

180
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE ALGUNAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS
DE LA LACTONA SESQUITERPENICA
GLAUCOLIDO - E, EXTRAIDA DE Vernonia salicifolia

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

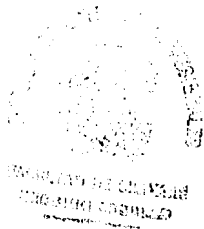
P R E S E N T A :

MONICA ADRIANA TORRES RAMOS



MEXICO, D F

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



1994



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.

CIUDAD UNIVERSITARIA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
Profesionales
Exp. Núm. 55

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Universidad Nacional Autónoma de México.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo
revisado el trabajo de tesis que realiz 6 la pasante Torres
Ramos Mónica Adriana

con número de cuenta 8752551 - 5 con el título: Estudio
de algunas actividades biológicas de la Lactona sesquiterpénica Glaucólide-E,
extraída de Vernonia salicifolia

Consideramos que reúne los méritos necesarios para que pueda conti-
nuar el trámite de su Examen Profesional para obtener el título de -
 BIOLOGO .

GRADO NOMBRE Y APELLIDOS COMPLETOS

M. en C. Javier Antonio Taboada Ramírez
Director de Tesis
Dr. Carlos Guerrero Ruiz

L.C.Q. Ma. del Rosario Arellano García

Biol. Ma. de los Remedios Josefina Ramírez Rangel
Suplente
M. en C. Carlos Ramos Abraham
Suplente

FIRMA

Ciudad Universitaria, D.F., a 12 de Septiembre de 1994

**A la memoria de mi padre
Armando Torres**

**A mi madre por todo su apoyo y cariño
Gloria Ramos**

**A mis hermanos con mucho ánimo
para que continúen con sus estudios
Armando, Antonio y Silvestre**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de forma muy especial a mis asesores por su paciencia, consejos y confianza:

Asesor de la parte Química

Dr. Carlos Guerrero Ruiz

Asesor de la parte Biológica

M. en C. Javier Antonio Taboada Ramírez

El haber aceptado tan amablemente ser mis jurados

L.C.Q. Ma. del Rosario Arellano

Biol. Ma. de los Remedios Josefina Ramírez

M. en C. Carlos Ramos

Gracias al apoyo y la ayuda brindada para la realización de ésta tesis a:

Dr. Efraín Campos del depto. de Toxicología, Fac. de Medicina UNAM

Dr. Fructuoso Ayala-Guerrero del Laboratorio del sueño, Instituto de investigaciones Biomédica UNAM

Dr. Mario Camino del CPROBI (Centro de Productos Bióticos) IPN en Yautepec, Morelos

Dr. Néstor Delgado IMSS en Xochitepec, Morelos

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Pruebas Biológicas en el Instituto de Química UNAM

" ¿Cuánta verdad soporta a cuanto verdad se
atreve un espíritu?
Esto es lo que ha constituido para mi
cada vez mas la verdadera medida de los valores
El error (la fe en el ideal)
no es ceguera, el error es cobardía
cada conquista, cada paso hacia adelante en el conocimiento
destila valor, duración hacia sí, limpieza para sí "

Nietche

INDICE

INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	8
OBJETIVOS	11
METODOLOGIA	12
RESULTADOS Y DISCUSION	28
CONCLUSIONES	37
REFERENCIAS	39

INTRODUCCION

Siempre ha existido una curiosidad innata en el hombre que lo llevó a conocer y relacionar los diferentes objetos encontrados en su ambiente natural, por esto, no es sorprendente que el conocimiento y la utilización de la flora con fines terapéuticos y curativos date desde tiempos muy antiguos. De forma tradicional las poblaciones indígenas han tenido una variedad de plantas para mantener su salud, muchas de éstas han sido seleccionadas a través de generaciones, acrecentando su importancia durante la historia de la humanidad.

En México las poblaciones que habitaban el país en épocas prehispánicas conocían las propiedades artesanales, medicinales y estimulantes de muchas plantas silvestres; el uso de éstas se basaba en conocimientos empíricos ya que se desconocían sus principios activos, los que ahora se denominan productos naturales.

En la naturaleza, son muy pocas las sustancias que se encuentran en estado puro, una gran parte de los primeros trabajos en el campo de la química orgánica se concentraron en el aislamiento, determinación estructural y síntesis de estos productos, así en la actualidad con el gran avance científico se ha conseguido aislar y caracterizar muchos de éstos compuestos correlacionando su estructura con su posible actividad biológica. El uso de los productos naturales aislados de plantas sus análogos y semisíntesis tuvo un avance importante en el siglo XIX durante el periodo de crecimiento y diversidad de la industria fitoquímica, que lentamente ha venido desarrollándose como una disciplina

Anteriormente los estudios en plantas se enfocaban al desarrollo de técnicas de separación (cromatografías) y los métodos de identificación de estructuras (espectrometrías, resonancia magnética nuclear) y se le daba poca prioridad a la evaluación biológica. Sin embargo esto ha venido cambiando al incorporarse una serie de bioensayos en diversas áreas tales como fisiología vegetal y animal, parasitología, neurobiología, etc., para ser aplicados en las disciplinas farmacológica, alimenticia y agrícola entre otras.

Por otra parte, los productos naturales (metabolitos secundarios) también juegan un papel ecológico importante cuando se estudian interacciones químicas entre plantas (alelopatía, por ejemplo) y entre plantas con otros organismos incluyendo parásitos, insectos o mamíferos.

Dentro del grupo de los metabolitos secundarios se encuentra al Glucólido-E, producto natural estudiado en este trabajo, que fue extraído de *Vernonia salicifolia* (Compositae) y sometido a pruebas de actividad biológica.

Una de las familias más grandes dentro del reino vegetal, es la de las compuestas, su origen se localiza probablemente en el continente Americano, en México ya que es en nuestro país donde se localiza el mayor número de géneros (Rzedowky, 1983).

Debido al gran número de plantas de la familia Compositae, con frecuencia las diferencias morfológicas entre las especies son muy pequeñas, creando confusión para su clasificación, por lo que actualmente es importante conocer sus metabolitos secundarios para fines taxonómicos, ya que éstos son característicos de tribus, de géneros y en ocasiones de especies particulares (Wagner, 1983).

Entre los metabolitos secundarios mas comunes en la familia de las compuestas están: aceites esenciales de acidos grasos, diterpenos, triterpenos, compuestos acetilénicos, flavonas y flavonoles, pero probablemente los que caracterizan mejor a esta familia son los sesquiterpenos, en especial, las lactonas sesquiterpénicas. El interés de este tipo de compuestos radica no solo en su valor quimiotaxonómico sino también en sus propiedades biológicas y químicas.

Las lactonas sesquiterpénicas son compuestos que poseen un esqueleto fundamental de 15 átomos de carbono, se han aislado principalmente de extractos de flores o partes aéreas de plantas de varias familias de angiospermas (Fischer *et al.*, 1979) umbelíferas y hongos (Fischer *et al.*, 1979), pero la mayoría de los compuestos han sido aislados de varios géneros de la familia Compositae, las lactonas sesquiterpénicas son sustancias amargas, generalmente insolubles en agua y biológicamente poco estudiadas.

La clasificación de los diferentes tipos de esqueletos de lactonas sesquiterpénicas está basado en el esqueleto carbocíclico en el cual el sufijo "olide" indica la presencia de una función lactónica (Gil, 1992).

Durante las tres últimas décadas se ha incrementado el número de publicaciones concernientes a aspectos químicos y biológicos de lactonas las sesquiterpénicas. Algunos de ellos son las dos revisiones sobre la distribución, biogénesis y química de varios tipos estructurales de lactonas sesquiterpénicas (Fischer *et al.*, 1979) y la revisión anual sobre sesquiterpenos en Natural Products Report (Robert and Bryson 1984) entre muchos otros.

