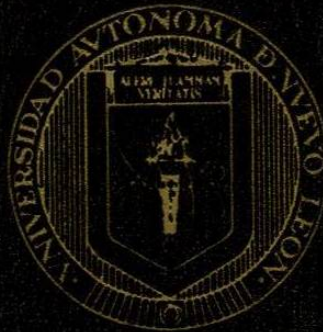


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



ESTUDIO FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
Tiquilia canescens

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

PRESENTA

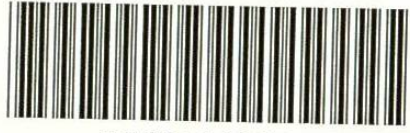
Q.B.P. CLAUDIA CELESTE VELAZQUEZ GONZALEZ

SAN NICOLAS DE LOS GARZA N.L.

JUNIO DE 1997

Q.B.P. CLAUDIA CELESTE VELA ZOUQUEZ GONZALEZ

TM
Z5320
FCB
1997
V4



1020119991

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

MT
04625
337
FPII
PV



ESTUDIO FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

PRESENTA

ESTUDIO FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
Tiquilia canescens
Q.B.P. CLAUDIA CELESTE VELAZQUEZ GONZALEZ

COMISION DE TESIS

Maria Julia Jutes de Star
DRA. MARIA JUTES DE STAR
PRESIDENTE



COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

FONDO TESIS

M.C. AZUCENA ORANDAY CARDENAS
SECRETARIO
PRESENTA

M.C. CATALINA RIVAS MORALES
Q.B.P. CLAUDIA CELESTE VELAZQUEZ GONZALEZ

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

JUNIO DE 1997

SAN NICOLAS DE LOS GARZA N.L.

JUNIO DE 1997

012 20 - 2

FM
25-
F B
197
V4

;

.

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
*Tiquilia canescens***

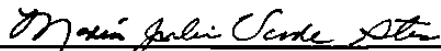
TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES**

PRESENTA

Q.B.P. CLAUDIA CELESTE VELAZQUEZ GONZALEZ

COMISION DE TESIS



**DRA. MARIA JULIA VERDE STAR
PRESIDENTE**

**M.C. AZUCENA ORANDAY CARDENAS
SECRETARIO**

**M.C. CATALINA RIVAS MORALES
VOCAL**

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

JUNIO DE 1997

ESTE TRABAJO DE INVESTIGACION FUE REALIZADO EN:

El laboratorio de Fitoquímica y en el Departamento de Bioquímica ambos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Ma. Julia Verde Star.

INDICE

	Página
Dedicatorias	I
Agradecimientos.....	II
Lista de figuras	III
Abreviaturas	V
Resumen	VI
1.- Introducción	1
1.1.- Objetivo.....	3
1.2.- Hipótesis.....	3
1.3.- Antecedentes	4
2.- Materiales y Métodos	
2.1.- Material Vegetal.....	10
2.2.- Extracción del material vegetal	10
2.3.- Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios	11
2.4.- Pruebas de inhibición bacteriana	14
3.- Resultados	
3.1.- Actividad antimicrobiana de los extractos	16
3.2.- Estudio fitoquímico de <i>Tiquilia canescens</i>	22
4.- Discusión	33
5.- Conclusiones	35
6.- Bibliografía	36

DEDICATORIAS:

Esta tesis se la dedico especialmente a mis padres:

JUAN GUILLERMO VELAZQUEZ GUTIERREZ

Y

MARINA GONZALEZ DE VELAZQUEZ

*GRACIAS POR DARME LA VIDA, SU AMOR Y APOYO EN TODOS LOS
MOMENTOS DIFICILES.*

A mis hermanos Guillermo y Juan con todo mi cariño.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Ma. Julia Verde Star por todo **SU APOYO** paciencia y consejos para poder concluir otro éxito mas en mi carrera profesional de todo corazón **muchas gracias.**

A la Maestra Catalina Rivas por su orientación y asesoría en la parte de actividad antimicrobiana.

A la Maestra Azucena Oranday por sus sugerencias y acertada revisión del presente trabajo.

Al Ing. Armando Martínez , Coordinador de la Carrera de IIA de la Facultad de Ciencias Químicas, por su interés durante el desarrollo del trabajo.

