
II.4.1 Preparación de Placas Cromatográficas.....	41
II.4.2 Reveladores y Reacciones para Identificación.....	41
II.5 ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO (METODOLOGIA).....	43
II.5.1 Identificación de Azúcares.....	43
II.5.2 Identificación de Cumarinas.....	43
II.5.3 Identificación de Glicósidos Cardiacos.....	44
II.5.4 Flavonoides.....	45
II.5.5 Quinonas.....	46

II.5.6	Sesquiterpenlactonas.....	46
II.5.7	Taninos.....	47
II.5.8	Saponinas.....	48
II.5.9	Glicósidos Cianogenéticos.....	48
II.5.10	Alcaloides.....	49
II.6	EVALUACIONES BIOLOGICAS DE LOS EXTRACTOS	
	DE LA RAIZ DE <u>Sisyrinchium scabrum</u>.....	53
II.6.1	Análisis Cualitativo Antimicrobiano....	53
II.6.1.1	Microorganismos de Prueba.....	53
II.6.1.2	Preparación de los Inoculos.....	53
II.6.1.3	Preparación de la muestra de Prueba.....	54
II.6.1.4	Procedimientos del Ensayo.....	54
II.6.2	Determinación de la Toxicidad para el crustáceo <u>Artemia</u> <u>salina</u> (Leach).....	55
II.6.2.1	Preparación de las Muestras.....	55
II.6.2.2	Bioensayo.....	55
III	RESULTADOS Y DISCUSION.....	56
IV	CONCLUSIONES.....	68
V	GLOSARIO.....	70
VI	BIBLIOGRAFIA.....	72

INTRODUCCION

JUSTIFICACION.

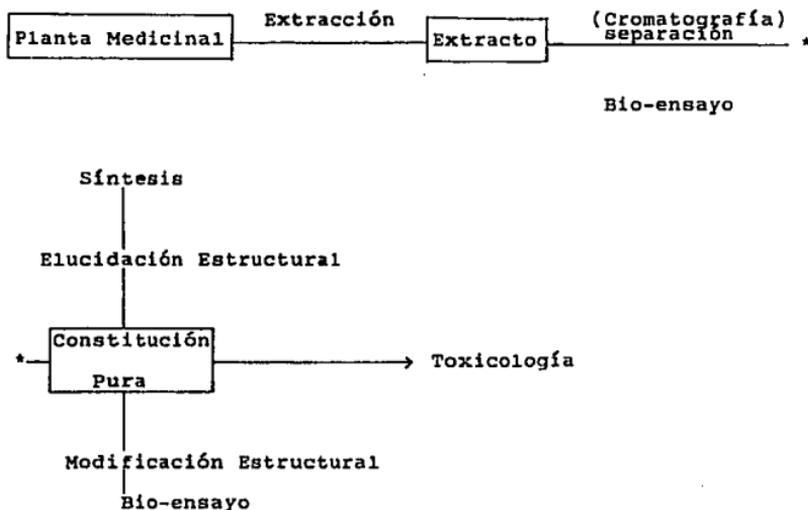
Es indudable que en los últimos años ha surgido un renovado interés por las plantas medicinales en todo el mundo; la herbolaria medicinal recobra una posición que parecía perdida después del surgimiento y auge de la industria químico-farmacéutica que con sus numerosos medicamentos había revolucionado la terapéutica.

El potencial de las principales plantas como fuentes de nuevos fármacos todavía está inexplorado. De entre 250,000 y 500,000 especies de plantas que se estiman, solamente un pequeño porcentaje ha sido investigado fitoquímicamente y su evaluación farmacológica es aún más pequeña.

El proceso que comienza desde la planta hasta hacerla farmacológicamente activa; a partir de sus constituyentes puros es muy largo y tedioso, y requiere una colaboración multidisciplinaria de botánicos, farmacólogos, químicos, farmacéuticos y toxicólogos.

En la reseña de constituyentes vegetales biológicamente activos, la selección de las especies a ser estudiadas, es obviamente, un factor crucial para ultimar el éxito de la investigación. Además, la variedad de material vegetal colectado, deberá centrarse considerando las relaciones taxonómicas y la explotación de información etnobotánica.

Figura 3. Proceso de obtención en el estudio de una planta medicinal.



La detección de los constituyentes activos es una tarea difícil. Sin embargo, la tendencia contemporánea en esta línea de investigación se enfoca al estudio de los agentes medicinales, mediante la aplicación de bioensayos durante el desarrollo del análisis fitoquímico de los extractos vegetales (Sufness, M. y Dourous, J. 1979). Diferentes análisis han permitido demostrar que las plantas medicinales exhiben un gran espectro de actividades biológicas potenciales. Por lo tanto,

el empleo de algún tipo de bioensayo ayuda al fitoquímico a no descartar compuestos activos, que de otra manera pasarían inadvertidos, contribuyendo simultáneamente a la investigación química y biológica de las especies medicinales.

Los bioensayos utilizados incluyen desde sencillos análisis microbiológicos in vitro, hasta complejos estudios farmacológicos in vivo utilizando organismos superiores (Vlietinck, A. J. 1987).

Sin embargo, la mayoría de las plantas superiores de interés económico y medicinal aún no se han descrito desde un punto de vista etnobotánico y, mucho menos, se ha realizado la investigación de sus constituyentes químicos o biológicamente activos. Por lo tanto, nuevas fuentes de materiales con valor comercial permanecen por ser descubiertas (Farnsworth, R. N. 1977).

En consecuencia, las plantas superiores constituyen una reserva de compuestos químicos de utilidad potencial no sólo como fármacos, sino como fuentes importantes de núcleos químicos estructurales que servirán como un punto de partida para la síntesis de análogos, y como una herramienta alternativa para el conocimiento de los procesos biológicos (Farnsworth, R. N. 1984).

Para poder impulsar una estrategia de revaloración de la herbolaria mexicana y propiciar un adecuado desarrollo de los estudios científicos nacionales tendientes a impulsar un nuevo y diferente aprovechamiento de nuestros recursos, es indispensable la información; se necesita reordenar y actuali-

zar los datos que sobre herbolaria medicinal tiene la sociedad mexicana a través del estudio de su literatura científica, de sus fuentes históricas, de sus estudios florísticos, de un enorme caudal de información, abandonada o dispersa en el polvo de los años para confrontarlas con el conocimiento científico de nuestro tiempo y poder así, retomar la tarea de su investigación y aplicación en beneficio de la salud de los mexicanos.

Ahí donde las sociedades han conocido siglos de cultura, y donde las tradiciones se arraigan a la población, la medicina popular o indígena, es rica en especies y conocimientos porque se ha nutrido en un dinámico proceso de interculturación, adaptándose al período histórico correspondiente. Para los mexicanos, la existencia de una medicina popular o tradicional eminentemente herbolaria es una realidad cultural insoslayable que requiere ser estudiada y valorada.

La Medicina Tradicional mexicana, es rica en recursos naturales, caracterizándose por sus raíces indígenas; cumple con la importante labor de proporcionar la salud a un porcentaje considerable de la población, además dichos recursos constituyen fuentes potenciales para el hallazgo de nuevos y/o conocidos principios activos. Considerando lo anterior, la medicina tradicional, debe ser objeto de estudios interdisciplinarios sistemáticos que permitan validarla sobre bases más científicas y garantizar las fuentes naturales de las que hace uso.

Por las razones anteriores, éste trabajo está enfocado a analizar una planta proveniente del Estado de Chiapas,

la cual es utilizada por los indígenas para el dolor y hemorragia después del parto.

La planta es conocida por los indígenas como Thuis jovel o Thuis vomoi y la parte de la planta que tiene la actividad mencionada es la Raíz.

Por sus características botánicas, la planta se clasifica dentro de la Familia denominada científicamente: IRIDACEAE; Género Sisyrinchium; Especie scabrum.

La revisión bibliográfica realizada en torno a esta planta medicinal demostró que no hay ningún tipo de estudios efectuados sobre la misma, por lo que tiene una relevante importancia el iniciar una investigación fitoquímica de Sisyrinchium scabrum.

Con el presente trabajo se contribuye a ampliar el conocimiento que de ella se tiene validándola sobre bases científicas para utilizarla de manera racional.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar la actividad antimicrobiana y la toxicidad contra el crustáceo Artemia salina (Leach), de la raíz de Sisyrinchium scabrum, así como, el aislamiento de su (s) principio (s) activo (s).

OBJETIVOS PARTICULARES.

- A. Realizar una investigación bibliográfica exhaustiva de la planta objeto de estudio.
- B. Obtener los extractos clorofórmico, hexánico, metanólico y de acetato de etilo.
- C. Evaluar la actividad antimicrobiana, mediante el Método de Difusión en Agar.
- D. Evaluar la Toxicidad de los extractos contra el crustáceo Artemia salina (Leach).
- E. Hacer uso de los métodos cromatográficos y fitoquímicos, con el fin de obtener el compuesto o compuestos responsables de la actividad biológica.
- F. Hacer uso de los métodos espectroscópicos, para la elucidación estructural del ó los compuestos aislados.

I ANTECEDENTES

I.1 LOS ALTOS DE CHIAPAS.

I.1.1. UBICACION GEOGRAFICA.

El Estado de Chiapas se localiza al sureste de la República Mexicana, con una extensión territorial de 75,634.4 Km² (3.8 % del territorio nacional); se limita al norte con el estado de Tabasco, al sur con el Océano Pacífico, al este con la República de Guatemala y al oeste con los estados de Oaxaca y Veracruz (Mapa 1).

Se divide en 111 municipios agrupados en 9 regiones económicas, dentro de las cuales se encuentra la región de los Altos de Chiapas, no lejos de la ciudad de San Cristóbal de las Casas (Agenda Estadística. Chiapas 1992) (Mapa 2).

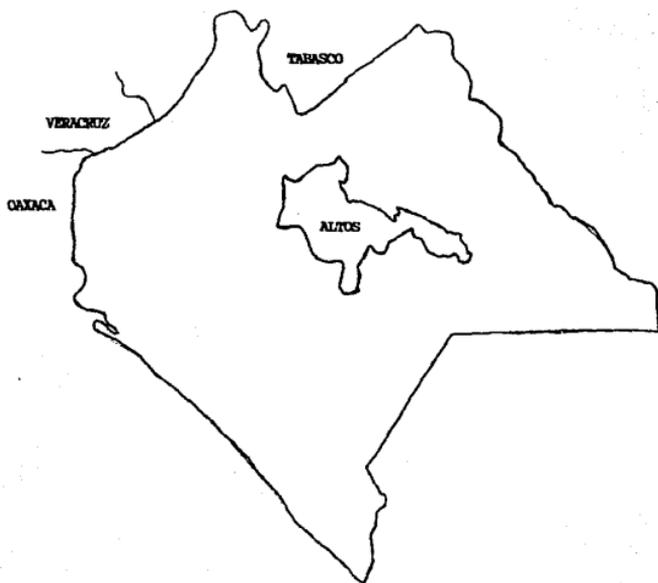
Presenta una sucesión continua de altas y rugosas montañas cuya altura máxima es de 2,858 metros y cuyo promedio aproximado alcanza los 1,800 metros.

Abruptos precipicios y profundos desfiladeros se hallan por todas partes; los valles y las llanuras son escasos y, en general, la zona entera está cubierta de abundantes árboles y de una vegetación muy densa.

Los Altos de Chiapas permanecieron separados y aislados del resto de México hasta 1950, cuando se extendió la carretera panamericana desde Tuxtla Gutiérrez, Capital del Estado, hasta San Cristóbal a través de las montañas.



Mapa 1. Localización geográfica del Estado de Chiapas, México.



Mapa 2. Estado de Chiapas y localización de la
Región de Los Altos de Chiapas.

Debido a la elevada altitud, el clima es templado y húmedo con lluvias de verano que se prolongan desde junio hasta noviembre. El mes más caluroso del año tiene una temperatura promedio de 23°C. En el Valle de San Cristóbal hay un promedio anual de 945 mm de precipitación pluvial y en las montañas vecinas suele ser mucho mayor. Durante la estación de lluvias aparece la neblina al caer la tarde y llega a ser tan densa que limita la visibilidad a pocos metros. Durante la estación seca, que va de diciembre a mayo, la temperatura fluctúa entre los 3°C y los 26°C en la sombra y alcanza 40°C en el sol (Holland, W. R. 1989).