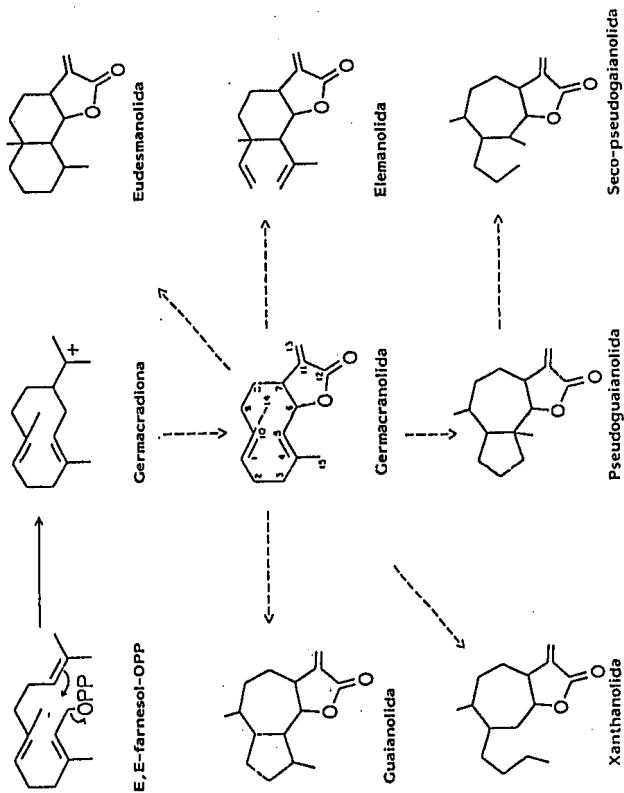
El glaucólido-E pertenece al grupo de los compuestos llamados Germacranólidas, los cuales son el primer tipo de lactonas sesquiterpénicas que se forma por ciclización del farnesol, (fig. 1) tiene dobles ligaduras en C-4 y C-1 ambas en posición trans; estas sustancias son las de mayor distribución y abundancia. Se conocen cerca de 300 compuestos diferentes (Romo de Vivar, 1985), este tipo de compuestos merecen atención para el conocimiento de su posible actividad biológica.

El grupo funcional responsable de la actividad biológica es el α - metileno - γ - lactona. Otras lactonas también contienen α , β - carbonilos insaturados con algunos grupos funcionales como epóxidos, clorhidruro, éster no saturado, lactonas no saturadas y cetonas sin saturar. Estos grupos funcionales representan receptores reactivos en sitios para nucleófilos biológicos, en particular tioles y grupos amino. Por lo tanto, las lactonas sesquiterpénicas pueden causar alquilaciones irreversibles de tioles esenciales y funciones amino de ciertas enzimas. Así que han sido reportadas un extenso espectro de actividades biológicas de lactonas sesquiterpénicas. (Rodriguez, et al., 1976; Picman, 1986).

Dentro de los estudios sobre actividad-estructura han demostrado que las enzimas que contienen tioles tales como la fosfofructocinasa, la glicogeno sintetasa, DNA polimerasa y timidil sintetasa son inhibidas por lactonas. Además, ciertas lactonas suprimen la actividad de las enzimas que contienen tioles en vías como la glicólisis y la síntesis de proteínas. (Picman, 1986).

Muchas lactonas sesquiterpénicas presentan actividad antibacterial, generalmente en bacterias Gram positivo tales como: *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Lee et al., 1970; Picman y Towers, 1983).

Fig 1. Transformación biogenética del trans-farnesol-pirofosfato a Germacradiona que por procesos de bioxidación-lactonización forma a las Germacranólidas, las cuales pueden ser consideradas el precursor biogenético de los otros tipos esqueléticos de lactonas sesquiterpénicas.



Se reportó actividad antimicótica en varios tipos de lactonas sesquiterpénicas contra *Candida albicans* (Lee, et al., 1977; Picman, 1984) también actividad contra hongos filamentosos (Blakeman y Atkinson, 1979). Ha sido demostrada actividad antiparasitaria contra varias especies de *Plasmodium* (Klayman, 1985) y se ha obtenido un nuevo tipo de droga anti-malaria; también atacan tremátodos de géneros como *Schistosoma* (Vichnewski, et al., 1976), poseen actividad antihelmíntica, y ha sido estudiada su actividad moluscicida sobre caracoles hospederos intermediarios de algún parásito de importancia médica, con resultados alentadores (Cruz-Reyes, 1989).

Las lactonas sesquiterpénicas representan uno de los grupos de productos naturales mas grandes en los que se ha demostrado actividad citotóxica y antitumoral (Kupchan, 1970; Pettit, 1977; Cassady y Suffnes, 1980; Misra y Pandey, 1981; Picman, 1986). El grupo α - metileno - γ - lactona está presente en muchos de los compuestos que presentan ésta actividad.

También han sido revisadas actividades farmacológicas, como espectorantes y estimulantes de secreción intestinal (Kowalewski, et al., 1976). Sedantes (Wagner, 1983), propiedades analgésicas (Lucas, et al., 1964) y mas recientemente actividad anti-inflamatoria (Hall et al., 1980).

Muchas lactonas sesquiterpénicas también presentan efectos tóxicos en un amplio rango de organismos, lo que sugiere que éstas lactonas juegan un papel ecológico importante debido a su interacción con otros organismos, incluyendo mamíferos, insectos, parásitos y con otras plantas. Los efectos de las lactonas sesquiterpénicas sobre insectos herbívoros muestran propiedades antialimentarias y reducen la sobrevivencia de larvas y adultos (Romo de Vivar, 1985).

Propiedades alelopáticas y efecto sobre los reguladores de germinación y crecimiento en plantas, también son atribuidos a algunas lactonas sesquiterpénicas (Hartman,1979).

La información anterior nos muestra la amplia actividad biológica que desempeñan las lactonas sesquiterpénicas Tomando en cuenta el gran número de éstos compuestos y que sólo algunos han sido estudiadas química y biológicamente, se hace necesario, plantear una serie de bioensayos definidos, los cuales deben ser simples, rápidos y reproducibles, usar un mínimo de equipo, razonablemente selectivos para la clase de compuesto que se está probando y cuantitativos hasta donde sea posible, de esta manera poder garantizar resultados rápidos (lo cual es primordial debido al amplio número de productos naturales que se están extrayendo actualmente) y poder continuar, estudios mas detallados de una actividad cuando se hayan obtenido resultados positivos.

Los resultados sobre la actividad biológica de las lactonas sesquiterpénicas, está haciendo que muchos investigadores en diversas partes del mundo se interesen en su estudio.

ANTECEDENTES

La familia Compositae, es una de las mas grandes y estudiadas, consta de mas de 1000 géneros y 20 000 especies. Esta familia se encuentra dividida en 14 tribus:

- | | |
|----------------|-----------------|
| 1. Vernoneae | 8. Senecioneae |
| 2. Astereae | 9. Tageteae |
| 3. Eupatoreae | 10. Artoteae |
| 4. Inuleae | 11. Calenduleae |
| 5. Heliantheae | 12. Cynareae |
| 6. Helinieae | 13. Muticeae |
| 7. Anthemideae | 14. Lactuceae |

La tribu Vernonieae se divide en dos subtribus:

- | | |
|---------------|------------------|
| 1. Vernoninae | 2. Lychnophoreae |
|---------------|------------------|

La planta estudiada fue clasificada como *Vernonia salicifolia* (que pertenece a la familia compositae, a la tribu Vernonieae y a la subtribu Vernoninae). La clasificación fue realizada por el profesor Francisco Ramos en el Instituto de Biología UNAM.

Vernonia salicifolia es llamada comunmente como Ahuitle (Tejupilco, Luvianos, Mex.). Es un arbusto de hojas alternas, elípticas, o angostamente oblongo elípticas, de 4-8.5 cm de largo por 1-2 de ancho, punteado-glandular en ambas caras; flores en cabezuelas; el vilano blanco-piloso. Localizada en los estados de México, Puebla, Oaxaca (Martínez, 1979) y Morelos (Gil, 1992).

Se han reportado para la tribu Vernoninae 1456 spp de 70 géneros de los cuales el género *Vernonia* es el mas grande de la tribu con 1000 especies aproximadamente, distribuidas en América, Africa y Asia (Wagner, 1983).

Cómo se puede ver en la revisión bibliográfica una gran cantidad de especies de éste género ya han sido estudiadas químicamente e indudablemente los compuestos químicos mas importantes son las lactonas sesquiterpénicas .

Han sido identificadas alrededor de 19 lactonas sesquiterpénicas en solo cuatro géneros de la tribu Vernoniae: *Vernonia*, *Elephantopus*, *Eremanthus*, y *Vanillosmopsis*. La mayoría de las lactonas de las especies de *Vernonia* pertenecen al tipo Germacranólida (Wagner, 1983).