A la Q.F.B. Gloria Nelly Páez Subdirectora Administrativa de la Facultad de Ciencias Químicas por su apoyo.

Al Ing. José Manuel Martínez Director de la Facultad de Ciencias Químicas, por su confianza y apoyo.

Al Sr. José Luis Gibaja por su apoyo con el trabajo fotográfico que se utilizó en el presente trabajo.

A la M.C. Angeles Verástegui por sus consejos y amistad en todo momento.

LISTA DE FIGURAS, GRAFICAS Y TABLAS

	Página
FIGURAS	
1.- Efecto antimicrobiano del extracto hexánico sobre el crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Shigella flexeri</i> , <i>Vibrio cholerae</i> y <i>Escherichia coli</i>	20
2.- Dosis mínima inhibitoria del extracto hexánico sobre el crecimiento de 4 bacterias	20
3.- Inhibición bacteriana del cloramfenicol 25mg/mL sobre <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Listeria monocytogenes</i>	21
4.- Espectro IR de EHTC9	25
5.- Espectro IR de EHTC7	26
GRAFICAS	
1.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria del extracto hexánico de <i>Tiquilia canescens</i> sobre 8 especies bacterianas	18
2.- Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana del extracto hexánico de <i>Tiquilia canescens</i> con cloramfenicol en 8 especies bacterianas	19
TABLAS	
1.- Compuestos aislados de especies de la familia Boraginaceae	9
2.- Actividad antimicrobiana de los diferentes extractos de <i>Tiquilia canescens</i> sobre 8 especies bacterianas.....	16
3.- Inhibición bacteriana de las diferentes concentraciones del extracto hexánico de <i>Tiquilia canescens</i> comparado con el cloramfenicol.....	17
4.- CCD en placas de SiO ₂ del extracto hexánico.....	22

5.- CCD en placas de SiO ₂ del extracto clorofórmico.....	22
6.- CCD en placas de SiO ₂ del extracto metanólico.....	23
7.- Pruebas químicas para identificación de grupos funcionales del extracto clorofórmico.	29
8.- Pruebas químicas para identificación de grupos funcionales del extracto metanólico.....	32

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCL	Cromatografía en columna líquida
cm	Centímetros
DNFH	Dinitrofenilhidracina
EHTC	Extracto hexánico
ECTC	Extracto clorofórmico
EMTC	Extracto metanólico
g	Gramos
IR	Espectro infrarojo
LB	Liebermann-Burchard
mg	Miligramos
mL	Militros
mm	Milímetros
Pf	Punto de fusión
Rf	Razón de la velocidad de flujo de muestra con respecto al eluyente
UV	Ultravioleta

RESUMEN

Actualmente algunos de los microorganismos causantes de enfermedades gastrointestinales han adquirido resistencia contra una gran variedad de antibióticos. El objetivo de éste trabajo es determinar la actividad antimicrobiana de la parte aérea de *Tiquilia canescens* (Boraginaceae),. Conforme a los antecedentes populares; la hipótesis del presente trabajo es que los metabolitos secundarios de la parte aérea de *Tiquilia canescens* tienen actividad biológica contra microorganismos causantes de enfermedades gastrointestinales como la disentería. La planta se recolectó en el kilómetro 21 de la carretera a Colombia en el estado de Nuevo León, la extracción se realizó en forma continua con equipo Soxhlet utilizando solventes de polaridad creciente: hexano, cloroformo y metanol, determinándose actividad antimicrobiana de los extractos en los siguientes microorganismos: *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, activándose en caldo BHI por 22hrs. a 37°C, las pruebas de actividad antimicrobiana se realizaron *in vitro* por el método de difusión en placa; se utilizó una suspensión bacteriana de concentración 15×10^8 UFC/mL, sobre la superficie del medio sólido C. Rivas (Dextrosa, peptona de colágeno, extracto de levadura), después se hicieron orificios (5mm), colocando 60µL de cada uno de los extractos a una dilución de 1:10 (6mg/mL). En un orificio se colocó el solvente utilizado en la extracción como control negativo y cloramfenicol (25mg/mL) como control positivo. Se incubó a 37°C por 24 hrs después de éste período se midieron halos de inhibición en mm para cada prueba. De los 3 extractos de la parte aérea de *Tiquilia canescens*, sólo el hexánico demostró tener efecto inhibitorio sobre todas las especies bacterianas a una concentración de 6mg/mL. Las especies más susceptibles fueron *Shigella boydii*, *Shigella flexeri* y *Salmonella typhi*. Del extracto activo se aislaron 2 sólidos. Sólido EHTC7 con señales IR en cm^{-1} : 3456, 2966, 2920, 1722, 1150 indica sea un aldehído alifático, mientras que el sólido EHTC9 presentó señales IR en región 2919, 2849, 1734, 1467, 1374, 1177, 724 indica una cetona alifática. En el extracto clorofórmico se detectó presencia de alcaloides por reacciones químicas (Dragendorff), mientras que en el extracto metanólico se determinó la presencia de quinonas (Bornträger).