I.1.2 LOS INDIOS TZOTZILES DE CHIAPAS.

Los 182,815 indígenas tzotziles habitantes de los Altos de Chiapas, forman uno de los 21 grupos mayas que pueblan la Península de Yucatán, el Estado de Chiapas y Guatemala (Mapa 3). Todos estos grupos tienen una población total de 2 000 000 de individuos (Morley, 1956). El nombre Tzotzil tiene el significado literal de "hombres murciélagos" (Seler, 1904).

Los tzotziles forman uno de los grupos indígenas menos asimilados en México; de ellos muy pocos individuos dominan suficientemente el español para poder ser considerados como bilingües. Su forma de vida no ha cambiado mucho desde la Conquista y son relativamente pocos los rasgos de la cultura europea que se han añadido a su vida, fundamentalmente prehispánica.

I.1.3 LA MEDICINA TRADICIONAL EN EL ESTADO DE CHIAPAS.

La Medicina Tradicional es un conjunto de conocimientos y prácticas generados en el seno de la comunidad, transmitidos de generación en generación y que, basada en un saber fundamentalmente empírico, ofrece e intenta ofrecer soluciones a las diversas manifestaciones de la enfermedad, buscando propiciar la salud de la comunidad (Holland, R. W. 1989).

Este acervo de conocimientos, forma parte de la cultura popular y por lo tanto está sujeto a los cambios y desarrollo de la misma. En muchas ocasiones se ha creído que la medicina tradicional es un fenómeno pasivo, un legado antiguo que proviene de culturas indígenas (particularmente maya y azteca) y permanece como patrimonio cultural de la comunidad sin alteraciones, dándole a esta idea la connotación de antigüedad o de reliquia. Sin embargo, la realidad nos muestra que, por el contrario, la medicina tradicional o popular se ha ido modificando bajo la influencia de los cambios que la propia cultura popular ha sufrido en los distintos períodos históricos. Así, en la actualidad, las prácticas curativas que ejercen las comunidades en el Estado de Chiapas son el resultado de la combinación de conceptos y recursos de origen muy remoto con otros heredados del período colonial y otros más procedentes de la medicina contemporánea (Estrada, L.E. 1992).

La cultura indígena posee una visión propia del mundo, de la vida y de la naturaleza; interpretación que se fundamenta en antiquísimos principios filosóficos concebidos por sociedades autóctonas de Mesoamérica y posteriormente influen-

ciados por la cultura occidental a partir de la conquista española. Los tzotziles, por ejemplo, conciben, en la actualidad, su vida como "una lucha constante entre las fuerzas del bien, representadas por los benevolentes dioses del cielo, y las fuerzas del mal, encarnadas en los dioses o seres sobrenaturales del mundo inferior: mensajeros de la muerte y la destrucción" (Holland, 1978).

El concepto de naturaleza humana para el pueblo Tzotzil tiene dos componentes al primero lo integran los elementos materiales (carne, hueso, víceras, etc.) y al segundo (elemento no material) el espíritu (chu'ulel): Estos dos componentes están dinámicamente relacionados en todo individuo.

Para el tzotzil, el espíritu (chu'ulel) es la fuerza vital de la naturaleza, la energía dinámica presente en el hombre, animales y plantas. Atribuyen a la sangre el carácter de sustancia vital, básica y reconocen en el pulso arterial la expresión material y tangible del espíritu humano. Los indígenas consideran que la relación entre carne y espíritu es dinámica y que muchas cosas que afectan al chu'ulel existe antes del nacimiento de la persona y después de la muerte (Estrada, 1992).

I.1.4 LAS PLANTAS MEDICINALES.

En todo el mundo se observa un renacimiento considerable del interés por las plantas medicinales. Son cada vez más numerosas las personas que, inquietas ante los excesos de las civilizaciones industriales y las amenazas que proyectan

sobre la salud física y moral, recurren a las plantas curativas llevadas por un deseo de reconciliación con la naturaleza, una de cuyas manifestaciones es el interés por la ecología (Lozoya, x. 1982).

La historia del hombre ha registrado que la sabiduría popular ha ido emergiendo de las tinieblas. Muchos de los grandes medicamentos contemporáneos nacieron en el curso de procesos análogos. La mayoría de las plantas de las que se derivan eran conocidas desde la antigüedad más remota. Las efedras, remedios adecuados contra el asma, que proporcionan la efedrina, vienen utilizándose en China por lo menos desde tres mil años antes de Jesucristo. Los grandes analgésicos tales como el beleño, la mandrágora, el opio y el asafoetida, figuran en las farmacopeas más antiguas, que datan de las épocas sumeria y babilónica, porque mucho antes de aprender a curar las enfermedades, la facultad de aliviar el dolor fue, sin duda, el primer éxito señalado de la medicina.

Con el descubrimiento de América y de la ruta marítima de las Indias se incorporan otras plantas y especies medicinales a las antiguas farmacopeas occidentales, contribuyendo a enriquecer el vasto catálogo que es usado por la medicina contemporánea.

A partir del siglo XIX evolucionan las pautas de utilización de las plantas medicinales. El empleo terapéutico de la planta o de sus preparados se cambia por el uso de los constituyentes bioactivos que contienen. Las ideologías productivistas de las nacientes sociedades industriales revolu-

cionan a fondo, durante esa época, la imagen tradicional de la naturaleza que solo representa un depósito de materias primas, un caudal aprovechable, y el hombre moderno se comporta a este respecto como un administrador egoísta e incluso como un explotador (Estrada, L. 1992).

En la etapa siguiente, la sustancia bioactiva es reproducida mediante síntesis total por los profesionales de la química, que la reproducen. Desaparece, pues, todo interés por la planta al dejar de ser ésta necesaria para fabricar las sustancias que contiene. Inspirándose, en fin, en la estructura de estas sustancias se sintetizan otras por modificación de la molécula original; se ensayan sus efectos y se fabrican series cada vez más numerosas de medicamentos sintéticos (Estrada, L. 1992).

A veces se ha ido tan lejos por ese camino que se olvida que tal o cual preparado moderno puramente químico tuvo en el inicio de su historia un "antepasado" vegetal que surtía efectos semejantes. De esta manera, se lanzaron al mercado numerosísimas moléculas sintéticas en base a los principios activos de las plantas medicinales.

El hombre no cesa de fabricar nuevos compuestos que no existen en la naturaleza y que representan su "química particular" y cuyos riesgos para el equilibrio del medio natural y humano son evidentes. Estamos, en efecto, ante el fenómeno de la contaminación del medio ambiente, pero también ante el de la contaminación medicamentosa, con el enorme problema del consumo cada vez mayor de fármacos por personas sanas.

Como quiera que sea, aumenta el número de los que --- piensan con angustia en lo que acaecerá si prosigue a este ritmo la evolución industrial "indiscriminada" basada en la producción y el consumo cada vez mayores de sustancias nuevas. Ello explica el inmenso movimiento de retorno a la naturaleza, manifiesto en todas partes y en particular en torno a las plantas medicinales. Por ese motivo, la producción y el consumo de plantas medicinales a nivel mundial son muy elevados, a la par que se desarrolla un vasto movimiento de opinión pública en pro de formas terapéuticas nuevas, menos agresivas, menos peligrosas para el organismo.

Pero si hoy queremos romper con los abusos de la civilización química, y recrear o inventar una terapéutica nueva que reconcilie al hombre con su entorno natural, habría que aclarar las relaciones entre ciencia y el empirismo; entre los médicos y los curanderos, es necesario reconciliar cuanto antes estas dos ramas del saber, y en ello reside el interés de las investigaciones que apoya la Organización Mundial de la Salud y que poco a poco impulsan a cada país a investigar desde la base sus propios recursos terapéuticos, entre los cuales las plantas medicinales siguen desempeñando una función dominante (Berlín, B. 1990).

Otra dirección fructuosa de la labor investigadora es la exploración metódica de grupos botánicos, géneros o familias ricos en principios activos. Sirve de guía, en este caso, el

razonamiento analógico de que si una cierta especie contiene una sustancia determinada, es probable que una especie relacionada la posea también. Existe, por decirlo de algún modo, un "espíritu familiar" y cada familia se especializa en una bioquímica propia.

Las investigaciones en materia de plantas medicinales se desarrollan con mucho vigor en el mundo entero. Es alentador el vivo interés que los países en desarrollo muestran actualmente por sus fármacos tradicionales. Bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud, procuran satisfacer con recursos propios sus necesidades en la esfera de la salud, aprovechando en lo que tienen de válido las tradiciones milenarias de sus civilizaciones y reduciendo a lo estrictamente indispensable las costosas importaciones de medicamentos extranjeros, cuya superioridad no siempre es evidente. Hoy, como ayer, las plantas medicinales son un campo muy vasto, abierto a la investigación y al progreso de la medicina (Pelt, J.M. 1979).

I.1.5 PLANTAS MEDICINALES DE LOS ALTOS DE CHIAPAS.

La existencia de la medicina tradicional en las comunidades indígenas de las zonas marginadas del Estado de Chiapas no es un fenómeno accidental ni fortuito. Arraigada a las culturas autóctonas, esta medicina (practicada por yerberos, curanderos, pulsadores, parteras y población en general), afronta el tratamiento de diversas dolencias con mayor o menor

éxito como resultado de una realidad cultural que no podemos ignorar. De una manera u otra, para la mayoría de las comunidades indígenas esta medicina ha sido la única alternativa para resolver sus problemas de salud (Lozoya, X., Zolla, C., Aguilar, A., 1982).

Si bien es cierto que la comunidad y los practicantes de la medicina tradicional reconocen las limitaciones de su terapéutica, en infinidad de casos la herbolaria popular constituye un recurso eficaz, y a veces único, al cual se ha recurrido durante siglos.

Como recursos importantes con los que cuenta la medicina tradicional de los Altos de Chiapas se encuentran:

- Plantas medicinales (empleadas como emplastos, ingeridas en forma de infusiones, etc., ó usadas con fines exclusivamente rituales).
- Productos Animales (grasas, cálculos renales y biliares de diversos ruminantes, pieles, etc.).
- Fármacos (ungüentos, antibióticos, laxantes, anti-piréticos, vitaminas, etc.).

A continuación, se muestra un análisis de las medicinas herbolarias más utilizadas en los Altos de Chiapas:

(Holland, R.W., 1989).

Nombre Tzotzil	Nombre Español	Nombre Latino	Comentario
1 akubal us		<u>Stevia salicifolia</u>	puede ser un agente dulcificador.
2 alalats			
3 ch'a'il vomol	chichipate	<u>Eupatorium sp.</u>	
4 ch'a'il vomol	hoja amarga		
5 ch'ich bot	sangre de drago	<u>Croton draco</u>	
6 chijilté	saúco	<u>Sambucus mexicana</u>	
7 ch'it	nuez moscada		
8 ch'ulelal vomol	te lajerio	<u>Saponaria officinalis</u>	provoca ataxia, disminución de la actividad motriz.
9	durazno	<u>Prunus persica</u>	
10 granata	granadilla		provoca ataxia, disminución de la actividad motriz.
11	hinojo	<u>Foeniculum vulgare</u>	
12 kanal chishté	manzanilla	<u>Crataegus pubescens</u>	

	Nombre Tzotzil	Nombre Español	Nombre Latino	Comentario
13	kashlan chupak	higuerilla	<u>Ricinus communis</u>	
14	koko'on	epazote	<u>Chenopodium ambrosioides</u>	antihelmíntico
15	kush peul	soa	<u>Solanum torvum</u>	
16	lula	ruda	<u>Ruta chulepensis</u>	alcaloides pre- sentes, ninguna actividad
17	makom bet	mora	<u>Rubus idaeus</u>	
18		manzana	<u>Malus pumila</u>	
19		membrillo	<u>Cydonia oblonga</u>	
20	mesté		<u>Bacharis vaccinides</u>	
21	mui	bobotabaco	<u>Nicotiana tabacum</u>	tabaco de fu- mar
22	nap shuch			provoca ataxia, disminución de la actividad motriz
23	on té	madron		provoca ataxia, disminución de la actividad motriz

Nombre Tzotzil	Nombre Español	Nombre Latino	Comentario
24 pen ku lum	berbena	<u>Verbena officinalis</u>	
25 poshil obal		<u>Brunella vulgaris</u>	disminuye la actividad del sistema nervioso central
26 poshil saltsi			
27 pos lu mal vomol			
28 potoj	guayaba	<u>Psidium guayava</u>	escasa actividad del sistema nervioso central
29 poy té	hierba de zorro	<u>Achyranthes aspera</u>	
30 sak pat			
31 sembrillo	siempreviva	<u>Semprevivum tectorum</u>	provoca ataxia, disminución de la actividad motora
32 shashim	timbre	<u>Acacia angustissima</u>	
33 soyon chuch	mata palo		
34 suk	quebracha	<u>Acacia millenaria</u>	
35 tsis uch	laurel	<u>Litsea sp.</u>	contiene veneno tetánico

	Nombre Tzotzil	Nombre Español	Nombre Latino	Comentario
36	tuil vomol	valeriana	<u>Valeriana mexicana</u>	
37	tul nichim	hierbabuena	<u>Mentha piperita</u>	
38	wala shik			
39	yashal nich vomol			provoca ataxia, disminución de la actividad motriz

Una planta medicinal que no se menciona en el análisis anterior, pero que es muy utilizada por los indígenas de los Altos de Chiapas, para dolor y hemorragia después del parto, es la que se conoce con el nombre vulgar de Thuis jovel o Thuis vomol, se clasifica científicamente dentro de la familia IRIDACEAE, pertenece al género Sisyrinchium y a la especie scabrum.