Parece ser que pocas especies de esta tribu han sido estudiadas biológicamente, una es *Vernonia antihelmíntica* la cual ha sido utilizada cómo fuente de un agente antihelmíntico, para el tratamiento del asma y problemas renales. Muchas especies de *Vernonia* han sido utilizadas en la medicina tradicional para tratar varias enfermedades. Las sustancias activas que presentan estas plantas han sido demostradas por Kupchan et al. (1966) con el aislamiento de vernolepina de *Vernonia himenolepis* y de elefatopina y elefantina de *Elephantopus* .Estas lactonas sesquiterpénicas muestran una significativa actividad *in vitro* en celulas derivadas de carcinoma humano de la nasofaringe e *in vivo* en carcinomas de ratas. La Vernolepina también actúa cómo un inhibidor en el crecimiento de plantas, que es reversible por el ac. indolacético (Wagner, 1983).

Una de las actividades biológicas mas importantes de Vernonicae es el descubrimiento de la eremantina, la lactona sesquiterpénica de *Eremanthus elaeagnus* que afecta al tremátodo *Schistosoma mansoni* (Wagner, 1983).

Un estudio muy reciente muestra actividades farmacológicas: cómo analgésico, anti-úlceras y sedante de un extracto obtenido de las hojas de *Vernonia condensata* (Frutuoso, 1994)

Las lactonas sesquiterpénicas llamadas Glaucólidos tienen también propiedades interesantes tanto químicas como biológicas, en pruebas alimentarias en larvas de varias especies de insectos lepidopteros se ha demostrado que el Glaucólido-A altera de alguna manera el ciclo de vida del insecto; el Glaucólido-B aislado de *Vernonia eremophila* mostró actividad molucicida, también ha presentado actividad antibiótica en *Bacillus cereus* y *Stafilococcus aureus* (Gil, 1992)

Se encuentran pocos estudios donde han aislado Glaucólido-E , de *Vernonia uniflora* (Betrousky, 1975) , *Vernonia liatroides* DC (Maldonado, 1980). y *Vernonia salicifolia* (Gil, 1992) y ningún estudio reportado en la literatura acerca de que presente alguna actividad biológica.

En estos antecedentes se pueden observar algunas actividades biológicas que presentan ciertas lactonas sesquiterpénicas extraídas de plantas del género *Vernonia* y también algunas propiedades biológicas que presentan otros Glaucólidos, moléculas químicamente mas parecidas al Glaucólido-E. En base a esto se plantearon los objetivos generales de este trabajo.

OBJETIVOS

1. Extracción, aislamiento y purificación de metabolitos secundarios de *Vernonia salicifolia* e identificación del compuesto cristalizado mas abundante.
2. Determinación de posibles actividades biológicas del compuesto aislado Glucólido-E, mediante una serie de bioensayos definidos.

METODOLOGIA

La metodología de éste trabajo consta de dos partes, una química (extracción del producto natural) y una biológica (bioensayos).

EXTRACCION DEL PRODUCTO NATURAL

Vernonia salicifolia fue colectada a 6 km al sur de Cuautla, Morelos; 396 g de la parte aérea de la planta se sometieron a un tratamiento de extracción con diclorometano durante 24 h a temperatura ambiente y concentrado en una destilación sencilla hasta obtener aproximadamente 300 ml de extracto lo que posteriormente se pasó a un rotavapor para desecarse, este procedimiento se realizó tres veces en total, de las cuales se obtuvieron finalmente 59.4 g de extracto concentrado y seco.

La cantidad total de extracto seco se pasó por una columna empleando como soporte 800 g de gel de sílice; la columna se eluyó con diferentes proporciones en orden creciente de polaridad, de hexano-diclorometano.

Todas las fracciones se analizaron por cromatografía en placa fina (ccf), eluyendo con 95% diclorometano y 5% acetona.

De las fracciones eluidas con hexano-diclorometano (1:9) se obtuvo un compuesto sólido, fue purificado por cristalización, se eliminaron las ceras por medio de filtración en caliente y se recristalizó con éter isopropílico, sometido después a una cristalización fraccionada obteniéndose un punto de fusión final de 144-145 °C.

Por medio de las propiedades físicas y datos espectroscópicos de la muestra cristalizada, se determinó que el compuesto aislado es una lactona sesquiterpénica, de la familia de las Germacranólidas, llamada Glaucolido-E (Gil, 1992).

EXTRACCION DEL PRODUCTO NATURAL

**Colecta de la parte aerea de
Vernonia salicifolia en el
municipio de Cuautla Edo. de
Morelos**



**Extracción de 396 g de hojas secas
de *V.salicifolia* con diclorometano**



**Cromatografía en columna de sílice del extracto
eluyendo con hexano-diclorometano en
orden creciente de polaridad**



**Obtención del compuesto de las fracciones
eluidas con hexano-diclorometano (1:9)
y purificación por cristalización**



**Determinación
punto de fusión**

**Espectroscopía
de RMN**

**Pruebas de actividad
biológica**

El siguiente paso fue hacer pruebas de solubilidad para iniciar la experimentación biológica. Los solventes utilizados en éstas pruebas fueron los siguientes: DMSO en concentración de 0.05ml/5ml o acetona en soluciones con agua, en pruebas *in vivo* con ratones se suspendió en aceite de maíz.

BIOENSAYOS

El Glucólido-E ya determinado, fue sometido a las siguientes pruebas biológicas:

- 1) Germinación de semillas
- 2) Síntesis de proteínas en la germinación de semillas
- 3) Prueba en raíces
- 4) Antibiosis
- 5) Prueba antimicótica
- 6) Actividad Moluscicida
- 7) Prueba antialimentaria en larvas de insecto
- 8) Citotoxicidad
- 9) Determinación de la toxicidad aguda preliminar en ratón
LD₅₀
- 10) Prueba sobre actividad motora
- 11) Prueba de Analgesia
- 12) Prueba de umbral al dolor por medio de la platina caliente
- 13) Prueba cómo antiespasmódico en músculo liso
- 14) Actividad en inducción de sueño
- 15) Actividad anticonvulsiva
- 16) Efecto sobre espermatozoides

GERMINACION DE SEMILLAS

De una diversidad de partes de plantas : semillas, frutos, savia de hojas, bulbos y raíces se pueden extraer sustancias que inhiben la germinación. Algunos de éstos inhibidores que ocurren naturalmente han sido identificadas sustancias químicas específicas cómo: amoniaco, ac. cianhídrico, etileno, aceites esenciales, ac. orgánicos no saturados, alcaloides y lactonas entre otras.

La existencia de éstas sustancias en las plantas no significa necesariamente que tienen un papel esencial en el control de la germinación de las semillas. Sin embargo, desempeñan un papel ecológico importante cuando se presenta éste fenómeno llamado alelopatía al inhibir la germinación o crecimiento de otras especies (Hartman, 1979).

En este bioensayo se utilizaron varias concentraciones del Glaucólido-E para determinar si alguna de ellas inhibe la germinación de semillas.

Tratamiento de imbibición con Glaucólido-E durante 2horas

25 semillas en 100 partes por millón (ppm) +DMSO

25 semillas en 50 ppm + DMSO

25 semillas en DMSO 0.05 ml por cada 5 ml de agua (testigo)

25 semillas en agua (testigo)

Después se pasaron las semillas a cajas petri sobre papel filtro (Whatman No 1) humedecido con 5 ml de la solución del tratamiento que tuvieron las semillas en cada caso, las cuatro cajas del bioensayo se etiquetaron y se observaron cada 24 h durante tres días y al término de este periodo se obtuvo el porcentaje de germinación.

SINTESIS DE PROTEINAS EN LA GERMINACION DE SEMILLAS

Cuando la semilla seca embebe agua aparece en el embrión la Gibberelina (hormona vegetal del crecimiento) y es translocada a la capa de aleurona (capa exterior del endospermo) donde activa a las enzimas. Una de esas enzimas la α -amilasa se mueve al endospermo (tejido no viviente de almacenamiento, formado principalmente por almidón) haciendo que el almidón se convierta en azúcar (Hartman,1979).

En este caso utilizamos una solución de lugol para detectar la presencia de almidón en el medio de cultivo durante la germinación, lo cual indicaría indirectamente la síntesis de proteínas (Taboada, comunicación personal).