1.- INTRODUCCION

Las plantas medicinales mexicanas han sido tradicionalmente usadas por nuestro pueblo y constituyen una de las manifestaciones del acervo cultural que nos legaron nuestros antepasados; los cuales, han utilizado en forma empírica para el tratamiento de un gran número de enfermedades (38, 55).

La raza humana ha dependido de las plantas y estas han servido para la formulación de una gran variedad de productos de la industria farmacéutica, ya que contienen agentes medicinales de complejidad química y actividad biológica (34) En la actualidad los productos naturales incluyendo derivados análogos representan más del 50% de todas las drogas de uso clínico (55).

Lo más importante en el estudio de las plantas medicinales es realizar análisis químicos y determinar su actividad biológica para de ésta manera contribuir con validez científica al uso de las mismas como remedios caseros (19)

Los análisis fitoquímicos permiten establecer criterios quimiotaxonómicos entre las familias de plantas, y de esta información se puede predecir la actividad fisiológica que la planta posee; sin embargo, esta actividad puede no ser debida a un principio activo en particular sino a la acción sinérgica de todos sus compuestos aún cuando por sí solos no presentan efectos terapéuticos(13, 56)

La búsqueda de nuevos medicamentos se ha realizado en una diversidad de plantas, y de ellas se han aislado una gran cantidad de metabolitos secundarios con actividad; no obstante, existen aún muchas especies no estudiadas que pudieran contener compuestos activos para algunas enfermedades, entre las que se encuentran las enfermedades gastrointestinales(46).

Las enfermedades gastrointestinales son muy frecuentes en la población mexicana, la mayoría de ellas son ocasionadas por bacterias, virus o sustancias químicas, las más importantes son las toxi-infecciones alimentarias en niños y as infecciones intestinales en adultos(46).

Para contrarrestar estas enfermedades, se han establecido tratamientos quimioterapéuticos, sin embargo, muchos de los microorganismos han adquirido con el paso del tiempo resistencia contra los antibióticos actuales por lo que es necesario buscar alternativas nuevas para combatir o controlar a éstos patógenos (46).

La importancia del presente trabajo radica en aislar los metabolitos secundarios presentes en la parte aérea de *Tiquilia canescens*, contribuyendo así a la quimiotaxonomía de la familia Boraginaceae y determinar su actividad biológica contra microorganismos de importancia médica (46,56).

1.1.- OBJETIVO.

Aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios de la parte aérea de *Tiquilia canescens*, y determinación de la actividad biológica de sus extractos.

1.2.- HIPOTESIS.

Los metabolitos secundarios de la parte aérea de *Tiquilia canescens* presentan actividad biológica contra microorganismos que causan enfermedades gastrointestinales como la disentería.

1.3.- ANTECEDENTES

Alfred Richardson en 1976 reubicó el género *Coldenia*, encontrando que una de sus características principales es su distribución restringida a habitats forestales, bosques y campos secos de arroz del viejo mundo; reinstalándose el género *Tiquilia* para las plantas de habitat xérico del Nuevo Mundo, además de otros caracteres diferenciales de tipo morfológico. Por lo tanto las especies de éste género se conocen como *Tiquilia canescens* (DC) A. Richardson y *Tiquilia hispidissima* (T & G) A. Richardson(39).

El uso medicinal empírico que se le ha adjudicado a esta especie es utilizando un té o cocimiento de la parte aérea para dolores estomacales y enfermedades gastrointestinales como la disentería (56).

METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA FAMILIA BORAGINACEAE

Al realizar una búsqueda bibliográfica en el Chemical Abstracts desde sus inicios a la fecha no se encontraron reportes de trabajos científicos en el género *Tiquilia* ni de la especie *Tiquilia canescens*, se reporta a continuación los trabajos realizados sobre la familia Boraginaceae.

Una gran cantidad de compuestos se han aislado de diversas especies de la familia Boraginaceae entre los que se encuentran alcaloides, flavonoides, saponinas quinonas por mencionar algunos (4, 6, 14, 20, 21, 22, 45). Ver tabla 1.

La principal característica quimiotaxonómica de la familia Boraginaceae es la presencia de alcaloides pirrolizidínicos como la Amabilina, Thesinina y Licopsamina, la mayoría de los alcaloides aislados de las especies de esta familia son tóxicos en dosis altas, pero en cantidades mínimas suelen tener efectos medicinales (1,38,31 56).

En especies de *Heliotropium* también se han aislado alcaloides pirrolizidínicos los cuales en animales de laboratorio tales como ratas y ratones han causado daño en el hígado específicamente en el metabolismo de la vitamina A (9).

Alcaloides pirrolizidínicos como la tricodesmina fueron aislados de *Trichodesma africanum* estos compuestos fueron identificados por métodos espectroscópicos y - su acción sobre animales experimentales como ratas y ratones se observó a nivel muscular provocando contracción muscular además de causar disminución de la -- presión sanguínea (37).

La equinatina y heliotrina que son alcaloides pirrolizidínicos fueron aislados del extracto etanólico de *Moltkiopsis ciliata* por Rizk y col. en 1988, a este extracto se le determinó la LD₅₀ en ratas y ratones por vía oral, reportando dosis de 7 mg/Kg y 20 mg/Kg respectivamente; concluyendo que la principal causa de muerte en los animales utilizados se debía a una deficiencia cardíaca provocada por el extracto administrado(41).

La acción anticoagulante de un polifenol aislado de *Pulmonaria mollissima* fué determinado en ratas albinas por Gerbert en 1988; encontrando que una administración intravenosa de 80 mg/Kg de la fracción en donde se identificó al polifenol, provocaba alteraciones en el proceso de coagulación en los animales sujetos a experimentación (16).

Constituyentes fenólicos tales como el ácido caféico, ácido clorogénico y ácido rosmarínico han sido aislados del extracto acuoso de especies del género *Lithospermum* en los que experimentalmente se he demostrado acción antigonaotrópica siendo el ácido rosmarínico el compuesto más activo (55). También en experimentos realizados en especímenes de laboratorio como las ratas se ha observado que el ácido rosmarínico tiene efectos antihormonales a nivel de tiroides, por lo que éste tipo de compuesto aislado de especies de la familia Boraginaceae puede ser utilizado en medicina para el tratamiento de hipertiroidismo (2).

De la corteza de *Cordia geetzei* se han aislado polifenoles como la cordigona, los cuales presentan acción fungicida contra especies como *Cladosporium cucumerinum* (30).

Se han sido encontrado saponinas en extractos de *Anchusa officinalis* L. en los cuales se ha observado acción hemolítica in vitro (42).

La artemetina, flavona aislada de *Cordia verbenaceae* en experimentación con ratas ha mostrado actividad antiinflamatoria a dosis que oscilan entre 67.07 mg/Kg y 1 mg/Kg vía oral, se ha demostrado experimentalmente que éste compuesto presenta una toxicidad muy baja (48).

Verde, en 1987 pudo aislar dos compuestos del extracto hexánico de la parte aérea de *Tiquilia canescens*, obtenidos por extracción continua en Soxhlet, uno de los compuestos reportados es una cetona alifática de Pf=72-74°C con una fórmula general: R-(CH₂)_n-C-(CH₂)_n-R, y el otro un hidrocarburo(55).