I.2 GENERALIDADES DE LA FAMILIA IRIDACEAE.

I.2.1 ASPECTOS BOTANICOS DE LA FAMILIA.

La Familia Iridaceae, pertenece a la Familia Vegetal de las Angiospermas, plantas leñosas y herbáceas; trepaderas con semilla encapsulada. Son plantas Monocotiledóneas ya que poseen un embrión con un cotiledón. Se encuentran, tanto en regiones tropicales, como en regiones templadas.

Son hierbas perennes (rara vez herbáceas anuales o plantas subarborescentes), con frecuencia con porciones subterráneas engrosadas a modo de rizomas, bulbos o raíces carnosas; las hojas son por lo general equitantes y dísticas, variando de filiformes a ensiformes o linearlanceoladas; flores solitarias o en fascículos, hermafroditas; 3 estambres, anteras biloculares; ovario ínfero; fruto en forma de cápsula trivalva; semillas por lo común numerosas en 1 ó 2 hileras en cada lóculo.

Se calculan entre 55 y 80 géneros con 1000 a 1500 especies de amplia distribución. Esta familia tiene importancia desde el punto de vista ornamental; pertenecen aquí los "lirios" (*Iris* spp.) y los "gladiolos" (*Gladiolus* spp.), ambos géneros con numerosas especies, variedades, formas e híbridos, son plantas de flores vistosas de las más populares (Rzedowski, J. 1990).

I.2.2 ASPECTOS FITOQUIMICOS DE LA FAMILIA.

Entre los metabolitos secundarios encontrados en la Familia Iridaceae, se encuentran (Trease-Evans, 1991):

1. Quinonas (naftaquinonas y antraquinonas).
2. Cetonas Aromáticas (como en el género Iris).
3. Pigmentos carotenoides (como en el azafrán).
4. Terpenoides (mono-, sesqui-, di-, y tetra- terpenoides).
5. Flavonoides (antocianinas, flavonas, flavonoles e isoflavonas).

A pesar que esta familia cuenta con alrededor de 1500 especies, únicamente, desde el punto de vista fitoquímico se han estudiado un número muy reducido de ellas.

En la siguiente tabla, se muestran los diferentes compuestos aislados de algunas especies de ésta familia que han sido estudiadas químicamente (Tabla 1).

Tabla 1. COMPUESTOS AISLADOS DE LA FAMILIA IRIDACEAE.

Especie Vegetal	Compuestos aislados	Parte de la planta estudiada.	Referencias
<u>Crocus reticulatus</u>	<p>C-Glicosidos:</p> <p>I. 8-C- (O-L-rhamnosil-O-D-glucosil)-β-D-glucopiranos. (1)</p> <p>II. 8-C-β-D-glucopiranos. (2)</p>	Hojas	Sergeeva, N.V. 1977.
<u>Eleutherine americana</u>	<p>Antraquinonas:</p> <p>I. Metil ester del ácido 3,4,8-trihidroxi-1-metil-antra-9,10-quinon-2-carboxílico. (3)</p> <p>Tres compuestos aromáticos:</p> <p>1. Eleuterol (4)</p> <p>2. Eleuterina (5)</p> <p>3. Isoeleuterina (6)</p>	Bulbos	Hajime Kamura, Kohsei M., Hiroyuki M., Hui zhu H., 1983.

Tabla 1. COMPUESTOS AISLADOS DE LA FAMILIA IRIDACEAE (cont.)

Especie Vegetal	Compuestos aislados	Parte de la planta estudiada.	Referencias
<u>Iris ensata</u>	I. C-Glicósido. 4',7-di-O-metilapi- genin 6-C-(O-β-D-glu- copiranosil-L-ramnosa. (7) II. Acidos fenólicos. (8)	Epigeo	Blinova, K.F., Glyzin, V.I. y Pryakhina, N.I. 1977. Pryakhina, N.I. y Blinova, K.F. 1979
<u>Iris florentina</u>	I. 1,3,5,6-tetrahidroxi- xantona-2-C-glucósido (9) II. Isomangiferin. (10) III. Mangiferin. (11) IV. 1,3,6-trihidroxi-7- metoxixantona-2-C-β- D-glucopiranosido(7- O-metilmangiferin). (12) V. 1,3,6-trihidroxi-7- metoxixantona-4-C-β- D-glucopiranosido(7-0 -metilisomangiferin). (13)	Hojas y Raíz.	Fujita, M., Inove, T. 1981.

Tabla 1. COMPUESTOS AISLADOS DE LA FAMILIA IRIDACEAE (cont.)

Especie vegetal	Compuestos aislados	Parte de la planta estudiada.	Referencias
<u>Iris florentina</u>	VI. Swertisin. (14) VII. Isoswertisin. (15) VIII. Isoswertiajaponin. (16)	Hojas y Raíz.	Fujita, M., Inove, T. 1981.
<u>Iris germanica</u>	Dos Triterpenoides: I. ω -Irigermanal (1a) γ -Irigermanal (1b) (17) II. Iridogermanal. (18) Tres Isoflavonoides: I. 5,3'-dihidroxi-4'-5'-dimetoxi-6,7-metilen-dioxi-isoflavona. (19) II. 5-hidroxi-6,4'-dime-toxi-isoflavona-7-glucosido. (20) III. 5,3'-dihidroxi-4',5'-dimetoxi-isoflavona-7 glucosido. (21)	Raíz. Raíz.	Marner, F.J.; Krick, W.; Gellrich, B.; Jaenicke, L.; Winter W. (1982) Ali, A.A.; El-Emary, N.A.; El-Moghazi, M. A.; Darwish, F.M; Frahm, A.W. 1983.
<u>Iris hollandica</u>	Plastoquinona. (22)	Bulbos y Hojas.	Etman-Gervais, Claudine. 1976.

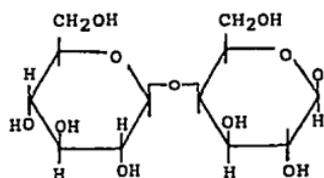
Tabla 1. COMPUESTOS AISLADOS DE LA FAMILIA IRIDACEAE (cont.)

Especie vegetal	Compuestos aislados	Parte de la planta estudiada.	Referencias
<u>Iris lactea</u>	I. 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona 6-C- [O-(2-acetil- α -L-rhamnopyranosil)-(1-2)-x-acetil- β -D-glicopiranosido] (diacetilembinina). (23)	Partes aereas.	Pryakhina, N.I.; Sheichenko, V.I.; Blinova, K.F. 1984.
	II. 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona 6-C- [O-(2-acetil- α -L-rhamnopyranosil)-(1-2)-D-glicopiranosido] (acetilembinina). (24)		
<u>Iris milesii</u>	I. 5,6,7,4'-tetrahidroxi 8-metoxi-isoflavona. (25)	Rafz.	Agarwal, V.K.; Thapp R.K.; Agarwal, S.G.; Dhar, K.L. 1984.
<u>Iris missouriensis</u>	I. 6 α -acetoxil-2 β -hidroxil 6 22-eno. (26)	Rafz.	Wong, Sui Ming; Pezzuto, J.M.; Fong, H. Farnswart, N. 1986.

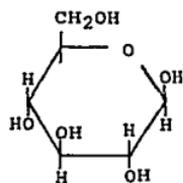
Tabla 1. COMPUESTOS AISLADOS DE LA FAMILIA IRIDACEAE (cont.)

Espece Vegetal	Compuestos aislados	Parte de la planta estudiada.	Referencias
<u>Iris nepalensis</u> D.	4'-hidroxi-5-metoxi-6,7 metilendioxi-isoflavona. (27)	Raíz.	Matsumoto, Fukui. 1965.
<u>Iris tingitana</u>	I. 5,4'-dimetoxi-6-7-metilendioxi-isoflavona. (28) II. 5,4'-dimetoxi-3'-hidroxi 6,7-metilendioxi-isoflavona. (29)	Bulbos frescos.	El-Emary, Nasr A; Kobayashi, Y; Ogi-hara, Y. 1980.
<u>Iris unquicularis</u>	5,8-dihidroxi-4'-metoxi-6,7--metilendioxi-flavona. (30)	Raíz.	Arisawa, M.; Morita, N. 1976.

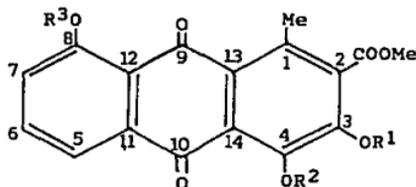
A continuación se muestran las Estructuras aisladas de la Familia Iridaceae :



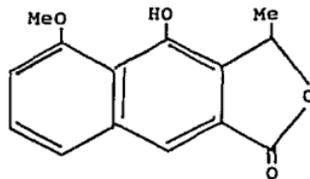
(1)



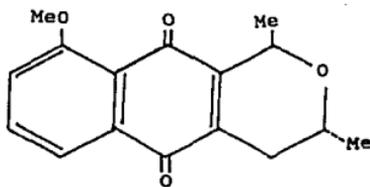
(2)



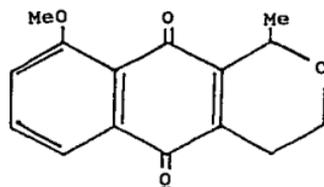
(3)



(4)



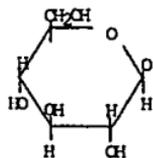
(5)



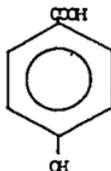
(6)

Figura 1. Estructuras químicas de los compuestos químicos aislados de la Familia Iridaceae.