En un medio de cultivo compuesto de 2% agar y 0.05% de almidón soluble dentro de cajas petri previamente etiquetadas, se colocaron 25 semillas en cada caja, las cuales habían pasado durante 2 h por un tratamiento de imbibición con las concentraciones del Glaucólido-E de 50 y 100 ppm y testigos igual al bioensayo anterior.

Se revisaron después de 24 h y se les aplicó el método de colorante indicativo de almidón con lugol (Gaviño,1975) para comprobar si hay o no síntesis de proteínas, si no hay síntesis de proteínas el almidón queda intacto y toma una coloración azul.

PRUEBA EN RAICES

En 1935 Went demostró que las auxinas juegan un papel importante en la formación y crecimiento de raíces en plantas, mas tarde sugirió que algunos cofactores adicionales son requeridos para estimular el enraizamiento, desde entonces varios investigadores han reportado la presencia de estimulantes endógenos para la formación y desarrollo de raíces (Osawa, et al. 1971) con tal motivo este bioensayo se hizo sobre cebollas de cambray.

El primer paso fue hacer tres repeticiones solo con agua, colocando la cebolla en un vaso de precipitado de 20 ml sumergiendo solo la placa basal y esperar los resultados en 24 y 48 h, comprobando así que si presentaban enraizamiento, se procedió a probar con diferentes concentraciones de Glaucólido-E : 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, DMSO/agua (testigo) y agua (testigo), primero con una repetición y después con 5 repeticiones de cada dosis. Se observaron cada 24 h y se cuantificó hasta el sexto día en que se midieron y contaron las raicillas y así poder determinar si el Glaucólido-E de alguna forma estimula la formación y/o desarrollo de raíces.

ANTIBIOSIS

Con métodos *in vitro* se puede determinar la acción microbiana de drogas sobre cultivo de microorganismos (bacterias u hongos) y así puede estudiarse la acción bacteriostática (detención del crecimiento) y bactericida (muerte) pero en general se acostumbra estudiar la primera, en esta forma se determina lo que se denomina espectro antimicrobiano, es decir el conjunto de microorganismos susceptibles o sensibles a la droga.

Una de las pruebas mas sencillas y muy empleada en clinica consiste en utilizar discos de papel filtro impregnados con la droga y que se colocan sobre el cultivo sólido, el efecto antimicrobiano se determina midiendo la zona de inhibición de crecimiento producida en forma de halo, el ensayo de denomina método del disco (Litter, 1986).

En este caso se preparó el medio de cultivo para antibiótico (No 1 de Grove y Randal marca Bioxón) según especificaciones del fabricante, 25 ml del medio se pusieron en cajas petri esterilizadas y se colocaron en la estufa a 37 °C durante 24 h, transcurrido ese tiempo se determinó que el medio nutritivo no estaba contaminado, se guardaron en refrigeración hasta el momento de la siembra de las bacterias.

A discos de papel filtro (Whatman No 42) con diámetro de 0.6 mm llamados sensidiscos, se les puso una determinada cantidad del producto natural que se está probando, previamente disuelto en 1 ml de acetona (la cual se deja evaporar completamente del sensidisco) los sensidiscos testigos se prepararon solo con solvente.

Con todas las medidas de seguridad e higiénicas (para evitar contaminación) se sembraron las bacterias en las cajas y a cada una se le colocó tres sensidiscos sobre la siembra, cada sensidisco con diferente concentración del producto y un testigo, siempre verificando que el lado del sensidisco con el Glaucólide-E estuviera en contacto directo con las bacterias, se metieron en la estufa a 37 °C durante 24 h y se observó si existía inhibición de crecimiento alrededor de los discos.

En esta prueba se utilizaron cepas de bacterias *Escherichia coli* y *Staphilococcus aureus*.

PRUEBA ANTIMICOTICA

Se utilizó la misma metodología que el bioensayo anterior (antibiosis) con excepción de que las cajas petri con el medio nutritivo, se dividieron en tres zonas con un espacio entre ellas ya que en cada una se sembró un hongo diferente y sobre cada zona sus sensidiscos respectivos.

Las especies de hongos utilizados para la prueba se muestran en el siguiente cuadro:

Hongo filamentoso	Actividad
<i>Trichoderma viride</i>	Celulolítico
<i>Absidia cilindrospora</i>	Amilolítico
<i>Aspergillus terreus</i>	Degradador general
Levadura	
<i>Candida albicans</i>	Potencialmente patógeno

ACTIVIDAD MOLUSCICIDA

El control de los caracoles que actúan como vectores de enfermedades parasitarias de humanos y de algunos animales de importancia económica representa un medio efectivo y rápido para transmitir parásitos como: *Schistosoma mansoni* y *Fasciola hepática*. Estudios recientes ha demostrado que la aplicación de moluscicidas sintéticos afecta seriamente el habitat de los moluscos de agua dulce actuando como biocidas reciduales que eliminan flora y fauna asociados con los caracoles que se desean eliminar. Por esto es que se ha incrementado el interés por el estudio de extractos o productos aislados de plantas, para emplearlos como moluscicidas con la esperanza de que sean efectivos, menos contaminantes, baratos y a la vez se apliquen con técnicas simples (Cruz-Reyes, 1989).

En este caso el Glaucólido-E se trabajó en soluciones acuosas de la siguiente forma: Se pesó la cantidad necesaria del sólido cristalino para diferentes concentraciones 100, 50 y 25 ppm (para 200 ml de agua desclorinada) cada una fue disuelta en 1 ml de acetona dentro de cristalizadores con capacidad de 250 ml humedeciendo todas las paredes del recipiente hasta que el solvente se evaporara y quedara impregnado el producto, posteriormente se le puso el agua correspondiente. Para cada concentración se utilizaron 10 caracoles adultos por recipiente, mas el control, al cual se le agregó la misma cantidad de acetona (que se dejó evaporar) y agua desclorinada. Durante el periodo de exposición al Glaucólido-E, los cristalizadores se cubrieron con una tapa de vidrio y se mantuvieron a temperatura ambiente. En ningún caso los caracoles se alimentaron durante el experimento, las observaciones se hicieron a las 6 y a las 24 h , después de este periodo se colocaron en otro recipiente conteniendo el mismo volumen de agua para observar posible recuperación.

Se probaron dos especies de caracoles: *Melanoide tuberculata* colectados en el estado de Hidalgo, y *Physella sp* colectados en la planta tratadora de agua en Ciudad Universitaria (UNAM).

PRUEBA ANTIALIMENTARIA EN LARVAS DE INSECTO

Algunas lactonas sesquiterpénicas impiden que algunas especies de insectos se alimenten de las plantas que las poseen, de esta forma podrían ser utilizadas como control de plagas que no sean tóxicas para otras especies de seres vivos (obregón, 1986).

Se probó la actividad del Glaucólido-E sobre larvas jóvenes y larvas maduras (después del tercer estadio) del insecto *Spodoptera frugiperda* o gusano cogollero del maíz, donadas por el CEPROBI, IPN de Yauatepec morelos.

La prueba entomológica se llevó a cabo siguiendo el método descrito por M. Kato et.al. (1972) ligeramente modificado: En cajas de petri se colocaron trozos de 6 X 4 cm de hojas tiernas de maíz en el caso de las larvas mas pequeñas y de pasto común en en larvas de mayor tamaño (esto es indistinto para su alimentación) que fueron sumergidas durante 10 segundos en la solución acetónica de 100, 50 y 25 ppm con Glaucolido-E. Las hojas testigo se sumergieron en acetona de igual manera que las experimentales; luego las hojas se dejaron secar al aire. Junto con el alimento tratado, en cada caja petri se colocó una larva de insecto (Guerrero, 1990).

De cada dosis se hicieron dos pruebas y dos mas cómo control tratadas únicamente con solvente.

CITOTOXICIDAD

En un estudio de la relación estructura-actividad entre las lactonas sesquiterpénicas se observó que la presencia de un doble enlace exocíclico en C₁₁ - C₁₃ conjugado con la γ -lactona era esencial para la actividad citotóxica (Kupchan,1970)). Para determinar esta actividad se utilizó el bioensayo propuesto por Mayer, et.al. en 1982 el cual se basa en la comparación de sus resultados con *Artemia salina* con los obtenidos al probar diferentes líneas celulares.

