

2 00582



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *Buddleja perfoliata* y *Buddleja scordioides*.
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y
FOTOPROTECTORA DE SUS PRINCIPALES METABOLITOS
SECUNDARIOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A :
M. en C. JOSÉ GUILLERMO AVILA ACEVEDO

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALFONSO ROMO DE VIVAR ROMO

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2002

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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

DEDICATORIAS

Al gran maestro. A Lucy, Betsy, Belem y mi familia.

Al Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al programa PAPIIT-DGAPA IN210197 y al Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP108302) por financiar una parte importante de este trabajo.

Este trabajo fue realizado en el Instituto de Química de la UNAM.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE GRÁFICAS	IX
LISTA DE ESPECTROS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMEN	XV
ABSTRACT	XVII

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
--------------------	---

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES GENERALES Y JUSTIFICACIÓN.

I.1. ESTUDIOS FITOQUÍMICOS DEL GÉNERO <i>BUDDLEJA</i>	3
I.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.	4
I.3 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS RELACIONADAS CON EL PROYECTO.....	7
I.3.1 ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN VEGETAL.	7
I.3.1.1 Flavonoides.	8
I.3.1.2 Taninos.	8
I.3.1.3 Lactonas sesquiterpénicas.	10
I.3.1.4 Aceites esenciales.....	10
I.3.1.5 Ácidos de compuestos aromáticos simples.....	10
I.3.2 LA PIEL	11
I.3.3 EFECTOS DE LA RADIACIÓN UV EN LA PIEL.	15
I.3.4 FILTROS SOLARES... ..	19
I.4 JUSTIFICACIÓN.	23

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.1 HIPÓTESIS.....	24
II.2 OBJETIVOS.	24
II.2.1 OBJETIVOS GENERALES.....	24
II.2.2 OBJETIVOS PARTICULARES.	25

CAPÍTULO III

PARTE EXPERIMENTAL

III.1 METODOLOGÍA GENERAL PARTE QUÍMICA	26
III.1.1 EQUIPO USADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES FÍSICAS ESPECTROSCÓPICAS Y ESPECTROMÉTRICAS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS.	26
III.1.2 METODOS CROMATOGRÁFICOS.....	27
III.1.3 RECOLECTA Y SECADO.....	28
III.1.4 EXTRACCIÓN.....	29
III.1.4.1 EXTRACCIÓN DE <i>B. perfoliata</i>	29
III.1.4.2 EXTRACCIÓN DE <i>B. scordioides</i>	30
III.1.4.3 ACEITE ESENCIAL DE <i>B. perfoliata</i>	31
III.1.5 OBTENCION DE LOS PRINCIPALES METABOLITOS DE <i>B. perfoliata</i>	31
III.1.5.1 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO.....	31
III.1.5.1.1 ACETILACIÓN DE LA LINARINA.....	33
III.1.5.2 FRACCIONAMIENTO PREELIMINAR DEL EXTRACTO BUTANÓLICO.....	33
III.1.5.2.1 SEPARACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA FRACCION 50-103.....	34
III.1.5.3 BUSQUEDA DE SAPONINAS EN <i>B. perfoliata</i>	35
III.1.6 OBTENCION DE LOS PRINCIPALES METABOLITOS DE <i>B. scordioides</i>	37



III.1.6.1 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO METANÓLICO.....	37
III.1.6.2 AISLAMIENTO DE LA SYRINGINA Y DE O-METILCATALPOL.....	38
III.1.7 METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE LAS SAPONINAS DE <i>B. scordioides</i>	41
III.1.7.1 AISLAMIENTO.....	41
III.1.7.2 HIDRÓLISIS ÁCIDA DE LA MEZCLA DE SAPONINAS.....	43
III.1.7.3 ACETILACIÓN DE LA MEZCLA DE SAPONINAS.	43
III.1.7.4 AISLAMIENTO DE LOS DERIVADOS ACETILADOS.....	44
III.1.7.5 AISLAMIENTO DE SAPONINAS (SEGUNDO PROCESO).....	45
III.1.7.5.1 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO POLAR DE <i>B. scordioides</i> (SEGUNDO PROCESO)..	47
III.1.7.5.2 ACETILACIÓN DE LA MEZCLA DE SAPONINAS.....	49
III.1.7.5.3 SEPARACIÓN DE LOS DERIVADOS ACETILADOS.....	49
III.2. METODOLOGÍA GENERAL PARTE BIOLÓGICA.....	52
III.2.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS Y DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE <i>B. perfoliata</i> y <i>B. scordioides</i>	52
III.2.1.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.	52
III.2.1.2 MICROORGANISMOS UTILIZADOS.....	52
III.2.1.3 EVALUACIÓN CUANTITATIVA.....	52
III.2.2 MODO DE ACCIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS AISLADOS DE LAS DOS ESPECIES DE <i>BUDDLEJA</i>	53
III.2.2.1 MICROORGANISMOS Y MEDIOS DE CULTIVO.....	53
III.2.2.2 REACTIVOS.....	53
III.2.2.3 BIOENSAYOS PARA DETERMINAR EL NÚMERO DE SOBREVIVIENTES.....	53
III.2.2.4 INCORPORACIÓN DE PRECURSORES RADIACTIVOS.....	54
III.2.3 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FOTOPROTECTORA EN LA REGIÓN DEL UV-B DEL O LOS COMPUESTOS ACTIVOS.....	55
III.2.3.1 PROTECCIÓN USANDO BACTERIAS.....	55
III.2.3.2 DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR (FPS) EN CUYOS.....	56

III.2.3.3 EVALUACIÓN DE LA FOTOPROTECCIÓN; ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.....	59
---	----

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 AISLAMIENTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE <i>B. perfoliata</i>	61
IV.1.1 ANÁLISIS DEL ACEITE ESENCIAL.....	61
IV.1.2 SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS DE <i>B. perfoliata</i>	63
IV.1.2.1 BÚSQUEDA DE SAPONINAS EN <i>B. PERFOLIATA</i> . AISLAMIENTO DEL ÉSTER METÍLICO DEL ÁCIDO FERÚLICO	65
IV.2 AISLAMIENTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE <i>B. scordioides</i>	68
IV.2.1 SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DEL EXTRACTO METANÓLICO.....	68
IV.2.2 ESTUDIO DE LAS SAPONINAS DE <i>B. scordioides</i>	74
IV.2.2.1 HIDRÓLISIS.....	77
IV.2.2.2 ACETILACIÓN DE LA MEZCLA DE SAPONINAS.....	81
IV.2.2.3 SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS SAPONINAS ACETILADAS.....	84
IV.3 PARTE BIOLÓGICA.....	98
IV.3.1 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS.....	98
IV.3.2 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL VERBASCÓSIDO.....	99
IV.3.3 MODO DE ACCIÓN.....	101
IV.3.4 ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA DE <i>B. perfoliata</i> y <i>B. scordioides</i>	107
IV.3.4.1 FOTOPROTECCIÓN DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE <i>B. perfoliata</i> y <i>B. scordioides</i> UTILIZANDO BACTERIAS.....	107
IV.3.4.2 FOTOPROTECCIÓN DE LOS COMPUESTOS QUE ABSORBEN EN LA REGIÓN DEL UV-B AISLADOS DE <i>B. perfoliata</i> y <i>B. scordioides</i> UTILIZANDO BACTERIAS.	111
IV.3.4.3 DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR (FPS) EN CUYOS.....	114
IV.4 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.....	116



CAPÍTULO V

CONCLUSIONES DE LA INVESTIGACIÓN

V CONCLUSIONES.....	130
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133
APÉNDICE I. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR O DE KIRBY – BAUER	141
APÉNDICE II. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	143
APÉNDICE III. CURVA DE SUPERVIVENCIA (CURVA LETAL).	145
APÉNDICE IV. TÉCNICA HISTOLÓGICA ESTÁNDAR	146
APÉNDICE V. ANÁLISIS DE LAS CURVAS DE SUPERVIVENCIA DE LAS BACTERIAS EXPUESTAS AL VERBASCÓSIDO	148
APÉNDICE VI. ESPECTROS	151
APÉNDICE VII. ARTÍCULOS GENERADOS DE LA INVESTIGACIÓN	208

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Fraccionamiento del Extracto de Acetato de Etilo de <i>B. perfoliata</i> .	32
Tabla 2.- Fraccionamiento Preliminar del Extracto Butanólico de <i>B. perfoliata</i> .	33
Tabla 3.- Recromatografía de las fracciones 50-130 (extracto butanólico de <i>B. perfoliata</i>).	34
Tabla 4.- Separación de los componentes de la fase orgánica del hidrolizado (<i>B. perfoliata</i>).	36
Tabla 5.- Fraccionamiento del Extracto Metanólico de <i>B. scordioides</i> .	37
Tabla 6.- Recromatografía en columna de la fracción secundaria 30-130.	38
Tabla 7.- Recromatografía en columna de la fracción terciaria 84-121.	39
Tabla 8.- Recromatografía de la fracción 104-301.	41
Tabla 9.- Recromatografía de la fracción 110-146.	42
Tabla 10.- Fraccionamiento del Extracto Metanólico de <i>B. scordioides</i> (Segundo proceso).	47
Tabla 11.- Recromatografía de la fracción secundaria 90-218 (segundo proceso).	48
Tabla 12.- Cromatografía de la mezcla de saponinas acetiladas.	50
Tabla 13.- Desplazamientos Químicos en RMN ¹ H del Aceite Esencial de <i>B. perfoliata</i>	62
Tabla 14.- Desplazamientos Químicos en RMN ¹³ C del Compuesto 6.	71
Tabla 15.- Desplazamientos Químicos en RMN ¹³ C de las agliconas 16 y 17.	79
Tabla 16.- Datos espectrales de ¹ H RMN de las Agliconas 16 y 17.	80
Tabla 17.- Desplazamientos Químicos en ¹³ C-RMN de 13, 14 y 15 en CDCl ₃	85
Tabla 18.- Datos espectrales de ¹ H RMN de los compuestos 13, 14 Y 15.	86
Tabla 19.- Actividad Antibacteriana de los Extractos de <i>B. perfoliata</i> y <i>B. scordioides</i> .	98
Tabla 20.- Actividad antimicrobiana del verbascósido.	99
Tabla 21.- Concentración Mínima Inhibitoria y Bactericida Mínima del Verbascósido.	100
Tabla 22.- Coeficientes de extinción de los cromóforos aislados de las Buddlejas.	111
Tabla 23.- Determinación del FPS en Cuyos.	116
Tabla 24.- Significancia estadística de acuerdo a las pruebas de Wilcoxon y Friedman.	117
Tabla 25.- Evaluación Histopatológica de Piel Irradiada con Luz UV-B Sin Protección.	118
Tabla 26.- Evaluación Histopatológica de Piel Irradiada con Luz UV-B y Protegida con Escalol.	119
Tabla 27.- Evaluación Histopatológica de Piel Irradiada con Luz UV-B y Protegida con Extracto Metanólico de <i>B. scordioides</i> .	120

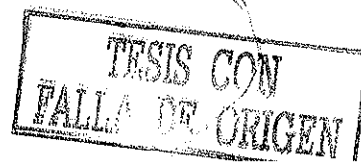


Tabla 28.- Evaluación Histopatológica de Piel Irradiada con Luz UV-B y Protegida con Extracto Metanólico de <i>B. perfoliata</i> .	121
Tabla 29.- Evaluación Histopatológica de Piel Irradiada con Luz UV-B y Protegida con Acetato de Linarina.	122
Tabla 30.-Evaluación Histopatológica de Piel Irradiada con Luz UV-B y Protegida con Linarina.	123
Tabla 31.-Evaluación Histopatológica de Piel Irradiada con Luz UV-B y Protegida con Verbascósido.	124
Tabla 32. Bacterias supervivientes expuestas a 800 µg/ml (CBM) de verbascósido.	148



LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Fotos del ejemplar de herbario de <i>B. perfoliata</i> .	5
Figura 2.- Fotos del ejemplar de herbario de <i>B. scordioides</i> .	6
Figura 3.- Distribución de <i>B. perfoliata</i> y <i>B. scordioides</i> en la Republica Mexicana.	7
Figura 4.- Estructuras fundamentales de la piel	12
Figura 5.- Cromatograma de los aceites esenciales de <i>B. perfoliata</i> .	61
Figura 6.- Patrón de Fragmentación de la syringina (6).	73
Figura 7.- COSY ^1H - ^1H expansión en 3.1-5.3 ppm	89
Figura 8.- COSY ^1H - ^1H expansión en 3.1-5.3 ppm	90
Figura 9.- COSY ^1H - ^1H expansión en 3.1-5.3 ppm	92
Figura 10.- Sección del espectro HMBC del Peracetato de la Buddlejasaponina I.	93
Figura 11.- Mapa de fragmentación del Compuesto 13.	94
Figura 12.- Mapa de fragmentación del Peracetato de la Buddlejasaponina I.	95
Figura 13.- Mapa de fragmentación del Compuesto 15.	96
Figura 14.- Piel de cuyo sin protección y expuesta a 1 DEM.	126
Figura 15.- Piel de cuyo protegida con extracto metanólico de <i>B. scordioides</i> y expuesta a 2 DEM.	126
Figura 16.- Piel de cuyo protegida con extracto metanólico de <i>B. perfoliata</i> y expuesta a 2 DEM.	127
Figura 17.- Piel de cuyo protegida con Escalol y expuesta a 4 DEM.	127
Figura 18.- Piel de cuyo protegida con Acetato de linarina y expuesta a 4 DEM.	128
Figura 19.- Piel de cuyo protegida con Linarina y expuesta a 8 DEM.	128
Figura 20.- Piel de cuyo protegida con verbascósido expuesta a 22 DEM.	129

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1.- Efecto del verbascósido sobre la incorporación de leucina ^3H en <i>S. aureus</i>	102
Gráfica 2.- Efecto del verbascósido sobre la incorporación de leucina ^3H en <i>V. cholerae</i>	103
Gráfica 3.- Efecto del Verbascósido sobre el número de supervivientes de <i>S. aureus</i> .	106
Gráfica 4.- Efecto del Verbascósido sobre el número de supervivientes de <i>V. cholerae</i> .	106
Gráfica 5.- Irradiación de luz UV-B (312) nm sobre <i>E. coli</i> sin protección.	108
Gráfica 6.- Irradiación de luz UV-B (312) nm sobre <i>E. coli</i> protegida con escalol.	109
Gráfica 7.- Irradiación de luz UV-B (312) nm sobre <i>E. coli</i> protegida con extracto Metanólico de <i>B. perfoliata</i> .	109
Gráfica 8.- Irradiación de luz UV-B (312) nm sobre <i>E. coli</i> protegida con extracto Metanólico de <i>B. scordioides</i> .	110
Gráfica 9.- Irradiación de luz UV-B (312) nm sobre <i>E. coli</i> protegida con Verbascósido.	112
Gráfica 10.- Irradiación de luz UV-B (312) nm sobre <i>E. coli</i> protegida con Acetato de Linarina.	113
Gráfica 11.- Irradiación de luz UV-B (312) nm sobre <i>E. coli</i> protegida con Linarina.	113
Gráfica 13.- Curva de Supervivencia de <i>S. aureus</i> expuesta a la CBM de Verbascósido.	149
Gráfica 14.- Curva de Supervivencia de <i>V. cholerae</i> expuesta a la CBM de Verbascósido.	150

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1.- Espectro de Masas del α -pineno.	152
Espectro 2.- Espectro de RMN protónica del α -pineno.	153
Espectro 3.- Espectro de RMN protónica de la Linarina.	154
Espectro 4.- Espectro IR de la Linarina.	155
Espectro 5.- Espectro de RMN protónica del Verbascósido.	156
Espectro 6.- Espectro IR del Verbascósido.	157
Espectro 7.- Espectro IR del Éster Metílico del Ácido Ferúlico.	158
Espectro 8.- Espectro de Masas del Éster Metílico del Ácido Ferúlico.	159
Espectro 9.- Espectro de RMN protónica del Éster Metílico del Ácido Ferúlico.	160
Espectro 10.- Espectro de RMN de Carbono-13 del Éster Metílico del Ácido Ferúlico.	161
Espectro 11.- Espectro HÉCTOR del Éster Metílico del Ácido Ferúlico.	162
Espectro 12.- Espectro IR del Manitol.	163
Espectro 13.- Espectro IR de la Syringina.	164
Espectro 14.- Espectro de RMN protónica de la Syringina.	165
Espectro 15.- Espectro COSY de la Syringina.	166
Espectro 16.- Espectro de RMN de Carbono-13 de la Syringina.	167
Espectro 17.- Espectro DEPT de la Syringina.	168
Espectro 18.- Espectro de Masas de la Syringina.	169
Espectro 19.- Espectro IR del O-Metilcatalpol.	170
Espectro 20.- Espectro IR de la Mezcla de Saponinas.	171
Espectro 21.- Espectro de RMN protónica de la Mezcla de Saponinas.	172
Espectro 22.- Espectro de RMN de Carbono-13 de la Mezcla de Saponinas.	173
Espectro 23.- Espectro DEPT de la Mezcla de Saponinas.	174
Espectro 24.- Espectro de Masas de la Mezcla de Saponinas.	175
Espectro 25.- Espectro de RMN protónica de la Mezcla de Saponinas Acetiladas.	176
Espectro 26.- Espectro de RMN de Carbono-13 de la Mezcla de Saponinas Acetiladas.	177
Espectro 27.- Espectro de Masas de la Mezcla de Saponinas Acetiladas.	178



Espectro 28.- Espectro de RMN protónica de la Saikogenina A.	179
Espectro 29.- Espectro de RMN de Carbono-13 de la Saikogenina A.	180
Espectro 30.- Espectro COSY de la Saikogenina A.	181
Espectro 31.- Espectro HMQC de la Saikogenina A.	182
Espectro 32.- Espectro HMBC de la Saikogenina A.	183
Espectro 33.- Espectro de RMN protónica del 3, 23, 28-Trihidroxiolean-11, 13(18)-dieno.	184
Espectro 34.- Espectro de RMN de Carbono-13 del 3, 23, 28-Trihidroxiolean-11, 13(18)-dieno.	185
Espectro 35.- Espectro COSY del 3, 23, 28-Trihidroxiolean-11, 13(18)-dieno.	186
Espectro 36.- Espectro HMQC del 3, 23, 28-Trihidroxiolean-11, 13(18)-dieno.	187
Espectro 37.- Espectro HMBC del 3, 23, 28-Trihidroxiolean-11, 13(18)-dieno.	188
Espectro 38.- Espectro de Masas del peracetato de la Buddlejasaponina I.	189
Espectro 39.- Espectro de RMN protónica del peracetato de la Buddlejasaponina I.	190
Espectro 40.- Espectro de RMN de Carbono-13 del peracetato de la Buddlejasaponina I.	191
Espectro 41.- Espectro COSY del peracetato de la Buddlejasaponina I.	192
Espectro 42.- Espectro HMQC del peracetato de la Buddlejasaponina I.	193
Espectro 43.- Espectro HMBC del peracetato de la Buddlejasaponina I.	194
Espectro 44.- Espectro de Masas del Compuesto 13.	195
Espectro 45.- Espectro de RMN protónica del Compuesto 13.	196
Espectro 46.- Espectro de RMN de Carbono-13 del Compuesto 13.	197
Espectro 47.- Espectro COSY del Compuesto 13.	198
Espectro 48.- Espectro HMQC del Compuesto 13.	199
Espectro 49.- Espectro HMBC del Compuesto 13.	200
Espectro 50.- Espectro de Masas del Compuesto 15.	201
Espectro 51.- Espectro de RMN protónica del Compuesto 15.	202
Espectro 52.- Espectro de RMN de Carbono-13 Compuesto 15.	203
Espectro 52.- Espectro de RMN de Carbono-13 Compuesto 15 (Continuación, a)	204
Espectro 52.- Espectro de RMN de Carbono-13 Compuesto 15 (Continuación, b)	205
Espectro 53.- Espectro DEPT del Compuesto 15.	206
Espectro 53.- Espectro DEPT del Compuesto 15 (Continuación)	207

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etilo
ATCC	American Type Culture Collection
Bac/ml	Bacterias por mililitro
BuOH	Butanol
CBM	Concentración Bactericida Mínima
CCB	Carcinoma de Células Basales
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
ccf	Cromatografía en placa fina
CDC	Center for Disease Control
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
COSY	Espectroscopia de correlación homonuclear ^1H - ^1H bidimensional
D	Dermis
d	Doblete
dd	Doble de doble
DEM	Dosis Eritematogénica Mínima
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer*
DMSO	Dimetilsulfóxido
dt	Doblete tripleteado
E	Edema
Ei	Edema intracelular ó vacuolización
EM-FAB	Espectrometría de Masas mediante Bombardeo Rápido de Átomos
EM-IE	Espectrometría de Masas mediante Impacto Electrónico
Ep	Epidermis
Escalol	etil-hexil-(<i>p</i>) metoxicinamato
eV	Electrón-volts
FP	Folículo Piloso
FPS	Factor de Protección Solar
FT-NMR	Resonancia Magnética Nuclear con Transformada de Fourier

GC-MS	Espectrometría de Masas acoplada a Cromatografía de Gases
GS	Glándula Sebácea
h y/o hs	Hora y/o horas
H ³ acetato de sodio	Acetato de sodio tritiado
H ³ Leucina	Leucina tritiada
H ³ Timidina	Timidina tritiada
H ³ Uridina	Uridina tritiada
HETCOR	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear (¹ H- ¹³ C)
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Presión
HMBC	Espectroscopía de correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C bidimensional binaria
HMQC	Espectroscopía de correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C bidimensional
H y E	Tinción de Hematoxilina y Eosina
INDRE	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica
IR	Espectro infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Joule/cm ²	Joule por centímetro cuadrado
KeV	Kilo-electrón volts
Log del # de supervivientes	Logaritmo del número de supervivientes
M	Molaridad
MeOH	Metanol
Metanol- <i>d</i>	Metanol deuterado
mg/disco	Miligramos por disco
[M+Na] ⁺	Ion positivo derivado del ion molecular más el PM del sodio
[M+H] ⁺	Ion positivo derivado del ion molecular más el PM del hidrógeno
m/z	Relación masa-carga
N	Normalidad
n	Número de individuos
nm	Nanómetros
PABA	Ácido paraaminobenzoico
pH	Potencial de Hidrógeno
ppm y/o δ	Partes por millón

rf	Factor de retención
<i>Rt</i>	Tiempo de retención
RUV	Radiación Ultravioleta
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Protones
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
rpm	Revoluciones por minuto
s	Singulete
SC	<i>stratum corneum</i>
TMS	Tetrametilsilano
v/v	Relación Volumen-Volumen
V/V/V	Relación Volumen-Volumen-Volumen
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
UFC/ml	Unidades Formadoras de Colonia por mililitro
UV-A	Luz ultravioleta de 320-400 nm
UV-B	Luz ultravioleta de 290-320 nm
UV-C	Luz ultravioleta de 100-290 nm
Watt/m ²	Watt por metro cuadrado
ε	Coefficiente de extinción
λ _{max}	Longitud de onda máxima
μCi/ml	Micro Curies por mililitro
μg	Microgramos
μg/ml	Microgramos por mililitro
μg/disco	Microgramos por disco
μl	Microlitros
μm	Micrómetro
[α] _D ^{+22°C}	Rotación específica con respecto a la línea D del sodio a 22 °C

RESUMEN

En México, algunas especies del género *Buddleja* son conocidas como “tepozanes” y se utilizan en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades. *Buddleja perfoliata* y *Buddleja scordioides* crecen en la República Mexicana, siendo *B. perfoliata* endémica de nuestro país. *B. perfoliata* es conocida como “salvia de bolita” y se emplea para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales de probable origen infeccioso, asimismo se usa para curar heridas. *B. scordioides* se conoce como “escobilla” y además de emplearse para la curación de diarreas de origen infeccioso, también es utilizada para prevenir las quemaduras solares.

El objetivo del presente trabajo fue el estudio químico de las plantas *B. perfoliata* y *B. scordioides*, y la evaluación de las actividades antibacteriana y fotoprotectora de sus principales metabolitos secundarios.

De ambas plantas se aislaron metabolitos secundarios mediante métodos cromatográficos. Las estructuras de los compuestos aislados se establecieron mediante técnicas espectroscópicas (UV, IR, RMN) y espectrométricas (EM); en algunos casos fue necesario llevar a cabo experimentos bidimensionales de RMN (COSY, DEPT, HETCOR, HMQC y HMBC) para la plena identificación de las estructuras. De *B. perfoliata* se aislaron α -pineno, linarina y verbascósido, las dos últimas son sustancias comunes en el género *Buddleja*. De *B. scordioides* se separaron e identificaron verbascósido, linarina, o-metilcatalpol, syringina (esta última se reporta por vez primera en el género *Buddleja*) y tres saponinas derivadas del oleanano; una de ellas presentó un puente etéreo entre las posiciones 28-13 del oleanano y las otras dos saponinas exhibieron dienos conjugados 11, 13(18) en sus agliconas. En todos los casos, las saponinas presentaron unida en la posición tres de la aglicona la misma cadena sacárida dispuesta de acuerdo al siguiente orden: α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-fucopiranosil-aglicona. Cabe hacer notar que aunque se buscaron saponinas en *B. perfoliata* no fue evidente su presencia, es probable que esta planta no sintetice estos compuestos.

A los extractos de ambas plantas se les determinó la actividad antibacteriana mediante la técnica de difusión en agar, siendo activos los extractos metanólicos contra *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae*. El compuesto activo contra estas bacterias y que se aisló de los extractos fue el verbascósido. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Bactericida Mínima (CBM) del verbascósido se calculó de acuerdo al método de dilución en caldo siendo de 400 y 800 μ g/ml respectivamente. Se realizaron experimentos de desafío para obtener las curvas de supervivencia de las bacterias expuestas al verbascósido, los resultados indicaron que el verbascósido a dosis iguales a la Concentración Mínima Inhibitoria tiene efecto bacteriostático y es bactericida con cinética multiimpacto a dosis equivalentes a la CBM. El modo de acción del verbascósido se estableció con base en experimentos de incorporación de metabolitos marcados con tritio y que son esenciales en las vías metabólicas primarias de la bacteria. El verbascósido inhibe la incorporación de leucina 3 H entre el 90-100% y el 40-80% en *S. aureus* y *V. cholerae* respectivamente. De acuerdo con estos resultados, se concluyó que la vía metabólica que daña el verbascósido es la síntesis de proteínas.

La actividad fotoprotectora de los extractos y de los cromóforos fue evaluada mediante experimentos de desafío en los cuales se utilizaron bacterias expuestas a radiación UV-B con y sin protección. El factor de protección solar (FPS) se estableció en conejillos de indias (cuyos) utilizando la metodología propuesta por Bissett. Finalmente, se realizó una evaluación histopatológica de la piel de cuyo expuesta a radiación UV-B con y sin protección.

Los resultados indicaron que los microorganismos (10^8 bacterias/ml) expuestos a la radiación sin protección mueren a los 3 minutos de exposición, en cambio las bacterias protegidas con los extractos metanólicos de *B. perfoliata* y *B. scordioides* alcanzaron la muerte de toda la población hasta los 64 minutos. De los extractos metanólicos se aislaron verbascósido y linarina como cromóforos, además, se preparó el acetato de linarina. El verbascósido y el acetato de linarina protegieron de la muerte por irradiación a las poblaciones bacterianas, existiendo supervivientes en ambos casos hasta los 256 minutos, en cambio la supervivencia de las bacterias protegidas con linarina fue de 80 minutos.

El verbascósido presentó el mayor Factor de Protección Solar (FPS= 24), seguido de la linarina (FPS= 9) y del acetato de linarina (FPS= 5). Los extractos metanólicos de ambas plantas protegieron a los cuyos escasamente de la formación de eritema, puesto que apenas tuvieron un valor del FPS= 3.

A nivel histológico, las muestras de piel de cuyo sin protección mostraron el cuadro clásico debido a la quemadura por irradiación con luz UV-B. La epidermis presentó separación del estrato córneo, úlceras y edema. Los queratinocitos exhibieron edema intracelular (vacuolización). En la dermis hubo congestión de vasos sanguíneos, extravasación de eritrocitos e infiltración de células eosinofílicas. Las muestras de piel tratadas con las sustancias fotoprotectoras e irradiadas con dosis menores a las necesarias para alcanzar el FPS no presentaron daño histológico evidente.

ABSTRACT

The majority of the Mexican *Buddleja* species (locally known as "tepozanes") are traditionally used to treat several diseases. *Buddleja perfoliata*, which is endemic to Mexico is used to disinfect wounds and to cure gastrointestinal diseases of bacterial origin whereas *B. scordioides* (escobilla) is a shrub natural of the Chihuahuan desert which is used as an antidiarrheal agent and to prevent sunburns.

The aim of this work was the chemical examination of *Buddleja perfoliata* and *Buddleja scordioides* and the evaluation of the antibacterial and photoprotective properties of their main natural products.

The structures of the isolated compounds were established based on conventional spectral studies including 2D NMR techniques, COSY, DEPT, HETCOR, HMQC and HMBC.

B. perfoliata afforded the known compounds α -pinene, linarin, and verbascoside. *B. scordioides* showed to contain verbascoside, linarin, *o*-methyl catalpol, syringin, and three oleanane saponins. One of the saponins contains an oxygen bridge between the C-28 and the C-13 positions of the oleanane skeleton, the other saponins contain an 11, 13(18) diene.

The three saponins have at C-3 the same saccharide chain: α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-fucopyranosyl-aglycone.

B. perfoliata worked up as *B. scordioides* did not afford triterpenoid saponins.

The extracts of both plants were tested for antibacterial activity using the agar diffusion technique. The MeOH extracts of both plants were active against *Staphylococcus aureus* and *Vibrio cholerae*. The active agent isolated from the extracts was verbascoside. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) of verbascoside were calculated according to the broth culture dilution method resulting in 400 and 800 μ g/ml respectively. Challenge experiments were carried out in order to obtain the survival curves of bacteria exposed to verbascoside. Results showed that verbascoside at MIC doses had bacteriostatic effect, but at MBC doses, an exponential killing curve of several hits was obtained. The mode of action of verbascoside was established by killing kinetics and incorporation of tritiated precursors. Verbascoside inhibited the 3 H leucine incorporation in *S. aureus* and *V. cholerae* of about 90-100% and 40-80% respectively.

Photoprotective activity of the extracts and compounds was evaluated in accordance to challenge experiments using bacteria exposed to UV-B radiation with or without protection. The Sun Protection Factor (SPF) was estimated in guinea pigs according to Bissett's method. A histopathological study was carried out with protected and non-protected guinea pig skin.

The results obtained showed that the bacteria population ($\cong 10^8$ cells/ml), protected with methanolic extracts of both plants, reached cell death at 64 minutes, while non-protected bacteria died in 3 minutes. Linarin acetate and verbascoside protected bacteria more efficiently than positive control and methanolic extracts. Bacterial population protected by these compounds reached cell death until 256 min., while bacteria protected with linarin arrive to cell death in 80 min. Methanolic extracts had the smallest SPF (3). Verbascoside was the substance with the highest photoprotective activity; its SPF was 24 since it retarded the erythema appearance until 440 min. The SPF obtained for linarin was 9, while the value of linarin acetate SPF was 5.

The histological photographs of non-protected guinea pig skin showed a zone of epidermal changes such as intracellular edema, vacuolization, and stratum corneum detachment. These phenomena are classical of UV-B irradiation burn. The samples of skin protected with extracts or pure compounds and irradiated with lower doses than SPF, did not show important histological changes.

INTRODUCCIÓN

El género *Buddleja*, cuyo nombre fue asignado en honor de Adam Buddle, antes se consideraba dentro de la familia Loganiaceae. Desde 1973 y de acuerdo con Hutchinson, este género pertenece a la familia Buddlejaceae (Houghton, 1984). El género *Buddleja* (anteriormente conocido como: *Buddleia*, *Budleia*, *Buddlea*, *Buddleya*) comprende alrededor de 100 especies, 50 de las cuales son originarias del continente Americano. Las especies de *Buddleja* comprenden árboles pequeños o arbustos que crecen en las tierras tropicales de América, Asia y África (Norman, 1967).

Los usos medicinales más frecuentes de estas plantas son como antiinflamatorio, expectorante, antiséptico local, como diurético, y para sanar heridas. (Houghton, 1984)

En México existen 20 especies de *Buddleja*, las cuales se distribuyen en todo el territorio nacional (Rzedowski, 1985). Algunas de estas plantas son utilizadas por la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la erisipela, como cicatrizantes, analgésicos, antidiarreicos, antiinflamatorios y contra infecciones de las vías respiratorias altas (INI, 1994). Existen pocos estudios químicos y biológicos que permitan correlacionar los compuestos químicos reportados con las propiedades medicinales que se les atribuye a las buddlejas que habitan en México.

Buddleja perfoliata vulgarmente conocida como “salvia de bolita” es una planta endémica de México (Norman, 1967) y popularmente se utiliza para desinfectar heridas y contra padecimientos del tracto digestivo.

B. scordioides habita en el centro y norte del país, extendiéndose hasta Texas y Arizona en los Estados Unidos de América. Esta planta también se utiliza contra padecimientos del tracto digestivo (Rzedowski y Rzedowski, 1985) y para prevenir las quemaduras de la piel producidas por exposición a la radiación solar (comunicación personal).

El propósito del presente trabajo fue realizar un estudio fitoquímico tendiente a aislar e identificar los principales metabolitos secundarios de *B. perfoliata* y de *B. scordioides*, además de evaluar la actividad antimicrobiana y fotoprotectora de los compuestos aislados.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES GENERALES Y JUSTIFICACIÓN.

I.1. ESTUDIOS FITOQUÍMICOS DEL GÉNERO *BUDDLEJA*.

Uno de los géneros de plantas que tienen amplia distribución, tanto en el hemisferio oriental como en el occidental, es *Buddleja*. Las plantas de dicho género se caracterizan por vivir en una amplia diversidad de hábitats, incluyendo zonas perturbadas por efecto de la urbanización. Las especies más comunes son *B. asiatica*, *B. officinalis*, *B. curviflora*, *B. davidii*, *B. americana*, *B. cordata*, *B. globosa* y *B. variabilis*. Estos vegetales son conocidos mundialmente por su uso medicinal en el tratamiento de la disentería, como agentes cicatrizantes, antiinflamatorios, diuréticos, antisépticos, analgésico-sedativos, hepatoprotectores, antiulcerogástricos y abortivos (Houghton, 1984). Los estudios fitoquímicos realizados en este género han revelado la presencia de gran variedad de compuestos, entre ellos:

- Monoterpenos: citrionelol, β -cariofileno, óxido de β -cariofileno (Garg, and Dengre, (1992).
- Sesquiterpenos: buddleinas A, B y C que son citotóxicas y buddleinas D y E no tóxicas (Yoshida *et al.*, 1976; Yoshida *et al.*, 1978). Además de dihidroxibuddleina A, buddledona A, y buddledona B que poseen actividad antiinflamatoria (Liao, 1999)
- Diterpenos: buddlejona, primer diterpeno aislado de la familia buddlejaceae (Houghton, 1996) y desoxibuddlejona diterpeno fungicida aislado de *B. globosa* (Mensah, 2000).
- Esteroles: β -sitosterol y estigmasterol (Chawla *et al.*, 1981; Houghton, 1984).
- Triterpenos: β -amirina, acetato de β -amirina (López *et al.*, 1979).
- Saponinas: mimengósidos A y B (Ding *et al.*, 1992). buddlejasaponinas I-IV (Yamamoto *et al.*, 1991).

- Flavonoides: acacetina, linarina, kaempferol, quercetina, luteolina, rutina, salvigenina, 6 y 8 hidroxiluteolina, 7-O-glucósido de escutellareina, 7-O-rutinósido de acacetina, 3-O-rutinósido de quercetina (Harborne and Williams, 1971; Marin *et al.*, 1977).
- Iridoides: aucubina, catalpol, metilcatalpol, biridósido (Duff *et al.*, 1965; Houghton, 1985; Mansoor *et al.*, 1992), acetil glicósidos de iridoide (Miyase *et al.*, 1991).
- Iridoides unidos a lignanos: 6-feruloilajugol (Yamamoto *et al.*, 1993)
- Fenilpropanoides: ácidos cafeíco, ferúlico y p-cumárico, verbascósido, martinósido, jionósido, angorósido (Houghton, 1985).
- Fenil etanoides: 2-(-4-hidroxifenil) etil lignoserato, 2-(-4-hidroxifenil) etil dodecanoato (Houghton, 1985), glicósidos feniletanoides (Yamamoto *et al.*, 1993). 2-(-4-hidroxifenil) etil esterato, 2-(-4-hidroxifenil) etil behenato (Acevedo, *et al.*, 2000).
- Lignanos: buddlenol A, B, C, D, E, y F (Houghton, 1985).
- Alcaloides: buddamina (I) (Roeder *et al.*, 1985).

En el valle de México existen 15 especies de *Buddleja*, siendo las de mayor distribución *B. cordata*, *B. parviflora* y *B. sessiliflora* (Rzedowski y Rzedowski, 1985).

Entre los compuestos químicos encontrados en *B. parviflora* por Arciniegas en 1997 se encuentran: verbascósido, aucubina y metil catalpol. Además, Martínez-Vázquez y colaboradores en 1997, demostraron que la linarina presente en los extractos de *B. cordata* posee actividad antiinflamatoria. De la misma especie, Acevedo y colaboradores en el año 2000 aislaron ésteres de ácidos grasos de cadena larga unidos al 2-(4' hidroxifenil) etanol; el éster lignocérico correspondiente presentó actividad anti-micobacteriana.

I.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

La planta *Buddleja perfoliata* HBK se distribuye en los estados de San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo y Puebla (Figura 3). Se conoce popularmente con los nombres de “salvia real” o “salvia de bolita” y se emplea como antisudorífico, diurético, para

desinfectar heridas y contra las infecciones gastrointestinales. Este vegetal es un arbusto (Figura 1) que puede alcanzar un metro de altura, es ramoso con pubescencia densa, sus hojas son lanceoladas oblongas, con margen finamente crenado y con venación prominente en el envés. Sus inflorescencias son terminales con varios capítulos colocados en axilas foliares, las cabezuelas tienen pedúnculo. Las flores tienen olor a salvia (Rzedowski y Rzedowski, 1985). Esta planta carece de estudios fitoquímicos que permitan correlacionar sus propiedades medicinales con sus componentes químicos.



Figura 1.- Fotos del ejemplar de herbario de *Buddleja perfoliata*.

La *Buddleja scordioides* HBK tiene una amplia distribución en las zonas áridas de nuestro país (Figura 3), desde el suroeste de Hidalgo hasta Chihuahua, habitando también las zonas desérticas de Estados Unidos. En los estados del norte del país se le conoce con el nombre de “escobilla”. Es un arbusto de 30 centímetros a un metro de alto (Figura 2), muy ramoso

y con tallos de consistencia leñosa, sus hojas son sésiles y de margen crenado, son pequeñas, miden de 0.25 a 0.8 cm de largo y de 0.1 a 0.3 (0.8) cm de ancho con venación muy conspicua en el envés. Presenta inflorescencia terminal con varios pares de cimas capitadas colocadas en axilas foliares, con cabezuelas sésiles. Esta planta es utilizada artesanalmente para fabricar escobas, además el cocimiento de sus hojas se utiliza contra la indigestión y contra infecciones gastrointestinales (Rzedowski y Rzedowski, 1985). El cocimiento acuoso y los macerados hidroalcoholicos de esta planta también se utilizan para prevenir las quemaduras de la piel producidas por exposición prolongada a la luz solar (comunicación personal). Después de una revisión cuidadosa de la bibliografía química no se encontró ningún estudio relacionado.



Figura 2.- Fotos del ejemplar de herbario de *Buddleja scordioides*.



Distribución de *B. perfoliata*

Distribución de *B. scordioides*

Figura 3. Distribución de *B. perfoliata* y *B. scordioides* en la República Mexicana.

I.3 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS RELACIONADAS CON EL PROYECTO.

En el presente estudio se evaluó la actividad biológica de los principales metabolitos secundarios de *B. perfoliata* y de *B. scordioides*. De acuerdo con ello, y para introducir a estos temas, es conveniente hacer algunas precisiones, así como exponer algunos conceptos básicos respecto a las dos vertientes de investigación de las actividades biológicas que se desarrollaron en este trabajo: la actividad antibacteriana y la actividad fotoprotectora en la región del UVB.

I.3.1 ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN VEGETAL: se han realizado numerosas investigaciones sobre este tema y el resultado ha sido la identificación de una gran cantidad de compuestos activos obtenidos de vegetales de casi toda la escala filogenética, desde briofitas (Asakawa, 1990) y líquenes (Trace, 1993), hasta monocotiledóneas y

dicotiledóneas. Basta revisar cualquier publicación especializada del área de productos naturales para encontrar numerosos artículos en donde se reporta la actividad antimicrobiana de nuevas sustancias, sin embargo, pocas de ellas han sido objeto de estudios más profundos que expliquen la forma como actúan dichos compuestos. Dentro de las sustancias antimicrobianas de origen vegetal a las que se les ha determinado su modo de acción figuran los flavonoides, los taninos, las lactonas sesquiterpénicas los aceites esenciales y los ácidos de compuestos aromáticos simples.

I.3.1.1 Flavonoides

Se ha observado que algunas flavonas provocan la muerte bacteriana. Estos compuestos inhiben la síntesis de ADN o ARN debido a que tienen una estructura plana similar a la de las bases púricas y pirimídicas, por lo tanto se pueden intercalar formando puentes de hidrógeno con las bases de la doble hélice, de esta forma, las flavonas alteran la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos impidiendo su adecuada síntesis *de novo*, además de provocar errores de lectura durante el proceso de transcripción. Las flavonas que han mostrado mayor inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos son aquellas que poseen tres grupos OH en el anillo B (Mori *et al.*, 1987).

I.3.1.2. Taninos

La acción inhibitoria de estos compuestos se debe a los siguientes efectos: astringencia, acción sobre membrana y competencia por metales.

- a) **Astringencia.** Este efecto se ha estudiado de manera exhaustiva en el caso de los taninos, puesto que esta propiedad ha sido utilizada por el hombre para curtir pieles. Los taninos forman complejos insolubles con enzimas y sustratos que las bacterias requieren para su crecimiento normal. Se ha observado que muchas enzimas microbianas han sido inhibidas en cultivos libres de células o bien en ensayos con

enzimas purificadas cuando son mezcladas con taninos. Las enzimas en las cuales se ha visto este efecto son las peroxidasas y las glicosiltransferasas. Los taninos también pueden afectar directamente el metabolismo de los microorganismos como lo sugiere el cambio de morfología de *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* y *Cellulibrio fulvus* que al entrar en contacto con bajas concentraciones de taninos forman filamentos o cadenas, mientras que las células en condiciones normales crecen de manera individual (Scalbert, 1991).

- b) **Acción sobre membranas.** Dentro de los efectos deletéreos de los taninos sobre los microorganismos está su acción sobre las membranas; Konishi, y cols. (1987) demostraron que el ácido tánico a concentración de 50 mg/l inhibe el transporte electrónico membranar de *Photobacterium*. La acción de los taninos en las bacterias puede ser similar a la observada con el fenol sintético o-difenilfenol, compuesto que ha sido muy usado como desinfectante.
- c) **Competencia por metales.** Otro mecanismo para explicar la toxicidad de los taninos sobre las bacterias es su capacidad para formar complejos con los metales. Los sistemas biológicos incluyendo los microorganismos son altamente dependientes de los iones metálicos presentes en el medio ambiente. Por ejemplo, la infección en humanos por *Escherichia coli* se inhibe por la presencia de la lactoferrina (proteína que se acompleja con fierro). Muchos taninos presentan más de dos grupos hidroxilos en la parte aromática de su molécula. Los taninos pueden formar quelatos con varios iones metálicos, como los iones férricos o cúpricos. La naturaleza multicatecólica de los taninos permite la quelación y con esto la formación de un precipitado metal-tanino eliminando del medio los iones metálicos que necesitan las bacterias para su crecimiento adecuado (Scalbert, 1991).



I.3.1.3 Lactonas sesquiterpénicas

En general, las lactonas sesquiterpénicas que poseen actividad antibacteriana son aquellas que tienen un metileno exocíclico conjugado con el carbonilo de la lactona. Además, si tienen cetona α , β insaturada su actividad aumenta. Estos grupos representan sitios receptores reactivos para nucleófilos biológicos, en particular los grupos tiol y los grupos amino que son esenciales para algunas funciones enzimáticas. Los estudios de estructura-actividad han demostrado que las enzimas bacterianas como la fosfofructoquinasa, la ADN polimerasa y la timidilato sintetasa de *E. coli* son inhibidas por estas lactonas (Fischer, 1991).

I.3.1.4 Aceites esenciales

Algunos monoterpenos y compuestos fenólicos de bajo peso molecular presentes en los aceites esenciales de las plantas poseen una actividad antimicrobiana inespecífica puesto que tienen la capacidad de disolver las membranas celulares, con esto, se produce un efecto similar al de la lisis bacteriana provocada mediante enzimas líticas (lisozima) o por tratamiento con disolventes orgánicos (Harvey, 1982).

Helander *et al.* (1998) demostraron que las bacterias *E. coli* y *Salmonella thyphimurium* al ser sometidas a dosis bajas de carvacrol y de timol aumentaban la concentración de ATP y de glucosa 6-fosfato extracelular, debido a esto, se evidenció el efecto lítico de estos compuestos sobre la membrana celular bacteriana.

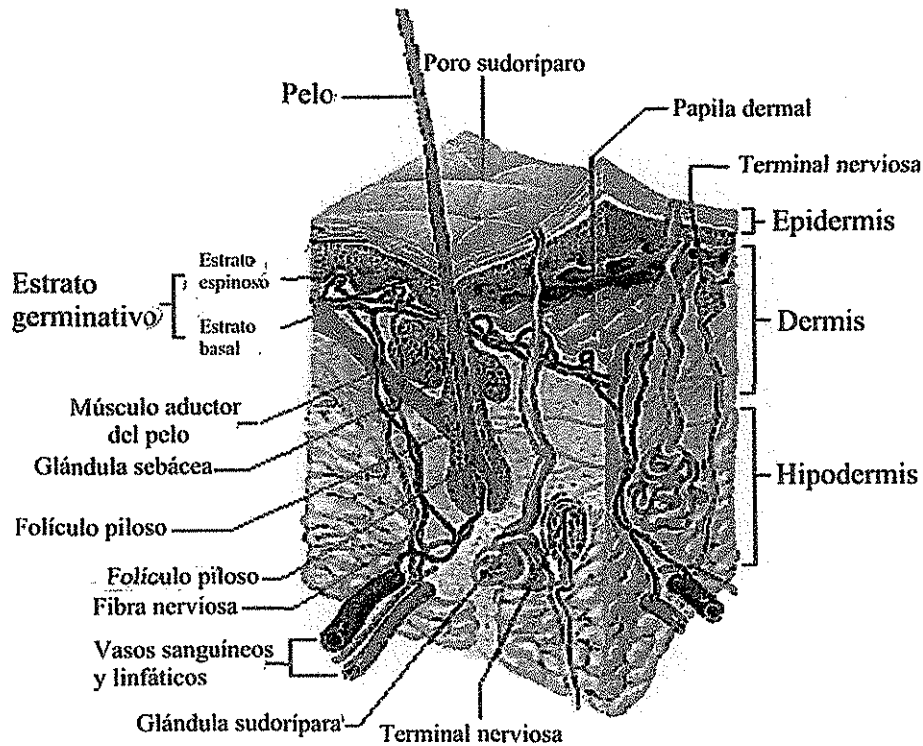
I.3.1.5 Ácidos de compuestos aromáticos simples

Algunos compuestos antibacterianos presentes en los extractos de plantas son ácidos débiles, ejemplos de ellos son: el ácido vainillínico, el ácido benzoico, el ácido ferúlico, etc.

En solución, estos ácidos pueden existir en forma disociada y no disociada dependiendo del pH del medio. Estos compuestos presentan actividad inhibitoria óptima a pH ácido, porque este favorece la existencia de la forma no disociada y sin carga de la molécula, de esta manera, el ácido débil es permeable en la membrana plasmática y así penetra al citoplasma celular. En el interior celular el ácido débil se disocia puesto que existe un pH mayor (7-7.5), así se generan en el interior celular aniones y protones que no pueden atravesar la membrana y salir del citoplasma mediante transporte pasivo. La inhibición del crecimiento de los microorganismos se debe a que los protones pueden inhibir reacciones metabólicas importantes como la cadena respiratoria, además de provocar estrés homeostático intracelular por disminución del pH, los aniones a su vez son tóxicos porque pueden llevar a cabo reacciones de adición nucleofílica con biomoléculas alterando la función de estas últimas (Brul, 1999).

I.3.2 LA PIEL.

La piel (Figura 4) es el órgano de mayor extensión del cuerpo, está compuesta de varios tipos celulares y de anexos epidérmicos cada uno de los cuales tiene una función específica. El principal papel de la piel es el de proteger al organismo de las agresiones del medio ambiente externo. Para cumplir este objetivo, la piel ha evolucionado en una serie de envolturas complejas, cada una con propiedades particulares. Las capas fundamentales de la piel son: la epidermis, la dermis y la hipodermis (Eckert, 1992). La capa superficial (epidermis) es una cubierta estratificada de células epiteliales que descansa sobre un recubrimiento de tejido conectivo (dermis). La epidermis y la dermis se sostienen sobre una capa interna de tejido adiposo (hipodermis).



Epidermis:

1. Escamas córneas
2. Capa córnea
3. Capa lúcida
4. Capa granulosa
5. Capa de células espinosas
6. Capa basal o germinativa
7. Fibras de tejido conjuntivo
8. Melanocito
9. Rama arterial de los capilares
10. Rama venosa de los capilares
11. Vaso linfático
12. Corpúsculos táctiles de Merkel
13. Terminación nerviosa libre
14. Conducto excretor de las glándulas sudoríparas

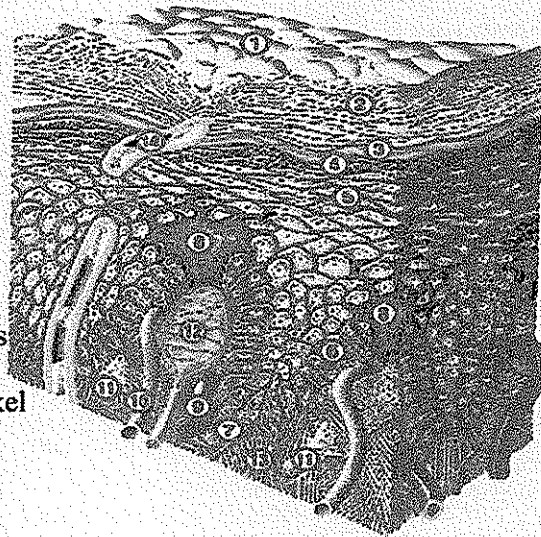


Figura 4.- Estructuras fundamentales de la piel.

Epidermis:

La célula fundamental de la epidermis es el queratinocito que constituye más del 90% de las células de la capa epidérmica. El queratinocito es la célula responsable de la formación de la envoltura (epidermis) que repele patógenos, y que protege de la pérdida de fluidos y de la abrasión. Para llevar a cabo estas funciones, el queratinocito sufre un proceso programado de diferenciación en el que células no diferenciadas se convierten paulatinamente en células que no se dividen y que son altamente diferenciadas llamadas corneocitos. Así, la epidermis se puede dividir en varias capas celulares basada en la diferenciación del queratinocito (fig. 4). La capa basal de la epidermis son queratinocitos no diferenciados de tipo columnar y su proliferación está regulada por una variedad de factores intrínsecos y extrínsecos no completamente conocidos. Los reguladores extrínsecos incluyen el factor de crecimiento epidérmico, los factores alfa y beta de crecimiento tumoral, estrógenos, progesterona, epinefrina y vitaminas D y A (Eckert, 1992). La capa espinosa está situada directamente sobre la capa basal. Por tener numerosos desmosomas los queratinocitos de esta envoltura tienen la apariencia espinosa, de ahí su nombre. La capa granular presenta queratinocitos con gránulos queratohialinos que contienen profilagrina. Esta última capa presenta todavía células vivas que realizan metabolismo normal. Sobre la capa granular existe una “zona de transición” entre la epidermis viva y la muerta, esta zona es de gran recambio celular en donde los organelos celulares, ADN y ARN, son destruidos por la actividad de proteasas y nucleasas. En esta zona, los filamentos de queratina se reestructuran en una forma más estable, para formar la envoltura córnea. El último estado de la diferenciación del queratinocito es el corneocito. El principal componente del corneocito es la queratina, proteína fibrosa que se encuentra en la parte más externa de la piel y que da origen a los anexos epidérmicos como el pelo y las uñas.

Otras células que se encuentran en la epidermis son las células de Merkel y el melanocito. Los melanocitos son células productoras de pigmento que se originan en la cresta neural y se distribuyen en la capa basal de queratinocitos sobre la lámina basal. El componente principal del melanocito es el melanosoma, que es el sitio donde se sintetiza la melanina. Los melanocitos transfieren el pigmento a los queratinocitos vecinos mediante transferencia del melanosoma completo. La melanina se degrada conforme ocurre la metamorfosis del queratinocito. La pigmentación de la piel se debe a la cantidad de pigmento presente en las capas bajas de la epidermis. Las células de Merkel son mecanorreceptores y contienen una gran cantidad de gránulos densos de 100 nm de diámetro. Los gránulos contienen neurotransmisores, por ello estos se encuentran en la zona contigua a la sinapsis de las células de Merkel con neuronas (Holbrook, 1997).

Dermis:

Esta capa esta formada por tejido conectivo cuyo volumen esta ocupado principalmente por colágeno. Las células que se encuentran en la dermis son: el fibroblasto, los macrófagos y los mastocitos. El fibroblasto es la principal célula de la dermis. Su función primordial es la síntesis y remodelación de las proteínas del tejido conectivo como la fibronectina y el colágeno. La fibronectina es la proteína que utiliza el fibroblasto para anclarse a la matriz de colágeno. Los fibroblastos secretan colagenasa y gelatinasa para remodelar las fibras de colágeno.

Los macrófagos funcionan presentando antígenos a las células linfoides como parte de la respuesta inmune además de fagocitar partículas o patógenos que invadan la dermis, también sintetizan y secretan interleucina I, factores de crecimiento, prostaglandinas e interferón.

Los mastocitos están presentes en toda la dermis, pero se concentran alrededor de los vasos sanguíneos. Estas células producen gránulos de sustancias vasoactivas y quimioatrayentes como la histamina. Los mastocitos responden a la luz, frío, trauma agudo, vibración y presión, así como a estímulos químicos e inmunológicos. Cuando existe uno de estos estímulos, estas células liberan el contenido de los gránulos iniciando la quimiotáxis o la vasodilatación.

Hipodermis:

La hipodermis es una capa de células adiposas derivadas del mesodermo y constituye la parte más profunda de la piel, funciona como agente amortiguador entre las capas externas de la piel y las estructuras internas como músculo y hueso. También provee energía de reserva, confiere movilidad a la piel, aísla y moldea el cuerpo (Holbrook, 1997).

1.3.3 EFECTOS DE LA RADIACIÓN UV EN LA PIEL.

La luz solar y la radiación ultravioleta (RUV) de fuentes artificiales pueden tonificar y/o ser tóxicas para la piel humana. Las cualidades benéficas de la luz solar para la salud de la piel han sido conocidas por la humanidad desde tiempos inmemoriales. La exposición a la luz solar genera una sensación de bienestar, puesto que promueve la síntesis de vitamina D (que tiene un efecto curativo en el tratamiento del raquitismo, además de regular el metabolismo del calcio), y estimula la producción de melanina que proporciona a la piel un bronceado capaz de protegerla de los efectos dañinos de la RUV. La luz solar es el soporte para la vida en la biósfera, aunque no se pueden ignorar los efectos acumulativos que esta radiación puede provocar. Algunos de los efectos agudos y crónicos de la radiación solar son los siguientes (Pathak, 1986):

Efectos agudos: quemadura solar, bronceado, reacciones fototóxicas y fotoalérgicas inducidas por medicamentos (psoralenos, fenotiazinas, ácido nalidíxico, etc.) y fotosensibilidad (erupciones polimórficas mediadas por luz, lupus eritematoso, porfirias, etc.)

Efectos crónicos: envejecimiento y arrugas (fotoenvejecimiento y dermatoheliosis), Cáncer (carcinomas de células basales y escamosas) y alteración de la respuesta inmune.

Aproximadamente el 6% de la radiación solar que alcanza la superficie de la tierra es radiación ultravioleta, 48% es luz visible y 46% luz infrarroja (Pathak, 1997). El sol emite luz ultravioleta de diferente longitud de onda que tiene efectos sobre la piel y que operacionalmente pueden dividirse en tres regiones: UV-A (320-400 nm), UV-B (290-320 nm), UV-C (<290 nm). La radiación UV-C es absorbida por la capa de ozono en la atmósfera y no llega a la superficie de la tierra, sin embargo, la radiación de este tipo que pudiese alcanza la piel sería absorbida por el estrato córneo que es tejido muerto. Las radiaciones UV-B que son muy eritematogénicas y carcinogénicas son primariamente absorbidas en la epidermis por su capa basal. Las radiaciones UV-A penetran profundamente en la dermis y sus efectos dañinos son algo más sutiles que los de las radiaciones UV-B (Ziegler, *et al.*, 1994).

Tal vez el efecto más nocivo provocado por la exposición al sol es la inducción del cáncer no melanómico de piel (ya que la radiación UV-B provoca la formación de dímeros de timina dañando la estructura y alterando la función del ADN). Este cáncer –el carcinoma de células basales (CCB) y el carcinoma de las células escamosas (CCE)- es el más común en los habitantes de Estados Unidos (Epstein, 1997). La incidencia de esta enfermedad se ha

incrementado tan rápido en las últimas décadas que se le ha considerado la epidemia silenciosa del siglo XX. El papel de la radiación solar en la inducción de cáncer no melanómico de piel se evidenció por primera vez mediante observaciones clínicas y fue confirmado con base en estudios experimentales y epidemiológicos (Epstein, 1989). La radiación que provoca este tipo de cáncer es la UV-B (Epstein, 1997). Esto es más notable en el caso del cáncer de células escamosas (CCE) en donde se hace más evidente la relación causa-efecto.

A similitud de todos los organismos que habitan la superficie terrestre, el hombre ha desarrollado en su piel varios mecanismos para protegerse de los efectos dañinos de la RUV. Una vez que la piel es irradiada, la epidermis engrosa y forma melanina, que disminuye la penetración de la radiación UV-B a la capa basal proliferativa. La melanina no es una sustancia importante en la absorción selectiva de RUV, sin embargo, representa un papel importante en el “secuestro” de radicales libres generados por la exposición a la radiación ultravioleta (Chedekel y Zeise, 1997). El daño al ADN debido a la RUV se repara mediante una serie de reacciones enzimáticas, y la célula que sufrió daño en su ADN es eliminada por un proceso conocido como apoptosis. A pesar de esta formidable adaptación de la epidermis para contrarrestar los efectos de la RUV, puede ocurrir, que se acumulen los errores en el ADN después de varios años de exposición. Estos errores (mutaciones) pueden provocar que algunos genes que son cruciales en la regulación del ciclo celular (por ejemplo, protooncogenes, como el gene *ras*; y los genes supresores de tumores, como el p53) sean disfuncionales, y una combinación de mutaciones en ambos genes, provocan la transformación a célula cancerosa. La secuencia principal de eventos ha sido elucidada recientemente. La radiación solar más importante para la producción de lesiones en el ADN es la radiación UV-B que provoca la formación de dímeros de ciclobutano-pirimidina y

fotoproductos 6-4, que corresponden directamente con mutaciones que son asociadas a sitios dipirimidínicos (Box *et al.*, 2001). Asociado a ello, también se ha encontrado que la radiación UV es la causante de mutaciones en el gene p53 (Brash *et al.*, 1991). La comprobación directa de que la relación causal entre las mutaciones en el gene p53, los tumores de piel y la RUV se ha dilucidado en experimentos usando ratones (Van Kranen *et al.*, 1995). Por otra parte, las células transformadas pueden ser reconocidas y eliminadas por el sistema inmune, pero la RUV también afecta este sistema (Gruijl, 1996). La RUV incide sobre cromóforos que tienen función inmunomoduladora, tal es el caso del ácido *trans*-urocánico. Este compuesto es un derivado de la histidina que se sintetiza principalmente en los queratinocitos y representa un papel importante en la diferenciación del estrato granuloso a estrato córneo, además, mantiene la homeostasis en las capas altas de la piel puesto que provee protones que mantienen un gradiente adecuado de pH (Krien, 2000). Se sabe que el ácido urocánico de configuración *trans* se isomeriza a *cis* por efecto de la luz UV-B, el ácido *cis*-urocánico es un inmunomodulador negativo, esto es, deprime la respuesta inmune. Existen varias evidencias experimentales que explican la actividad inmunosupresora del ácido *cis*-urocánico, entre ellas el alto porcentaje de mortalidad de ratones a los que se les administró este compuesto y/o fueron irradiados con luz UV-B y que posteriormente fueron sometidos a experimentos de desafío utilizando virus-herpes (Norval, *et al.*, 1989). Se ha demostrado que existe sinergia entre el ácido *cis*-urocánico y la histamina para incrementar la producción de prostanoídes, compuestos que aumentan la permeabilidad vascular y están implicados en la inmunosupresión mediada por radiación UV-B (Jaksic, 1995). Por otra parte, el ácido *cis*-urocánico se une a los receptores del ácido γ -aminobutírico (GABA) en los linfocitos, de esta forma, al actuar como agonista del

GABA, se detiene la actividad citotóxica de los linfocitos T inhibiendo la actividad inmune de estas importantes células (Norval, 2001).

I.3.4 FILTROS SOLARES.

El origen de la vida en el planeta se produjo en gran parte por los cambios atmosféricos que disminuyeron la cantidad de irradiación de luz ultravioleta que incidía en la superficie terrestre. La importancia fundamental de la fotoprotección para la supervivencia se ilustra por su conservación en la escala evolutiva. Así, los organismos más primitivos poseen métodos endógenos que los protegen de las excesivas cantidades de RUV solar. Los humanos y otros vertebrados poseen pigmentos que absorben luz además de otros sistemas químicos y enzimáticos que reparan los daños producidos por la exposición excesiva a la radiación UV (Pathak, 1986). Los individuos con alteraciones genéticas en estos mecanismos protectores, como el albinismo y el xeroderma pigmentosum, tienen una vida media corta (Cleaver y Kraemer, 1995). El hombre ha buscado protegerse de la radiación ultravioleta mediante sustancias que absorban esta energía. Los filtros solares son sustancias químicas que se aplican tópicamente (aunque ya existen filtros solares cuya vía de administración es oral) y que protegen de los efectos adversos de la luz solar, en particular de la quemadura por RUV (Pathak, 2000).

Existen evidencias de que en las grandes civilizaciones antiguas, los hombres se protegían de la radiación solar usando ropa adecuada, así, los Griegos usaban velos y sombreros de bordes prominentes; las sombrillas ya existían en Egipto, Mesopotamia, China e India. En América los indios de las Guayanas usaban extractos vegetales y alquitrán para protegerse del sol.

Durante 1887 el médico alemán Thomas Veiel fue capaz de proteger a un paciente con eczema solar usando velos rojos finamente tejidos. En 1889, Erasmo J. Widmark utilizó sulfato de quinina para absorber radiación UV-B, propuso correctamente que la quinina podía absorber longitudes de onda corta. Corría el año de 1891 cuando Frank Hammer repitió los experimentos de Widmark y usó la quinina para preparar lociones y ungüentos constituyéndose así el primer filtro solar comercial para uso humano. Durante el siglo veinte se utilizaron los extractos de varias plantas como filtros solares. Uno de los mas efectivos fue el extracto de castaña. Durante 1911, Leopold Freund investigó varios de los filtros solares usados en esa época mediante un método fotográfico de prueba para evaluar las capacidades de absorción. Freund fue el primer investigador que sugirió que las longitudes de onda menores de 325 nm son las principales causantes de eritema. En 1922, Michael Eder y Leopold Freund, proponen el uso de las sales del ácido 2-naftol-6,8-disulfónico para absorber radiación UV-A y UV-B. En los siguientes 40 años se introdujeron varias sustancias para usarlas como filtros solares: el ácido tánico (1925), el salicilato de benzilo (1931), los derivados del ácido *para*-aminobenzoico y del 2-fenilimidazol (1942), el ácido antranílico (1950), varios cinamatos (1954), la cloroquina (1962), las benzofenonas (1965) y muchas otras sustancias (Urbach, 2001).

Actualmente, muchos individuos con poca pigmentación y que trabajan en actividades al aire libre se protegen de la RUV de acuerdo con normas laborales y médicas, sin embargo, los actuales hábitos y estilos de vida han incrementado la incidencia y prevalencia del cáncer y del fotoenvejecimiento de la piel. Debido a esto, se ha realizado una fuerte campaña por parte de los científicos y gobiernos para educar a la población sobre los efectos adversos de la RUV, y de parte de los dermatólogos, químicos, biólogos y compañías farmacéuticas para el desarrollo de productos que se puedan aplicar en la piel y

que permitan incrementar el tiempo de exposición de los individuos a la radiación. Los programas educacionales recomiendan: (I) Evitar exponerse a la radiación solar en horas pico (medio día); (II) usar ropa que proteja cuello, brazos y piernas; (III) usar sombreros; (IV) usar gafas contra el sol y bloqueadores solares; (V) utilizar filtros solares con factor de protección solar (FPS) de 15 o mayores. (Elmets y Anderson, 1996).

En los primeros años del siglo próximo pasado se pusieron a la disposición del público los primeros filtros solares, pero hasta 1979 todos tenían un FPS menor de 15 (Rothman y Rubin, 1942; Pathak, 1986). El ácido *p*-aminobenzoico (PABA) fue uno de los primeros filtros solares que se comercializaron intensivamente, pero con el tiempo se introdujeron otros compuestos al mercado. Actualmente se utilizan filtros solares derivados de ocho grandes grupos: los derivados del PABA, los salicilatos, los cinamatos, las benzofenonas, los antranilatos, los derivados del dibensoilmetano, los derivados del alcanfor y una clase que se le considera “miscelánea” porque en ella se incluyen filtros solares con diferentes grupos cromóforos (Shaath, 1997). Los compuestos que absorben en la región del UV-A son los antranilatos, las benzofenonas y los derivados del dibensoilmetano, y los que absorben radiación UV-B son los derivados del PABA, los salicilatos, los cinamatos, y los derivados del alcanfor (Shaath, 1977). Algunos filtros solares tienen uno o varios componentes activos. La mayoría de los filtros solares protegen a la piel de la radiación UV-B porque esta longitud de onda provoca eritematosis y cáncer de células basales.

Así, todos los filtros solares que se usan comúnmente, absorben RUV, y por lo tanto reducen la cantidad de ésta que pudiese alcanzar las capas de la piel debajo del *stratum corneum*. La protección que proporciona un filtro solar se determina de acuerdo al valor del Factor de Protección Solar o FPS (Pathak, 1986). Los valores de FPS para un filtro solar se determinan estableciendo la cantidad (tiempo de exposición) de radiación solar simulada

requerida para causar un eritema uniforme en la piel (Dosis Mínima Eritematogénica, DME) y que se trata con 2.0 mg/cm^2 del filtro solar a evaluar, comparada con la cantidad de radiación solar simulada requerida para producir eritema uniforme en piel no protegida con filtro solar (Elmets, 1996). El valor del FPS se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{FPS} = \frac{\text{Dosis de UV que provoca 1 DME (Dosis Mínima Eritematogénica) con Filtro Solar}}{\text{Dosis de UV que provoca 1 DME sin Filtro Solar}}$$

De esta manera, la piel tratada con un filtro solar con un valor de FPS de 15 requerirá 15 veces más radiación solar simulada con respecto a la piel no tratada para desarrollar un eritema mínimo perceptible. Es falso concebir que no ocurrirán daños después de que se haya aplicado un filtro solar y la piel se exponga a la radiación por menos tiempo que el FPS. En realidad, la piel tratada con un FPS de 15 y expuesta a 7.5 DME de radiación UV recibe el equivalente de 0.5 DME (Elmets, 1996).

Se ha demostrado que el uso de filtros solares reduce los daños, tanto agudos (eritema), como crónicos (fotoenvejecimiento y cáncer de piel) provocados por la radiación UV-B. Los filtros solares pueden prevenir los efectos crónicos de forma indirecta al impedir que mediadores de la respuesta inmune se transformen en isómeros nocivos por efecto de la radiación UV-B (Finlay-Jones, 1998 y Kerr, 1998).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I.4 JUSTIFICACIÓN.

Las plantas *B. perfoliata* y *B. scordioides* son especies medicinales que se utilizan para desinfectar heridas y para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales de probable origen infeccioso. *B. scordioides*, además, es utilizada para prevenir las quemaduras solares. El interés por realizar este estudio surgió a partir de las siguientes consideraciones:

- Contribuir al conocimiento de la química de estas dos especies, puesto que no existían estudios al respecto.
- Determinar si estas plantas presentan metabolitos secundarios que justifiquen las actividades biológicas que se les atribuye.
- Realizar investigación básica tendiente a encontrar nuevas alternativas para el tratamiento de enfermedades provocadas por bacterias. Actualmente ha adquirido importancia la búsqueda de sustancias que dañen la viabilidad de las bacterias mediante mecanismos diferentes a los de los antibióticos convencionales, puesto que las bacterias que han creado resistencia a los antimicrobianos de uso común se han convertido en un problema real de salud pública.
- Por otra parte, debido a la incidencia de cáncer en la piel, es importante determinar si estas plantas contienen metabolitos con propiedades de filtros solares, que tendrían la ventaja de ser biodegradables y probablemente con menos efectos secundarios que los filtros solares sintéticos, cabe hacer notar que también estos metabolitos pueden ser usados para atenuar los síntomas de las enfermedades relacionadas con la exposición a la radiación solar como el lupus eritematoso, el xeroderma pigmentosum, y el albinismo; además de que también podrían utilizarse para prevenir la fotoalergia y la fototoxicidad.
- Que los resultados de la presente investigación sirvan de base para nuevos estudios relacionados con estos temas.

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

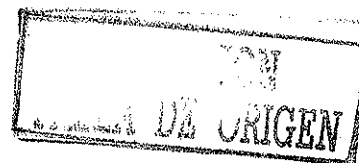
II.1 HIPÓTESIS.

Las plantas *B. perfoliata* y *B. scordioides*, son utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. *B. scordioides*, además, se emplea para prevenir las quemaduras solares; por lo que, ambas plantas deben contener metabolitos secundarios con propiedades antibacterianas y *B. scordioides* puede contener sustancias que actúen como agentes fotoprotectores.

II.2 OBJETIVOS.

II.2.1-OBJETIVOS GENERALES.

1. Aislar e identificar los principales metabolitos secundarios de las plantas *Buddleja perfoliata* HBK y *Buddleja scordioides* HBK.
2. Evaluar la actividad antibacteriana de los metabolitos aislados y determinar su posible modo de acción antibacteriana.
3. Evaluar la actividad fotoprotectora en la región del UV-B de los productos naturales aislados que contengan cromóforos apropiados; es decir, que absorban en la región del UV-B.



II.2.2 –OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Preparar extractos con disolventes de distinta polaridad a partir de cada planta.
2. Aislar y purificar los componentes principales de cada extracto.
3. Realizar los análisis espectroscópicos y químicos que permitan elucidar las estructuras de los principales metabolitos aislados.
4. Determinar cualitativamente la actividad antibacteriana de los compuestos aislados.
5. Obtener la concentración mínima inhibitoria y bactericida mínima de las sustancias activas.
6. Determinar el modo de acción antibacteriano de los productos activos mediante experimentos de incorporación de precursores marcados y obtener las curvas de supervivencia.
7. Evaluar la actividad fotoprotectora en la región del UV-B de los compuestos que tengan absorción en dicha zona del espectro electromagnético empleando modelos biológicos.
8. Determinar en conejillos de indias (cuyos), el Factor de Protección Solar (FPS) de las sustancias que absorban en el UV-B.
9. Realizar un estudio histopatológico comparativo entre los tejidos protegidos con las sustancias fotoprotectoras y los no protegidos, con la finalidad de evaluar los daños en los tejidos de piel de cuyo.

CAPÍTULO III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1 METODOLOGÍA GENERAL PARTE QUÍMICA

III.1.1 - EQUIPO USADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES FÍSICAS ESPECTROSCÓPICAS Y ESPECTROMÉTRICAS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y se describen sin corregir. Los espectros en el Infrarrojo se obtuvieron en un aparato de rejilla Perkin-Elmer modelo 599B y en un aparato Nicolet FT-5X, en pastilla de KBr y/o en suspensión en nujol. Para las separaciones cromatográficas automatizadas se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Waters Millipore 4000.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H) y de carbono-13 (RMN-¹³C) fueron obtenidos en los equipo Varian Unity VXR-300s, y Jeol eclipse 300, los cuales se operaron a una frecuencia de 300 y 75.44 MHz, respectivamente, y en un aparato FT-NMR Varian PIOS 500, que trabajó a una frecuencia de 500 MHz (para RMN-¹H) y 125.7 MHz (para RMN-¹³C). Los espectros se obtuvieron en CDCl₃, CD₃OD o en piridina deuterada, dependiendo de la solubilidad de los compuestos; los desplazamientos químicos se expresan en unidades de ppm (δ) con respecto al tetrametilsilano (TMS), que se usó como referencia interna. En el caso de los espectros de RMN-¹H, las constantes de acoplamiento (J) se obtuvieron directamente del espectro y se reportan en Hertz (Hz). Los experimentos DEPT, COSY, HMQC y HMBC se realizaron en un aparato FT-NMR Varian PIOS 500. Se emplearon los programas de secuencias de pulsos estándares Varian para el

registro de los espectros bidimensionales homonucleares (^1H - ^1H -COSY). Para los experimentos de HMQC y HMBC se emplearon las siguientes condiciones: $\Delta 51\text{s}$ y J5140, 8 Hz, respectivamente. Los espectros de HMQC se registraron en modo de fase sensible y los espectros de HMBC fueron procesados mediante la técnica de modo mezclado (fase sensible a lo largo de F_1 y valor absoluto a lo largo de F_2).

Los espectros de masas se determinaron en un aparato Jeol JMS-SX102A mediante la técnica de bombardeo rápido de átomos (FAB-MS) y se obtuvieron con un sistema JMA-3500, empleando como matriz alcohol m-nitrobencílico, el átomo acelerado para la generación de iones a partir de la muestra fue xenón utilizando un voltaje de 6 KeV.

III.1.2 -MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Las cromatografías de adsorción en columna abierta se realizaron sobre gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, malla 70-230 ASTM). Para las cromatografías en capa fina (ccf) se emplearon cromatofolios de aluminio cubiertos con gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck (0.2 mm de espesor, para análisis). La ccf permitió verificar el desarrollo de las cromatografías en columna abierta y comprobar la pureza de los compuestos obtenidos. Como agentes cromogénicos se emplearon: I) una solución de sulfato cérico en ácido sulfúrico concentrado, y para el desarrollo del color fue necesario calentar las placas cromatográficas durante dos minutos a 110 °C. II) Luz UV de 254 y 366 nm (Ultraviolet Fluorescence Analysis Cabinet. Spectroline Mod CX-20).

Para el análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del aceite esencial de *B. perfoliata* (GC-MS) se utilizó un cromatógrafo Hewlett Packard modelo 5890 serie II conectado a un espectrómetro Jeol AX50HA. El análisis se realizó

utilizando una columna DB WAX de 30 m x 0.32 mm y diámetro interno de 0.25 µm. Las condiciones de separación fueron: temperatura del horno 80-220 °C (aumentando gradualmente la temperatura a razón de 8°C por minuto); temperatura del inyector 225 °C; gas de acarreo He, a presión de 134 Kpa (19 Psi) y velocidad linear de 20 cm/s; cantidad de muestra empleada: 1.0 µl; energía de ionización 70 eV.