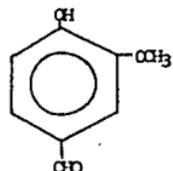
Acidos fenólicos:



(7)

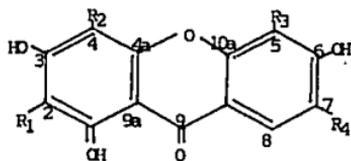
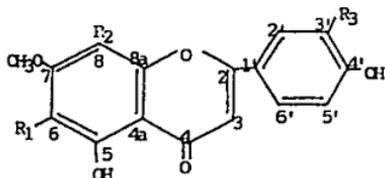
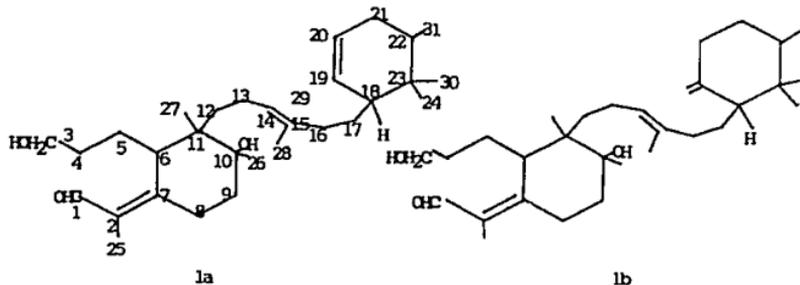


p-hidroxi benzoico



vainillina

(8)

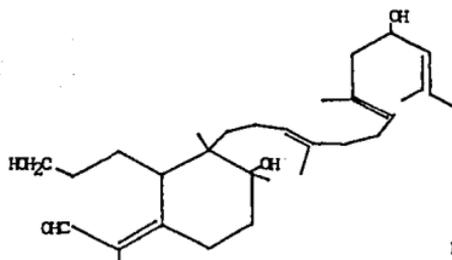
(9) $R_1 = \text{Glc}, R_2 = R_4 = \text{H}, R_5 = \text{OH}$ (10) $R_1 = R_3 = \text{H}, R_2 = \text{Glc}, R_4 = \text{OH}$ (11) $R_1 = \text{Glc}, R_2 = R_3 = \text{H}, R_4 = \text{OH}$ (12) $R_1 = \text{Glc}, R_2 = R_3 = \text{H}, R_4 = \text{OCH}_3$ (13) $R_1 = R_3 = \text{H}, R_2 = \text{Glc}, R_4 = \text{OCH}_3$ (14) $R_1 = \text{Glc}, R_2 = R_3 = \text{H}$ (15) $R_1 = R_3 = \text{H}, R_2 = \text{Glc}$ (16) $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{Glc}, R_3 = \text{OH}$ 

1a

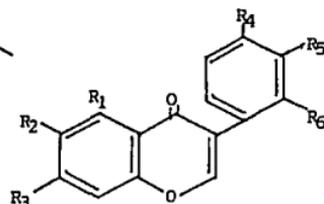
1b

(17)

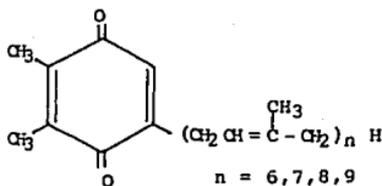
Figura 1 Estructuras químicas de los compuestos químicos aislados de la familia Iridaceae (cont.)



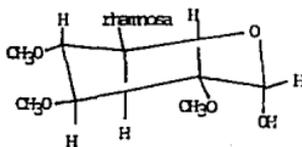
(18)



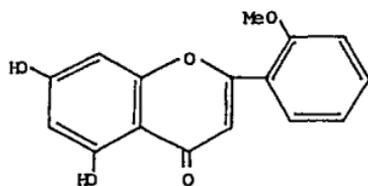
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
(19)	CH	-O-CH	-O	CH	OMe	OMe
(20)	CH	OMe	OGlc	H	OMe	H
(21)	CH	H	OGlc	CH	OMe	OMe



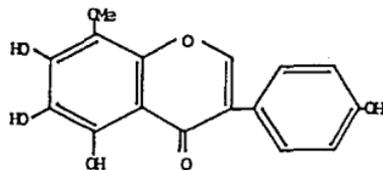
(22)



(23)

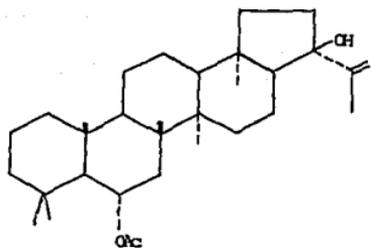


(24)

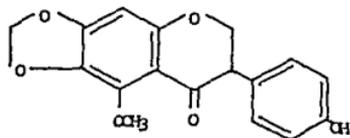


(25)

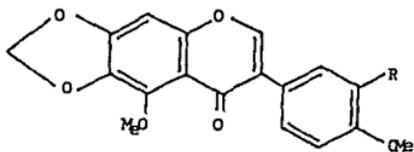
Figura 1. Estructuras químicas de los compuestos químicos aislados de la familia Iridaceae (cont.)



(26)

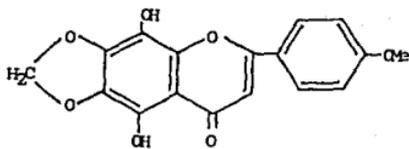


(27)



(28) R = H

(29) R = OH



(30)

Figura 1. Estructuras químicas de los compuestos químicos aislados de la familia Iridaceae (cont.)

I.2.3 ASPECTOS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA FAMILIA.

Se han efectuado pruebas del potencial biológico en algunas especies de la Familia Iridaceae, así tenemos que de una planta cultivada en China conocida como Eleutherine americana, de uso ornamental y medicinal, sus bulbos rojos se usan para el tratamiento de enfermedades cardíacas, especialmente en desordenes coronarios; también se reporta que tres compuestos aromáticos aislados de esta especie denominados Eleuterol, Eleuterina e Isoeleuterina actúan como vasodpresores en el corazón del cerdo de Guinea (Komura, H.; Mizukawa, K.; Minakata, H. 1983).

En Alemania, de la raíz de Iris germanica, se obtienen principios aromáticos utilizados en la preparación de perfumes y cosméticos con fragancia de violetas dulces (Marner, F. J.; Krick, W.; Gellrich, B. y Jaenicke, L. 1981).

La especie conocida como Iris missouriensis, que se cultiva en Norte América, se utiliza por los indios americanos con propósitos medicinales no especificados. Sin embargo, existen reportes de que la planta tiene potencial antitumoral y anticancerígeno (Wong, S.; Pezzuto, J.W.; Fong, H.; Farnsworth, N.; 1986).

En México son utilizadas como plantas curativas otras especies de la Familia Iridaceae, las cuales se encuentran reportadas en las Monografías Científicas I y II editadas por José Luis Díaz (IMEPLAM) 1976 (Tabla 2).

La especie Sisyrinchium scabrum, es utilizada para el dolor y hemorragia después del parto, por los indígenas Tzotziles de los Altos de Chiapas. La parte de la planta utilizada, es la raíz y se administra por vía oral.

En la siguiente Tabla se muestran algunas plantas mexicanas pertenecientes a la Familia Iridaceae que tienen uso terapéutico.

Tabla 2. Plantas mexicanas pertenecientes a la Familia Iridaceae que tienen uso terapéutico (Díaz, J.L. 1976. Vol. I y II).

Nombre Científico		Nombre Vulgar	Usos	Vía de Administración	Parte usada	
Género	Especie	Familia				
<u>Crocus</u>	<u>sativus</u>	Irida	Azafrán	Antiespasmódico Aperitivo	Oral	&
			Azafrán oficinal.	Carminativo Condimento Diurético Emanagogo	& Oral " "	Flor " & Flor/Planta entera.
				Eupéptico	"	"
				Excitante	"	&
				Sedante	"	&
<u>Iris</u>	<u>florentina</u>	Irida	Lirio Blanco	Catártico	Oral	Raíz
			Lirio de Florencia.	Cauterizante Diaforético Expectorante	Tópica Oral "	Raíz " "
<u>Iris</u>	<u>germanica</u>	Irida	Lirio de Florencia.	&	&	Raíz

& = No hay información.

Tabla 2. Plantas mexicanas pertenecientes a la Familia Iridaceae que tienen uso terapéutico (Díaz, J.L. 1976. Vol. I y II). (cont.)

Nombre Científico		Nombre Vulgar	Usos	Vía de Administración	Parte usada	
Género	Especie	Familia				
<u>Iris</u>	<u>pallida</u>	Irida	Lirio de Florencia.	&	&	
<u>Tigridia</u>	<u>dugesii</u>	Irida	Cacomite	&	&	
<u>Tigridia</u>	<u>pavonia</u>	Irida	Cacomite	Antipirético	Oral	Raíz
			Flor de Tigre	Enfermedades Exantemáticas.	"	"
			Ocaloxochitl	Favorece Fecundidad.	"	"
				Expectorante.	"	"

& = No hay información.

I.3 GENERALIDADES DEL GENERO SISYRINCHIUM.

I.3.1 ASPECTOS BOTANICOS DEL GENERO.

Son plantas herbáceas, anuales o perennes; tienen raíces fibrosas, más o menos engrosadas y con frecuencia carnosas, a veces con rizomas rastreros también presentes; hojas dísticas, graminoides, lineares o ensiformes; tallos florales foliosos, bracteados o desnudos, cilíndricos, cuadrangulares o más o menos comprimidos, hasta alados; espatas 1 a numerosas, conteniendo 2 a muchas flores, pero por lo común una sola abierta por espata; tépalos subiguales, por lo general unidos muy en la base, a menudo con venas longitudinales manifiestas; estambres insertos en la base del perianto, filamentos libres o con más frecuencia unidos en un tubo estaminal más o menos largo, anteras a menudo versátiles, derechas, curvadas a retorcidas; ovario ovoide a globoso, pubescente, ramas del estilo delgadas; cápsulas en ocasiones con la superficie irregular por la presión interna de las semillas, globosas a elipsoides, a veces angulosas, hasta un poco aladas, pubescentes; semillas casi siempre numerosas y pequeñas, angulosas, subglobosas o cóncavo convexas.

Género americano de regiones templadas y tropicales. Algunos autores calculan entre 30 y 125 especies, otros prefieren admitir un número "incierto" de especies, ya que se trata de un género sumamente complicado que requiere aún de un serio estudio crítico.

En relación con lo anterior, se ha llegado a la con--

clusión de que en el Valle de México existen 10 especies de Sisyrrinchium, de las cuales 4 no habían sido registradas anteriormente para la región. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos hechos en cuanto a revisión de plantas, en el campo, en los herbarios, así como en la bibliografía existente, el resultado final se considera apenas tentativo y en muchos casos han quedado dudas en relación con los límites reales de una especie dada y en otras ocasiones en lo que se refiere a la aplicación correcta de los nombres (Rzedowski, J. 1990).

I.4 GENERALIDADES DE LA ESPECIE Sisyrinchium scabrum.

I.4.1 ASPECTOS BOTANICOS DE S. scabrum.

Es una planta herbácea perenne, por lo general escabrosa, de 10 a 20 cm de alto; tiene raicillas numerosas, fibrosas, delgadas, en la base del tallo se aprecian fibrillas dirigidas hacia la parte superior; tallos por lo general saliendo varios desde la base, aplanados; hojas en su mayoría basales, estrechamente lanceolado-ensiformes, desiguales entre sí, de 4 a 10 cm de largo por alrededor de 1 a 2 mm de ancho; espatas 1 o 2 por tallo, conteniendo 1 a 4 flores, de 1 a 1.5 cm de largo; flores sobre pedicelos filamentosos, hasta de 5 mm de largo, alargándose en el fruto; perianto azul a morado, a veces blanquecino, de 1.5 a 2 cm de diámetro, con una mancha amarilla alargada en la parte basal media de cada tépalo, éstos unidos muy en su base, con el ápice redondeado o más frecuentemente bidentado y con un apículo de \pm 1 mm de largo; filamentos de unos 2.5 mm de largo, unidos en toda su longitud, anteras amarillas, oblongas, de \pm 1 mm de largo; ovario pubescente; fruto piloso, globoso o subgloboso, algo anguloso, de unos 3 o 4 mm de largo por \pm 3 mm de grosor; semillas negras, subhemisféricas, cóncavo-convexas, de \pm 1 mm de diámetro (Figura 2).

Es una planta que se encuentra ampliamente distribuida en las elevaciones del Valle de México, en altitudes que varían entre 2450 y 3350 m; en variados habitats, desde matorrales y pastizales hasta bosques de encino y de coníferas, con frecuencia en lugares perturbados, a veces como maleza. (¿Norte?) cen

tro de México, de San Luis Potosí, Guanajuato y Michoacán a Puebla, Veracruz y Oaxaca, Chiapas.

A esta especie se le ha venido llamando con frecuencia S. angustifolium Mill., taxón diferente que habita en el suroeste de Canadá centro y este de Estados Unidos. De cualquier manera, no queda aún clara la separación de S. scabrum de otros miembros del complejo "angustifolium", por lo que se requiere de un estudio más profundo en este grupo (Rzedowski, J. 1990).