Se preparó el medio para el cultivo del crustaceo con solución salina al 35% y en un pequeño estanque (el cual tenía cubierta la mitad) se colocaron huevos de *Artemia salina* en la parte oscura y se mantuvieron a una temperatura de 24-25 °C aproximadamente y se incubaron por 48 h, al término de este tiempo se colocó una lámpara sobre el estanque y las larvas con fototropismo positivo pasaron a la parte iluminada del estanque , estando listas así para la prueba con el producto natural.

Se utilizaron tres concentraciones diferentes del Glaucólido-E, 100, 50 y 25 ppm en solución salina y DMSO usado como solvente; los testigos fueron DMSO/solución salina y otro con solución salina únicamente.

En viales de 10 ml, se pusieron 7 ml de cada concentración y testigos, con tres repeticiones cada una. A cada vial se le puso 10 larvas, quedaron bajo la luz (cuidando la temperatura adecuada) y se cuantificó la mortalidad a las 24 h.

Los resultados se extrapolaron en el programa de computación de Finney Purde (Meyer, 1982)

DETERMINACION DE LA TOXICIDAD PRELIMINAR AGUDA EN RATON LD₅₀

Cuando se emplean animales para probar la actividad biológica de un compuesto, es necesario determinar su toxicidad, como al principio se desconoce por completo la dosificación, se administran varias dosis hasta alcanzar la "dosis máxima tolerada" esto es, el límite al que ocurre la toxicidad (Madroño, 1980).

Para esta prueba preliminar se determinaron dos concentraciones 100 y 50 mg/kg y se suministraron en ratones por dos vías diferentes: intraperitoneal y subcutánea.

El Glaucólido-E se preparó en suspensión con aceite de maíz, a dos ratones se les puso 100 ppm vía intraperitoneal y a otros dos la misma dosis vía subcutánea, lo mismo se hizo con la dosis de 50 ppm. Se observaron minuciosamente durante una hora, y se mantuvieron en observación durante 10 días.

PRUEBA SOBRE ACTIVIDAD MOTORA

Para esta prueba solo se hicieron anotaciones del comportamiento motor y otras reacciones como acicalamiento, velocidad de la respiración, comeción estiramientos y convulsiones en el ratón, durante el bioensayo preliminar sobre toxicidad aguda, como posibles respuestas que nos dieran una pauta para la investigación posterior.

PRUEBA DE ANALGESIA

El manejo del dolor es un problema típicamente interdisciplinario, que va desde el empleo de sustancias químicas de fácil administración hasta procedimientos neuroquirúrgicos muy sofisticados; en el mayor porcentaje de los casos se le puede controlar con fármacos capaces de inducir un estado de analgesia. Existen varios modelos en la experimentación farmacológica, en este caso se utilizó la administración de una sustancia que produce espasmos abdominales (que consideramos como dolor) llamada fenilquinona y se cuantificó con el número de espasmos (que se manifiestan como estiramientos) producidos (Hndershot and Forsaith, 1959)

Se preparó una suspensión de fenilquinona en concentración de 10 mg/kg de peso del ratón para producir dolor, en un volumen no mayor a 0.25 ml de aceite de maíz, se suministró al ratón por vía intraperitoneal y se observaron modificaciones en su conducta por un periodo de 15 min haciendo anotaciones cada 5 min (dos repeticiones como control). El Glaucolido-E se suministró en suspensión con aceite de maíz diferentes concentraciones por kg de peso del ratón menores a la concentración determinada como LD50: 50 mg/kg vía intraperitoneal y 100 y 50 mg/kg vía subcutánea en un volumen no mayor a 0.25 ml; 30 minutos después se le inyectó a cada ratón la misma cantidad de fenilquinona que en los controles y se observaron modificaciones en su conducta también por un periodo de 15 minutos haciendo registros cada 5 min.

PRUEBA COMO ANTIESPASMÓDICO EN MUSCULO LISO

Las infusiones de plantas con efectos antiespasmódicos son muy utilizados en la medicina tradicional practicada en diferentes regiones del mundo. Los compuestos que ha ejercido un efecto relajante sobre el músculo liso dentro de los productos naturales están los alcaloides derivados como la belladona y algunos compuestos terpenoides (Hernández-Falcón, 1991).

La prueba antiespasmódica se hizo *in vitro* utilizando segmentos de 1 cm de largo de ilion (tejido liso) de una rata Wistar de 509.97 g de peso. Después de la disección y extracción del tejido, tres porciones de éste fueron mantenidas en cámaras con un baño de solución de Krebs pH 7.3 y a 37 °C (Hernández-Falcón, 1991). Cada porción de ilion se colocó en una cámara diferente conectadas a un fisiógrafo (Grass Model 790) para medir la actividad mecánica espontánea, provocamos contracciones al tejido con una solución de 0.1 ml de acetilcolina por 10 ml de Krebs en la cámara con capacidad de 30 ml y se tomaron datos de sensibilidad calibrando el Polígrafo a 2cm-2g.

Ya calibrado el fisiógrafo se registró una curva patrón (dosis-respuesta) con acetilcolina de la siguiente forma:

- 15 minutos con el tejido en estado basal
- 5 minutos con acetilcolina a 10^{-8} M
- 5 minutos de lavado con solución de Krebs
- 5 minutos con acetilcolina a 10^{-7} M
- 5 minutos de lavado
- 5 minutos con acetilcolina a 10^{-6} M
- 5 minutos de lavado
- 5 minutos con acetilcolina a 10^{-5} M

Obtenida la curva dosis-respuesta se procedió a usar la sustancia prueba (Glaucólido-E) en una concentración de 10^{-3} M en solución de Krebs, poniendo 0.1 ml por cada 10 ml en la cámara, se registró el dato durante el lapso de 2 min inmediatamente después de éste tiempo se le aplicó la primera concentración de acetilcolina de 10^{-8} M y se registró durante 10 minutos, haciéndose así la curva experimental del Glaucólido-E con las diferentes concentraciones de acetilcolina.

ACTIVIDAD COMO INDUCTOR DE SUEÑO

Las sustancias que se han utilizado como inductores del sueño son de diversa estructura química. Los barbitúricos introducidos hace más de 50 años, son considerados como prototipos de éstos fármacos. Sin embargo, debido a efectos indeseables tales como habituación y dependencia física que producen, su uso ha ido decreciendo. Actualmente el interés es el estudio de otros compuestos que ofrezcan ventajas y que no tengan efectos colaterales perjudiciales (Ayala-Guerrero, 1990).

El experimento se llevó a cabo en dos ratas Wistar adultas, entre 300-400g de peso, aparentemente sanas, de sexo masculino. Bajo anestesia general con pentobarbital sódico, (50 mg/kg ip), se implantaron epiduralmente dos pares de electrodos de acero inoxidable para registrar la actividad eléctrica de las regiones frontal y occipital del cerebro. La actividad ocular se registró por medio de electrodos colocados sobre el hueso supraorbitario; se procedió igual para registrar el EMG de los músculos de la nuca.

Los animales se dejaron recuperar de la intervención quirúrgica por un período mínimo de una semana, después se colocaron en una cámara sonomortiguadora a temperatura y luz constante con agua y comida, para registrar su ciclo vigilia-sueño mediante un polígrafo Grass modelo 111D de 8 canales (Ayala-Guerrero, 1990), primeramente se hizo un registro control bajo condiciones normales durante 10 horas continuas (diurnas), 24 horas después se inyectó el Glaucólido-E por vía intraperitoneal a dosis de 3 mg en 0.5 ml de aceite de maíz, registrándose inmediatamente después de manera semejante al control.

Los registros se analizaron visualmente, identificándose las deferentes etapas del ciclo vigilia-sueño. El tiempo total de cada una de ellas se midió manualmente obteniendo así su duración promedio en condiciones del control y bajo el efecto del producto administrado.

ACTIVIDAD ANTICONVULSIVA

En este caso el interés es estudiar si la administración del Glaucólido-E, protege de las convulsiones inducidas por el metrazol (Campos, 1992).