III.1.3-RECOLECTA Y SECADO.

La *B. perfoliata* se recolectó en los alrededores de San Martín Texmelucan estado de Puebla en agosto de 1997. La zona presenta vegetación perturbada de tipo pastizal con arbustos.

B. scordioides se recolectó durante el mes de noviembre de 1997 en el municipio de Matehuala, San Luis Potosí en el kilómetro 16 de la carretera Matehuala-Dr. Arroyo, a 10 metros de la orilla de la carretera, la zona presenta vegetación tipo matorral xerófito. En ambos casos, la recolecta se realizó manualmente y algunos ejemplares se prensaron y se depositaron en el herbario Izta de la FES-Iztacala UNAM para su identificación, en donde se le asignaron los siguientes números de registro:

B. perfoliata: 25560

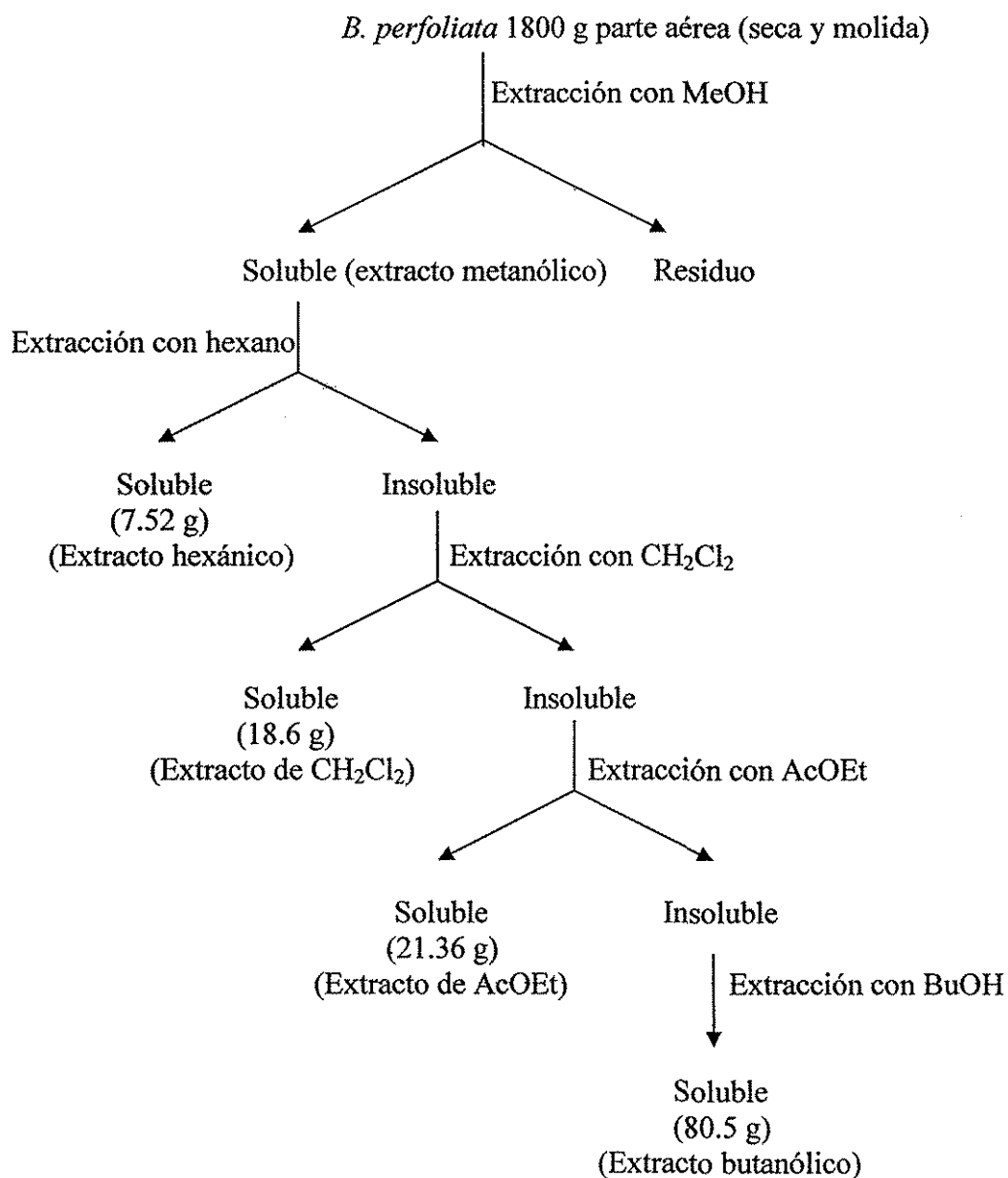
B. scordioides: 26140

Una vez transportadas al laboratorio, las plantas se extendieron sobre papel periódico y se secaron a la sombra durante una semana; transcurrido este tiempo se molieron y se guardaron en costales.

III.1.4 -EXTRACCIÓN.

III.1.4.1 – Extracción de *B. perfoliata*.

Para la extracción de *B. perfoliata* se procedió de acuerdo al siguiente diagrama de flujo (Lin, 1990).

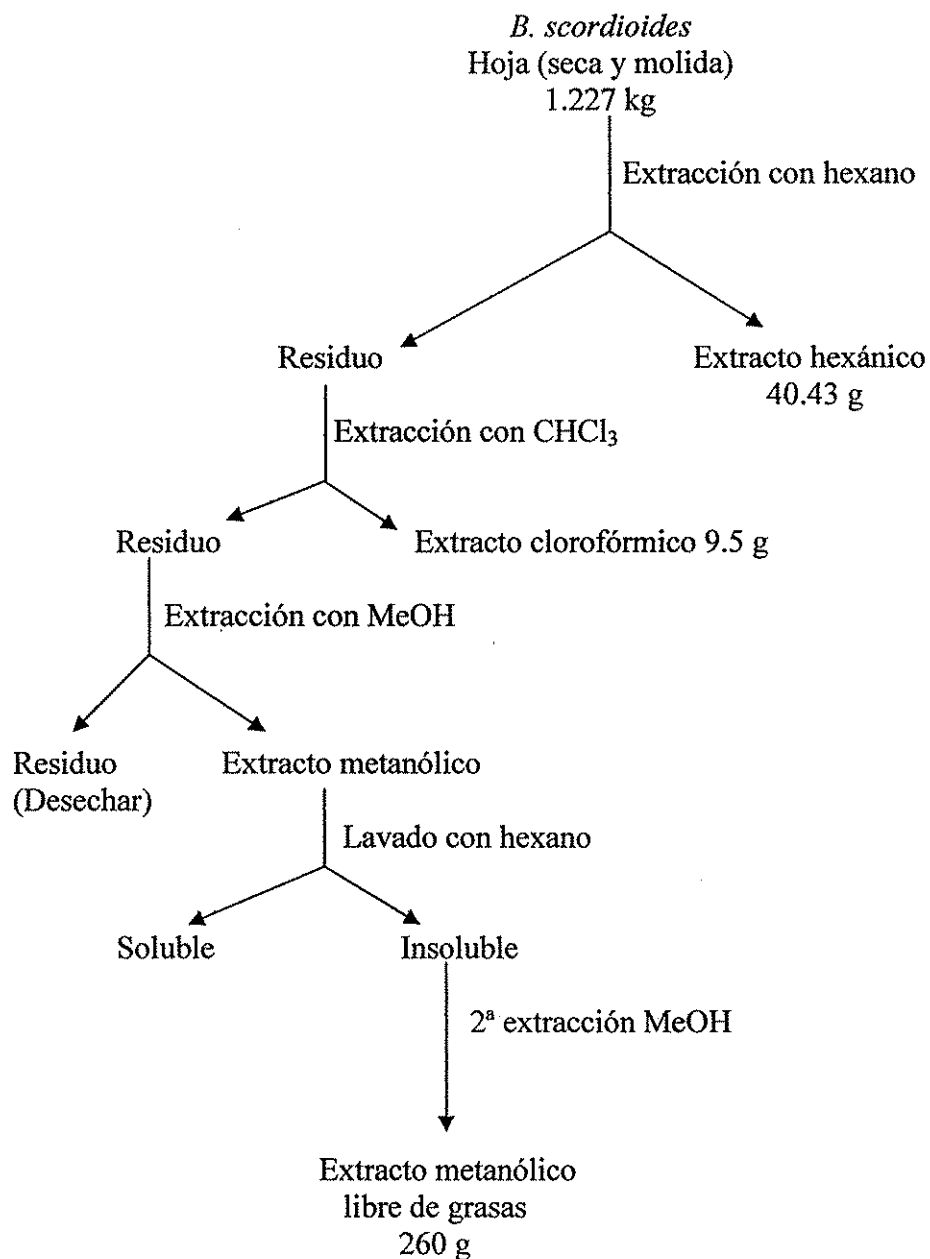


Esquema I. Preparación de los extractos de *Buddleja perfoliata*

Los extractos fluidos se obtuvieron por percolación y los extractos concentrados mediante destilación a presión reducida.

III.1.4.2. Extracción de *B. scordioides*.

En el esquema 2 se describe el procedimiento para la extracción de *B. scordioides*:



Esquema 2.- Preparación de los extractos de *B. scordioides*

Los extractos fluidos se obtuvieron por percolación y los extractos concentrados mediante destilación a presión reducida.

III.1.4.3 - ACEITE ESENCIAL DE *B. perfoliata*.

El material vegetal fresco y fragmentado (parte aérea) se sometió a una destilación por arrastre de vapor de acuerdo a la técnica convencional para la obtención de aceites esenciales (Vogel, 1989). En el matraz generador de vapor, se colocó un litro de agua destilada y en otro 500 g de planta. Posteriormente, el matraz generador de vapor se calentó hasta ebullición y el vapor generado se hizo pasar a través del material vegetal. El calentamiento se suspendió cuando se obtuvieron 500 ml de destilado. El aceite esencial se extrajo del destilado mediante reparto, empleando éter etílico como disolvente. La fase orgánica se trató con sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró a presión reducida para generar 2 ml de aceite.

III.1.5- OBTENCIÓN DE LOS PRINCIPALES METABOLITOS DE *B. perfoliata*

III.1.5.1 -FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

El extracto de acetato de etilo (Esquema I, 21.36 g) se fraccionó en una columna cromatográfica empacada con 300 g de gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck, utilizando como eluyentes CH₂Cl₂, y mezclas de CH₂Cl₂-MeOH con aumento gradual de la polaridad. Se recolectaron 188 fracciones de 100 ml cada una. En la tabla 1 se resumen los sistemas de elución empleados y las fracciones resultantes. El fraccionamiento cromatográfico fue verificado mediante ccf, las fracciones con factor de retención (rf) semejante se reunieron dando 4 grupos de fracciones.

Tabla 1.- Fraccionamiento del Extracto de Acetato de Etilo de *B. perfoliata*

Eluyente	Proporción %	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas	Peso del residuo (g)
CH ₂ Cl ₂	100	1-5		
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	95:5	6-33	1-33	12.3
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	90:10	34-106	34-57	0.2
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	80:20	107-129		
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	70:30	130-155	58-155	3.2
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	60:40	156-169		
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	50:50	170-175	156-188	0.4
MeOH	100	176-188		

De las fracciones 58-155 precipitó un compuesto amarillo verdoso (3.2 g) que después de ser lavado con metanol, mostró las siguientes constantes físicas y datos espectroscópicos: pf. 273-274 °C, UV λ_{\max} 334 nm (ϵ , 18832); $[\alpha]_D^{22^\circ\text{C}}$: -99.1° (piridina; c 0.8); IR (Espectro 3) ν_{\max} (KBr) (cm⁻¹): 3350 (OH), 1650 (C=O), 1610 (C=C); 1590, 1560, 1500 (anillo aromático). RMN ¹H (DMSO) (Espectro 4) δ : 1.13 (3H, d, J = 6.1 Hz, metilo ramnosa), 3.2 – 4.8 (14 H azúcares), 5.11 (1H, d, J = 7.2 Hz, H₁ glucosa), 5.26 (1H, s amplio, H₁ ramnosa), 6.5 (1H, d, J = 2.18 Hz, aromático), 6.84 (1H, d, J = 2.18 Hz, aromático), 6.99 (1H, s, vinílico), 7.2 (1H, d, J = 8.86 Hz, aromático), 8.1 (1H, d, J = 8.86 Hz, aromático), 12.96 (1H, s, OH). Los datos anteriores y su rf coinciden con los de la linarina (2).

III.1.5.1.1 -ACETILACIÓN DE LA LINARINA.

Una solución de 100 mg de linarina en piridina (1 ml) y anhídrido acético (1 ml) se calentó a 60 °C durante 1 h; la mezcla de reacción se dejó durante toda la noche a temperatura ambiente, el progreso de la misma se determinó mediante cromatografía en capa fina. Una vez que la transformación se completó, la mezcla de reacción se vertió en agua, el sólido formado se filtró y lavó con agua; el producto de la acetilación una vez secado pesó 68 mg, y presentó un pf de 124-125 °C; su espectro en el IR resultó idéntico al de una muestra auténtica de acetato de linarina.

III.1.5.2 -FRACCIONAMIENTO PRELIMINAR DEL EXTRACTO BUTANÓLICO

El extracto butanólico (Esquema I, 80.5 g) se fraccionó de manera preliminar en una columna cromatográfica empacada con 800 g de gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck, utilizando como sistema de elución CH₂Cl₂-MeOH, con aumento gradual de la polaridad. Se recolectaron 135 fracciones de 250 ml cada una. El fraccionamiento cromatográfico seguido mediante ccf permitió la obtención de 5 grupos de fracciones primarias (Tabla 2).

Tabla 2.- Fraccionamiento Preliminar del Extracto Butanólico de *B. perfoliata*.

Eluyente	Proporción %	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas	Peso del residuo (g)
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	90:10	1-79	1-29	12.4
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	80:20	80-104	30-49	1.58
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	70:30	105-110	50-103	46.4
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	60:40	118-126	104-116	1.2
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	50:50	127-130	117-135	5.3
MeOH	100	131-135		

De la fracción 30-49 eluída con CH₂Cl₂-MeOH 4:1 se aislaron 1.58 g de linarina pura. A partir de la fracción 50 y hasta la 103 se obtuvo linarina impura; al unir estas fracciones, precipitó una mayor cantidad de linarina que fue purificada mediante cristalización generando 300 mg de compuesto puro.

III.1.5.2.1 –SEPARACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA FRACCIÓN 50-103.

Las fracciones 50-103 se reunieron dando 46.1 g de residuo que se separó en columna empacada con 500 g de gel de sílice 60 F₂₅₄, utilizando CH₂Cl₂-MeOH como fase móvil, aumentando la polaridad de manera gradual; al igual que en los casos anteriores. Se colectaron 134 fracciones de 100 ml, la distribución de las fracciones fue la siguiente (Tabla 3):

Tabla 3.- Recromatografía de las fracciones 50-130 (extracto butanólico de *B. perfoliata*)

Eluyente	Proporción %	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas	Peso del residuo (g)
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	90:10	1-30	1-80	0.289
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	80:20	31-50		
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	70:30	51-124	81-88	10.0
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	50:50	125-134	89-134	23.2

De las fracciones 89-134 se obtuvieron 23.2 g de verbascósido (3) como una sustancia amorfa que presentó una sola mancha en ccf y tuvo: $[\alpha]_D^{+22^\circ} -41.5$ (MeOH; c 1.1). UV λ_{\max} (log ϵ) (en metanol) (nm): 208 (4.30), 217 (4.45), 291 (4.41), 332 (4.54). IR (Espectro 6) ν_{\max} (nujol) (cm⁻¹): 3348 (OH), 2932 (C-H), 1692 (éster conjugado), 1629 (C=C), 1602-1518 (C-C de anillo aromático). RMN ¹H (CD₃OD) (Espectro 5) δ : 1.08 (d, $J=6.1$ Hz, 3H,

Metilo de Ramnosa), 2.78 (t, $J=7.32$ Hz, 2H, Ar-CH₂-CH₂), 4.36 (d, $J=7.94$ Hz, 1H, H-1 de glucosa), 5.17 (d, $J=1.1$ Hz, 1H, H-1 de Ramnosa), 6.26 (d, $J=15.8$ Hz, 1H Ar-CH=CH), 7.58 (d, $J=15.8$ Hz, 1H, Ar-CH-CH), 6.55-7.05 (6H, H aromáticos), 3.5-4.25 (8H, H de azúcares).

III.1.5.3- BÚSQUEDA DE SAPONINAS EN *B. perfoliata*.

De una segunda recolección en los alrededores de San Martín Texmelucan, Puebla durante el mes de octubre de 1999, se procedió a obtener un extracto polar (metanólico) para determinar la presencia de saponinas. El proceso fue el siguiente: 1000 g de planta se extrajeron mediante percolación primero con n-hexano, posteriormente con acetato de etilo, y finalmente con metanol. La solución metanólica se concentró a presión reducida dejando un residuo de 191.3 g. Se tomaron diez gramos del extracto y se hidrolizaron con 100 ml de HCl 1N mediante calentamiento en baño maría durante 8 h. La mezcla de reacción se neutralizó con una solución concentrada de NaHCO₃ y se extrajo con cloroformo. Se buscó la presencia de sapogeninas en la fase no polar mediante cromatografía en capa fina, empleando la saikogenina A y el 3,23,28-trihidroxi-olean 11,13(18)-dieno como referencia puesto que estas dos sustancias se obtuvieron como producto de hidrólisis de las saponinas aisladas de *B. scordioides*, los resultados fueron negativos. Aunque no se encontraron saponinas, la fase orgánica (900 mg) se separó mediante cromatografía de columna abierta empacada con gel de sílice, eluida con mezclas de n-hexano-AcOEt, y aumentando paulatinamente la polaridad. Se obtuvieron 42 fracciones de 10 ml cada una, las cuales se distribuyeron como se muestra en la Tabla 4.



Tabla 4.- Separación de los componentes de la fase orgánica del hidrolizado de *B. perfoliata*.

Eluyente	Proporción %	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas	Peso del residuo (g)
Hexano-AcOEt	90:10	1-14	1-6	0.289
Hexano-AcOEt			7-14	0.010
Hexano-AcOEt	80:20	15-42	15-19	0.015
Hexano-AcOEt			20-33	0.180
Hexano-AcOEt			34-36	0.150
Hexano-AcOEt			37-42	0.076

De las fracciones 15-19 se obtuvo un compuesto cristalino (15 mg) de color amarillo-verdoso, el cual se identificó como el éster metílico del ácido ferúlico.

Éster metílico del ácido ferúlico (4). IR (Espectro 7) ν_{\max} (CHCl₃) (cm⁻¹): 3536 (OH), 1707 (C=O), 1637 (C=C), 1513 (C-C de anillo aromático), 1267 (C-O). RMN ¹H (CDCl₃) (Espectro 9), δ : 7.62 (d, $J=15.9$ Hz, 1H, Ar-CH=CH), 6.29 (d, $J_1=15.9$, 1H, Ar-CH=CH), 7.07 (dd, $J_1=8.1$ Hz, $J_2=1.8$ Hz, 1H, aromático), 7.025 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, aromático), 6.91 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, aromático), 3.92 (s, 3H, OCH₃), 3.79 (s, 3H, OCH₃). RMN ¹³C (Espectro 10) (CDCl₃), 167.7 (C=O), 144.9, 115.13 (carbonos vinílicos); 146.8, 126.9, 123.0, 114.7, 109.6 (carbonos aromáticos); 55.9, 51.59 (metilos). EM-IE (Espectro 8), m/z (intensidad relativa): 208 [M⁺ (100)], 192 (62), 149 (13), 145 (27), 133 (13), 121 (18), 75 (19).

III.1.6 – OBTENCIÓN DE LOS PRINCIPALES METABOLITOS DE *B. scordioides*.

III.1.6.1 -FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO METANÓLICO

El extracto metanólico de *B. scordioides* (260.10 g), fue fraccionado de manera preliminar en una columna abierta empacada con 2 kg de gel de sílice 60 F₂₅₄, usando como fase móvil AcOEt y mezclas de AcOEt-MeOH. Se recolectaron 327 fracciones de 250 ml, el fraccionamiento fue monitoreado mediante ccf y permitió la obtención de 5 grupos de fracciones primarias. En la Tabla 5 se resumen los sistemas de elución empleados y las fracciones resultantes.

Tabla 5.- Fraccionamiento del Extracto Metanólico de *B. scordioides*

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas	Peso del residuo (g)
AcOEt	100	1-58	2-12	12.0
AcOEt-MeOH	97.5:2.5	59-98	13-29	38.2
AcOEt-MeOH	95.5:5.0	99-130	30-103	73.4
AcOEt-MeOH	92.5:7.5	131-179		
AcOEt-MeOH	90:10	180-216	104-301	85.4
AcOEt-MeOH	85:15	217-240		
AcOEt-MeOH	80:20	241-300		
AcOEt-MeOH	70:30	301-311	302-325	2.3
AcOEt-MeOH	60:40	312-320		
AcOEt-MeOH	50:50	321-326		
MeOH	100	327		

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

De las fracciones 13 a la 29 se obtuvo un polvo amorfo de color amarillo (38.3 g) que generó una sola mancha al analizarlo por ccf. Su espectro en el infrarrojo y patrón cromatográfico en ccf fueron idénticos a los del verbascósido. A partir de la fracción 193 y hasta la 300 cristalizó un compuesto (15.2 g) blanco con punto de fusión de 158-160 °C que fue identificado como manitol por comparación de su espectro infrarrojo con el de una muestra auténtica.

Manitol (5): cristales agujas $[\alpha]_D^{+22} = -2.1$ (MeOH). IR (Espectro 12) ν_{\max} (KBr) (cm^{-1}): 3270 (OH), 2935 (C-H), 1054, 1024 (C-O).

III.1.6.2-AISLAMIENTO DE LA SYRINGINA (6) Y DEL O-METILCATALPOL (7).

Las fracciones 30-103 de la cromatografía original se combinaron dando un residuo de 73.4 g que se separó mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (1 Kg), utilizando como mezclas de elución CH_2Cl_2 y CH_2Cl_2 -MeOH. Se recolectaron 121 fracciones de 150 ml. En la Tabla 6 se resumen los sistemas de elución y las fracciones resultantes.

Tabla 6.- Recromatografía en columna de la fracción secundaria 30-130.

Eluyente	Proporción %	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas	Peso del residuo (g)
CH_2Cl_2	100	1-15	1-15	25.5
CH_2Cl_2 -MeOH	95:5	16-60	16-60	21.2
CH_2Cl_2 -MeOH	90:10	61-121	61-83	13.1
			84-121	10.5

A partir de la fracción 61 y hasta la 83 precipitó un compuesto verde amarillento cuyo rf, pf, y espectro en el infrarrojo fueron idénticos a los de la linarina. El análisis de la fracción 84-121 (10.5 g) mediante ccf indicó que estaba formada por cuando menos tres compuestos, los cuales fueron separados usando cromatografía en columna empacada con 200 g de gel de sílice. El proceso de elución se realizó con CH₂Cl₂-Acetona (60:40). De esta columna se obtuvieron 79 fracciones de 50 ml cada una y se reunieron aquellas que eran iguales desde el punto de vista cromatográfico. En la Tabla 7 se resume el sistema de elución empleado y las fracciones resultantes.

Tabla 7.- Recromatografía en columna de la fracción terciaria 84-121.

Eluyente	Proporción	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas	Peso del residuo (g)	Compuesto aislado
CH ₂ Cl ₂ - Acetona	60:40	1-79	29-35	0.0478	Syringina
			44-51	0.250	O-Metil Catalpol
			55-79	7.52	Verbascósido

De la fracción 29 a la 35 cristalizó un compuesto (47.8 mg) que se recrystalizó de metanol, y fue identificado como la syringina. Syringina (6): cristales amarillos, pf 194-197 °C. IR (Espectro 13) ν_{\max} (KBr) (cm⁻¹): 3337 (OH), 1640 (C=C), 1113 (C-O), 1507 (C-C de anillo aromático). RMN ¹H (Espectro 14) (CD₃OD), δ : 6.65 (2H, s, aromáticos), 6.49 (1H, d, $J=15.9$ Hz, Ar-CH=CH), 6.28 (1H, dt, $J_1=15.9$ Hz, $J_2=5.1$ Hz, Ar-CH=CH), 4.68 (1H, t, $J=5.1$ Hz, CH₂), 4.18 (1H, t, $J=5.1$ Hz, CH₂), 4.75 (1H, d, $J=6.9$ Hz, H-1 de glucosa), 4.53

(2H, d, $J=2.7$ Hz, CH₂ de glucosa), 3.3-4.9 (4H, H de azúcares), 3.83 (6H, s, 2 OCH₃). EM-FAB (Espectro 18) m/z : 395 [M+23]⁺; 373 [M+H]⁺; 210 [M-162]⁺; 193 [M-179]⁺.

O- metilcatalpol (7).

De la fracción 44 a la 51 cristalizó un compuesto blanco (125.8 mg, pf 233-235°C) cuyo rf fue igual al del O-metil catalpol. Su espectro en el IR (Espectro 19) ν_{\max} (KBr) (cm⁻¹): 3375 (OH), 2900 (C-H), 1062 (C-O), se superpuso al de una muestra auténtica de O-metilcatalpol con lo que se logró su identificación.

A partir de la fracción 53 y hasta la 79 se obtuvo un compuesto (7.52 g) cuyo patrón cromatográfico en ccf y espectro infrarrojo fue idéntico al de una muestra auténtica de verbascósido (rendimiento total = 2.5%).

III.1.7-METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE LAS SAPONINAS DE *B. scordioides*.

III.7.1 -AISLAMIENTO.

Se reunieron las fracciones 104-301 de la cromatografía del extracto metanólico generando 85.4 g de residuo. Este se sometió a separación por cromatografía de columna abierta sobre gel de sílice. Como eluyente se utilizó una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH 80:20, aumentando gradualmente la polaridad. En la Tabla 8 se resumen los sistemas de elución empleados y el número de fracciones obtenidas.

Tabla 8.- Recromatografía de la fracción 104-301.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas	Peso del residuo (g)
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	80:20	1-67	1-9	8.3
CH ₂ Cl ₂ -MeOH			10-22	9.4
CH ₂ Cl ₂ -MeOH			23-39	12.3
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	75:25	68-109	40-74	18.2
CH ₂ Cl ₂ -MeOH			75-84	12.8
CH ₂ Cl ₂ -MeOH			85-98	3.1
CH ₂ Cl ₂ -MeOH			99-109	3.5
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	70:30	110-146	110-146	14.5

A partir de la fracción 110 (eluida con mezcla de CH₂Cl₂-MeOH 70:30) y hasta la 146 cristalizó manitol (12 g), estas fracciones se juntaron por tener igual patrón cromatográfico en ccf. El manitol se separó y las aguas madres se fraccionaron mediante cromatografía en columna (rendimiento total de manitol, 3.28%).

Las aguas madres de las fracciones 110-146 se combinaron para generar 2.5 g de un residuo que se fraccionó mediante una cromatografía en columna abierta usando gel de sílice como fase estacionaria y como sistema de elución isocrática una mezcla de AcOEt-MeOH 9:1; de esta columna se obtuvieron 183 fracciones de 50 ml cada una. En la Tabla 9 se resume el sistema de elución empleado y las fracciones recolectadas.

Tabla 9.- Recromatografía de la fracción 110-146.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas	Peso del residuo (mg)
AcOEt-MeOH	9:1	1-183	1-7	30
			8-10	150
			11-21	320
			22-34	210
			35-49	311
			50-74	382
			75-101	334
			102-122	205
			123-183	295

La ccf de las fracciones indicó que la fracción 123-183 generaba una sola mancha, por lo que se analizó espectroscópicamente. El resultado del análisis de RMN ¹H (Espectro 21) y de espectrometría de masas (Espectro 24) indicó que la fracción 123-183 era una mezcla de saponinas (295 mg), que daban una sola mancha en cromatografía en capa fina por ser de similar polaridad, esta fracción se analizó mediante espectrometría de masas modalidad

FAB⁺. El espectro resultante presentó los siguientes picos en una relación m/z de: 1095 [M+Na]⁺; 1111 [M+Na]⁺; 1127 [M+Na]⁺; 1143 [M+Na]⁺.

III.1.7.2 -HIDRÓLISIS ÁCIDA DE LA MEZCLA DE SAPONINAS.

100 mg de la mezcla de saponinas se trataron con HCl 1N (10 ml) y se calentaron durante 3 horas en un baño de vapor. Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se neutralizó con una solución concentrada de bicarbonato de sodio, se formó un precipitado. El precipitado y la solución se extrajeron con CHCl₃.

Se separó la fase clorofórmica de la acuosa. Los componentes de la fase acuosa (azúcares) se separaron mediante cromatografía en capa fina de sílica gel (impregnadas con NaH₂PO₄), usando como fase móvil una mezcla de 2-propanol: acetona: ácido láctico 0.1M (4:4:2) y como agente cromogénico una mezcla de anilina-difenilamina-acetona-H₃PO₄; de esta manera se detectaron ramnosa (rf 0.83), fucosa (rf 0.65) y glucosa (rf 0.41) sobre la base de los datos reportados por Hansen, 1975.

Los componentes de la fase clorofórmica se aislaron usando cromatografía en capa fina preparativa de gel de sílice y como eluyente acetato de etilo. Así se aislaron 1.1 mg de saikogenina A (16) [pf = 300-301 °C. UV λ_{max} (en MeOH) 254 nm]; y 2.7 mg de 3,23,28-trihidroxiolean-11,13 (18) dieno (17) [pf = 280-283 °C. UV λ_{max} (en MeOH) 246 nm].

III.1.7.3 -ACETILACIÓN DE LA MEZCLA DE SAPONINAS.

Una solución de 100 mg de la mezcla de saponinas disueltas en piridina (1 ml) y anhídrido acético (1 ml) se calentó a 60 °C durante 1 h y posteriormente se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche. El progreso de la reacción se siguió mediante cromatografía en capa fina. La reacción se detuvo agregando agua y enfriando la mezcla de

reacción a 4 °C. La mezcla de los acetatos de saponina se lavó con agua y se extrajo con cloroformo, dando 32 mg de la mezcla de saponinas acetiladas.

III.1.7.4 -AISLAMIENTO DE LOS DERIVADOS ACETILADOS.

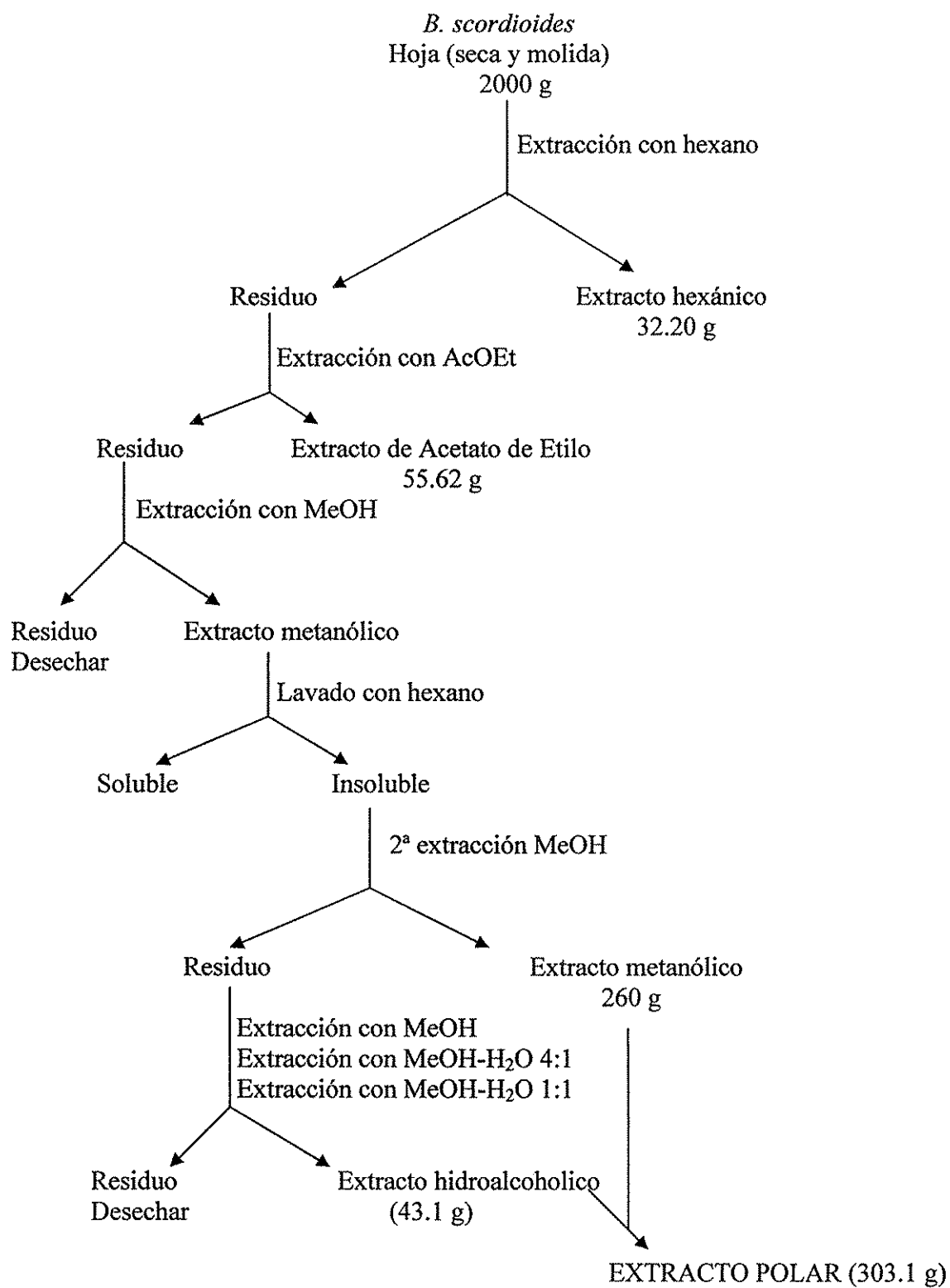
La mezcla de acetatos (32 mg) se disolvió en AcOEt y sus componentes fueron separados mediante HPLC utilizando una columna preparativa (μ -Porasil). Los acetatos fueron detectados mediante luz UV (250 nm) y separados por sus tiempos de retención (*Rt*). La elución se llevó a cabo de manera isocrática usando una mezcla de n-hexano–AcOEt 1:1 (flujo: 0.5 ml/min.). Los compuestos **13** (*Rt* 40 min., 5%) y **14** (*Rt* 58 min., 23%), se colectaron durante su primer paso a través de la columna. Cabe hacer notar que apareció un pico adicional (*Rt* 12 min., 72%), y después de hacer su análisis espectroscópico se concluyó que se trataba de una mezcla. Dos ciclos se llevaron a cabo para la separación completa de los compuestos. El compuesto **14** (peracetato de la Buddlejasonina I) (20 mg) es un polvo amorfo $[\alpha]_D^{25} = +27.7$. IR ν_{\max} (película) cm^{-1} , 2943 (C-H), 1747 (C=O), 1060 y 1039 (C-O). EM-FAB⁺ (Espectro 38) $\text{C}_{80}\text{O}_{35}\text{H}_{114}$ m/z: 1657 [M+23]⁺, 1635 [M+H]⁺, 1079 [M– Aglicona]⁺, 555 [Aglicona]⁺. RMN ¹H (Espectro39) (CDCl_3) δ : 0.78, 0.91, 1.08, 1.03; 0.97, 0.89 (cada señal 3H, s, 24–27, 29-30), 3.98, 3.18 (cada señal un H, sist.AB, d, $J = 7.5$ Hz, H₂-28), 4.26, 4.05 (cada señal un H, sist. AB, d, $J = 12$ Hz, $J = 11.5$ Hz, H₂-23), 5.16 (1H, dd, $J_1 = 10.5$ Hz, $J_2 = 3$ Hz, H-16), 5.41 (1H, d, $J = 10.5$ Hz, H-12), 5.88 (1H, d, $J = 10.5$ Hz, H-11), 3.49 (1H, traslapado, H-3), 4.26 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-1 fucosa), 4.71 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-1 glucosa), 4.64 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-1 glucosa), 4.86 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-1 ramnosa), 1.14 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, CH₃ fucosa), 1.15 (3H, d, $J = 6$ Hz, CH₃ ramnosa).

El compuesto **13** (peracetato de 3-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-fucopiranosil 3,23,28-trihidroxiolean-11,13(18)-dieno) (12 mg) es un polvo amorfo $[\alpha]_D^{25} = -7.5$. IR ν_{\max} (película) cm^{-1} , 2943 (C-H), 1747 (C=O), 1060 y 1039 (C-O). EM-FAB* (Espectro 44), $\text{C}_{80}\text{O}_{34}\text{H}_{114}$ m/z 1641 [$M+23$]⁺, 1618 [M]⁺, 1079 [M -Aglicona]⁺, 539 [Aglicona]⁺. RMN ¹H (Espectro 45) (CDCl_3) δ : 0.794, 0.925, 0.727, 0.962; 0.962, 0.794 (cada señal 3H, s, H₃-24—27, 29-30), 4.17, 4.0 (cada señal un H, sist. AB, d, $J= 11$ Hz, $J= 11.5$ Hz, H₂-28), 4.24, 4.07 (cada uno un H, sist. AB, d, $J= 11.5$ Hz, H₂-23), 1.19 (1H, s amplio, H-16), 6.40 (1H, dd, $J_1= 11$ Hz, $J_2= 3$ Hz, H-12), 5.58 (1H, d, $J= 10.5$ Hz, H-11), 3.5 (1H, traslapado, H-3), 4.27 (1H, d, $J= 8$ Hz, H-1 fucosa), 4.72 (1H, d, $J= 8$ Hz, H-1 glucosa), 4.66 (1H, d, $J= 8$ Hz, H-1 glucosa), 4.82 (1H, d, $J= 1.5$ Hz, H-1 ramnosa), 1.151 (3H, d, $J= 6$ Hz, CH₃ fucosa), 1.156 (3H, d, $J= 5.5$ Hz, CH₃ ramnosa).

III.1.7.5- AISLAMIENTO DE SAPONINAS (SEGUNDO PROCESO).

Puesto que una de las fracciones del proceso discutido en el inciso III.1.7.4 contenía probablemente otra u otras saponinas, se decidió llevar a cabo una nueva extracción, para lo cual, se procedió a recolectar planta durante el mes de septiembre de 1999 en la zona geográfica de la primera colecta (Dr. Arroyo, N. L.).

Para la extracción de *B. scordioides* se procedió de la siguiente manera (Esquema 3):



Esquema 3.- Preparación del extracto polar de *B. scordioides* para la separación de saponinas.

III.1.7.5.1- FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO POLAR DE *B. scordioides*

(SEGUNDO PROCESO)

El extracto polar de *B. scordioides* (303.10 g) se fraccionó de manera preliminar en una columna abierta empacada con 2.5 kg de gel de sílice 60 F₂₅₄, usando inicialmente como fase móvil CH₂Cl₂-MeOH 9:1, y terminando con CH₂Cl₂-MeOH 6:4. Se recolectaron 258 fracciones de 250 ml. El fraccionamiento fue verificado mediante ccf y permitió la obtención de 5 grupos de fracciones primarias. En la Tabla 10 se resumen los sistemas de elución empleados y las fracciones resultantes.

Tabla 10.- Fraccionamiento del Extracto Metanólico de *B. scordioides* (Segundo proceso)

Eluyente	Proporción %	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas	Peso del residuo (g)
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	9:1	1-234	1-9	5.3
CH ₂ Cl ₂ -MeOH			11-30	54.3
CH ₂ Cl ₂ -MeOH			31-89	180.5
CH ₂ Cl ₂ -MeOH			90-218	10.2
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	6:4	236-258	236-258	43.2

A partir de la fracción 11 y hasta la 30 cristalizó un compuesto (54.3 g) blanco con punto de fusión de 158-160 °C que se identificó como manitol. Las fracciones 31-89 reunidas pesaron 180.5 g y presentaron 4 manchas cuyos valores de *r_f* en ccf coinciden con los del manitol, la syringina, la linarina y el verbascósido. A partir de la fracción 90 y hasta la 218 se obtuvo una mezcla de compuestos (10.2 g). Al analizar estas fracciones mediante ccf se observó que sus factores de retención coincidían con los de las saponinas obtenidas en el primer proceso, además de presentar también verbascósido, linarina y manitol.

Las fracciones 90-218 se reunieron y analizaron por cromatografía en una columna abierta empacada con 200 g de gel de sílice 60 F₂₅₄, y eluida con una mezcla de CHCl₃:MeOH, iniciando con una proporción de 95-5 y subsecuentemente aumentando la polaridad, se colectaron 96 fracciones de 100 ml. En la tabla 11 se muestran los sistemas de disolventes y las fracciones obtenidas durante este proceso de separación.

Tabla 11.- Recromatografía de la fracción secundaria 90-218 (segundo proceso)

Eluyente	Proporción %	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas	Peso del residuo (g)
CHCl ₃ -MeOH	95:5	1-5		
CHCl ₃ -MeOH	9:1	6-33	1-25	3.2
CHCl ₃ -MeOH			26-35	2.4
CHCl ₃ -MeOH	8:2	34-96	36-41	1.8
CHCl ₃ -MeOH			42-52	0.960
CHCl ₃ -MeOH			54-96	0.520

Las fracciones 42-52 (0.960 g) presentaron un patrón cromatográfico en ccf similar al de la mezcla de las saponinas obtenidas en el proceso anterior, por lo que se continuó trabajando con la misma. Las fracciones se reunieron y fueron sometidas a cromatografía mediante filtración en gel usando sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals) como tamiz molecular y metanol como eluyente. Las fracciones similares se reunieron de acuerdo a su patrón cromatográfico en ccf. A partir de la fracción 7 y hasta la 11 se obtuvo una mezcla de saponinas (210 mg). Esta mezcla se analizó mediante espectrometría de masas modalidad FAB⁺. El espectro presentó iones pseudomoleculares con una relación m/z de

1073 [M+H]⁺; 1089 [M+H]⁺ y 1111 [M+Na]⁺. De acuerdo con este análisis, las fracciones 7-11 contenían las saponinas.

III.1.7.5.2-ACETILACIÓN DE LA MEZCLA DE SAPONINAS.

Las fracciones 7-11 (200 mg) se reunieron, se disolvieron en piridina (2.5 ml) y en anhídrido acético (2.5 ml); la mezcla se calentó a 60 °C durante 1 h y la reacción se dejó durante toda la noche, el progreso de la misma se siguió por cromatografía en capa fina. La reacción se detuvo agregando agua y enfriando a 4 °C. El producto se lavó con agua y se extrajo con cloroformo, generando 233.1 mg de la mezcla de saponinas acetiladas.

III.7.1.5.3- SEPARACIÓN DE LOS DERIVADOS ACETILADOS.

La mezcla de acetatos (100 mg) se disolvió en AcOEt y se separó mediante una cromatografía en columna abierta empacada con 5 g de gel de sílice 60 F₂₅₄. El proceso de elución se efectuó con n-hexano y mezclas de n-hexano-acetona. En la Tabla 12 se muestran los sistemas de disolventes y las fracciones obtenidas durante este proceso de separación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 12.- Cromatografía de la mezcla de saponinas acetiladas.

Eluyente	Proporción %	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas	Peso del residuo (mg)
Hexano	100	1-7		
Hexano-Me ₂ CO	90:10	8-15		
Hexano-Me ₂ CO	80:20	16-21	1-28	4.2
Hexano-Me ₂ CO	75:25	22-48	29-30	24.5
Hexano-Me ₂ CO			31-33	8.7
Hexano-Me ₂ CO			34	6.7
Hexano-Me ₂ CO			35-37	22.4
Hexano-Me ₂ CO			38-44	19.1

De las fracciones 29-30 y 34 se aislaron dos compuestos puros cuyas propiedades fisicoquímicas y espectroscópicas coincidieron completamente con las de los compuestos 14 y 13 (respectivamente) aislados en el proceso anterior.

De las fracciones 38-44 se aisló el compuesto 15 (peracetato de 3-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-fucopiranosil 3,16,23,28-tetrahidroxiolean-11,13(18)-dieno) (19.1mg), cuyas principales características físicas son: polvo amorfo $[\alpha]_D^{25} = -10.5$. IR ν_{\max} (película) cm^{-1} , 2950 (C-H), 1747 (C=O), 1061 y 1041(C-O). EM-FAB⁺ (Espectro 50), C₈₂O₃₆H₁₁₆ m/z 1676 [M]⁺, 1079 [M-Aglicona]⁺, 539 [Aglicona]⁺. RMN ¹H (Espectro 51) (CDCl₃) δ : 0.794, 0.925, 0.727, 0.962; 0.962, 0.794 (cada señal 3H, s, H₃-24—27, 29-30), 4.17, 4.0 (cada señal un H, sist. AB, d, $J = 11$ Hz, $J = 11.5$ Hz, H₂-28), 4.24, 4.07 (cada uno un H, sist. AB, d, $J = 11.5$ Hz, H₂-23), 1.19 (1H, s amplio, H-16), 6.40 (1H, dd, $J_1 = 11$, $J_2 = 3$ Hz, H-12), 5.58 (1H, d, $J = 10.5$ Hz,

H-11), 3.5 (1H, traslapado, H-3), 4.27 (1H, d, $J= 8$ Hz, H-1 fucosa), 4.72 (1H, d, $J= 8$ Hz, H-1 glucosa), 4.66 (1H, d, $J= 8$ Hz, H-1 glucosa), 4.82 (1H, d, $J= 1.5$ Hz, H-1 ramnosa), 1.15 (3H, d, $J= 6$ Hz, CH₃ fucosa), 1.15 (3H, d, $J= 5.5$ Hz, CH₃ ramnosa) .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III.2 –METODOLOGÍA GENERAL PARTE BIOLÓGICA

III.2.1 -EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS Y DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE *B. perfoliata* y *B. scordioides*.

III.2.1.1 -EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

El método que se utilizó para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos y los compuestos puros fue el de difusión en agar ó de Kirby-Bauer (Barry y Thornsberry, 1987, Vanden Berghe y Vlietinck, 1991). . El método general se expone en el Apéndice I, cada bioensayo se realizó por triplicado.

III.2.1.2 -MICROORGANISMOS UTILIZADOS. *Vibrio cholerae* CDC V12, *Vibrio cholerae* INDRE 206 aislada de agua contaminada, *Vibrio cholerae* aislada de una muestra clínica (estas cepas corresponden al grupo 01, productor de enterotoxina, serotipo Inaba, biotipo El Tor), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155, *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Shigella boydii* ATCC 8700, *Staphylococcus aureus* ATCC 12398.

III.2.1.3 -EVALUACIÓN CUANTITATIVA. Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) se usó el método de dilución en caldo (Jones, 1987, ver Apéndice II), cada bioensayo se realizó por triplicado. La curva de supervivencia y el efecto sobre el crecimiento de las bacterias expuestas a los productos naturales aislados se hicieron de acuerdo a los métodos descritos por Kubo,

1993. Los controles positivos fueron los disolventes utilizados para solubilizar los compuestos (ver Apéndice III).

III.2.2-MODO DE ACCIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS AISLADOS DE LAS DOS ESPECIES DE *BUDDLEJA*.

III.2.2.1 -MICROORGANISMOS Y MEDIOS DE CULTIVO.

Las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 12398 y *Vibrio cholerae* CDCV12 se inocularon en caldo de infusión de cerebro y corazón de bovino (Bioxon 112-1) para mantener los cultivos y en caldo Mueller-Hinton (Bioxon 260-1) para realizar los experimentos.

III.2.2.2 –REACTIVOS.

Verbascósido obtenido de las especies de *Buddleja*; [2-³H] acetato de sodio (ICN 2200405); L-[4,5-³H] Leucina (Amersham TRK 683); [metil-³H] timidina (Amersham TRK 758) y [5,6-³H] uridina (Amersham TRK 410).

III.2.2.3-BIOENSAYOS PARA DETERMINAR EL NÚMERO DE SOBREVIVIENTES.

Los bioensayos se llevaron a cabo en caldo Mueller-Hinton que contenía concentraciones del compuesto activo correspondientes a la concentración mínima inhibitoria (CMI), 0.5 de CMI y la concentración bactericida mínima (CBM), el control fue tratado con el solvente de dilución del compuesto activo (DMSO, 100µl). El inóculo inicial de bacterias (determinado de acuerdo a medidas turbidimétricas utilizando el patrón de 0.5 de McFarland, ver Apéndice II) contenía aproximadamente 3×10^7 unidades formadoras de colonia (UFC). Los experimentos (n=3) se llevaron a cabo en condiciones aeróbicas (sin presión de CO₂) y la temperatura de incubación fue de 37°C (Incubador Thelco Laboratory

Oven Model 160). Para cuantificar las bacterias supervivientes al desafío (UFC/ml), se tomaron muestras de 100 μ l de cada tubo experimental cada 4 horas y hasta las 24 horas. Las células viables de cada tubo se determinaron mediante la técnica de dilución (Anhalt et al., 1985). La constante de mortalidad (K) y el coeficiente de determinación se obtuvieron usando la función de mortalidad de Gomperts (Durán, *et al.*, 1986).

III.2.2.4 -INCORPORACIÓN DE PRECURSORES RADIACTIVOS.

Para incorporar cada precursor radiactivo en las células se procedió de la siguiente manera: Se prepararon cultivos bacterianos en 10 ml de caldo de infusión de cerebro y corazón de bovino (Bioxon 112-1) y se incubaron durante 12 horas a 37°C (Incubador Thelco Laboratory Oven Model 160). Cuando el crecimiento bacteriano alcanzó la fase exponencial (0.2 de absorbancia a 600 nm medida en un espectrofotómetro Spectronic 21 Milton Roy Company) el cultivo se diluyó 10 veces. Se prepararon 5 unidades para el bioensayo (3 experimentales y 2 controles). A las unidades experimentales se les adicionó el compuesto bioactivo a concentraciones que correspondieron a 0.5 CMI, CMI y CBM. A un control se le agregó 100 μ l de vehículo (solvente utilizado para diluir los compuestos) y el otro control permaneció intacto. Los precursores radiactivos se agregaron a los tubos a concentraciones de 0.1 μ Ci/ml. Los tubos se incubaron a 37°C, y se tomaron alícuotas (1.0 ml) de cada unidad experimental a las 1.0, 1.5 y 2.0 horas. Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante (1.0 ml) se suspendió en líquido de centelleo (9.0 ml) (Ready Organic TM Beckman).

La radiactividad se determinó usando un contador de centelleo líquido (Beckman LS000SE). Las muestras se leyeron durante un minuto. El porcentaje de precursor incorporado a la bacteria se calculó mediante la proporción de cantidad remanente de

radiactividad (número de cuentas por minuto) en cada tiempo. Se realizaron 5 réplicas por cada precursor marcado. (Mori *et al.* 1987).

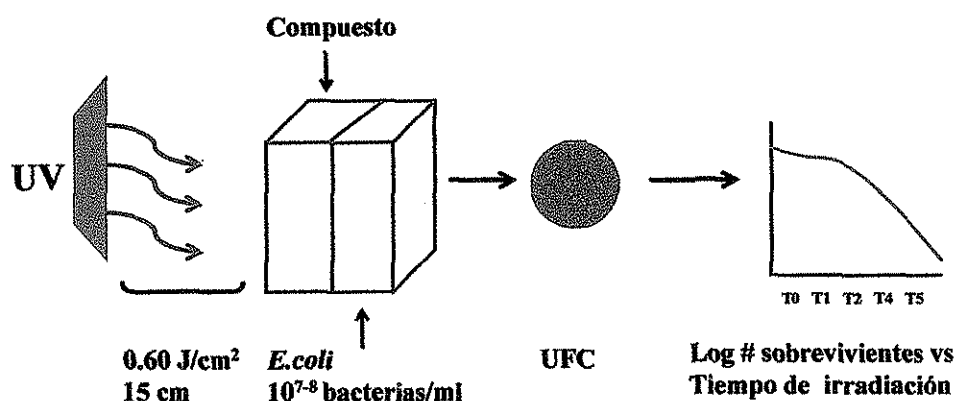
III.2.3-EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FOTOPROTECTORA EN LA REGIÓN DEL UV-B DEL O LOS COMPUESTOS ACTIVOS

III.2.3.1 - PROTECCIÓN USANDO BACTERIAS.

La bacteria *Escherichia coli* (ATCC 25922) se dejó crecer en medio Mueller-Hinton durante 12 horas, posteriormente se diluyó 1:10 en medio de infusión de cerebro y de bovino (Bioxon-112), cuando el crecimiento poblacional alcanzó una densidad óptica (a 550 nm) de 0.3 se centrifugó (3500 rpm). Posteriormente, las bacterias se suspendieron en 10 ml de Ringer PBS (pH 7.0) y se transportaron a cubetas de cuarzo estériles (Pye Unicam B538751 A, de 1.0 mm de espesor). Cada sustancia (extractos, sustancias fotoprotectoras, y controles) se disolvió en un disolvente apropiado (2.0 mg/ml), se depositó en cubetas de cuarzo, y se colocó junto a la cubeta que contenía las bacterias (la cubeta de cuarzo que contenía las bacterias se adhirió a la otra cubeta de cuarzo con la sustancia, esto formó una unidad experimental). Finalmente se colocaron las unidades experimentales con la sustancia a evaluar del lado de la lámpara y se irradiaron (0.60 Joule/cm² medida con un radiómetro Spectroline DM-300HA) con una lámpara de luz UV-B (312 nm Spectroline EB-280C) a una distancia de 15 cm (intensidad de campo de 130 Watt/m²) durante 5 minutos y posteriormente en progresión geométrica. Se tomaron muestras de 100 µl cada 30 segundos de las unidades experimentales sin protección (control negativo) para realizar el conteo de microorganismos sobrevivientes mediante la técnica de dilución (Eisenstadt *et al.*, 1994). Se procedió de igual forma con las unidades experimentales con protección,

ampliando los intervalos de tiempo en progresión geométrica para la toma de muestras. Se empleó como control positivo etil-hexil-*p*-metoxicinamato (Escalol, ISP VAN DIK) y como control negativo el solvente usado para la disolución de los compuestos. Los resultados se expresaron graficando el logaritmo del número de sobrevivientes con relación al tiempo de irradiación (curvas de supervivencia). La constante de mortalidad (K) y el coeficiente de determinación se obtuvieron usando la función de mortalidad de Gomperts (Durán, *et al.*, 1986), se llevaron a cabo 3 repeticiones por cada experimento. En el siguiente esquema se describe el modelo experimental.

Modelo para evaluar la fotoprotección de los compuestos usando *E. coli*



III.2.3.2 -DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR (FPS) EN CUYOS.

Preparación de los animales. Las zonas dorsales de los cuyos (hembras peso promedio de 0.5 kg) se afeitaron con una rasuradora eléctrica (Osteriser) y se depilaron con loción depiladora (Velvinette-Wella). Posteriormente, se lavaron perfectamente las zonas depiladas. Después de 16 horas, la piel de la zona dorsal de cada cuyo se cubrió dejando

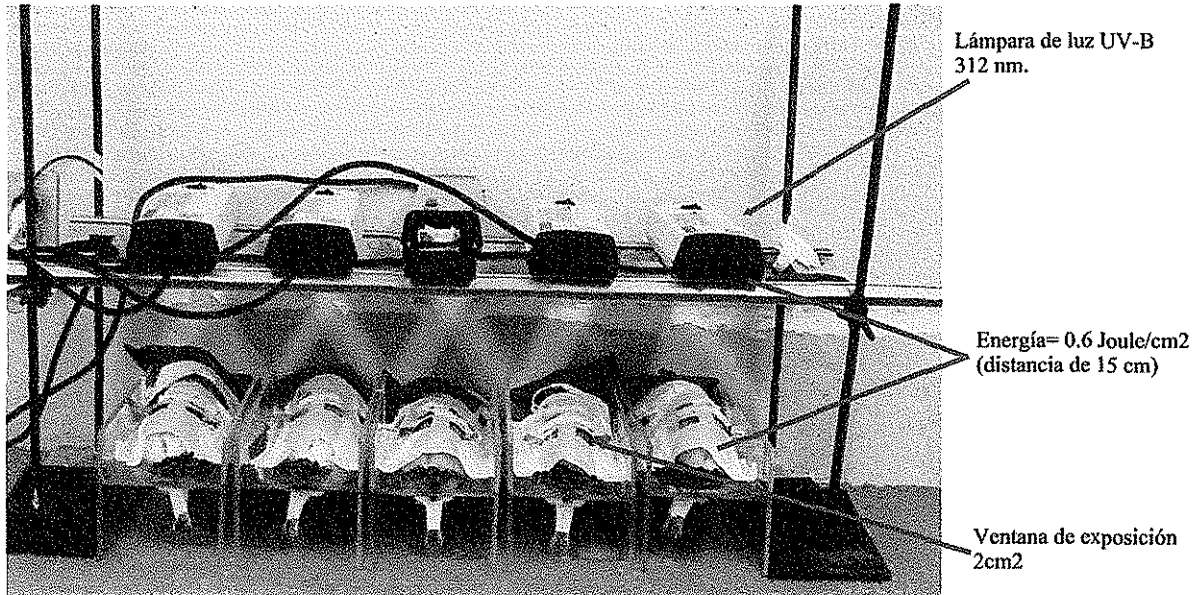
ventanas de exposición que se trataron con 2 mg/cm^2 de la sustancia a evaluar o del vehículo (las sustancias se disolvieron en un disolvente adecuado y se mezclaron con el vehículo que fue: setting gel marca Stil Net y/o etanol-propilenglicol-agua 2:1:1). Las ventanas de exposición se prepararon de la siguiente manera: cada animal ($n=5$ por tratamiento) se envolvió en cinta adherible (marca Turk de 7.5 cm) que contenía seis ventanas de exposición de 2 cm^2 (3 ventanas a cada lado de la zona de la espina dorsal). La parte adhesiva que cubría la zona dorsal se revistió con papel aluminio para prevenir el enrojecimiento de la piel en dicha zona cuando se les desprendía la cinta para hacer la evaluación.

Irradiación con luz UV-B. El lapso de tiempo entre el tratamiento tópico y la irradiación con luz UV-B fue de aproximadamente 15 min. Los animales se colocaron en sujetadores y se dispusieron a 15 cm de separación de la zona dorsal con respecto a la lámpara de luz UV-B (312 nm, Spectroline EB-280C). La energía de irradiación a esta distancia es de aproximadamente 0.60 Joule/cm^2 (intensidad de campo de 130 watt/m^2) calculada con un radiómetro (Spectroline DM-300HA). Los animales se irradiaron con luz UV-B a diferentes lapsos de tiempo (20, 40, 80, 160, 320, 640 minutos). Concluido cada tiempo se cerraba la ventana de exposición correspondiente. Si existía evidencia de la aparición de eritema antes de cerrar la última ventana se concluía el experimento. El eritema se midió (de acuerdo a una escala de 0 a 3) 24 horas después del experimento, usando como referencia la piel adyacente no expuesta de cada animal (valor 0). El valor de 1 DEM (Dosis Eritematogénica Mínima) correspondió al tiempo de irradiación que provocó enrojecimiento detectable en el área expuesta. El FPS se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{FPS} = \frac{\text{Dosis de UV que provoca 1 DME con producto}}{\text{Dosis de UV que provoca 1 DME sin producto}}$$

La dosis fue el tiempo de exposición a la radiación expresada en minutos. De igual forma se trataron los individuos que llevaron el vehículo y los no tratados (controles). Se ha observado que los experimentos en cuyos proveen una buena aproximación de los FPS calculados en humanos (Bissett, *et al.*, 1987).

La significancia estadística entre los tratamientos, y dentro de cada tratamiento se determinó mediante las pruebas no-paramétricas de Friedman y de Wilcoxon, respectivamente. En el siguiente esquema se describe el modelo.



III.2.3.3- EVALUACIÓN DE LA FOTOPROTECCIÓN; ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Para llevar a cabo el estudio histopatológico se realizaron experimentos similares a los de determinación del FPS, sólo que en este caso se irradió la zona dorsal de los cuyos con dosis preestablecidas de luz UV-B de acuerdo con los resultados obtenidos en la determinación del FPS para cada sustancia. A cada animal se le prepararon ventanas de exposición en las que se administró la sustancia fotoprotectora (2 mg/cm^2), junto a cada ventana se preparó otra como control negativo (sin protección) y se irradió de igual manera que en el experimento anterior. Veinticuatro horas después, se tomaron biopsias de las zonas irradiadas (con y sin protección) de aproximadamente 25 mm^2 y los cortes se preservaron en formaldehído al 10% (en solución salina fisiológica), posteriormente, los tejidos se prepararon para su observación microscópica de acuerdo a la técnica histológica estándar de Eosina y Hematoxilina (Elenitsas, et al., 1997). La secuencia de pasos para llevar a cabo la técnica histológica se muestra en el Apéndice IV.

Una vez que se tuvieron las muestras de los tejidos fijadas y montadas, se realizó la evaluación histopatológica en el microscopio óptico (Olympus CH-2 System OM, con cámara fotográfica Olympus SC35 type 12), además, se tomaron microfotografías a 400X. El estudio histopatológico consistió en la evaluación de la lesión (grado, extensión y curso), la queratinización (orto o para), la proliferación epitelial, formación de edema y úlceras, y necrosis todas estas correspondientes al diagnóstico de daño en la epidermis. Asimismo, se evaluó la dermis de acuerdo a la infiltración de células mononucleares y polimorfonucleares, hemorragia y congestión (edema perivenular). El diagnóstico se basó en lo reportado para quemadura por irradiación de luz UV-B de tipo agudo, comparando el

tejido de la piel de cuyo sin protección con relación a los tejidos protegidos con las sustancias fotoprotectoras (Lowe and Friedlander, 1997; Norris, et al., 1997).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 AISLAMIENTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE *B. perfoliata*.

IV.1.1 ANÁLISIS DEL ACEITE ESENCIAL.

B. perfoliata es una planta cuyo alto contenido de aceite esencial le confiere un olor agradable especialmente cuando está fresca. Es bien sabido que los componentes de los aceites esenciales no solo poseen olor agradable sino que con frecuencia tienen propiedades biológicas interesantes, por lo que se decidió aislarlo de la planta fresca (Brul, 1999).

El análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) mostró que el aceite esencial que se obtuvo con un rendimiento de 0.37% estaba constituido casi exclusivamente por α -pineno (96%) p eb.= 154-157 °C, PM= 136.24 (Figura 5). Su identificación se logró por medio de su espectro de masas, el cual mostró un ión molecular de 136, y un patrón de fragmentación que coincidió con el que tiene la biblioteca del equipo para el α -pineno (Biblioteca Public/NIST) (Espectro 1).

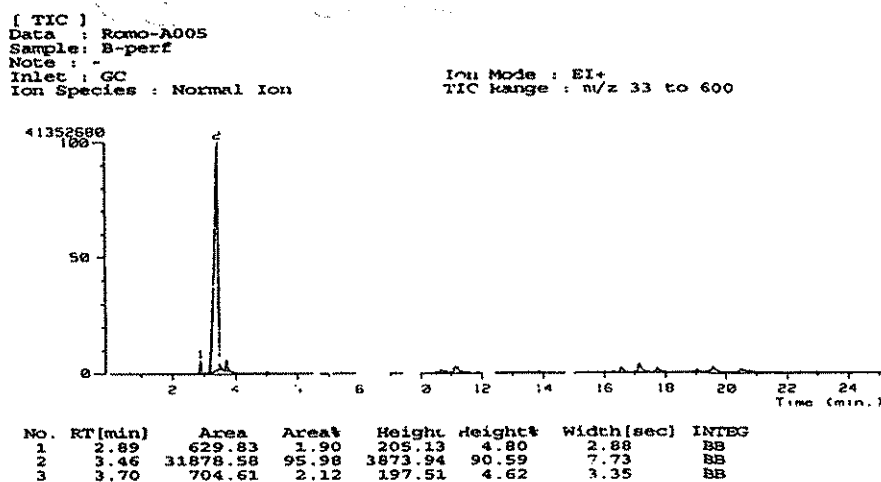


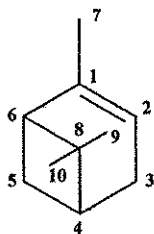
Figura 5.- Cromatograma de los aceites esenciales de *B. perfoliata*.

El espectro de resonancia magnética nuclear del aceite mostró las señales típicas del α -pineno (Tabla 13) quedando así plenamente identificado (Espectro 2).

Tabla 13.-Desplazamientos químicos en RMN ^1H del Aceite Esencial de *B. perfoliata*.

Asignación	Desplazamiento en ppm	Multiplicidad
H-2	5.12	d, d (6.5, 1.2)
H-3	2.06-2.08	m
H-4	1.9	m
H-5	1.16, 2.34	m,m
H-6	2.19	m
H-7	1.65	d (1.8)
H-9	1.26	s
H-10	0.84	s

Los datos presentados en la tabla 13 coinciden con los reportados por la literatura (Sadtler Hand Book of Proton Nuclear Magnetic Spectrometry, 1978. Sadtler Heyden, Philadelphia, USA) para el α -pineno.



α -pineno (1)

La presencia de α -pineno en la planta podría explicar la actividad antimicrobiana de la infusión que prepara la gente para el tratamiento de infecciones gastrointestinales, puesto que es conocido que el α -pineno es un compuesto germicida que tiene actividad

antimicrobiana al provocar “lisis” bacteriana mediante la dilución de los fosfolípidos de la membrana de los microorganismos. (Harvey, 1982 y Helander *et al.* 1998).

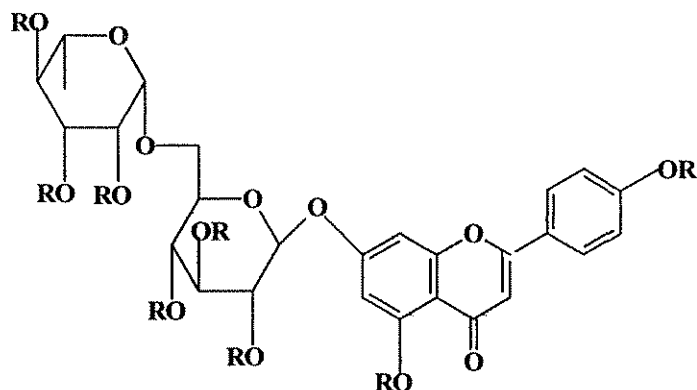
IV.1.2 SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS DE *B. perfoliata*.

El extracto de acetato de etilo sometido a cromatografía en columna rindió en sus fracciones 58-155 (que fueron eluidas con CH₂Cl₂-MeOH 9:1) un compuesto blanco amarillento pf 261°C. El espectro en el IR (Espectro 4) muestra una banda ancha a 3364 cm⁻¹ (numerosos grupos hidroxilo); a 1659 cm⁻¹ se observa una banda para carbonilo; a 1564 cm⁻¹ se aprecia una banda de anillos aromáticos y a 806 cm⁻¹ una banda que indica la presencia de un compuesto aromático *para* sustituido.

Su espectro de RMN¹H (Espectro 3) mostró señales correspondientes a un sistema AB aromático a δ 7.19 (d, $J= 8.86$ Hz) y a δ 8.1 (d, $J= 8.86$ Hz); un protón de hidroxilo fenólico que por su desplazamiento a campo bajo (δ 12.96) indica que forma un quelato con un grupo carbonilo; un protón vinílico en δ 6.99 (s); dos protones aromáticos, uno a δ 6.84 (d, $J= 2.06$ Hz) y otro a δ 6.50 (d, $J= 2.06$ Hz); una señal doble asignada al metilo de la ramnosa a δ 1.1 (d, $J= 6.2$ Hz); una señal equivalente a dos protones en δ 2.55 (d, $J= 3.48$ Hz) que se asigna al metileno C-6 de glucosa; por último, entre δ 3.21 y 4.6 se observan señales superpuestas que indican la presencia de hidroxilos de azúcares.

Las señales anteriores corresponden a las de la linarina por lo que su espectro se comparó con el de una muestra auténtica obtenida de *B. cordata*, con la que coincidió totalmente, quedando así identificada.

Para lograr una confirmación definitiva se preparó su acetato cuyo espectro en el infrarrojo fue idéntico al de una muestra auténtica.



Linarina R=H (2)

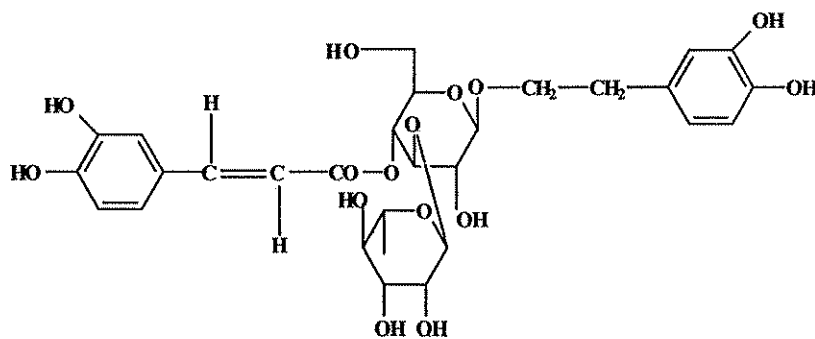
Acetato de Linarina R=OAc (2a)

El extracto butanólico se analizó mediante una cromatografía en columna empacada con gel de sílice, eluyendo con mezclas de CH_2Cl_2 -MeOH; de la fracción 30 a la 49 se obtuvo linarina (rendimiento total, 0.22%). La identidad de ésta se determinó por medio de sus constantes físicas y datos espectroscópicos que se compararon con los de una muestra aislada del extracto de acetato de etilo. Para realizar una identificación adicional se preparó su acetato cuyo espectro de IR resultó idéntico al de una muestra auténtica.

De las fracciones 50-103 obtenidas de la cromatografía del extracto butanólico se aisló un compuesto cuyo espectro de RMN^1H (Espectro 5) corresponde al del verbascósido. En dicho espectro destacan varias señales características como el doblete asignado al metilo secundario de la ramnosa a δ 1.08 (3H, d, $J= 6.1$ Hz); una señal equivalente para 2 protones en δ 2.78 (2H, t, $J= 7.32$, Hz) que se asigna al Ar-CH₂-CH₂-O del feniletano; entre 3.5 y 4.25 se observan señales superpuestas indicando la presencia de protones de azúcares. La señal del protón anomérico de glucosa se observa a δ 4.36 (1H, d, $J= 7.94$ Hz) y el de la ramnosa a δ 5.17 (1H, d, $J= 1.1$ Hz). A campo bajo se observan las señales de un sistema AB vinílico típico de cinamato a δ 6.26 (1H, d, $J= 15.8$ Hz) y a δ 7.58 (1H, d, $J= 15.8$ Hz);

por otra parte, se distinguen las señales de un grupo cafeilo: una señal centrada a δ 7.04 (1H, d, $J= 1.81$ Hz); un doble de doble centrado a δ 6.94 (1H, d, d, $J_1= 8.1$ Hz, $J_2= 1.96$ Hz); además de una señal cuyo centro se encuentra a δ 6.76 (1H, d, $J= 8.1$ Hz). En la misma zona del espectro se aprecian las señales aromáticas de un residuo de feniletanol: una señal cuyo centro se localiza a δ 6.68 (1H, d, $J= 2.0$ Hz); una señal centrada a δ 6.66 (1H, d, $J= 8.1$ Hz); y un doble de doble cuyo centro se localiza en δ 6.55 (1H, d, d, $J_1= 8.1$ Hz, $J_2= 2.04$ Hz).

La identidad definitiva de este compuesto se logró cuando su espectro de IR (Espectro 6) coincidió banda por banda con el de una muestra auténtica del verbascósido registrado en paralelo.



Verbascósido (3)

IV.1.2. BÚSQUEDA DE SAPONINAS EN *B. perfoliata*. AISLAMIENTO DEL ÉSTER METÍLICO DEL ÁCIDO FERÚLICO.

Se preparó el extracto metanólico de las partes aéreas de la planta y posteriormente se procedió a realizar una hidrólisis ácida en busca de agliconas triterpénicas, sin embargo, no hubo evidencia de la existencia de estos compuestos en dicho extracto. Durante la búsqueda de las agliconas, se aisló la sustancia 4 mediante cromatografía en columna. Su espectro

infrarrojo (Espectro 7) presentó absorciones asociadas con la presencia de grupo carbonilo de éster (1707 cm^{-1}), de grupo hidroxilo fenólico (3536 y 1267 cm^{-1}), de doble ligadura (1637 cm^{-1}), y de unión C=C de anillo aromático (1513 cm^{-1}). El espectro de masas de 4 obtenido mediante la técnica de impacto electrónico (Espectro 8) presentó un ion molecular con una relación de masa carga (m/z) de 208 uma. Este ion molecular corresponde a la fórmula condensada $C_{11}H_{12}O_4$.

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (Espectros 9 y 10) de la sustancia 4 presentaron las siguientes señales diagnósticas:

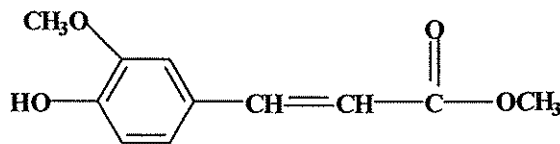
a) Un doblete a δ 7.62 (1H, $J= 15.9$ Hz) acoplado con otro a δ 6.29 ppm (1H, $J= 15.9$ Hz) asignables a los hidrógenos de un sistema vinílico del éster ferúlico. En el espectro de RMN ^{13}C , las señales para los carbonos vinílicos se observan a δ 144.9 y a δ 115.13 respectivamente.

b) Un doblete debido a un protón aromático a δ 6.91 (1H, $J= 8.1$ Hz) acoplado con otro protón aromático cuya señal es un doble de doble y aparece a δ 7.07 (1H, $J_1= 8.1$ Hz; $J_2= 1.8$ Hz); este último protón se encuentra a su vez acoplado con otro protón aromático que se distingue como doblete a δ 7.02 (1H, $J= 1.8$ Hz). En el espectro de RMN ^{13}C las señales de los carbonos aromáticos unidos a los protones anteriormente descritos se observan a δ 114.7, δ 123.0 y δ 109.4, respectivamente. Las asignaciones anteriores están de acuerdo con las correlaciones heteronucleares que se observan en un experimento HETCOR (Espectro 11). En dicho espectro se observan las conectividades siguientes: la señal del carbono a δ 123.0 con la señal del protón que se distingue a δ 7.07; la señal del carbono a δ 114.7 con la señal del protón a δ 6.91 y la señal del carbono a δ 109.3 con la señal del protón que se visualiza a δ 7.02.

c) En el espectro de RMN¹³C se observan las señales de tres carbonos aromáticos sustituidos; una de ellas se distingue a δ 146.8 y por su desplazamiento químico este carbono está unido a un grupo OH, otro se presenta a δ 126.9 y de acuerdo a su desplazamiento representa un carbono *ipso* a un sistema vinílico. Por último, se observa una señal a δ 147.9 que corresponde a un carbono *ipso* a un grupo metoxilo.

d) Los protones de los metoxilos se aprecian a δ 3.92 y δ 3.79, ambos singuletes. El singulete más desplazado a campo bajo corresponde a los protones del metoxilo de la función éster, y el menos desplazado a los protones del metoxilo unido al anillo aromático. En el espectro de RMN¹³C los carbonos metoxílicos se observan a δ 55.9 y δ 51.6. El primero corresponde al metoxilo del éster y el segundo al metoxilo ligado al anillo aromático. El carbono correspondiente al carbonilo del éster se aprecia a δ 167.7.

De acuerdo con el análisis de los espectros de IR, RMN y de masas del compuesto 4, además de la comparación con los datos espectroscópicos reportados en la literatura (Sadtler, 1978), la estructura propuesta para la sustancia aislada del hidrolizado del extracto metanólico corresponde a la del éster metílico del ácido ferúlico. Es probable que este compuesto se haya formado por metanólisis a partir del verbascósido como producto de la hidrólisis ácida.