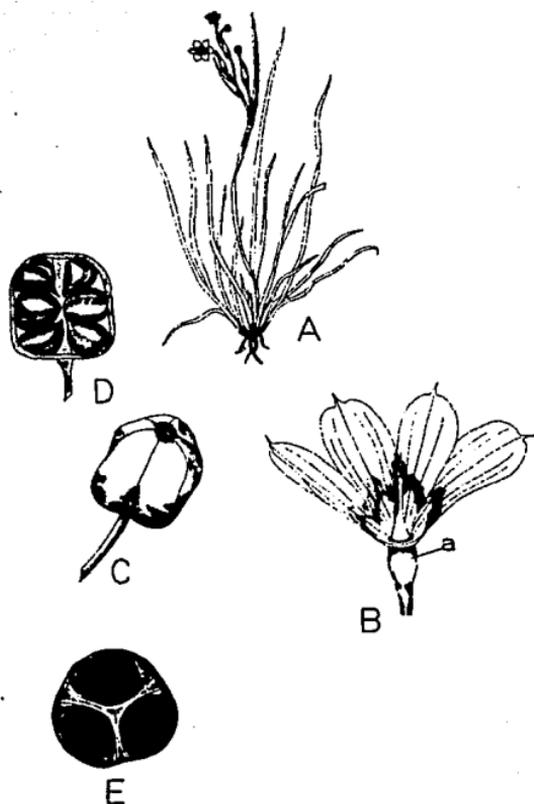


Figura 2. *Sisyrinchium scabrum* : A. aspecto general de la planta x 0.4; B. flor desprovista de dos tépalos x 4, a. ovario; C. fruto x 6; D. corte longitudinal del fruto x 7; E. corte transversal del fruto x 8.

II METODOLOGIA

II.1 MATERIAL VEGETAL.

Las raíces de una población de Sisyrinchium scabrum fueron recolectadas de una región conocida con el nombre de Los Altos de Chiapas localizada cerca de San Cristóbal de las Casas, en el Estado de Chiapas.

La planta se recolectó a una altura de 2210 metros, el día 26 de agosto de 1991. Las raíces de Sisyrinchium scabrum, fueron enviadas a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, por la Organización de Médicos Indígenas del Estado de Chiapas (OMIECH) para su identificación y clasificación, lo cual fué realizado por la Dra. Concepción Rodríguez Jiménez, investigadora del departamento de Botánica de la E.N.C.B., y posteriormente enviada a la sección de Fitoquímica (Departamento de Farmacia) a cargo de la M. en C. Ma. de Lourdes Hernández de Jesús para su Análisis. Una muestra de herbario se encuentra depositada en el Herbario de la E.N.C.B. del IPN y en el Jardín Botánico de la UNAM.

II.2 EXTRACCION Y PURIFICACION DE LOS CONSTITUYENTES MAYORITARIOS DE LA RAIZ DE Sisyrinchium scabrum.

II.2.1 ANALISIS PRELIMINAR.

Aproximadamente 10 g de raíces secas y previamente molidas en un molino de cuchillas, modelo Wiley 4; se colocan

en pequeños matraces, uno por cada disolvente a utilizar y se someten a maceraciones sucesivas con Hexano (C_6H_{14}), Metanol (MeOH), Cloroformo ($CHCl_3$) y Acetato de Etilo (AcOEt), durante 5 días. Posteriormente el extracto se filtra y se evapora a presión reducida a sequedad, proporcionando un extracto por cada disolvente.

Se realizan las evaluaciones biológicas preliminares de cada uno de los extractos determinando el efecto tóxico letal contra el crustáceo Artemia salina (Leach) (Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E. 1982). Así mismo, se efectúa la evaluación de la actividad antimicrobiana, mediante el método de Difusión en Agar (Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., 1982), así como el desarrollo cromatográfico en capa fina de los residuos orgánicos obtenidos.

II.3 EXTRACCION.

3.0 Kg de raíces, se fragmentan en un molino de cuchillas (modelo Wiley 4) y el polvo obtenido se somete a maceración con Acetato de Etilo (AcOEt) durante 5 días. Posteriormente, el disolvente de extracción se filtra y se evapora a presión reducida, proporcionando un extracto total de 48 g.

Se realiza el análisis del extracto total mediante Cromatografía en Capa Fina (C.C.F.), evaluaciones biológicas de la actividad antimicrobiana (Método de Difusión en Agar) y la Citotoxicidad contra el crustáceo Artemia salina (Leach). Posteriormente se procede a realizar el Análisis Fitoquímico preliminar del extracto total (AcOEt), mediante su fracciona-

miento Cromatográfico en Columna y la evaluación Espectroscópica del compuesto ó compuestos purificados.

Cabe mencionar, que los Métodos de Evaluación de la Actividad Antimicrobiana y Evaluación de la Actividad Citotóxica, se emplean por su bajo costo, además de que se ha comprobado su factibilidad para obtener principios activos en tiempos cortos. En el bioensayo de la Toxicidad contra el crustáceo Artemia salina (Leach), se ha demostrado que tiene cierta correlación con otras actividades más complejas como la citotóxica, antihelmíntica y antipalúdica.

II.3.1 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO TOTAL POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA.

El extracto orgánico (AcOEt) total, preparado a partir de las raíces de S. scabrum, se somete al proceso de extracción previamente descrito (Sección II.3) para el aislamiento de sus constituyentes, proporcionando un residuo orgánico.

La purificación de este residuo orgánico se lleva a cabo mediante cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyentes distintas mezclas para cambiar la polaridad. De esta forma se obtuvieron distintas fracciones (Cuadro 1). Se utilizaron 40.0 g de sílice 60 Merck F₂₅₄, tamaño de partícula 0.063 - 0.200 mm (40.0 g), en donde se adsorvieron 4 g del extracto disuelto en cloroformo.

Cuadro 1. Cromatografía en columna del residuo orgánico obtenido del extracto de AcOEt a partir de las raíces de S. scabrum.

Sistema de Eluyentes	Proporción	Fracciones Colectadas	Eluatos Combinados
C ₆ H ₁₄		1 - 57	1 - 19
C ₆ H ₁₄ -AcOEt	95 : 5	58 - 94	69 - 91
C ₆ H ₁₄ -AcOEt	90 : 10	95 - 162	97 - 155
"	80 : 20	163 - 250	163 - 250
"	70 : 30	251 - 327	251 - 327
"	60 : 40	328 - 346	335 - 341
"	50 : 50	347 - 363	347 - 363
AcOEt		364 - 373	364 - 373

II.4 ANALISIS MEDIANTE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

II.4.1 PREPARACION DE PLACAS CROMATOGRAFICAS.

Se utilizaron cromatoplacas de vidrio de 20 x 20 cm, cubiertas de gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck), para las purificaciones a nivel preparativo. El gel de sílice, se preparó disolviendo 30 g de sílice en 60 ml de agua destilada y se aplicó sobre placas de vidrio de manera uniforme con una capa de 0.2 mm de grosor. Las placas se secan por una hora a 120°C y, para activarlas una vez frías y secas, se sometieron a calentamiento de 105°C durante 30 minutos.

Como eluyentes utilizados para la separación de los constituyentes presentes en los extractos, se emplearon diferentes mezclas de disolventes (Cuadro 2).

II.4.2 REVELADORES Y REACCIONES PARA IDENTIFICACION.

La purificación de los compuestos y el desarrollo de las reacciones se monitorea por cromatografía en capa fina con placas comerciales conteniendo gel de sílice Merck F₂₅₄, antes de revelar, se observa primero con luz ultravioleta para localizar el frente del eluato y posteriormente revelar con sulfato cérico al 1 % en ácido sulfúrico 2 N.

Cuadro 2. Cromatografía en Capa Fina del extracto de acetato de etilo obtenido de las raíces de S. scabrum.

Sistema de Eluyentes	Proporción	No. de placas preparativas de vidrio	No. de placas preparativas Merck F254
Hexano-AcOEt	95 : 5	40	10
"	90 : 10	20	5
"	80 : 20	10	5
"	70 : 30	6	4
"	60 : 40	5	3
"	50 : 50	5	3

II.5 ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO (METODOLOGIA).

Del Extracto de Acetato de Etilo (E.1), se toma una porción para realizar los ensayos fitoquímicos siguientes:

II.5.1 IDENTIFICACION DE AZUCARES.

Una muestra del residuo orgánico (E.1) se diluye con agua destilada, se mide el pH y se agrega hidróxido de sodio al 5 % para alcalinizar. El extracto se divide en dos tubos.

1. Reacción de Fehling :

A 0.5 ml del extracto alcalino se le adiciona 0.5 ml de la solución A y 0.5 ml de la solución B.

2. Reactivo de Benedict :

0.5 ml del extracto alcalino se mezclan con 0.5 ml de reactivo y 1 ml de agua.

3. Se prepara un blanco para cada reactivo. Los 3 tubos se colocan en un baño maría por 15 minutos.

Si los azúcares se encuentran presentes se forma un precipitado de color naranja a rojo ladrillo en ambas pruebas.

II.5.2 IDENTIFICACION DE CUMARINAS.

1. Reacción de Erlich :

Se coloca una pequeña porción del residuo orgánico (E.1) en una placa de muesca, se añaden dos gotas de reactivo y una gota de ácido clorhídrico concentrado.

2. Reacción con hidróxido de amonio :

A una porción del extracto concentrado se añaden 0.5 ml de etanol más dos gotas de hidróxido de amonio concentrado. Se observa una fluorescencia azul-violeta, si se encuentran presentes las cumarinas.

II.5.3 IDENTIFICACION DE GLICOSIDOS CARDIACOS.

En una cápsula de porcelana con extracto (E.1) se agrega 3 ml de una mezcla cloroformo-metanol (E.2), se concentra a la tercera parte de su volumen original y se divide en tres muestras para realizar las siguientes pruebas :

1. Reacción de Legal :

En una placa de muescas se colocan 2 gotas del extracto (E.2) dejando evaporar completamente el disolvente se agregan 3 gotas de piridina, 1 gota de nitroprusiato de sodio al 0.5 % y cuatro gotas de hidróxido de potasio.

Si se encuentran presentes los glicósidos cardíacos, se formará una coloración roja poco estable.

2. Reacción de Baljet :

En la placa de muescas se colocan 2 gotas del extracto (E.2) agregándole 3 gotas del reactivo de Baljet. Se mezcla con 3 gotas de la solución A y 3 gotas de la solución B.

Si están presentes los glicósidos se forman coloraciones que varían del naranja al rojo oscuro.

3. Reacción de Kedde :

Una tira de papel filtro se moja con una gota de reactivo y se deja secar, después se adiciona 1 gota del extracto (E.2). El cambio de color en un rango del azul al violeta indican la presencia de glicósidos cardíacos.

II.5.4 FLAVONOIDES.

Se diluye una porción del extracto (E.1) con 2 ml de etanol y se calienta por 1 minuto; se deja enfriar y se filtra el extracto (E.3). Esta solución se divide en 3 partes en tubos de ensayo, utilizando uno como blanco, y en los otros 2 se efectúan las siguientes reacciones :

1. Reacción de Shinoda :

A uno de los tubos conteniendo 0.5 ml del extracto (E.3) se adicionan 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado, se observa si se presenta algún cambio de coloración comparando contra el tubo testigo. Una coloración roja indica que se encuentran presentes auronas o chalconas. Si no hay cambio, se adiciona un trocito de magnesio metálico, una coloración de naranja a rojo es señal de la presencia de flavonas; rojo si son flavonoles y magenta si son flavononas.

2. Reacción con hidróxido de sodio al 10 % :

Al segundo tubo con extracto (E.3) se le adicionan 3 gotas de hidróxido de sodio al 10 %; si se observa una coloración de amarillo a rojo se considera positiva para xantonas y flavonas; café a naranja para flavonoles; púrpura arojizo

para chalconas, y azul para antocianinas.

II.5.5 QUINONAS.

1. Reacción con hidróxido de amonio :

A una porción de extracto concentrado (E.1) se aña de una gota de hidróxido de amonio concentrado; si presenta una coloración ligeramente rojo se considera que hay presencia de antraquinonas.