Se emplearon ratones del sexo masculino de 30-35 g de peso, al control se le administró metrazol en dosis de 90 mg/kg via subcutanea, se anotó la latencia de la primera convulsión generalizada, el número de convulsiones y la latencia a la muerte inducida por esta sustancia (Campos, et al., 1992), teniendo el registro se procedió a inyectar en el organismo experimental la suspensión de Glaucólido-E a 50 mg/kg en peso, via intraperitoneal, después de 30 minutos recibieron via subcutanea la misma dosis de metrazol que el control y se cuantificaron las convulsiones inducidas por un periodo de 20 minutos y se mantuvo en observación durante 24 horas.

PRUEBA DE UMBRAL AL DOLOR POR MEDIO DE LA PLATINA CALIENTE

Dentro de las pruebas utilizadas para determinar analgesia se encuentra ésta, en la cual se experimentó estimulando las terminaciones nerviosas sensitivas termicamente, por medio de una platina caliente cómo prueba de umbral al dolor.

La dosis preliminar utilizada fue de 25 mg/kg en suspensión de aceite de maíz, administrada intraperitonealmente, a los controles se les administró el vehiculo por la misma vía. Cada lote contó con 10 organismos, ratones machos de 25g de peso en promedio.

La temperatura de la platina se mantuvo a 55 ± 0.3 °C y se colocó a cada ratón por intervalos de 30 y 65 minutos, la permanencia del ratón sobre la platina y las mediciones que se hicieron en tiempo dependían de cuatro modificaciones en su conducta fundamentalmente : 1a. levantar una pata, 2a. Lamerse la parte en contacto al calor, 3a. Erguirse, buscar salida y 4a. Escape, brinco.

PRUEBA SOBRE ESPERMATOZOIDES

La importancia que actualmente tiene el control de la natalidad en países cómo el nuestro, el hecho de que se han probado extractos acuosos de plantas para determinar su efecto sobre espermatozoides cómo lo es el de *Echeveria gibbiflora* de la familia Crassulaceae utillizado tradicionalmente cómo lavado vaginal postcoital (Taboada, 1992) y a pesar de que no se tienen reportes de *Vernonia salicifolia* para este uso, se experimentó por esta linea.

Se utilizaron espermatozoides de ratón CD1 extraídos de la cola del epidídimo, se lavaron con Ham F-10 una sola vez y en una gota sobre un portaobjetos se observó al microscopio (40X), esto fue para la muestra control, a los experimentales se les agregó Glacólido-E en concentración de 150 µg/ml y en una gota sobre el portaobjetos se observó al microscopio.

RESULTADOS Y DISCUSION

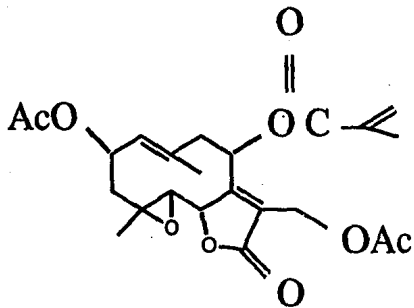
Los resultados de la fase química alentaron a la experimentación biológica ya que de *Vernonia salicifolia* se aisló una lactona sesquiterpénica miembro de la serie de los Glaucolidos, el Glaucolido-E, en cantidad de 39.1g de los 59.4g de extracto concentrado, esta cantidad es sorprendente y muy importante para los objetivos primordiales de la química de productos naturales, donde se busca que la planta sea constante en su metabolismo y que la cantidad de metabolitos secundarios sea suficiente tanto para el análisis químico como el biológico (Gil, 1992).

El Glaucolido-E fue identificado como tal, en base a sus propiedades físicas y datos espectroscópicos (fig. 2).

En las pruebas de solubilidad se observó que este producto natural es insoluble en agua, en propileno glicol y en tetraetileno glicol. La insolubilidad en agua (común en metabolitos secundarios) nos provoca ciertos problemas al experimentar con organismos vivos, pero manteniendo el registro del control con el solvente utilizado algunas pruebas pueden llevarse a cabo.

Una de las pruebas preliminares que tuvieron resultados considerables es el bioensayo entomológico con orugas del insecto *Spodoptera frugiperda* o gusano cogollero de maíz, en donde se puede ver (tabla1) que a la concentración de 50ppm y de 100ppm no hubo modificaciones en su alimentación, sin embargo en las larvas de mayor grado de desarrollo, hubo diferencias en mortalidad y en su metamorfosis a adulto con respecto al lote control ya que los adultos del lote experimental nunca desplegaron totalmente las alas, lo que les impide volar, a esto le llamé malformación.

GLAUCOLIDO -E



**Fig. 2 Estructura Química de la Lactona sesquiterpénica
Glaucólido-E
P.f. 144-145 °C**

Tabla 1. Resultados del bioensayo entomológico del Glaucolido-E sobre el insecto *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero de maíz) durante sus estadios de larva-pupa-adulto.

Dosis	Larvas que comieron	Larvas que puparon	Adultos que emergieron	Malformaciones
control	100%	100%	75%	0
50ppm	100%	100%	20%	0
100ppm	100%	100%	66%	16%

Es recomendable continuar la investigación de los productos naturales por esta línea debido a los adelantos en la química de los insectos. A partir del estudio de compuestos aislados de los insectos llamados feromonas y hormonas responsables entre otras cosas de la metamorfosis (Quijano, 1981), se hace interesante determinar si esos compuestos aislados tienen estructuralmente alguna semejanza con otros productos extraídos de plantas y si se relacionan de alguna manera con el comportamiento y desarrollo o en la interacción insecto-planta.

Se han reportado metabolitos secundarios, como la Grandiflórída-A (un diterpeno) con actividad como disuacivo de la alimentación también en cogollero de maíz (Guerrero, 1990) y con los mismos resultados se probó la marrubina (Gil, 1992).

Usar productos naturales de toxicidad baja para los mamíferos y que afecten solo a los insectos que atacan a un cultivo y que no dañan a otros insectos tienen muchas ventajas para ser usados como control de plagas que afectan gravemente a la agricultura y a la economía, sin contar que los plagicidas comúnmente usados son altamente tóxicos.

Por otro lado, en este trabajo se determinó que la LD50 preliminar en ratones para el Glaucolido-E está dentro del rango de 50-100 mg/kg vía intraperitoneal y mas de 100mg/kg vía subcutanea. Durante esta prueba se observaron las posibles respuestas en el organismo al administrarle el producto(Tabla 2)

Tabla 2. Conducta observada en ratones durante la prueba preliminar de toxicidad aguda, en dosis de 50 y 100 mg/kg del Glaucolido-E, administradas por vía intraperitoneal y subcutanea.

DOSIS	Via intraperitoneal	Via subcutanea
50ppm	Aletargamiento Poca movilidad Respiración acelerada Poca respuesta a estímulos Recuperación después de 1h Sed y acicalamiento	Acicalamiento Comezón en la zona inyectada Aparentemente normales
100ppm	Respiración acelerada Convulsiones Poca movilidad Muerte	Acicalamiento Comezón en la zona inyectada Aparentemente normales

La LD50 obtenida en esta prueba nos permitió determinar las dosis para la experimentación *in vivo* en ratones.

Partiendo de la premisa de que a pesar que la analogía entre las enfermedades humanas y los modelos animales puede ser muy superficial y la selección de farmacos en animales puede no revelar una acción útil o sugerir falsamente mucha utilidad, los resultados preliminares como analgésico del Glaucolido-E son alentadores para continuar con la experimentación ya que es un inicio de investigación farmacológica.

Se pueden llevar a cabo en animales pruebas empíricas de "analgésia" aunque no se sabe con seguridad si sienten el dolor en la misma forma que nosotros (Madroño, 1980.)

Se realizaron dos pruebas de analgesia: la primera basada en la administración de fenilquinona que produce espasmos abdominales (manifestándose como estiramientos) obteniéndose que por vía subcutánea no hubo diferencia en el número de estiramientos producidos respecto a los controles, sin embargo, la prueba por vía intraperitoneal (tabla 3) nos muestra un efecto positivo del Glaucolido-E a dosis de 50 mg/kg sobre la fenilquinona . En este caso debe seguirse la biovaloración con dosis mas bajas ya que de alguna manera reduce espasmos abdominales lo que traducimos a disminución de dolor.