Éster metílico del ácido ferúlico (4)

IV.2 AISLAMIENTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE *B. scordioides*.

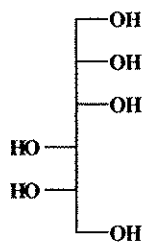
Se procedió a la preparación de los extractos de acuerdo al esquema que se presenta en el punto III.1.4.2. de la metodología. Los rendimientos de cada extracto fueron los siguientes:

EXTRACTO	PESO (g)	RENDIMIENTO (%)
Hexánico	40.43	1.81
Clorofórmico	9.50	0.43
Metanólico	260.10	11.68

IV.2.1 SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DEL EXTRACTO METANÓLICO.

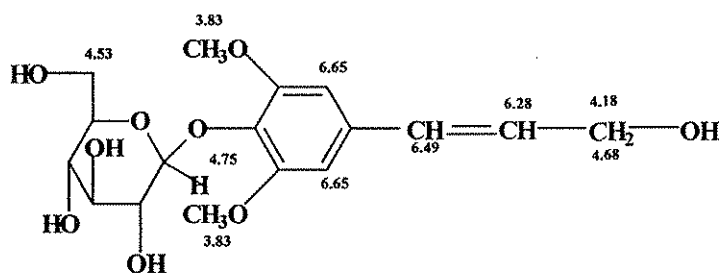
El extracto metanólico se analizó mediante cromatografía en columna usando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil acetato de etilo, aumentando la polaridad con metanol. A partir de la fracción 24 y hasta la fracción 159 (eluidas con mezclas AcOEt-MeOH 97.5-2.5 y AcOEt-MeOH 95-5) se obtuvo un compuesto cuyo r_f (evaluado en varios sistemas de disolvente) coincide con el del verbascósido. Su espectro en el infrarrojo fue idéntico al de una muestra auténtica, lográndose así su identificación definitiva.

De la fracciones 193 a la 303 se obtuvo un sólido (0.56%). El compuesto recristalizado de metanol presentó un pf de 166-168°C. El r_f de este compuesto (evaluado en varios sistemas de disolventes) coincidió con el del manitol (5), además, su espectro infrarrojo (Espectro 12) coincidió con el de dicho compuesto (corrido en paralelo); esto es, presentó una banda ancha a 3270 cm^{-1} correspondiente a grupos hidroxilo, y a 2935 cm^{-1} y 1458 cm^{-1} señales que corresponden a grupos CH.



Manitol (5)

Posteriormente, se procedió a separar los componentes de las fracciones 30-103 (Tabla 6) que pesó 73.4 g. En este caso, la separación se llevó a cabo mediante cromatografía en columna usando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil una mezcla de acetona-diclorometano (40:30). De la fracción 29 a la 35 de esta cromatografía cristalizó el compuesto 6 (47.8 mg, 0.0026 %), posteriormente se recrystalizó de acetona y presentó un pf de 194-195°C, el espectro en el IR de este compuesto (Espectro 13) mostró bandas a: 3377 (OH); 1640 (C=C); 1113 (C-O), y 1507 cm^{-1} (C=C de anillos aromáticos). El espectro de RMN ^1H (Espectro 14) presentó una señal a δ 6.65 (s) que corresponde a dos protones aromáticos equivalentes, un sistema vinílico a δ 6.49 (1H, d, $J=15.9$ Hz) y a δ 6.28 (1H, d, t, $J_1=15.9$ Hz, $J_2=5.1$ Hz), esta última señal presenta a su vez un acoplamiento con una señal a δ 4.18 (t, $J=5.1$ Hz) que representa un protón de un sistema metileno no equivalente. Además, se observa una señal a δ 4.68 (t, $J=5.1$ Hz) que se asigna a un protón en posición gem con respecto al protón anterior. A δ 3.83 (s) se observa una señal intensa que integra para 6 protones correspondientes a dos metoxilos. Por otra parte, se observan las señales de los protones correspondientes a hidroxilos de azúcar y a sus metinos gem entre δ 3.3 y δ 4.9. El protón anomérico se distingue a δ 4.75 (d, $J=6.9$ Hz); y en δ 4.53 (d, $J=2.7$ Hz) aparece una señal que integra para dos protones que por su desplazamiento químico se atribuye a los protones de C_6 de una molécula de glucosa.



Siringina (6)

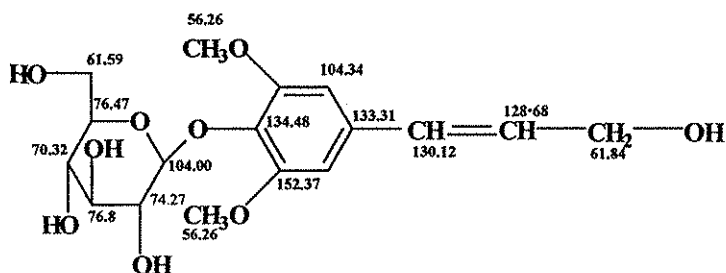
Se realizó un experimento de correlación homonuclear en 2 dimensiones H^1-H^1 COSY (Espectro 15) para distinguir la conectividad secuencial de los protones. En dicho espectro se observa que la resonancia de un protón vinílico a δ 6.49 muestra conectividad con la señal de otro protón vinílico a δ 6.28. La señal del protón vinílico a δ 6.28 interactúa a su vez con un sistema AB a δ 4.18 y δ 4.68. En el espectro también se observa la conectividad entre estos 2 protones. La señal del protón anomérico (δ 4.75) muestra acoplamiento con la del H-2 del azúcar que se distingue en δ 3.3. Por último, también se advierte la conectividad entre la señal de los protones del metileno del azúcar (δ 4.53) con la señal del protón H-5 que se observa a δ 4.21.

El espectro de RMN ^{13}C mostró 14 señales, 3 de ellas correspondientes a dos átomos por lo que la molécula debe contener 17 átomos de carbono (Espectro 16). La señal a δ 152.73 corresponde a dos carbonos aromáticos simétricos unidos a grupos metoxilo. Una señal a δ 134.48 correspondiente a un carbono aromático unido a oxígeno (de C-1 de glucosa) y en posición *orto* con respecto a ambos carbonos que sostienen los metoxilos. Una señal a δ 133.31 que representa el carbono *ipso* a un sistema vinílico. A δ 104.34 se encuentra una señal de dos carbonos aromáticos equivalentes unidos a hidrógenos. En δ 130.12 se observa una señal que representa un carbono vinílico y que debido a su desplazamiento químico se

encuentra unido al anillo aromático. A δ 128.68 se observa la señal de otro carbono vinílico y a δ 104.00 la del carbono anomérico de la glucosa. El C-2 del azúcar se observa a δ 74.27; el C-3 del azúcar a δ 76.80; el C-4 a δ 70.32; el C-5 a δ 76.47, y el C-6 a δ 61.59. El metileno del alcohol sinapílico aparece a δ 61.84 y por último, los metoxilos unidos al anillo aromático se observan en una sola señal a δ 56.29 indicando que son equivalentes (Tabla 14).

Tabla 14.-Desplazamientos Químicos en RMN ^{13}C del Compuesto 6

Azúcar		Anillo Aromático	
Carbono (posición)	Desplazamiento (ppm)	Carbono (posición)	Desplazamiento (ppm)
1	104.0	1	133.3
2	74.3	2,6	104.3
3	76.8	3,5	152.4
4	70.3	4	134.5
5	76.4	7	130.1
6	61.6	8	128.7
		9	61.8
		OMe	56.3



El análisis del espectro DEPT (Espectro 17) determinó la presencia de 2 metinos vinílicos a δ 130.1 y 128.7. A δ 104.0 se observa una señal que se asignó al carbón anomérico de una molécula de glucosa y a δ 104.3 a dos metinos equivalentes del anillo aromático. A δ 76.8, δ 74.3, δ 76.5, δ 70.3, se observan señales correspondientes a los metinos 3, 2, 5 y 4 de la glucosa respectivamente, asignados por comparación con los descritos en la literatura (Niwa, *et al.*, 1988 y Della Greca, *et al.*, 1998). En δ 61.8 y δ 61.6 se distinguen dos señales que corresponden a metilenos unidos a oxígeno, el primero se atribuye al metileno alílico y el segundo al $-\text{CH}_2\text{-OH}$ de la glucosa. La señal a δ 56.3 representa a dos metoxilos unidos a un anillo aromático que por ser simétricos coinciden en una sola señal.

El compuesto fue sometido a un experimento de EM-FAB⁺ (Espectro 18); y en el espectro se observa el ión pseudomolecular a m/z 395 [M+23], aunque el ion molecular es claramente visible a m/z 372, lo que está de acuerdo con la estructura propuesta. La ruptura del enlace glucosídico origina un ión a m/z 210 (M-163) que corresponde al alcohol sinapílico, asimismo, la eliminación de glucosa rinde un fragmento de m/z 193 (M-179).

El patrón de fragmentación antes descrito queda representado en el esquema (1), confirmando la estructura 6, que por comparación con los descritos en la literatura (Niwa, *et al.*, 1988 y Della Greca, *et al.* 1998) corresponden a los de la siringina, y en este trabajo se describe por primera vez en una especie de *Buddleja*.

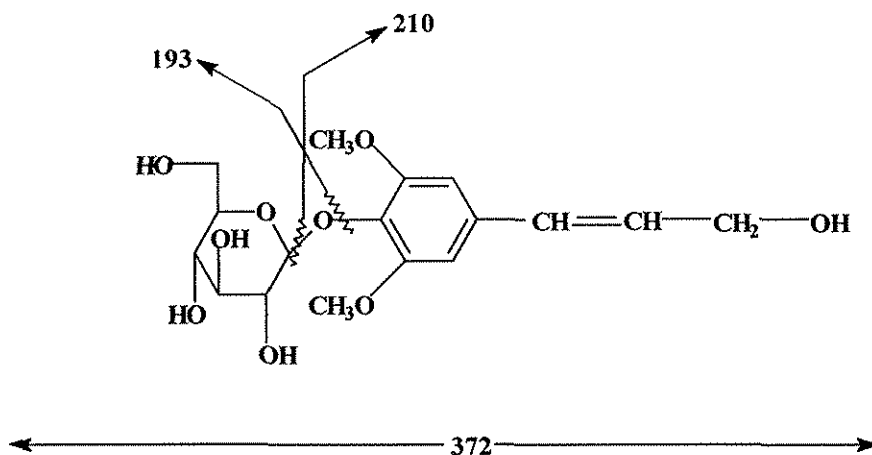
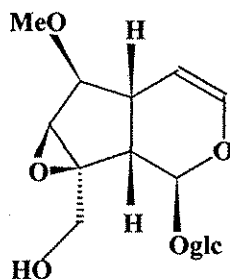


Figura 6.- Patrón de Fragmentación de la siringina (6).

De las fracciones 44-51 de la misma columna se obtuvo un sólido (125.8 mg) que al ser cristalizado de metanol presentó un pf de 249-251°C, cuyo rf coincidió con el del O-metil catalpol (desarrollado en varios sistemas de disolventes). Su identificación definitiva se logró cuando se registró su espectro de IR en paralelo con una muestra auténtica resultando ambos espectros idénticos (Espectro 19).



O-metilcatalpol (7)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IV.2.2 ESTUDIO DE LAS SAPONINAS DE *B. scordioides*.

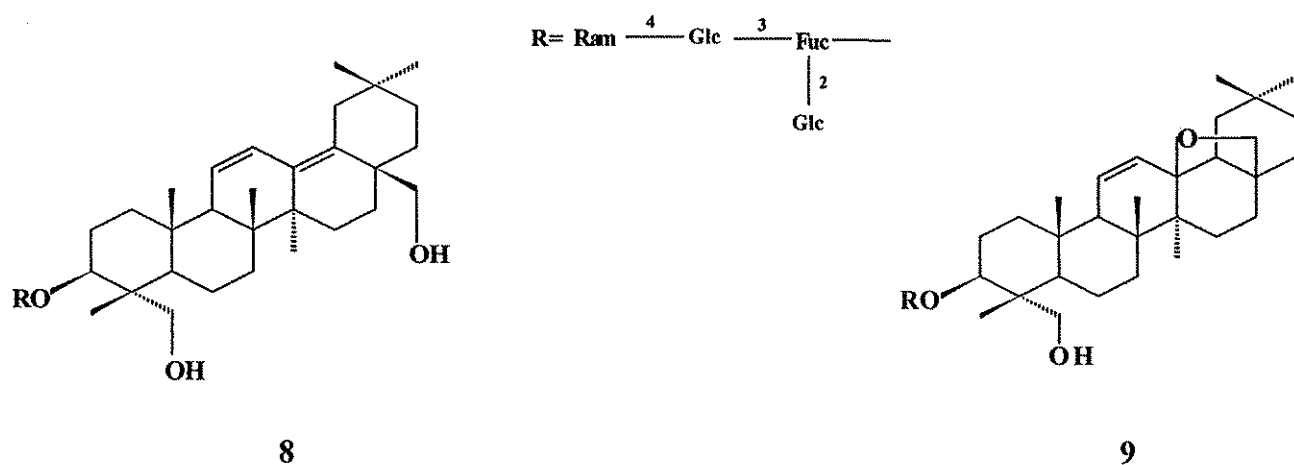
De las fracciones más polares se obtuvo una mezcla que debido a la poca diferencia en sus R_f dan una sola mancha en cromatografía de capa fina, por lo que se creyó que se trataba de una sustancia pura. El espectro en el IR de la mezcla (Espectro 20) mostró bandas a: 3342 cm^{-1} (OH); 2926 cm^{-1} (C-H); y 1095 cm^{-1} (C-O), además, la mezcla absorbió en el UV (λ_{max} a 245 nm). El análisis de RMN¹H (en piridina) de la mezcla (Espectro 21) indicó la presencia de cuatro protones vinílicos a δ 6.59 (d, $J= 10.2$), 5.60 (d, $J= 10.8$), 5.9 (d, $J= 9.9$) y 5.40 (d, $J= 9.8$) que corresponden los dos primeros a un dieno conjugado y los segundos a una doble ligadura aislada. Entre δ 4.6 y δ 5.2 se observan las señales correspondientes a los protones de azúcares, de los cuales, el doblete centrado a δ 6.1 se atribuye al protón anomérico de ramnosa. A δ 5.56 (d, $J= 8$) y 5.73 (d, $J= 8$) se distinguen señales que tentativamente se asignan a los protones anoméricos de la glucosa y fucosa, respectivamente. A δ 1.70 (d) y 1.40 (d) aparecen dos dobletes que integran para 3 protones y que por su desplazamiento químico se atribuyen a los metilos de ramnosa y fucosa respectivamente (Kubota, *et al.*, 1966). Cabe hacer notar que una señal de metoxilo a δ 3.2 aunque poco intensa es claramente visible.

El espectro de RMN ¹³C (Espectro 22) en piridina mostró 4 señales para carbonos anoméricos de azúcares a δ 102.7, 103.9, 104.9, 105.7; la de δ 102.7 se atribuyó al carbón anomérico de ramnosa, la presencia de este azúcar se encuentra reforzada por la señal a δ 18.5 que se atribuye a su metilo C-6 (Ding, *et al.*, 1986). La señal a δ 105.7 se atribuye al C-1 de una fucosa cuyo metilo C-6 se observa a δ 17, las señales a δ 103.9 y 104.9 corresponden a los carbonos anoméricos de dos glucosas. En la región de campo bajo se observan las señales a δ 127.8, 127.4, 137.5 y 135 que se atribuyen a los carbonos C-11,



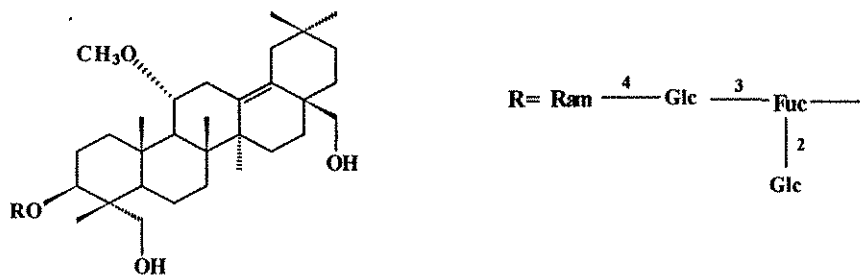
C-12, C-13 y C-18 de un dieno triterpénico. La posible presencia de un metoxilo indicada por la señal a δ 3.2 en ^1H RMN se encuentra reforzada por una señal en ^{13}C RMN a δ 52.2. El espectro de ^{13}C RMN DEPT (Espectro 23) mostró cuatro grupos $-\text{CH}_2-\text{O}-$ de gran intensidad a δ 62.78, 63.87, 64.6 y 65.5, que tentativamente se asignan a los carbonos C-6 de dos glucosas y a los carbonos C-28 y C-23 de un triterpeno dihidroxilado en esas posiciones, se puede observar en δ 73.2 la señal de un metileno cuyo desplazamiento químico es congruente con el de un puente de oxígeno 28-13. De acuerdo con estos datos y por comparación de los desplazamientos químicos con los reportados en la literatura (Kubota, *et al.*, 1966; Ding, *et al.*, 1986) se concluyó que la mezcla estaba compuesta de saponinas triterpénicas derivadas del oleanano. Para comprobar esta hipótesis se realizó una hidrólisis a la supuesta mezcla de saponinas para detectar las agliconas y los azúcares presentes en dicha mezcla (apartado IV.2.2.1).

El espectro de masas (EM-FAB⁺, Espectro 24) de la mezcla indicó que se trataba de al menos cuatro diferentes saponinas que mostraron sus [M+23] a m/z 1095, 1111, 1127 y 1143. El pico de 1095 es probable que corresponda a saponinas con estructuras 8 o 9.

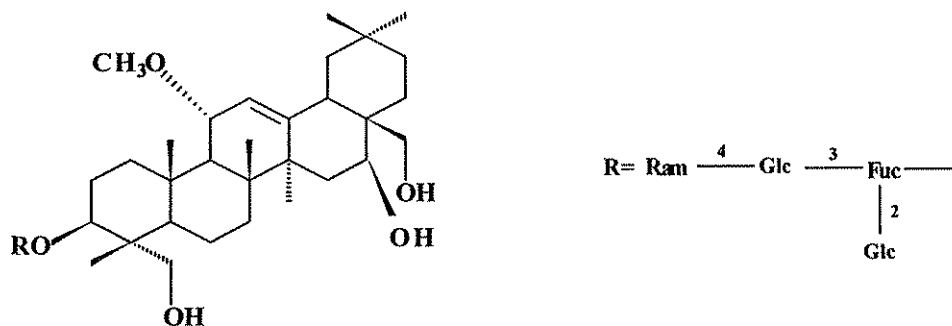


Varios autores (Ding, *et al.*, 1986; Ding, *et al.*, 1991; y Yamamoto, *et al.*, 1991) sugieren que los dienos 11, 12, 13(18) como **8** son artefactos derivados de la apertura del éter presente en sustancias con estructuras tipo **9**, sin embargo, es importante mencionar que dienos como el del compuesto **8** se encuentran presentes en la mezcla de saponinas antes de acetilar como lo sugieren las señales en ^{13}C NMR a δ 64.6 y 65.5 que son característicos para C-23 y C-28 de este tipo de dienos y que son los más intensos en el espectro de la mezcla, esto además de las señales de protones a δ 6.6 y 5.6, típicas para este tipo de dienos. Si bien es verdad que en la extracción y purificación se empleó CHCl_3 cuya acidez pudo haber provocado la apertura del éter cíclico, hay que señalar el predominio del dieno sobre otro tipo de triterpenos. Ishi y colaboradores (1980) hacen amplio uso del CHCl_3 en la separación y, sin embargo, sólo obtienen una sustancia diénica de entre 13 que aislaron, por lo tanto es muy probable que la planta contenga dienos de forma natural.

En esta fase del trabajo; era hipotética la presencia de los azúcares ramnosa, glucosa y fucosa y el tipo de enlace azúcar-azúcar; sin embargo, los pesos moleculares obtenidos por espectrometría de masas indicaba que era posible tener estructuras como las descritas anteriormente. Una tercera posibilidad para explicar el pico de 1095 es mediante la pérdida de metanol del compuesto **10** que es responsable del pico a m/z 1127.



El pico a m/z 1143 se explicaría por la presencia del compuesto **11**, este último al perder metanol daría un pico a m/z 1111. Este pico también puede deberse a los derivados de **8** o **9** con un OH en C-16.



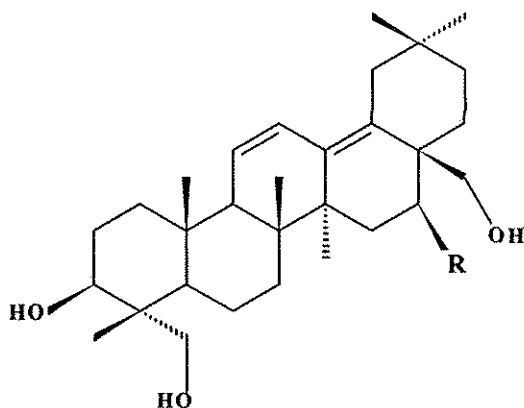
11

IV.2.2.1 HIDRÓLISIS.

La mezcla de saponinas libres se sometió a hidrólisis ácida, separándose la fase orgánica soluble en cloroformo, de la fase acuosa que contenía los azúcares, estos se separaron por cromatografía y se identificaron como fucosa, glucosa y ramnosa por comparación de sus r_f con los reportados con aquellos de muestras auténticas.

La fase orgánica mostró la presencia de dos sustancias que absorben luz UV en la región de 254 nm, estas se separaron mediante cromatografía en capa fina preparativa. Los espectros de RMN¹H de ambas sustancias fueron similares a excepción de la señal que presentó una de ellas a δ 3.93 (dd, 12.5 y 4 Hz) y que corresponde al protón del C-16 unido a un grupo hidroxilo. El análisis del espectro de RMN¹H de una de las sustancias (**16**) mostró las señales características del esqueleto del oleanano; a δ 5.59 (dd, $J_1= 10.5$ Hz, $J_2= 2$ Hz) se observa la señal del hidrógeno vinílico de C-11; a δ 6.5 (dd, $J= 10.5$ Hz, $J_2= 3$ Hz) se distingue la señal del protón vinílico de C-12; a δ 3.66 la señal doble de doble ($J= 10$ Hz,

$J_2 = 6.5$ Hz) de H-3; y entre 0.73 y 1.01 se observan siete señales singulete que corresponden a los siete metilos del esqueleto del oleanano. Las sustancias fueron caracterizadas como 3,16,23,28-tetrahidroxiolean-11,13(18)-dieno o Saikogenina A (**16**); y como 3, 23, 28-trihidroxiolean-11,13(18)-dieno (**17**) mediante estudios espectroscópicos de RMN ^1H , ^{13}C , COSY, HMQC y HMBC (Espectros 28, 29, 30, 31, 32, y 33, 34, 35, 36, 37 respectivamente). La aglicona **16** fue la más polar y tuvo un pf de 300-301 °C, la menos polar corresponde a la sustancia **17** que presentó un pf de 280-283 °C. Los desplazamientos químicos (en CDCl_3) de los treinta carbonos de las dos agliconas se observan en la tabla 15; y en la tabla 16 los desplazamientos químicos de los protones.



16 R=OH saikogenina A

17 R=H 3, 23, 28-trihidroxiolean-11, 13(18)-dieno

Las constantes físicas y la estructura de **16** corresponden al 3,16,23,28-tetrahidroxiolean-11,13(18)-dieno (Saikogenina A) descrita por Yamamoto *et al.* (1991) y las de la sustancia **17** al 3,23,28-trihidroxiolean-11,13(18)-dieno descrita por Ding *et al.*(1991).

Tabla 15.- Desplazamientos Químicos en RMN ^{13}C de las agliconas 16 y 17

CARBÓN	COMPUESTO	
	16	17
C-1	38.0	37.7
C-2	26.8	26.7
C-3	76.2	76.4
C-4	41.8	41.8
C-5	49.3	49.4
C-6	18.4	18.4
C-7	32.2	32.6
C-8	40.0	39.9
C-9	53.9	54.2
C-10	36.8	35.0
C-11	125.3	125.3
C-12	126.2	126.2
C-13	136.3	136.0
C-14	44.6	42.0
C-15	29.0	30.3
C-16	74.4	24.7
C-17	42.9	38.1
C-18	136.8	132.9
C-19	37.7	38.1
C-20	34.0	33.0
C-21	34.5	32.7
C-22	22.2	22.7
C-23	71.3	71.6
C-24	11.0	10.0
C-25	16.6	16.5
C-26	18.3	18.3
C-27	21.8	20.4
C-28	63.5	65.3
C-29	32.1	32.3
C-30	24.6	24.5

Los desplazamientos químicos se expresan en ppm. Las asignaciones están de acuerdo con los resultados de los experimentos DEPT, HETCOR, HMQC y HMBC.



Tabla 16.- Datos espectrales de ¹H RMN de las Agliconas 16 y 17

Posición	16	17
3	3.66 (dd, 10, 6.5)	3.68 (dd, 10, 6)
11	5.59 (dd, 10.5, 2)	5.58 (dd, 10.5, 2)
12	6.37 (dd, 10.5, 3)	6.43 (dd, 10.5, 3)
16	3.93 (dd, 12.5, 4)	1.44 (a)
21	1.87 (a)	1.71 (a)
23	3.74 (d, 10.5) 3.44 (d, 10.5)	3.74 (d, 10) 3.44 (d, 10)
24	0.87 (s)	0.88 (s)
25	0.73 (s)	0.72 (s)
26	0.93 (s)	0.94 (s)
27	1.01 (s)	0.97 (s)
28	3.78 (d, 7) 4.11 (d, 6.5)	3.57 (d, 10.5) 3.61 (d, 11)
29	0.97 (s)	0.96 (s)
30	0.78 (s)	0.79 (s)

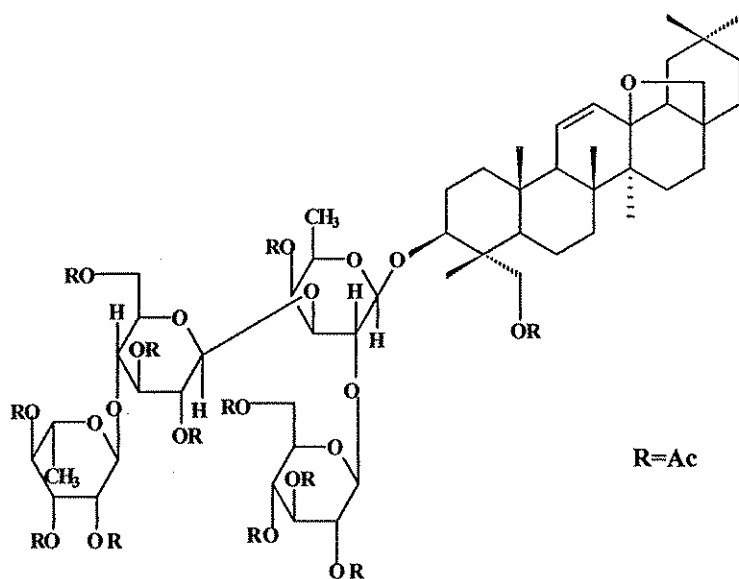
Los desplazamientos químicos están expresados en ppm, referidos al TMS, y las constantes de acoplamiento (en paréntesis) en Hz. Las asignaciones están de acuerdo con los resultados de los experimentos COSY, HMQC y HMBC. (a)= señal traslapada.

IV.2.2.2 ACETILACIÓN DE LA MEZCLA DE SAPONINAS.

La mezcla de saponinas se acetiló de manera convencional y la mezcla de acetatos se sometió a análisis espectroscópico de RMN ^1H , ^{13}C y de espectrometría de masas (Espectros 25, 26 y 27, respectivamente). En la RMN ^1H (en CDCl_3) de la mezcla se observan las señales de 4 protones vinílicos a δ 6.38, 5.9, 5.56 y 5.40. Las señales que se desplazan a δ 6.38 y 5.56 corresponden a protones vinílicos de un sistema conjugado como el de **8** y las que se desplazan a δ 5.9 y 5.4 corresponden a una doble ligadura aislada como la de **9**. Entre δ 4.6 y 5.2 se observa un conjunto de señales correspondientes a protones de azúcares, entre los que se puede distinguir a δ 5.17 un doblete del protón anomérico de ramnosa. Las señales de los protones anoméricos de glucosa y fucosa (dobletes en ambos casos) aparecen a δ 4.69 y 4.62. A δ 4.11 y 3.88 se observan dos dobletes acoplados entre sí que se atribuyen al hidroximetileno C-28 de una saponina como **8**. El C-28 de la saponina **9** se identificó por medio de un sistema AB entre δ 3.2 y δ 3.9, el hidroximetileno (C-23) de dicha saponina apareció como un segundo sistema AB a δ 4.28 y 4.03. En la zona de metilos sobresalen las señales de los dobletes a δ 1.13 y a δ 1.03 que corresponden a los metilos de ramnosa y fucosa respectivamente.

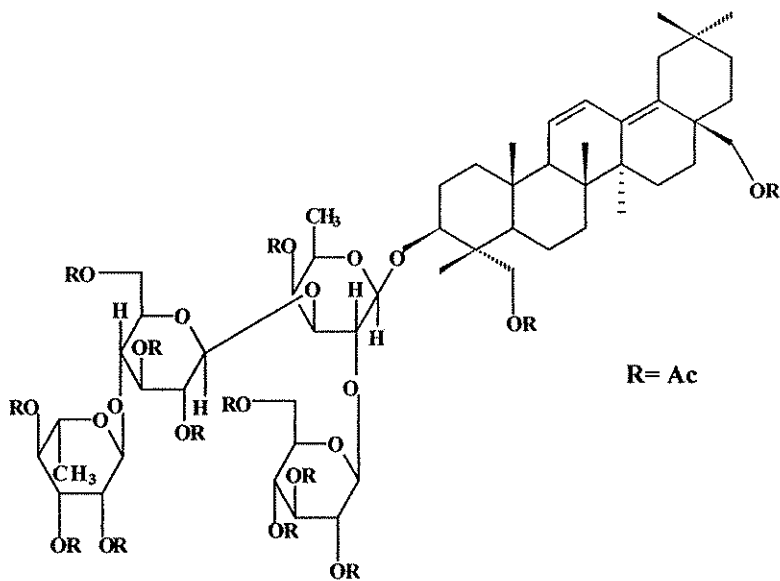
Los espectros de RMN ^{13}C fueron de gran ayuda en la elucidación estructural, la presencia de seis señales correspondientes a los 6 carbonos vinílicos de las sustancias de tipo **8** y **9** se observan entre δ 125 y 136. Los carbonos anoméricos están presentes entre δ 99 y 103 (cuatro señales), el espectro también muestra a δ 61.99 y a δ 60.64 señales que corresponden a los hidroximetilenos C-6 de dos moléculas de glucosa. Es notable una señal a δ 52.2 que indica la presencia de un grupo metoxilo.

El espectro de masas de los productos de acetilación de la mezcla de saponinas (Espectro 27) mostró picos a m/z : 1576 $[M]^+$, 1618 $[M]^+$, 1641 $[1618+23]^+$ y 1657 $[1634+23]^+$ que corresponden a dos iones moleculares y a un pseudo-ion molecular de los compuestos **12**, **13** y **14**. Otros picos importantes son los que se deben a los azúcares acetilados; triacetil-ramnosa a m/z 273, tetraacetil-glucosa a 331, y a m/z 1079 el pico correspondiente a los cuatro azúcares acetilados. Se pueden observar también los picos correspondientes a las agliconas acetiladas a m/z 495 (1576-1079), a 539 (1618-1079) y a 577 (1658-1079) un pico de baja intensidad que corresponde al ion pseudomolecular de la sustancia **14** ($M+23$) con pérdida de los azúcares.

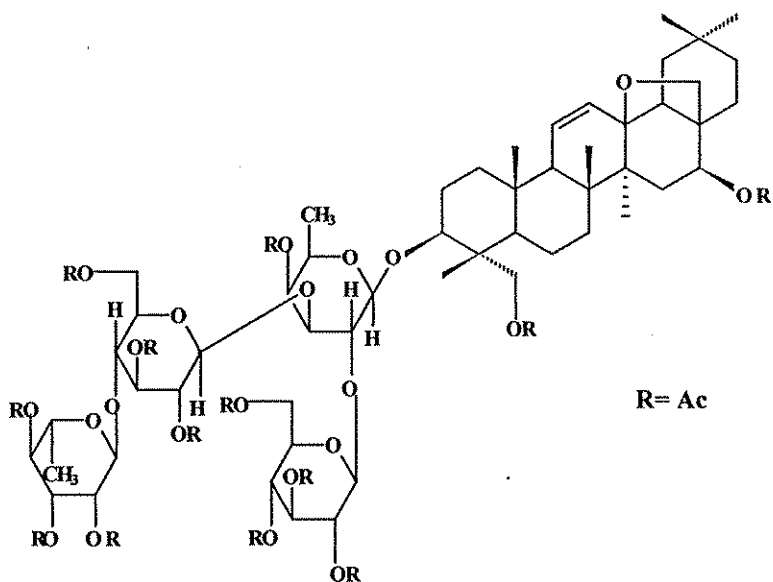


12

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



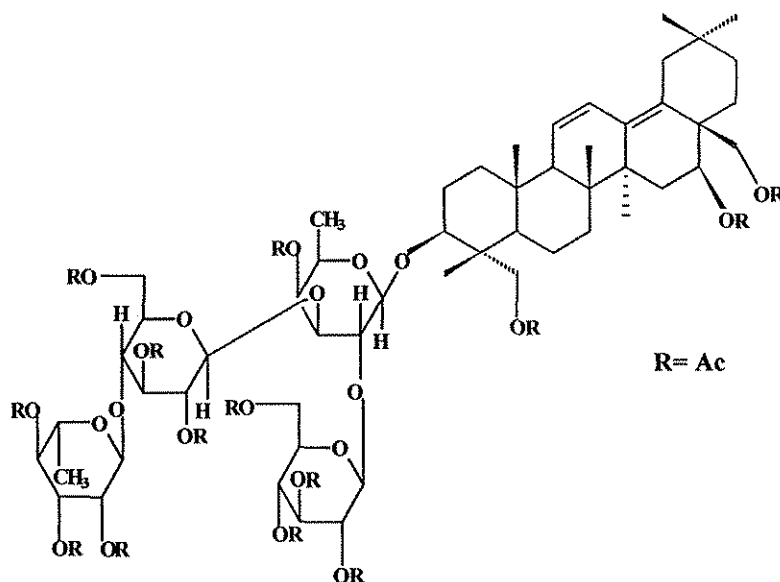
13



14

IV.2.2.3 SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS SAPONINAS ACETILADAS.

Los componentes de la mezcla de saponinas acetiladas se separaron usando cromatografía de líquidos de alta resolución (en el primer proceso); y mediante filtración en gel y cromatografía en columna en el segundo proceso, en este caso se obtuvo una saponina que no se había aislado en el primer proceso y cuyo ión molecular determinado mediante espectrometría de masas modalidad FAB⁺ (Espectro 50), fue: C₈₂O₃₆H₁₁₆ m/z 1676 [M]⁺, 1079 [M-Aglicona]⁺, 539 [Aglicona]⁺ (15).



15

Las saponinas 13 y 14 fueron identificadas mediante espectrometría de masas y estudios espectroscópicos de RMN ¹H, RMN ¹³C, COSY, HMQC; HMBC (Espectros 38, 39, 40, 41, 42 y 43 correspondientes a 14; 44, 45, 46, 47, 48 y 49 correspondientes a 13). La saponina 15 fue identificada mediante el análisis de sus espectros de masas, de RMN ¹H, RMN ¹³C y DEPT (Espectros 50, 51, 52 y 53). Las tablas 17 y 18 muestran las asignaciones para los

carbonos y los protones de las saponinas con base en los estudios de RMN homo y heteronuclear.

Tabla 17.- Desplazamientos Químicos en ^{13}C -RMN de 13, 14 y 15 en CDCl_3

	13	14	15		13	14	15
C-1	38.0	37.9	37.6	Fuc			
C-2	25.2	25.1	25.1	C-1	103.3	103.3	103.3
C-3	83.6	83.6	83.6	C-2	74.2	74.7	74.1
C-4	42.0	41.8	41.8	C-3	79.3	79.3	79.3
C-5	47.8	47.5	47.5	C-4	73.0	72.9	72.9
C-6	18.0	20.7	17.8	C-5	67.9	67.8	67.8
C-7	33.0	31.2	32.8	C-6	16.7	16.4	16.8
C-8	40.4	31.8	40.3	Glc			
C-9	54.8	52.8	53.9	C-1	100.2	100.1	100.1
C-10	36.4	35.9	36.2	C-2	68.7	68.5	68.4
C-11	125.4	132.6	125.0	C-3	76.3	72.9	72.9
C-12	126.6	129.6	127.3	C-4	75.0	75.0	72.7
C-13	133.3	83.8	131.0	C-5	71.9	71.8	71.7
C-14	42.3	41.5	42.0	C-6	62.2	62.1	62.1
C-15	35.1	29.7	34.8	Glc'			
C-16	25.2	68.7	68.6	C-1	100.2	100.0	99.9
C-17	42.3	45.1	43.9	C-2	72.1	71.9	71.9
C-18	137.1	51.6	136.9	C-3	73.0	74.1	73.0
C-19	38.2	37.3	37.7	C-4	76.3	76.1	76.1
C-20	33.0	31.4	32.1	C-5	73.0	72.7	72.8
C-21	32.9	34.2	32.1	C-6	60.7	60.5	60.6
C-22	29.7	25.9	29.7	Rha			
C-23	65.9	65.3	65.2	C-1	99.5	99.4	99.3
C-24	12.5	12.3	12.5	C-2	70.0	69.9	69.9
C-25	18.3	18.0	18.3	C-3	68.7	68.6	68.4
C-26	16.4	19.4	16.5	C-4	70.1	70.1	70.6
C-27	20.2	20.5	20.7	C-5	69.0	69.0	69.0
C-28	65.5	73.2	63.7	C-6	17.3	17.2	17.2
C-29	32.2	33.3	32.8				
C-30	24.4	23.6	24.2				

Los desplazamientos químicos se expresan en ppm. Las asignaciones están de acuerdo con los resultados de los experimentos DEPT, HETCOR, HMQC y HMBC.

Tabla 18.- Datos espectrales de ¹H RMN de los compuestos 13, 14 Y 15.

	13	14	15
Aglicona			
3	3.5 (a)	3.49 (a)	3.49 (a)
11	5.58 (d, 10.5)	5.88 (d, 10.5)	5.62 (d, 10.7)
12	6.40 (dd, 11, 3)	5.41 (d, 10.5)	6.39 (dd, 10.7, 2.2)
16	1.19 (s)	5.42 (dd, 10.5, 3)	5.42 (d, 3.3)
21	0.88 (d, 7)	1.18 (dd, 11.5, 3)	1.03 (d, 10.1)
23	4.24 (d, 11.5)	4.26 (d, 12)	4.26 (d, 11.8)
	4.07 (d, 11.5)	4.05 (d, 11.5)	4.04 (d, 12)
24	0.79 (s)	0.78 (s)	0.77 (s)
25	0.92 (s)	0.91 (s)	0.91 (s)
26	0.72 (s)	1.08 (s)	0.78 (s)
27	0.96 (s)	1.03 (s)	1.10 (s)
28	4.17 (d, 11)	3.98 (d, 7.5)	4.50 (d, 11.8)
	4.00 (d, 11.5)	3.18 (d, 7.5)	4.04 (d, 12)
29	0.96 (s)	0.97 (s)	0.96 (s)
30	0.79 (s)	0.89 (s)	0.78 (s)
Azúcares unidos a C-3			
Fuc			
1	4.27 (d, 8)	4.26 (d, 8)	4.27 (d, 7)
2	3.82 (a)	3.82 (a)	3.82 (a)
3	3.75 (dd, 9.5, 3.5)	3.75 (dd, 9.5, 3.5)	3.75 (dd, 9.8, 3.3)
4	5.17 (dd, 9.5, 3)	5.18 (d, 3)	5.18 (d, 3)
5	3.82 (a)	3.82 (a)	3.82 (a)
6	1.15 (d, 6)	1.14 (d, 6.5)	1.14 (s)
Glc (C-2 de Fuc)			
1	4.72 (d, 8)	4.71 (d, 8)	4.70 (d, 7.1)
2	5.11 (a)	5.10 (a)	5.08 (a)
3	4.83 (dd, 7, 7)	4.84 (dd, 7.5, 7)	4.85 (dd, 6.8, 4.4)
4	5.11 (a)	5.10 (a)	5.08 (a)
5	3.62 (a)	3.62 (a)	3.62 (a)
6	4.74 (dd, 12.5, 2)	4.33 (dd, 12.5, 5)	4.32 (dd, 12, 4.4)
	4.07 (dd, 11.5, 5.5)	4.05 (d amplio, 11.5)	4.10 (dd, 11.3, 4.4)
Glc' (C-3 de Fuc)			
1	4.66 (d, 8)	4.64 (d, 8)	4.63 (d, 7.9)
2	4.92 (a)	4.91 (dd, 8, 8)	4.92 (a)
3	5.11 (a)	5.10 (a)	5.08 (a)
4	3.91 (dd, 9, 9.5)	3.92 (dd, 9.5, 9.5)	3.91 (dd, 9.3, 9.3)
5	3.5 (a)	3.48 (a)	3.48 (a)
6	4.74 (dd, 12.5, 2)	4.75 (dd, 12.5, 2)	4.74 (d amplio 12)
	4.11 (dd, 12.5, 3)	4.11 (dd, 12.5, 3)	4.10 (dd, 11.3, 4.4)
Ram (C-4 de Glc')			
1	4.82 (d, 1.5)	4.86 (d, 2)	4.84 (d, 2.4)
2	5.10 (a)	5.10 (a)	5.08 (a)
3	5.10 (a)	5.16 (dd, 10, 3.5)	5.09 (a)
4	5.03 (dd, 10, 10)	5.04 (dd, 10, 10)	5.03 (dd, 9.6, 9.6)
5	3.62 (a)	3.62 (a)	3.62 (a)
6	1.15 (d, 5.5)	1.15 (d, 6)	1.14 (d, 6.33)

Los desplazamientos químicos están expresados en ppm, referidos al TMS, y las constantes de acoplamiento (en paréntesis) en Hz. Las asignaciones se realizaron con base en los resultados de los experimentos COSY, HMQC y HMBC. (a)= señal traslapada

Si bien, ya se sabía que las saponinas presentaban en la aglicona el esqueleto del oleanano (sección IV.2.2.1), las diferencias entre las tres saponinas se dilucidaron al comparar los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C .

Las saponinas **13** y **15** presentaron un dieno conjugado en posición 11-12, 13(18). La diferencia entre ambas, consistió en que **15** contiene un grupo hidroxilo en la posición 16, este hecho se reflejó en los desplazamientos químicos de sus espectros de RMN. En los espectros de RMN de la saponina **15** las señales tanto del protón como del carbono de la posición 16 se observaron a campo bajo (δ 5.42 y δ 68.6, respectivamente) debido al efecto paramagnético del grupo hidroxilo; en cambio, en los espectros de RMN de la saponina **13** las señales del protón y del carbono de la misma posición aparecieron a campo alto (δ 1.19 y δ 25.2, respectivamente).

La saponina **14** presentó un doble enlace en posición 11-12 cuyas señales en el espectro de RMN ^{13}C , se observaron a δ 132.6 y a δ 129.6, respectivamente. El compuesto **14** posee un puente etéreo entre C-13 y C-28 evidenciado en su espectro de RMN ^1H por dos señales dobles, una centrada a δ 3.18 y otra a δ 3.98. En cambio las señales de los protones en la misma posición de las saponinas **13** y **15** por estar vecinas a un grupo acetato se observan a menor campo como dos señales dobles centradas a δ 4.0 y δ 4.17 (saponina **13**); y a δ 4.04 y δ 4.50 (saponina **15**). Por otra parte, la señal del carbono 28 de la saponina **14** aparece en el espectro de RMN ^{13}C a δ 73.2, en cambio las de las saponinas **13** y **15** se observan a δ 65.5 y δ 63.7, respectivamente. Los datos anteriores son similares a los reportados en la literatura para los desplazamientos químicos de dienos triterpénicos y triterpenos con puente etéreo 28-13 (Tori, *et al.*, 1976).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuando se llevó a cabo la hidrólisis ácida de la mezcla de saponinas se habían detectado mediante cromatografía de capa fina tres azúcares diferentes (fucosa, glucosa y ramnosa). Por otra parte, fue evidente la presencia de cuatro protones y cuatro carbonos anoméricos en los espectros de resonancia magnética nuclear tanto protónica como de carbono-13 de cada una de las saponinas aisladas, por lo tanto, cada saponina presentaba cuatro azúcares. El patrón de señales en la zona de los azúcares es similar, tanto en ^1H como en ^{13}C . Para determinar la identidad de los azúcares presentes en las saponinas se analizó el espectro de correlación homonuclear en dos dimensiones ^1H - ^1H COSY, en donde se observó principalmente la conectividad secuencial de cada uno de los hidrógenos anoméricos, cabe hacer notar que los espectros COSY de las tres saponinas aisladas fueron idénticos en la zona de los desplazamientos químicos de las señales correspondientes a los protones de los azúcares (Figuras 7, 8 y 9).

El análisis se inició (Figura 7) con la señal del hidrógeno anomérico localizada a δ 4.26 (d, $J= 8.0$ Hz), la cual muestra correlación con una señal múltiple centrada a δ 3.82 asignada a H-2; la señal del hidrógeno H-2, a su vez, muestra correlación con una señal doble de doble centrada a δ 3.75 con constantes de acoplamiento de 9.5 y 3.5 Hz, asignada a H-3; esta señal también muestra correlación con la señal centrada a δ 5.18 (dd, 9.5, 3 Hz) que se asignó al H-4. La señal del protón H-5 se localiza en el multiplete centrado a δ 3.82, esta no mostró claramente una correlación con la señal de H-4, sin embargo, sí es evidente la correlación de la señal de H-5 con la señal de los protones de un metilo que se observa como un doblete centrado en δ 1.14 (d, 6 Hz) y que se asignaron como H-6 (figura 9). Estas conectividades, así como las multiplicidades y constantes de acoplamiento (especialmente

la del carbono anomérico $J= 8.0$ Hz) observadas para estas señales, indican que este azúcar corresponde a la β -fucopiranososa.

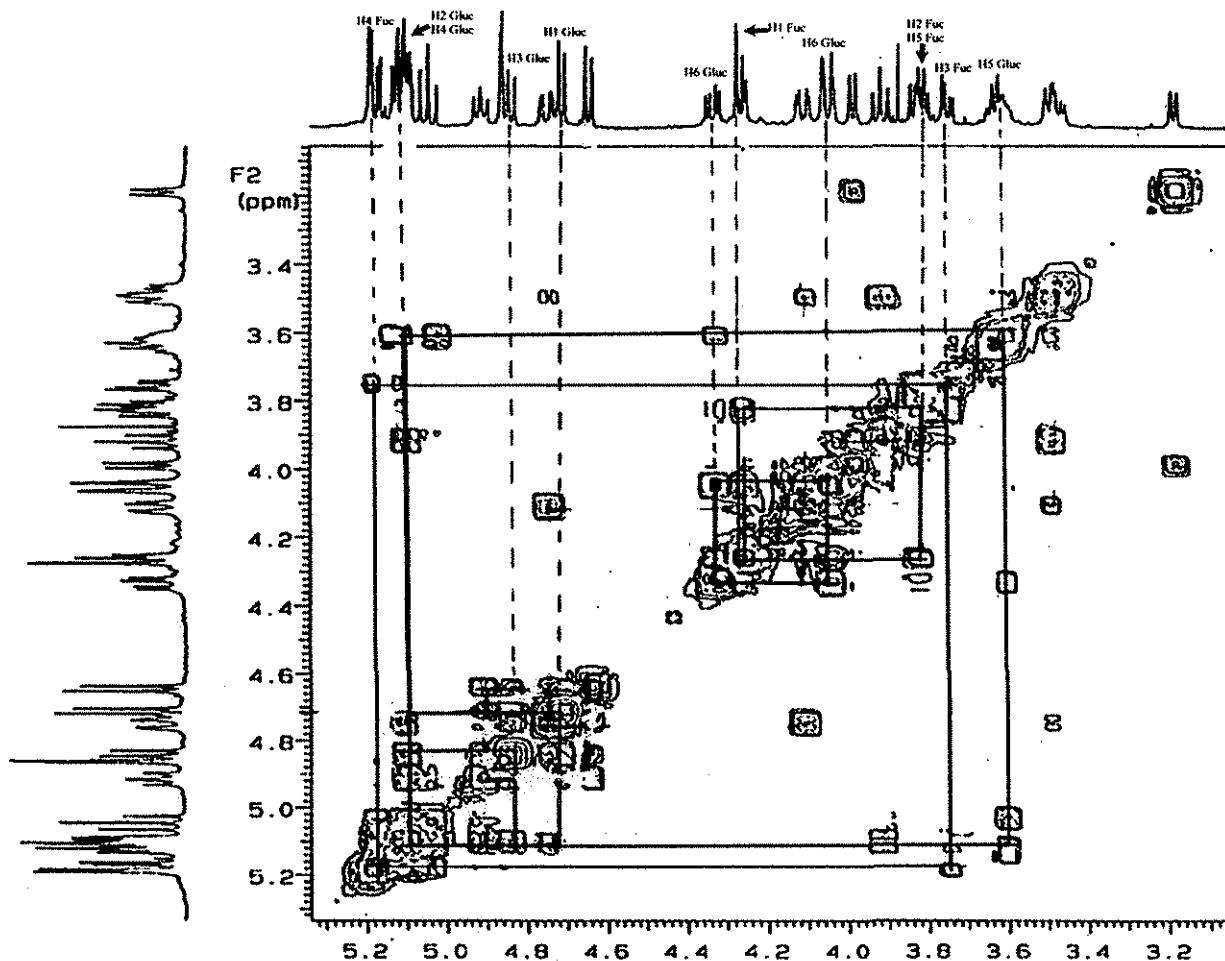


Figura 7.- COSY ¹H-¹H expansión en 3.1-5.3 ppm

La identidad de otro de los azúcares presente en las saponinas, también se estableció mediante el análisis del experimento COSY (figura 7) como se indica a continuación: la señal de un protón anomérico a δ 4.71 que se observa en el espectro como un doblete ($J= 8$ Hz) muestra correlación con una señal múltiple a δ 5.10, en este multiplete se encuentran traslapadas las señales correspondientes a H-2 y H-4, puesto que es evidente que existen correlaciones entre este multiplete con una señal centrada a δ 4.84 (dd, $J= 7.5, 7$ Hz) y con un multiplete a δ 3.62, estas dos últimas señales se asignaron a los protones H-3 y H-5

respectivamente. La señal a δ 3.62 (correspondiente a H-5); a su vez, muestra correlación con la señal de los protones del hidroximetileno H-6 que se observa a δ 4.33 (dd, $J= 12.5, 5$ Hz). La presencia de un sistema AB del hidroximetileno fue evidente cuando se observó que existía correlación entre la señal a δ 4.33 con la presente a δ 4.05 (d amplio, 11.5 Hz). Las multiplicidades y constantes de acoplamiento, así como la correlación secuencial entre las señales permitieron establecer la identidad de este azúcar como la β -glucopiranososa.

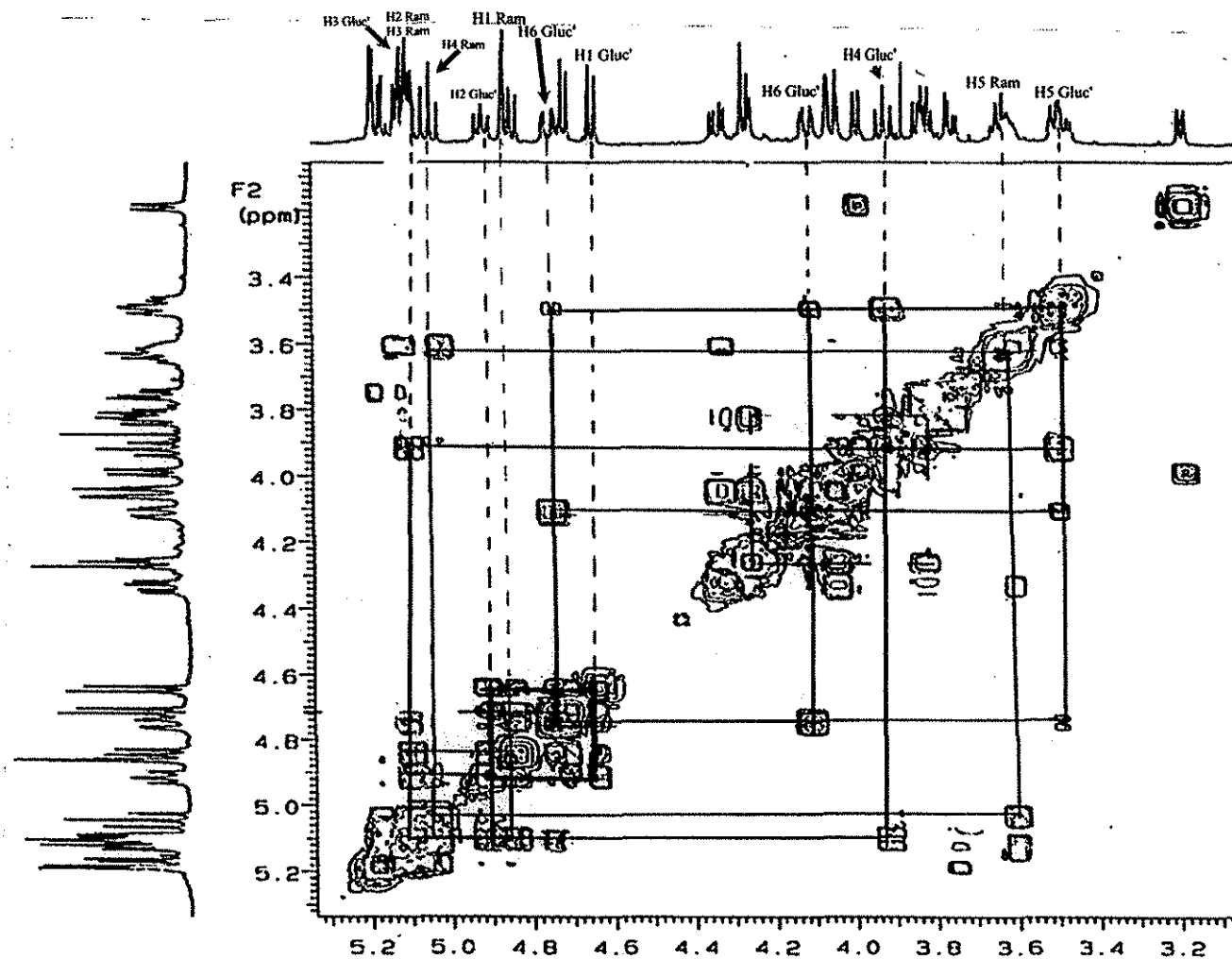


Figura 8.- COSY ^1H - ^1H expansión en 3.1-5.3 ppm

El tercer azúcar presente en las saponinas fue caracterizado como β -glucopiranososa (Glc'), en la figura 8 se observa la secuencia de correlaciones que permitieron identificar este

azúcar. Al igual que en los casos anteriores, se tomó como punto de partida la señal del protón anomérico, el cual se observa como un doblete centrado a δ 4.64 (d, 8 Hz). Esta señal tiene correlación con un doble de doble centrado a δ 4.91 ($J=$ 8, 8 Hz) que se asignó al H-2. A su vez, esta señal mostró correlación con el multiplete centrado a δ 5.10 que fue asignado al H-3 (en este multiplete coincidieron las señales de varios protones). La señal múltiple en δ 5.10 presentó correlación con un doble de doble centrado a δ 3.92 ($J=$ 9.5, 9.5 Hz) y que se asignó al protón H-4. Por otra parte, se detectó correlación entre la señal asignada a H-4 y el multiplete cuyo centro se observa a δ 3.48 y que fue asignado al protón H-5. Por último, la señal múltiple a δ 3.48 mostró correlación con un sistema AB correspondiente al hidroximetileno de la glucosa cuyas señales se visualizan a δ 4.75 (dd, $J=$ 12.5, 2 Hz) y a δ 4.11 (dd, 12.5, 3 Hz), también fue evidente la correlación entre estas dos señales.

De la misma manera que en los casos anteriores, mediante el análisis del espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY (figura 8) se determinaron las conectividades secuenciales de los protones del cuarto azúcar, que en este caso fue identificado como α ramnosa. La señal del protón anomérico se distingue como doblete centrado en δ 4.86 y con constante de acoplamiento de 2 Hz, esta señal presentó correlación con un multiplete centrado en δ 5.10 que corresponde al H-2. La constante de acoplamiento de H-1, indicó una relación *ecuatorial-ecuatorial* entre dicho protón y el H-2, lo que establece que la forma anomérica es α . El protón correspondiente a H-3 presentó una señal a δ 5.16 (dd, 10, 3.5 Hz) que por su cercanía con la señal de H-2 se aprecia un cuadro de conectividad pequeño. El mismo fenómeno se observa en la correlación de H-3 con la señal de H-4 que se presentó como un doble de doble centrado a δ 5.04 ($J=$ 10, 10 Hz). La señal doble de

doble correspondiente a H-4 mostró correlación con un multiplete centrado a δ 3.62 y que se asignó a H-5. Por último la señal correspondiente a H-5 (figura 9) presentó correlación con la señal de los protones del metilo que se observan como un doblete centrado a δ 1.15 ($J=6$ Hz).

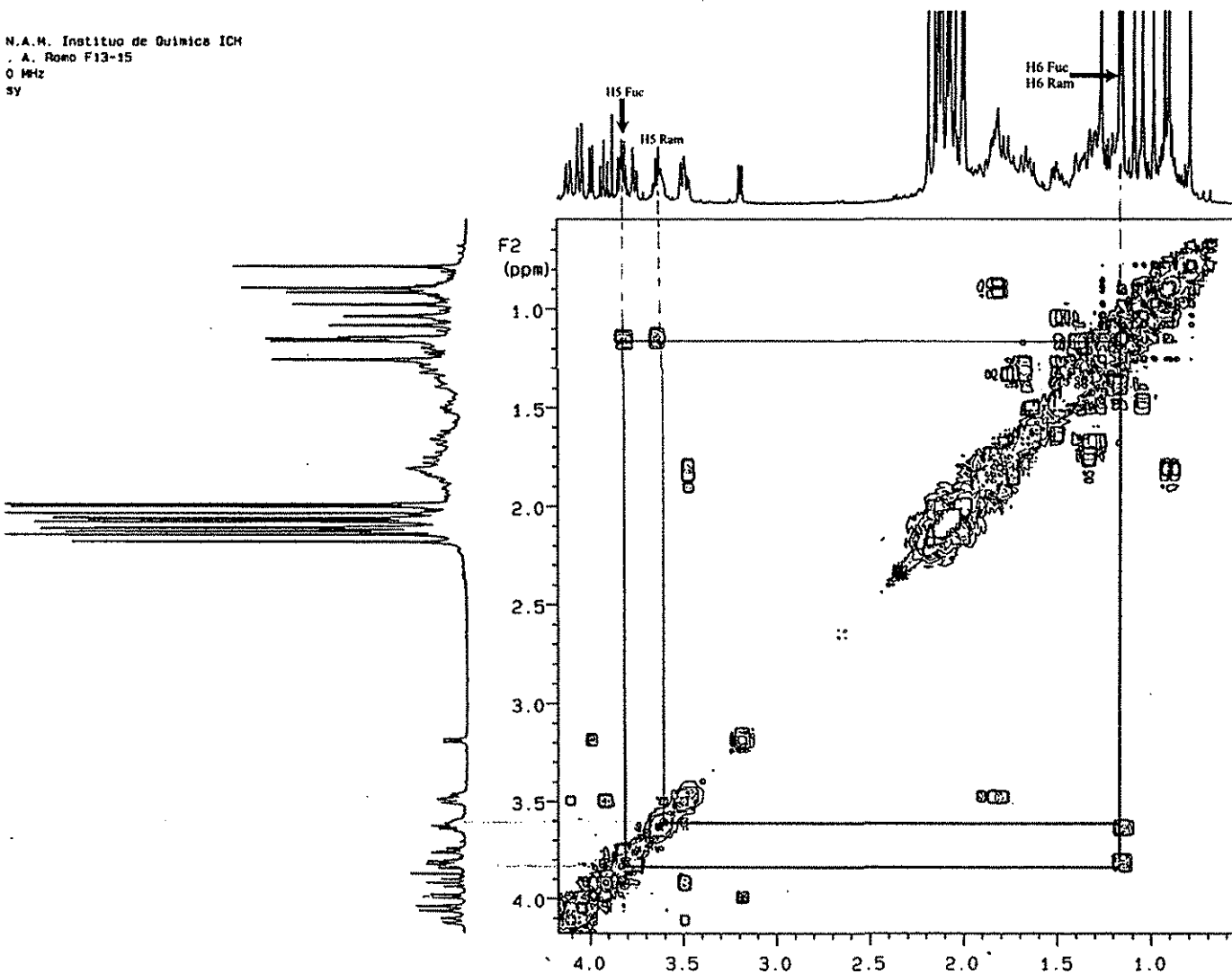


Figura 9.- COSY ¹H-¹H expansión en 3.1-5.3 ppm

Fue especialmente útil el experimento de HMBC que se les realizó a las saponinas, los resultados de este, permitieron establecer la posición del enlace azúcar-azúcar y a su vez la

secuencia de los mismos con relación a la aglicona. De esta forma, el espectro HMBC indicó que existía correlación heteronuclear a tres ligaduras entre el C-3 de la aglicona y el H-1 de la fucosa; el C-3 de la aglicona y un protón de C-23; el H-2 de Fucosa con el carbono anomérico de una glucosa (Glc); el H-3 de fucosa con el carbono anomérico de glucosa (Glc'); H-4 de Glc' con el carbono anomérico de ramnosa. El espectro HMBC de una de las saponinas se muestra en la figura 10.

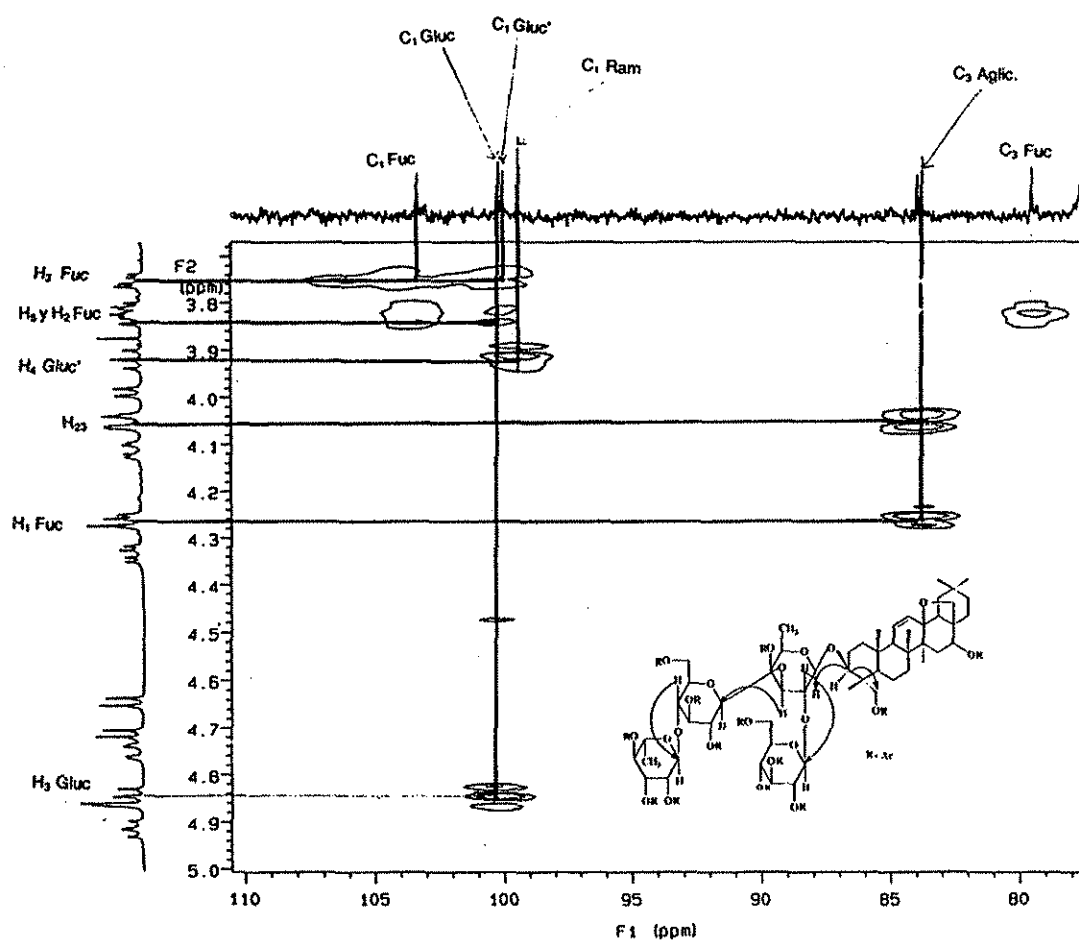


Figura 10.- Sección del espectro HMBC del Peracetato de la Buddlejasonina I.

Los espectros de masas de los compuestos 13, 14 y 15 mostraron iones moleculares con una relación masa carga (m/z) de 1618, 1634 y 1676 uma, respectivamente. En las figuras

11, 12, y 13 se observan los mapas de fragmentación propuestos con base en los espectros obtenidos mediante experimentos de EM modalidad FAB.

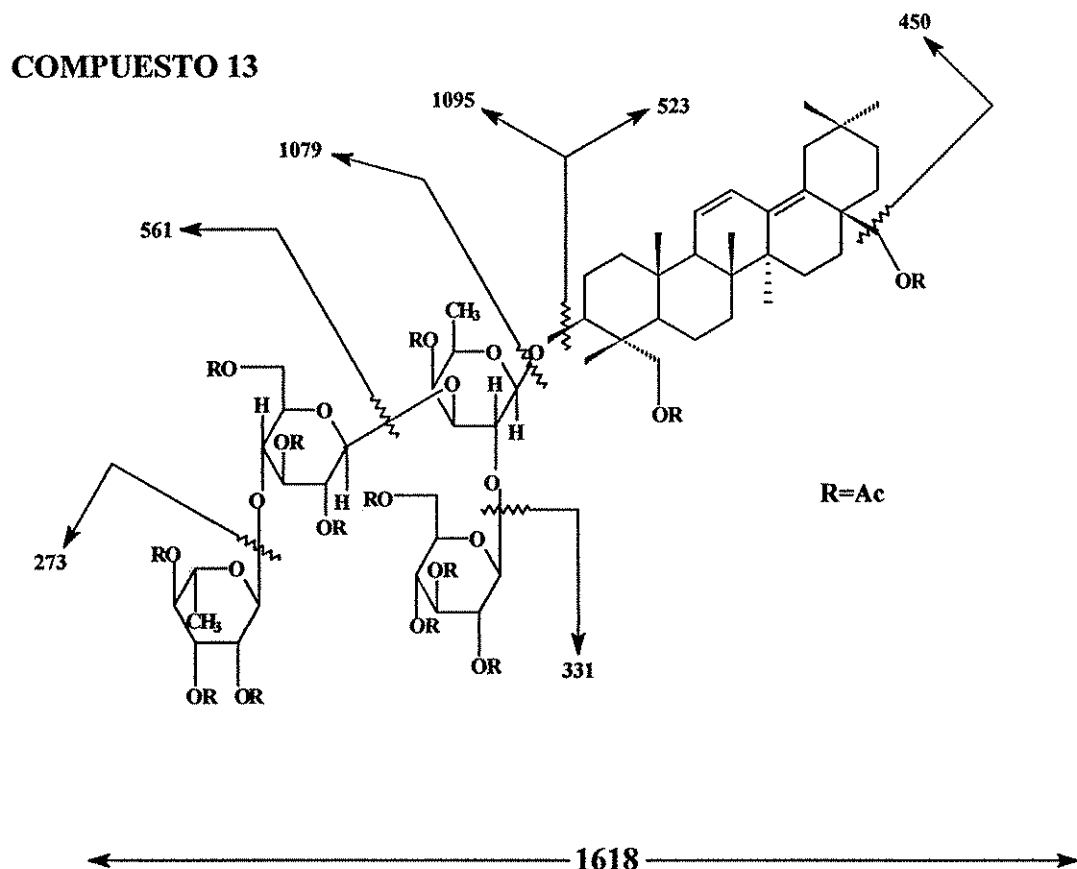


Figura 11.- Mapa de fragmentación del peracetato de 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-fucopiranosil 3,23,28-trihidroxiolean-11,13(18)-dieno.

COMPUESTO 14

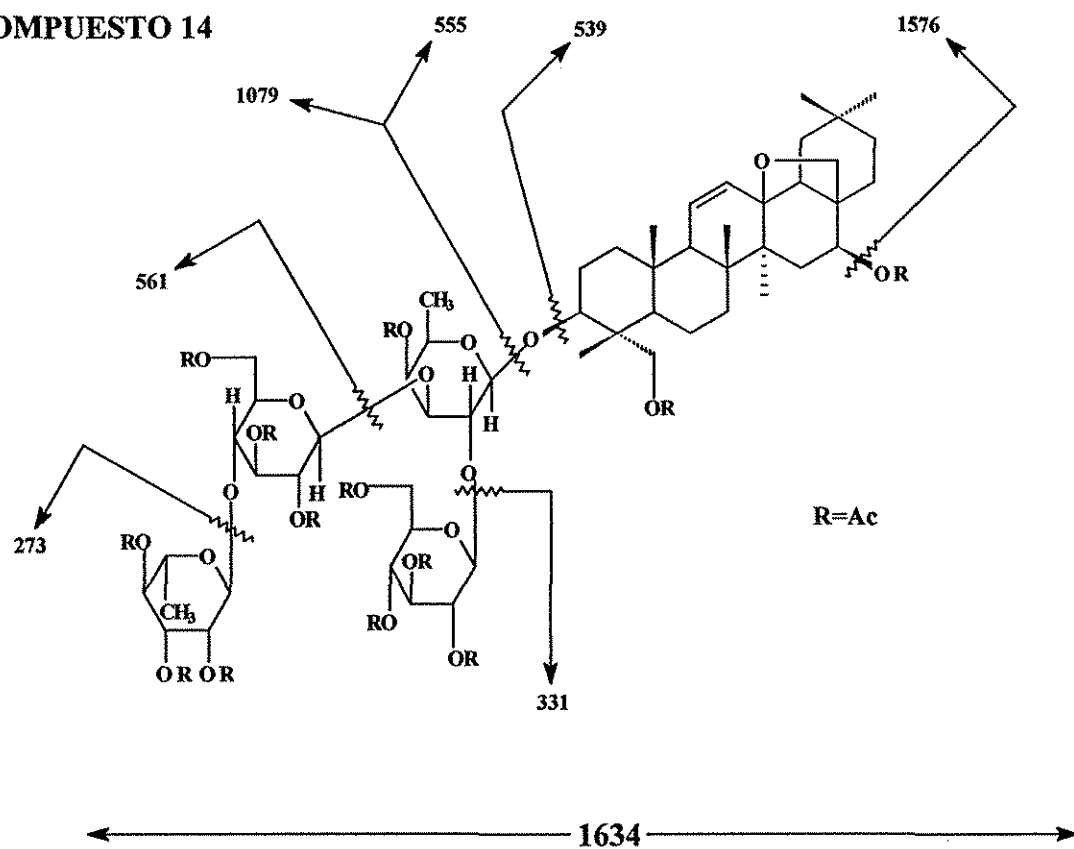


Figura 12.- Mapa de fragmentación del peracetato de la Buddlejaponina I.

COMPUESTO 15

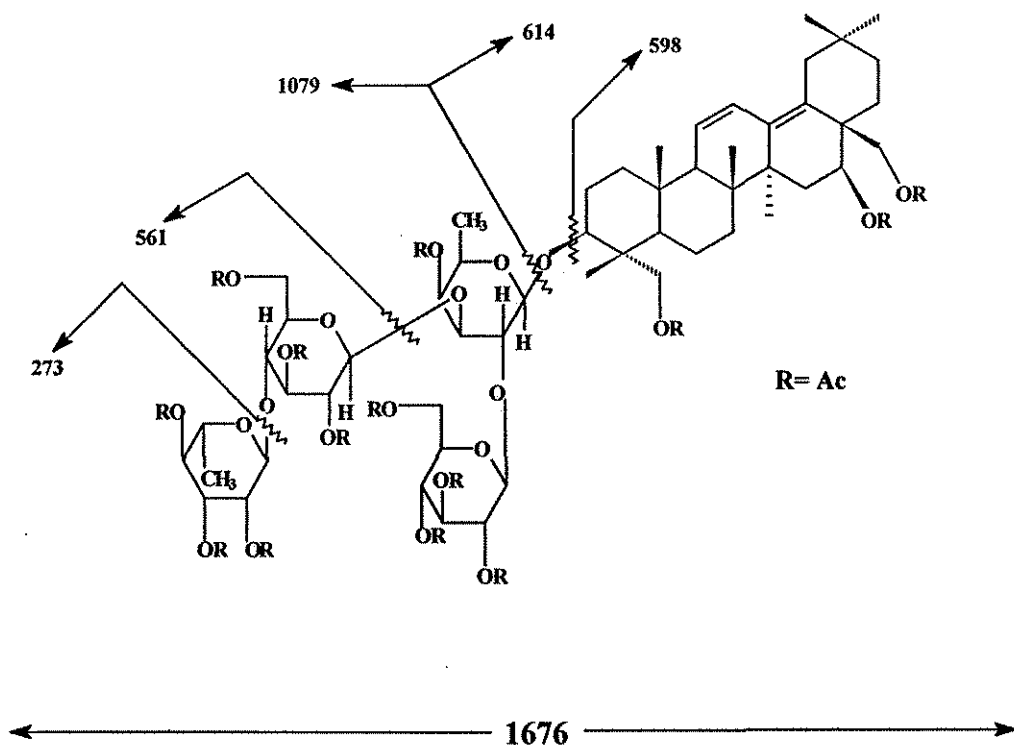


Figura 13.- Mapa de fragmentación del peracetato de 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-fucopiranosil 3,16,23,28-tetrahidroxiolean-11,13(18)-dieno.

Sobre la base de los resultados obtenidos, la estructura 13 corresponde al peracetato de 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-fucopiranosil 3,23,28- trihidroxiolean-11,13(18)-dieno. El compuesto 14, según nuestros datos es el peracetato de la Buddlejasonina I aislada por Yamamoto *et al.* (1991) en forma libre y cuyo derivado acetilado fue identificado como peracetato de 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-fucopiranosil-saikogenina G; y el compuesto 15 es el peracetato de 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-fucopiranosil 3,16,23,28-tetrahidroxiolean-11,13(18)-dieno.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IV.3 –PARTE BIOLÓGICA.

IV.3.1 –ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS.

Se determinó la actividad antibacteriana de los extractos mediante la técnica de difusión en agar (Kirby-Bauer), la tabla 19 muestra los resultados obtenidos en los que se observa que sólo los extractos polares de las dos plantas presentaron actividad antibacteriana, y que este efecto sólo se presentó sobre las bacterias *S. aureus*, *S. boydii* y *V. cholerae*.

Tabla 19. Actividad Antibacteriana de los Extractos de *B. perfoliata* y *B. scordioides*.