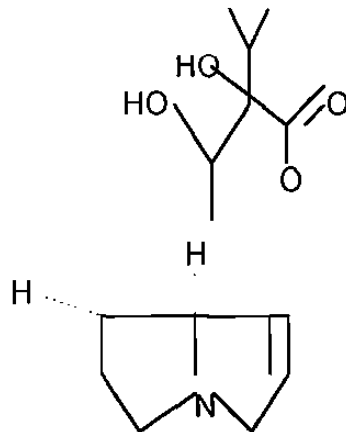


Los alcaloides constituyen un grupo muy heterogéneo de bases vegetales nitrogenadas, la mayoría se hallan en los vegetales como sales de ácidos orgánicos. Se les ha considerado como productos terminales del metabolismo del nitrógeno, también se les ha asociado con la protección del vegetal ante los actos predatorios de insectos y animales herbívoros, en lo que concierne a su distribución en la planta, en ocasiones, se hallan restringidos a cierto órgano o a ciertas partes de la planta; a veces se les encuentra en toda la planta(12).

La propiedad característica de los alcaloides es su basicidad, por lo que los métodos para aislarlos purificarlos e identificarlos por lo general aprovechan su basicidad, muchos alcaloides pueden extraerse con solventes neutros como alcoholes y cloroformo(12).

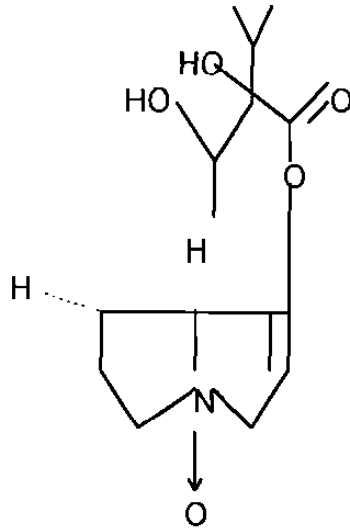
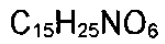
Los alcaloides a los que se le ha elucidado su estructura a sido a partir de IR, RMN y espectroscopía de masas este último ayuda con el conocimiento estructural a que pertenece.(12) A continuación se muestra los compuestos que han sido aislados de algunas especies de la familia Boraginaceae con sus estructuras(17).

AMABILINA



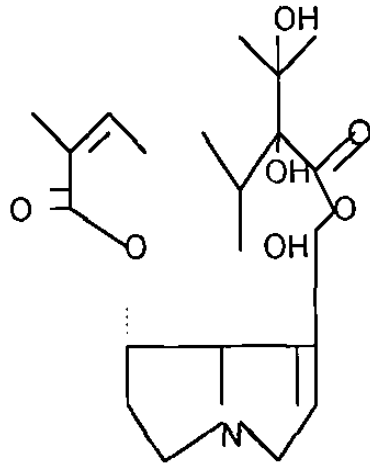
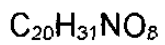
este alcaloide su estructura la determinó Man'ko en 1972. Con una fórmula empírica $C_{15}H_{25}NO_4$

EQUINATINA N-OXIDO



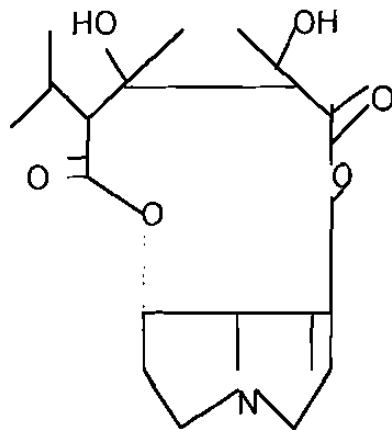
Este alcaloide se forma a partir de la equinatina por oxidación se ha encontrado en *Cynoglossum pictum* (Boraginaceae)

HELIOSUPINA



Este alcaloide fué aislado de *Cynoglossum viridiflorum* (Boraginaceae) por Man'ko en 1972

TRICODESMINA



Este alcaloide pirrolizidinico se ha encontrado en *Tricodesma africanum*, su estructura se ha elucidado por métodos espectroscópicos.

Respecto a la actividad biológica de los alcaloides algunos de ellos como la mitomicina se han utilizado como agentes antimicrobianos en bacterias de importancia médica, también a los alcaloides se les ha atribuido efectos contra algunos cánceres (37).

En extractos de *Heliotropium indicum* se ha aislado el alcaloide indicina, a un N-óxido del mismo se le ha atribuido actividad sobre diferentes tumores como la leucemia en ratas (23).