Los modelos utilizados para determinar un producto como probable analgésico son muchos, aquí se experimentó también estimulando térmicamente las terminaciones nerviosas sensitivas por medio de una platina caliente como prueba de umbral al dolor, éste estímulo es mas directo que el de la fenilquinona, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4. donde las prueba estadística realizada a los resultados nos lleva a pensar que nuestro producto puede elevar el umbral al dolor (el cual es la resultante de un complicado mecanismo y puede ser producido por toda una gama de causas, en su mayor parte el daño celular constituye una etapa importante en la cascada de reacciones que conducen finalmente a la sensación del dolor).

La biovaloración farmacológica en esta prueba se considera muy importante por los claros resultados de la prueba preliminar ya que en promedio los ratones inyectados con Glaucólido-E permanecieron mas tiempo en la fuente de calor que les estaba provocando el dolor.

Tabla 3. Cuantificación durante tres periodos de 5 min de las contracciones inducidas por la administración de fenilquinona via intraperitoneal a dosis de 2mg/kg (control) y los cambios producidos por la aplicación del Glaucólido-E administrado 30 min antes en concentración de 50mg/kg via intraperitoneal (experimental: Glaucólido-E + fenilquinona)

Dosis mg/kg	Numero total de estiramientos		
	0 - 5 min	5 - 10 min	10 - 15 min
control	-	2	4
control	2	2	4
50	1	1	-
50	-	-	-
50	-	1	-
50	1	1	1

Tabla 4. Prueba de umbral al dolor por medio de la platina caliente, administración de 25mg/kg del Glaucofólido-E via intraperitoneal, en donde podemos observar que se eleva el umbral a los 30 min de su aplicación, principalmente en la reacción de escape, habiendo diferencias también en la reacción de búsqueda de salida a los 30 y 65 min, con respecto al lote control. La prueba estadística es la de t de student de dos colas (Ostle,1965)

Reacción	Levantar una pata		Lamerse la parte en contacto al calor		Buscar salida erguirse		Escape	
	30	65	30	65	30	65	30	65
Tiempo (min)	30	65	30	65	30	65	30	65
n	9	9	10	7	10	10	10	10
\bar{X} (s)	3.6	2.6	8.61	7.4	16.44	6.59	64.54	25.94
n	9	7	9	7	9	9	9	9
\bar{X} (s)	3.01	2.68	6.14	6.96	51.8	29.61	114.18	58.98
t	-0.95	-0.10	-1.61	-0.25	-2.53	-1.99	-3.02	-1.72
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0.025	p<0.05	p<0.005	n.s.

Control

EXP.

Si consideramos que fertilizar un óvulo es el destino biológico de un espermatozoide y si de alguna manera se llega a interrumpir esa vía, inmovilizándolos o matándolos, se puede pensar entonces en un Anticonceptivo. El Glaucólido-E tiene un efecto marcado a dosis de 150 $\mu\text{g/ml}$ inmovilizando espermatozoides, cómo se puede ver en la tabla 5.

Tabla5. Resultados en porcentaje de la movilidad de los espermatozoides de ratón, observada durante el tratamiento con Glaucólido-E en dosis de 150 $\mu\text{g/ml}$.

Tiempo (min)	Control % movilidad	Glaucólido-E % movilidad
0	57	45
10	58	42
20	57	17
30	56	0
40	52	0

Observamos en los resultados que el Glaucólido-E inmoviliza totalmente a los espermatozoides de ratón en 30 minutos notándose la disminución de movilidad desde los 10 minutos. Hacer la prueba con celulas gaméticas masculinas de humanos es el siguiente paso para continuar con esta investigación y así poder considerarlo cómo un anticonceptivo, muy útil, debido al ya muy conocido problema demográfico de nuestro País y muchos mas de America Latina y del Mundo

En el tipo de pruebas biológicas que pretenden una vía farmacológica se debe ser muy objetivo y tomar con calma los resultados, obviamente se necesitan muchas pruebas mas para determinar si este producto tiene algún efecto analgésico o cómo anticonceptivo local, pero así se inician muchas investigaciones a pesar de los problemas que se puedan tener con los modelos animales o modelos *in vitro*

A pesar de que en este caso no solo nos referimos a pruebas farmacológicas sino a pruebas biológicas en general, cabe mencionar que Malone y Ribichaud han marcado un perfil general cómo sigue:

"La premisa básica de un perfil farmacológico es no admitir solo una actividad biológica inicial sino seguir, porque se pueden llegar a inferir nuevas, inesperadas y únicas actividades biológicas. El perfil inicial debe inequívocamente establecer éstas actividades así cómo su probable naturaleza en orden para indicar el curso de características mas específicas en una evaluación farmacológica" (Farnsworth, 1966). Esto es muy importante porque aún existen muchas enfermedades humanas, de importancia agropecuaria, entre otras, que podrían ser tratadas con productos naturales .

Además de las enfermedades tenemos su utilidad en el mejoramiento de vegetales, aceleración o retraso de enraizamiento, control de plagas etc.

Por otro lado falta mencionar la pregunta de ¿para qué o porqué *Vernonia salicifolia* sintetiza tal cantidad de Glucólido-E ? pregunta muy interesante para la fisiología vegetal en donde podrían estar involucrados factores cómo la temporada de colecta, floración, estrés hídrico etc. no podría definirse en este estudio, pero sí son muchos gramos extraídos para un metabolito secundario.

Podemos aprovechar el hecho de que en México existen aún muchas especies de plantas de la familia Compositae entre muchas otras, que no han sido estudiadas tanto química cómo biológicamente.

CONCLUSIONES

1. De *Vernonia salicifolia* se aisló un producto natural identificado como Glaucólido-E, de fórmula estructural $C_{23}H_{28}O_9$
Con un punto de fusión de 144-145 °C y fórmula estructural presentada en la fig.2
2. De los diferentes bioensayos a los que fue sometido el Glaucólido-E, en cuatro de ellos vale la pena continuar con la investigación, ya que la actividad biológica en las otras pruebas fue negativa.
 - a) El bioensayo entomológico con orugas del insecto *Spodoptera frugiperda* mostró diferencias significativas en mortalidad y desarrollo anormal, a dosis de 50 y 100 ppm de Glaucólido-E, con respecto al lote control.
 - b) Como prueba de analgesia, los espasmos abdominales en ratones, provocados por la fenilquinona se redujeron al suministrar Glaucólido-E, a dosis de 50 mg/kg vía intraperitoneal.
 - c) También el Glaucólido-E mostró actividad biológica como analgésico en la prueba preliminar elevando el umbral al dolor por medio de la platina caliente, en dosis de 25 mg/kg vía intraperitoneal a 30 y 65 minutos de ser administrado.
 - d) Los espermatozoides de ratón se inmovilizan completamente en un periodo de 30 minutos al aplicarles Glaucólido-E en dosis de 150 µg/kg.

Finalmente el estudio biológico de productos naturales merece mucha mas atención debido al gran número que se están aislando, sin embargo toda investigación que se requiera para esto debe seguir los objetivos planteados por el laboratorio o institución en los que se realice, en el caso actual del Instituto de Química de la UNAM por ejemplo es primordial una evaluación biológica a las nuevas estructuras y a aquellas que se han dejado solo en el paso del análisis químico; no se espera que todos los compuestos sean bioactivos, sin ver las cosas antropocéntricamente, ¿porqué pensar que la síntesis de metabolitos secundarios la hacen los vegetales "tratando" les sea útil al hombre? Biológicamente los resultados de una serie de pruebas de éste índole determinan en donde son o no activas ciertas sustancias resultados muy válidos cómo datos biológicos. No debemos conformarnos con un número determinado de pruebas, existen muchas mas que a otros investigadores, con otros medios e intereses les convendría realizar.