BACTERIA	EXTRACTOS (Halos de inhibición en mm, 1 mg/disco)							C ⁺
	<i>B. perfoliata</i>				<i>B. scordioides</i>			
	BuOH	AcOEt	CH ₂ Cl ₂	Hexano	MeOH	AcOEt	Hexano	
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	17±0.5
<i>S. typhi</i>	-	-	-	-	-	-	-	16±0.5
<i>S. boydii</i>	8±0.5	-	-	-	9±0.5	-	-	17±0.5
<i>E. agglomerans</i>	-	-	-	-	-	-	-	16±0.5
<i>V. cholerae</i> CDC	10±0.5	-	-	-	11±0.5	-	-	17±0.5
<i>V. cholerae</i> INDRE	10±0.5	-	-	-	11±0.5	-	-	16±0.5
<i>V. cholerae</i> C. C.	10±0.5	-	-	-	11±0.5	-	-	16±0.5
<i>S. aureus</i>	14±0.5	-	-	-	16±0.5	-	-	16±0.5

C⁺=Control positivo (Kanamicina 30 µg)

Posteriormente, se realizó un seguimiento de la actividad durante la fase de separación de los componentes del extracto metanólico y butanólico; de ambos, se separó el verbascósido como único principio activo.

IV.3.2 –ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL VERBASCÓSIDO.

Al iniciar los bioensayos para determinar la actividad antimicrobiana de los extractos se usó la concentración de 1 mg/disco con base en lo recomendado en la literatura para evaluar la actividad antibacteriana de extractos vegetales (Vanden Berghe y Vlietnick, 1991); posteriormente, fue evidente que conforme se purificaba el compuesto activo se reducía la cantidad necesaria de sustancia para observar halos de inhibición. En las últimas fases de separación se necesitaron 400 µg/disco para detectar actividad antibacteriana contra las bacterias sensibles. En la tabla 20 se muestran los resultados la actividad antibacteriana del verbascósido utilizando la técnica de Kirby-Bauer.

Tabla 20.- Actividad antimicrobiana del verbascósido.

Bacteria	Actividad antimicrobiana (Halos de inhibición en mm)		
	Verbascósido 400 µg/disco	Kanamicina 30 µg	Control negativo
<i>E. coli</i>	-	17 ± 0.5	-
<i>S. typhi</i>	-	16 ± 0.5	-
<i>S. boydii</i>	9 ± 0.5	18 ± 0.5	-
<i>E. agglomerans</i>	-	16 ± 0.5	-
<i>V. cholerae CDCV12</i>	12 ± 0.5	20 ± 0.5	-
<i>V. cholerae INDRE</i>	12 ± 0.5	21 ± 0.5	-
<i>V. cholerae C.C.</i>	12 ± 0.5	20 ± 0.5	-
<i>S. aureus</i>	18 ± 0.5	16 ± 0.5	-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Una vez evaluada cualitativamente la actividad antibacteriana del verbascósido, se procedió a determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la bactericida mínima (CBM). Los resultados se muestran en la tabla 21.

Tabla 21.- Concentración Mínima Inhibitoria y Bactericida Mínima del Verbascósido

Bacteria	CMI (µg/ml)	CBM (µg/ml)
<i>V. cholerae</i> CDCV12	400	800
<i>V. cholerae</i> INDRE	400	800
<i>V. cholerae</i> C.C.	400	800
<i>S. aureus</i>	400	800
<i>S. boydii</i>	>800	-

Los resultados indican que las bacterias sensibles fueron *V. cholerae* y *S. aureus*. Cabe hacer notar que aunque en *S. boydii* se presentaron halos de inhibición, la concentración mínima inhibitoria para esta bacteria fue alta, además de que no se presentó efecto bactericida a dosis de 1600 µg/ml. Por otra parte, la CMI que se obtuvo para *S. aureus* concuerda con la reportada por Pardo, *et al.* (1993) para el verbascósido aislado de *Buddleja globosa*.

Se podría afirmar que el verbascósido presenta un espectro de actividad reducido (sólo algunas especies bacterianas fueron sensibles), y que su potencia es baja (CMI 400 µg/ml)

con relación a la mayoría de los antibióticos de uso clínico. De acuerdo con estos criterios, el verbascósido sería poco prometedor para realizarle más estudios tendientes a evaluar su posible uso terapéutico. Sin embargo, existen otros factores que se toman en cuenta para evaluar las potencialidades de una nueva sustancia antibacteriana. Actualmente, suele preferirse el uso de antibióticos que sean específicos, esto es, que sólo inhiban el crecimiento de las bacterias que están causando una infección y que dejen crecer a las bacterias comensales que proporcionan beneficios como la transformación de las vitaminas y otros metabolitos útiles para el ser humano. Por otra parte, la potencia (CMI y CBM) no es un factor determinante para evaluar la importancia de un antibiótico, la sustancia antibacteriana es importante si su índice terapéutico (que se la relación entre la dosis tóxica y la concentración mínima inhibitoria) es grande. No se le han realizado estudios de toxicología al verbascósido, además, en el presente trabajo no se evaluó su actividad sobre bacterias autóctonas del hombre, debido a ello, tendría que realizarse más investigación para determinar si esta sustancia pudiese tener posibilidades para ser usada como agente antibacteriano.

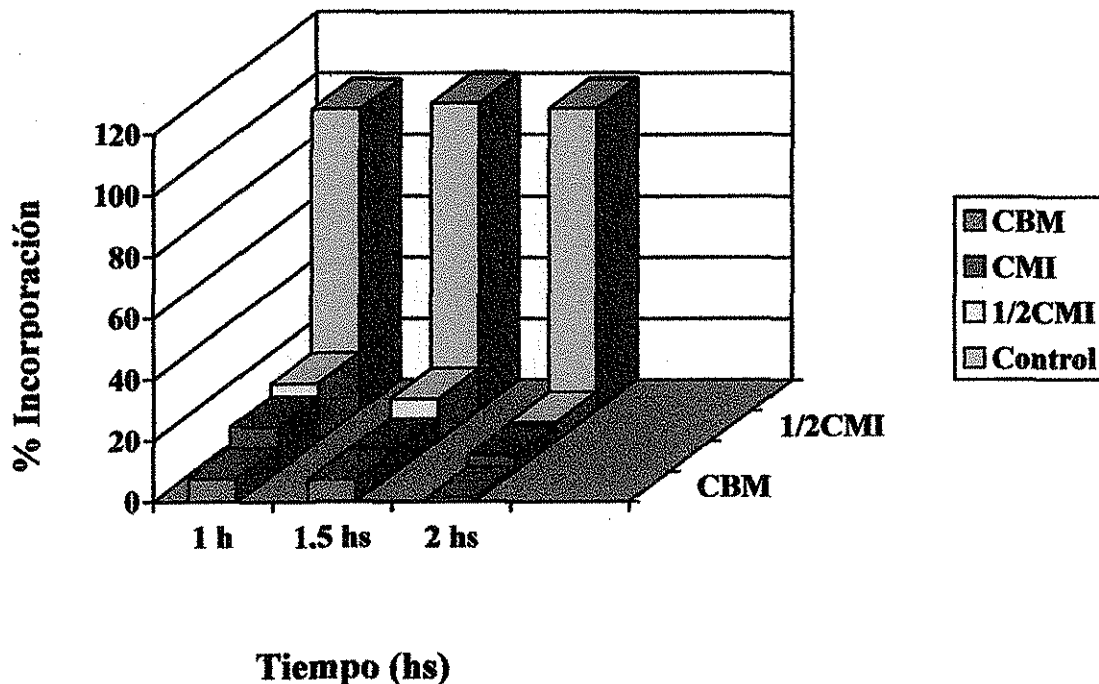
IV.3.3 –MODO DE ACCIÓN.

Los resultados de los experimentos de incorporación de precursores marcados se muestran en las gráficas 1 y 2, en ellas se observa que hay inhibición de la incorporación de leucina ^3H . Por otra parte, el acetato, la timidina y la uridina marcados fueron asimilados por las bacterias tratadas con verbascósido de manera similar al control (no se observó alteración de la incorporación). De acuerdo con esto, el modo de acción del verbascósido contra *S. aureus* y *V. cholerae*, es mediante la inhibición de la síntesis de proteínas puesto que la leucina es un metabolito importante para que se lleve a cabo dicha vía metabólica. En el

caso del efecto del verbascósido sobre *S. aureus* se observa una inhibición de la incorporación del 90-100% de leucina ^3H durante el intervalo de tiempo en el que se cuantificó la incorporación de este metabolito marcado, y en el caso de *V. cholerae* del 40-80%.

Gráfica 1

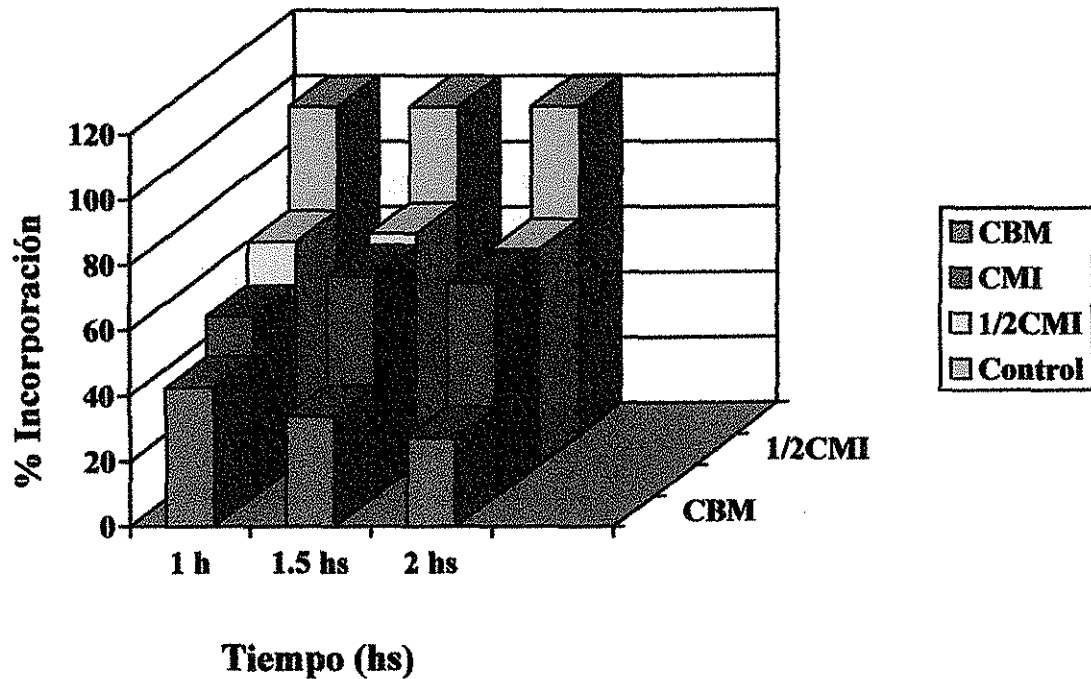
Efecto del verbascósido sobre la incorporación de leucina ^3H en *S. aureus*



El porcentaje de incorporación se calculó con base en la incorporación de leucina ^3H observada en los cultivos bacterianos sin verbascósido (control, n=5), comparada con la incorporación de leucina ^3H observada en los cultivos experimentales tratados con verbascósido (CBM=800 $\mu\text{g/ml}$; CMI=400 $\mu\text{g/ml}$; $\frac{1}{2}$ CMI=200 $\mu\text{g/ml}$; n=5 por cada concentración). La dosis de radioactividad a que fueron expuestos los cultivos fue de 0.1 $\mu\text{Ci/ml}$ y la cantidad de precursor incorporado lo proporcionó el equipo (número de cuentas por minuto, después de incubar 1 h, 1.5 hs y 2hs los cultivos bacterianos junto con el precursor).

Gráfica 2

Efecto del verbascósido sobre la incorporación de leucina ^3H en *V. cholerae*



El porcentaje de incorporación se calculó con base en la incorporación de leucina ^3H observada en los cultivos bacterianos sin verbascósido (control, n=5), comparada con la incorporación de leucina ^3H observada en los cultivos experimentales tratados con verbascósido (CBM=800 $\mu\text{g}/\text{ml}$; CMI=400 $\mu\text{g}/\text{ml}$; $\frac{1}{2}$ CMI=200 $\mu\text{g}/\text{ml}$; n=5 por cada concentración). La dosis de radioactividad a que fueron expuestos los cultivos fue de 0.1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ y la cantidad de precursor incorporado lo proporcionó el equipo (número de cuentas por minuto, después de incubar 1 h, 1.5 hs y 2hs los cultivos bacterianos junto con el precursor).

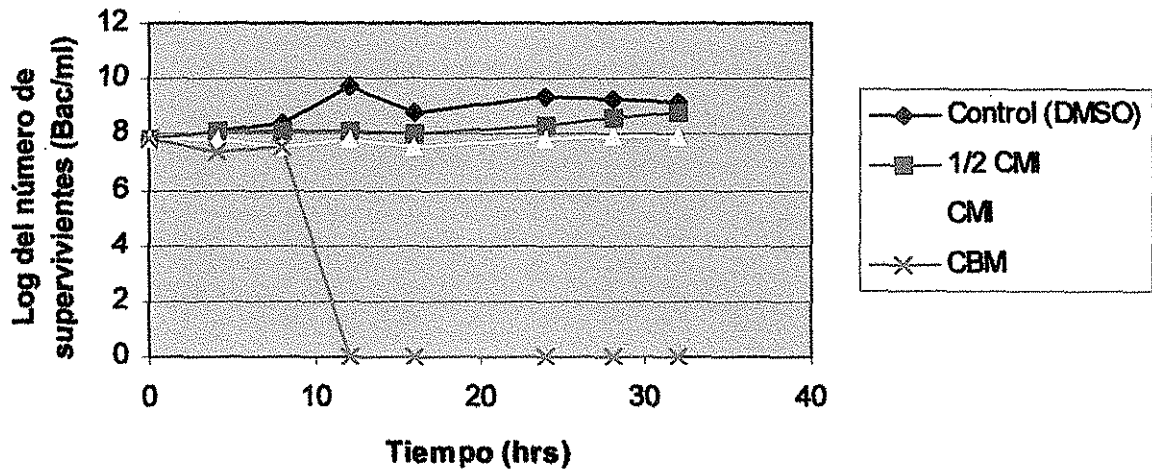
Cabe hacer notar que el modo de acción del verbascósido podría llevarse a cabo alterando el transporte de la leucina hacia el citoplasma bacteriano, o mediante un efecto directo sobre la síntesis de proteínas. Para determinar el sitio de acción del verbascósido se podrían proponer experimentos de autorradiografía utilizando verbascósido marcado radiactivamente para detectar el sitio diana. Los resultados de la autorradiografía podrían indicar si el verbascósido penetra hacia el citoplasma bacteriano; de no ser así, es probable que su actividad sea a nivel de membrana. Si el verbascósido penetra al citoplasma entonces podría detectarse el sitio de acción mediante técnicas de centrifugación diferencial y detección por centelleo líquido, de esta manera se podría dilucidar si el verbascósido interactúa con la fracción ribosomal o con otra fracción citoplásmica.

En cuanto al efecto del verbascósido sobre la población bacteriana de *S. aureus* y de *V. cholerae* (Gráficas 3 y 4), los experimentos de desafío mostraron que el compuesto provoca un efecto bacteriostático a dosis iguales a la CMI (se mantiene la población con relación al tiempo de exposición al verbascósido), pero a dosis iguales a la concentración bactericida mínima (CBM) se observa una curva de supervivencia del tipo de impactos múltiples (Davis y Dulbecco, 1996), en la cual antes de hacerse lineal con pendiente negativa presenta un comportamiento que pareciera no tener cambios significativos en cuanto al número de supervivientes, debido a que en cada organismo viable deben producirse varias alteraciones en alguna o algunas vías metabólicas (impactos) antes de que se pierda dicha viabilidad. Para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la inactivación, la técnica recomendada por la literatura (Davis y Dulbecco, 1996), consiste en prolongar la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su intersección con el eje de las ordenadas (extrapolando se observa que la cinética es de 10 impactos en el caso de *V. cholerae* y de aproximadamente 22 para *S. aureus*, ver Apéndice 5). Las curvas

correspondientes a la CBM muestran estos dos comportamientos: no se aprecia muerte celular significativa en las primeras horas de desafío incrementándose notablemente la letalidad a partir de las 6-8 horas (la pendiente es menor). Además, se observa que el efecto del verbascósido es específico puesto que las curvas de supervivencia que produce, no son similares a las que se observan en experimentos de desafío usando desinfectantes (como el formaldehído, los agentes tensioactivos, los ácidos aromáticos, los alcoholes y fenoles). Estos desinfectantes provocan curvas de supervivencia de tipo multicomponente generalmente diáuxicas o triáuxicas con tres o más rectas con pendientes diferentes y alguna de ellas con pendiente igual a cero (Harvey, 1982; Brul, 1999).

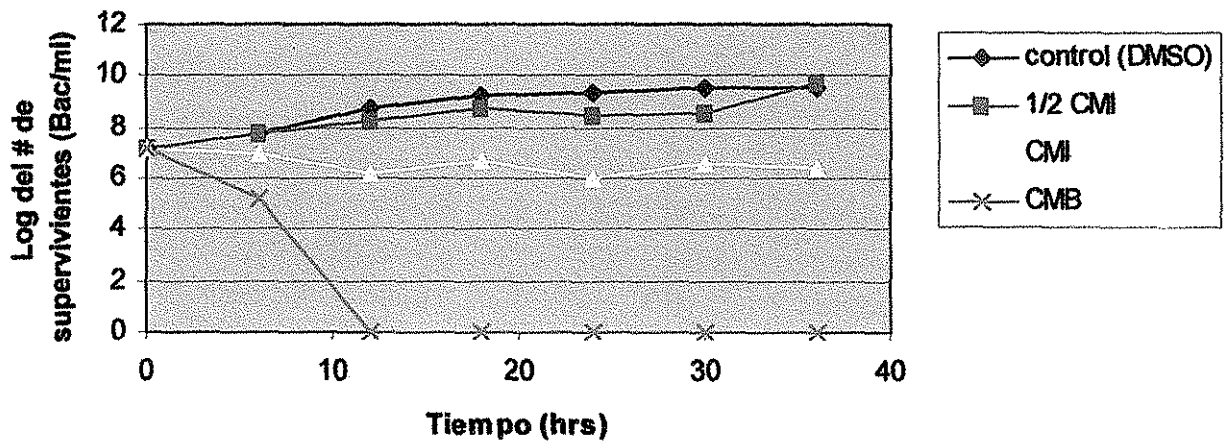
La acción bactericida del verbascósido podría generarse como consecuencia de lesiones irreparables en un número limitado de puntos de acción. Estos puntos de acción podrían ser todas las copias de un componente proteínico del sistema de síntesis de proteínas (incluidos los ribosomas), ya que para regenerar una proteína es necesario el propio sistema de síntesis y por lo tanto para que se produzca el fenómeno de muerte celular se requiere que se haya inactivado de manera irreversible una parte importante de dicho sistema y que se agoten las reservas. Los resultados de estos experimentos fueron publicados y el artículo se muestra al final de este trabajo.

Gráfica 3. Efecto del verbascósido sobre el número de supervivientes de *S. aureus*



El verbascósido fue adicionado a cada cultivo experimental en el tiempo 0: (CBM), 800 µg/ml; (CMI), 400 µg/ml; (1/2 CMI), 200 µg/ml; (control, sin verbascósido), 100µl DMSO. Cada experimento (n=3) se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones descritas en la Metodología General, el número de supervivientes se calculó mediante el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC).

Gráfica 4. Efecto del verbascósido sobre el número de supervivientes de *V. cholerae*.



El verbascósido fue adicionado a cada cultivo experimental en el tiempo 0: (CMB), 800 µg/ml; (CMI), 400 µg/ml; (1/2 CMI), 200 µg/ml; (control, sin verbascósido), 100µl DMSO. Cada experimento (n=3) se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones descritas en la Metodología General, el número de supervivientes se calculó mediante el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC).

Con base en los resultados obtenidos, *B. perfoliata* y *B. scordioides* poseen metabolitos secundarios que tienen propiedades antibacterianas contra algunas bacterias que son patógenas del tracto digestivo humano. Popularmente se usan infusiones o cocimientos acuosos de estas plantas para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. En el caso de *B. perfoliata*, la actividad antibacteriana de la infusión sería provocada por el verbascósido, aunque también por el α pineno cuya actividad antimicrobiana ya ha sido estudiada (Harvey, 1982), la presencia de ambos compuestos podría ejercer un efecto sinérgico que potencie el efecto antibacteriano.

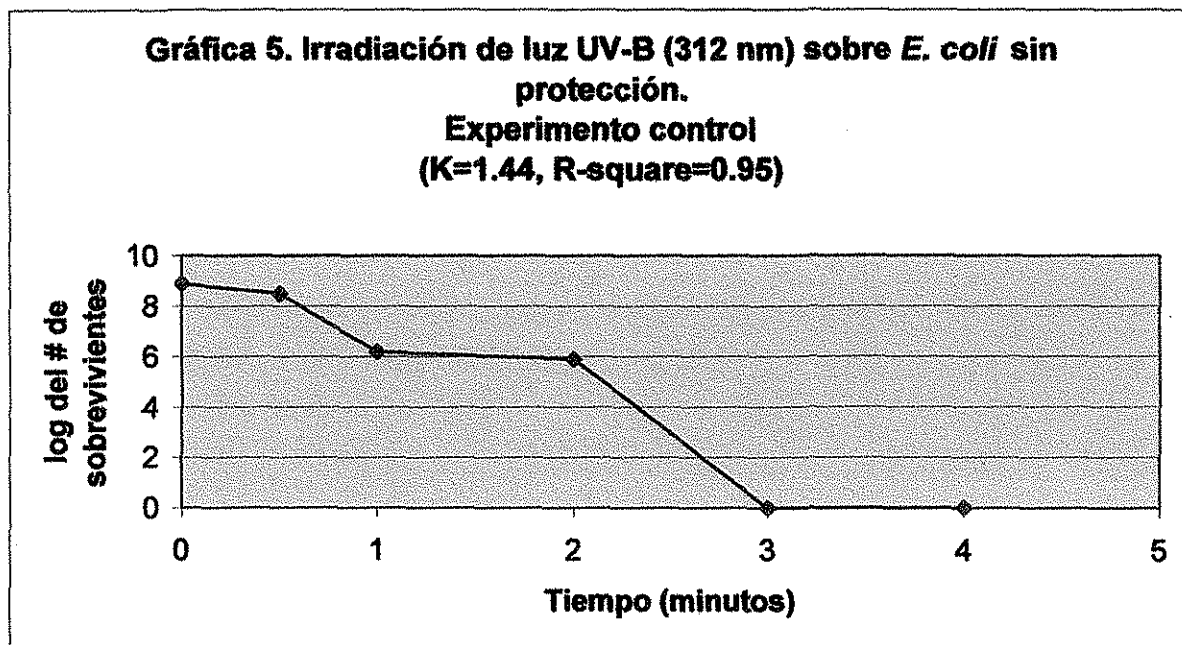
IV.3.4- ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA DE *B. perfoliata* y *B. scordioides*

IV.3.4.1- FOTOPROTECCIÓN DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE *B. perfoliata* y *B. scordioides* UTILIZANDO BACTERIAS.

Estos experimentos se realizaron para determinar si los extractos metanólicos de *B. perfoliata* y *B. scordioides*, protegían a un sistema biológico de la muerte celular provocada por la luz ultravioleta. El sistema biológico en este caso estuvo formado por poblaciones de similar número de individuos de la bacteria *Escherichia coli*.

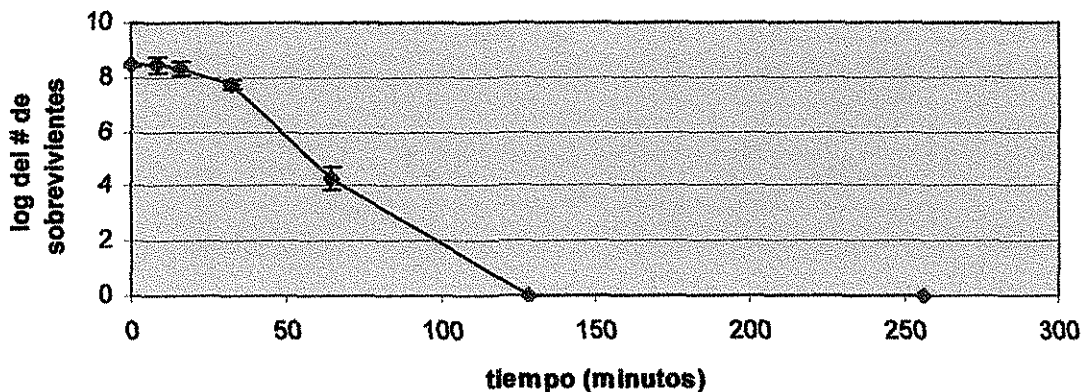
En primer lugar se evaluó el efecto fotoprotector de los extractos metanólicos de las plantas estudiadas (2 mg de sólidos por ml en la cubeta, Bissett, *et al.*, 1987) y del control positivo (escalol, 2 mg/ml en la cubeta) con relación a la muerte celular provocada por irradiación de luz UV-B sobre una población de bacterias sin protección (control negativo). En la gráfica 5 se observa que la población de bacterias no protegidas (control negativo) presentó mortalidad de toda la población con una dosis de 3 minutos de irradiación. En cambio, las bacterias protegidas con el control positivo (Escalol, gráfica 6), presentaron muerte celular

de toda la población en el intervalo de 60-120 minutos de irradiación, por otra parte, los extractos de *B. perfoliata* y *B. scordioides* (gráficas 7 y 8) protegieron a las poblaciones bacterianas hasta el intervalo de 32-64 minutos. Los resultados anteriores indican que el intervalo de tiempo que se requiere para eliminar a la población bacteriana no protegida fue significativamente menor a la de los protegidos, cabe hacer notar que en todos los casos la forma de las curvas (la cinética) fue similar a la reportada en la literatura cuando se utiliza luz UV-B como agente bactericida (Davis, 1996).



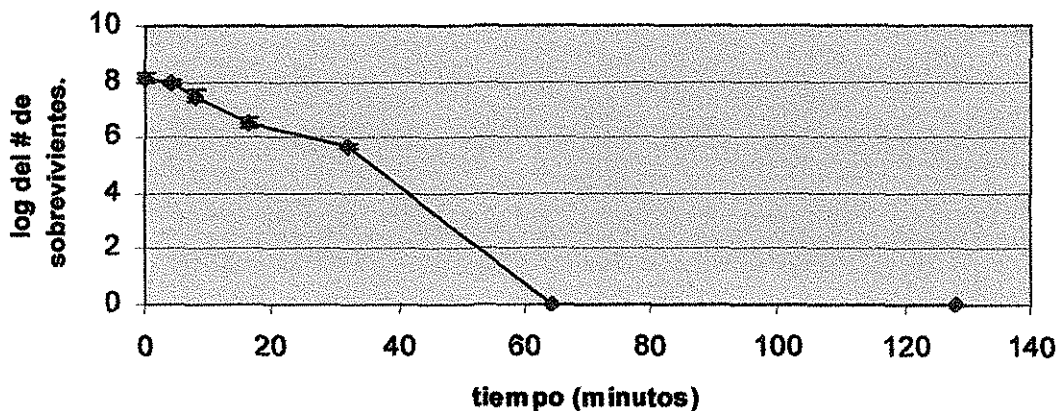
Curva de supervivencia de *E. coli* sometida a luz UV sin protección, el número de supervivientes se calculó mediante el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC). Los datos representan la media de tres experimentos (n=3).

Gráfica 6. Irradiación de luz UV-B (312 nm) sobre *E. coli* protegida con escalol.
(K= 0.060, R-square= 0.99)

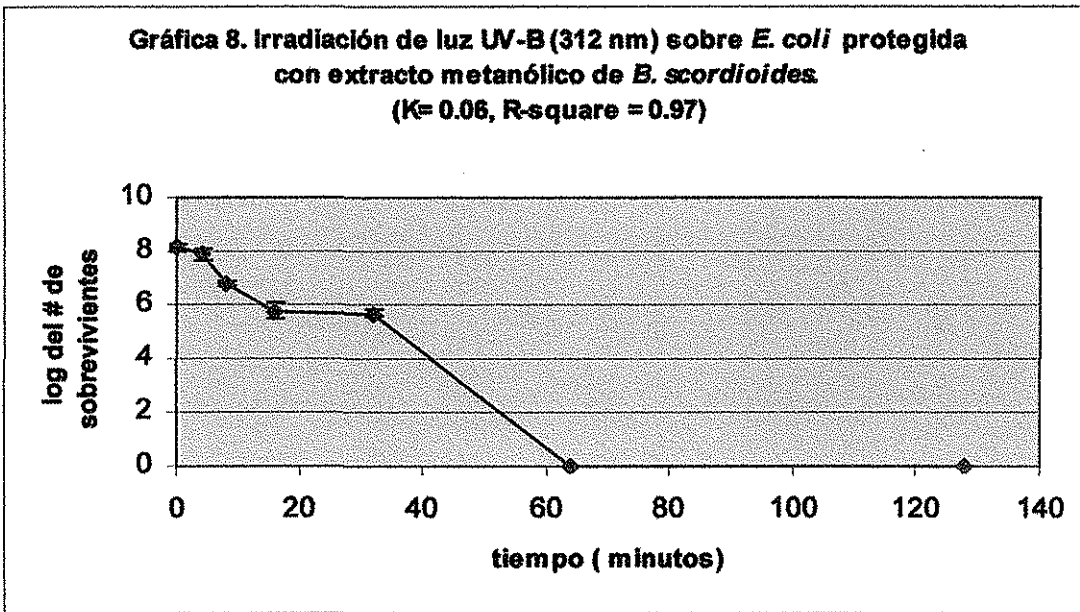


Curva de supervivencia de *E. coli* sometida a luz UV protegida con escalol (2 mg/ml), el número de supervivientes se calculó mediante el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC). Los datos representan la media de tres experimentos (n=3).

Gráfica 7 . Irradiación de luz UV-B (312) sobre *E. coli* protegida con extracto metanólico de *B. perfoliata*.
(K= 0.068, R-square= 0.99)



Curva de supervivencia de *E. coli* sometida a luz UV protegida con extracto metanólico de *B. perfoliata* (2 mg/ml), el número de supervivientes se calculó mediante el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC). Los datos representan la media de tres experimentos (n=3).



Curva de supervivencia de *E. coli* sometida a luz UV protegida con extracto metanólico de *B. scordioides* (2 mg/ml), el número de supervivientes se calculó mediante el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC). Los datos representan la media de tres experimentos (n=3).

En los cuatro casos se obtuvo la constante de mortalidad K (número de organismos muertos expresado en unidades logarítmicas por minuto), de acuerdo con esto, el control negativo (bacterias expuestas a la radiación sin protección) presentó una K (1.44) mayor a la del control positivo (Escalol, K= 0.060) y a la de los dos extractos (K= 0.06), quedando así demostrado el efecto fotoprotector de las sustancias evaluadas (Davis, 1996).

IV.3.4.2. FOTOPROTECCIÓN DE LOS COMPUESTOS QUE ABSORBEN EN LA REGIÓN DEL UV-B AISLADOS DE *B. perfoliata* y *B. scordioides* UTILIZANDO BACTERIAS.

Se aislaron dos compuestos que absorbían energía en la región de la luz UV-B: la linarina y el verbascósido, además, se preparó el acetato de linarina.

Primeramente se determinó el espectro de absorción en el UV-B de la linarina, el acetato de linarina y del verbascósido (tabla 22).

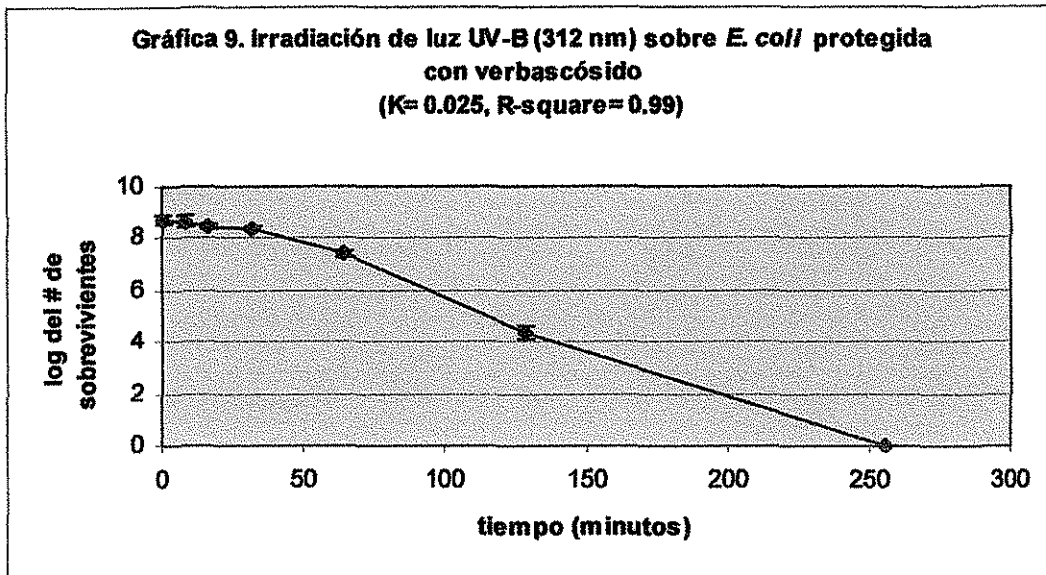
Tabla 22.- Coeficientes de extinción de los cromóforos aislados de las Buddlejas.

Compuesto	$\lambda_{\text{máx}}$	Coefficiente de Extinción
Linarina	334	18832
Acetato de linarina	320	32335
Verbascósido	291 y 332	26130 y 35113

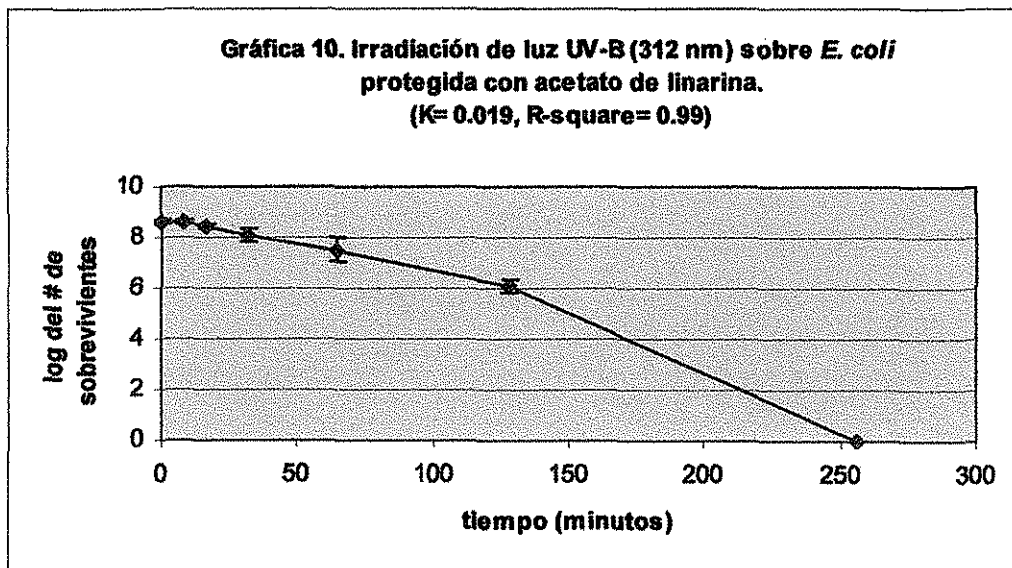
De acuerdo con estos datos, las tres sustancias tiene valores de coeficientes de extinción similares a los de las sustancias fotoprotectoras comerciales (Shaath, 1997). El acetato de linarina y la linarina absorben sobre el límite de la región del UV-B, el verbascósido tiene 2 máximos de absorción, y el área bajo la curva de su espectro ultravioleta cubre toda la región de UV-B.

En las gráficas 9 y 10 se muestra el efecto fotoprotector del verbascósido y del acetato de linarina, en ellas se observa que estos compuestos le confieren protección a las bacterias durante 32 minutos de exposición puesto que se mantienen las poblaciones bacterianas en número similar a la del inóculo inicial, a partir de este tiempo el número de células viables

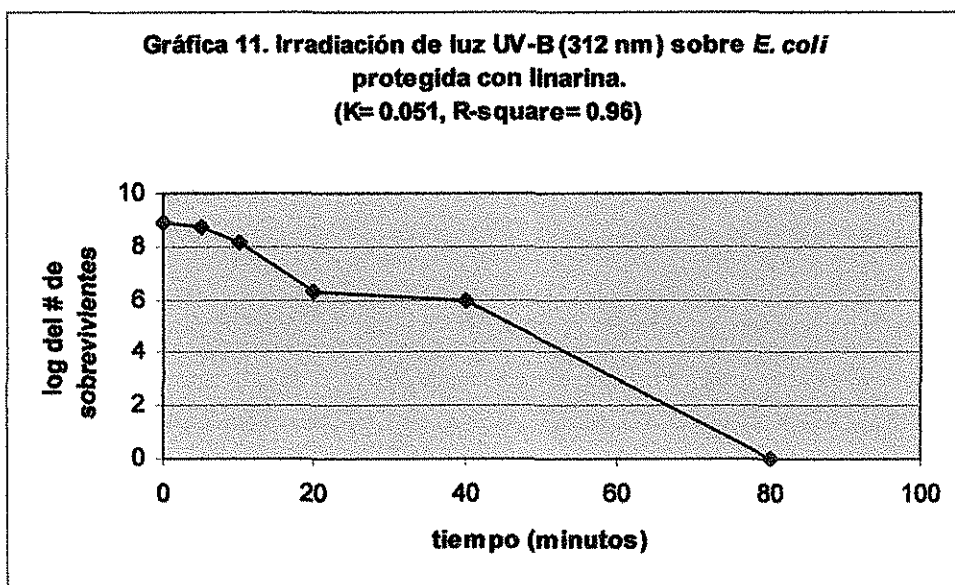
decrece hasta alcanzar la muerte ambas poblaciones bacterianas a los 256 minutos. Cuando se usó verbascósido como agente fotoprotector la constante de mortalidad (K) calculada fue de 0.025 y en el caso del acetato de linarina fue de 0.019, estos valores fueron menores con relación a las constantes de mortalidad obtenidas para el control negativo (gráfica 5), el escalol (gráfica 6) y los extractos metanólicos (gráficas 7 y 8); por lo tanto se considera que el efecto fotoprotector del verbascósido y del acetato de linarina fue significativamente mayor. Por otra parte, las bacterias protegidas con linarina (gráfica 11) sobreviven en un número similar al inóculo durante 10 minutos de irradiación, a partir de este tiempo existe una reducción drástica del número de sobrevivientes hasta los 20 minutos estabilizándose durante los siguientes 20 minutos (40 minutos de irradiación). A partir de este tiempo y hasta los 80 minutos hay muerte celular de toda la población. La constante de mortalidad K en este caso fue de 0.051. En estas pruebas de desafío se observó que la linarina presenta un efecto fotoprotector menor que el obtenido con su acetato y con el verbascósido, este hecho probablemente se deba a que la linarina tiene un coeficiente de extinción menor que aquellos y un máximo de absorción en 334 nm (fuera de la zona de UV-B) y la lámpara que se utilizó para realizar estos experimentos irradia principalmente luz UV con una λ máx. de 312 nm.



Curva de supervivencia de *E. coli* sometida a luz UV protegida con verbascósido (2 mg/ml), el número de supervivientes se calculó mediante el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC). Los datos representan la media de tres experimentos (n=3).



Curva de supervivencia de *E. coli* sometida a luz UV protegida con acetato de linarina (2 mg/ml), el número de supervivientes se calculó mediante el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC). Los datos representan la media de tres experimentos (n=3).



Curva de supervivencia de *E. coli* sometida a luz UV protegida con linarina (2 mg/ml), el número de supervivientes se calculó mediante el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC). Los datos representan la media de tres experimentos (n=3).

IV.3.4.3- DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR (FPS) EN CUYOS.

Primeramente, se determinó la dosis de irradiación para producir el mínimo eritema perceptible (también conocido como dosis eritematogénica mínima, DEM), y así iniciar los experimentos de desafío. De acuerdo con estas evaluaciones, los cuyos (n=5) presentan eritema mínimo perceptible (DEM) a los 20 minutos de exposición a la radiación.

Se realizaron los experimentos de acuerdo al modelo propuesto por Bissett (1991) y según los resultados que se muestran en la tabla 23, se observa que el verbascósido confiere un FPS de 24, la linarina de 9 y el acetato de linarina de 5. De acuerdo con estos resultados, el verbascósido proporciona buena fotoprotección puesto que presenta un factor de protección solar superior a 15 (Pathak, 1992). Cabe hacer notar que aunque la linarina y su acetato presentan buenos coeficientes de extinción, su factor de protección solar (FPS) fue

relativamente bajo, esto podría deberse a la sustantividad de estos compuestos. Los extractos metanólicos de ambas plantas tuvieron los valores de FPS menores, probablemente debido a la baja concentración de las sustancias fotoprotectoras.

Tabla 23.- Determinación del FPS en Cuyos.

Sustancia (2 mg/cm ²)	FPS	Tiempo de Exposición sin Eritema (min)
Extracto Metanólico de <i>B. scordioides</i>	3	40
Extracto Metanólico de <i>B. perfoliata</i>	3	40
Verbascósido	24	440
Linarina	9	160
Acetato de linarina	5	8
Escalol	5	80

Se realizó la prueba no paramétrica de Friedman para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos (los extractos, los compuestos fotoprotectores aislados de las *Buddlejas*, y el control positivo). Efectivamente, existieron diferencias significativas entre los tratamientos, o sea, cada sustancia protege de manera diferente con relación al tiempo de exposición. La prueba de Wilcoxon se utilizó para evaluar si existían diferencias significativas entre el control (la ventana sin protección, # 1) y cada uno de las sustancias dentro de cada tratamiento. De acuerdo a los resultados del análisis estadístico, el verbascósido protege de la aparición de eritema hasta un tiempo correspondiente a los 22 DME, la linarina confiere protección de 8 DME, el acetato de linarina de 4 DME, y los extractos de ambas plantas 2 DME (tabla 24).

Tabla 24.- Resultados de las pruebas de Wilcoxon y Friedman.

I		II		III		IV		V		VI	
Prueba de Wilcoxon:											
DEM	P	DME	P	DME	P	DME	P	DME	P	DME	P
1-2	0.046*	1-2	0.046*	1-2	0.025*	1-2	0.025*	1-2	0.025*	1-2	0.025*
1-3	0.083	1-3	0.083	1-4	0.025*	1-4	0.046*	1-4	0.025*	1-4	0.025*
1-4	0.083	1-8	0.083	1-8	0.025*	1-8	0.025*	1-8	0.317	1-5	0.083
1-5	0.157	1-16	0.157	1-16	0.025*	1-9	0.157	1-16	0.500	1-8	0.083
1-7	0.157	1-20	0.157	1-22	0.025*	1-18	0.157	1-20	0.500		
				1-24	0.083	1-26	0.317				
				1-32	0.083	1-32	0.059				
*Diferencia significativa (p< 0.05)											
Prueba de Friedman:											
I		II		III		IV		V		VI	
$\chi^2=10.78$ p<0.05		$\chi^2=10.78$ p<0.05		$\chi^2=37.35$ p<0.005		$\chi^2=28.27$ p<0.005		$\chi^2=28.27$ p<0.005		$\chi^2=28.27$ p<0.005	

I: Extracto metanólico de *B. perfoliata*
 II: Extracto metanólico de *B. scordioides*
 III: Verbascósido
 IV: Linarina
 V: Acetato de Linarina
 VI: Escalol

1= control (ventanas sin protección), equivalente a 1 DEM.
 2 en adelante hasta 32= ventanas experimentales (con protección) equivalente a 2,3,4.....32 DEM.

IV.4- ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.

Se irradió la parte dorsal de los cuyos a dosis que correspondieron a 1 DEM, 2 DEM, 3 DEM etc., hasta la dosis correspondiente al valor de FPS obtenido para cada sustancia fotoprotectora, y se comparó con un control negativo (sin protección). Se utilizó la técnica histológica estándar para evaluar el daño producido por la radiación UV-B en la piel con y sin protección. Los resultados son los siguientes (Tablas 25-31):

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 25.- Evaluación Histopatológica de Piel Irradiada con Luz UV-B Sin Protección.

TIPO	1 DEM Sin prot.
Lesión	Dermatitis
Grado *	++++
Extensión	Multifocal
Curso	Aguda
Ortoqueratinización QUERATINIZACIÓN Paraqueratinización	+
	-
** Infiltrados Mononucleares	Macrófagos
	Linfocitos
** Infiltrados Polimorfonucleares Células eosinofílicas	+
	-
*Vasos sanguíneos	Neutrófilos
	Células eosinofílicas
Congestión	+
	Hemorragia
Proliferación Epitelial	-
	+
*Otras	Normal
	Necrosis
	Úlceras
	Ámpulas
	-
	+
	+++

*Edema: (+) muy leve; (++) leve; (+++) moderado; (++++) severo.

** Cantidad de células: (+) escasas; (++) representativas; (+++) gran cantidad.

Tabla 26.- Evaluación Histopatológica de Piel Irradiada con Luz UV-B y Protegida con Escalol.

TIPO	1 DEM Sin prot.	1 DEM Con prot.	2 DEM Sin prot.	2 DEM Con prot.	4 DEM Sin prot.	4 DEM Con prot.
Lesión	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis
Grado *	+++	-	+++	+	+++	++
Extensión	Multifocal	Difusa	Difusa	Difusa	Focal	Difusa
Curso	Aguda	Aguda	Aguda	Aguda	Aguda	Aguda
Ortoqueratinización	+	+	+	+	+	+
	-	-	-	-	-	-
QUERATINIZACIÓN						
Paraqueratinización						
** Infiltrados Mononucleares	Macrófagos	+	+	+	++	++
	Linfocitos	-	-	-	-	-
** Infiltrados Polimorfonucleares	Neutrófilos	-	-	-	-	-
	Células eosinofílicas	+	-	-	+	+++
*Vasos sanguíneos	Congestión	-	-	+	-	+
	Hemorragia	-	-	+	-	-
Proliferación Epitelial	Normal	-	+	-	-	-
	Anormal	+	-	+	+	+
*Otras	Necrosis	-	-	-	-	+
	Úlceras	-	-	-	-	+
	Ámpulas	-	-	-	-	-

*Edema: (+) muy leve; (++) leve; (+++) moderado; (++++) severo.

** Cantidad de células: (+) escasas; (++) representativas; (+++) gran cantidad.

Tabla 27.- Evaluación Histopatológica de Piel Irradiada con Luz UV-B y Protegida con Extracto Metanólico de *B. scordioides*

TIPO	1 DEM Sin prot.	1 DEM Con prot.	2 DEM Sin prot.	2 DEM Con prot.
Lesión	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis
Grado *	++	+	+++	++
Extensión	Difuso	Difuso	Difuso	Difuso
Curso	Aguda	Aguda	Aguda	Aguda
Ortoqueratinización QUERATINIZACIÓN Paraqueratinización	+	+	+	+
	-	-	-	-
Macrófagos ** Infiltrados Mononucleares Linfocitos	+	-	+	+
	-	-	-	-
Neutrófilos ** Infiltrados Polimorfonucleares Células eosinofílicas	-	-	-	-
	-	-	+	-
Congestión *Vasos sanguíneos Hemorragia	+	-	+	-
	-	-	+	-
Normal Proliferación Epitelial Anormal	-	+	-	+
	+	-	+	-
*Otras Úlceras Ámpulas	-	-	+	-
	+	-	+	-
	-	-	-	-

*Edema: (+) muy leve; (++) leve; (+++) moderado; (++++) severo.

** Cantidad de células: (+) escasas; (++) representativas; (+++) gran cantidad.

Tabla 28.- Evaluación Histopatológica de Piel Irradiada con Luz UV-B y Protegida con Extracto Metanólico de *B. perfoliata*.

TIPO	1 DEM Sin prot.	1 DEM Con prot.	2 DEM Sin prot.	2 DEM Con prot.
Lesión	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis
Grado *	+++	+	+++	+
Extensión	Difuso	Difuso	Difuso	Difuso
Curso	Aguda	Aguda	Aguda	Aguda
Ortoqueratinización	+	+	+	+
QUERATINIZACIÓN Paraqueratinización	-	-	-	-
** Infiltrados Mononucleares				
Macrófagos	+	+	+	-
Linfocitos	-	-	-	-
** Infiltrados Polimorfonucleares				
Neutrófilos	-	-	-	-
Células eosinofílicas	-	-	++	-
*Vasos sanguíneos				
Congestión	-	-	++	-
Hemorragia	-	-	+	-
Proliferación Epitelial				
Normal	-	-	-	+
Anormal	+	+	+	-
*Otras				
Necrosis	+	-	-	-
Úlceras	-	+	-	-
Ámpulas	-	-	-	-

*Edema: (+) muy leve; (++) leve; (+++) moderado; (++++) severo.

** Cantidad de células: (+) escasas; (++) representativas; (+++) gran cantidad.

Tabla 29.- Evaluación Histopatológica de Piel Irradiada con Luz UV-B y Protegida con Acetáto de Linarina.

TIPO	1 DEM Sin prot.	1 DEM Con prot.	2 DEM Sin prot.	2 DEM Con prot.	4 DEM Sin prot.	4 DEM Con prot.
Lesión	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis
Grado *	+++	+	++	+	+++	++
Extensión	Difuso	Difuso	Difuso	Difuso	Difuso	Difuso
Curso	Aguda	Aguda	Aguda	Aguda	Aguda	Aguda
Ortoqueratinización QUERATINIZACIÓN Paraqueratinización	+	+	+	+	+	+
	-	-	-	-	-	-
Macrófagos ** Infiltrados Mononucleares Linfocitos	-	-	+	-	++	++
	-	-	-	-	-	-
Neutrófilos ** Infiltrados Polimorfonucleares Células eosinofílicas	-	-	-	-	-	-
	-	+	-	+	-	-
Congestión *Vasos sanguíneos Hemorragia	+	-	++	-	++	-
	-	-	-	-	-	-
Normal Proliferación Epitelial Anormal	+	-	+	+	-	+
	-	+	-	-	+	-
*Otras Necrosis Úlceras Ámpulas	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	+	-
	-	-	-	-	+	-

*Edema: (+) muy leve; (++) leve; (+++) moderado; (++++) severo.

** Cantidad de células: (+) escasas; (++) representativas; (+++) gran cantidad.

Tabla 30.-Evaluación Histopatológica de Piel Irradiada con Luz UV-B y Protegida con Linarina.

TIPO	1 DEM Sin prot.	1 DEM Con prot.	2 DEM Sin prot.	2 DEM Con prot.	4 DEM Sin prot.	4 DEM Con prot.	8 DEM Sin prot.	8 DEM Con prot.
Lesión	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis
Grado *	++	+	+++	+	+++	+	++++	++
Extensión	Difusa	Difusa	Difusa	Difusa	Focal	Difusa	Focal	Difusa
Curso	Aguda	Aguda	Aguda	Aguda	Aguda	Aguda	Aguda	Aguda
Ortoqueratinización QUERATINIZACIÓN Paraqueratinización	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	-	-	-	-	-	-	-
** Infiltrados Macrófagos Mononucleares Linfocitos	++	-	+	-	++	+	++++	+
	-	-	-	-	++	+	-	-
** Infiltrados Neutrófilos Polimorfonucleares Células eosinofílicas	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	-	+++	-	+++	-	+++	-
*Vasos sanguíneos Congestión Hemorragia	-	-	-	-	++	+	+++	-
	-	-	-	-	++	-	++	-
Proliferación Epitelial	Normal	+	+	+	+	+	+	+
	Anormal	-	-	-	-	-	-	-
Otras	Necrosis	-	-	-	-	-	-	-
	Úlceras	-	-	-	-	+	+	++
	Ámpulas	-	-	-	-	-	-	-

*Edema: (+) muy leve; (++) leve; (+++) moderado; (++++) severo.

** Cantidad de células: (+) escasas; (++) representativas; (+++) gran cantidad.

Tabla 31.-Evaluación Histopatológica de Piel Irradiada con Luz UV-B y Protegida con Verbascósido.

TIPO	1 DEM Sin prot.	1 DEM Con prot.	6 DEM Sin prot.	6 DEM Con prot.	11 DEM Sin prot.	11 DEM Con prot.	22 DEM Sin prot.	22 DEM Con prot.
Lesión	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis	Dermatitis
Grado *	+++	+	+++	++	++++	+	++++	+
Extensión	Focal	Difuso	Difuso	Difuso	Multifocal	Difuso	Multifocal	Difuso
Curso	Aguda	Aguda	Aguda	Aguda	Aguda	Aguda	Aguda	Aguda
Ortoqueratinización	+	+	+	+	+	+	+	+
Queratinización	-	-	-	-	-	-	-	-
Paraqueratinización	-	-	-	-	-	-	-	-
** Infiltrados Mononucleares								
Macrófagos	+	+	+	+	+++	+	++++	+
Linfocitos	-	-	-	-	-	-	-	-
** Infiltrados Polimorfonucleares								
Neutrófilos	-	+	-	+	-	-	-	-
Células eosinofílicas	++	+	-	-	+++	-	+++	+
*Vasos sanguíneos								
Congestión	-	-	-	-	-	-	+++	-
Hemorragia	-	-	-	-	-	-	++-	-
Proliferación Epitelial								
Normal	-	+	-	-	-	-	+	+
Anormal	+	-	+	-	+	-	-	-
*Otras								
Necrosis	-	-	-	-	-	-	-	-
Úlceras	-	-	-	+	-	-	+++	-
Ámpulas	++	-	-	-	+	-	++++	-

*Edema: (+) muy leve; (++) leve; (+++) moderado; (++++) severo.

** Cantidad de células: (+) escasas; (++) representativas; (+++) gran cantidad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

De acuerdo con el análisis histopatológico, todos los tejidos presentaron algún grado de dermatitis, probablemente esto se debió al manejo de los animales durante el experimento, sin embargo, los tejidos no protegidos presentaron comportamiento inflamatorio diferente, en ellos se observó un edema mayor representado por la extensión que en la mayoría fue de tipo focal o multifocal con grado de edema de leve a severo. Este tipo de dermatitis se manifiesta en la epidermis como edema extra e intra celular, con vacuolización, en algunos cortes se observa separación del estrato córneo debido a la presencia de líquido (ámpulas), y también úlceras. En la dermis el daño debido a la irradiación con luz UV-B se manifiesta por una mayor presencia de células eosinofílicas (que pueden ser eosinófilos y/o células cebadas) y macrófagos. Cabe hacer notar que también algunos de los tejidos no protegidos mostraron congestión de vasos sanguíneos y extravasación de eritrocitos.

Los tejidos de los animales protegidos presentaron diferencias con relación a los de los animales no protegidos, sobresalen los tejidos protegidos con verbascósido, puesto que aunque estos animales recibieron dosis de radiación altas no se observa la presencia de edema epitelial, ni una presencia importante de células que indican inflamación como son los macrófagos y las células eosinofílicas.

En todos los casos no se observaron cambios importantes en la queratinización, los tejidos presentaron orto-queratinización que es la normal, esto es no se observó la presencia de células con núcleo en el estrato córneo.

La evidencia foto-microscópica más representativa de los resultados del estudio histopatológico se muestra en las figuras 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20.

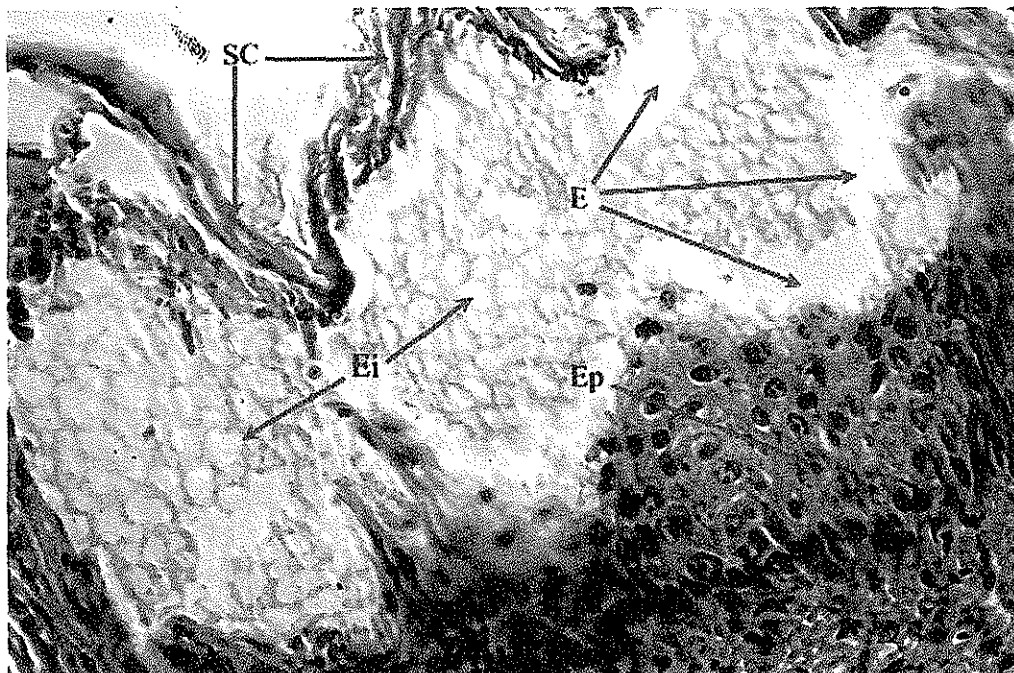


Figura 14.- Piel de cuyo sin protección y expuesta a 1 DEM. Se observa la epidermis (Ep) con edema (E), edema intracelular o vacuolización (Ei), separación del *stratum corneum* (SC) y la dermis (D). Tinción H y E, 400X.

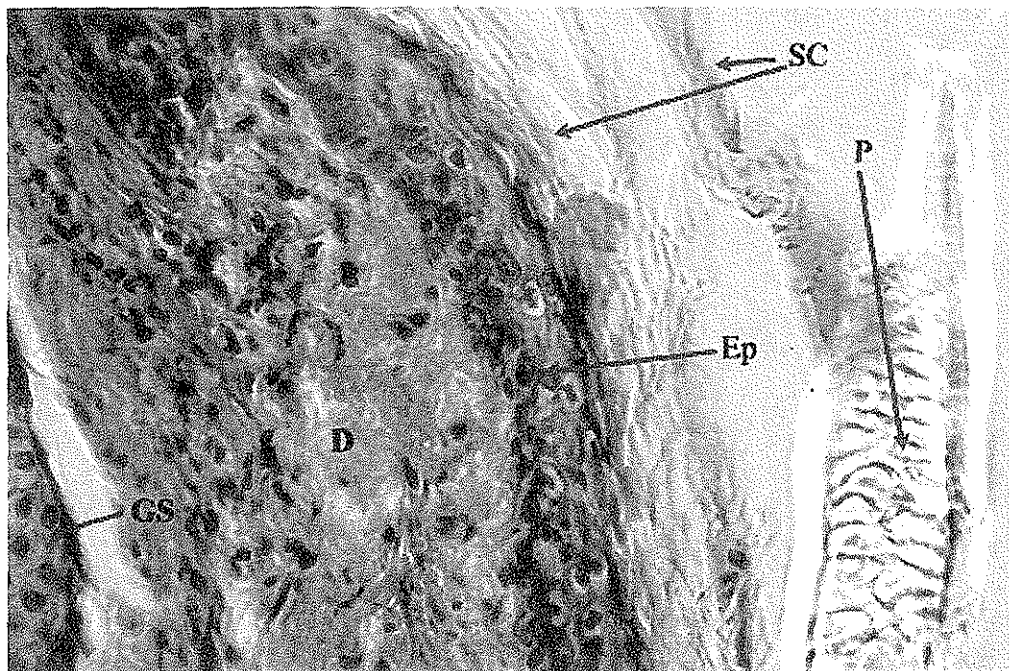


Figura 15.- Piel de cuyo protegida con extracto metanólico de *B. scordioides* y expuesta a 2 DEM. No se observa daño histológico importante. Clave: epidermis (Ep), pelo (P), *stratum corneum* (SC), dermis y glándula sebácea (GS). Tinción H y E, 400X.

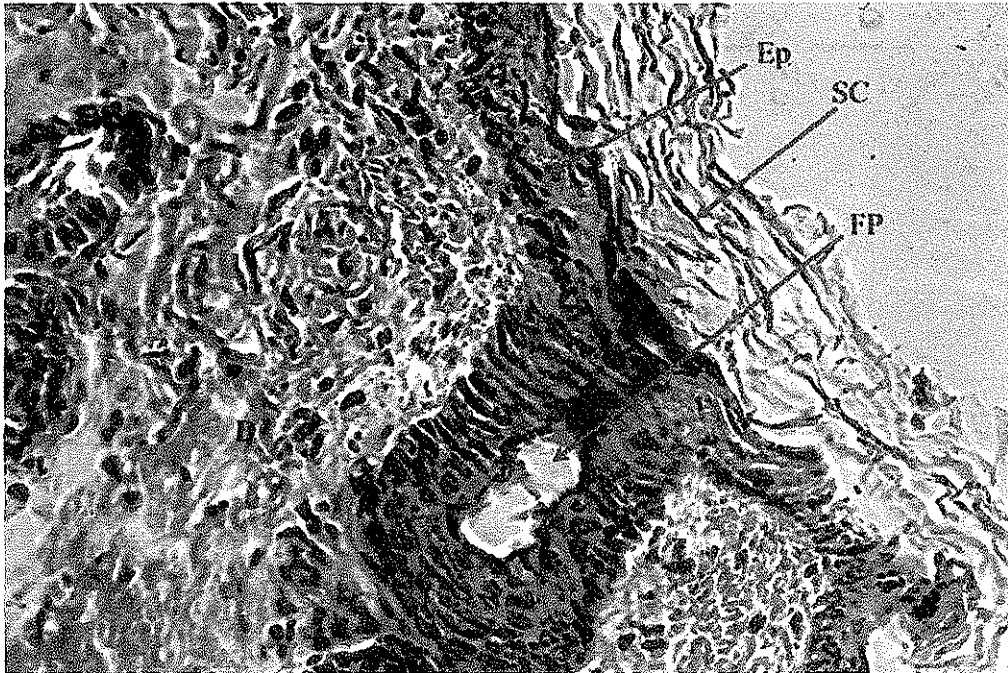


Figura 16.- Piel de cuyo protegida con extracto metanólico de *B. perfoliata* y expuesta a 2 DEM. No se observa daño histológico importante. Clave: epidermis (Ep), *stratum corneum* (SC), folículo piloso (FP) y dermis (D). Tinción H y E, 400X.

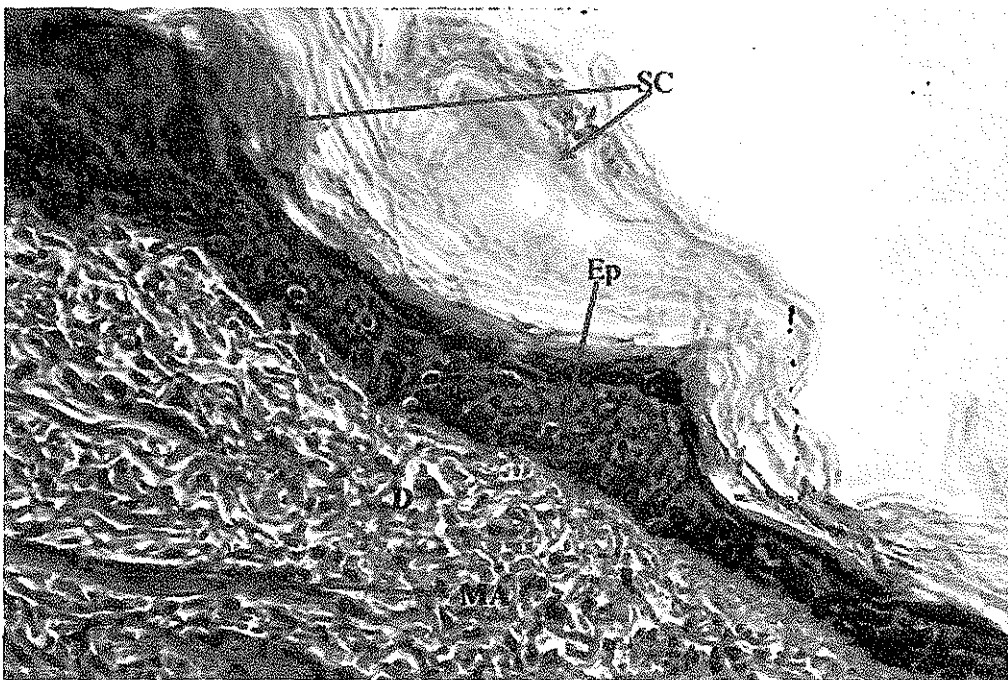


Figura 17.- Piel de cuyo protegida con Escalol y expuesta a 4 DEM. No se observan daños histológicos importantes. Clave: epidermis (Ep), dermis (D), *stratum corneum* (SC), y músculo aductor del pelo (MA). Tinción H y E, 400X.

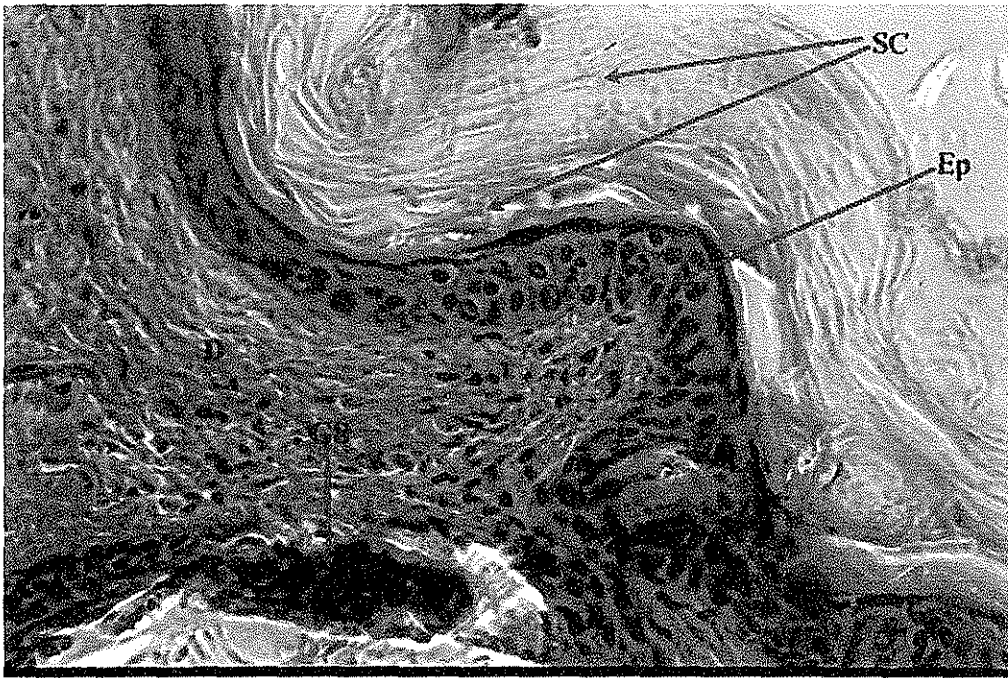


Figura 18.- Piel de cuyo protegida con Acetato de linarina y expuesta a 4 DEM. No se observa daño histológico. Clave: Epidermis (Ep), Dermis (D), *stratum corneum* (SC), y glándula sebácea (GS). Tinción H y E, 400X.



Figura 19.- Piel de cuyo protegida con Linarina y expuesta a 8 DEM. No se observa daño histológico en la epidermis (Ep), se observa separación del *stratum corneum* (SC) por efecto mecánico, la dermis (D) se distingue normal, además, se observa un folículo piloso (FP). Tinción H y E, 400X.

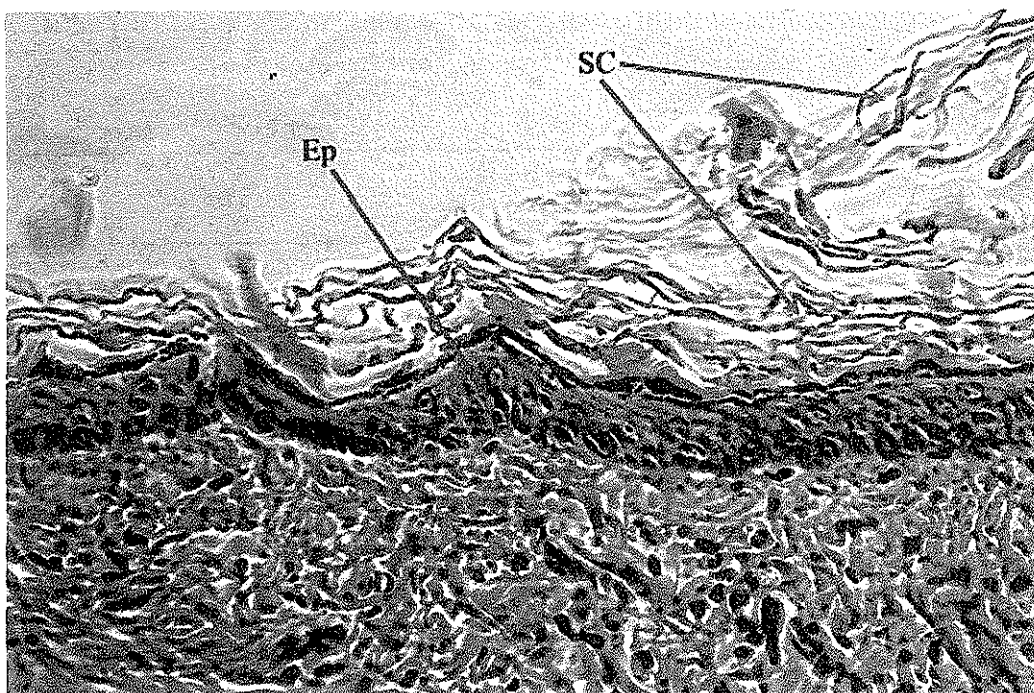


Figura 20.- Piel de cuyo protegida con verbascósido expuesta a 22 DEM, no se observa daño histológico importante en la epidermis (EP), ni en el *stratum corneum* (SC), en la dermis (D) se distinguen algunas células eosinofílicas. Tinción H y E, 400X.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos de evaluación de la fotoprotección, el uso popular de *B. scordioides* como filtro solar queda justificado. Los extractos polares de esta planta presentan verbascósido y linarina que proporcionaron foto protección comparable con la de las sustancias fotoprotectoras comerciales, además, también estos extractos contienen saponinas que junto con la linarina podrían coadyuvar a reducir los síntomas de la quemadura solar puesto que ambas sustancias tienen propiedades antiinflamatorias (Martínez-Vázquez, 1997; Benito *et al.*, 1998). El FPS de 3 como el que se obtuvo para el extracto metanólico de *B. scordioides* se considera moderado; cabe hacer notar que los preparados herbales que utiliza la gente pudieran ser similares en composición (la gente prepara cocimientos acuosos ó macerados hidroalcoholicos) al utilizado en los

experimentos. Las personas que usan la planta trabajan en el campo y generalmente son morenos (piel tipo III ó IV según Pathak, 2000), por lo tanto, para este tipo de piel, la fotoprotección que proporciona los cocimientos acuosos y/o los macerados hidroalcoholicos de *B. scordioides* podrían ser suficientes para prevenir la quemadura solar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES DE LA INVESTIGACIÓN

V- CONCLUSIONES

De las plantas *B. perfoliata* y *B. scordioides* se aislaron compuestos que son comunes para el género *Buddleja* como la linarina y el verbascósido.

De *B. scordioides*, se aislaron manitol, o-metilcatalpol y syringina. Esta última se reporta por vez primera en el género *Buddleja*.

A *B. perfoliata* no se le aislaron saponinas y es probable que esta especie no sintetice este tipo de compuestos.

La *B. scordioides* que se investigó presenta saponinas derivadas del oleanano, los compuestos de este tipo que se aislaron fueron: la Buddlejasaponina I; el 3-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-fucopiranosil 3,23,28-trihidroiolean-11,13(18)-dieno; y el 3-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-fucopiranosil 3,16,23,28-tetrahidroiolean-11,13(18)-dieno. Las tres sustancias se aislaron como peracetatos, aunque previamente se tuvieron los datos de IR, RMN y EM de la mezcla de sustancias libres, además, se obtuvieron las agliconas mediante hidrólisis.

Los extractos metanólicos de ambas plantas presentaron actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *V. cholerae*.

El compuesto activo antibacteriano fue el verbascósido, cuyo efecto letal contra las bacterias es mediante la inhibición de la incorporación de la leucina y con esto su modo de acción es la alteración de la síntesis proteínica.

Los extractos metanólicos de ambas plantas presentaron una moderada fotoprotección cuando se evaluó esta actividad en los modelos empleados.

Los compuestos aislados de ambas plantas y que presentaron efecto fotoprotector en la región del UV-B fueron el verbascósido y la linarina, además, se preparó en el laboratorio el acetato de linarina cuya actividad fotoprotectora también fue evaluada.

El verbascósido presentó el mayor efecto fotoprotector de las sustancias evaluadas, protegiendo de más dosis de irradiación a las bacterias y obteniendo un FPS de 24 en el modelo usando cuyos.

Los resultados del estudio histopatológico confirmaron los resultados obtenidos en los estudios de determinación del FPS, esto es, no se evidenció daño histológico importante en los tejidos protegidos con las sustancias fotoprotectoras aisladas, en cambio los tejidos no protegidos presentaron daño principalmente en la epidermis.

De acuerdo con los resultados, *B. perfoliata* y *B. scordioides* poseen actividad antibacteriana debido a la presencia de verbascósido; además, *B. perfoliata* presenta en su aceite esencial casi exclusivamente α pineno que tiene propiedades antisépticas, por lo

tanto, su uso popular como agente antimicrobiano contra enfermedades gastrointestinales de origen infeccioso queda justificado.

Popularmente se usan extractos acuosos ó hidroalcoholicos de *B.scordioides* como agentes fotoprotectores para prevenir la quemadura solar, los resultados obtenidos confirman este hecho, puesto que aunque en los resultados se observó una moderada fotoprotección del extracto metanólico de *B. scordioides* (FPS= 3), la presencia de verbascósido junto con la de la linarina y de las saponinas en los extractos polares proporcionaría además de propiedades fotoprotectoras, también antiinflamatorias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Acevedo, L., Martínez, E., Castañeda, P., Franzblau, S., Timmermann, B.N., Linares, E., Bye, R. and Mata, R. 2000. New phenylethanoids from *Buddleja cordata* subsp *cordata*. *Planta Med.* 66(3): 257-261.

Anhalt, J.P., Sabath, L.D. y Barry, A.L. 1985. Pruebas especiales: actividad bactericida, actividad de los antimicrobianos combinados y detección de producción de beta-lactamasa. En: Lennette, E.H. (ed). *Manual de microbiología clínica.* 4ª edición. Edit. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pp. 579-587.

Arciniegas, A., Avendaño, A., Pérez-Castorena, A.L. and Romo de Vivar, A. 1997. Flavonoids from *Buddleja parviflora*. *Biochem. Syst. Ecol.* 25 (2): 185-186.

Asakawa, Y. 1990. Terpenoids and aromatic compounds with pharmacological activity from bryophytes. In: *Bryophytes. Their chemistry and chemical taxonomy.* Edited by Zinneister, H.D. Clarendon Press. Oxford England. Pp. 394-397.

Barry, A.L. y Thornsberry, C. 1987. Pruebas de susceptibilidad: Técnicas para pruebas de difusión. En: Lennette, E.H. (ed). *Manual de microbiología clínica.* 4ª edición. Edit. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pp. 561-574.