2. Reacción de Borntrager :

Se diluye una porción del extracto (E.1) con 3 ml de agua y se filtra. Al líquido filtrado se añaden 3 ml de hidróxido de potasio al 5 %, se calienta a ebullición por 10 minutos, se enfría y se transfiere a un embudo de separación. Se extrae con 5 ml de benceno, la fase acuosa se elimina y la bencénica se extrae con 2 ml de hidróxido de potasio al 5 %; si la fase acuosa alcalina presenta color rojo indica la presencia de quinonas, si es amarillo fluorescente indica que se encuentran antronas.

II.5.6 SESQUITERPENLACTONAS.

1. Reacción con hidroximato férrico :

En una cápsula de porcelana con una porción del extracto (E.1) se adicionan dos gotas de clorhidrato de hidroxilamina 2 N y una gota de hidróxido de potasio 2 N en metanol, esta mezcla se calienta a ebullición por 2 minutos, se enfría

y se acidula a pH de 1 con ácido clorhídrico 0.5 N adicionando una gota de cloruro férrico al 1 %; la formación de coloraciones roja, violeta o rosa se considera positiva.

II.5.7 TANINOS.

Se prepara el extracto (E.4) con una porción del extracto (E.1) y 2 ml de agua, se adicionan 3 gotas de cloruro de sodio al 2 % calentando a ebullición por 1 minuto; posteriormente se enfría y se filtra. El filtrado resultante (E.4) se divide en tres tubos de ensayo para realizar las siguientes pruebas :

1. Reacción con gelatina :

En uno de los tubos con extracto se adicionan dos gotas del reactivo. La formación de un precipitado blanco indicará la presencia de taninos.

2. Reacción con cloruro férrico al 1 %.

En otro tubo con extracto se añade una gota de cloruro férrico al 1 %. La formación de coloraciones de azul a negro indica la presencia de derivados del ácido gálico. Si la coloración es verde se deberá a la presencia de derivados del catecol.

3. Reacción con ferricianuro de potasio.

Al tubo de la prueba 2 se añade una gota de ferricianuro de potasio al 1 %. La formación de una coloración azul comprobará la presencia de compuestos fenólicos.

II.5.8 SAPONINAS.

1. Prueba de la espuma :

Se pesan 0.5 g de la raíz de la planta, se adiciona 1 ml de agua, se calienta y se agita vigorosamente este extracto acuoso. Se mide la altura de la espuma formada, si esta mide de 8 a 10 mm y es estable por 15 minutos se le considera positiva para saponinas.

2. Reacción de Liebermann-Burchard :

Una pequeña porción del extracto (E.1) concentrado se disuelve en dos gotas de anhídrido acético, se estratifica con una gota de ácido sulfúrico concentrado; si se encuentran presentes saponinas esteroidales se forman coloraciones azules o verdes. Las saponinas triterpenoides dan coloraciones rosas, rojo, magenta o violeta.

3. Reacción de Rosenthaler :

Se disuelve una pequeña porción del extracto concentrado (E.1) en dos gotas del reactivo y se añade una gota de ácido sulfúrico concentrado. Si se encuentran presentes saponinas de tipo triterpenoide se forma una coloración violeta.

II.5.9 GLICOSIDOS CIANOGENETICOS.

1. Reacción de Guignard :

Se pesa un gramo de la planta (raíz) y se coloca en un tubo de ensayo, se adicionan 2 ml de agua y se calienta a ebullición colocando en la boca del tubo una tira de papel

filtro impregnado con reactivo de picrato de sodio. La formación de una mancha color rosa al rojo será indicativa de la presencia de éstos glicósidos.

II.5.10 ALCALOIDES.

A 1 g de la planta se adicionan 10 ml de ácido clorhídrico al 10 %, se calienta a ebullición por 5 minutos, se enfría y se filtra, esto se toma como extracto (E.5).

El filtrado claro y transparente (no incoloro) se divide en 6 tubos de ensayo para realizar las siguientes reacciones utilizando uno como blanco :

1. Reacción de Dragendorff :

Añadirle a uno de los tubos con extracto (E.5) una gota de reactivo. Si el extracto contiene alcaloides se forma un precipitado anaranjado.

2. Reacción de Mayer :

Se adiciona una gota del reactivo a otro tubo con extracto (E.5). Si el extracto contiene alcaloides se formará un precipitado blanco a amarillento.

3. Reactivo de ácido silicotungstico :

A otro tubo con extracto (E.5) se añade una gota del reactivo. Si hay alcaloides se forma un precipitado blanco-amarillento.

4. Reactivo de Sonneschain :

Se añade una gota del reactivo al tubo con el ex-

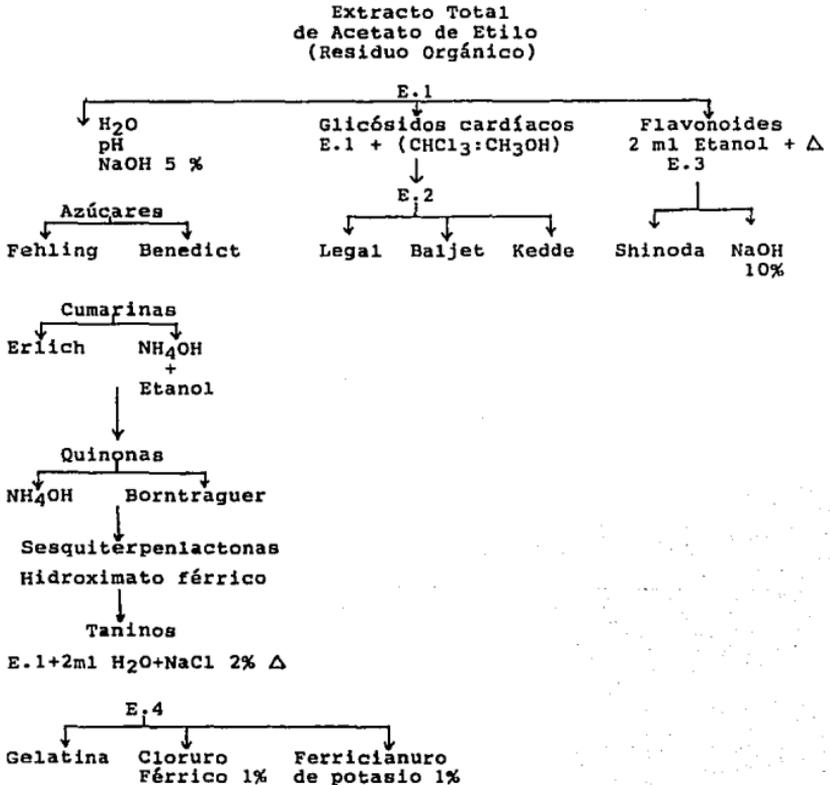
tracto (E.5). Es positivo si da un precipitado amarillo.

5. Reactivo de Wagner :

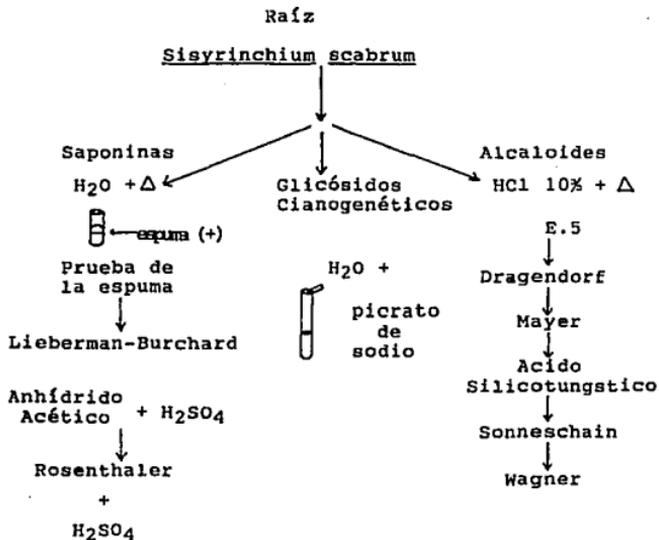
A otro tubo con extracto (E.5) se añade una gota del reactivo, si los alcaloides se encuentran presentes se forma un precipitado café-naranja.

Los esquemas 1 y 2 muestran la secuencia seguida en esta metodología.

Esquema 1. Marcha seguida en el Análisis Fitoquímico Preliminar del residuo orgánico extraído de la Raíz de Sisyrinchium scabrum.



Esquema 2. Marcha seguida en el Análisis Fitoquímico Preliminar de la Raíz de Sisyrinchium scabrum.



II.6 EVALUACIONES BIOLÓGICAS DE LOS EXTRACTOS DE LA RAÍZ DE Sisyrinchium scabrum.

II.6.1 ANALISIS CUALITATIVO ANTIMICROBIANO.

La evaluación de la potencialidad antimicrobiana de los extractos y de las fracciones obtenidas se realiza utilizando el Método microbiológico de Difusión en Agar (Hufford, C. D., Funderburk, M.J. 1975).

II.6.1.1 MICROORGANISMOS DE PRUEBA.

Las siguientes cepas, se utilizan como organismos de prueba en las evaluaciones microbiológicas.

Microorganismo	ATCC No.
<u>Staphylococcus aureus</u>	6538
<u>Bacillus subtilis</u>	6633
<u>Pseudomona aeruginosa</u>	9027
<u>Escherichia coli</u>	8739

II.6.1.2 PREPARACION DE LOS INOCULOS.

Las bacterias se desarrollan mediante incubación en Caldo Nutritivo (Merck) durante 24 horas a 37°C.

La concentración final de organismos en cada uno de los cultivos preparados se ajusta mediante dilución en solución salina isotónica (NaCl 0.9 %) hasta obtener la turbidez equivalente al estándar No. 1 de Mc Farland (0.1 ml de BaCl₂

al 1% y 9.9 ml de H₂SO₄ al 1 %), correspondiente a un número aproximado de 10⁹ células/ml.

II.6.1.3 PREPARACION DE LA MUESTRA DE PRUEBA.

Las muestras a evaluar se suspenden en una solución de Tween 80 al 1 %. Los extractos y las fracciones se evalúan por duplicado a las concentraciones de 50 y 100 ppm. Los controles positivos (estándares) se preparan a una concentración de 10 mg/ml de sulfato de estreptomycin, en solución acuosa.

II.6.1.4 PROCEDIMIENTOS DEL ENSAYO.

Un mililitro de la suspensión bacteriana se siembra de manera uniforme en cada caja Petri (100 x 15 mm) de prueba, conteniendo 15 ml de Agar-Antibiótico No. 1 (Merck) para bacterias. Con un horador cilíndrico se remueve el agar de las placas para producir tres perforaciones de un diámetro aproximado de 11 mm. Posteriormente, se adicionan 100 µl del control positivo en una de las perforaciones; 100 y 50 µl de la solución se adicionan de manera independiente en las cavidades restantes. Las placas así preparadas se mantienen por un período de 1 a 2 horas a temperatura ambiente para facilitar la difusión de las muestras. Transcurrido ese tiempo las placas se incuban por 24 horas a 37°C. Para cada muestra de prueba el ensayo se realiza por duplicado.

La actividad antimicrobiana se registra midiendo la longitud en mm de la zona de inhibición que circunda a cada una de las perforaciones.

II.6.2 DETERMINACION DE LA TOXICIDAD PARA EL CRUSTACEO Artemia salina (Leach).

II.6.2.1 PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

Se prepara una solución original de la muestra (de cada uno de los extractos) disolviendo 20 mg en 2 ml del disolvente adecuado (C_6H_{14} , MeOH, $CHCl_3$ o AcOEt). De ésta solución se transfieren 5, 50 y 500 μ l a frascos viales de manera independiente y por triplicado. Se deja evaporar el disolvente a sequedad y, posteriormente, se afora cada vial con 5 ml de medio salino artificial obteniéndose concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm, respectivamente.

II.6.2.2 BIOENSAYO.

Después de haber desarrollado previamente los huevos de Artemia salina (Leach) en un medio salino artificial durante 48 horas, se transfieren 10 crustáceos a cada uno de los viales conteniendo las muestras. Transcurridas 24 horas se registra el número de organismos sobrevivientes.

La actividad se manifiesta como el efecto tóxico letal para las larvas del crustáceo Artemia salina (Leach). Los resultados finales se expresan en términos de la dosis letal media (DL_{50}).

La concentración letal media (CL_{50}) se calcula mediante el Método de análisis estadístico de Finney.