REFERENCIAS

- Alarcón M, Callegari J, Herz W. Glaucolide B, A Mollucida Sesquiterpene Lactone and other Constituents of Vernonia eremophila *Planta Med* 1990; 56 :
- Ayala-Guerrero F, Vargas-Reyna L, Taboada J, Martínez R, Cortés E. Effect of a thione on sleep disturbances associated with chronic pain *Gaceta Medica de México* 1990;126
- Betrousky M and Mabry T. J. Glaucolido-D and -E, two New Germacranólides from Vernonia uniflora SCH-BIP (compositae) *Rev. Latinoamer. Quim.* 1975; 6 :191-195.
- Blakeman J. P. and Atkinson, P. Antimicrobial properties and possible role in host - pathogen interactions of Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone isolated from glands Crysanthemum parthenium *Physiol. Plant. Pathol.* 1979; 15:183-192.
- Campos A., Sanvicente, L., Ayala-Guerrero, F., Alcántara, G., Martínez, R., Taboada, J. Anticonvulsant effect of the 7-(p-chlorophenyl)-8-phenoxi-4,5-benzo-3-aza-nonem *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 1992;35: 191-193.
- Cruz-Reyes et al Actividad Moluscicida del Piquerol - A aislado de Piqueria trinervia (compositae) *Mem. Inst. Oswald Cruz, Rio de Janelro*, 1989; 84: 32-40

- Cassady J. M. and Suffness, M. In: " *Anticancer Agents Based on natural Products Models.*" J.M. Cassady and J.D. Dourous, Academic Press, London 1980.
- Farnsworth N. *Biological and Phytochemical Screening of plants* *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1966 **3: 225-276.**
- Fischer et.al. in " *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*" Eds. W. Herz H. Grosback and G.W. Kirby. Springer, Wien 1979; **38:47-90**
- Frutuoso V, Gurjao M, Cordeiro R, and Martins M. *Analgesic and Anti-ulcerogenic effects of a polar Extract. from leaves of Vernonia condensata* *Planta Med.* 1994; **60: 21-25**
- García M., da Silva, A. J. R., Baker, P. M., Gilbert, B. and Rabí, J. A. *Absolute Stereochemistry of eremanthine Schistosomicidal sesquiterpene lactone from Eremanthus elaeagnus* *Phytochemistry* 1976;15: 331-332
- Gaviño G. *Técnicas biológicas de Laboratorio y de campo* Ed. Limusa México D.F. 1975; **25**
- Gil N. M. *Estudio químico de las plantas Conyza ef coulteri Marrubium vulgare y Vernonia salicifolia* (Tesis para obtener el título de Químico) UNAM México, D.F. 1992
- Golstein A., Aronow, L., Kalman, S.M. *Farmacologia* LIMUSA. México 1976 pp 1001.

- Guerrero C, Ortega, A., Camino, M. y Taboada, J. *Grandifilidas A y B de Cornutia grandifolia (CHAM SHAUER) Rev. Latinoamericana. Quim. 1990;2:88-90*
- Hall I.H., Starnes, C.O., Lee, K.H. and Waddell, T.G. *Mode of action of sesquiterpene lactones as antiinflammatory agents J. Pharm.Sci. 1980;69:537-543*
- Hartman H.T. *Propagación de plantas Cla. Ed. Continental Kester D. E. México 1979; 810*
- Hendershot L and Forsaith *Antagonism of the frequency of Phenylquinone-induced writhings in the mouse by weak analgesic and nonalgesics. J.Pharmacol.Exp. Ther. 1959; 125: 237-240*
- Hernández-Falcón J., Taboada J., Guerrero C., Campos-Lozada V., Fernández D., Fuentes-Pardo. *Relaxant effect of viguiepinol on smooth muscle in vitro Proc West. Pharmacol. Soc. 1991;34: 199-203*
- Kawase M. *Centrifugation, rhizocaline and rooting in Salix alba Physiol. Plant., 1964; 17: 855-865*
- Klayman D. L, Lin A.J., Acton N., Scovill J.P., Hoch,J.M.,Milhous W. K. TheoHarides D. and Dobek, A. S.. *Isolation of artemisinin (ginghaosu) from Artemisia annua growing in the United States J. Nat Prod. 1984; 47: 715-717*
- Kowalewsky Z., Keddzia W. and Komiar H. *Action of helenin.on microorganisms Arch. Inm. Ter. Exp. 1976; 24: 121-125*

- Kupchan S. M. *The Isolation Elucidation of two novel sesquiterpenoide tumor inhibitor from Elephantopus elatus*
J. Am. Chem. Soc. 1966; 88: 3674-3676
- Kupchan S. M. *Tumor inhibitors. recent advances in the Chemistry of terpenoid tumor inhibitors. Pure Appl. Chem. 1970; 21: 227-246*
- Lee K. H., Ibuta T., Wu R. Y. and Geissman T. A. *Structure antimicrobial activity relationships among the sesquiterpene lactones and related compounds* **Phytochemistry 1977; 16: 1177-1181.**
- Litter M. *Farmacología experimental y clínica* Ed. El Ateneo Buenos Aires, Argentina 1986; 1445-1446
- Lucas R.A., Rovinsky S., Kiesel. R.J., Dorfman L. and Mc Phyllamy H.B. *Sesquiterpene lactone with analgesic activity from Helium* **J. Org. Chem. 1964; 29: 1549-1554.**
- Madroño R. *Química Médica métodos fundamentales en la búsqueda de nuevos fármacos.* Alhambra, Mex. D.F. 1980; 423.
- Maldonado J. E., Martínez R., Martínez, U. M. *Glaucolides D and E de Vernonia liatroides* **Rev Latinoamer. Quím 1980;11: 58-59.**
- Martínez M. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de Plantas Mexicanas.* Fondo de cultura económica Mex. D.F. 1979; 38: 1199.

- Meyer B.N. *et.al.* *Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active plant Constituents.* **Planta Medica** 1982; 45: 31-34
- Misra R. and Pandey R. C. in: *Antitumor Compound of Natural Origin: Chemistry and Biochemistry.* Ed. Aszalos, 1981; 2: 145-192, CRC Press Boca Raton.
- Obregón L. *Química de las plantas: Zexmenia lantiniifolia y Montanoa sp* (Tesis. Para obtener el título de Farmacobiólogo). UNAM Mexico D. F. 1986
- Ostle B. *Estadística Aplicada* Limusa Mexico D.F. 1965
- Osawa T., Susuki A. and Tamura. *Isolation of Chrysartemins A and B as rooting cofactors in Chrysanthemum morifolium* Agr. Biol. Chem., 1971; 12: 1966-1972
- Pettit G. R. *Biosynthetic Products for Cancer Chemotherapy* Plenum Press, New York 1977
- Picman A.K. *Biological activities of sesquiterpene lactones* Biochem. System. Ecol. 1986;14: 255-281.
- Picman A.K. and Towers G.H.N. *Effects of the sesquiterpene lactone, halenin on feeding rates and survival of the tundra redback vole Clethrionomys rutilus* Biochem. System. Ecol. 1983; 11:321-327
- Picman A.K. and Picman J. *Effect of selected Pseudoguaianolides on survival of the flour beetle, Tribolium confusum* Biochem. System. Ecol. 1984; 12: 89-93

- Quijano L. . *La química de los insectos: La contribución Mexicana*
Ciencia 1981; 32: 215-225.
- Robert and Bryson *Reviewing the literature published between*
September 1981 and December 1982 **Natural Products**
Report 1984; 1: 105-169
- Rodríguez E., Towers G. H. N. and Mitchell J. C. *Review Biological*
Activities of Sesquiterpene Lactones **Phytochemistry**
1976; 15: 1573-1580.
- Romo de Vivar A. . *Productos Naturales de la Flora Mexicana*
LIMUSA Mex. 1985.
- Rzedowsky, J. *Vegetación en México* **LIMUSA 1983**
- Segal, S. J. *Gossypol a potential contraceptive for men.*
Plenum Perss, New York and London. 1985; 1-7
- Taboada J., Ortega A., Reyes, R. and Delgado N. M. *Inmobilizing/*
agglutination effects of crude extrac of Crassulaceae plants
on human sperm : screening atudy **ADV CONT DELIV**
1992; 8: 139-143
- Tellez-Martinez J, Taboada J, Gonzalez-Diddi M. *Citotoxicidad de*
Algunas Lactonas Sesquiterpenicas in vitro **Archivos**
de la Investigación Medica México D.F. 1980;
4: 435-443
- Vichnewsky W., Sarti S. J., Gilbert B. and Herz W. *Goyazensolide a*
schistosomicidal Heliangolide from Eremanthus goyazensis
Phytochemistry 1976; 15: 191-193.

Vida J. A. *Anticonvulsants* Academic Press, New York, 1977
San Francisco., London.

Wagner H. in: *The Biology and Chemistry of the Compositae.*
Academic Press. New York. 1983 Vol. I y II.

Went F. W. Proc.IV Internat.Bot.Congress,Amsterdam,1985

Went F.W. *Specific factors other than auxin effecting growth and
root formation* Plant Physiol. 1938;13: 55.