Benito, B.P., Martínez, M.J.A., Sen, S.A.M., Gomez, M.A.S., Matellano, F.L., Contreras, S.S., Lanza, D.A.M. 1998. *In vivo* and *in vitro* antiinflammatory activity of saikosaponins. *Life Sci.* 63(13): 1147-1156.

Bissett, D.L., Hannon, D.P. and Thomas, V. 1987. An animal model of solar-aged skin: histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochem. Photobiol.* 46 (3): 367-378.

Bissett, D.L., McBride, J.F., Hannon, D.P. and Patrick, L.F. 1991. Time-depent decrease in sunscreen protection against chronic photodamage in UV-B irradiated hairless mouse skin. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 9: 323-334.

Brash, D.E., Rudolph, J.A., Simon, J.A., Lin, A., McKenna, G.J., Baden, H.P., Halper, A.J., and Ponten, J. 1991. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 10124-10128.

Box, H.C., Dawidzik, J. B. and Budzinski, E. E. 2001. Free radicals induced double lesions in DNA. *Free Radic. Biol. Med.* 31(2): 856-868.

Brul, S. and Coote, P. 1999. Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 1-17.

Charlwood, B.V. and Charlwood, K.A. 1991. Monoterpenoids. In: *Methods in plant biochemistry.* Vol. 7 "Terpenoids". Charlwood, B. and Banthorpe, D.V. (Eds). Series editor Dey, P.M. Academic Press. San Diego, Ca. USA. Pp. 80-83.



- Chawla, V.K., Gupta, A.S., Passannanti, S. and Paternostro, M.P. 1981. Constituents of *Buddleia* species leaves. *Fitoterapia*. 52(5): 235-237.
- Chedekel, M.R. and Zeise, L. 1997. Melanins. In: *Sunscreens. Development, Evaluation and Regulatory Aspects*. 2nd ed. (Edited by Lowe, N.J., Shaath, N.A., and Pathak, M.A.) Marcel Dekker. New York, USA. Pp 421-443.
- Cleaver, J.E. and Kraemer, K.H. 1995. Xeroderma pigmentosum. In: *The metabolic basis of inherited disease*. 7th ed. Vol. III (Edited by Scriver C.R., Beadet, A.L., Sly, W.S. and Valle, D.) Mc Graw-Hill. New York, USA. Pp. 4393-4419.
- Davis, B. D. 1996. Crecimiento y muerte de las bacterias. En: *Tratado de Microbiología*. 4^{ta} Edición (Editado por Davis R. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N. y Ginsberg H. S.) Masson, S. A. México D. F., México. Pp 47-59.
- Davis, B. D. y Dulbecco R. 1996. Aspectos moleculares de la replicación y variación del DNA. En: *Tratado de Microbiología*. 4^{ta} Edición (Editado por Davis R. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N. y Ginsberg H. S.) Masson, S. A. México D. F., México. Pp 166-168.
- Della Greca, M., Ferrara, M., Fiorentino, A., Monaco, P. and Previtera, L., 1998. Antialgal compounds from *Zantedeschia aethiopica*. *Phytochemistry*. 49(5):1299.
- Ding, J.K., Fujino, H., Kasai, R., Fujimoto, N., Tanaka, O., Zhou, J., Hiromichi, M., and Fuwa, T. 1986. Chemical evaluation of *Bupleurum* species collected in Yunan, China. *Chem. Pharm. Bull.* 34(3): 1158-1157.
- Ding, N., Yahara, S. and Nohara T. 1992. Structure of Mimengosides A and B, New Triterpenoid Glycosides from *Buddlejae* Flos Produced in China. *Chem. Pharm. Bull.* 40 (3): 780-782.
- Duff, B., Bacon, J.S.D., Mundie, C.M., Farmer, V.C., Russell, J.D. and Forrester A.R. 1965. Catalpol and Methylcatalpol: Naturally Ocurring Glycosides in *Plantago* and *Buddleia* Species. *Biochem. J.* 96(1): 1-5.
- Durán, D. A., Cisneros, C. A., Fernández, A. M. y Váegas, V. A. 1986. *Manual de Técnicas Estadísticas*. FES-Iztacala UNAM. Pp. 134.
- Eckert, R.L. 1992. The structure and function of skin. In *Pharmacology of the Skin*. Edit. by Mukthar, H. CRC Press. Boca Raton. USA. Pp. 3-12.
- Eisenstadt, E., Carlton, B.C. and Brown, B.J. 1994. Gene mutation. In: *Methods for general and molecular bacteriology*. Gerhardt, P.(ed). ASM, Washington D.C. USA. Pp. 297-303.
- Elenitsas, R., Van Belle, P. and Elder, D. 1997. Laboratory Methods. In *Lever's Histopathology of the Skin*. Eighth Edition. Edited by Elder, D. Lippincott-Raven. Philadelphia, PA. USA. Pp 51-60.

- Elmets, C.A. and Young, C.A. 1996. Sunscreens and photocarcinogenesis: an objective assessment. *Photochem. Photobiol. B.* 3 (4): 435-444.
- Epstein, J.H. 1989. Photocarcinogenesis, skin and aging. In: *Aging and skin*. Balin, A.K. and Kligman, A.M. (Eds.). Raven Press. New York, USA. Pp. 307-329.
- Epstein, J.H. 1997. Biological effects of sunlight. In: *Sunscreens. Development, evaluation and regulatory aspects*. Lowe, N.J., Shaath, N.A. and Pathak, M.A. (Eds.). 2nd edition. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. Pp.83-100.
- Finegold, S.M. y Jo Baron, E. 1989. Métodos para evaluar la efectividad antimicrobiana . En: *Diagnóstico microbiológico*. 7^a edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pp. 191-210.
- Finlay-Jones, J.J. and Hart, P.H. 1998. Photoprotection: sunscreens and the immunomodulatory effects of UV irradiation. *Mutat. Res.* 422: 155-159.
- Fischer, N.H. 1991. Sesquiterpenoid lactones. In: *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 7 "Terpenoids". Edited by Charlwood, B.V. and Banthorpe, D.V. Series Editor Dey, P.M. Academic Press. San Diego, Cal. USA. Pp. 187-210.
- Freeman, S.E., Hacham, H., Gange, R.W., Maytum, D.J., Sutherland, J.C. and Sutherland, B.M. 1989. Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 5605-5609.
- Garg, S.C. and Dengre, S.L. Composition of the essential oil from the leaves of *Buddleia asiatica* Lour. *Flavour Frag. J.* 7(3): 125-127.
- Grujil, F.R. 1996. Photobiology of photocarcinogenesis. *Photochem. Photobiol. B.* 63 (4): 372-375.
- Harborne, J.B. and Williams, C.A. 1971. 6-Hydroxyluteolin and Scutellarein as Phyletic Markers in Higher Plants. *Phytochemistry.* 10: 367-378.
- Hansen, S. A. 1975. Identification of Carbohidrates in TLC. *J. Chromatogr.* Vol 107: Pp. 224-227.
- Harvey, S.C. 1982. Antisépticos y desinfectantes; fungicidas; ectoparasiticidas. En "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica" Editado por Goodman, A., Goodman, L.S. y Gilman, A. Sexta edición. Editorial Médica Panamericana. México, D.F. México. Pp 950-972.
- Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M. and Von Wright, A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3590-3595.

- Hendrickson, D.A. 1987. Reactivos y colorantes. En: Lennette, E.H. (ed). Manual de microbiología clínica. 4ª edición. Edit. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pp. 1356.
- Holbrook, K.A. y Wolff, K. 1997. Estructura y desarrollo de la piel. En: Dermatología en Medicina General. Tomo 1. Editado por Fitzpatrick, T. B. Editorial Médica Panamericana. México, D.F. Pp 101-149.
- Houghton, P.J. 1984. Ethnopharmacology of some *Buddleia* sp. J. Ethnopharmacol. 11: 293-308.
- Houghton, P.J. 1985. Lignans and neolignans from *Buddleia davidii* Franch. Phytochemistry. 24 (4): 819-826.
- Houghton, P.J. 1985. Phenylpropanoid glycosides in *Buddleia davidii*. J. Nat. Prod. 8(6): 1005-1006.
- Houghton, P.J., Woldemariam, T.Z., Candau, M., Barnardo, A., Omedele, K, and Li, S. 1996. Buddlejone, a diterpene from *Buddleia albiflora*. Phytochemistry. 42 (2): 485-488.
- Hutchinson, J. 1973. The Families of Flowering Plants, 3th Ed., Oxford University Press. London England. p.463.
- INI (Instituto Nacional Indigenista). 1994. Flora medicinal indígena de México. Instituto Nacional Indigenista. México. Vols. 1-3: 155, 261, 1096, 1370.
- Ishii, M., Nakamura, S., Seo, S., Tori, K., Tozyo, T. and Yoshimura, Y. 1980. Isolation, characterization, and nuclear magnetic resonante spectra of new saponins from the roots of *Bupleurum falcatum* L. Chem. Pharm. Bull. 28(8): 2367-2373.
- Jaksic, A., Finlay-Jones, J.J, Watson, C.J., Spencer, L.K., Santucci, P.H. and Hart, P.H. 1995. *cis*-Urocanic acid synergises with histamine for incresed PGE₂ production in human keratinocytes: link to indomethacin-inhibitable UVB-induced immunosuppression. Photochem. Photobiol. 61:303-309.
- Jones, R.N., Barry, A.L., Gavan, T.L. y Washington, J.A. 1987. Pruebas de susceptibilidad: técnicas de microdilución y macrodilución en caldo. En: Lennette, E.H. (ed). Manual de microbiología clínica. 4ª edición. Edit. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pp. 1206-1212.
- Kerr, C. 1998. The effects of two UV-B radiation-absorbing sunscreens on UV radiation-induced carcinogenesis, suppression of the contact hypersensitivity response and histological changes in the hairless mouse. Mutat. Res. 422: 161-164.
- Konishy, K., Ito, C. and Kanbara, H. 1987. Inhibitory effects of tannic acid on the respiratory chain of *Photobacterium phosphoreum*. Chem. Pharm. Bull. 35(3): 1169-1175.

- Krien, P.M. and Kermici, M. 2000. Evidence for the existence of a self regulated enzymatic process within the human stratum corneum-an unexpected role for urocanic acid. *J. Invest. Dermatol.* 115: 414-420.
- Kubo, I. 1993. Antimicrobial activity of green tea flavor components. In: *Bioactive volatile compounds from plants*. Edited by Teranishi, R. and Buttery, R.G. American Chemical Society. Washington, D.C. USA. Pp. 57-70.
- Kubota, T., Tonami, F. and Hino, H., 1966. The structure of saykogenins A, B, C and D. Triterpenoid alcohols of *Bupleurum falcatum* L. *Tetrahedron Lett.* 701-710
- Liao, Y.H., Houghton, P.J. and Houlst, J.R.S. 1999. Novel and know constituents from *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation. *J. Nat. Prod.* 62(9): 1241-1245.
- Lin, Y.L., Neuman, P., Timmermann and Marbry, T. 1990. The flavonoids. In: Domínguez, X.A. (ed). *Phytochemical methods frontiers*. Rev. Lat. de Química. Supl. Especial. Pp. 92-130.
- López, J., Sierra, J., Vegazo, M.E. and Cortés, M. 1979. Chemical constituents of *Buddleja globosa* Lam. *Fitoterapia* 50: 195-198.
- Lowe, N.J. and Friedlander, J. 1997. Sunscreens: Rationale for use to Reduce Photodamage and Phototoxicity. . In: *Sunscreens. Development, evaluation and regulatory aspects*. Lowe, N.J., Shaath, N.A. and Pathak, M.A. (Eds.). 2nd edition. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. Pp. 35-58.
- Mansoor, A., Maktoob, A. and Gray, M. 1992. Biridoside, a new iridoid from *Buddleja davidii*. *Spectroscopic. Lett.* 25(3): 363-374.
- Marin, G., Giménez, B., Cortés, M., Pardo, F., Núñez, J. y Naranjo, J. 1977. Estudio fitoquímico de *B. globosa* Lam. *Buddlejaceae*. *Rev. Latinoamer. Quím.* 10: 19-21. Santiago, Chile.
- Martínez-Vázquez Mariano, Ramírez Apan Teresa O., Lastra Ana Lilia. and Bye Robert. 1997. A Comparative Study of the Analgesic and Anti-Inflammatory of Pectolinarin Isolated from *Cirsium subcoriaceum* and Linarin Isolated from *Buddleia cordata*. *Planta Med.* 64: 134-137.
- Mensah, A.Y., Houghton, P.J., Bloomfield, S., Vlietinck, A. and Vanden Berghe, D. 2000. Know and novel terpenes from *Buddleja globosa* displaying selective antifungal activity against dermatophytes. *J. Nat. Prod.* 63(9) 1210-1213.
- Miyase, T., Akahori, C., Kohsaka, H. and Ueno, A. 1991. Acylated iridoid glycosides from *Buddleja japonica*. *Chem. Pharm. Bull.* 39(11): 2944-2951.

- Mori, A., Nishino, C., Enoki, N. and Tawata, S. 1987. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*. 26 (8): 2231-2234.
- Niwa, M., Iwadare, Y., Wu, Yang-Chang. and Hirata, Y., 1988. Two new phenylpropanoid glycosides from *Wikstroemia sikokiana*. *Chem. Pharm. Bull.* 36(3): 1158-1161.
- Norris, P.G., Gange, R.W. and Hawk, J.L.M. 1997. Efectos agudos de la radiación ultravioleta sobre la piel. En: *Dermatología en Medicina General*. Tomo 2. Editado por Fitzpatrick, T. B. Editorial Médica Panamericana S. A. México, D. F., México. Pp 1725-1732.
- Norman, E.M. 1967. The genus *Buddleia* in North America. *Gentles Herbarum*. 10: 1-116.
- Norval, M., Simpson, T. J., Bardshiri, E. and Howie, S.E. 1989. Urocanic acid analogues and the suppression of the delayed type hypersensitivity response to herpes simplex virus. *Photochem. Photobiol.* 49: 633-639.
- Norval, M. 2001. Effects of solar radiation on the human immune system. *J. Photochem. Photobiol. B.* 63: 28-40.
- Pathak, M.A. 1986. Sunscreens: topical and systemic approaches for the prevention of acute and chronic sun-induced skin reactions. *Dermatol. Clin.* 4: 321-334.
- Pathak, M.A. 1997. Photoprotection against harmful effects of solar UVB and UVA radiation: An update. In: *Sunscreens: Development, Evaluation, and Regulatory Aspects*. Lowe, N.J., Shaath, N.A. and Pathak, M.A. (Eds.). 2nd Edition. Marcel Dekker. New York, USA. Pp. 59-79.
- Pathak, M. 2000. Sunscreens: Principles of Photoprotection. In: *Pharmacology of Skin*. Ed. Mukhtar, H. CRC Press. Boca Raton Fl. USA. Pp.229-248.
- Roeder, E., Wiedenfeld, H. and Hoening, A. 1985. Isolation of a new tricyclic piperidine alkaloid from *Buddleja davidii*. *Planta Med.* 2: 164-165.
- Rothman, S. and Rubin. 1942. Sunburn and para-aminobenzoic acid. *J. Invest. Dermatol.* 5: 445-457.
- Rzedowski, J. y Rzedowski, G. 1985. Flora fanerogámica del valle de México, Vol. II: Dicotyledoneae. Ed. E.N.C.B. México, D.F. Pp. 212-215.
- Sadtler Hand Book of Proton Nuclear Magnetic Spectrometry, 1978. Sadtler Heyden, Philadelphia, USA
- Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 30(12): 3875-3883.

Setlow, R.B., Grist, E., Thomson, K. And Woodhead, A.D. 1993. Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 6666-6670.

Shaath, N.A. 1997. Evolution of Modern Sunscreen Chemicals. In: Sunscreens: . Lowe, .J., Shaath, N.A. and Pathak, M.A. (Eds.). 2ⁿ Development, Evaluation, and Regulatory Aspects^d Edition. Marcel Dekker. New York, USA. Pp. 3-33.

Shaath, N.A. 1997. The Chemical of Sunscreens. In: Sunscreens: Development, Evaluation, and Regulatory Aspects. . Lowe, N.J., Shaath, N.A. and Pathak, M.A. (Eds.). 2nd Edition. Marcel Dekker. New York, USA. Pp. 263-283.

Shoenknecht, F.D., Sabath, L.D. and Thornsberry, C. 1987. Pruebas especiales de susceptibilidad. En: Lennette, E.H. (ed). Manual de microbiología clínica. 4^a edición. Edit. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pp. 1239-1249.

Tori, K., Yoshimura, Y., Seo, S., Sakurawi, K., Tomita, Y. and Ishii, H. 1976. Chemical shifts of oleanane-type triterpenoids. Tetrahedron Lett. 4163-4166.

Trace, B. 1993. Tratado de farmacognosia. 15^a edición. Ed. Interamericana, México, D.F. México Pp. 730-732.

Urbach, F. 2001. The historical aspects of sunscreens. J. Photochem. Photobiol. B. 64: 99-104.

Vanden Berghe, D.A. and Vlietinck, A.J. 1991. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: Methods in plant biochemistry. Vol. 6 "Assays for bioactivity". Edited by Hostettmann, K. Series editor Dey P.M. Academic Press. New York, USA. Pp. 47-71.

Van Kramen, H.J. Gruijl, F.R., De Vries, A., Sontag, Y., Wester, P.W., Senden, H.C.M., Rozenmuller, E. and Van Kreijl, C.F. 1995. Frequent p53 alterations but low incidence of *ras* mutations in UV-B induced skin tumors of hairless mice. Carcinogenesis, 16: 1141-1147.

Vogel, A. Y. 1989. Vogel's Textbook of practical Organic Chemistry. 5th Ed. Longman Scientific and Technical, U. K. Pp 1225.

Yamamoto, A., Miyase, T., Ueno, A. and Maeda, T. 1991. Buddlejasonins I-IV, four new oleanane-triterpene saponins from the aerial parts of *Buddleja japonica* Hemsl. Chem. Pharm. Bull. 39 (10): 2764-2766.

Yamamoto, A., Nitta, S., Miyase, T., Ueno, A. and Wu, L. 1993. Phenylethanoid and lignan-iridoid complex glucosides from roots of *Buddeja davidii*. Phytochemistry. 32 (2): 421-425.

Yoshida, T., Nobuhara, J., Uchida, M. and Okuda, T. 1976. Buddledin A, B and C, pisicidal sesquiterpenes from *Buddleja davidii* Franch. Tetrahendron Lett. 41: 3717-3720.

Yoshida, T., Nobuhara, J., Uchida, M. and Okuda, T. 1978. Studies on the constituents of *Buddleja* species I. Structures of buddledin a and b, two new toxic sesquiterpenes from *Buddleja davidii* Franch. Chem. Pharm. Bull. 26 (8): 2535-2542.

Yoshida, T., Nobuhara, J., Fiji, N. and Okuda, T. 1978. Studies on the constituents of *Buddleja* species II. Buddledin c, d and e, new sesquiterpenes from *Buddleja davidii* Franch. Chem. Pharm. Bull. 26 (8): 2543-2549.

Ziegler, A., Jonason, S., Leffell, D., Simon, J., and Sharma, H. 1994. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. Nature. 372: 773-776.

APÉNDICE I

MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR O DE KIRBY – BAUER

(Barry y Thornsberry, 1987, Vanden Berghe y Vlietinck, 1991).

Este método se utilizó para valorar cualitativamente la actividad antibacteriana de los compuestos puros y de las fracciones producto de las separaciones cromatográficas así como de los extractos, la metodología fue la siguiente:

MEDIO. Se ha seleccionado como medio de cultivo estándar el agar Müeller-Hinton (Bioxon 110-1), ya que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los antibióticos tienden a difundir más en dirección lateral, aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor difusión del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

INÓCULO. Con un hisopo estéril de poliéster se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias de apariencia semejante al de los microorganismos a ensayar (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella boydii*, etc. Se sumerge el hisopo en 3 ml de caldo tripteína soya (Bioxon III), se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retira el hisopo. Se incuba el tubo de cultivo a 37°C durante aproximadamente 2 a 3 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar N° 0.5 de MacFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 bacterias/ml. El estándar 0.5 de McFarland se prepara añadiendo 0.5 ml de sulfato de bario a 99.5 ml de H₂SO₄ 0.36 N (Hendrickson, 1987). La comparación de la turbidez entre el estándar y el caldo con el organismo en estudio se puede efectuar observándolos contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales, o en su defecto en un espectrofotómetro (Spectronic 21 Milton Roy) a 660 nm.

Si la suspensión de organismos es menos turbia que el estándar, se añade solución salina hasta igualarla. Una vez logrado esto, se sumerge un segundo hisopo de poliéster, estéril y seco en la suspensión bacteriana, y antes de retirarlo se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inocula la superficie de una placa de agar de Müeller-Hinton. Previamente, se deja que la placa alcance temperatura ambiente, es aconsejable mantener la tapa entreabierta para permitir la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie del agar. Finalmente, se siembra mediante estría en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría.

Una vez seco el inóculo, la placa de Müeller-Hinton está lista para la aplicación de las muestras a las que se les evaluará su actividad antibacteriana.

APLICACIÓN DE SUSTANCIAS. Para este caso, se utilizaron sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel whatman del N° 5. En todos los casos se hicieron las diluciones necesarias para que los sensidiscos llevaran la cantidad deseada de producto.

Al llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocan manualmente en la superficie del agar. Deben colocarse utilizando una pinza estéril a por lo menos 22 mm uno de otro y a 14 mm del borde de la placa para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen de la placa. Los sensidiscos se deben presionar suavemente con una punta de la pinza, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar. Sobre cada sensidisco se coloca la concentración de cada extracto a evaluar.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS. En cuanto a la evaluación de las fracciones, los sensidiscos se impregnaron con soluciones valoradas de las muestras hasta llegar a la concentración deseada de sustancia por disco; en este caso, se utilizaron solventes como el metanol y el cloroformo para solubilizar los compuestos, para posteriormente impregnar los discos dejando evaporar el solvente durante 12 horas.

CONTROLES NEGATIVOS. Discos a los que se les agregó metanol, cloroformo o dimetilsulfóxido y que se dejaron evaporar durante 12 horas (al igual que los experimentales).

CONTROL POSITIVO. Se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales a sensidiscos con antibiótico para bacterias Gram-negativas (Bigaux) encontrándose que kanamicina presentaba halos de inhibición dentro de los límites de susceptibilidad reportados (Barry y Thornsberry, 1987), debido a esto, se utilizaron discos de kanamicina de 30 μg (Bigaux E-03).

INCUBACIÓN. Una vez preparadas las placas para la prueba de susceptibilidad, se les colocó en una incubadora (aparatos de laboratorio E-51 con termostato) a 35°C, sin mayor tensión de CO₂. Es preciso evitar presión de CO₂ debido a que se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida del agar, provocando un descenso del pH. El desarrollo de algunos microorganismos es inhibido a pH ácido, lo cual tiende a estrechar falsamente la zona de inhibición. Asimismo, la actividad de diversos antibióticos puede aumentar o disminuir con la caída del pH, produciéndose diferencias en las velocidades de difusión y alteraciones de las zonas de inhibición. Se incuban siempre placas con discos sin sustancias a evaluar como control (control negativo).

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS. Las zonas de inhibición se midieron con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos, esta prueba se hizo por triplicado y se reportaron los valores promedio.

APÉNDICE II

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).

MÉTODO DE MACRODILUCIÓN EN CALDO (Jones et al., 1987)

a). PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y DILUCIONES.

La solución con el agente antimicrobiano de trabajo se prepara diluyendo la droga en el caldo Müeller-Hinton a la mayor concentración final deseada. La prueba se realiza en tubos de ensayo de 13 por 100 mm con tapa de rosca o con tapones de algodón. Para un pequeño número de pruebas se preparan diluciones al doble directamente en los tubos, de la siguiente forma: Se colocan 2 ml de la solución patrón de la droga en el primer tubo de la serie de diluciones. En cada uno de los tubos restantes se añade 1 ml de caldo Müeller-Hinton. Con una pipeta estéril se transfiere 1 ml del primer al segundo tubo. Después de mezclar bien el contenido del segundo tubo, se transfiere con otra pipeta estéril (en esta y en todas las transferencias sucesivas) al tercer tubo. El proceso continúa hasta el penúltimo tubo, al que se le quita 1 ml que se descarta. El último tubo no recibe agente antimicrobiano y sirve de control de crecimiento.

b). INOCULACIÓN E INCUBACIÓN DE LOS TUBOS

Se prepara un inóculo que contenga de 10^6 a 10^7 UFC/ml (unidades formadoras de colonia por mililitro) ajustando la turbidez del cultivo (de aproximadamente 12 horas de crecimiento) a un estándar de turbidez (en este caso se utilizó el estándar 0.5 de McFarland correspondiente a sulfato de bario al 10% en agua) posteriormente se diluye 1:200. Se añade a cada tubo 1 ml del inóculo ajustado. Finalmente se inoculan los tubos que contiene el antimicrobiano a diferentes concentraciones y se incuba a 35 °C durante 16 a 20 horas. Debido a que se trabajaron sólo bacterias aeróbicas no se usó atmósfera de CO₂.

c). INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La menor concentración de antimicrobiano que produce inhibición completa del desarrollo visible representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Una turbidez muy ligera o un pequeño botón de desarrollo o turbidez definida se considera que la droga ha sido incapaz de inhibir por completo el desarrollo a esa concentración.

d). DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA Mínima (Finogold y Jo Baron, 1989).

Para determinar la capacidad de un antimicrobiano para matar a una población de microorganismos se empleó el mismo sistema de la prueba de determinación de la CMI. Se toma como número inicial de microorganismos el inóculo inicial para dicha prueba, mediante el sembrado de una serie de diluciones 1:100 sucesivas en placas de agar Müeller-Hinton. El número inicial de UFC se obtiene de contar las colonias presentes 24 horas después de la inoculación de las placas tomando en cuenta el factor de dilución.

En cuanto se ha determinado la CMI, se toman 100 μ l de cada tubo (que representa una concentración de antimicrobiano) y se inoculan a placas de agar Müller-Hinton. El número de colonias que se desarrolla en estos cultivos luego de incubar 24 horas se compara con el número de UFC/ml del inóculo inicial. La CBM es la mínima concentración que permite sobrevivir a menos de 0.1% del inóculo inicial y se denomina Concentración Bactericida Mínima (CBM).

APÉNDICE III

CURVA DE SUPERVIVENCIA (Curva letal).

Las curvas de supervivencia se determinaron mediante el conteo de microorganismos viables a diferentes tiempos de desafío contra varias concentraciones de antimicrobiano (Kubo, 1993).

El desarrollo fue el siguiente:

- 1.- Se obtiene una población de bacterias de aproximadamente 10^{8-9} UFC/ml después de 16-24 horas de incubación.
- 2.- Se preparan tubos que contienen el agente antimicrobiano a concentraciones iguales a la CBM, la CMI, 0.5 CMI, 0.25 CMI y el control sin antimicrobiano.
- 3.- Se inoculan las bacterias en los tubos que contienen el antimicrobiano de tal forma que cada tubo contenga entre 10^{7-8} UFC/ml.
- 4.- Se toman muestras de 0.1 ml de cada tubo desde el tiempo cero, cada hora durante las primeras 6 horas y posteriormente cada 4-6 horas. A las muestras se les determina el número de microorganismos viables UFC mediante la técnica de diluciones.
- 5.- Los resultados del desafío se reportan graficando el logaritmo del número de sobrevivientes contra el tiempo de desafío.

APÉNDICE IV

TÉCNICA HISTOLÓGICA ESTÁNDAR

La secuencia de pasos para llevar a cabo la técnica histológica (Elenitsas, et al., 1997) es la siguiente:

- 1.- La muestra se coloca en formaldehído al 10%/solución salina fisiológica 0.9%.
- 2.- Se retira el formaldehído-salino.
- 3.- Se agrega agua corriente durante 30 minutos.
- 4.- El tejido se trata con alcohol al 70% durante 24 horas.
- 5.- El tejido se trata subsecuentemente con alcohol al 80% y al 90%, durante 30 minutos.
- 6.- El tejido se somete a 2 baños de alcohol absoluto durante 30 minutos.
- 7.- Se retira el alcohol, y la muestra se trata con cloroformo-aceite de cedro 1:1 2-3 horas.
- 8.- El tejido se deja incluido en aceite de cedro 2 días.
- 9.- La muestra se baña en parafina 2 veces (cada baño dura 24 horas).
- 10.- El tejido se trata con paraplast durante 45 minutos.
- 11.- La muestra se incluye en parafina para formar bloques.
- 12.- El tejido se corta en el micrótopo a un espesor de 6-8 μm .
- 13.- La muestra se monta en portaobjetos usando Ruyter.

El Ruyter se prepara mezclando dos soluciones (A y B). La solución A está hecha de partes iguales de acetona y benzoato de metilo y la solución B consta de agua destilada-albúmina glicerizada 8:2.

La tinción con Hematoxilina y Eosina se lleva a cabo tratando al tejido de acuerdo a la siguiente secuencia:

- 1.- Xilol I, 5 minutos.
- 2.- Xilol II, 5 minutos.



- 3.- Alcohol absoluto, 5 minutos.
- 4.- Alcohol 96%, 5 minutos.
- 5.- Alcohol 90%, 3 minutos.
- 6.- Alcohol 80%, 3 minutos.
- 7.- Alcohol 70%, 3 minutos.
- 8.- Agua, 10 minutos.
- 9.- Hematoxilina, 7 minutos.
- 10.- Agua, segundos.
- 11.- Alcohol acidulado, segundos.
- 12.- Agua, segundos.
- 13.- Agua amoniacal, segundos.
- 14.- Agua, segundos.
- 15.- Eosina, 5 minutos.
- 16.- Alcohol al 96%, tres minutos.
- 17.- Alcohol absoluto, tres minutos.
- 18.- Xilol I y Xilol II, cinco minutos cada uno.
- 19.- Se monta la muestra empleando resina histológica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE V

ANÁLISIS DE LAS CURVAS DE SUPERVIVENCIA DE LAS BACTERIAS

EXPUESTAS AL VERBASCÓSIDO.

Los datos obtenidos a partir de los experimentos de desafío, se sometieron al estadístico de Gomperts para obtener la constante de mortalidad (K) y el coeficiente de determinación (R). Los datos que se obtuvieron a partir del conteo de unidades formadoras de colonia se muestran en la siguiente tabla.

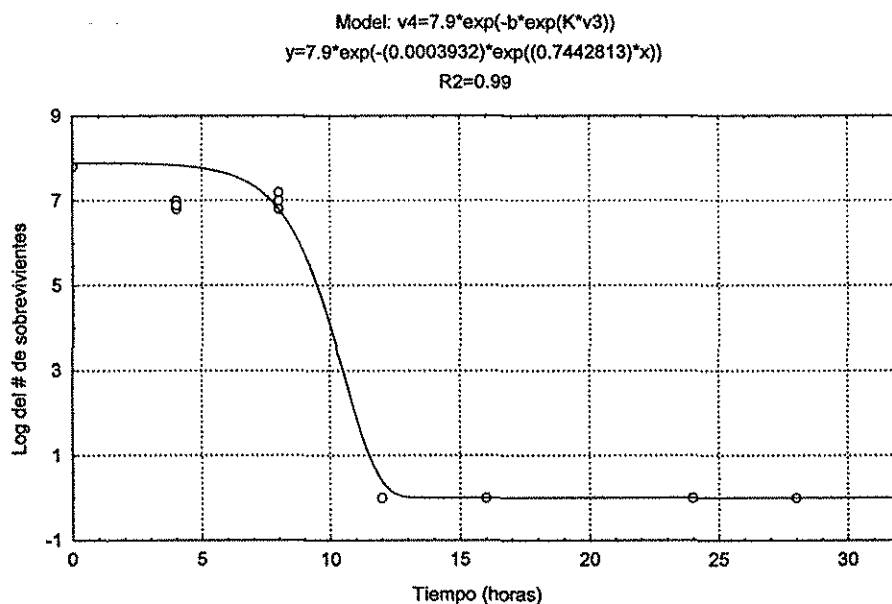
Tabla 32. Bacterias supervivientes expuestas a 800 µg/ml (CBM) de verbascósido.

Tiempo (horas)	<i>S. aureus</i> Logaritmo del número de sobrevivientes (n=3)
0	7.8
4	6.9
8	7.0
12	0
16	0
24	0
28	0
32	0
Tiempo (horas)	<i>V. cholerae</i> Logaritmo del número de sobrevivientes (n=3)
0	7.2
6	5.2
12	0
18	0
24	0
30	0
36	0

Para determinar el comportamiento multiimpacto de las curvas que representaban efecto bactericida (CBM), se utilizó la parte lineal de la curva y se extrapoló hasta el eje de las ordenadas. En las siguientes gráficas se muestran los resultados del análisis.

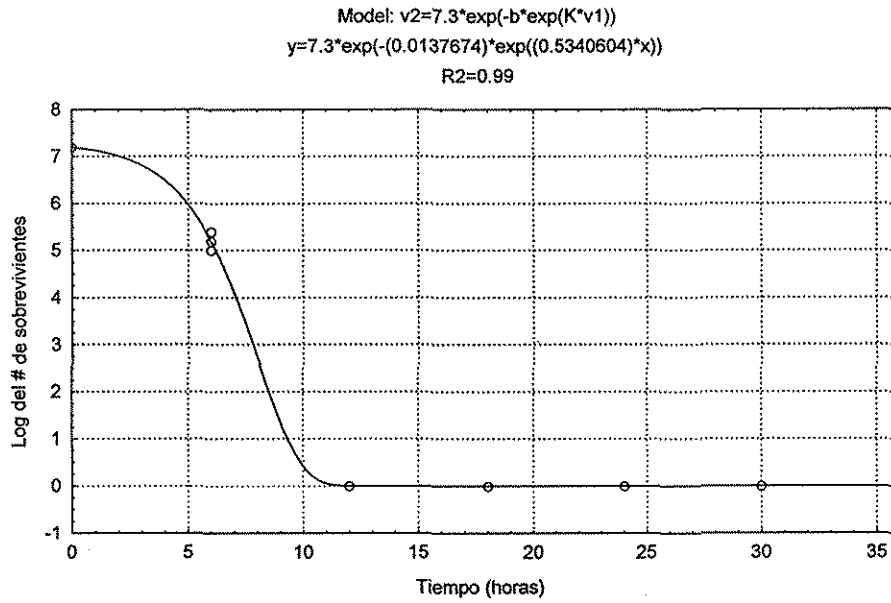
Gráfica 12.- Curva de Supervivencia de *S. aureus* expuesta a la CBM de Verbascósido.

Ordenada al origen = 21 ($\cong 1 \times 10^{13}$ impactos); $K= 0.744$; $R= 0.99$



Gráfica 13.- Curva de Supervivencia de *V. cholerae* expuesta a la CBM de Verbascósido.

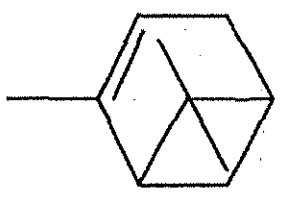
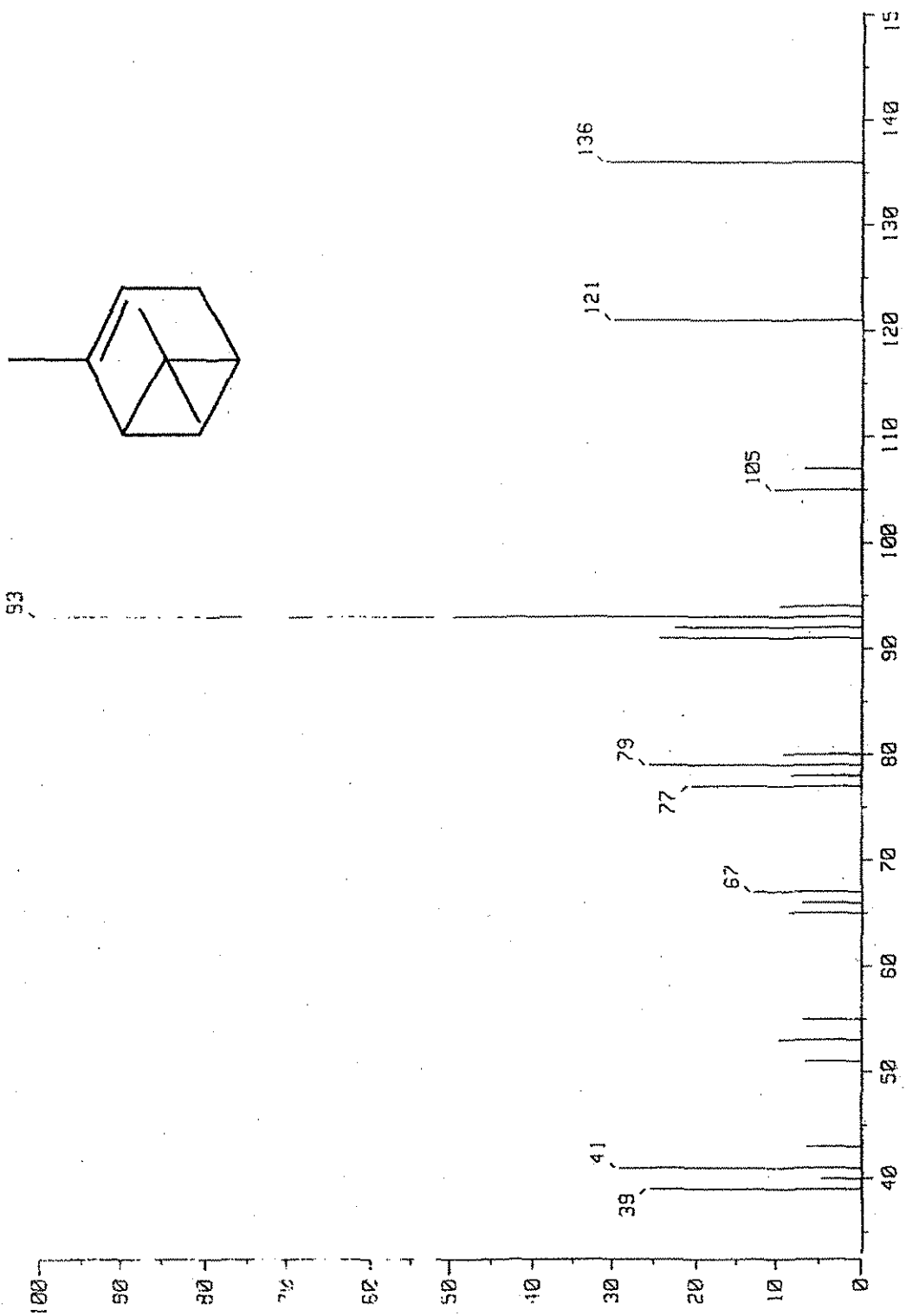
Ordenada al origen = 10.4 ($\cong 1 \times 10^3$ impactos); K= 0.53; R= 0.99



APÉNDICE VI

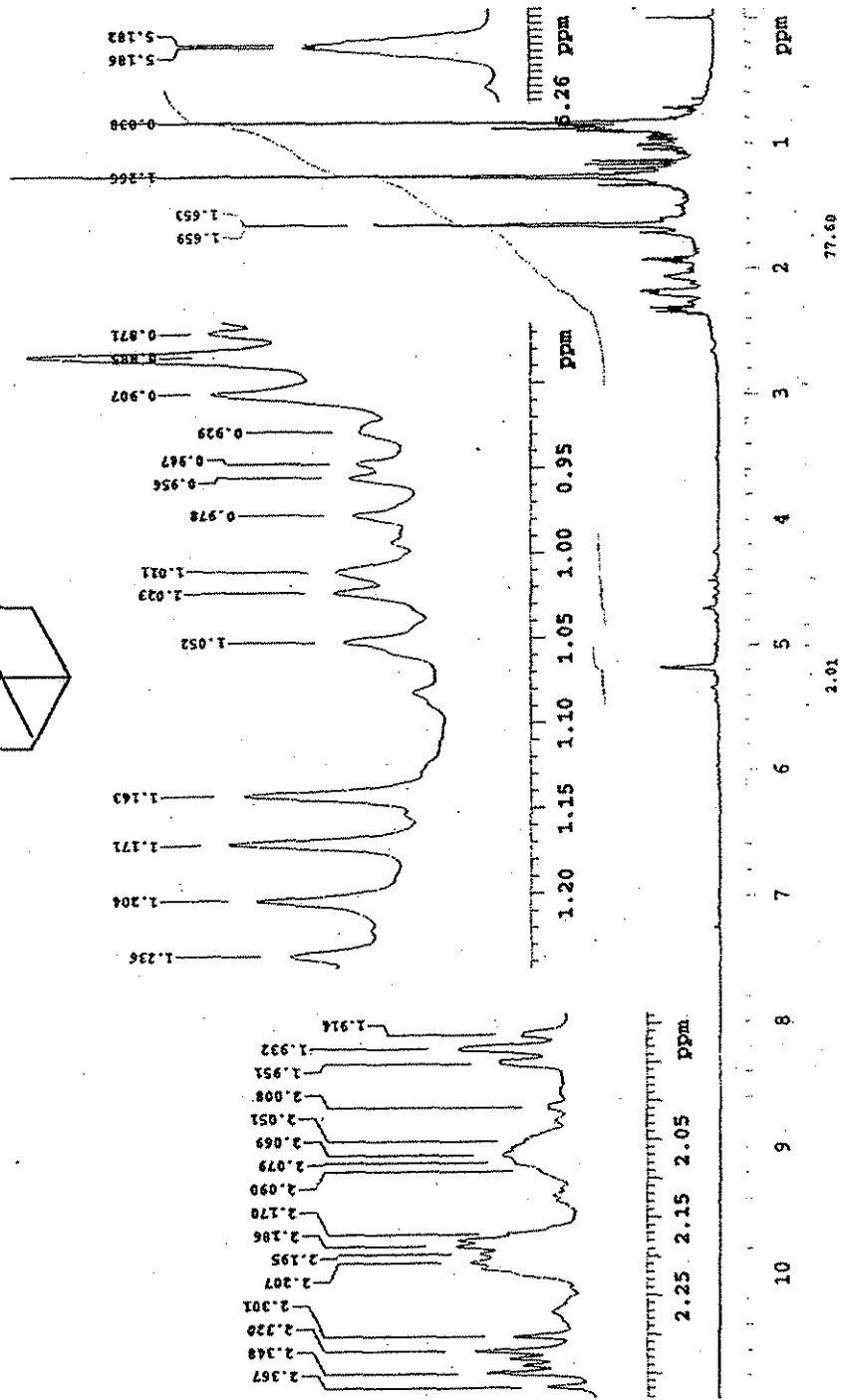
ESPECTROS

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



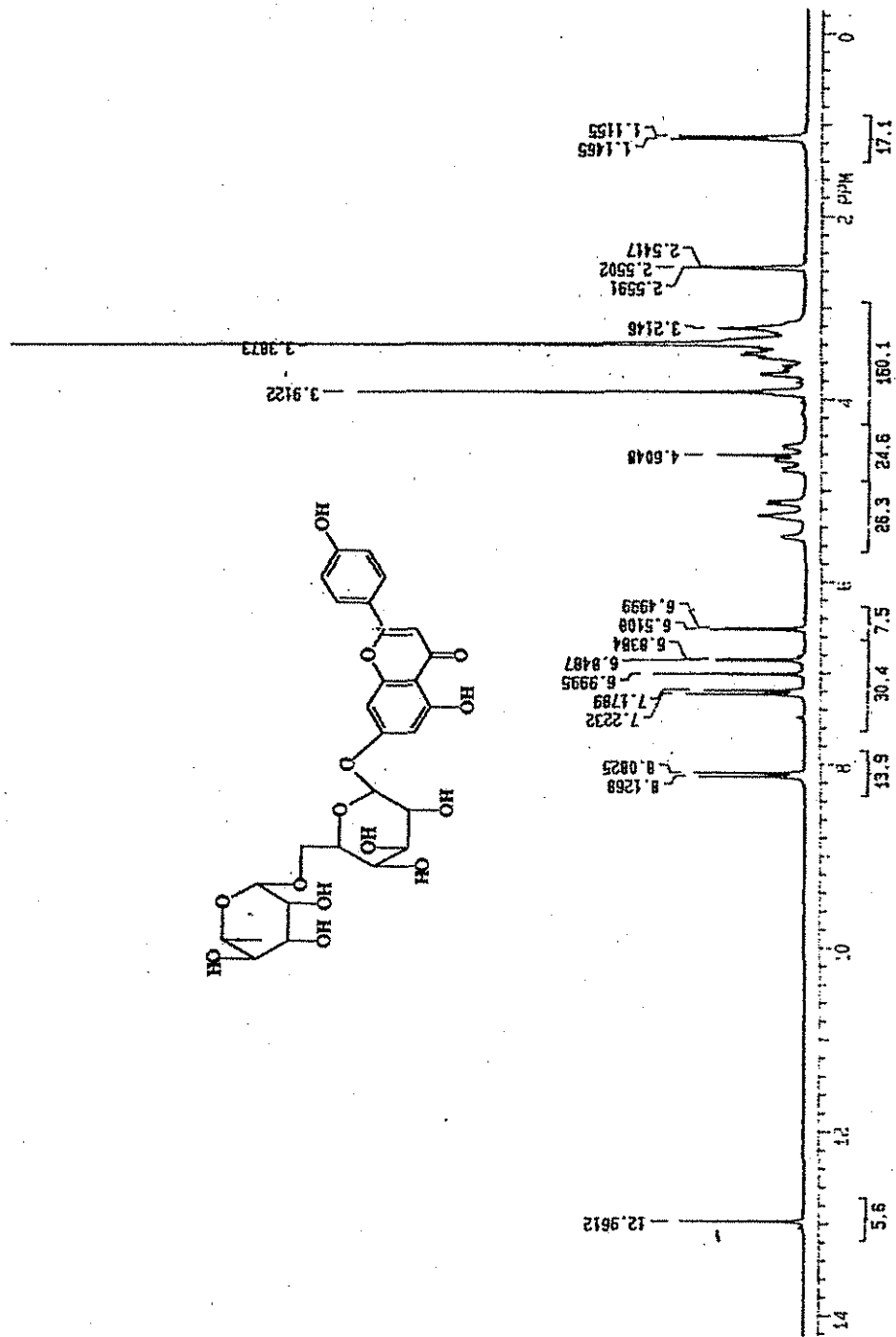
Espectro 1.- Espectro de Masas del alfa-pineno

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

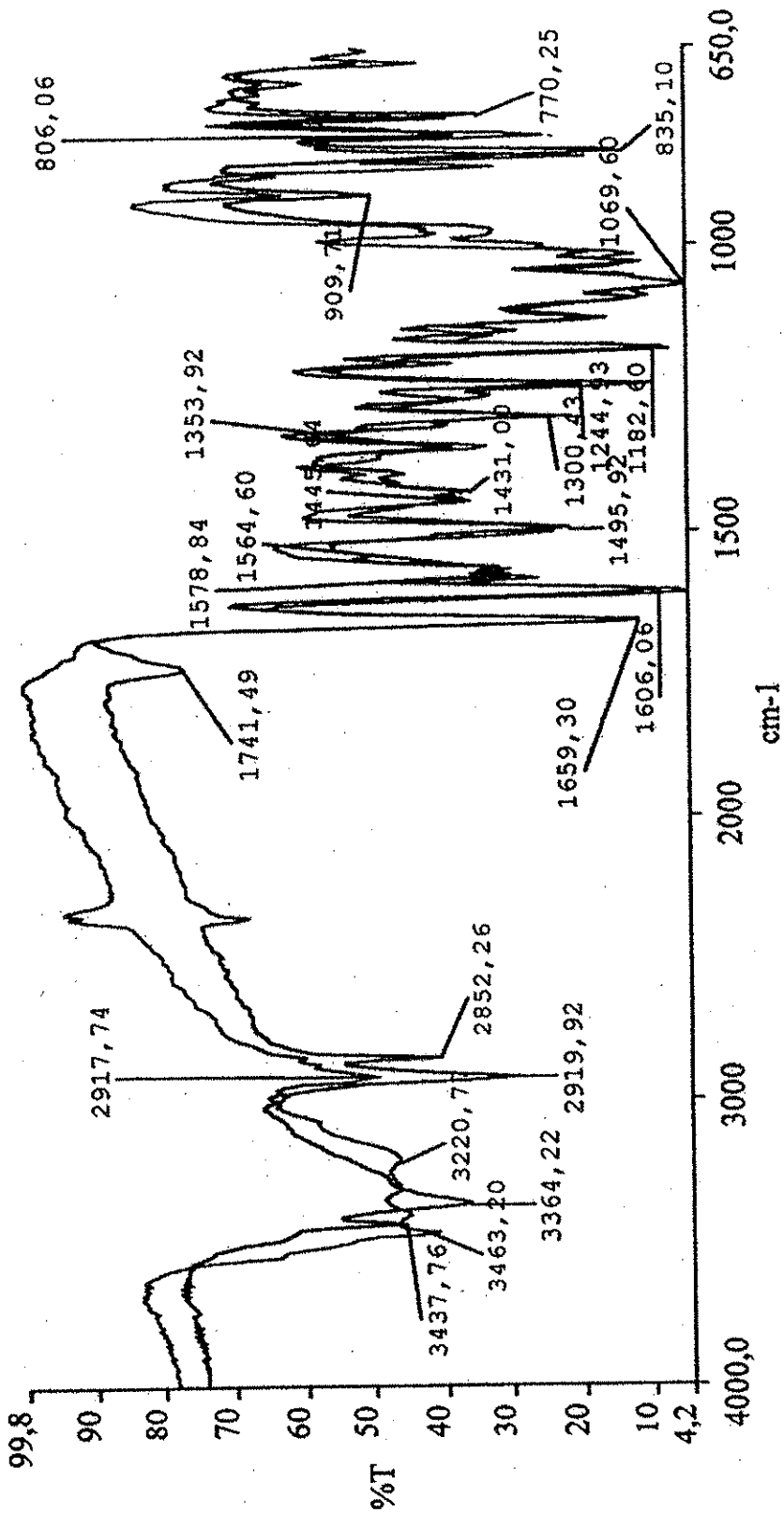


Espectro 2.- Espectro de RMN protónica del Alfa-pineno

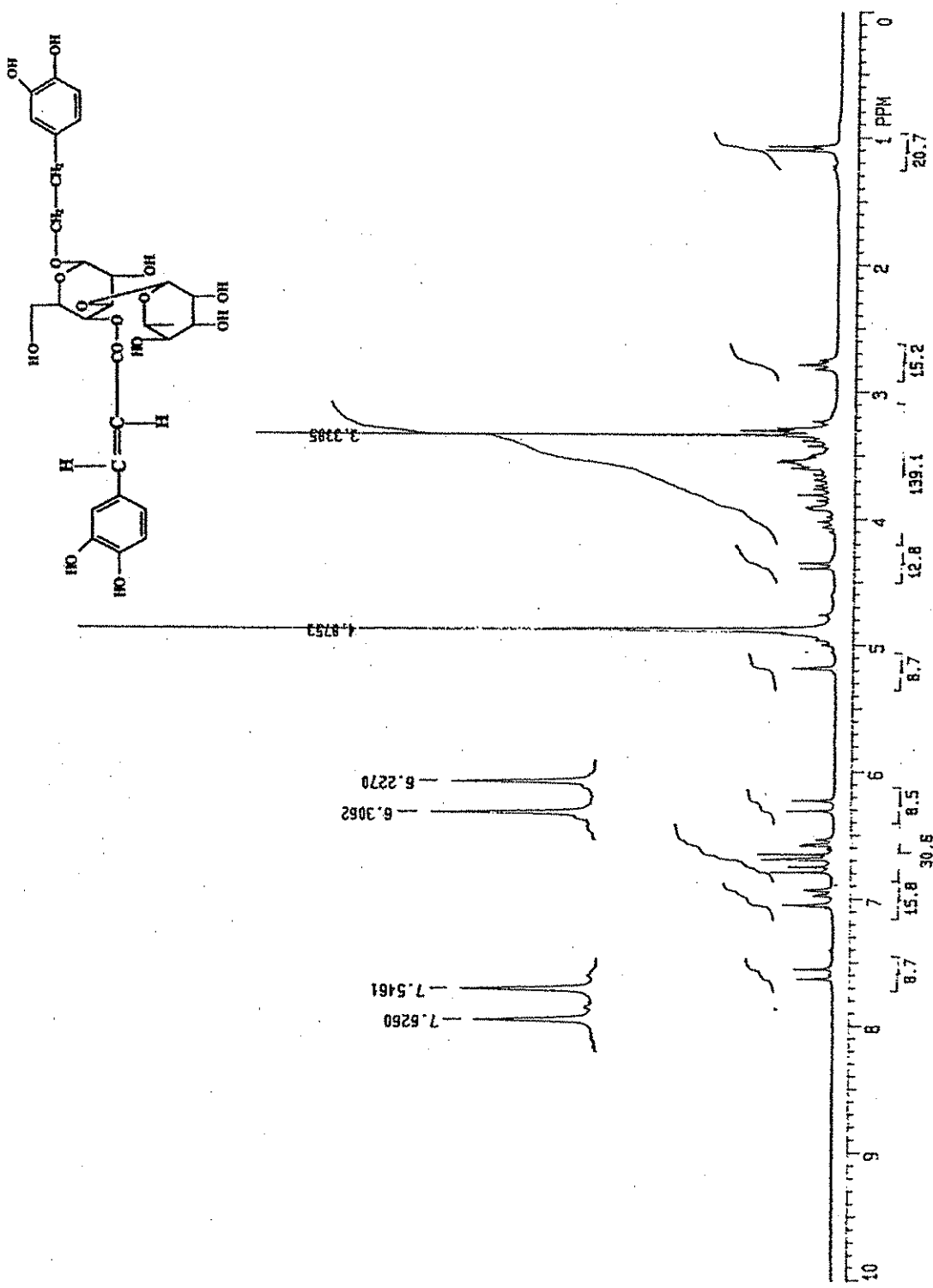
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Espectro 3.- Espectro de RMN protónica de la Linarina.

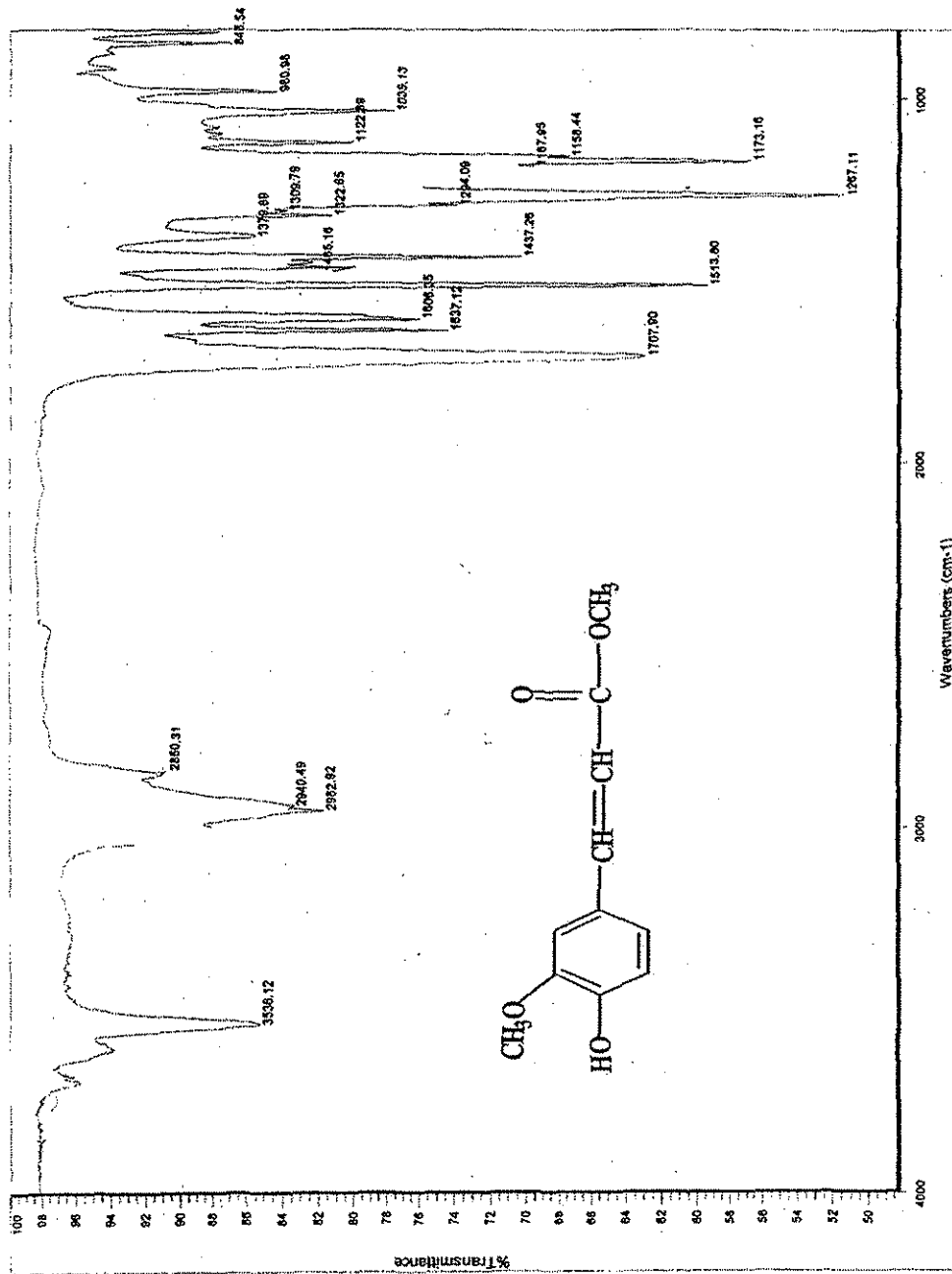


Espectro 4.- Espectro IR de la Linarina.

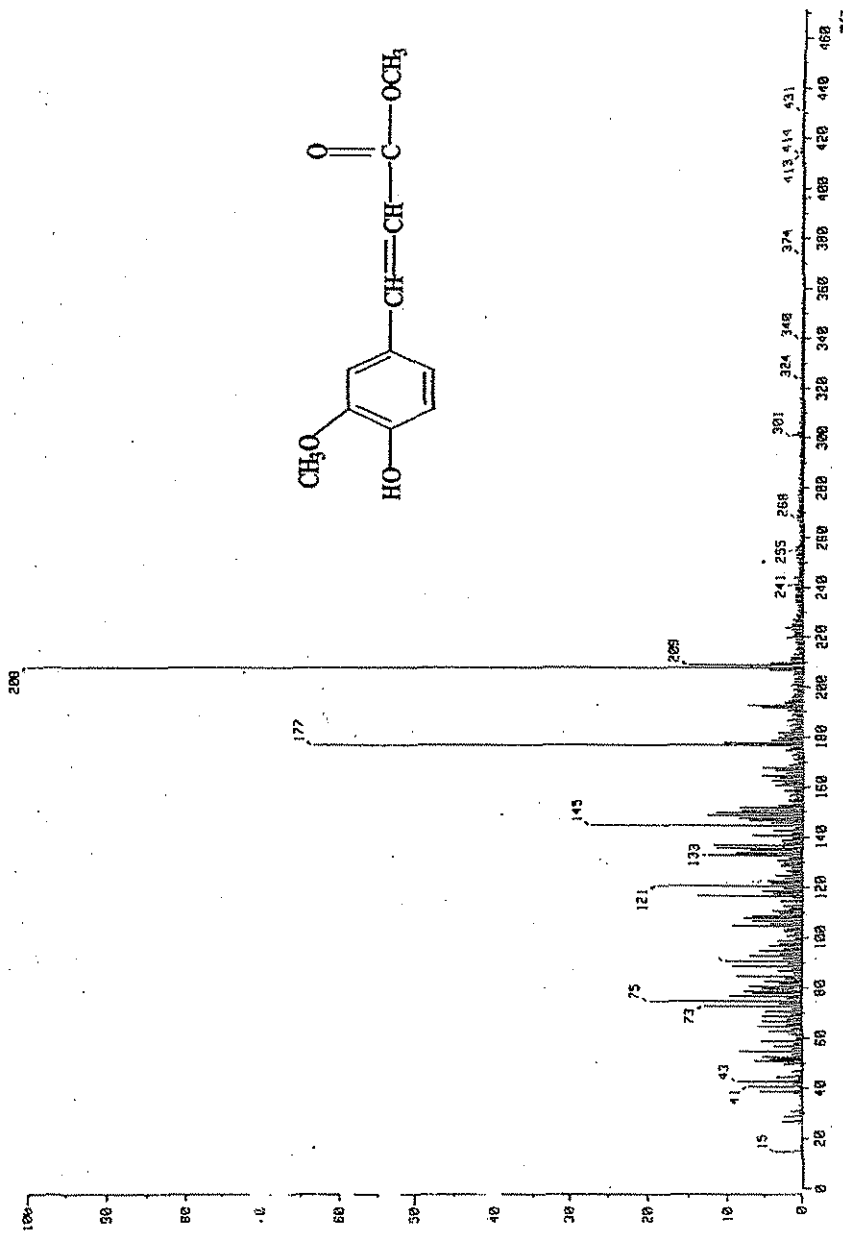


Espectro 5.- Espectro de RMN protónica del Verbascósido.

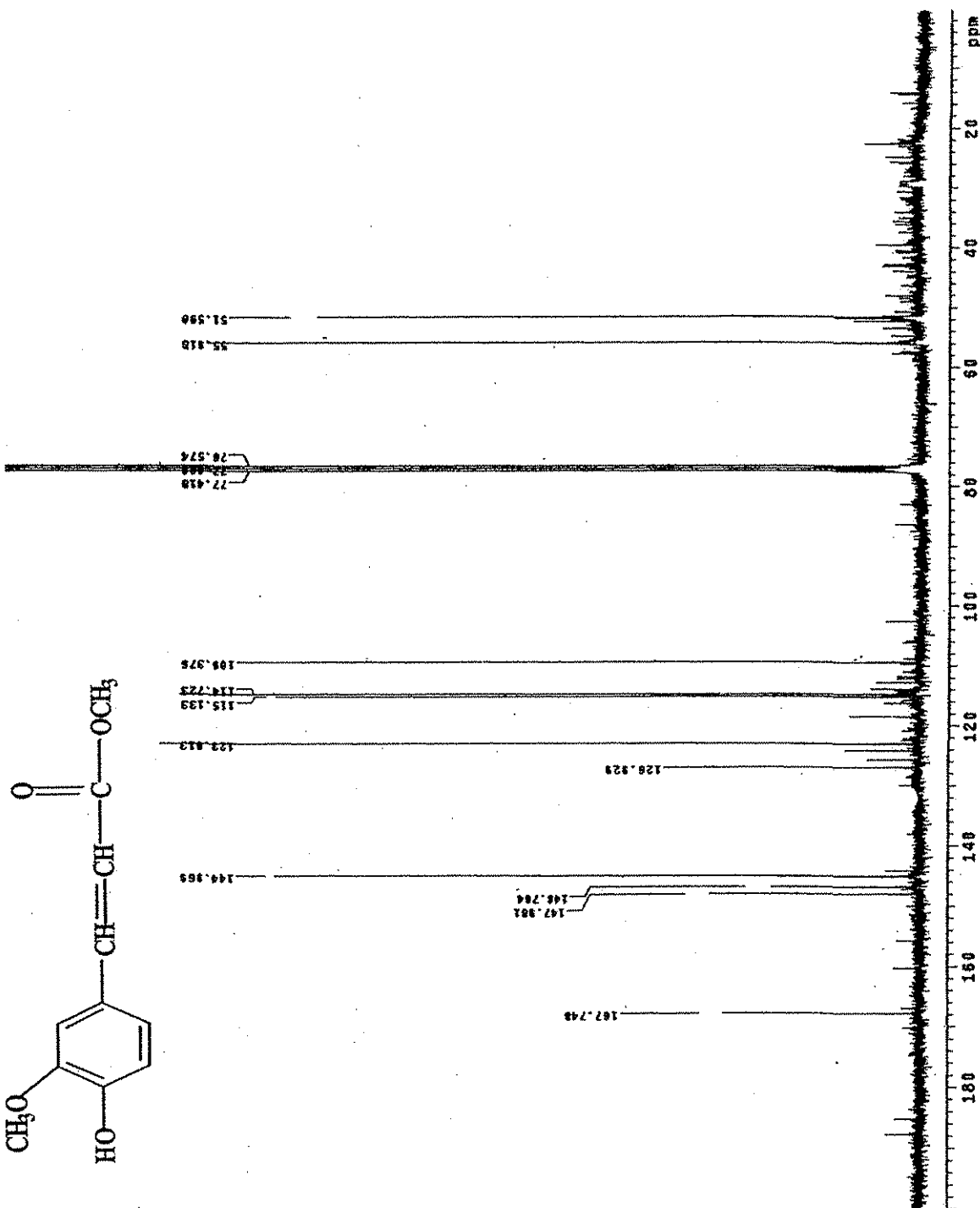
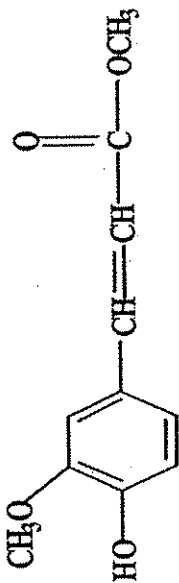
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Espectro 7.- Espectro IR del Éster Metílico del Ácido Ferúlico

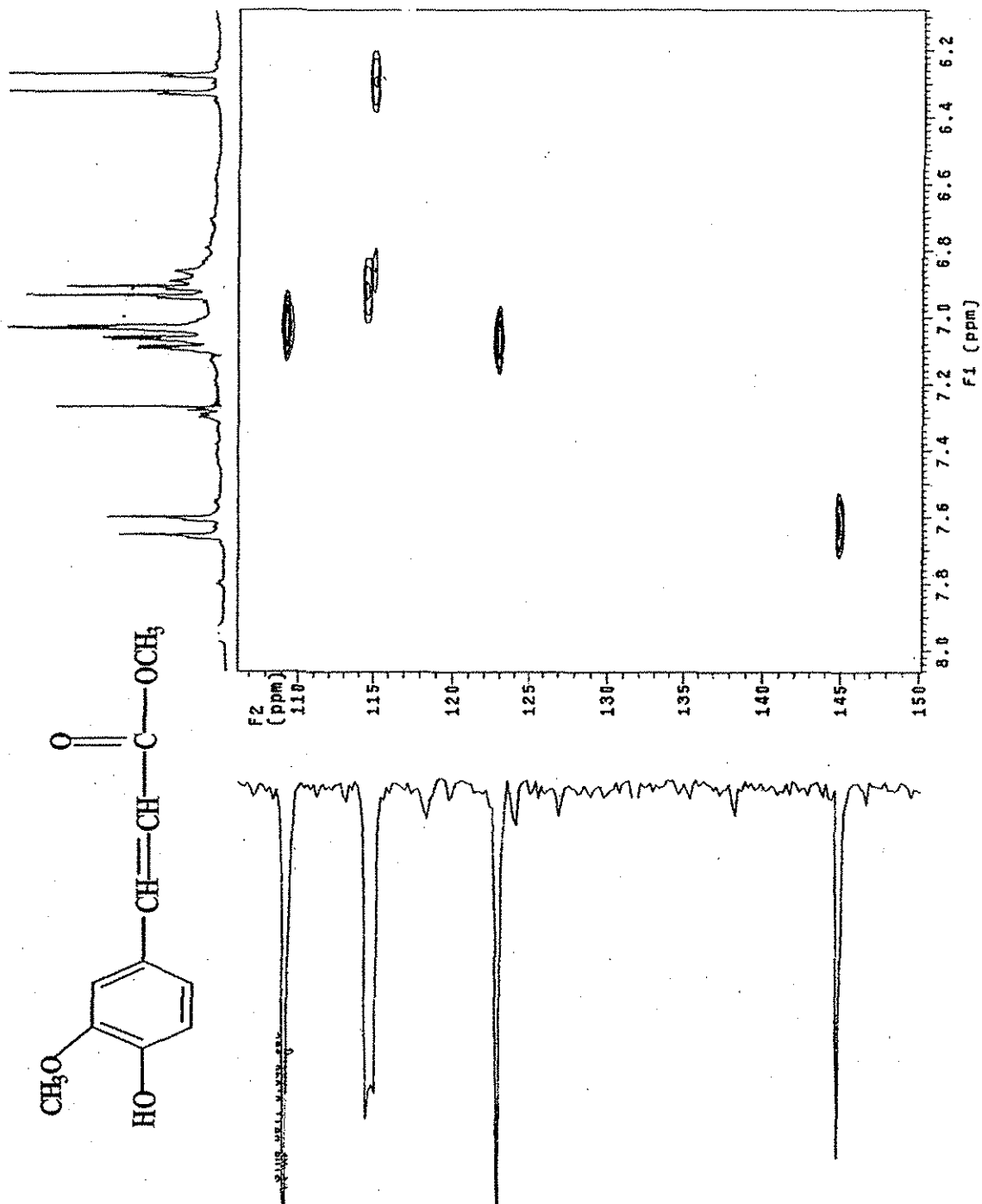


Espectro 8.- Espectro de Masas del Éster Metílico del Ácido Ferúlico.

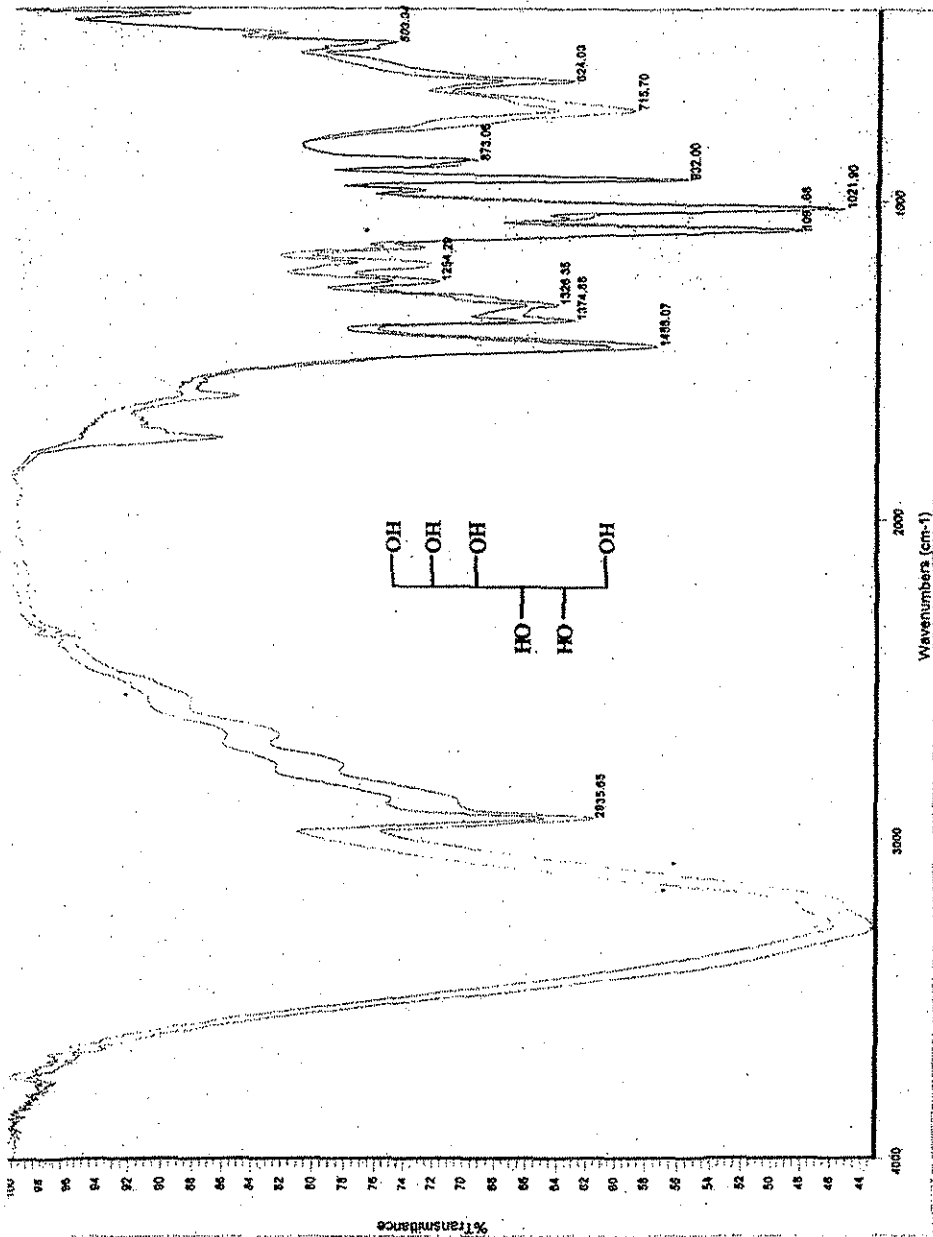


Espectro 10.- Espectro de RMN de Carbono-13 del Éster Metílico del Ácido Ferúlico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

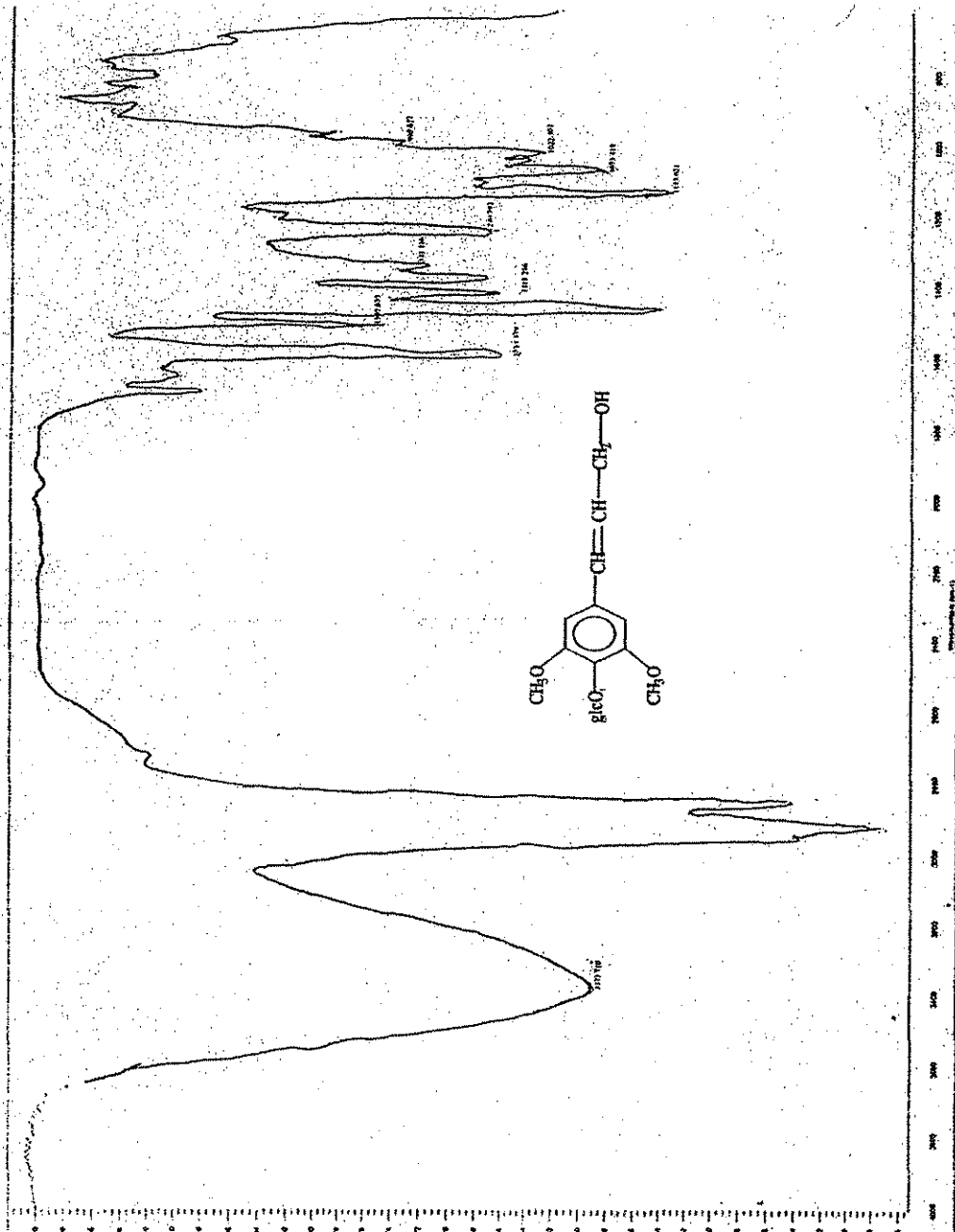


Espectro 11.- Espectro HETCOR del Éster Metílico del Ácido Ferúlico.