III RESULTADOS Y DISCUSION

El aspecto más importante de la secuencia metodológica desarrollada en la presente investigación, consistió en el empleo de un análisis cualitativo preliminar que permitió detectar la actividad antimicrobiana potencial y la actividad de la toxicidad sobre el crustáceo Artemia salina (Leach) de los extractos de la Raíz de Sisyrinchium scabrum y, al mismo tiempo, realizar el monitoreo de la actividad biológica a lo largo del estudio fitoquímico. Este último consistió, en la determinación de la potencialidad antimicrobiana cualitativa preliminar en -- contra de bacterias Gram (+) (Staphylococcus aureus ATCC 6538 y Bacillus subtilis ATCC 6633) y Gram (-) (Pseudomona aeruginosa ATCC 9027 y Escherichia coli ATCC 8739), y la toxicidad para Artemia salina (Leach) de los extractos metanólico, clorofórmico, hexánico y de acetato de etilo preparados a partir de la raíz de Sisyrinchium scabrum.

De los cuatro extractos preparados (metanol, clorofórmico, hexano y acetato de etilo), el extracto de Acetato de Etilo (AcOEt) fue el que demostró un efecto significativo sobre las bacterias Gram (+) (Cuadro 3) utilizadas como organismos de -- prueba y, también, actividad en la toxicidad para el crustáceo Artemia salina (Leach).

Cabe recordar que el Staphylococcus aureus patógeno es hemolítico y coagula el plasma, puede provocar supuraciones, formación de abscesos, diversas infecciones piógenas y aún sep

ticemias mortales. Estos microorganismos desarrollan rápidamente cepas resistentes hacia muchos de los agentes antimicrobianos y plantean por esta causa problemas de tratamiento de difícil solución (Jawetz, E. 1983).

Los estafilococos forman parte de la flora normal de la piel humana y de los sistemas respiratorio y digestivo.

El Bacillus subtilis es un agente causante de desórdenes gastrointestinales (Jawetz, E. 1983), estas bacterias causan enfermedades diarréicas ya sea por colonización y crecimiento en el tubo digestivo, o por la secreción de exotoxinas.

Cuadro 3. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de los diferentes extractos obtenidos de la Raíz de Sisyrinchium scabrum.

Microorganismo	E X T R A C T O							
	Hexano		Acetato de Etilo		Cloroformo		Metanol	
	Concentración (ug/ml)							
	100	50	100	50	100	50	100	50
S. aureus	8	6	8	6	6	4	6	4
B. subtilis	6	4	6	4	-	-	-	-
P. aeruginosa	-	-	-	-	-	-	-	-
E. coli	-	-	-	-	-	-	-	-

Los resultados se reportan en milímetros del diámetro de la zona de inhibición, con respecto al estandar de Estreptomina.

En la determinación de la toxicidad contra el crustáceo Artemia salina (Leach) la mayor actividad se presenta en el extracto hexánico y en seguida en el extracto de acetato de etilo, preparados a partir de la raíz de Sisyrinchium scabrum, a las concentraciones equivalentes a 1000 ppm donde todas o casi todas las larvas probadas (30 por cada concentración) mueren (Cuadro 4).

Cuadro 4. Evaluación de la Toxicidad contra el crustáceo Artemia salina (Leach) de los diferentes extractos obtenidos de la Raíz de Sisyrinchium scabrum.

EXTRACTO	LC ₅₀ (ppm)
Hexano	68.08
Acetato de Etilo	231.23
Cloroformo	282.86
Metanol	>1000

De acuerdo a estos resultados se procedió a preparar una mayor cantidad del extracto de Acetato de Etilo (AcOEt) para realizar el estudio biodirigido, con el objeto de encontrar el ó los compuestos responsables de la actividad biológica.

Cuadro 5. Análisis Fitoquímico preliminar del Extracto de Acetato de Etilo de la Raíz de Sisyrinchium scabrum.(continuación).

Principio Activo	Reactivo	Coloración o pp teórico	Extracto	Obs.
Quinonas	1.NH ₄ OH	rojo:antraquinonas	+	rojo
	2.Borntra guer	rojo:quinonas amarillo:antronas	- -	
Sesquiterpenlactonas	1.Hidroxi- mato fé- rrico	rojo,violeta o rosa:positivo	-	
Taninos	1.Gelatina	pp blanco:tani- nos	-	Sol.rosa
	2.FeCl ₃ al 1 %	azul a negro:de rivados del áci do gálico	-	Sol.ama- rilla
	3.K ₃ Fe(CN) ₆ al 1 %	verde:derivados del catecol	-	
		azul:comp. fenó licos	+	Sol.azul verdosa
Saponinas	1.Espuma	estable por 1 min. forma de panal	-	
	2.Lieber- man-Bur- chard	rosa,rojo,magenta o violeta:triter- penos	-	
	3.Rosentha ler	violeta para sapo ninas tipo triter penoides	-	
Glicósidos Cianogéné- ticos	1.Guignard	rosa o rojo	-	
Alcaloides	1.Mayer	pp blanco a amari- llo	-	Sol.amar.
	2.Dragen- dorff	pp anaranjado	-	Sol.amar. turbia
	3.Sonnes- chain	pp blanco a amar.	-	Sol.amar. a verde
	4.Wagner	pp anaranjado	-	Sol.anar.
	5.Silico- tungsti co	pp blanco a ama- rillo	-	Sol.amar.

El extracto de Acetato de Etilo que presentó la mayor actividad antimicrobiana se fraccionó mediante cromatografía en columna (CC) con Hexano-Acetato de Etilo; a cada una de las fracciones obtenidas se determinó la actividad antimicrobiana obteniendo resultados positivos en la fracción 328-346, correspondiente a la elución 60 : 40 Hexano-Acetato de Etilo (Cuadro 6).

Cuadro 6. Cromatografía en Columna del extracto de Acetato de Etilo de las raíces de *Sisyrinchium scabrum*, mostrando la Actividad Antimicrobiana de las fracciones activas.

Sistema de Eluyentes	Proporción	Fracciones Colectadas	Eluatos Combinados	Evaluación Biológica
C ₆ H ₁₄		1 - 57	1 - 19	-
C ₆ H ₁₄ -AcOEt	95 : 5	58 - 94	69 - 91	+
C ₆ H ₁₄ -AcOEt	90 : 10	95 - 162	97 - 155	+
"	80 : 20	163 - 250	163 - 250	-
"	70 : 30	251 - 327	251 - 327	-
"	60 : 40	328 - 346	335 - 341	+ + +
"	50 : 50	347 - 363	347 - 363	-
AcOEt	"	364 - 373	364 - 373	-

Se observó también que esta fracción era la mayoría de la cromatografía en capa fina del extracto total. Por lo tanto, se procedió a obtener el compuesto bioactivo mediante cromatografía en capa preparativa.

Esta fracción activa (328 - 346), dió una coloración púrpura al ponerla en contacto con vapores de amoníaco; con soluciones alcalinas de hidróxido de sodio al 10 % presenta una coloración púrpura, y el Espectro de Infrarojo obtenido de la misma fracción mostró bandas características de absorbanza para grupos hidroxilo (3412 cm^{-1}), carbonilo de una γ - pirona (1630 cm^{-1}) y dobles enlaces aromáticos (1440 cm^{-1}). Esto sugiere la presencia de una Chalcona o una Aurona.

Por haber obtenido una pequeña cantidad de la fracción activa no se pudo separar los constituyentes presentes para su purificación y elucidación estructural.

Todas las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del extracto de Acetato de Etilo, se reunieron tomando en cuenta la homogeneidad y la semejanza de los constituyentes presentes en cada uno.

Las fracciones así obtenidas fueron sometidas de manera independiente a la evaluación de la actividad antimicrobiana y la toxicidad para Artemia salina (Leach), mediante el ensayo ya mencionado.

Los resultados de la evaluación cualitativa antimicrobiana de la fracción activa (328 - 346) evidenciaron una significativa actividad biológica en contra de bacterias Gram (+), observándose, que en Bacillus subtilis el halo de inhibición generado por esta fracción es mayor que el obtenido para Staphylococcus aureus y este a su vez fue comparable con el observado para el estandar de Estreptomocina (Cuadro 7).

Cuadro 7. Evaluación Antimicrobiana de la fracción activa obtenida del Extracto de Acetato de Etilo de la Raíz de Sisyrinchium scabrum.

Muestra	Fracción Activa (328 - 346)	100 50 mcg/ml	
		100	50
Bacterias Gram (+)	S. aureus	7	4
	B. subtilis	14	10
Bacterias Gram (-)	P. aeruginosa	-	-
	E. coli	4	2

Los resultados están reportados en milímetros del diámetro de la zona de inhibición, con respecto al estandar de Estreptomicina.

De aquí, se sugiere, que al ir purificando la fracción activa se obtiene una mayor actividad sobre Bacillus subtilis y en el caso de Staphylococcus aureus, que presentó una mayor actividad de inhibición en el extracto total de Acetato de Etilo que la fracción activa aislada, esto puede deberse a un efecto sinérgico de todos los componentes presentes en el extracto total. En el caso de la fracción activa se observa una disminución en la inhibición contra Staphylococcus aureus, lo que también podría significar que en la fracción se tiene una mezcla de compuestos que podrían ejercer un efecto antagónico inhibitorio para Staphylococcus aureus.

Esta misma fracción presentó actividad de la toxicidad para Artemia salina (Leach) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Evaluación Citotóxica de la fracción activa contra el crustáceo Artemia salina (Leach), del Extracto de Acetato de Etilo de la raíz de Sisyrinchium scabrum.

Fracción Activa (328 - 346)			
ppm	1000	100	10
No. de org. vivos	0	0	10
	0	1	9
	1	1	8
No. de org. muertos	29	28	3
LC ₅₀	33.56 ppm		

Las evaluaciones seleccionadas ofrecen las ventajas de ser rápidas, de bajo costo y requieren poca cantidad de muestra. La determinación de la toxicidad para Artemia salina (Leach) se ha empleado en varias ocasiones como guía para conducir el fraccionamiento y aislamiento de sustancias bioactivas, las cuales en múltiples ocasiones han mostrado un cierto potencial citotóxico in vitro para células cancerígenas (Anderson, 1991); actividad antihelmíntica (Camacho, 1990) y antipalúdica (Hui, 1989; Hostettman, 1982; Martson, 1991). En lo que se refiere a la determinación de la actividad antimicrobiana, los microorganismos de prueba empleados se eligieron de acuerdo a

los criterios convencionales (Mistcher, 1982). Con excepción de Bacillus subtilis, todos los demás microorganismos son huéspedes normales del hombre aunque, bajo ciertas condiciones, pueden llegar a presentar patogenicidad (Pelczar, 1982).

Los resultados de la evaluación de la toxicidad para Artemia salina (Leach) se encuentran expresados en términos de la dosis letal media (LC_{50}), y en el caso de pruebas antimicrobianas en términos de diámetro de inhibición del crecimiento microbiano.

Por otro lado, se realizó una cromatografía en capa fina del extracto de acetato de etilo de la raíz de Sisyrinchium scabrum y la fracción activa obtenida por cromatografía en columna observándose que el compuesto mayoritario obtenido del extracto, tenía el mismo R_f que el obtenido en la fracción. Por tanto, se procedió a separar este compuesto mayoritario por cromatografía en placas preparativas sucesivas. El cuadro 9 resume las diferentes proporciones de sistemas de Hexano-Acetato de Etilo para la obtención del compuesto mayoritario.

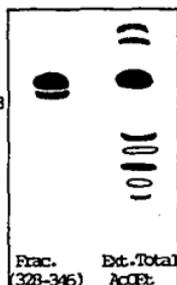
La fracción activa, se sometió a procedimientos de purificación adicionales mediante cromatografía en capa preparativa, sin lograr la separación de los compuestos presentes en esa fracción.

Cuadro 9. Cromatografía en Capa Fina del Extracto de Acetato de Etilo de la Raíz de Sisyrinchium scabrum.

Sistema de Eluyentes	Proporción	No. de placas preparativas de vidrio	No. de placas preparativas Merck F254
Hexano-AcOEt	95 : 5	40	10
"	90 : 10	20	5
"	80 : 20	10	5
"	70 : 30	6	4
"	60 : 40	5	3
"	50 : 50	5	3

Figura 4. Reproducción de la cromatografía en capa fina (ccf) de los extractos de acetato de etilo y de la fracción activa aislada por cromatografía en columna de la Raíz de Sisyrinchium scabrum (C₆H₁₄ - AcOEt) (95 : 5).

Rf
0.53



En los resultados del Análisis Fitoquímico preliminar (Cuadro 5) se observan reacciones positivas para Flavonoides, Quinonas y Taninos. Los cuales se correlacionan a la presencia de estos metabolitos secundarios reportados en la literatura en plantas pertenecientes a la Familia IRIDACEAE (Sección I.2. 2), por lo que debe ser evidente una relación quimiotaxonómica de S. scabrum con los demás miembros de ésta familia.

IV CONCLUSIONES

En los últimos años, una de las estrategias que mejores resultados ha proporcionado en la investigación de productos naturales es la de estudios fitoquímicos biodirigidos mediante evaluaciones adecuadas.

Esta estrategia consiste en ir monitoreando extractos y fracciones hasta llegar al principio activo puro mediante un bioensayo simple o mediante una prueba farmacológica.

El estudio biodirigido de la Raíz de Sisyrinchium scabrum, una especie medicinal mexicana, propuesto como objetivo fundamental de la presente investigación, permitió generar las siguientes conclusiones :

A. El bioensayo para la determinación del efecto larvívica sobre el crustáceo Artemia salina (Leach), representó una metodología de fácil implementación que permitió obtener resultados en un tiempo relativamente corto a un bajo costo de operación, y demostró una alta sensibilidad para el monitoreo de los constituyentes activos presentes en los extractos de la Raíz de Sisyrinchium scabrum.

B. De los cuatro extractos preparados (Metanol, Cloroformo, Hexano y Acetato de Etilo) de la Raíz de Sisyrinchium scabrum, el que presentó una mayor actividad antimicrobiana significativa para bacterias Gram (+), Staphylococcus aureus ATCC 6538 y Bacillus subtilis ATCC 6633, fue el extracto de

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Acetato de Etilo.

C. El fraccionamiento biodirigido del extracto activo, mediante la determinación de la actividad antimicrobiana, permitió la separación de la fracción (328 - 346). La cual demostró moderada actividad antimicrobiana en contra de bacterias Gram (+). Posiblemente, la actividad que demostró el extracto original se deba entonces a un efecto sinérgico de los componentes en el extracto y a la presencia de otros compuestos aún no aislados de la fracción activa.

D. El análisis de Infrarojo y las reacciones de coloración de la fracción activa, sugiere la presencia probable de una Chalcona o Aurona. Adicionalmente, el estudio fitoquímico preliminar realizado al extracto total de Acetato de Etilo indicó la presencia de Flavonoides, Quinonas y Taninos, lo cual corresponde a una relación quimiotaxonómica con otras especies pertenecientes a la familia IRIDACEAE.

Por todos estos resultados preliminares se recomienda continuar con los estudios fitoquímicos biodirigidos hasta el aislamiento y elucidación de los principios activos detectados en esta especie medicinal.

V GLOSARIO

- Aperitivo.** Estimulante del Apetito.
- Antipirético.** Agente que se usa contra la hipertermia o fiebre. Sin. Antipirético, Febrífugo.
- Antiespasmódico.** Agente que se usa contra el espasmo.
- Carminativo.** Agente que previene la formación de gases en el tubo digestivo.
- Catártico.** Sinónimo. Purgante, Catarético.
- Cauterizante.** Agente que quema.
- Diurético.** Agente que aumenta la secreción de orina.
- Diaforético.** Agente que favorece la sudoración. Sin. Sudorífico.
- Emanagogo.** Agente que estimula el flujo menstrual.
- Epigeo.** Cotiledón ó cotiledones que se manifiestan fuera de las cubiertas de la semilla y de la tierra en la germinación.
- Eupéptico.** Agente que favorece la digestión. Sin. Estomáquico.
- Expectorante.** Agente que provoca la expulsión de esputo de las vías respiratorias.
- Esputo.** Material procedente de las vías respiratorias que llega a la boca por expectoración.
- Enfermedades Exantemáticas.** Término genérico de varias enfermedades de origen viral que se manifiesta predominantemente durante la infancia como el sarampión, la escarlatina, la viruela, caracterizadas por erupción cutánea de color rojo.
- Pectoral.** Relativo al pecho. Se usa comunmente como sinónimo de expectorante.

Piόgeno. Que produce pus.

Sedante. Agente que calma el dolor o la excitación. Sin. Calmante, Sedativo, en ocasiones sinónimo de Ansiolítico.

VI BIBLIOGRAFIA

- Agarwal, V.K., Thapa, R.K., Agarwal, S.G., Dhar, K.L. (1984) Phenolic constituents of *Iris milesii* rhizomes. Phytochemistry 23(6), 1342-1343.
- Anderson, J.E.; Goetz, G.E.; Mc Laughlin, J.L. y Suffness, M.; (1991) Phytochem. Anal., 2, 107.
- Arisawa, M., Morita, N. (1976) Studies on Constituents of genus *Iris*. VII. The constituents of *Iris unguicularis* Poir. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 24(4), 815 - 817.
- Berlín, B., Berlín, E.A., Breedlove, D.E., Duncan, T. (1990) La Herbolaria Médica Tzetzal-Tzotzil en los Altos de Chiapas. Serie Nuestros Pueblos (PROCOMITH) Chiapas, México.
- Blinova, K.F., Glyzin, V.I., Pryakhina, N.I. (1977) C-Glycoside from *Iris ensata*. Khim. Prir. Soedin. 1, 116.
- Chapuis, J.C., Sordat, B., Hostettman, K. (1988) Screening for citotoxic of used in traditional Medicine. Journal of Ethnopharmacology. 23, 273 - 284.
- Chen, Z., Huang, H., Wang, Ch., Li, Y., Ding, J., Ushio, S., Hiroshi, N., Yoichi, I. (1986) Hongconin, a new naphtale-ne derivative from Hong-Kong, the rhizome of *Eleutherine americana* Merr. and Heyne (Iridaceae). Chem. Pharm. Bull. 34(7), 2743 - 2746.
- Departamento de Farmacia. Sección de Fitoquímica. (1993) Curso Experimental de Productos Naturales II. Editado en ENCB. IPN. 1a. edición.
- Díaz, José Luis. Índice y Sinónima de las Plantas Medicinales de México. Editor José Luis Díaz. Monografías Científicas I. IMEPLAM. México 1976.
- Díaz, José Luis. Usos de las Plantas Medicinales de México. Editor José Luis Díaz. Monografías Científicas II. IMEPLAM. México 1976.

- Domínguez, Xorge A.** Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa. 4a. Reimpresión. México 1988.
- El-Emary, N.A., Kobayashi, Y., Ogihara, Y.** (1980) Two isoflavonoids from the fresh bulbs of *Iris tingitana*. Phytochemistry 19(8), 1878 - 1879.
- El-Emary, N.A., Ali, A.A., El-Moghazi, M.A., Darwish, F.M., Frahm, A.W.** (1983) Three isoflavonoids from *Iris germanica*. Phytochemistry, 22(9), 2061 - 2063.
- El-Moghazy, A.M., Ali, A.A., El-Emary, N.A., Darwish, F.M.** (1980) Isoflavones from the rhizomes of *Iris germanica*. Fitoterapia, 51(5), 237 - 239.
- Estrada, Lugo Erick.** Plantas Medicinales de México. Introducción a su Estudio. Universidad Autónoma de Chapingo. 4a. edición 1992.
- Fujita, M., Inoue, T.** (1982) Studies on the constituents of *Iris florentina* L. II. C-Glucosides of xanthenes and flavones from the leaves. Chem. Pharm. Bull. 30(7), 2342 - 2348.
- Harborne, J.B.** Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plants analysis. 2a ed. Chapman & Hall, London 1984.
- Holland, R. William.** Medicina Maya en los Altos de Chiapas. Un estudio del cambio socio cultural. Instituto Nacional Indigenista (INI). 2a. reimpresión. México 1989.
- Hostettmann, K.; Kizo, H.; Tamamori, T.** (1982) Planta Médica, 44, 34.
- Javetz, Ernest.** Manual de Microbiología Médica. 10a. ed. México El Manual Moderno 1983.
- Komura, H., Mizukawa, K., Minakata, H., Huang, H., Qin, G., Xu, R.** (1983) New anthraquinones from *Eleutherine americana*. Chem. Pharm. Bull. 31(11), 4206 - 4208.
- Loukis, A., Al-Kofahi, A., Philiarios, S.** (1983) Constituents

- of *Crocus sativus* L. bulbs. *Plant. Med. Phytother* 17(2) 89 - 91.
- Lozoya, Xavier., Lozoya, Mariana. *Flora Medicinal de México. Primera parte. Plantas Indígenas.* IMSS.México 1982.
- Marner, F.J., Krick, W., Gellrich, B., Jaenicke, L., Winter, W. (1982). Iridgermanal and iridogermanal: two new triterpenoids from rhizomes of *Iris germanica* L. *Journal of Organic Chemistry* 47(13), 2531 - 2536.
- Martínez, M. *Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas.* 5a Ed. Botas. México 1969.
- Martínez, M. *Las Plantas Medicinales de México.* Ed. Botas. México 1969.
- Matson, A.; Hostettman, K.; In *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 6 pag. 153 - 178. Academic Press, 1991.
- Mc Laughlin, J.L. *Methods in Plant Biochemistry.* Vol. 6. Assays for Bioactivity (Hostettmann, K. Ed.). Academic Press. London 1991.
- Meyer, B.H., Ferringhi, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., Mc Laughlin, J.L. (1982). A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica.* 45, 31 - 34.
- Miranda, F. *La vegetación de Chiapas.* Ed. del Gobierno del Edo. de Chiapas, México, 1975 (1a. y 2a. partes).
- Morley, Sylvanus. *The Ancient Maya.* Stanford, California. Stanford University Press. 1956.
- Morrison, T.R., Boyd, N.R., *Química Orgánica.* Ed. Fondo Educativo Interamericano, S.A. México 1976.
- Olayiwola, Akerele., Vernon, H., Hugh, S. *The Conservation of Medicinal Plants.* Cambridge University Press. (CINVESTAV. IPN) 1986.
- Pryakhina, N.I., Blinova, K.F. (1979). Phenolic acids from *Iris ensata.* *Khim. Prir. Soedin.* 6, 861 - 862.

- Pryakhina, N.I., Blinova, K.F. (1984).** C-glycosides of luteolin from *Iris ensata*. Khim. Prir. Soedin. 1, 109 - 110.
- Pryakhina, N.I., Sheichenko, V.I., Blinova, K.F. (1984).** Acylated C-glycosides of *Iris lactea*. Khim.Prir. Soedin. 5, 589 - 595.
- Rojas, A.; Hernández, L.; Pereda-Miranda, R. y Mata, R.** Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 35, 275 - 283. 1992.
- Rzedowski y Rzedowski.** Flora Fanerogámica del Valle de México. Vol. III. Editado por Jerzy Rzedowski y Graciela C. de Rzedowski. Instituto de Ecología. Centro Regional del Bajío. Pátzcuaro Mich. 1990. 1a. Impresión
- San Martín, C.R.** Tratado de Farmacognosia. Edit. Científica Médica. México, 1977.
- Sergeeva, N.V. (1977).** C-Glycosides from *Crocus reticulatus* leaves. Khim. Prir. Soedin. 1, 124 - 125.
- Stumpf, P.K., Conn, E.E.** The Biochemistry of Plants: a comprehensive treatise. Academic Press 1980, p 1990.
- Trease, G.E., Evans, W.C.** Tratado de Farmacognosia. Ed. Interamericana. 12a. Ed. México 1987.
- Viesca, Treviño Carlos.** Estudios sobre Etnobotánica y Antropología Médica II. Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales. Centro de Estudios Económicos y Sociales del 3er. Mundo A.C. IMEPLAM. 1977.
- Wong, S.M., Pezzuto, J.M., Harry, H.S., Farnsworth, N.R. (1986).** Isolation and characterization of a new triterpene from *Iris missouriensis*. Journal of Natural Products 49(2), 330 - 333.