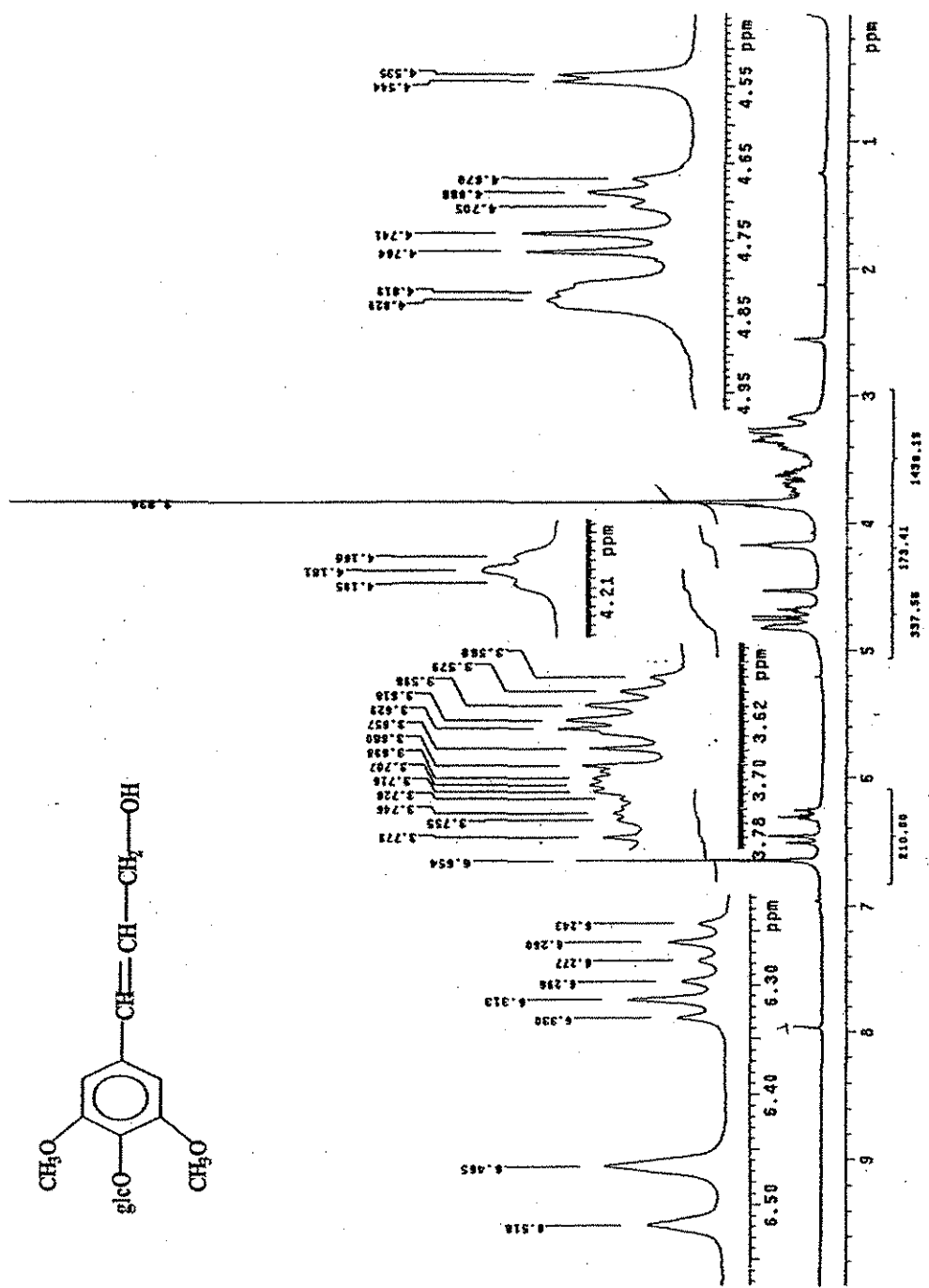


Espectro 12.- Espectro IR del Manitol.

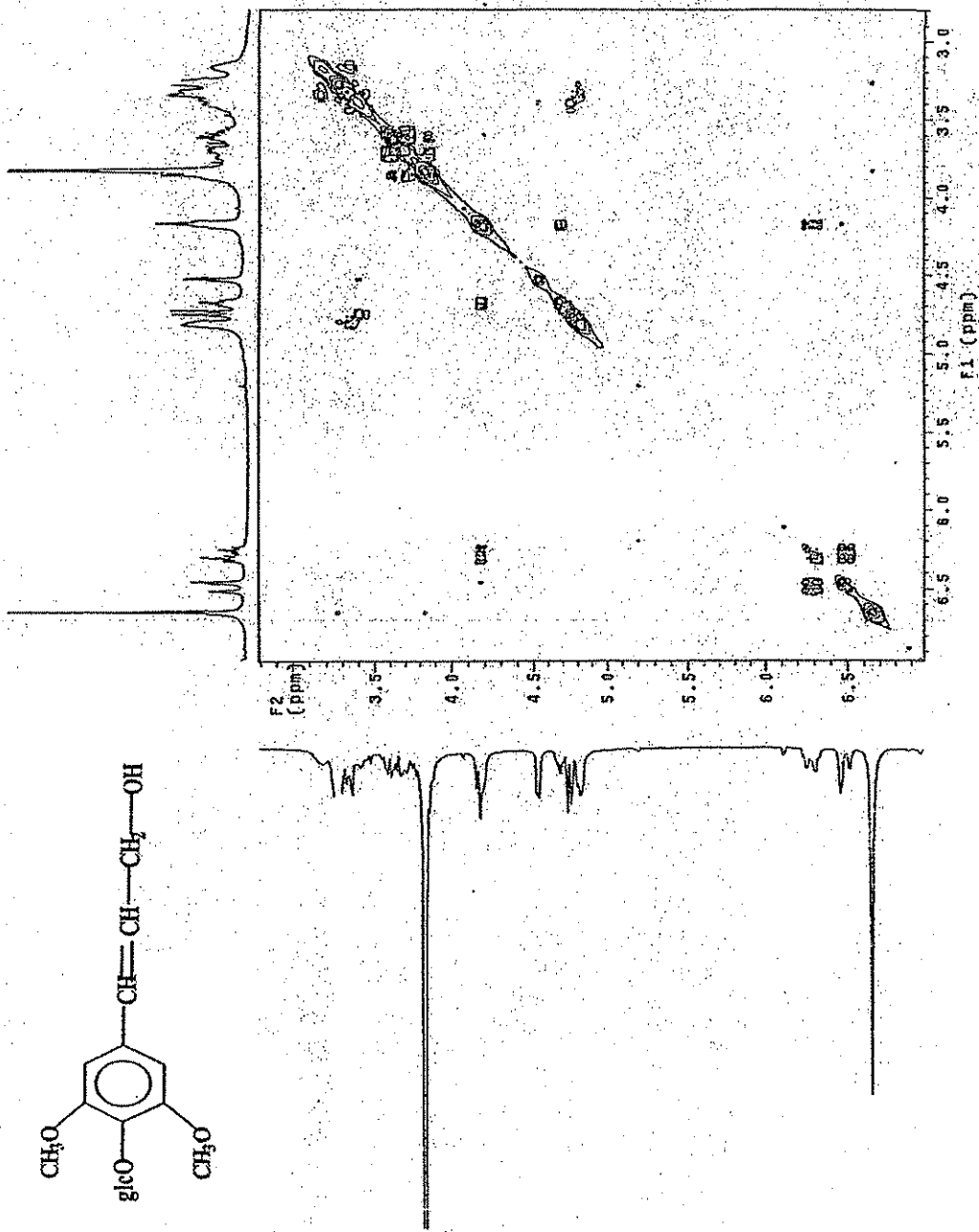
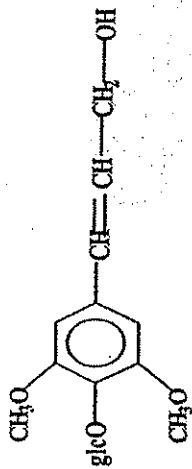
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



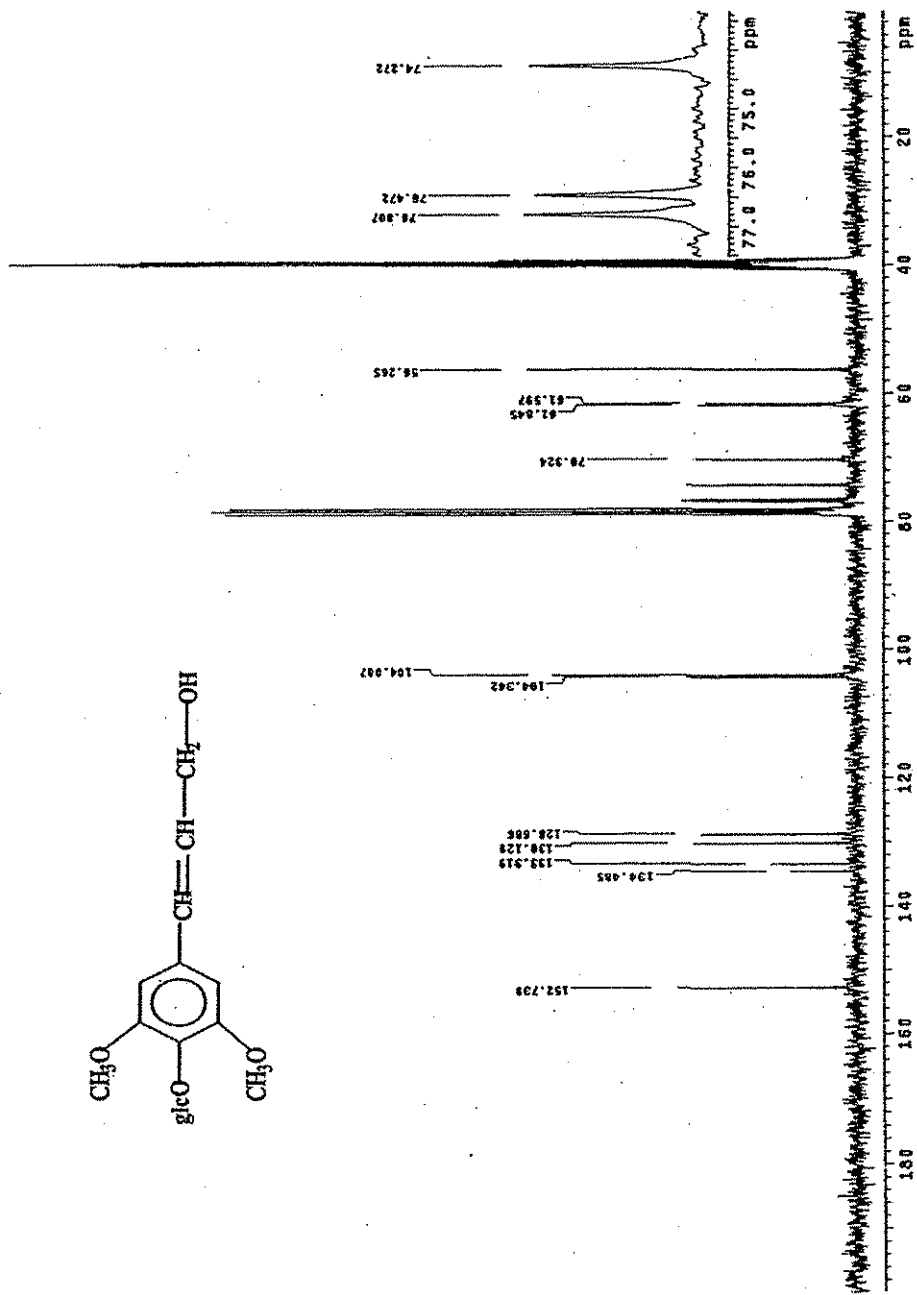
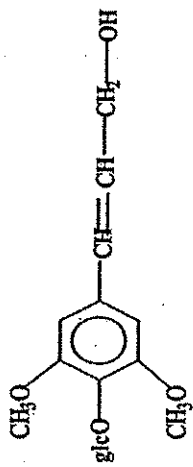
Espectro 13.- Espectro IR de la Syringina



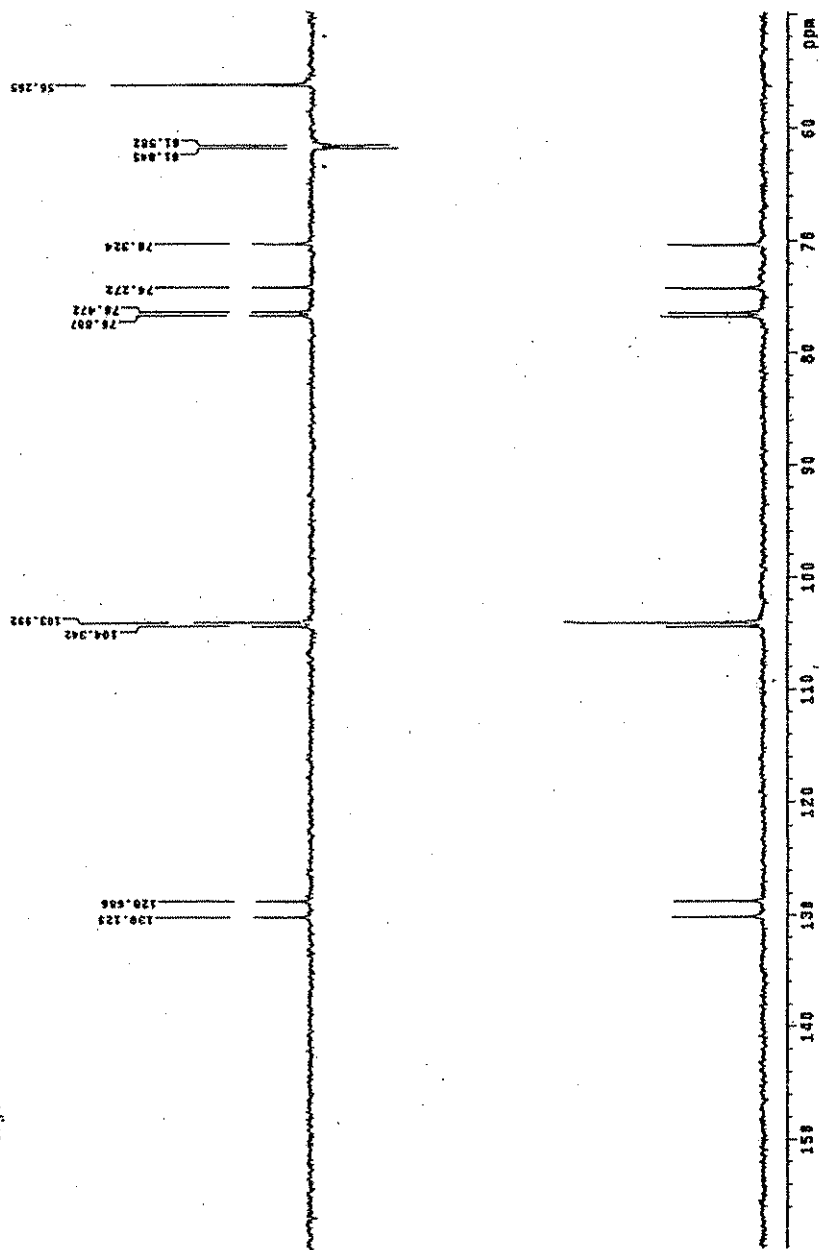
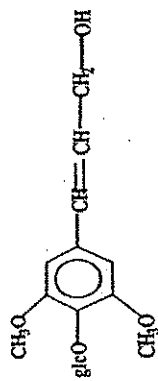
Espectro 14.- Espectro de RMN protónica de la Syringina.



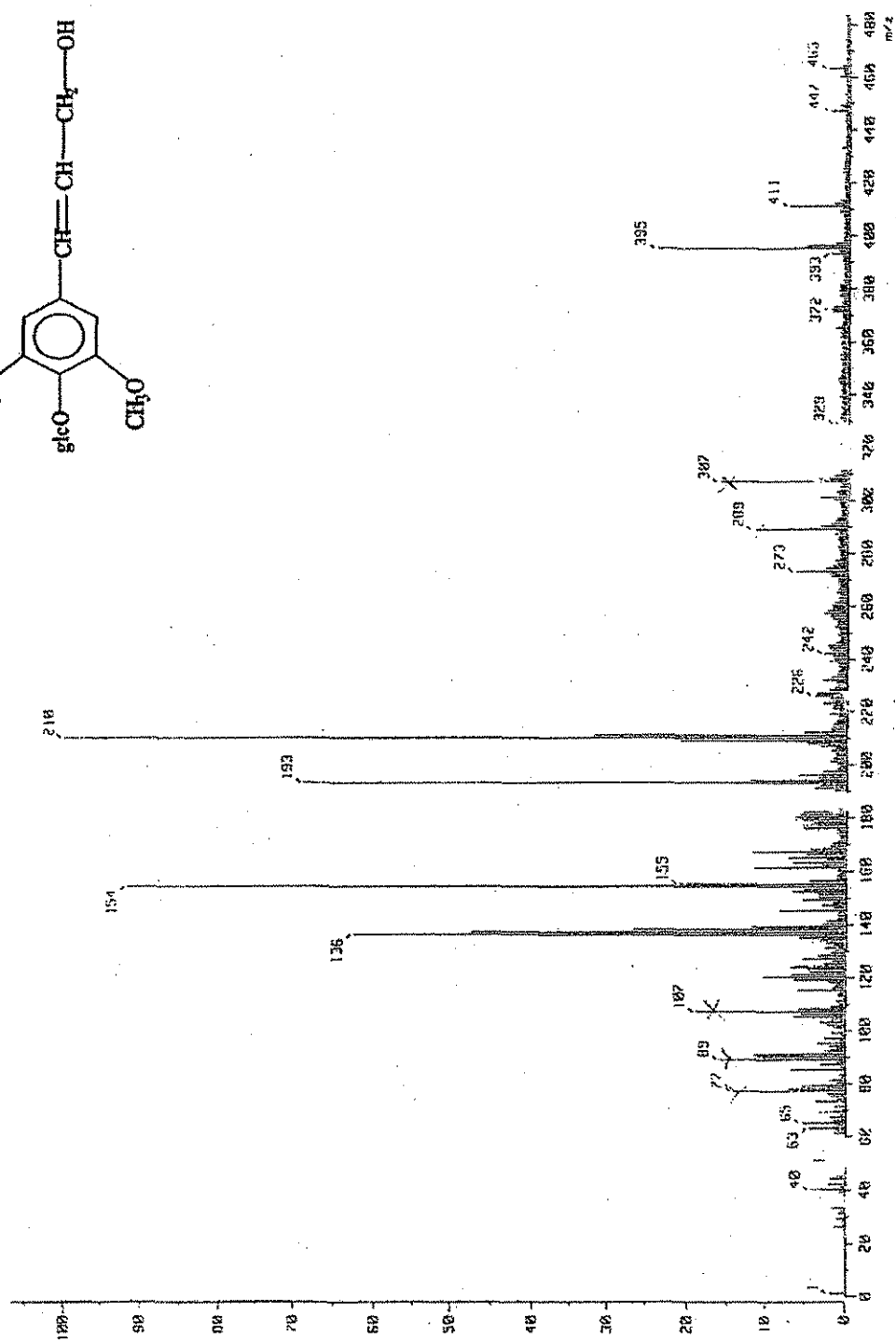
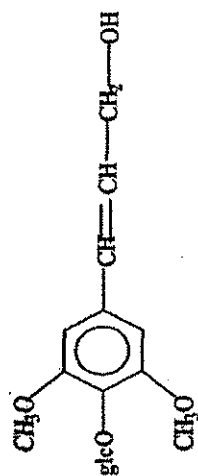
Espectro 15.- Espectro COSY de la Syringina.



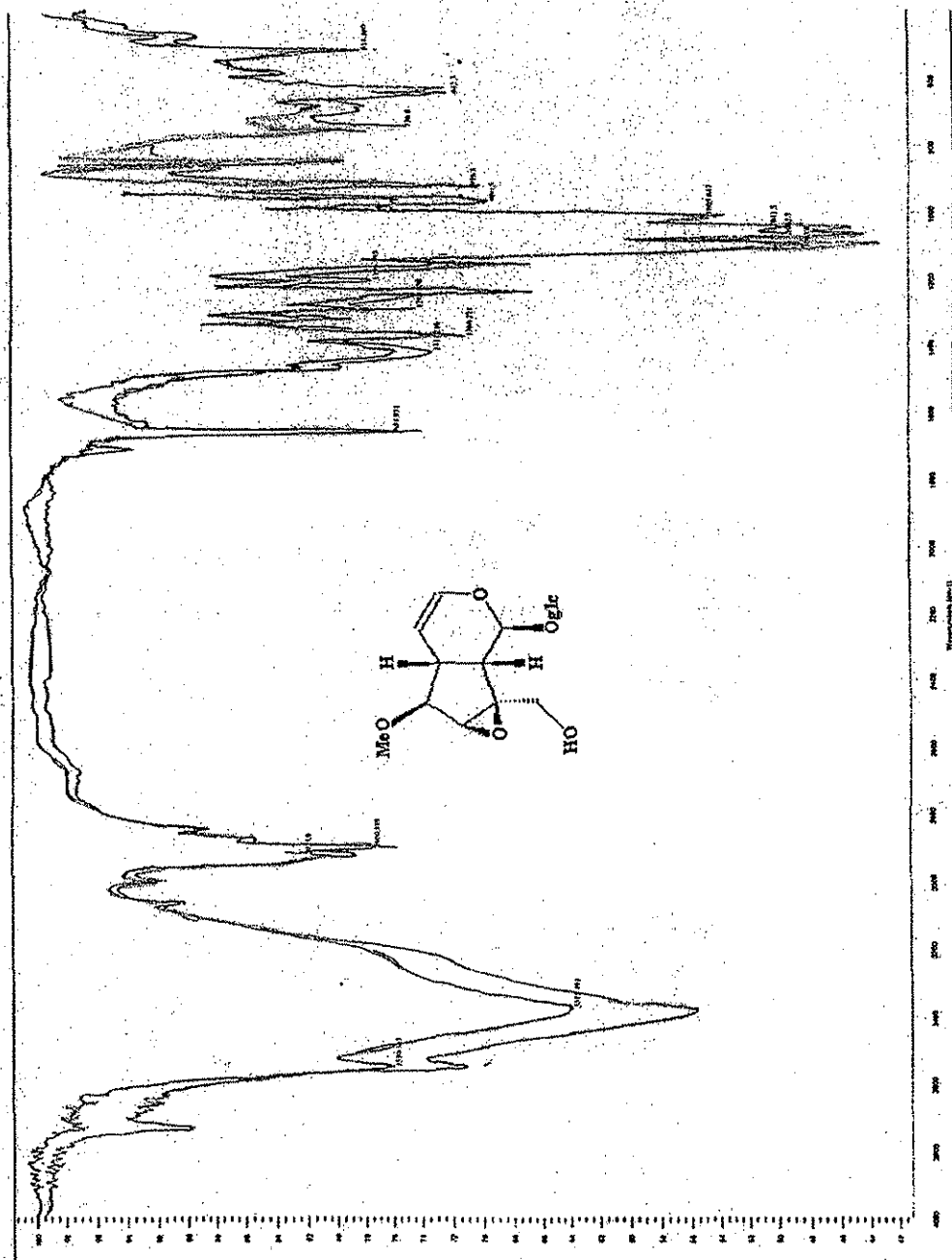
Espectro 16.- Espectro de RMN de Carbono-13 de la Syringina.



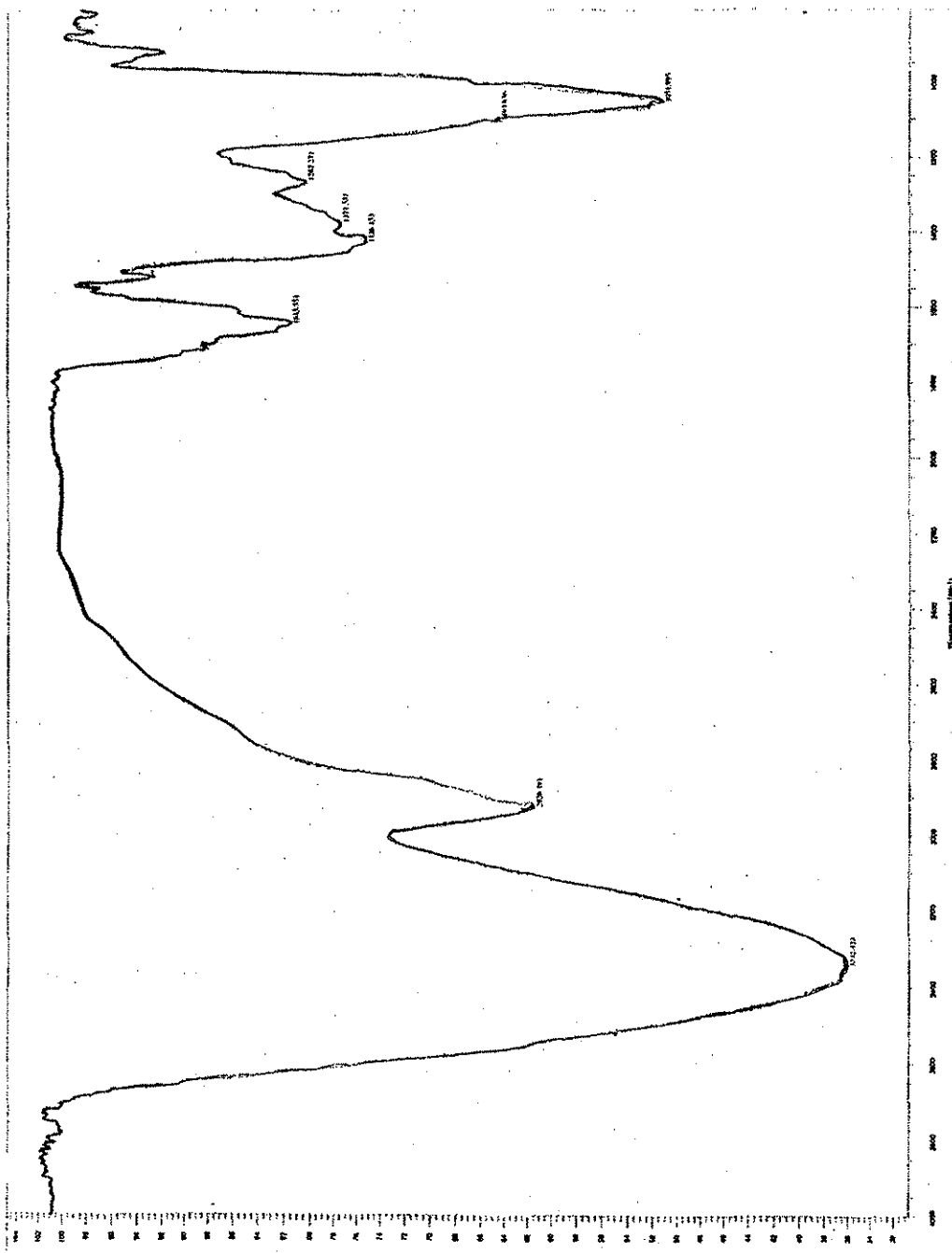
Espectro 17.- Espectro DEPT de la Syringina.



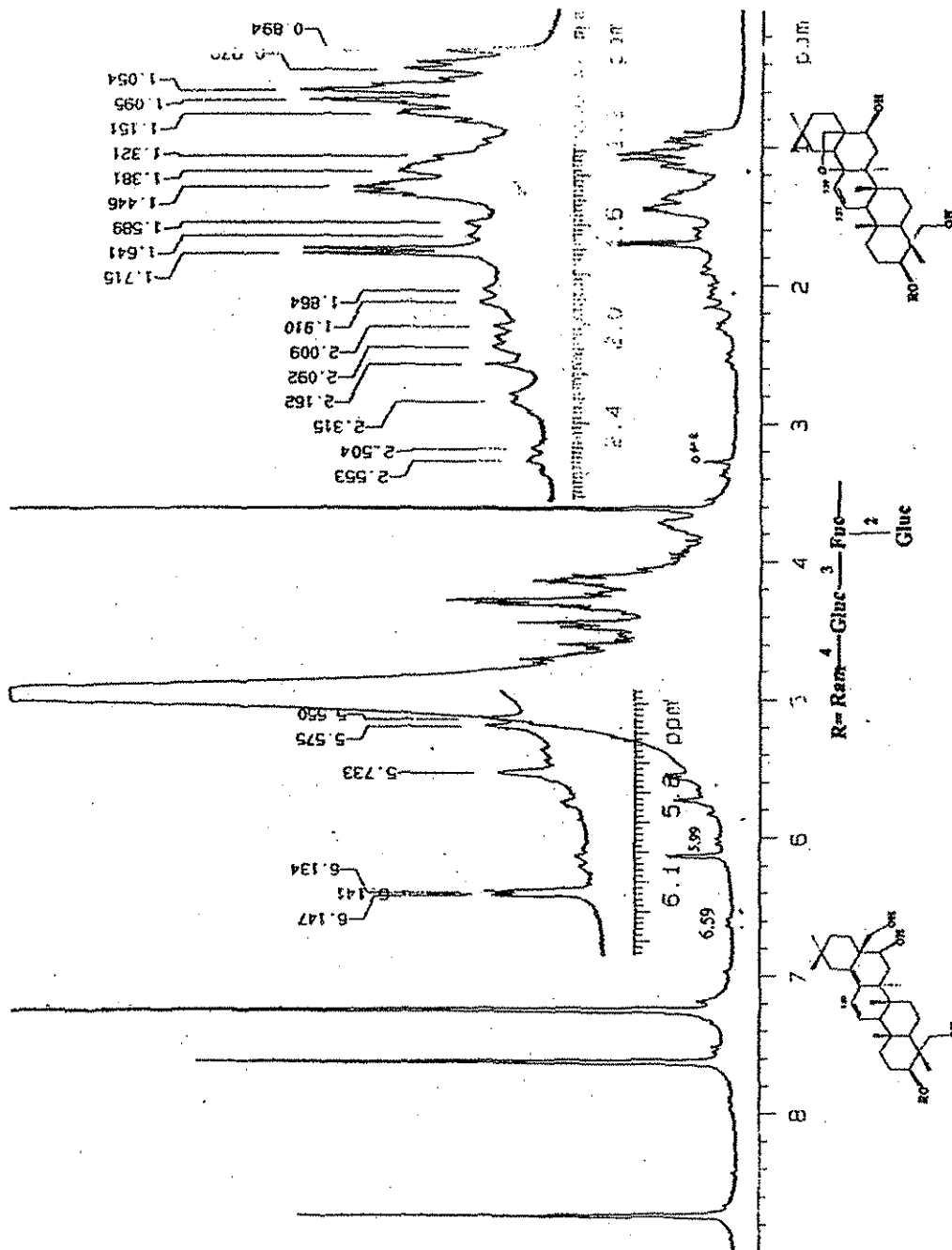
Espectro 18.- Espectro de Masas de la Syringina.



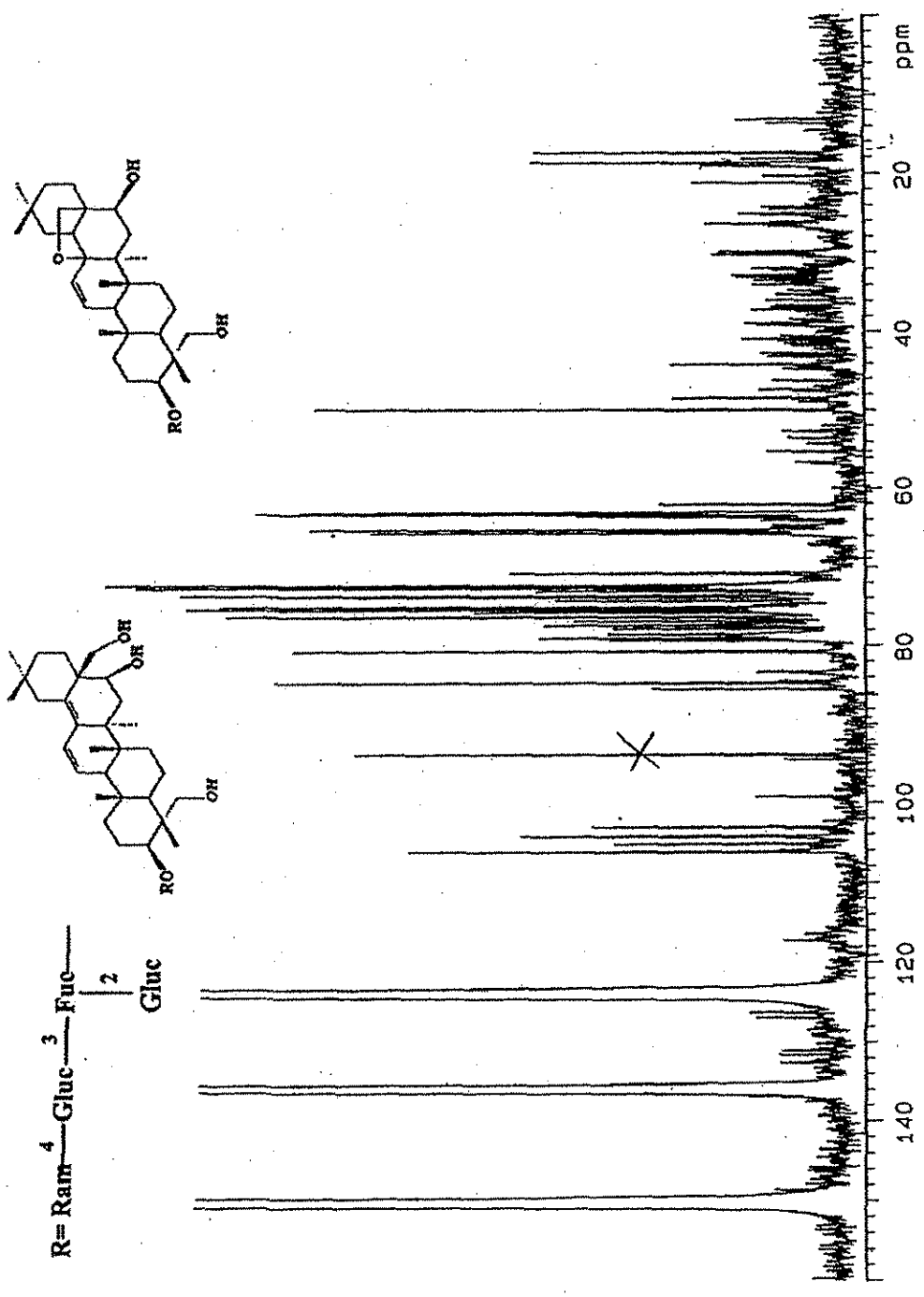
Espectro 19.- Espectro IR del O-Metil Catalpol.



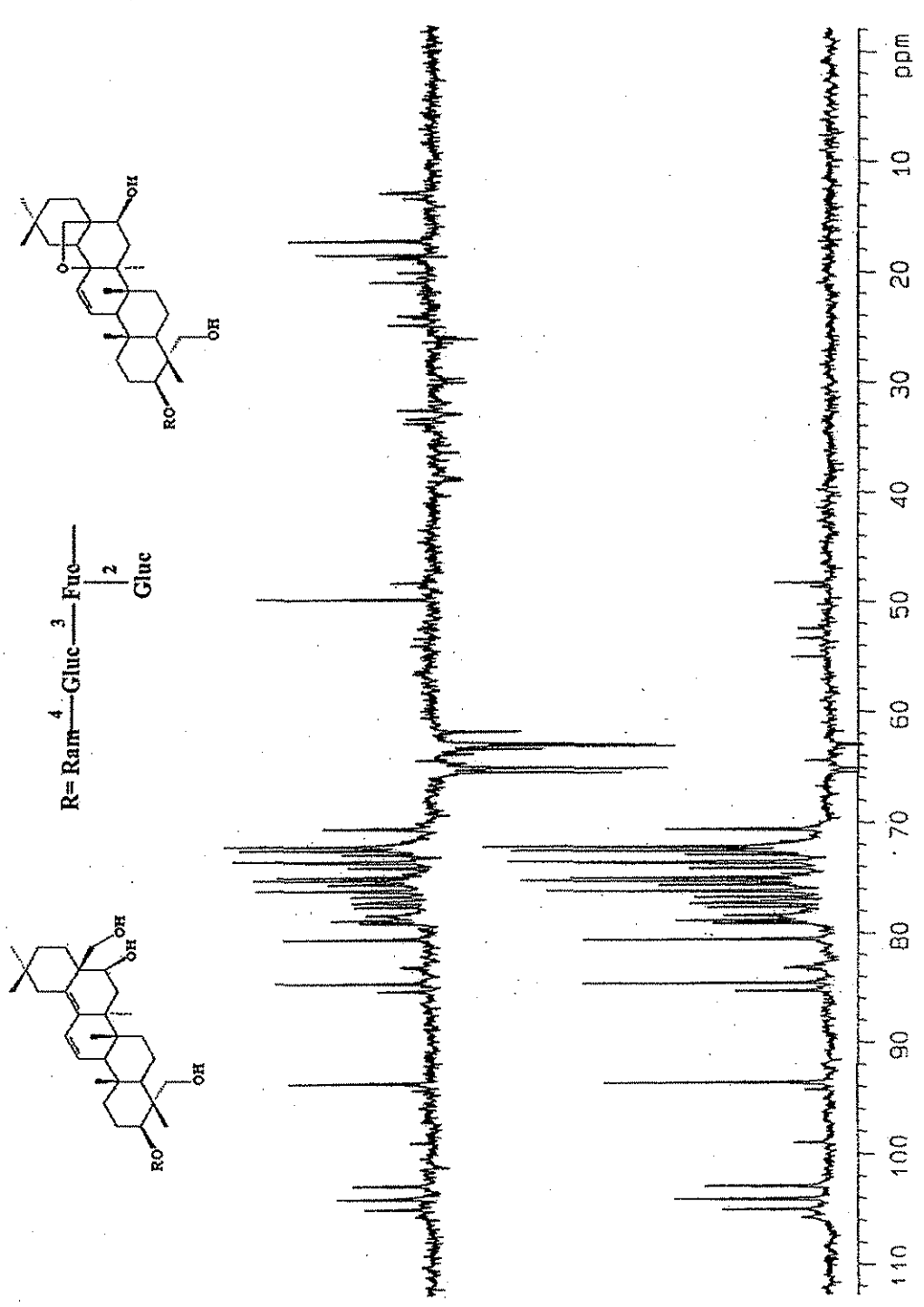
Espectro 20.- Espectro IR de la Mezcla de Saponinas.



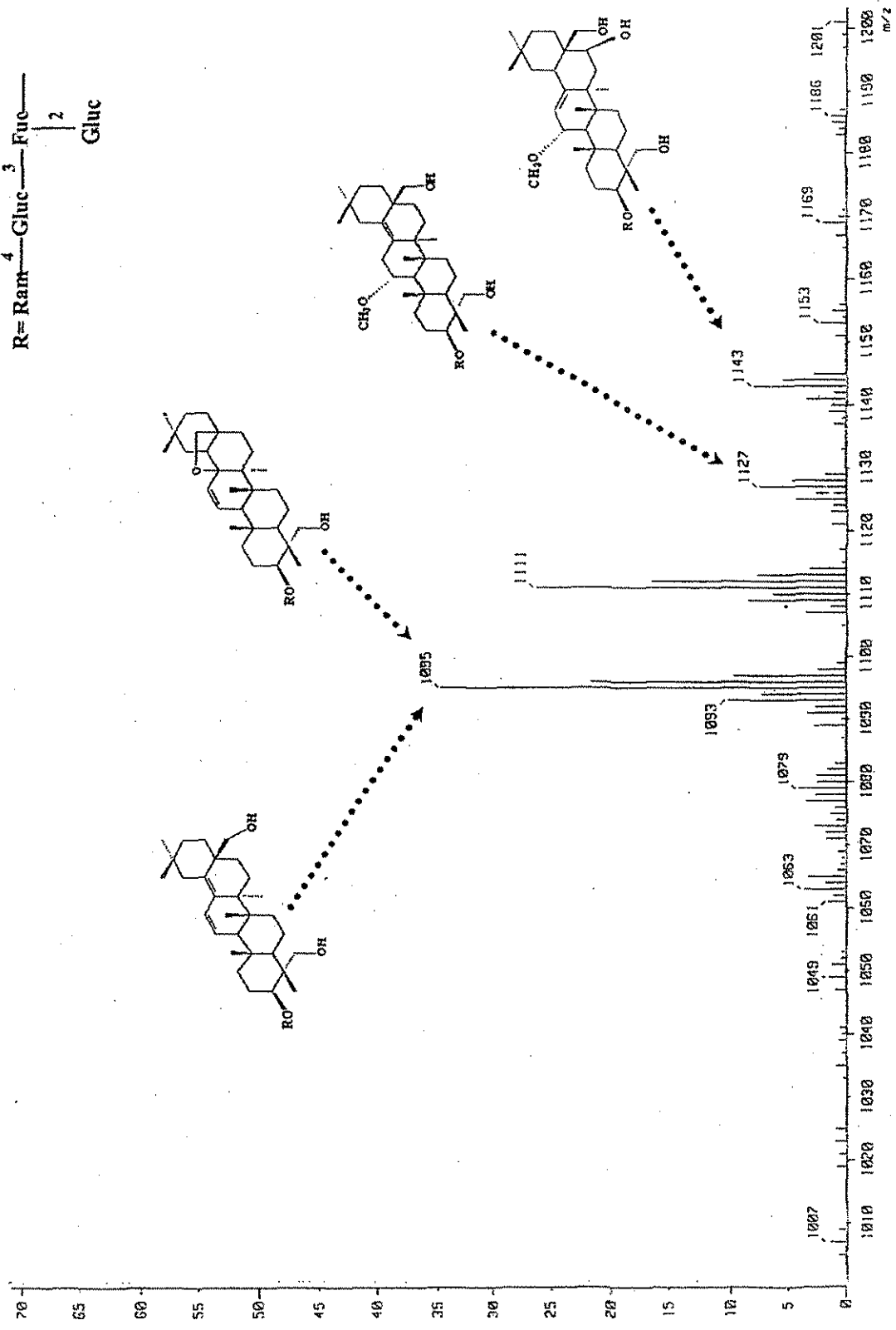
Espectro 21.- Espectro de RMN protónica de la mezcla de saponinas



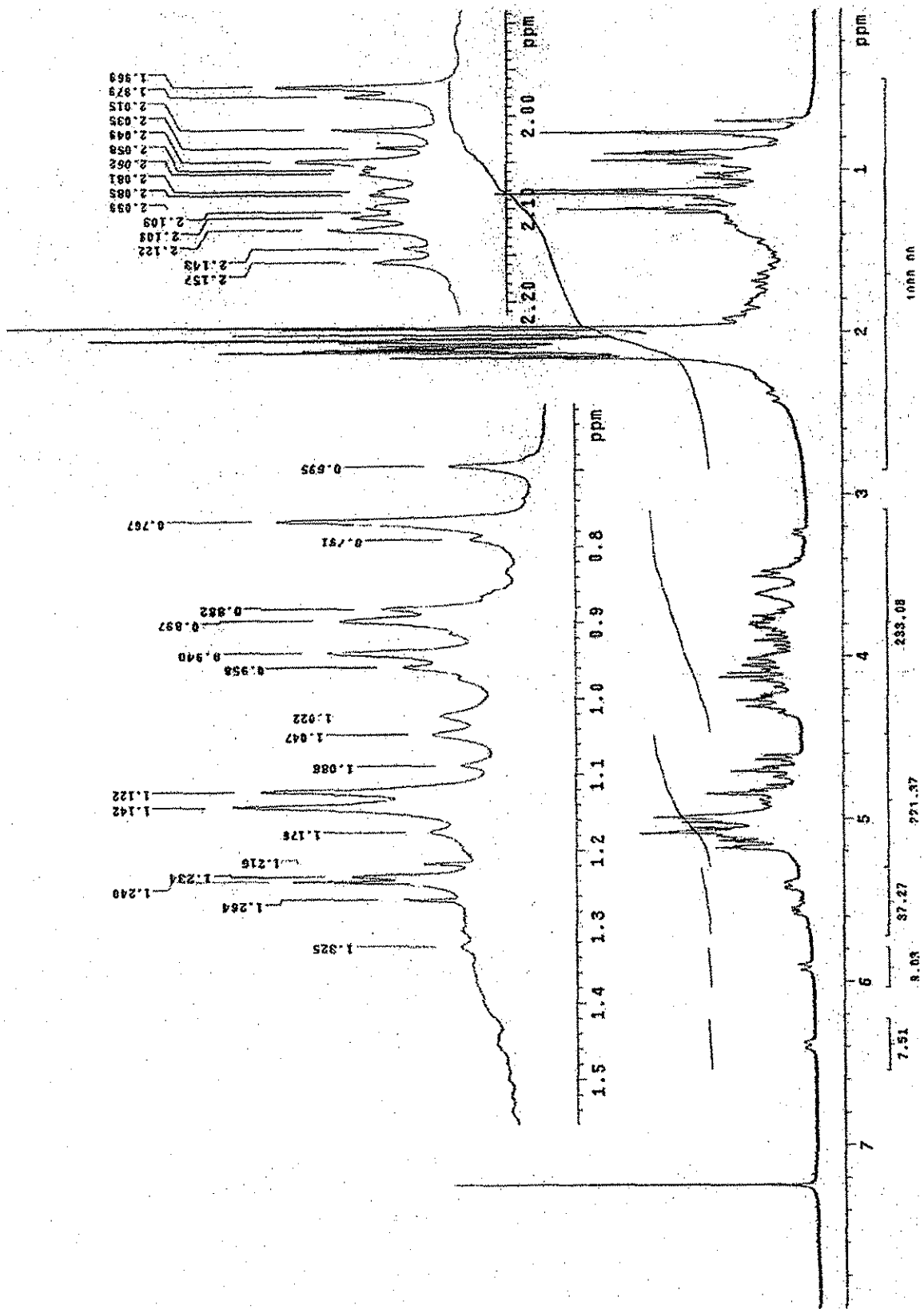
Espectro 22.- Espectro de RMN de Carbono-13 de la Mezcla de Saponinas.



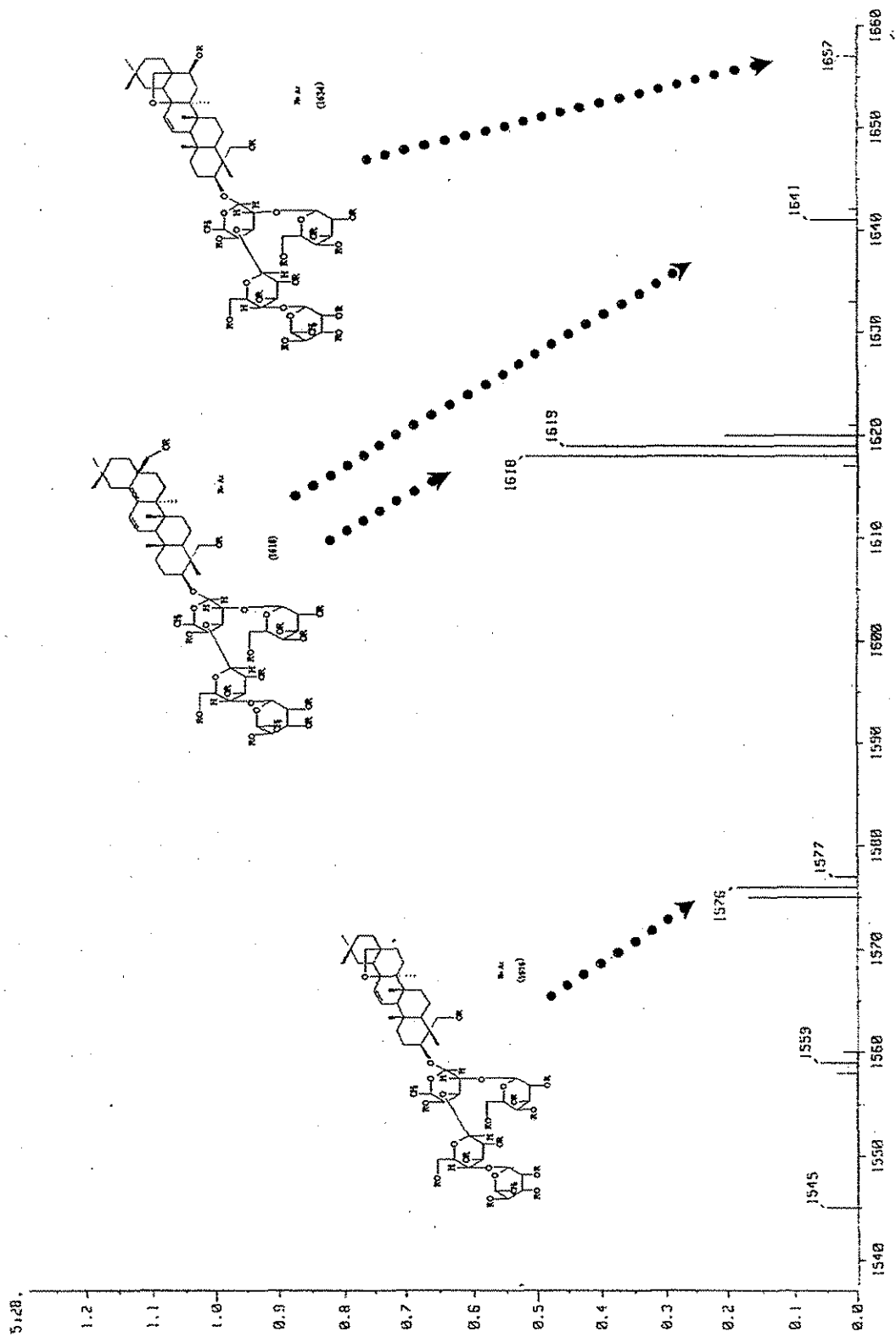
Espectro 23.- Espectro DEPT de la Mezcla de Saponinas.



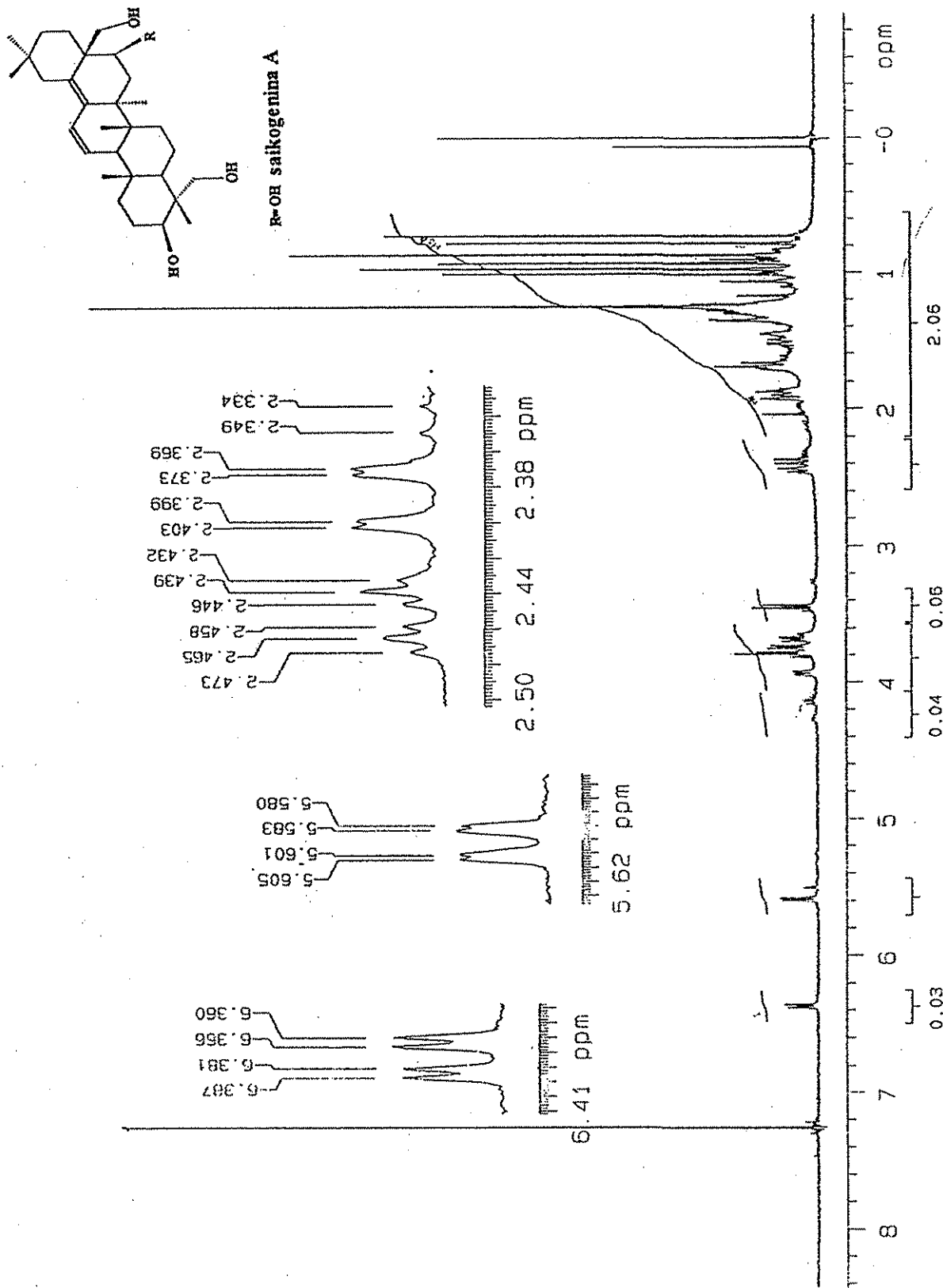
Espectro 24.- Espectro de Masas de la Mezcla de Saponinas



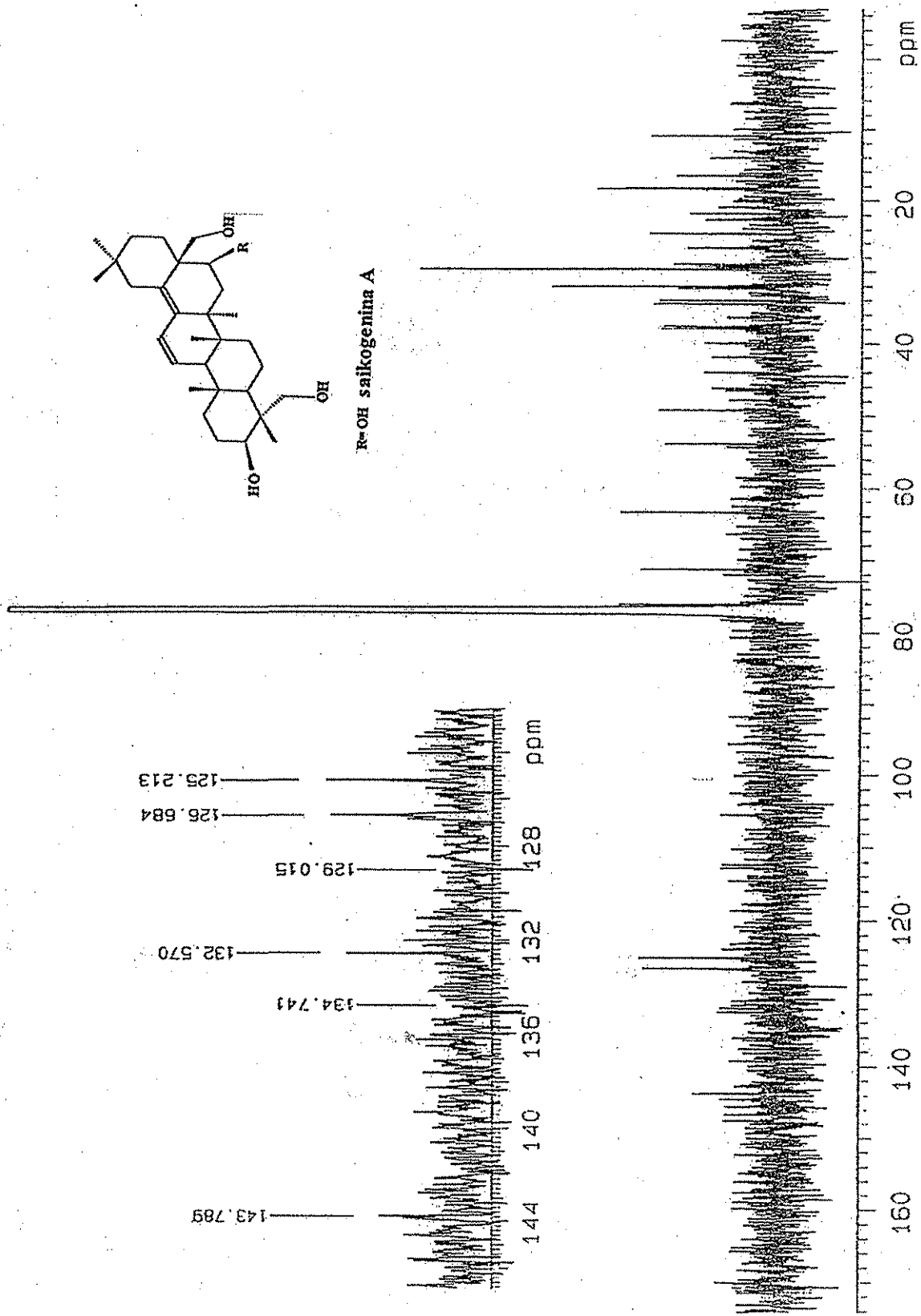
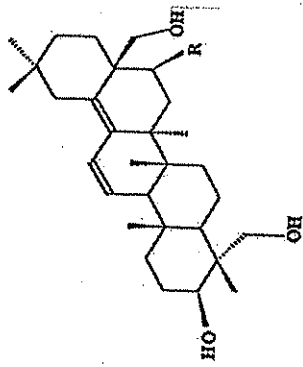
Espectro 25.- Espectro de RMN protónica de la Mezcla de Saponinas Acetiladas



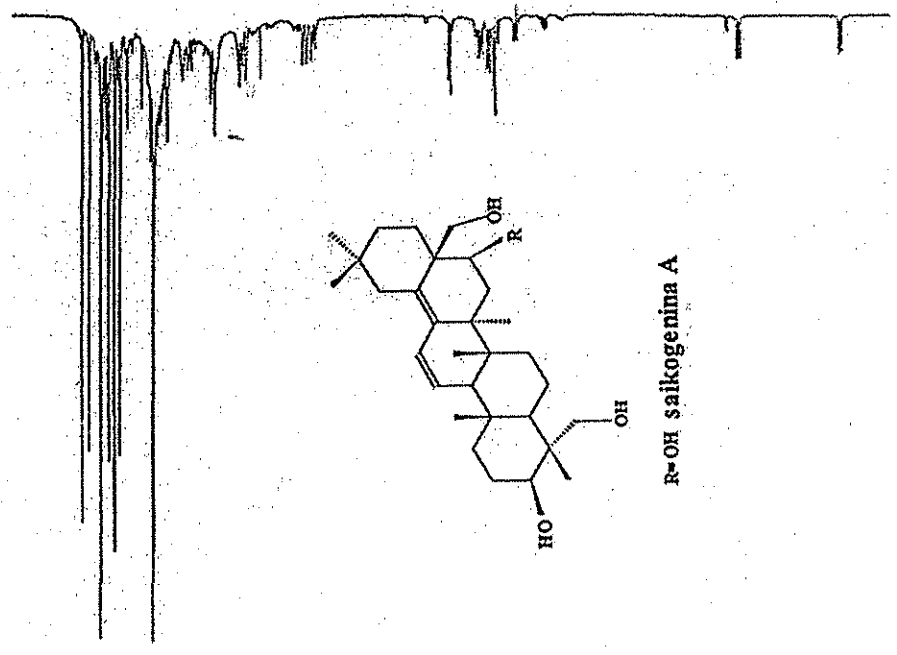
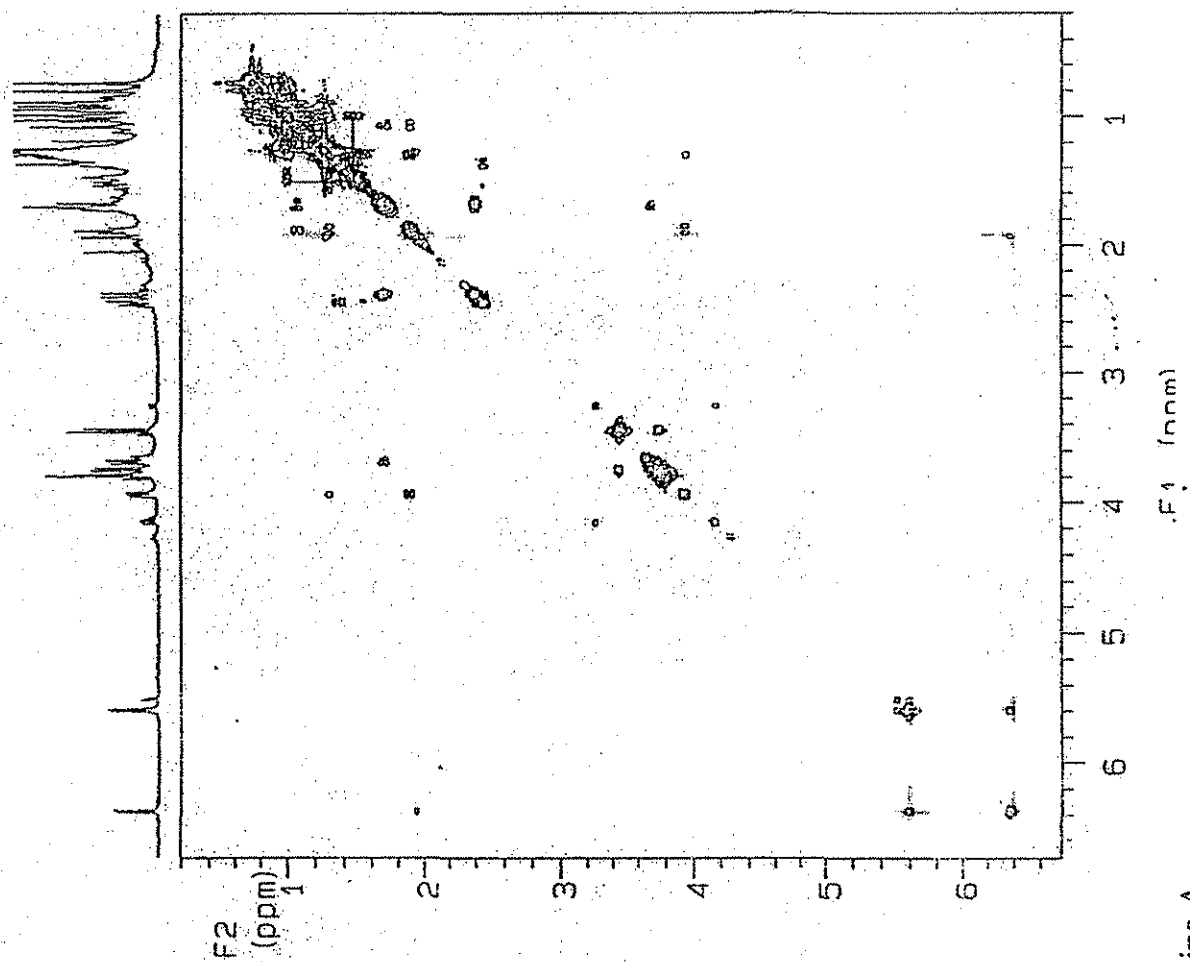
Espectro 27.-Espectro de Masas de la Mezcla de Saponinas Acetiladas



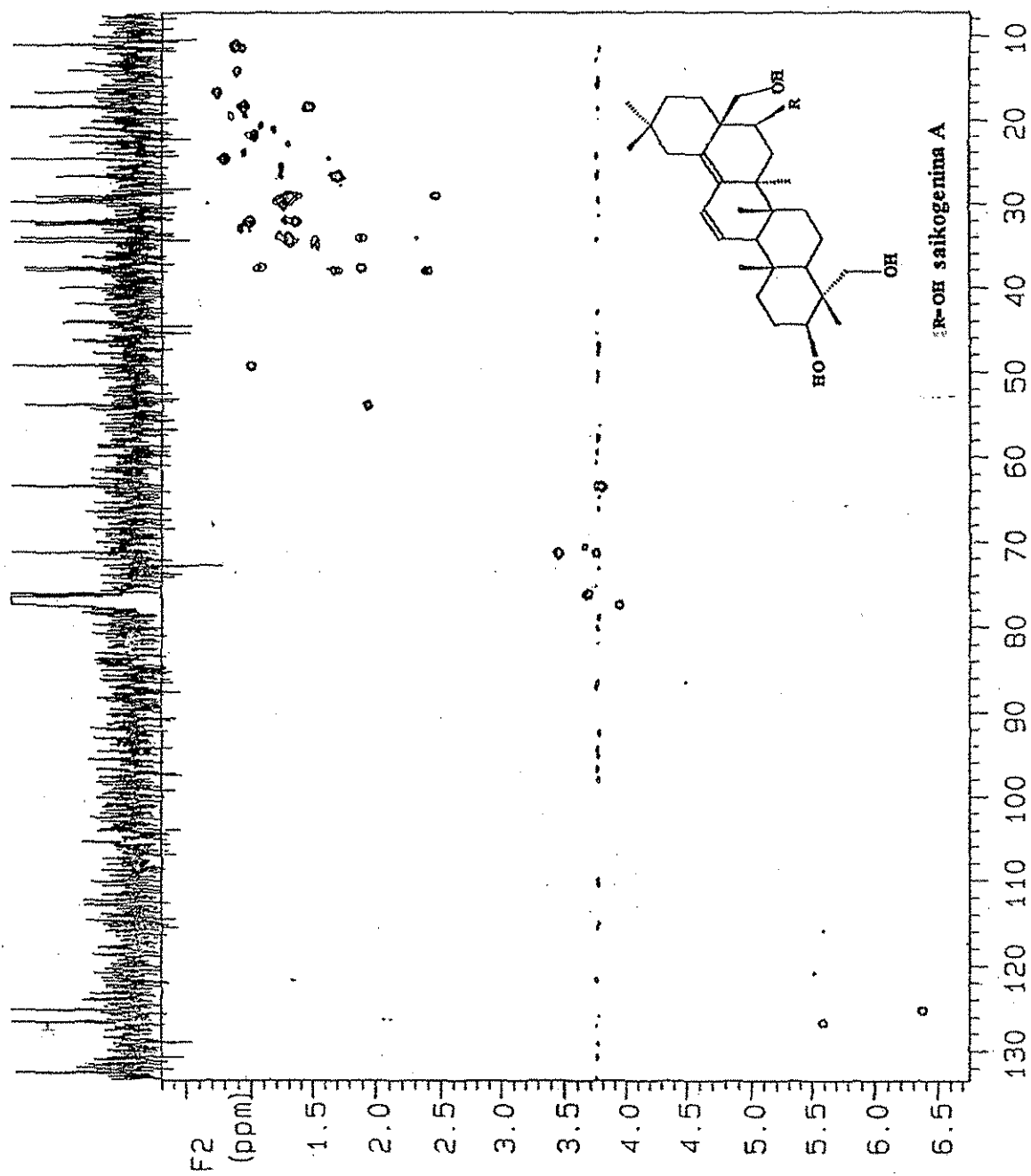
Espectro 28.- Espectro de RMN Protónica de la Saikogenina A



Espectro 29.- Espectro de RMN de Carbono-13 de la Saikogenina A

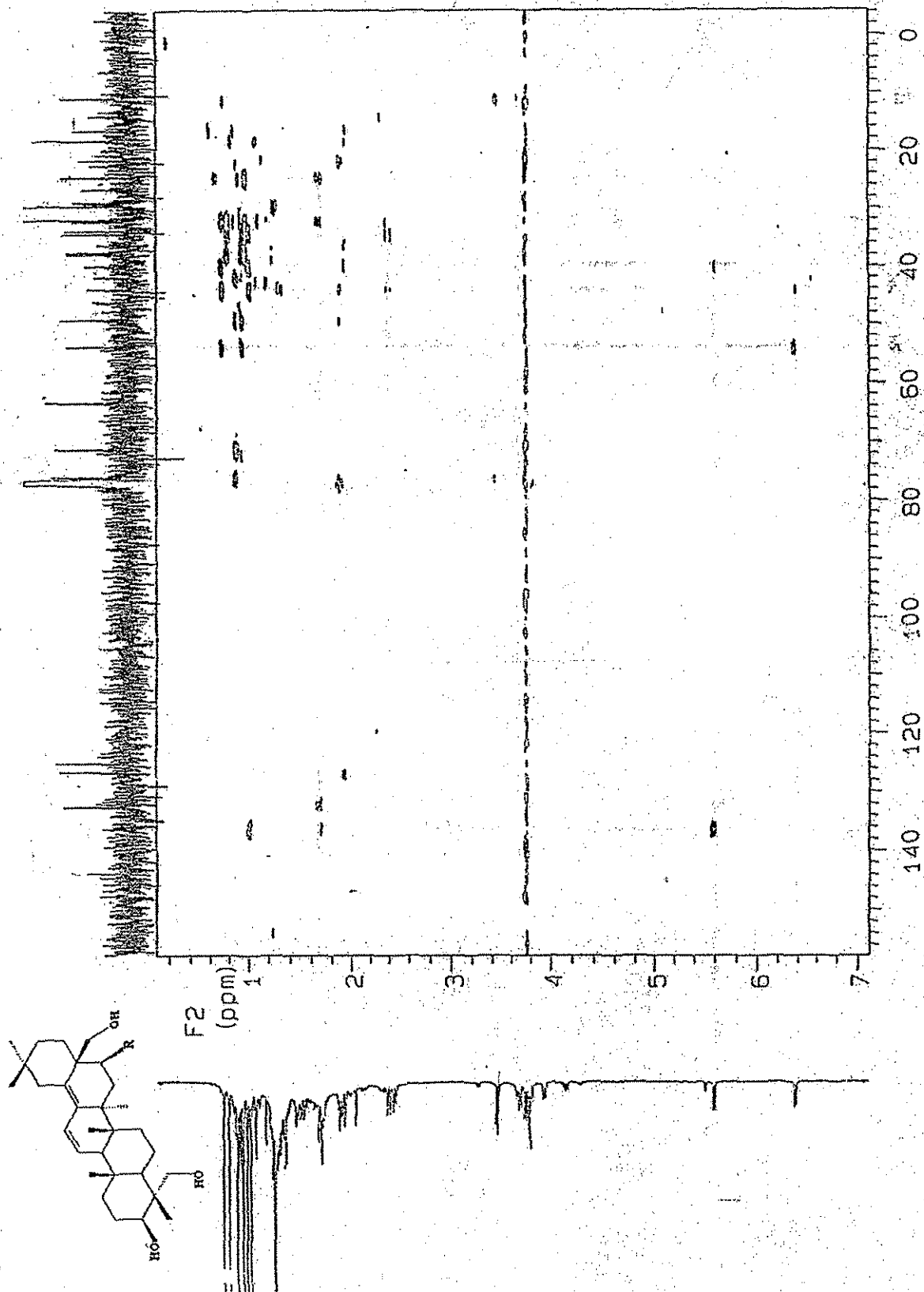


Espectro 30.- Espectro COSY de la Saikogenina A.

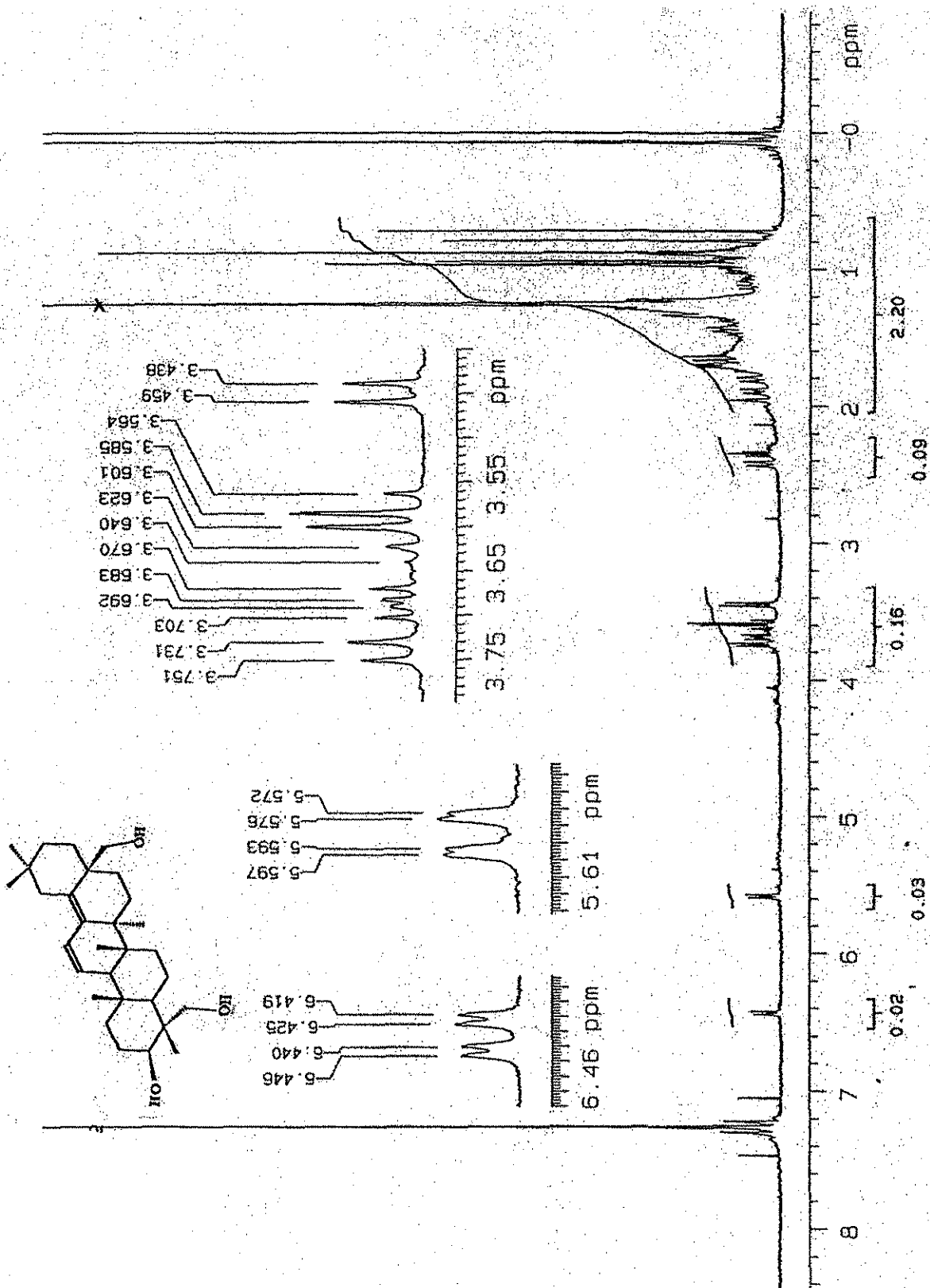


F1 (ppm)

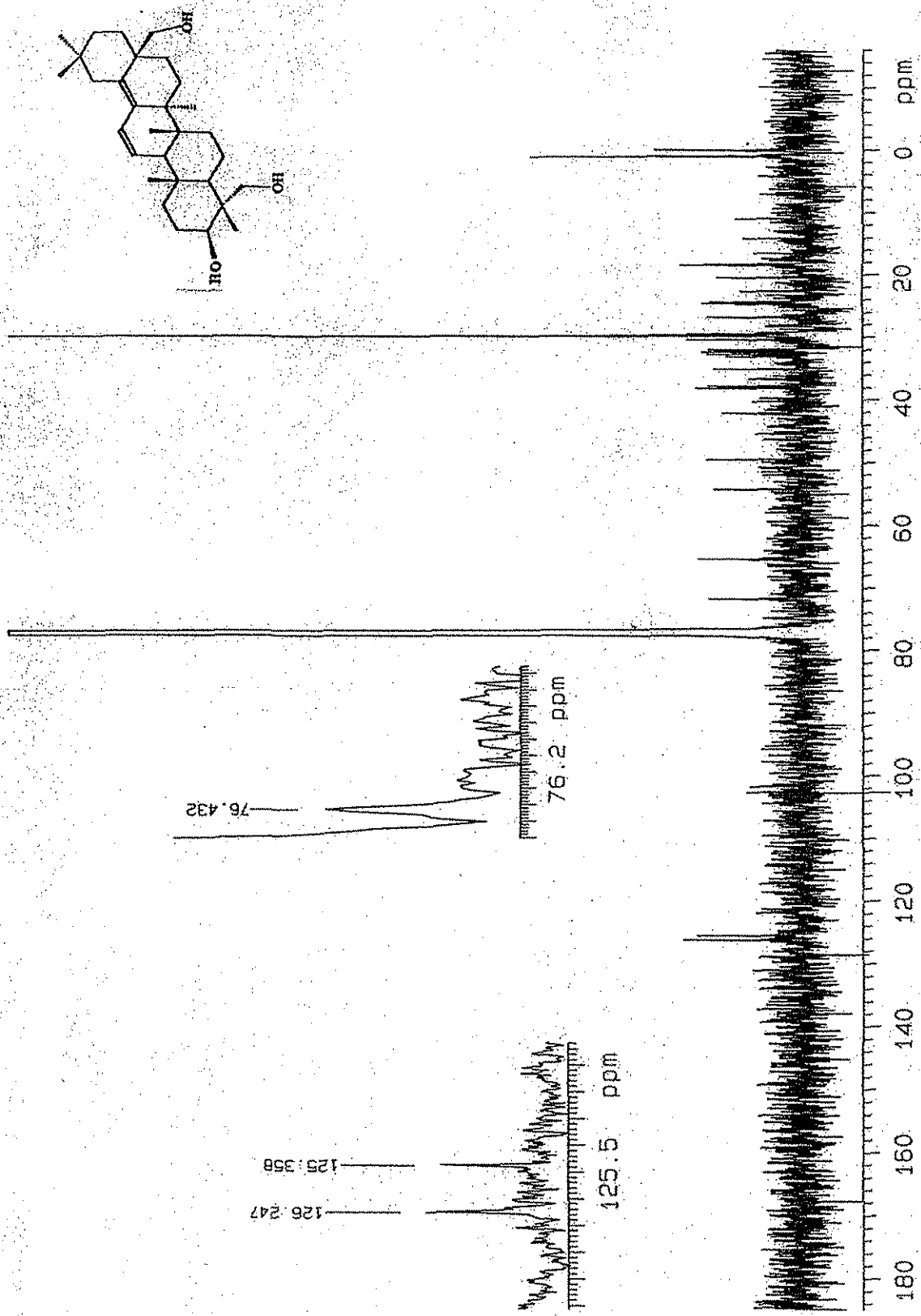
Espectro 31.- Espectro HMQC de la Saikogenina A



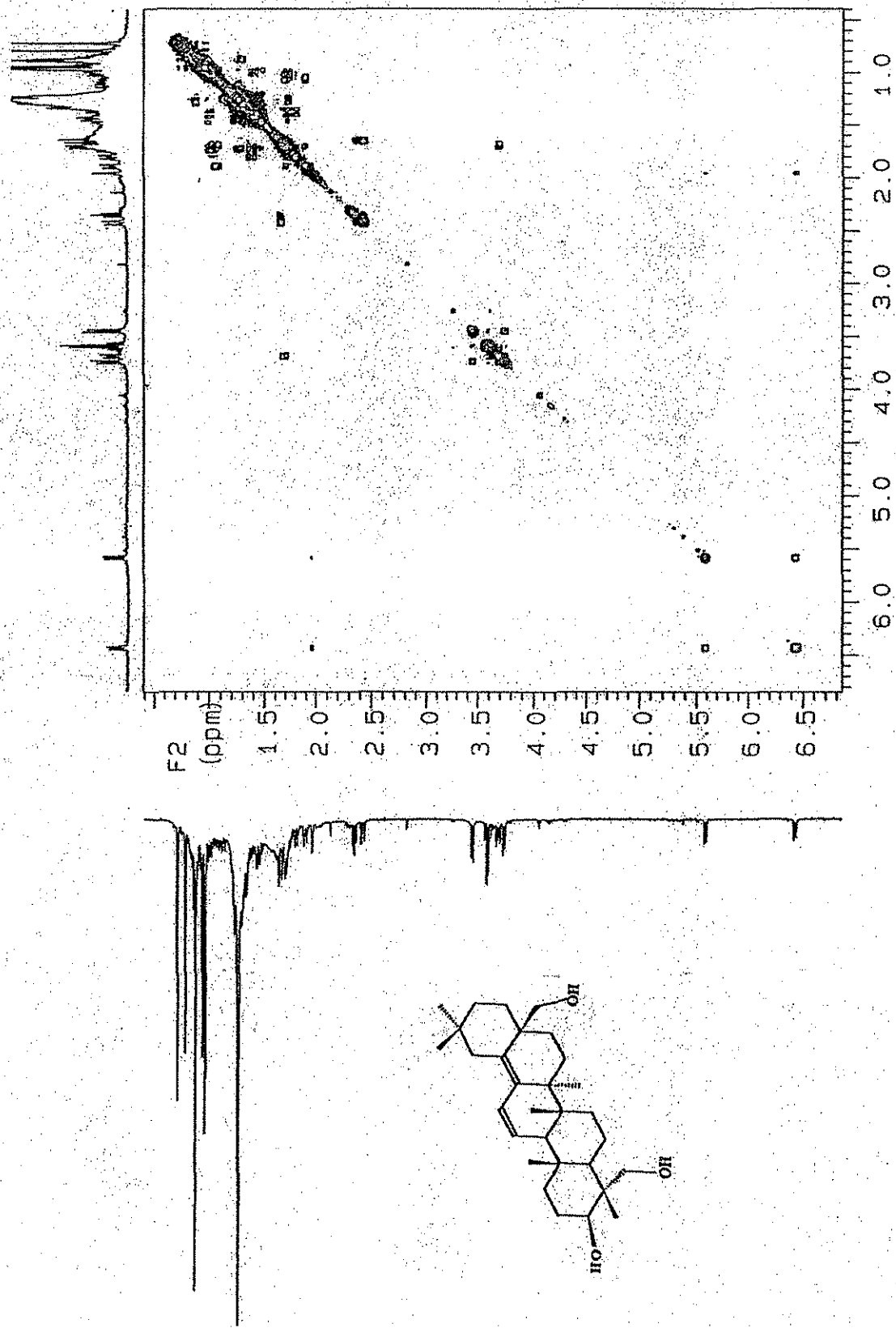
Espectro 32.- Espectro HMBC de la Saikogenina A



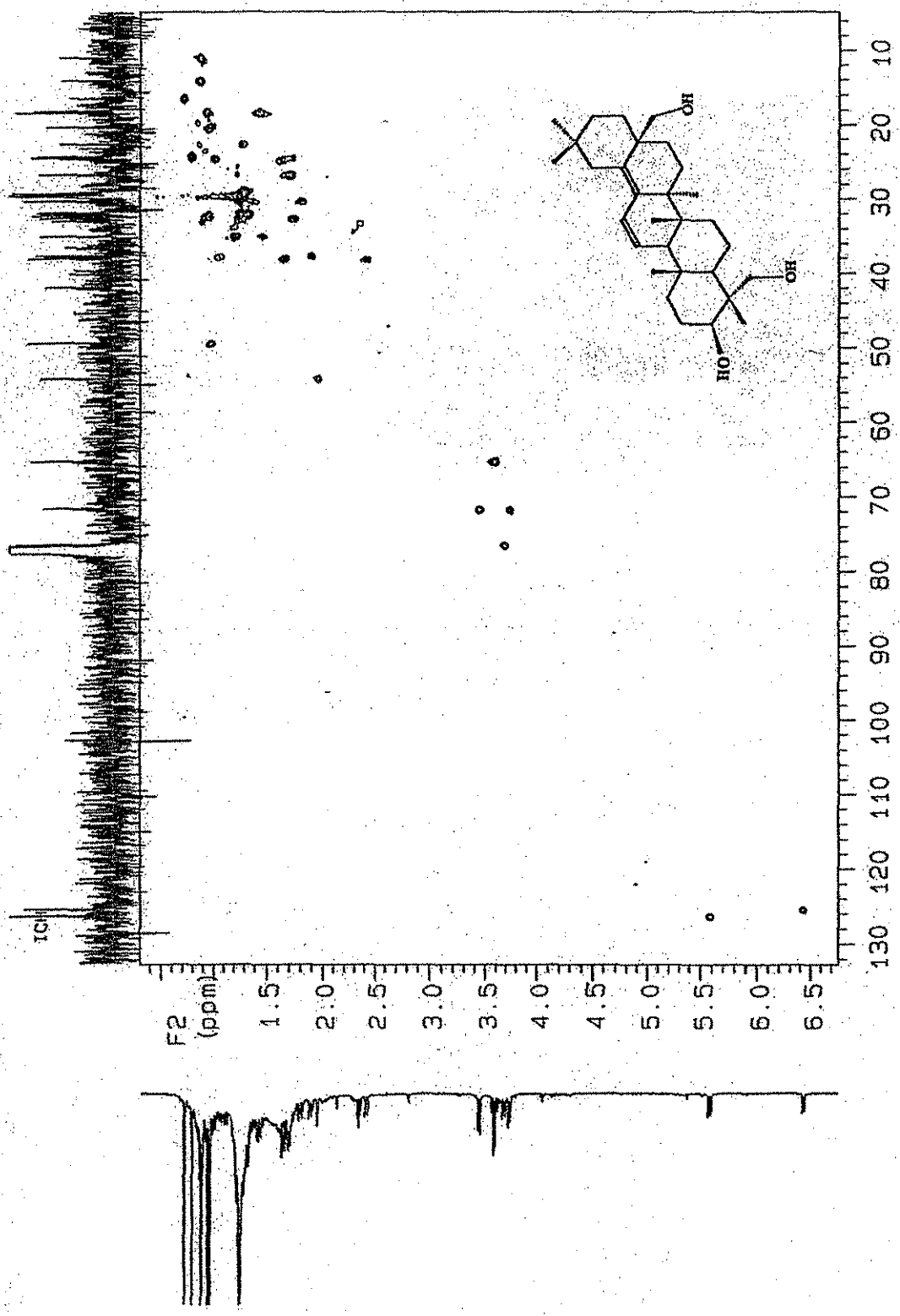
Espectro 33.- Espectro de RMN Protónica del 3, 23, 28 -Trihidroxiolean-11, 13(18)-dieno.



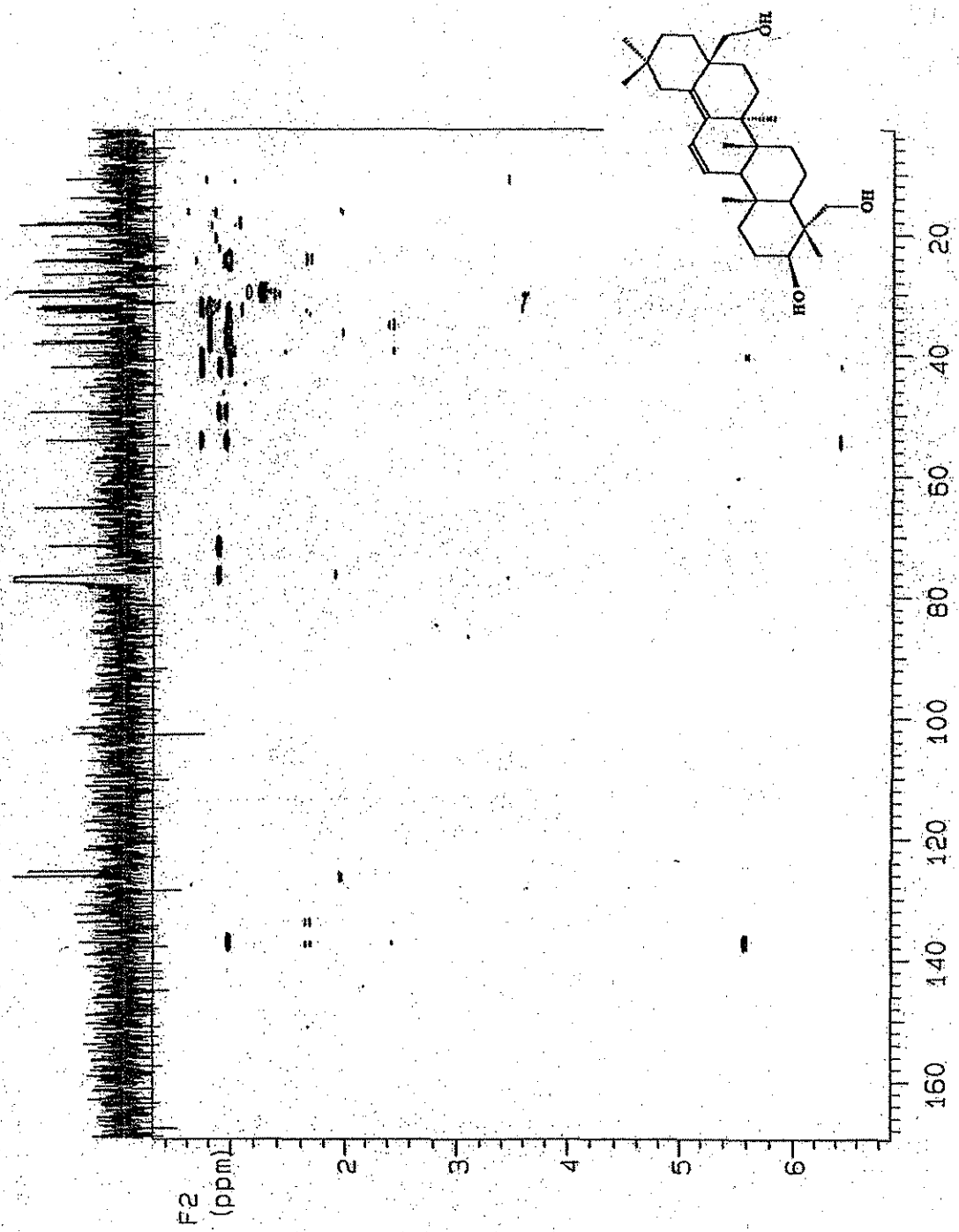
Espectro 34.- Espectro de RMN de Carbono-13 del 3, 23, 28-Trihidroxiolean-1, 13(18)-diene.



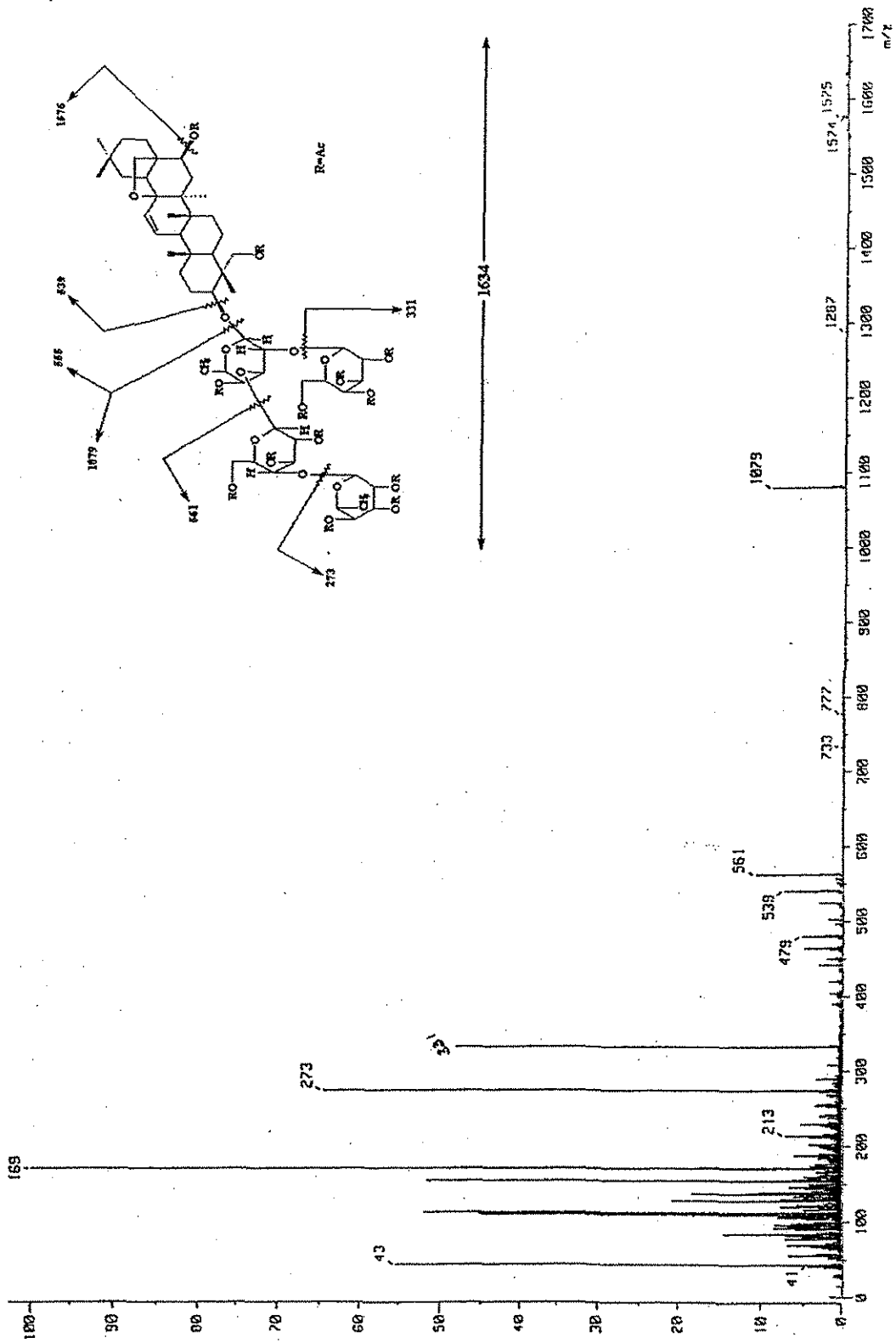
Espectro 35.- Espectro COSY del 3, 23, 28-Trihidroxiolean-11,13(18)-dieno.



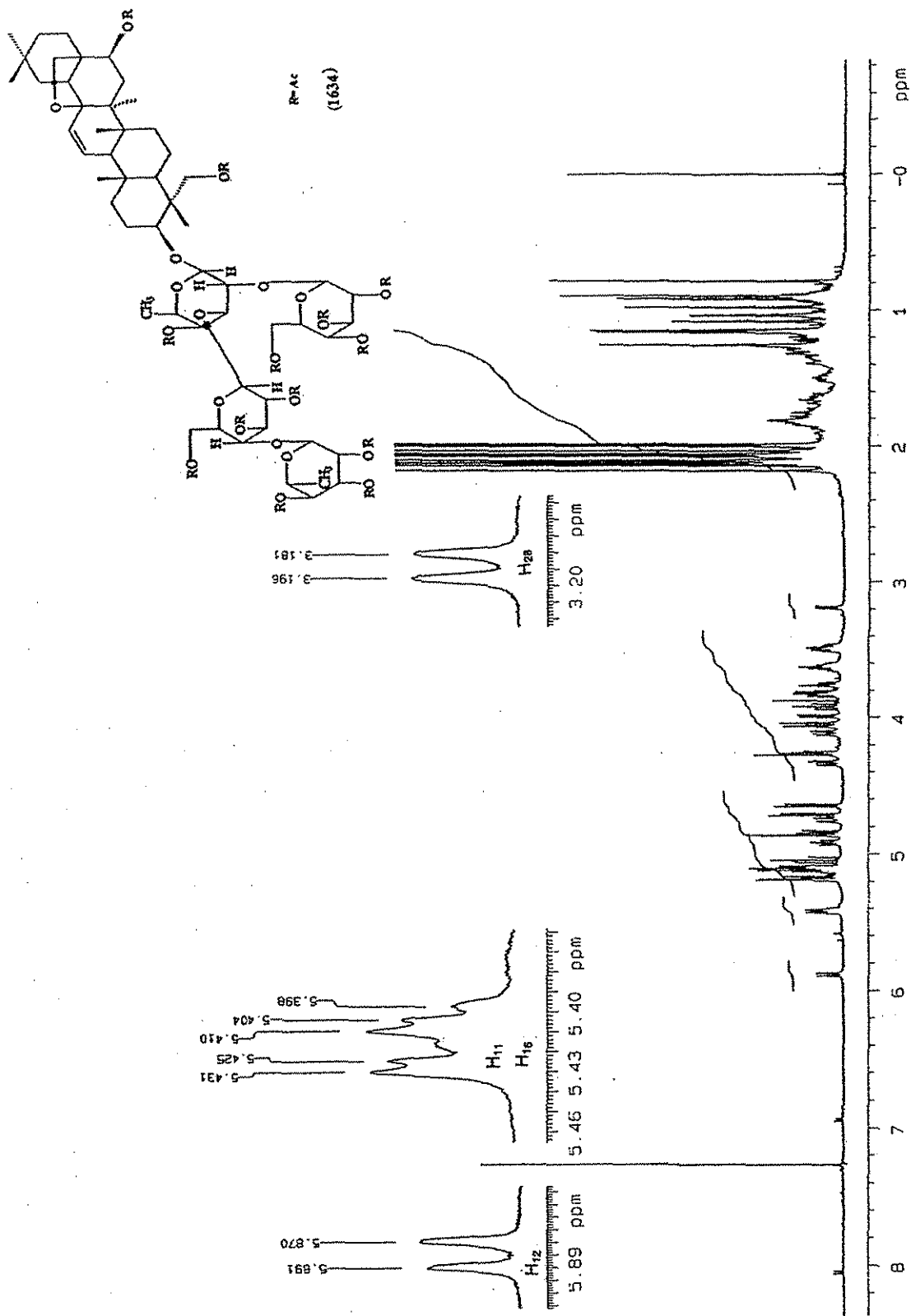
Espectro 36.- Espectro HMQC del 3, 23, 28-Trihidroxiolean-11, 13(18)-dieno.



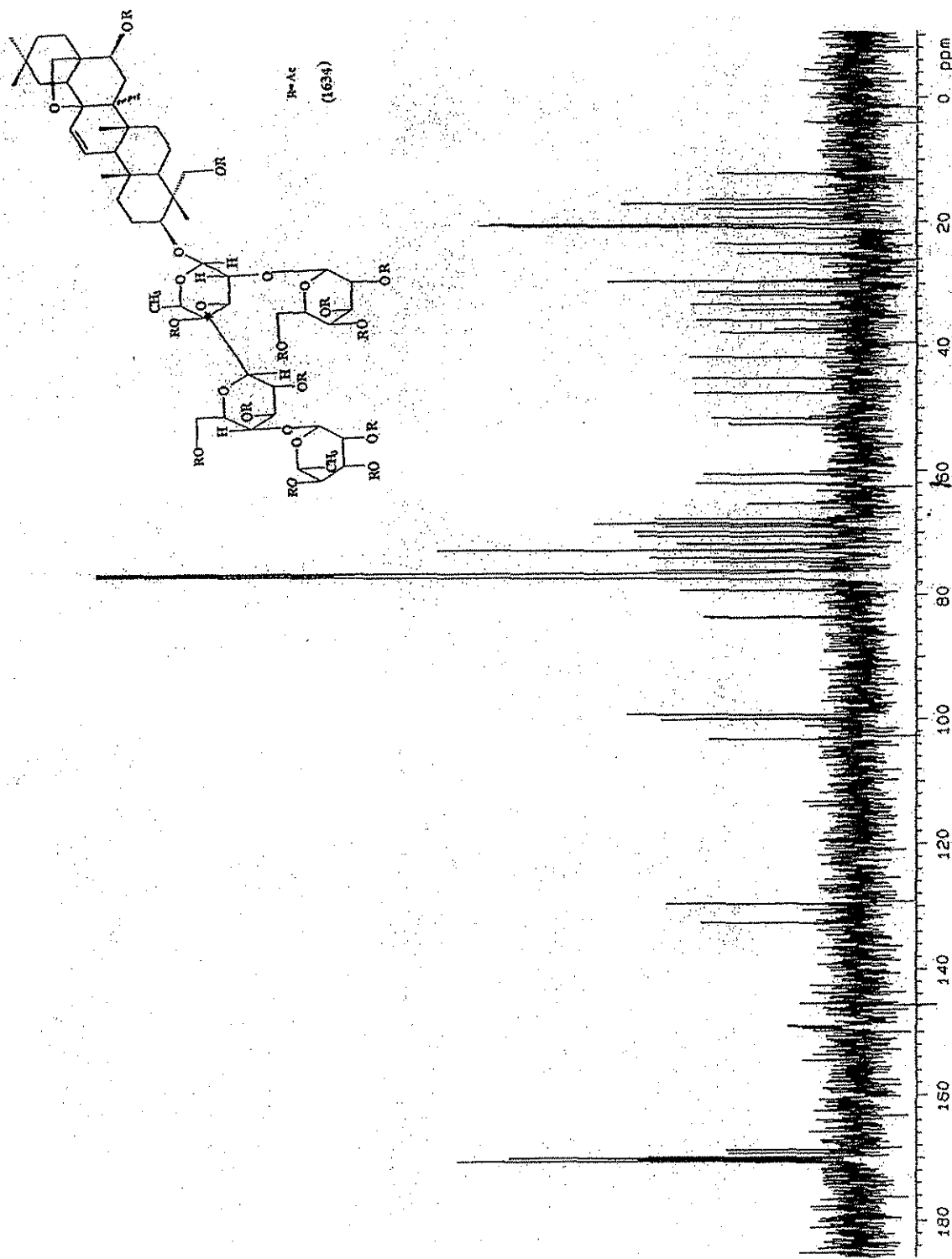
Espectro 37.- Espectro HMBC del 3, 23, 28-Trihidroxiolean-11, 13(18)-dieno.



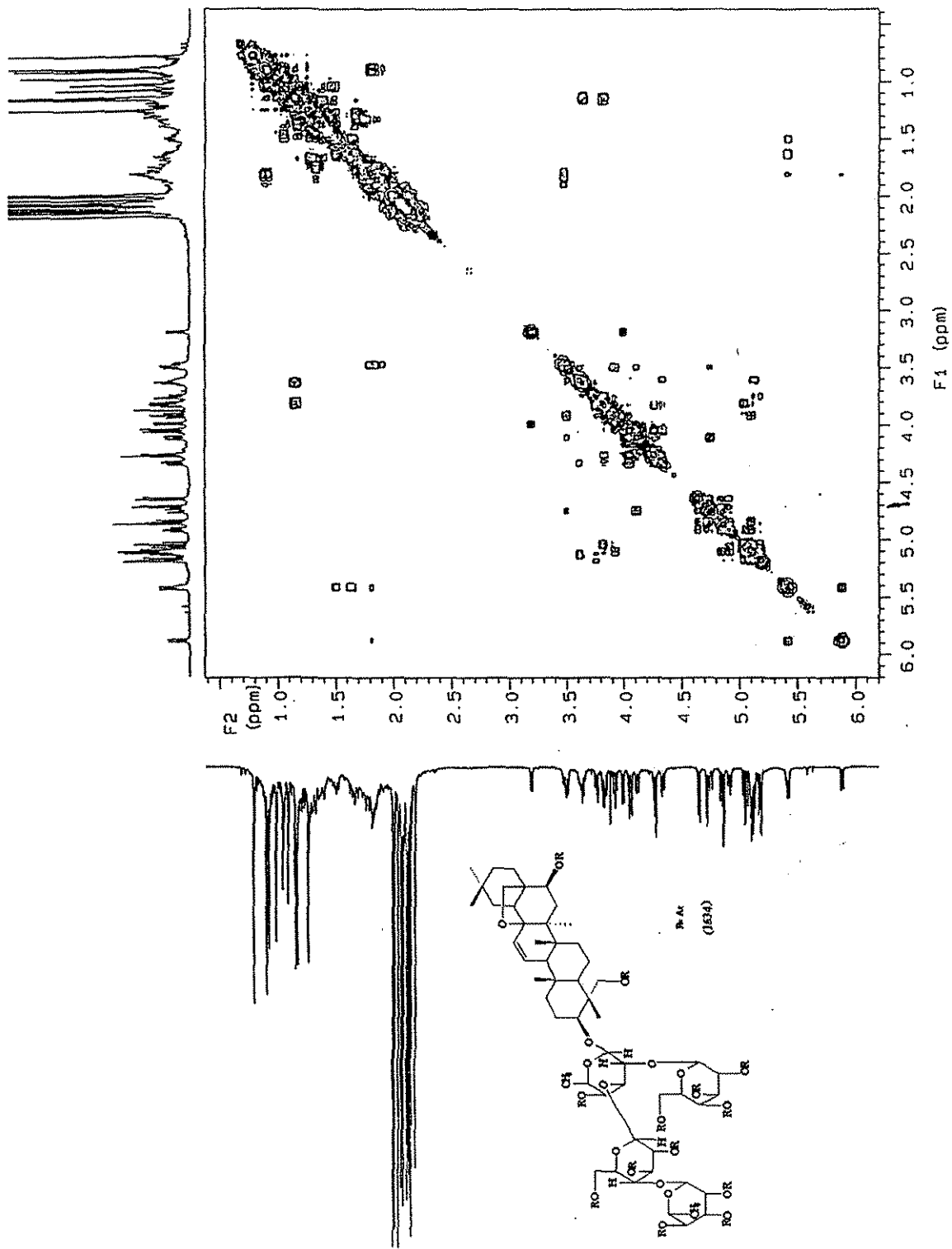
Espectro 38.- Espectro de Masas del peracetato de la Budlejasaponina I.



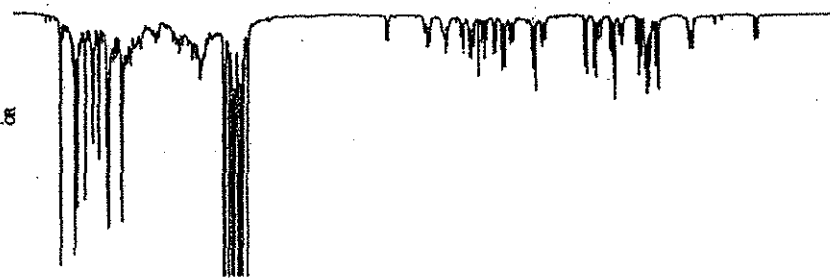
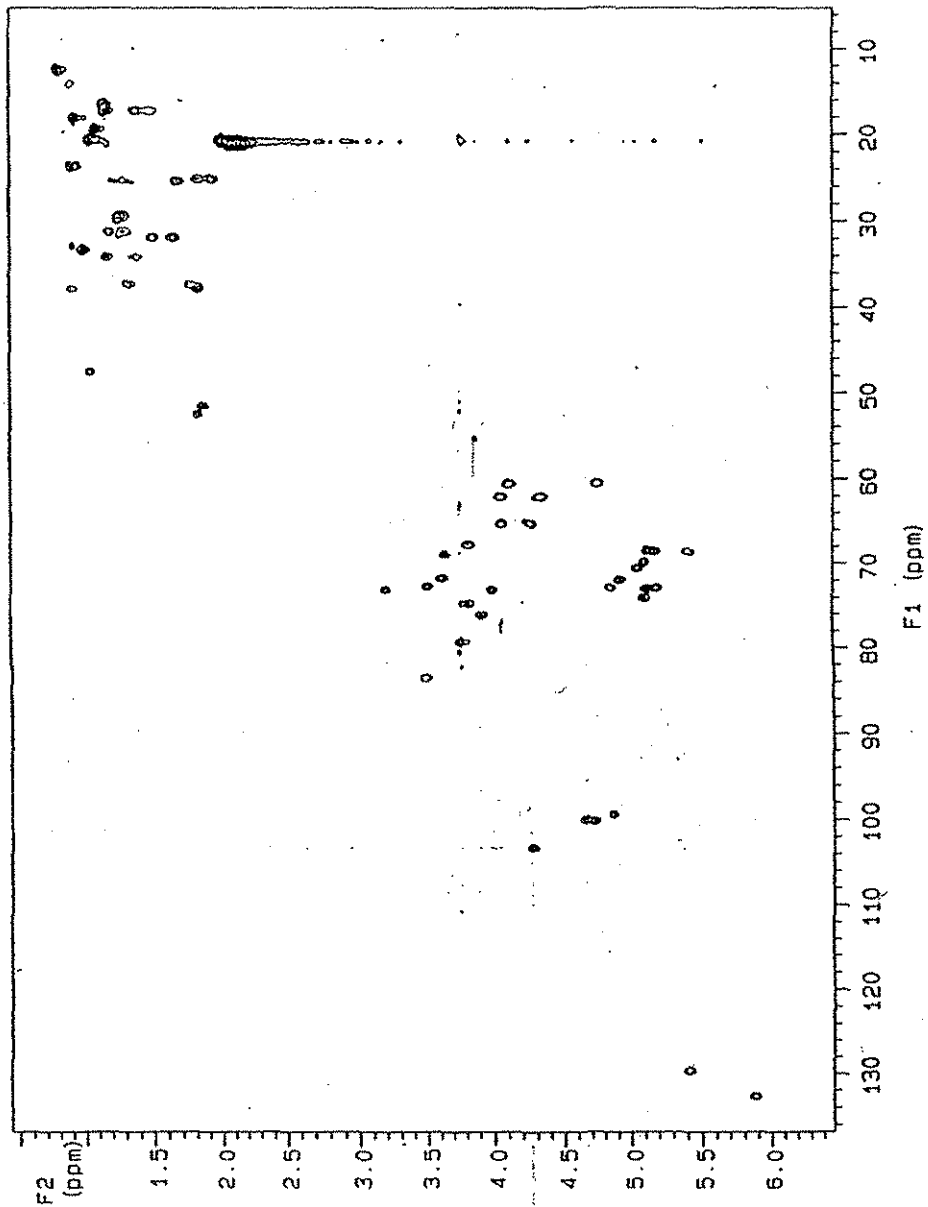
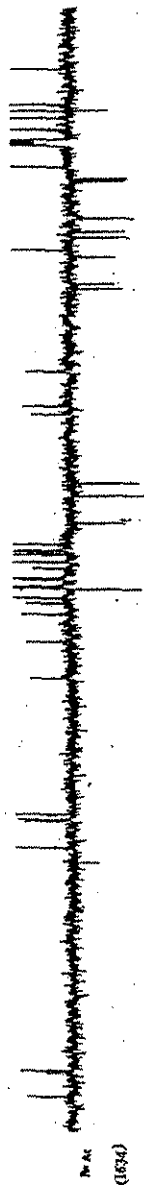
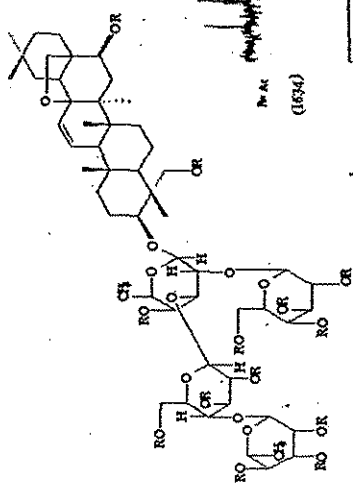
Espectro 39.- Espectro de RMN protónica del peracetato de la Budlejasonina I.



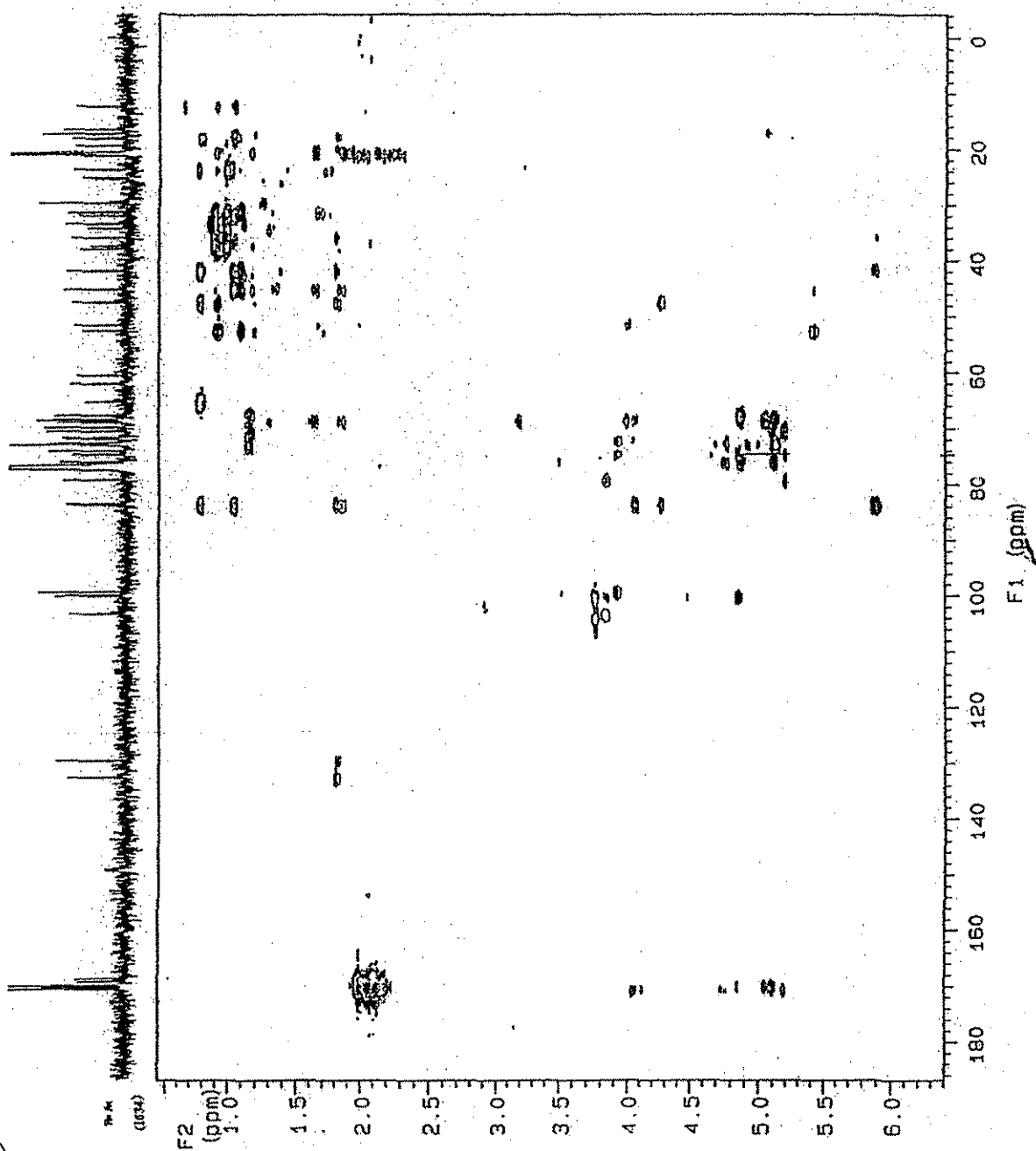
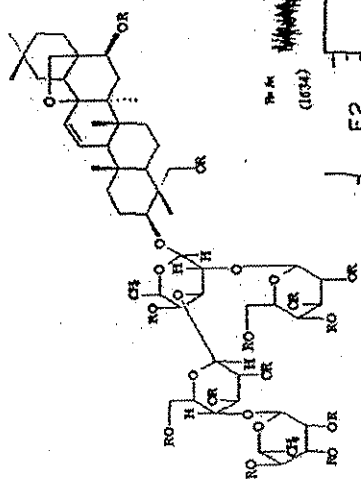
Espectro 40.- Espectro de RMN de Carbono-13 del peracetato de la Budlejasonina I.



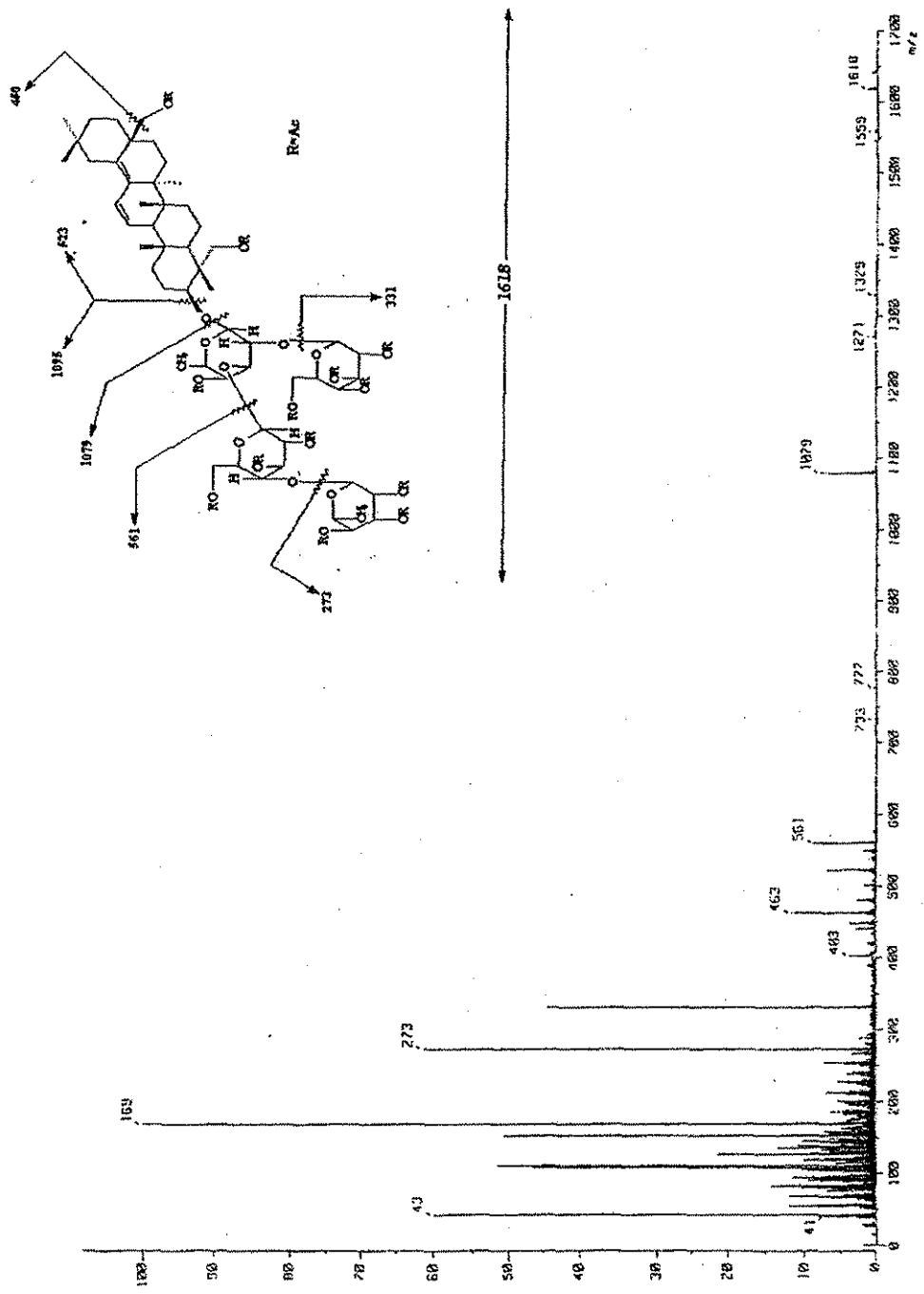
Espectro 41.- Espectro COSY del peracetato de la Budlejaponina I.



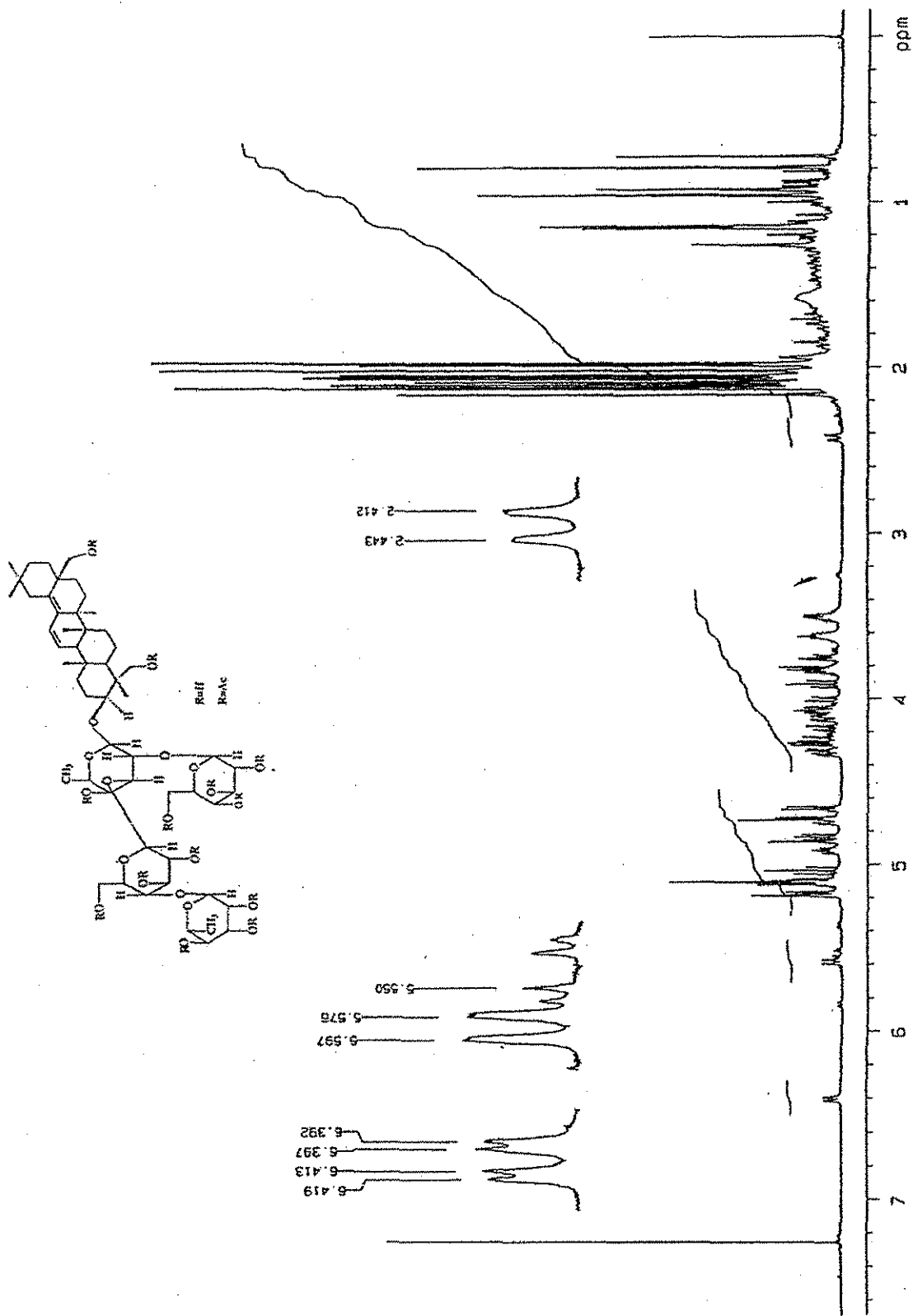
Espectro 42.- Espectro HMQC del peracetato de la Budlejaponina I.



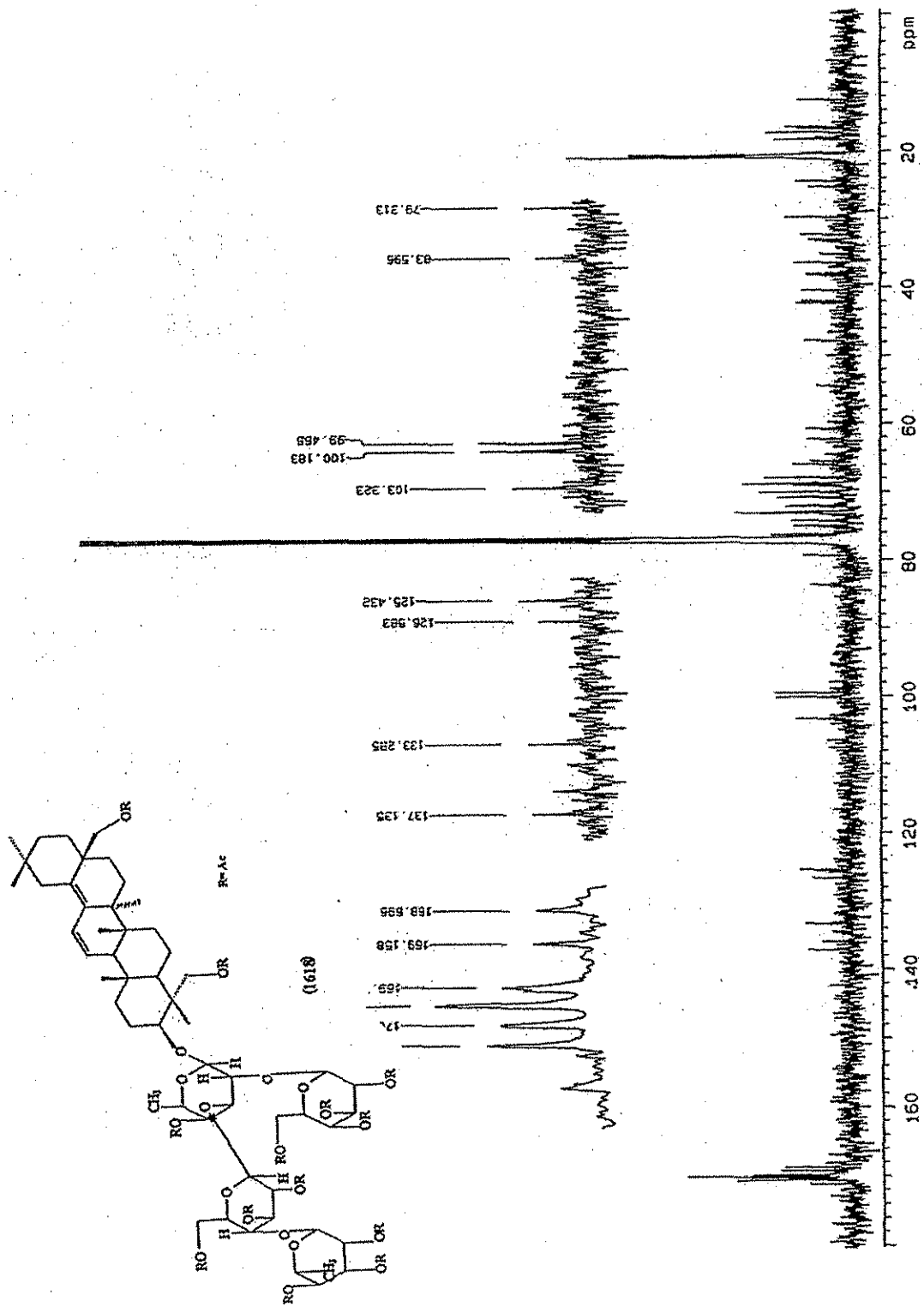
Espectro 43.- Espectro HMBC del peracetato de la Budlejaponina I.



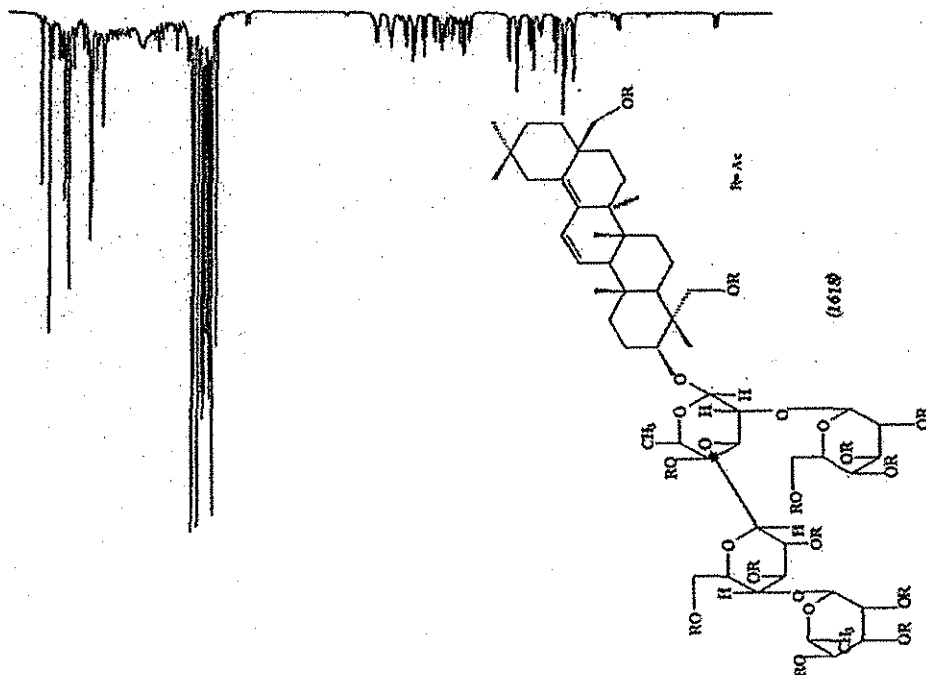
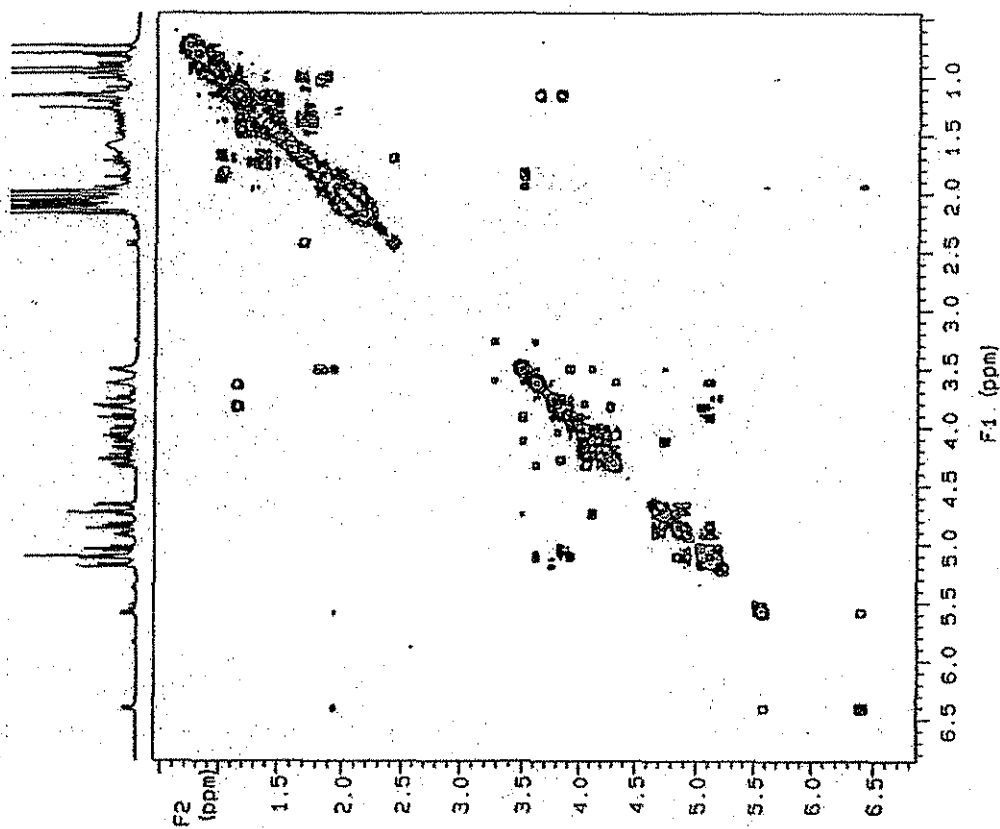
Espectro 44.- Espectro de masas del compuesto 13.



Espectro 45.- Espectro de RMN protónica del Compuesto 13.

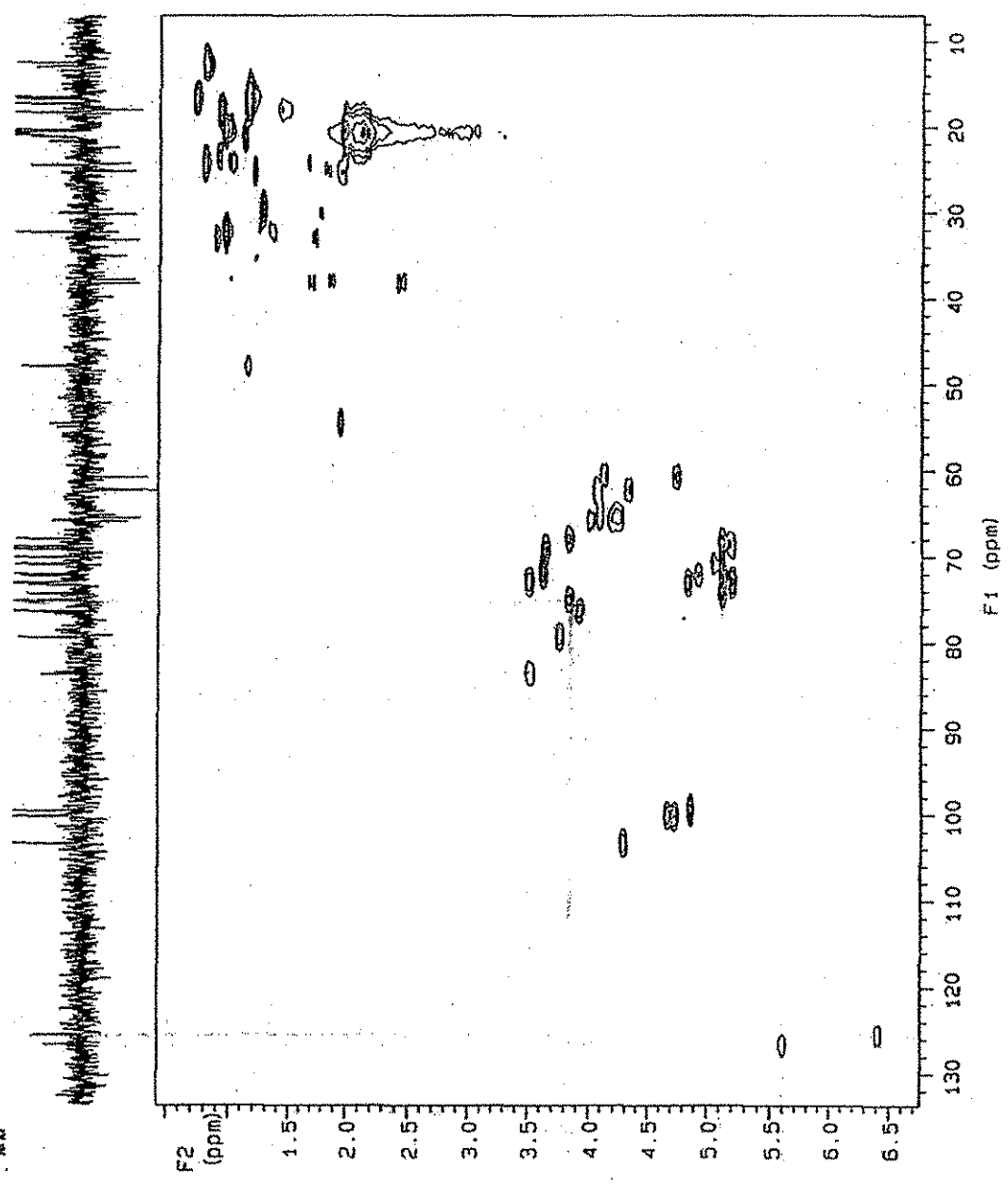
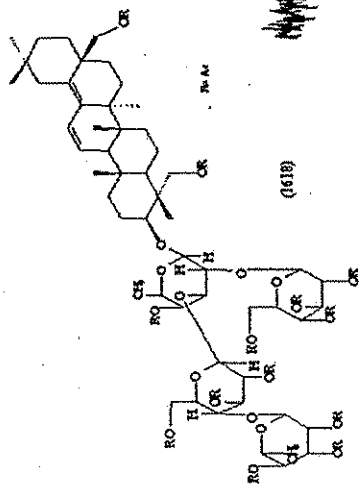


Espectro 46.- Espectro de RMN de Carbono-13 del Compuesto 13.

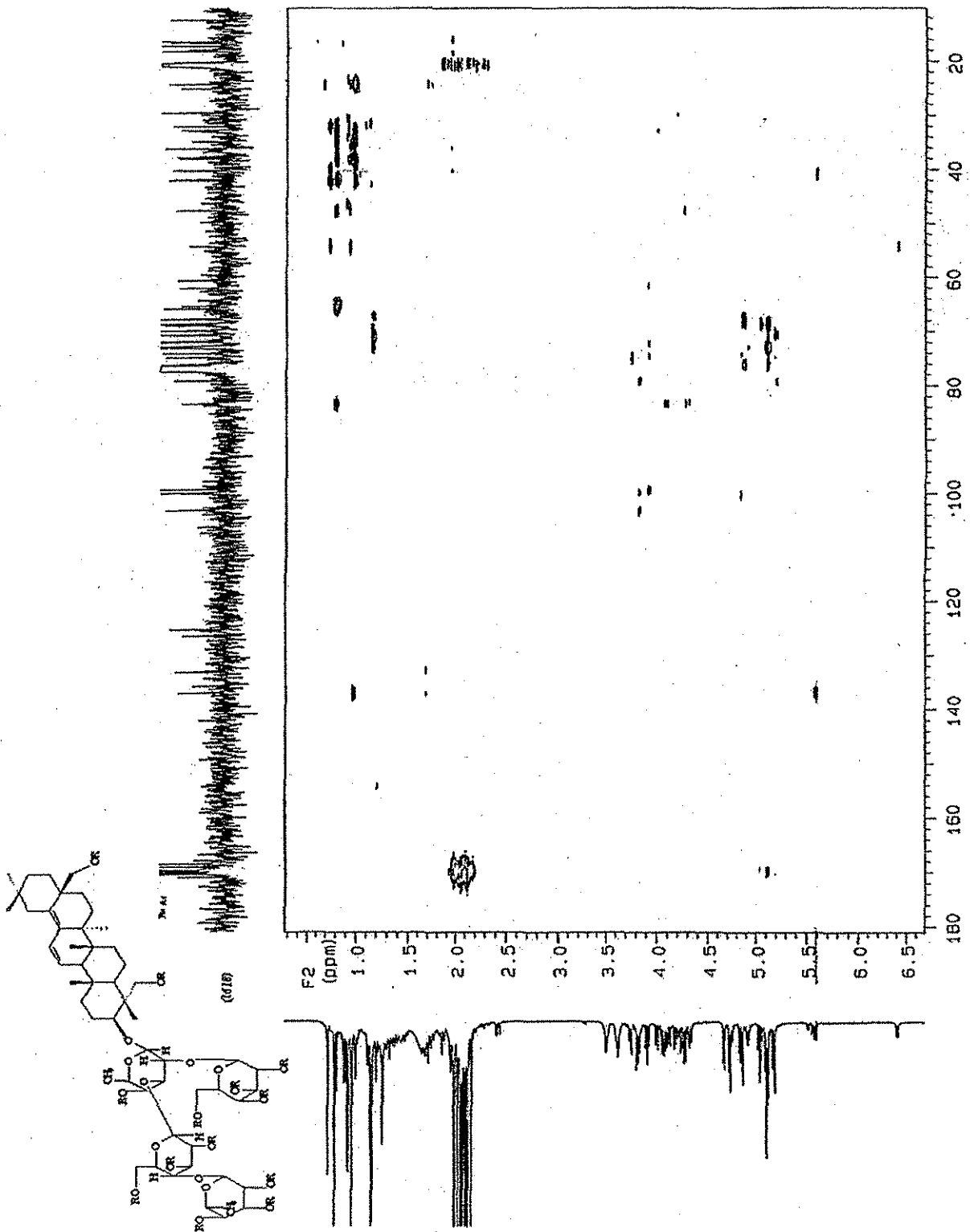


Espectro 47.- Espectro COSY del Compuesto 13.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

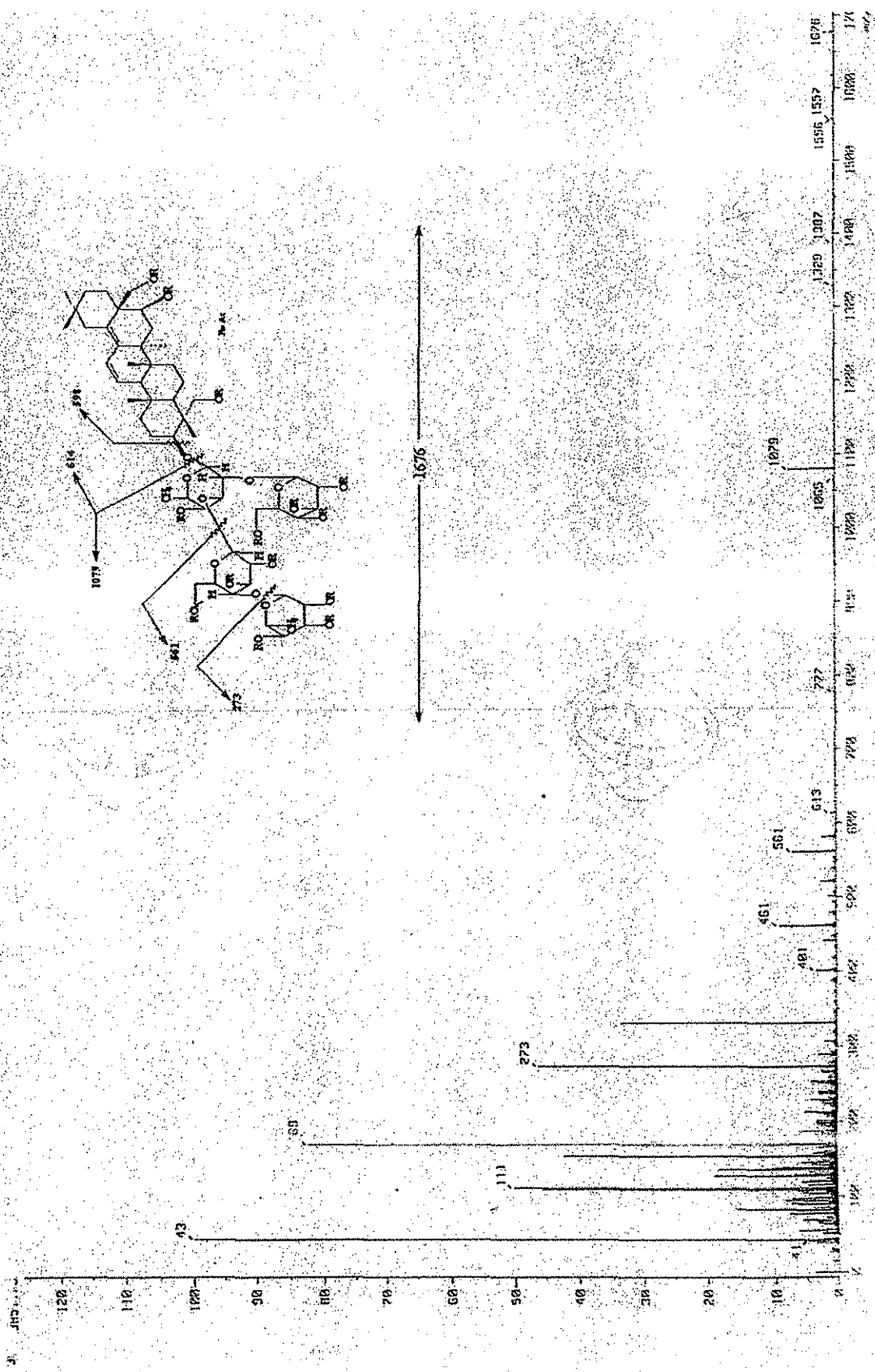


Espectro 48.- Espectro HMQC del Compuesto 13.

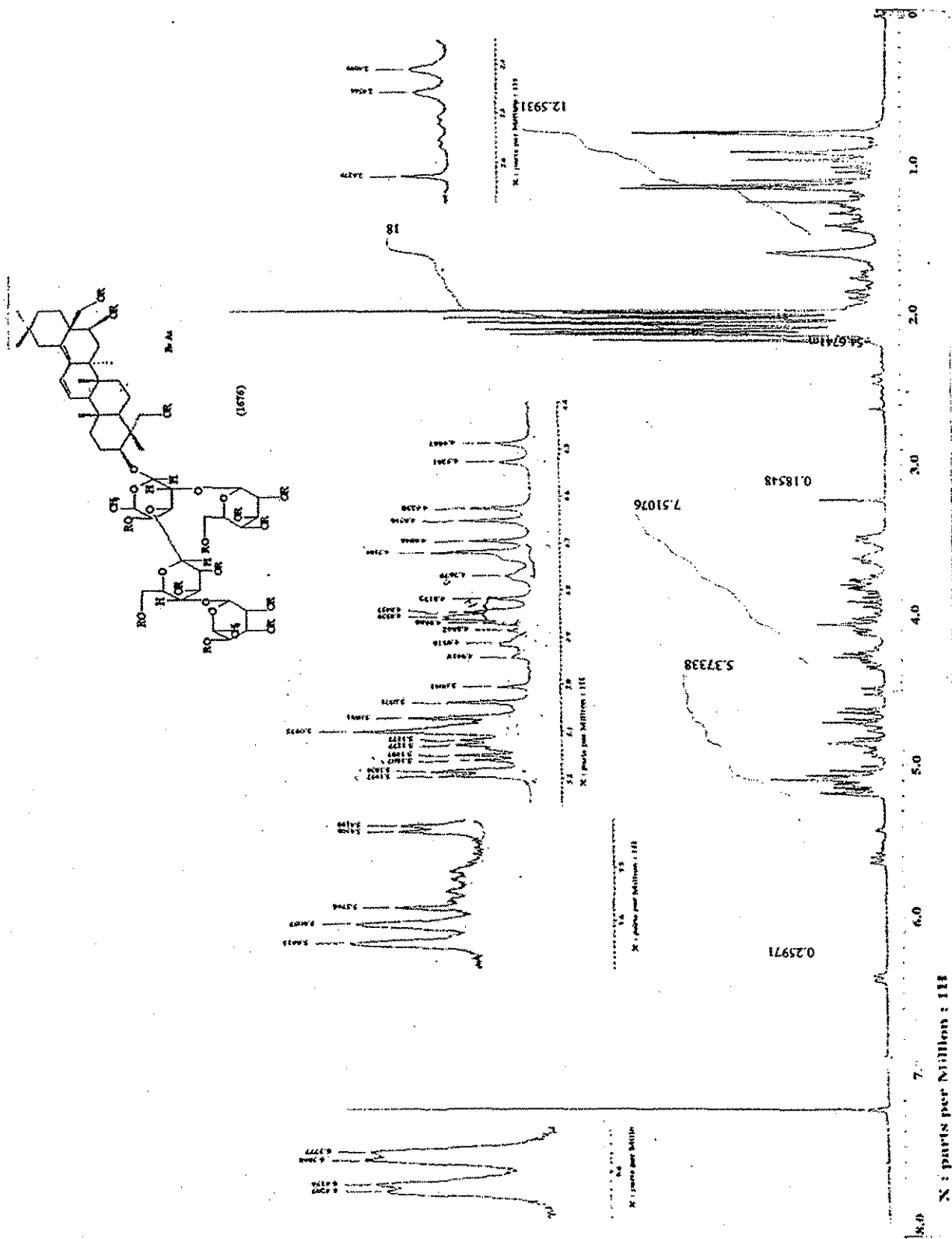


Espectro 49.- Espectro HMBC del Compuesto 13.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

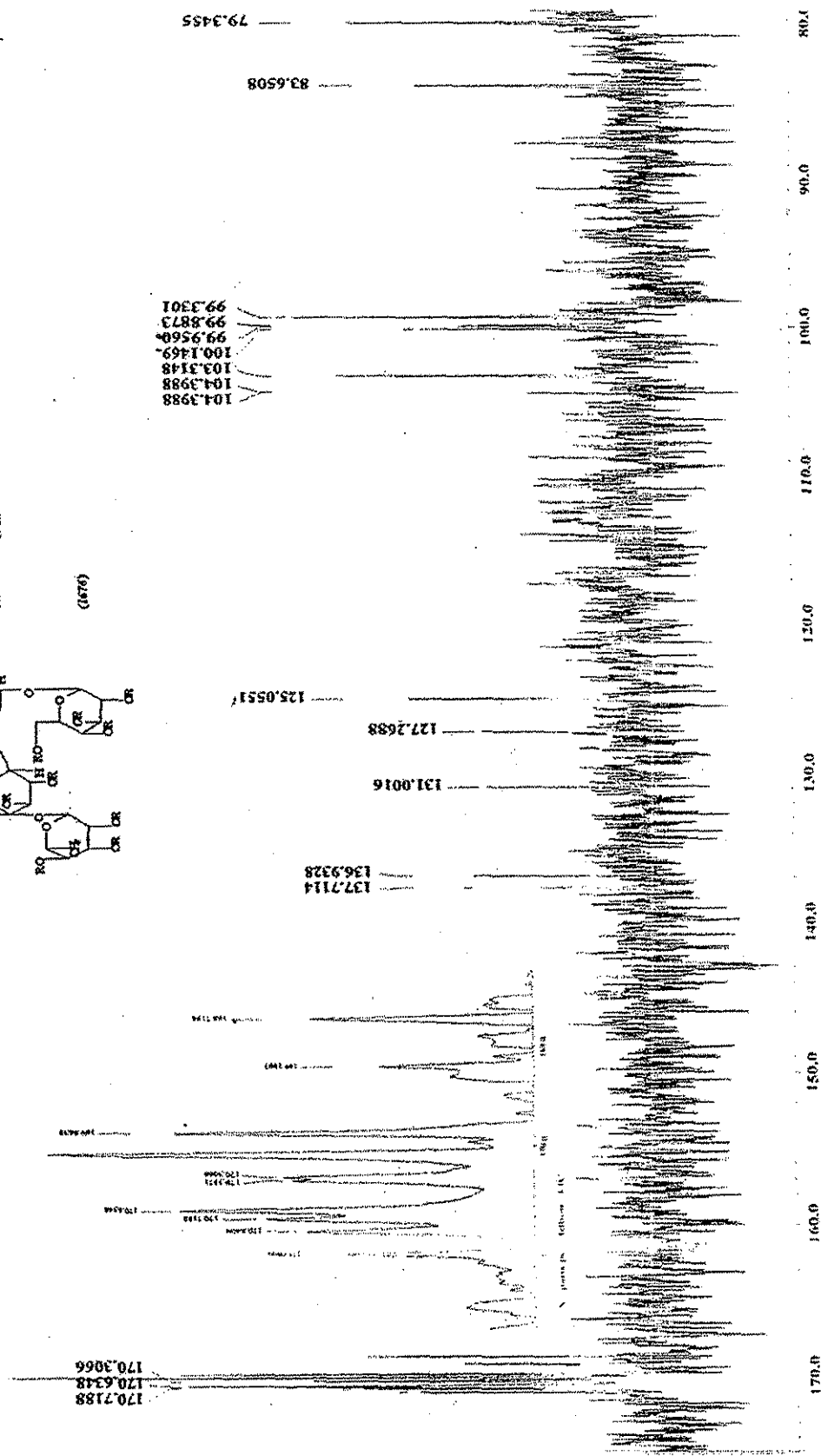
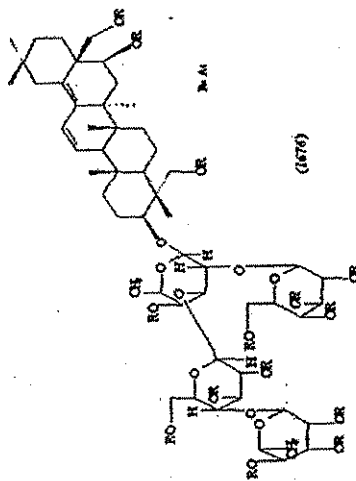


Espectro 50.- Espectro de Masas del Compuesto 15.

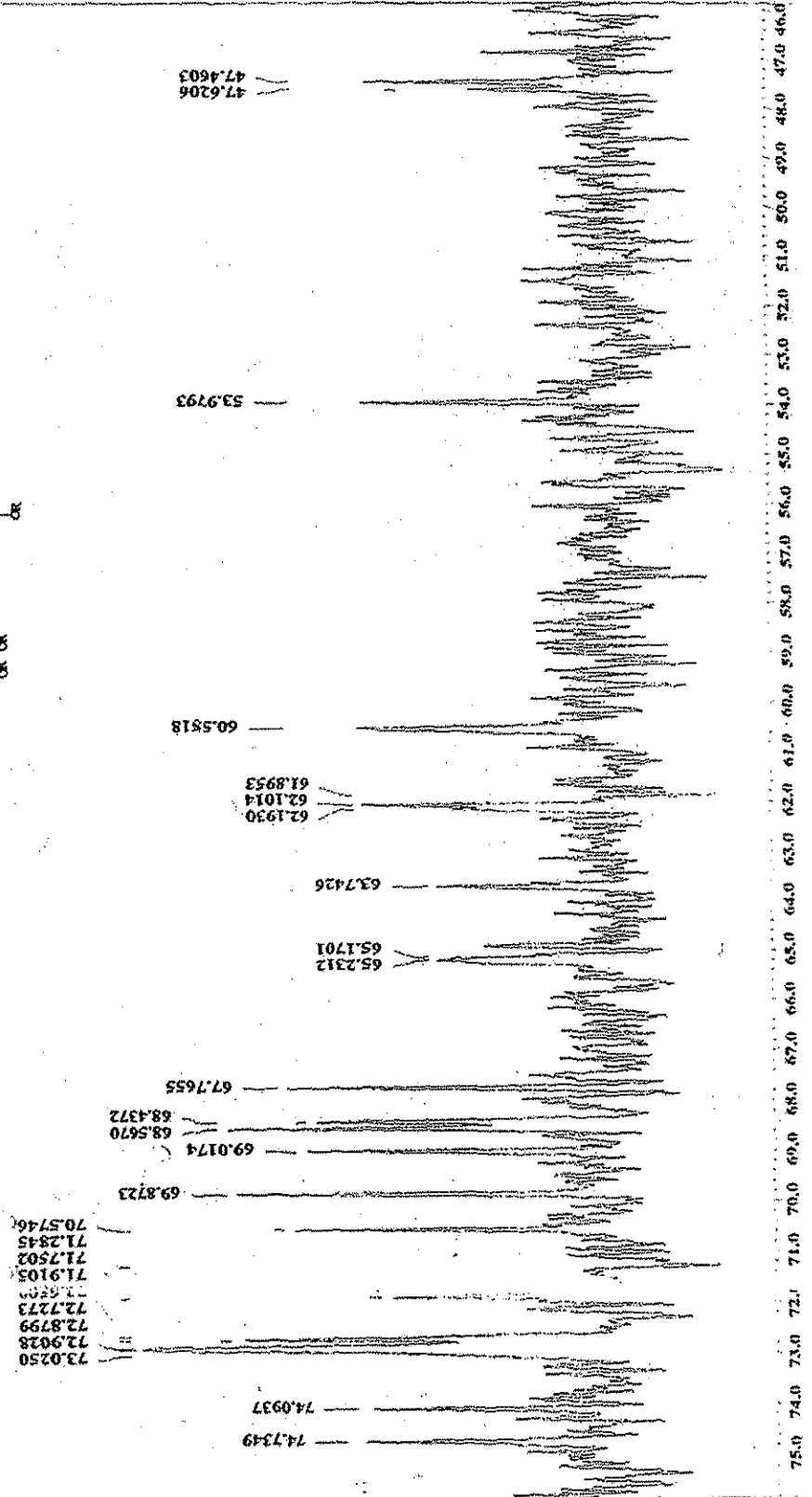
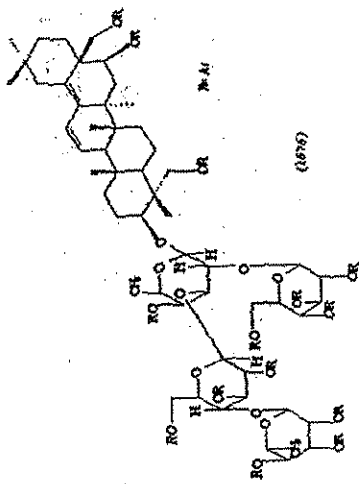


Espectro 51.- Espectro de RMN protónica del Compuesto 15.

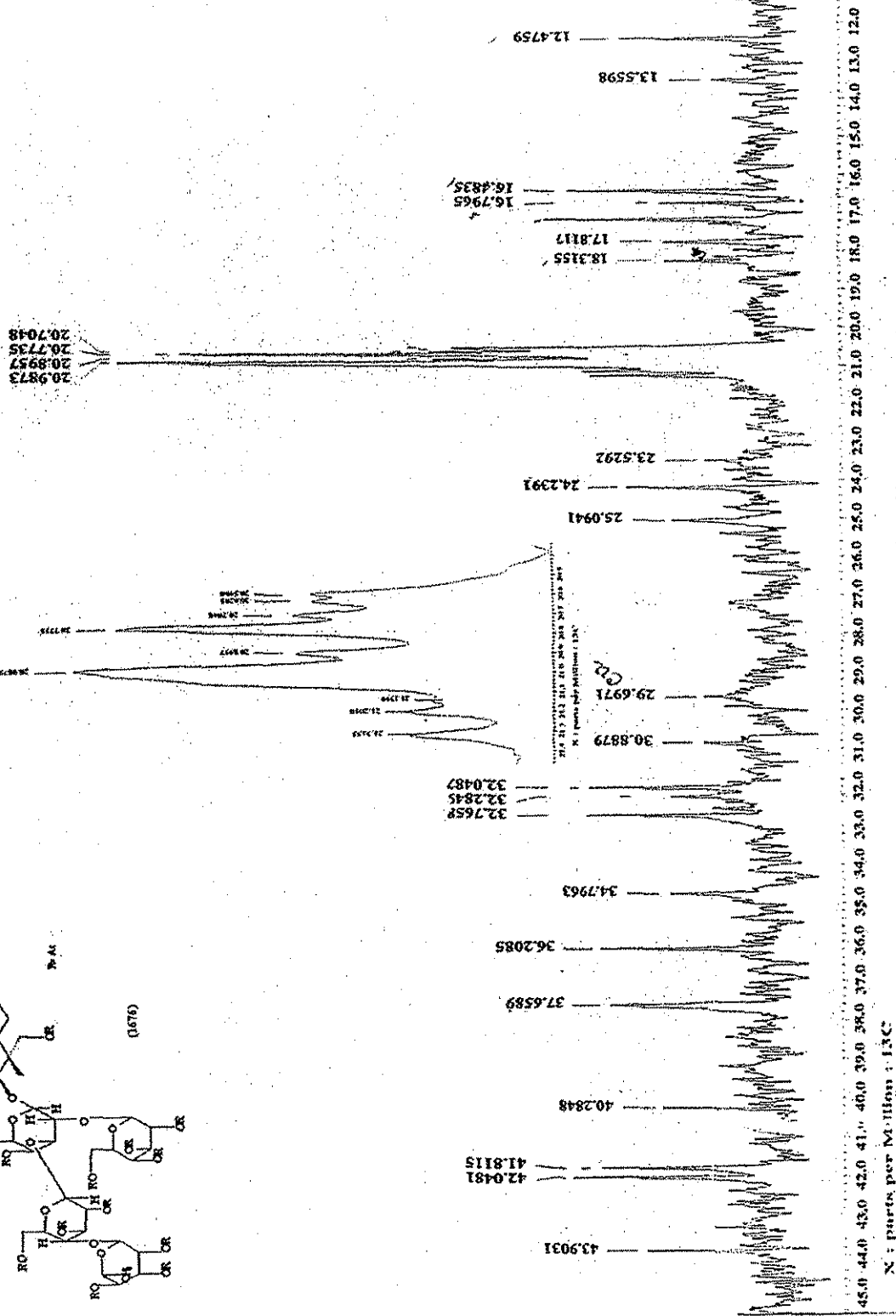
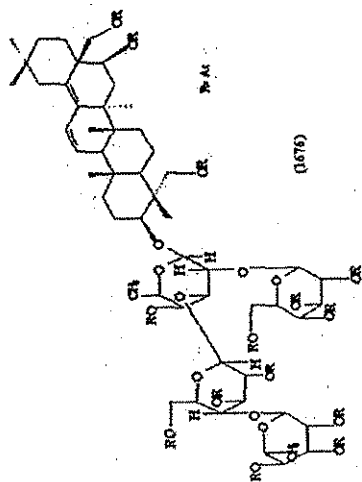
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



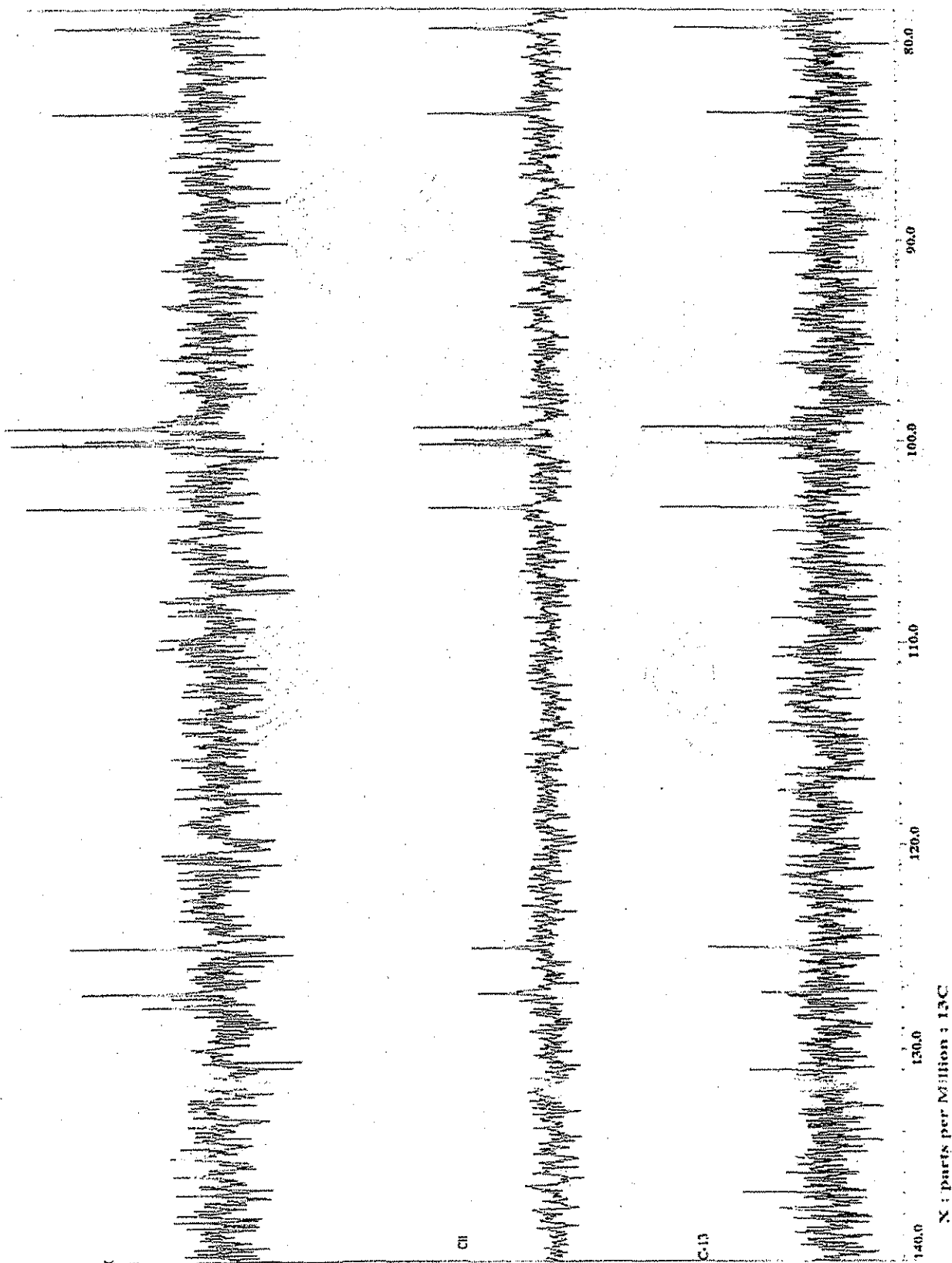
Espectro 52.- Espectro de RMN de Carbono-13 del Compuesto 15.



Espectro 52.- Espectro de RMN de Carbono-13 del compuesto 15 (continuación, a)

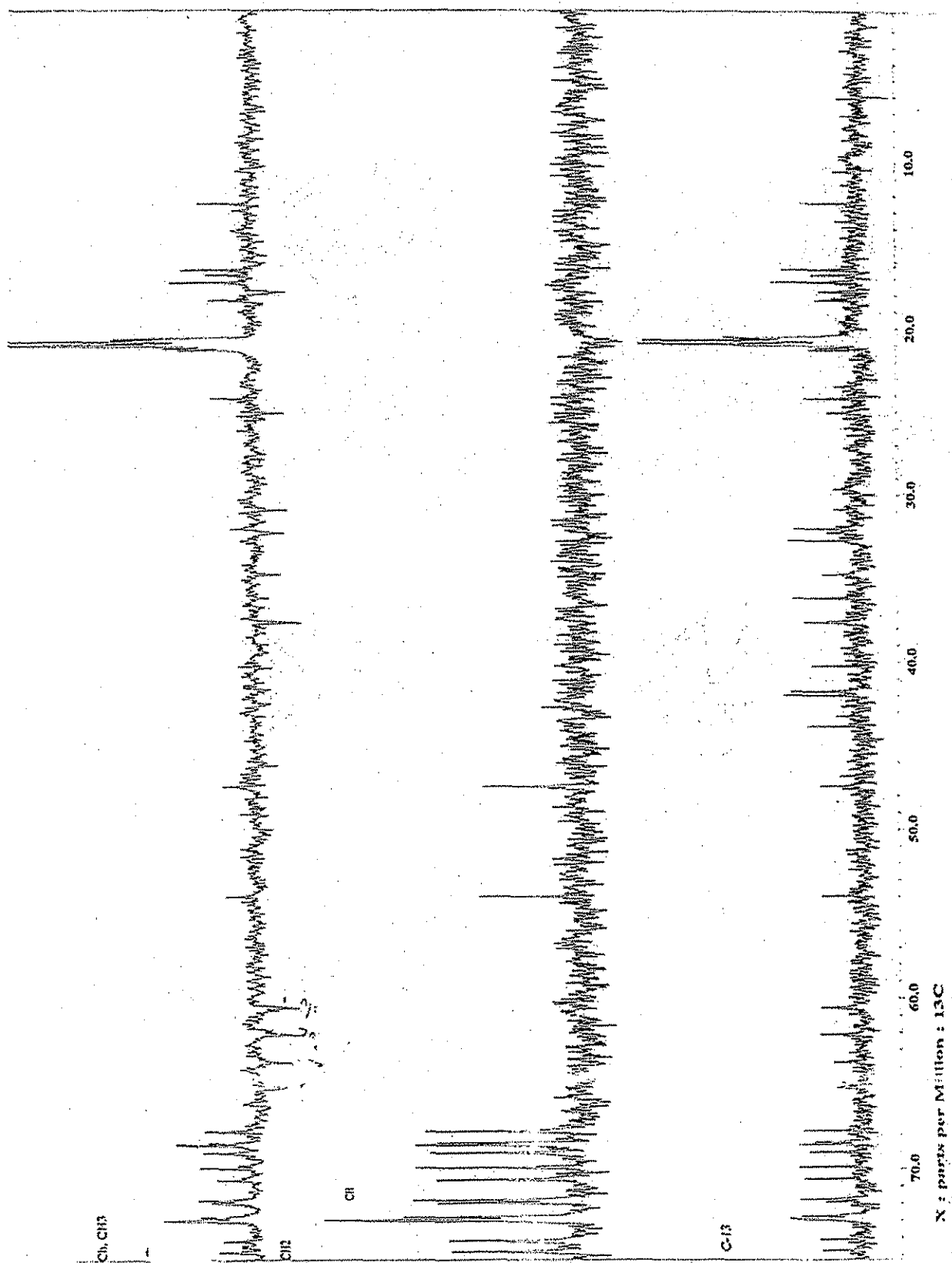


Espectro 52.- Espectro de RMN de Carono-13 del compuesto 15 (Continuación, b)



Espectro 53.- Espectro DEPT del Compuesto 15.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Espectro 53.- Espectro DEPT del Compuesto 15 (continuación)

APÉNDICE VII

ARTÍCULOS GENERADOS DE LA INVESTIGACIÓN

1. José Guillermo Avila, Juliana G. De Liverant, Andrés Martínez, Gabriel Martínez, José Luis Muñoz, Amira Arciniegas, Alfonso Romo de Vivar. (1999). Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. J. of Ethnopharmacol., 66, 75-78.
2. José Guillermo Avila A., Alfonso Romo de Vivar. (2002). Triterpenoid saponins and other glycosides from *Buddleja scordioides*. Biochem. System. Ecol., 30 (10): 1003-1005.
3. Avila Acevedo J. G., Castañeda C.M.C., Benitez F.J.C., Durán D.A., Barroso V.R., Martínez C.G., Muñoz L.J.L., Martínez C.A., Romo de Vivar A. (2002). Photoprotective activity of *Buddleja scordioides* HBK. Enviado para su publicación a Pharmaceutical Biology. (se anexa manuscrito y carta de recepción).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Short communication

Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against
Staphylococcus aureus

José Guillermo Avila ^{a,*}, Juliana G. de Liverant ^c, Andrés Martínez ^a,
Gabriel Martínez ^a, José Luis Muñoz ^a, Amira Arciniegas ^b, Alfonso Romo de Vivar ^b

^a Laboratory of Phytochemistry, Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO),
Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Iztacala, Tlalnepantla, C.P. 54090, México

^b Laboratory of Natural Products, Institute of Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior,
Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México

^c Laboratory of Radionuclide, UIHCSE, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Iztacala, Tlalnepantla,
C.P. 54090, México

Received 9 May 1998; received in revised form 13 October 1998; accepted 28 October 1998

Abstract

We evaluate the mode of action of verbascoside obtained from *Buddleja cordata* against *Staphylococcus aureus* by killing kinetics and incorporation of precursors methods. Verbascoside induced lethal effect on *S. aureus*, by affecting protein synthesis and inhibiting leucine incorporation. © 1999 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Buddleja cordata*; Verbascoside; *Staphylococcus aureus*; Radioactive precursor

1. Introduction

Several *Buddleja* species have been widely used in traditional medicine in many parts of the world. Roots, barks and leaves of these plants are used against different kinds of ailments, such as dysentery and eye or skin inflammation, as well as

being used as diuretic and antiseptic agents (Houghton, 1984).

Buddleja cordata (loganiaceae), known as 'tepozán' in Mexico, is a tree which can reach a 20 m height, and grows in ruderal zones of this country (Vargas, 1985).

Arciniegas et al. (1997) identified verbascoside as the antimicrobial agent, which presents antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. This compound derived from phenylpropane,

* Corresponding author.

which had already been isolated from another *Buddleja* species and also showed biological activity against this bacterium: Pardo et al. (1993) reported: MIC 400 µg/ml and MBC 800 µg/ml.

The purpose of this paper is to study the mode of action of verbascoside on *S. aureus* in vitro by exponential kinetic studies and the use of biosynthetic precursors labeled with tritium: [³H]leucine in protein synthesis, [³H]thymidine in DNA synthesis, [³H]juridine in RNA synthesis, and [³H]sodium acetate in lipid synthesis.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism and culture medium

S. aureus ATCC 12398 was grown in Brain Heart Infusion Broth (Bioxon: 112-1) for stock cultures and Mueller-Hinton Broth (Bioxon: 260-1) was used as a test medium due to its low interaction with the assayed compounds.

2.2. Reagents

[³H]Sodium acetate (ICN 2200405), [³H]leucine (Amersham TRK 683), [³H]thymidine (Amersham TRK 758), [³H]juridine (Amersham TRK 410), and Chloramphenicol (Sigma C7795).

2.3. Verbascoside isolation

Dried and ground leaves of *B. cordata* (2300 g) were extracted with hexane, and methanol. The methanolic portion was evaporated to obtain a crude syrup (345 g), which was chromatographed over silicagel, eluting with CH₂Cl₂-CH₃OH (19:1) followed by increasing concentrations of methanol; fractions collected with CH₂Cl₂-CH₃OH (8:2) afforded a pure amorphous powder (16 g), [α]_D^{22°} -41.5 (MeOH; c 1.1). UV λ_{max}^{MeOH} (nm): 208 (4.30), 217 (4.45), 292 (4.10), 329 (4.25). IR V_{max}^{KBr} (cm⁻¹): 3400 (OH), 2932 (C-H), 1701 (conj. ester), 1631 (C=C), 1604, 1521 (aromatic ring). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, TMS) δ ppm: 0.97 (*d*, *J* = 6 Hz, 3H, Me of Rha), 2.70 (*t*, *J* = 7 Hz, 2H, Ar-CH₂-CH₂), 4.36 (*d*, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-1 of Glc), 4.72 (*t*, *J* = 9.6 Hz, 1H, H-4 of Glc), 5.03 (*d*, *J* = 1.1 Hz, 1H, H-1 of Rha), 6.21 (*d*, *J* = 15.8 Hz, 1H, Ar-CH=CH), 6.49-7.01 (6H, aromatic H), 7.47 (*d*, *J* = 15.8 Hz, 1H, Ar-CH=CH), 8.69, 8.75, 9.19, 9.62 (4 × OH). Analytical data were identical to those published for verbascoside (Zimin and Zhongjian, 1991).

2.4. Exponential killing bioassay

Bioassay was carried out in Mueller-Hinton broth containing verbascoside at 200, 400, and

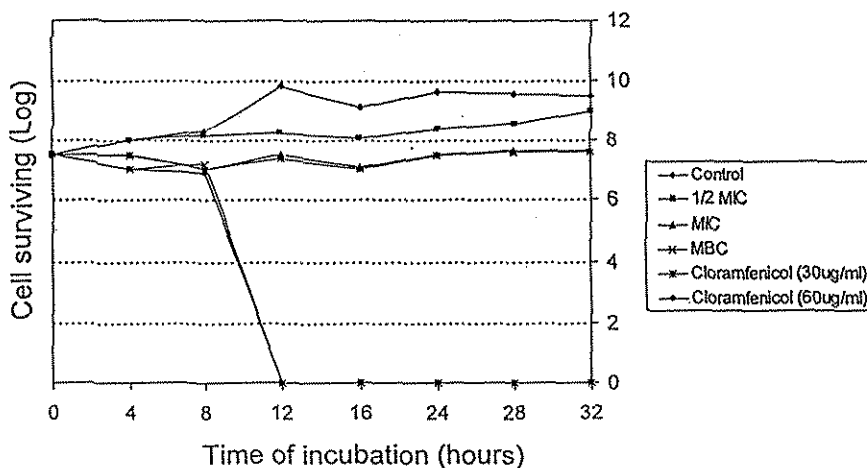


Fig. 1. Survival curve for *S. aureus* cells exposed to verbascoside.

210

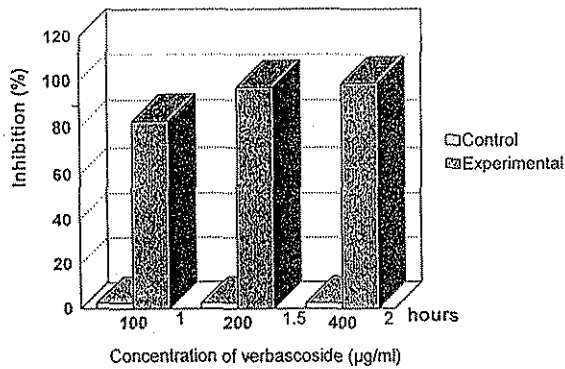


Fig. 2. Inhibitory effect of verbascoside on protein synthesis in *S. aureus*.

800 µg/ml concentrations. Positive control was chloramphenicol at 30 and 60 µg/ml and negative control was methanol 100 µl/10 ml. Initial inoculum was 3×10^7 colony forming units (CFU) and incubated at 37°C. To count CFU/ml, samples were taken from each test tube every 4 h until 24:00 h. Viable cells were counted by a dilution technique (Lennette et al., 1987).

2.5. Incorporation of radioactive precursors

To incorporate each radioactive precursor in the cell, we proceeded as follows: bacterial cultures were made in 10 ml brain heart infusion

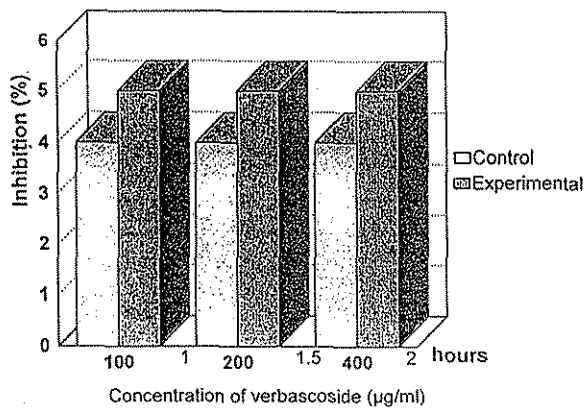


Fig. 3. Inhibitory effect of verbascoside on RNA synthesis in *S. aureus*.

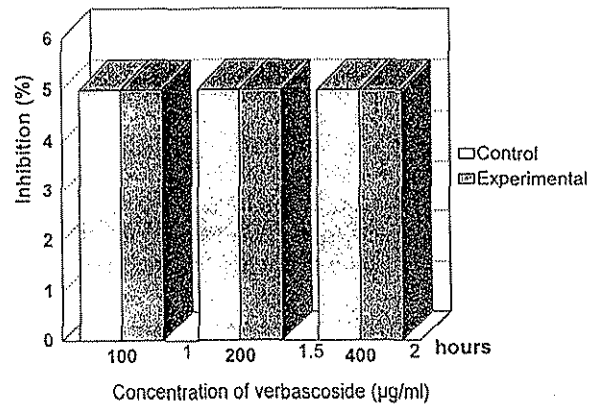


Fig. 4. Inhibitory action of verbascoside on DNA synthesis in *S. aureus*.

broth and were incubated during 12 h at 37°C (Thelco Laboratory Oven Model 160). When bacterial growth reached the exponential phase (0.2 absorbance at 600 nm in a Spectronic 21 Milton Roy Company) the culture was diluted ten times. Five units of bioassay were prepared (three experimental and two controls). Experimental units were added with verbascoside at 100, 200, and 400 µg/ml concentrations (1/4 MIC, 1/2 MIC, and 1.0 MIC). One control unit was methanol 100 µl and the other was the bacterial culture; then radioactive precursor was added at 3.7 Kbj (0.1 µCi/ml) concentration.

Both experimental and control units were incubated at 37°C, and aliquots (1.0 ml) of each

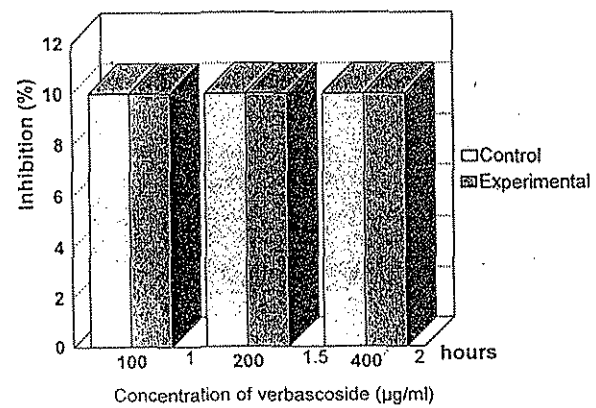


Fig. 5. Inhibitory action of verbascoside on lipid synthesis in *S. aureus*.

211

unit were taken at 1.0, 1.5, and 2.0 h. Samples were centrifugated during 10 min at 3500 rpm, and the supernatant ($\cong 1.0$ ml) was suspended in scintillation liquid (9.0 ml) (Ready organic TM Beckman).

Radioactivity was determined by scintillation counter (Beckman LS000SE). Samples were monitored during 1 min. The percentage of precursor absorbed by bacteria was calculated by the proportion of remaining radioactive quantity at each test time. Five replicates were carried out for each radioactive labeled precursor (Mori et al., 1987).

3. Results

3.1. Exponential killing bioassay

Verbascoside acts as bacteriostatic agent when applied to bacteria at the same or lower MIC doses (Fig. 1), but at equal MBC doses, produces an exponential killing curve of several hits (Davis and Dulbecco, 1973). Chloramphenicol doses were ten-fold lower than verbascoside. Lethal effect does not exist during the first 8 h, but cell mortality increases notably after this time until 12:00 h.

3.2. Mode of action

Mode of action of verbascoside is displayed in Figs. 1–5. Attention is focused on protein synthesis because there was not evidence of inclusion of [^3H]leucine into the cell (Figs. 1 and 2), whereas in the other radioactive precursors studied alterations are not observed, that is, incorporation of metabolites labeled with tritium. Accordingly, we conclude that the mode of action of verbascoside is the inhibition of protein production, since leucine is an important metabolite in protein synthesis.

Several alterations could occur in the cell membrane transportation, or in the passing through the cell wall, however, it is important to carry out experiments with verbascoside labeled so that evaluate its effect on bacterium structures.

4. Discussion and conclusion

From our results we can see that exclusively protein synthesis is the pathway strongly affected by verbascoside, because almost all leucine absorption is obstructed.

Introduction of the other precursors into the bacterial cell is not affected, for that reason, we think verbascoside kills this kind of bacteria by inhibiting the admission of leucine, and hence the protein synthesis.

With regard to the killing kinetics, it is only recognized that verbascoside affects several important sites in any metabolic or structural targets on the bacterial cell.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA), UNAM (Grant No. IN210197) for their financial support.

References

- Arciniegas, A., Avendaño, A., Pérez-Castorena, A.L., Romo de Vivar, A., 1997. Flavonoids from *Buddleja parviflora*. *Biochemical Systematics and Ecology* 25 (2), 185–186.
- Davis, B.D., Dulbecco, R., 1973. *Microbiology*, 2nd ed. Harper and Row, New York, pp. 268–269.
- Houghton, P.J., 1984. Ethnopharmacology of some *Buddleja* species. *Journal of Ethnopharmacology* 11 (3), 293–308.
- Lennette, H.E., Balows, A., Hausler, J.W., y Shadomy, H.J., 1987. *Manual de Microbiología Clínica*. 4a edición. Edit. Médica Panamericana, Argentina. pp. 336–352, 358–382, 1192, 1200–1245.
- Mori, A., Nishino, C., Enoki, N., Tawata, S., 1987. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry* 26 (8), 2231–2234.
- Pardo, F., Perich, F., Villaruel, L., Torres, R., 1993. Isolation of verbascoside, an antimicrobial constituent of *Buddleja globosa* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 39 (3), 221–222.
- Vargas, N.A., 1985. Loganiaceae. En: J. Rzedowsky y G. Rzedowsky (Eds.). *Flora fanerogámica del Valle de México*, Vol. II. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México, D.F., México. pp. 274–284.
- Zimin, L., Zhongjian, J., 1991. Phenylpropanoid and iridoid glycosides from *Pedicularis striata*. *Phytochemistry* 30 (4), 1341–1344.

217



Pergamon

Biochemical Systematics and Ecology 30 (2002) 1003–1005

www.elsevier.com/locate/biochemsyseco

biochemical
systematics
and ecology

Triterpenoid saponins and other glycosides from *Buddleja scordioides*

José Guillermo Avila A.^a, Alfonso Romo de Vivar^{*,b}

^a Laboratorio de Fitoquímica UBIPRO, FES-Iztacala UNAM, Avenida de los Barrios s/n, 54090 Tlalnepantla, Estado de México, Mexico

^b Instituto de Química UNAM, Circuito exterior s/n, 04510 Coyoacán D.F., Mexico

Received 28 August 2001; accepted 17 December 2001

Keywords: *Buddleja scordioides*; Buddlejaceae; Syringin; Triterpenoid saponins

1. Subject and source

Buddleja scordioides HBK., Buddlejaceae (Hutchinson, 1973, p. 463) is a shrub from the Chihuahuan desert of northern Mexico and western Texas.

The aerial parts of *B. scordioides* were collected in Dr. Arroyo Nuevo León, Mexico, in November 1998. A voucher specimen was deposited in Izta Herbarium of the UNAM Campus Iztacala (Izta 26140).

2. Previous work

Previous phytochemical investigations on *Buddleja* led to isolation of flavonoids (Arciniegas et al., 1997; Harborne and Williams, 1971), iridoids (Duff et al., 1965), phenylpropanoids (Houghton, 1984), sesquiterpenes (Yoshida et al., 1976, 1978a,b) and saponins (Ding et al., 1992; Emam et al., 1997; Yamamoto et al., 1991). No previous phytochemical work has been reported on *B. scordioides*.

* Corresponding author. Tel.: +52-5-622-4412; fax: +52-5-616-2217.
E-mail address: alrovi@correo.unam.mx (A. Romo de Vivar).

213

3. Present study

3.1. Extraction and isolation procedure

Dried and ground aerial parts of *B. scordioides* (2000 g) were extracted successively with hexane, EtOAc and MeOH. The MeOH solution was concentrated at reduced pressure to yield 303 g of residue (15.15%). This was applied to a silica gel column and eluted with CH₂Cl₂, CH₂Cl₂–MeOH 9:1, CH₂Cl₂–MeOH 3:2 and MeOH. The CH₂Cl₂–MeOH (9:1 and 3:2) fractions afforded O-methylcatalpol (Duff et al., 1965), verbascoside and linarin (Arciniegas et al., 1997). Syringin (1), which was identified by its physical and spectral data (Della Greca et al., 1998; Niwa et al., 1988), is reported here for the first time as a constituent of a *Buddleja* species. Mannitol was isolated in 0.6% yield.

The more polar fractions gave a mixture of saponins that were purified by Sephadex LH-20 eluting with MeOH. The spectroscopy of this mixture and especially the mass spectrum indicated the presence of at least three different compounds. Acid hydrolysis of the saponins mixture gave two aglycones: saikogenin A (2) and 3,23,28-trihydroxyoleana-11,13(18)-diene (3) (Knight, 1974; Tori et al., 1976). The *R_f* of the sugars corresponded to D-glucose, L-rhamnose and D-fucose (Hansen, 1975).

Acetylation of the mixture afforded a peracetates mixture whose mass spectrum (by fast atom bombardment–mass spectrometry; FAB–MS) showed molecular ions peaks at *m/z* of 1618, 1676 and 1634, which correspond to the acetates 4, 5 and 6, respectively. These were separated by high-performance liquid chromatography (HPLC; μ -Porasil preparative column, eluted with hexane–EtOAc 1:1, isocratic flow 10 ml/min, detected in ultraviolet at 250 nm) and their structures established by mass spectrometry and by one-dimensional and two-dimensional ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) experiments.

The ¹H – NMR spectrum of the acetate 4 showed signals at δ (ppm) of 6.40 (dd, *J* = 11.3 Hz, H-12) and 5.58 (d, *J* = 10.5 Hz, H-11) corresponding to the 11,12,13(18)-diene. The signals of two AB systems are attributed to C-28 (δ = 4.00, d and 4.17, d; *J* = 11 Hz each) and C-23 (δ = 4.07, d and 4.24, d; *J* = 11.5 Hz each). The ¹³C – NMR shows the signals of the 11,12,13(18)-diene at δ = 125.43, 126.58, 133.28 and 137.13 ppm, and those of the hydroxymethylenes at δ = 65.9 (C-23) and 65.5 (C-28) ppm.

The ¹H – NMR spectrum of compound 5 was very similar to that of 4 except for the H-16 signal, which was downfield shifted (δ = 5.42 ppm) due to the presence of the acetoxy group. Also, the ¹³C – NMR spectrum was very similar except for the signal of C-16.

Compounds 4 ($[\alpha]_D^{25} = -7.5$) and 5 ($[\alpha]_D^{25} = -10.5$) were identified as the peracetate of 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-fucopyranosyl-3,23,28-trihydroxyoleane-11,13(18)-diene (Ding et al., 1992) and 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-fucopyranosyl-3,16,23,28-tetrahydroxyoleane-11,13(18)-diene (Yamamoto et al., 1991), respectively.

Compound 6 ($[\alpha]_D^{25} = +27.7$) should correspond to the peracetate of buddlejasaponin I. It presents C-28 and C-23 as triplets at $\delta = 73.16$ and 65.32 ppm, respectively, which do not differ significantly from the chemical shifts reported for similar atoms of buddlejasaponin I (Yamamoto et al., 1991).

4. Chemotaxonomic significance

Although the oleanane glycosides have been found in three different *Buddleja* species, this is the first report of their presence in an American *Buddleja* species.

Phenylpropanoids such as verbascoside are common constituents of *Buddleja* species; nevertheless, this is the first time that syringin has been isolated from a *Buddleja*.

Acknowledgements

We thank Luis Velazco, Javier Pérez, Isabel Chávez, Alejandrina Acosta, Carmen Márquez and Rocío Patiño for their technical assistance. We are grateful to María Edith López for identification of the plant. This work was partially financed by DGAPA- UNAM (grant IN-210197).

References

- Arciniegas, A., Avendaño, A., Pérez-Castorena, A.L., Romo de Vivar, A., 1997. *Biochem. System. Ecol.* 24 (2), 185.
- Della Greca, M., Ferrara, M., Fiorentino, A., Monaco, P., Previtera, L., 1998. *Phytochemistry* 49, 1299.
- Ding, N., Yahara, S., Nohara, T., 1992. *Chem. Pharm. Bull.* 40 (3), 780.
- Duff, R.B., Bacon, J.S.D., Mundie, C.M., Farmer, V.C., Russell, J.D., Forrester, A.R., 1965. *Biochem. J.* 96, 1.
- Emam, A., Moussa, A., Faure, R., Elias, R., Balansard, G., 1997. *J. Ethnopharmacol.* 58, 215.
- Hansen, S.A., 1975. *J. Chromatogr.* 107, 224.
- Harborne, J.B., Williams, C.A., 1971. *Phytochemistry* 10, 367.
- Houghton, P.J., 1984. *J. Ethnopharmacol.* 11, 293.
- Hutchinson, J., 1973. *The Families of Flowering Plants*, 3rd ed. Oxford University Press, London.
- Knight, S., 1974. *Org. Magn. Reson.* 6, 603–611.
- Niwa, M., Iwadare, Y., Wu, Y.-C., Hirata, Y., 1988. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 1158.
- Tori, K., Yoshimura, Y., Seo, S., Sakurawi, K., Tomita, Y., Ishii, H., 1976. *Tetrahedron Lett.* 4163–4166.
- Yamamoto, A., Miyase, T., Ueno, A., Maeda, T., 1991. *Chem. Pharm. Bull.* 39 (10), 2764.
- Yoshida, T., Nobuhara, J., Uchida, M., Okuda, T., 1976. *Tetrahedron Lett.* 3717–3720.
- Yoshida, T., Nobuhara, J., Uchida, M., Okuda, T., 1978a. *Chem. Pharm. Bull.* 26 (8), 2535.
- Yoshida, T., Nobuhara, J., Uchida, M., Okuda, T., 1978b. *Chem. Pharm. Bull.* 26 (8), 2543.

INBOX: 2 de 2

Mover | Copiar | este mensaje a: 

[Eliminar](#) | [Responder](#) | [Responder a todos](#) | [Reenviar](#) | [Redirigir](#) | [Reanudar](#) | [Guardar como](#)

[Regresar a INBOX](#)  

Fecha Thu, 21 Mar 2002 17:39:48 +0000

De lewandowski.c@att.net

Para tuncomaclovio@correo.unam.mx

Asunto Pharm. Biol. MS. 2.043

Partes  (fuente)

Dr. J. G. Avila Acevedo
Univ. Nacioal Autonoma de Mexico
Lab. Fitoquim., UBIPRO
Tlalnepantla CP 54090
MEXICO

Dear Dr. Avila Acevedo:

We have received your manuscript entitled "Photoprotective activity of Buddleja scordioides ", and assigned it Manuscript #2.043. Please use this MS # in all future correspondence.

We have assigned this manuscript to Dr. Nina L. Etkin, Associate Editor, for review. She will contact you regarding the status of your manuscript during this process. Dr. Etkin's mailing address is:

Professor Nina L. Etkin
Chair, Department of Anthropology
Associate Editor, Pharmaceutical Biology
University of Hawaii
Saunders 346
2424 Maile Way
Honolulu, HAWAII 96822 USA
e-mail: etkin@hawaii.edu

After the review has been completed, you will be contacted by the Editor regarding the final decision. Thank you for your interest in the Pharmaceutical Biology.

Sincerely yours,

Carol Lewandowski
Managing Editor

[Eliminar](#) | [Responder](#) | [Responder a todos](#) | [Reenviar](#) | [Redirigir](#) | [Reanudar](#) | [Guardar como](#)

[Regresar a INBOX](#)  

Mover | Copiar | este mensaje a: 

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

216

Photoprotective activity of *Buddleja scordioides* HBK.

Avila Acevedo J. G*, Castañeda C. M. C., Benitez F. J.C., Durán D. A., Barroso V. R., Martínez C. G., Muñoz L. J. L., Martínez C. A and ²Romo de Vivar A.

Laboratorio de Fitoquímica, Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO),

Universidad Nacional Autónoma de México, FES Iztacala, Tlalnepantla, C. P. 54090. México.

²*Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, C. P. 04510. México.*

*Corresponding author. Tel.: + 52-5-623-11-36; fax: + 52-5-623-1225.

E-mail address: tuncomaclovio@correo.unam.mx (J. G. Avila Acevedo).

Abstract

The aim of this study was to determine the photoprotective properties of the methanolic extract of *B. scordioides*, as well as, verbascoside, linarin, and linarin acetate, which are UV-B absorbing compounds. The photoprotective effect of substances against UV-B induced cellular death was evaluated through challenge experiments using *Escherichia coli*. Verbascoside and linarin acetate showed the highest protection against UV-B induced bacterial death. The sun protection factor (SPF) of methanolic extract, linarin, linarin acetate, and verbascoside were evaluated by means of guinea pig bioassays. Verbascoside showed the largest SPF. Histopathological studies were also carried out.

Keywords: B. scordioides, verbascoside, linarin, photoprotective activity, sun protection factor.

1. Introduction

Exposure to UV radiation from the sunlight constitutes the main factor in skin cancer development. There is strong evidence that wavelengths within the UV-B (280-320 nm) are the most carcinogenic agents in man and animal models. The UV-B radiation reaches the terrestrial surface with higher intensity as a consequence of the ozone layer depletion (Brash, et al. 1991) thus increasing the risk of skin cancer such as basal and squamous cell carcinomas. Skin cancer is one of the major public health problems in the United States, and other countries with a significant population of fair-skinned individuals. In the past decade, the incidence of non-melanoma skin cancer in the United States was 900,000 to 1.2 million cases (Miller and Weinstock, 1994). Because of the impressive increasing in the incidence of non-melanoma skin cancer, the frequent use of sunscreens has been recommended. Recent studies in humans support this recommendation (Naylor, et al. 1995). Green tea polyphenols and extracts of *Aloe barbadensis* have been used to prevent sunburns (Elmets and Young, 1996, and Wang, et al. 1991).

Buddleja scordioides HBK., Buddlejaceae, is a shrub, which grows in the Chihuahuan desert (Rzedowski and Rzedowski, 1985). Decoctions of this plant are used orally or topically for treatment of several illnesses such as diarrhea, headache, and hurts. (Aguilar, et al. 1994). In the surroundings of Dr. Arroyo, Nuevo León México, where *B. scordioides* is known as "escobilla", the outdoor workers use infusion of its aerial parts as sunscreen (personal communication). In the present study we isolated UV-B absorbing compounds of *B. scordioides* and evaluated their photoprotective activity using bacteria and guinea pig models.

2. Methodology

2.1. Plant material.

The aerial parts of *B. scordioides* were collected in Dr. Arroyo Nuevo León, México, in November 1998. A voucher specimen was deposited in Izta Herbarium of the FES-Iztacala UNAM (Izta 26140).

2.2. Extraction procedure.

Dried and ground aerial parts of *B. scordioides* (2000 g) were extracted successively with Hexane, EtOAc, and MeOH. The MeOH solution was concentrated at reduced pressure to yield 303 g of residue (15.15%), 3g from these amount were employed for photoprotective experiments. 300 g of MeOH extract was applied to a silica gel column and eluted with CH₂Cl₂-MeOH 19:1, followed by increasing concentrations of methanol. The CH₂Cl₂-MeOH (9:1 and 8:2) fractions afforded linarin and verbascoside (3 g and 11 g, respectively) as UV-B absorbing compounds.

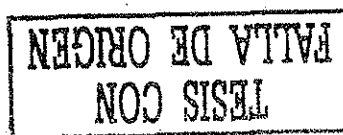
Linarin (Fig. 13, 1) (3.0 g): mp. 273-274 °C, UV λ_{\max} (MeOH) (nm) 334 (4.27); $[\alpha]_D^{+22^\circ\text{C}}$: -99.1° (AcOH; C 1.0); IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 3350 (OH), 1650 (C=O), 1610 (C=C); 1590, 1560, 1500 (aromatic ring). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, TMS) δ ppm: 1.13 (d, *J*=6.1, 3H Me of Rha), 3.2 – 4.8 (14 H sugars), 5.11 (d, *J*=7.2, 1H, H₁ of Glc), 5.26 (s, broad, 1H, H₁ of Rha), 6.5 (d, *J*=2.18, 1H, aromatic), 6.84 (d, *J*=2.18, 1H, aromatic), 6.99 (s, 1H, vinyl), 7.2 (d, *J*=8.86, 1H, aromatic), 8.1 (d, *J*=8.86, 1H, aromatic), 12.96 (s, 1H, OH). Physical and spectroscopic data are identical to those published for Linarin (Baker et al., 1951; Geisman, 1962).

experimental unit. The experimental units were irradiated with an UV-B lamp (312 nm, Spectroline EB-280C). The distance from the lamp to the experimental units was 15 cm (Russell, 1992). The energy output of the lamp at this distance was measured with an International Light model 700 A research radiometer. Irradiation dose was 0.85 J cm^{-2} . Survivor's number was detected in accordance with the dilution method (Eisenstadt et al., 1994) at different time periods. The photoprotective substances were methanolic extract of *B. scordioides*, verbascoside (dissolved in MeOH), linarin (dissolved in DMSO), and linarin peracetate (dissolved in CHCl_3). The positive control was escalol (ethylhexyl-methoxycinnamate, ISP VAN DIK) and the negative controls were the solvents used for dissolving the photoprotective substances.

2.3.2. Guinea pig sun protection factor (SPF) measurements.

Dorsal skin of guinea pigs was shaved with electric clippers (Oster Mod. 274-01) and then depilated with lotion hair remover (Velvnette-Wella). The skin was rinsed under warm tap water and dried with a towel. After 16 h, dorsal skin was treated with 2 mg/cm^2 of photoprotective substances or with vehicle (setting gel-Stil Net) or was left untreated. Animals ($n=5$ per treatment group) were then wrapped with 7.5 cm wide tape (Tuk M.R. #4) containing six 2.0 cm^2 exposure windows (three windows on each side of the spinal line). The adhesive side of the tape covering the dorsal skin area was coated with aluminum fold to prevent reddening of the skin (from adherence of the tape to that skin region). The time between topical treatment and irradiation with UV-B was approximately 15 min.

Animals were placed under a bank of 5 UV-B lamps (312 nm, Spectroline EB-280C) positioned 15 cm above their backs. The irradiance at this distance was of 0.85 J cm^{-2} measured with an International Light model 700 A research radiometer. Irradiation times of the six exposure windows on each animal were set to bracket the suspected SPF of the substance being tested.

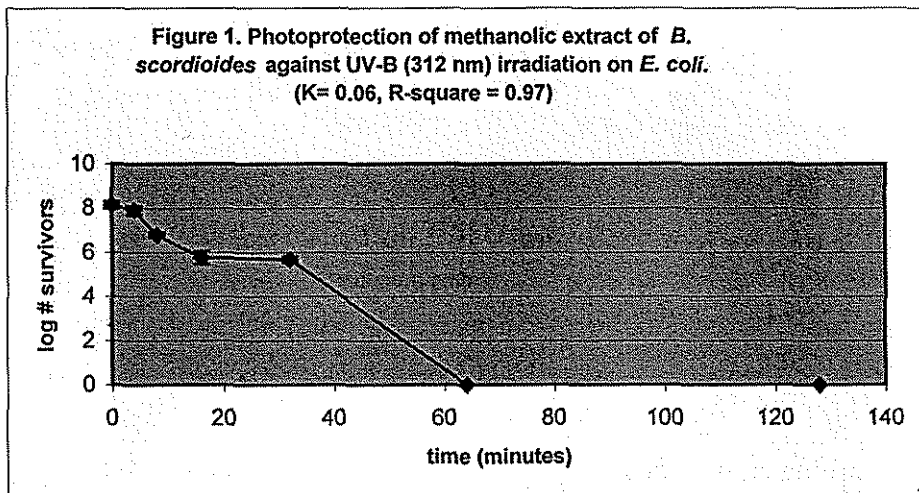


770

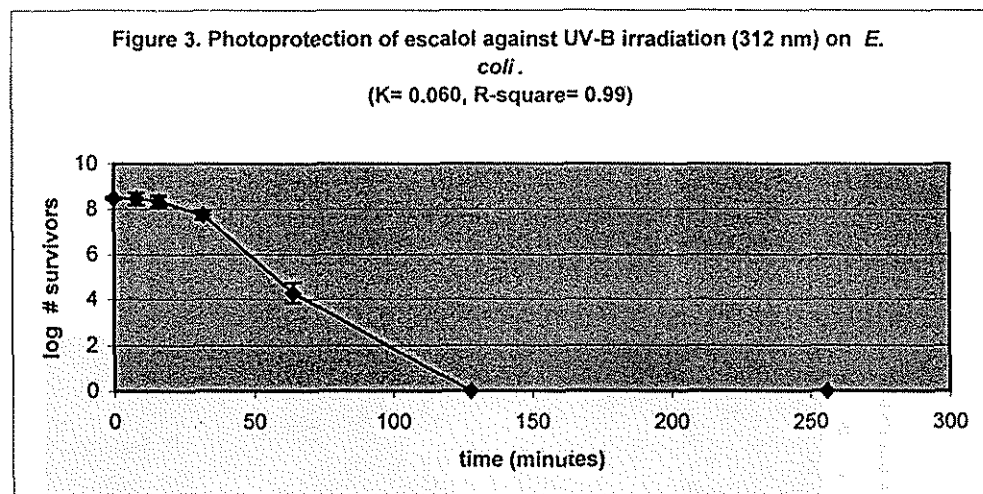
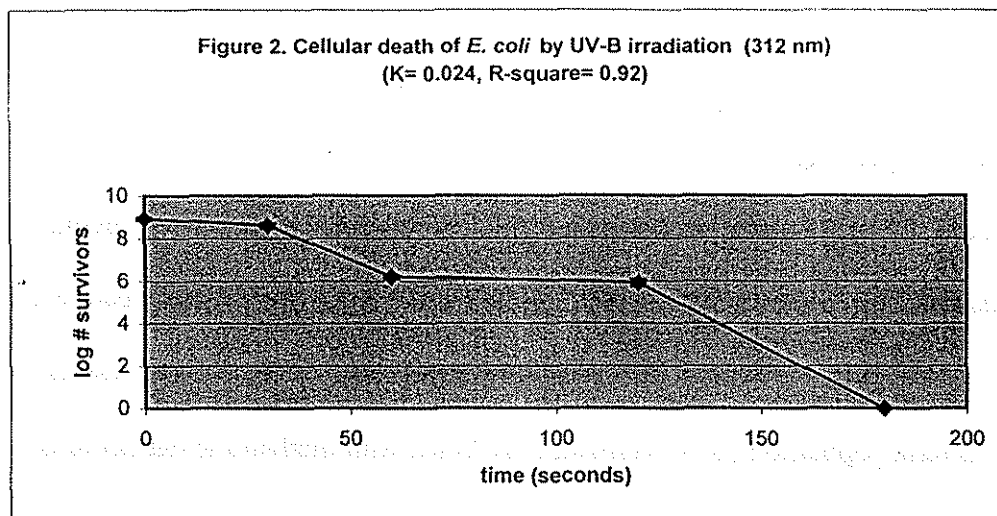
3. Results

3.1 Protective effect against UV-B induced cell death

In the course of our research we determined the photoprotective activity of methanolic extract of *B. scordioides*. Fig. 1 shows that the methanolic extract had more photoprotective activity than the negative control (Fig. 2), but less than positive control (escalol Fig. 3). The results also showed that the bacteria population ($\cong 10^8$ cells/ml), protected with methanolic extract of *B. scordioides*, reached cell death at 37-65 min interval; negative and positive control, in turn (Figures 2 and 3), reached cell death at 180 sec and 65-130 min intervals, respectively.

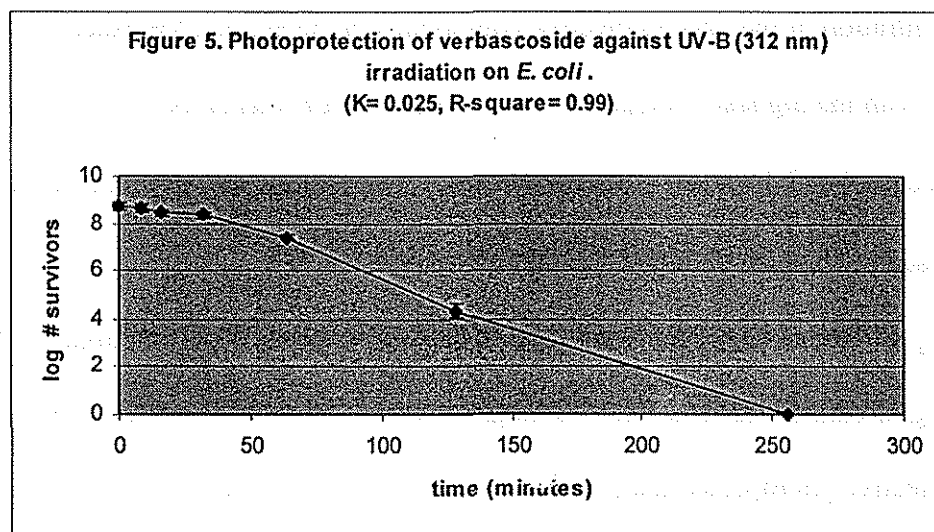
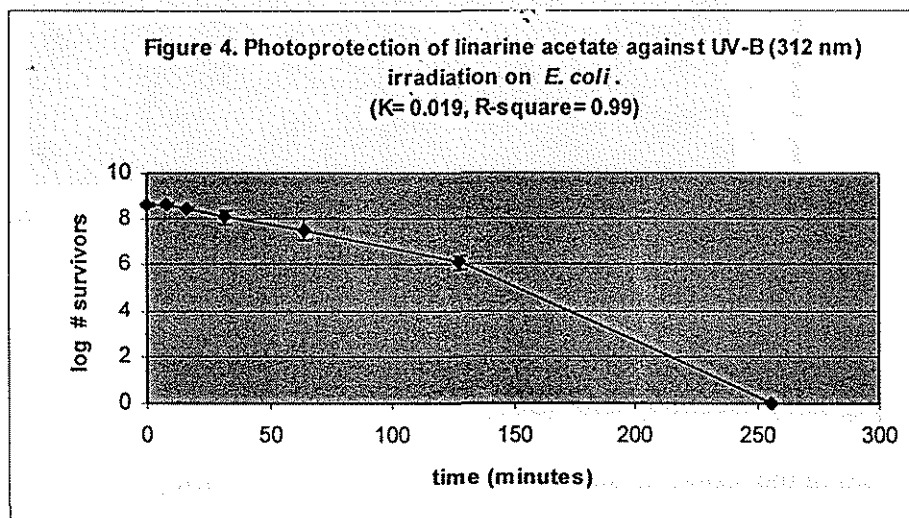


221

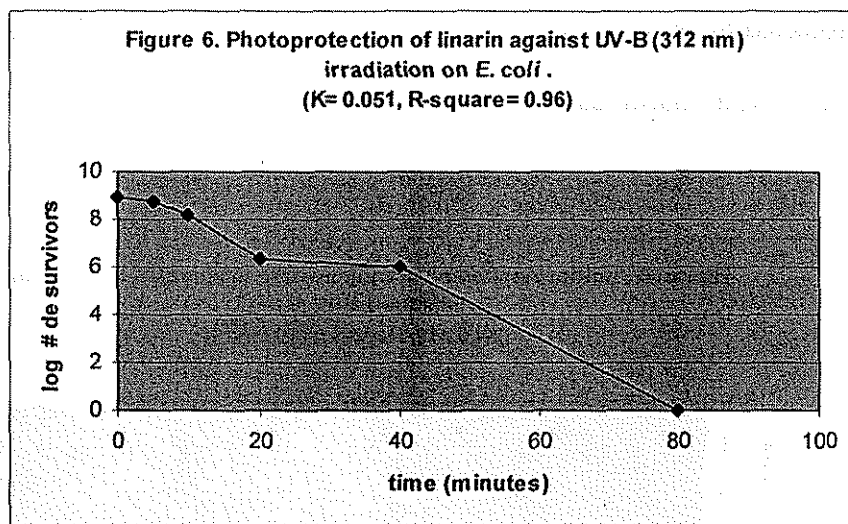


The UV-B absorbing compounds linarin (Fig.13, 1) and verbascoside (Fig. 13, 2) were isolated from the methanolic extract of *B. scordioides*, and linarin acetate (Fig. 13, 1a) was prepared in our laboratory. Table 1 shows λ max and extinction coefficients of linarin, linarin acetate, and verbascoside. These compounds were tested for their protective effect against UV-B induced cell death. Figs. 4, 5, and 6 show the photoprotective effect. Linarin acetate and Verbascoside protected bacteria more efficiently than positive control and methanolic extract. Bacterial

population protected by these compounds reached cell death until 125-250 min interval, while bacteria protected with linarin reached cell death until 40-80 min interval.



223



3.2 Guinea pig sun protection factor (SPF)

The SPF values of the tested substances were determined by guinea pig experiments (Table 2). Negative control (guinea pigs protected only with vehicle) showed perceptible erythema at 20 ± 2 min, this time was considered 1 SPF. Methanolic extract had the smallest SPF; probably due to low concentration of the photoprotective compounds in the extract. Verbascoside was the substance with the highest photoprotective activity, its SPF was of 24 ± 0.7 retarding the erythema appearance until 440 ± 14 min. Linarin acetate protected skin in similar manner than positive control (escalol). The SPF obtained for linarin was of 9 ± 0.3 .

According to Friedman test, there were significant differences in each treatment. Wilcoxon test showed significant differences between negative control and experimental substances during the time of effective photoprotection (Table 3), consequently the SPF values obtained from UV-B absorbing substances are reliable.

3.3 Histological changes

Biopsies were taken from irradiated zones corresponding to maximum irradiation time without MED of each treatment. Fig. 7 shows a skin tissue exposed to UV-B radiation corresponding to 1 MED without photoprotector substance (only vehicle). This histological photograph shows a zone of epidermal changes such as intracellular edema, vacuolization, and stratum corneum detachment. These phenomena are classical of UV-B irradiation burn (Lowe and Friedlander, 1997).

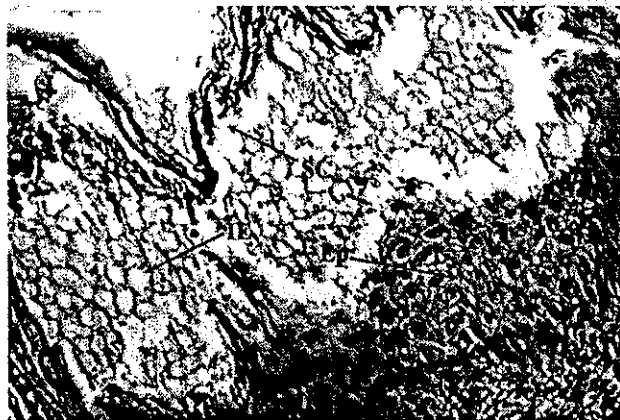


Figure 7. Skin tissue exposed at UV-B radiation, corresponding to 1 MED without photoprotection. It shows epidermis (Ep) with edema (E), intracellular edema (IE) (vacuolization), and *stratum corneum* (SC) detachment (H and E stain 400 X).

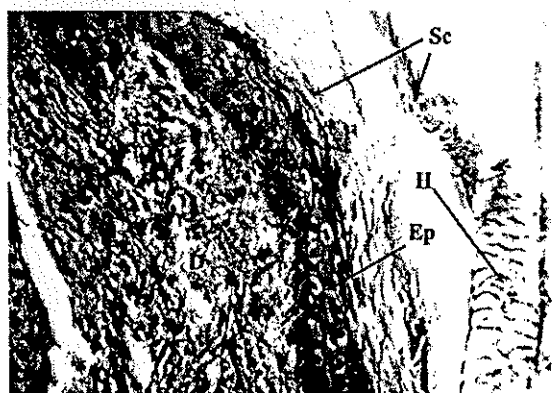


Fig 8. Guinea pig skin protected with MeOH extract of *B. scordioides*

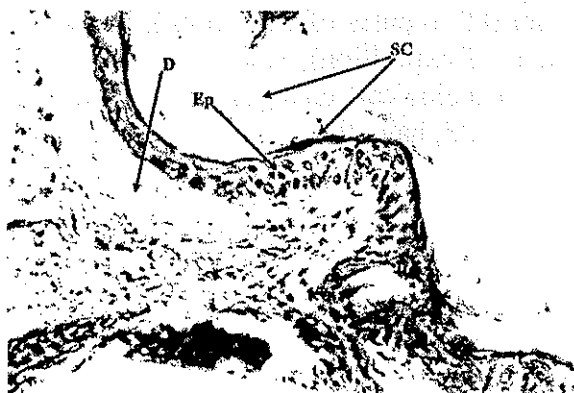


Fig 9. Guinea pig skin protected with Linarin Acetate

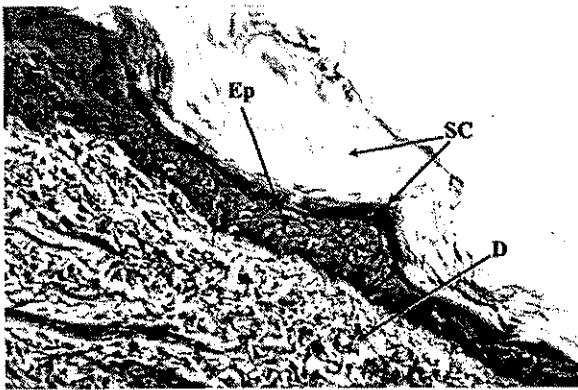


Fig 10. Guinea pig skin protected with Escalol



Fig 11. Guinea pig skin protected with Linarin

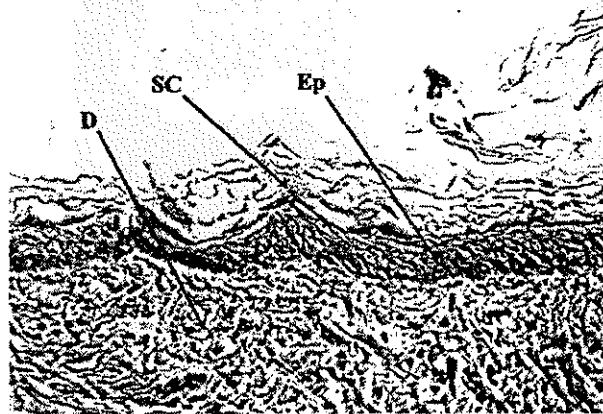
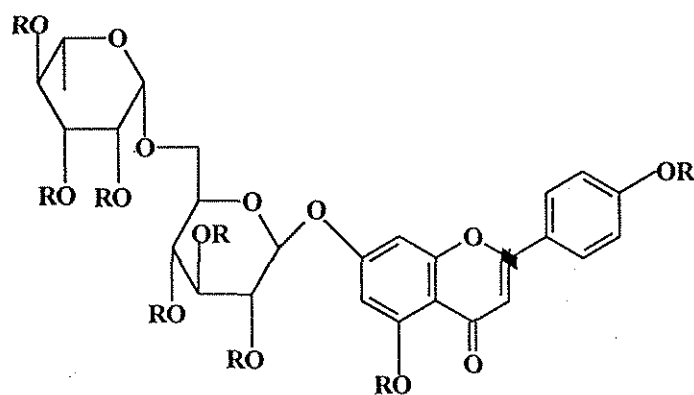


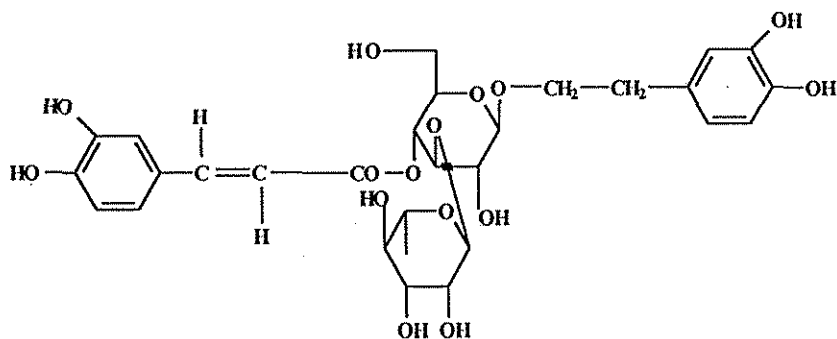
Fig 12. Guinea pig skin protected with Verbascoside

Figures. 8, 9, 10, 11, and 12 show skin tissue sections of guinea pigs protected with: methanolic extract of *B. scordioides* (40 minutes of exposition), Linarin acetate (80 minutes of exposition), Escalol (80 minutes of exposition), Linarin (160 minutes of exposition) and, Verbascoside (440 minutes of exposition), respectively (H and E stain 400 X). The epidermis and dermis did not show pathological changes, key: epidermis=Ep, dermis=D, *stratum corneum*=SC, pilose follicle=PF, hair=H.

Figs. 8, 9, 10, 11, and 12 show skin tissue of guinea pigs protected with methanolic extract of *B. scordioides* (40 minutes of exposition), Linarin acetate (80 minutes of exposition), Escalol (80 minutes of exposition), Linarin (160 minutes of exposition) and, Verbascoside (440 minutes of exposition), respectively, in all skin tissue preparations there were not evident histological changes.



1: R=H
1a: R=Ac



2

Figure 13. Structures of UV-B absorbing compounds obtained from *B. scordioides*.

4. Discussion

The photoprotective activity of methanolic extract of *B. scordioides* was determined (Fig. 1). The methanolic extract had more photoprotective activity than the negative control (fig. 2), but less than the positive control (escalol fig 3).

The UV-B absorbing compounds linarin and verbascoside were isolated from the methanolic extract of *B. scordioides* and linarin acetate was prepared. Linarin acetate and verbascoside protected bacteria more efficiently than methanolic extract, positive control, and linarin. Their mortality rates (K) 0.019 and 0.025 respectively were lesser than those obtained for methanolic extract and positive control (both with $K=0.06$), and linarin ($K=0.051$). The low value of K for negative control (0.024) apparently contradicts its mortality time (180 sec), this could be explained to the low slope obtained in regression analysis for this experiment, and is not comparable with the other experiments because the mortality time scale is different (seconds for negative control, and minutes for the others). Likewise the extinction coefficients correlated with photoprotection: the larger extinction coefficient, the larger photoprotection in cellular death UV-B induced experiments using bacteria.

Methanolic extract had the smallest SPF; probably due to low concentration of the photoprotective compounds in the extract. In contrast with photoprotection in bacteria experiments, linarin had larger SPF than linarin acetate; probably linarin acetate is absorbed across the skin due to its high lipofilicity.

In all cases; methanolic extract of *B. scordioides*, isolated compounds, and positive control protected the skin tissue from irradiation burn because there was not evidence of histological changes, while negative control exhibited cellular (vacuolization) and vascular inflammatory alterations (edema), as well as *stratum corneum* detachment.

Verbascoside was the best photoprotector compound because protection against cellular death and SPF values were greater than those obtained from linarin, linarin acetate, and escalol. In accordance with Elmetts and Young, 1996, the sunscreens should have two activities: first, to furnish a SPF higher than 15 and, second, to have antioxidant properties. Verbascoside could be a good sunscreen because its SPF is higher than 15, and it has antioxidant and wound healing properties (Mensah et al., 2001).

5. Conclusion

The present work correlates the popular use of *B. scordioides* with its photoprotective effect. The methanolic extract of *B. scordioides* has photoprotective activity, this may be explained by the presence of absorbing UV-B compounds in the extract such as Verbascoside and Linarin. We conclude that Verbascoside had the best photoprotection quality of the tested compounds.

6. Acknowledgements

We thank Alejandrina Acosta, Carmen Márquez, and Rocío Patiño for their technical assistant. We are grateful to Dra. María Edith López V. for the plant identification. This work was partially financed by DGAPA- UNAM (grant IN-210197) and PAEP-UNAM.

References

- Aguilar, A., López, E., Camacho, P., Chino, S. y Jácquez, R. P., 1994. Plantas Medicinales del Herbario del IMSS: su distribución por enfermedades. IMSS-Lab. Roche. México D.F. Pp. 167-168.
- Baker, W., Hemming, R., Ollis, W.D. 1951. The structures of buddleoflavonoside (linarin) and buddleoflavonol (acasetin). Journal of the Chemical Society, 691-695.
- Bissett, D.L., McBride, J.F., Hannon, D.P., Patrick, L.F. 1991. Time-depend decrease in sunscreen protection against chronic photodamage in UV-B irradiated hairless mouse skin. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 9: 323-334.
- Brash, D. E., Rudolph, J.A., Simon, J.A., Ling, A., Mckenna, G.J., Baden, H.P., Halper, A.J., Ponten, J. 1991. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A. 88, 10124-10128.
- Eisenstadt, E., Carlton, B.C. and Brown, B.J. 1994. Gene mutation. In: Gerhardt, P. (Ed) Method for general and molecular bacteriology. ASM, Washington D.C. USA. Pp. 297-303.
- Elmets, C.A. and Young, C. 1996. Sunscreens and photocarcinogenesis: an objective assessment. Photochem. Photobiol. 63(4), 435-440.
- Geisman, T.A., 1962. The chemistry of the flavonoid compounds. McMillan, New York, p.322.
- Lowe, N. J. and Friedlander, J. 1997. Sunscreens: Rationale for Use to Reduce Photodamage and Phototoxicity. In: Lowe, N.J., Shaath, N.A. and Pathak. Sunscreens. Development, Evaluation and Regulatory Aspects. 2nd Ed. Marcel Dekker. New York, USA. Pp.35-58.
- Mensah, A.Y., Sampson, J., Houghton, P.J., Hylands, P.J., Westbrook, J., Dunn, M., Hughes, M.A. and Cherry, G.W. 2001. Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. J. of Ethnopharmacol. 77: 219-216.

- Miller, D.L., Weinstock, M.A. 1994. Non-melanoma skin cancer in the United States: incidence. J. Am. Acad. Dermatol. 30, 774-778.
- Naylor, M.F., Boyd, A., Smith, D.W., Cameron, G.S., Hubbad, D., Neldner, K.H. 1995. High sun protection factor sunscreens in the suppression of actinic neoplasia. Arch. Dermatol. 131, 170-175..
- Rzedowski, J. y Rzedowski, G., 1985. Flora fanerogámica del Valle de México, Vol. II: Dicotyledoneae. Ed. E.N.C.B. México, D.F. Pp. 212-215.
- Russell, A.D., 1992. Ultraviolet Radiation. In: Desinfection, Preservation and Sterilization. Edited by Russell, A.D., Hugo, W.B. and Ayliffe, G.A.J. Blackwell Scientific Publications. Boston, MA, USA. Pp. 544-556.
- Wang, Z.Y., Agarwal, R., Bickers, D.R., Mukhtar, H. 1991. Protection against ultraviolet B radiation-induced photocarcinogenesis in hairless mice by green tea polyphenols. Carcinogenesis. 12, 1527-1530.
- Zimin, L., Zhongjian, J., 1991. Phenylpropanoid and steroid glycosides from *Pedicularis striata*. Phytochemistry 30 (4), 1341-1344.

TABLE 1. Absorption maxims (λ max) and Extinction Coefficients of isolated compounds.

Compound	λ max (nm)	Extinction Coefficient
Linarin	334	18,832
Linarin acetate	320	32,335
Verbascoside	291 y 332	26,130 y 35,113

TABLE 3. Statistical significance according to Friedman and Wilcoxon test.

Friedman Test: MeOH EXTRACT of <i>B. scordioides</i>		VERBASCOSIDE		LINARIN		LINARIN ACETATE		ESCALOL	
$\chi^2=10.78$ p<0.05		$\chi^2=37.5$ p<0.005		$\chi^2=28.27$ p<0.005		$\chi^2=28.27$ p<0.005		$\chi^2=28.27$ p<0.005	

Wilcoxon test: MeOH EXTRACT of <i>B. scordioides</i>		VERBASCOSIDE		LINARIN		LINARIN ACETATE		ESCALOL	
MED	(P-value)	MED	(P-value)	MED	(P-value)	MED	(P-value)	MED	(P-value)
1-2	0.046	1-2	0.025	1-2	0.025	1-2	0.025	1-2	0.025
1-3	0.083 n.s.	1-4	0.025	1-4	0.046	1-4	0.046	1-4	0.025
1-8	0.083 n.s.	1-8	0.025	1-8	0.025	1-5	0.317 n.s.	1-5	0.083 n.s.
1-16	0.157 n.s.	1-16	0.025	1-9	0.157 n.s.	1-8	0.500 n.s.	1-8	0.083 n.s.
1-20	0.157 n.s.	1-22	0.025	1-16	0.157 n.s.	1-16	0.500 n.s.		
		1-24	0.083 n.s.	1-22	0.317 n.s.				
		1-32	0.570 n.s.	1-28	0.059 n.s.				

n.s.= no significant difference

233

TABLE 2. SPF measurements in guinea pigs

Substance (2 mg/cm ²)	SPF	Exposition time without erythema (min)
Methanolic extract of <i>B. scordioides</i>	3 ± 0.09	40 ± 1.8
Verbascoside	24 ± 0.7	440 ± 14
Linarin	9 ± 0.3	160 ± 6
Linarin acetate	5 ± 0.2	80 ± 4
Escalol	5 ± 0.1	80 ± 2