Existen una gran cantidad de investigaciones en donde se determina la actividad antimicrobiana de extractos de plantas a las cuales empíricamente se les ha adjudicado un uso medicinal, entre los métodos de actividad antimicrobiana se encuentran los métodos de difusión en placa, se coloca el extracto a probar en orificios realizados a la misma o en discos de papel filtro(11).

Antecedentes de trabajos en los cuales se les ha determinado actividad biológica de un extracto de una planta con antecedentes de uso empírico medicinal tenemos a Boakye y col que en 1977, determinaron la actividad antimicrobiana de especies de la familia Annonaceae, utilizaron bacterias de importancia médica como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* por mencionar algunos; realizaron el método de difusión en placa, colocaron 60 μ L del extracto metanólico de los frutos de las especies de la familia Annonaceae sobre una placa de agar inoculada con una concentración conocida de los microorganismos estudiados, a esa placa le realizaron orificios de 8mm de diámetro se utilizó un control positivo el cloramfenicol (8).

Tabla1.- Compuestos aislados de especies de la familia Boraginaceae.

Especie	compuesto	Nombre	Referencia
<i>Caccina crassifolia</i>	Alcaloide	Supinina Heliotrina	53
<i>Cynoglossum creticum</i>	Alcaloide pirrolizidinico	Equinatina Rinderina Heliosupina	1
<i>Hackelia longituba</i>	Alcaloide pirrolizidinico	Longitubina Neolatifolina	44
<i>Moltkiopscis ciliata</i>	Alcaloide pirrolizidínico	Heliotrina Equinatina	41
<i>Tournefortia sogdiana</i>	Alcaloide	Equinatina	54
<i>Trichodesma africanum</i>	Alcaloide pirrolizidinico	Tricodesmina	36
<i>Lithospermum aruense</i>	Constituyentes fenólicos y coumarinas	Ac. p- hidrobenzóico Ac. p-cumarico Ac. p-hidroxifenil acético	52
<i>Lithospermum sp.</i>	Constituyentes fenólicos	Ac. rosmarínico Ac. clorogénico Ac. cafeico	57
<i>Borago officinalis</i> L.	Esteroides	Ac. \sqrt -linolénico Ac. estéarico	15, 49
<i>Heliotropium marifolium</i> <i>Heliotropium rariflorum</i>	Esteroides	β - sitosterol	51
<i>Anchusa officinalis</i>	Polifenoles	-----	16

2.- MATERIALES Y METODOS

2.1.- Material vegetal.

2.1.1.- Clasificación y descripción botánica de *Tiquilia canescens*.

Clasificación botánica.

Reino: Vegetal

subreino: Embryobionta

División: Magnoliophyta

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Dicotyledoneae

Subclase: Asteridae

Orden: Polemoniales

Suborden: Boragineae

Familia: Boraginaceae

Género: *Tiquilia*

Especie: *T. canescens*

Tiquilia canescens o *Coldenia canescens* es una planta perenne de 2-10 cm de altura y de 20-30 cm de diámetro usualmente postrada; presenta hojas numerosas, alternas de forma elíptica u ovalada de menos de media pulgada de longitud de color grisáceo o blancuzco; ésta planta tiene un fruto ovoide-globoso de 2-2.5mm diámetro, lóbulos del cáliz lineales-lanceolados corola color púrpura, rosa raramente blanco de 5-6mm de ancho. Nombres comunes: " Oreja de perro", "Coldenia gris", " hierba de la virgen" y "Oreja de ratón" (7, 10, 23, 24, 38, 54).

2.1.2.- Distribución geográfica.

Esta es una planta nativa de los Estados Unidos de América específicamente de Texas y de los desiertos del sureste de California, en México se le localiza en los estados de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Zacatecas, Hidalgo y Tamaulipas (24, 38, 54)

2.1.3.- Recolección de *T. canescens*.

La planta se recolectó en el kilómetro 21 de la carretera a Colombia en el estado de Nuevo León durante los meses de Febrero a Abril.

2.2.- Extracción del material vegetal.

La parte aérea de la planta fué lo que se utilizó, una vez colectado y clasificado el material vegetal recolectado se secó a la sombra, para posteriormente tritarlo; el material seco y molido se extrajo en forma continua en extractores Soxhlet con

disolventes de polaridad creciente: hexano, cloroformo y metanol por un periodo consecutivo de siete días con cada solvente.

2.3.- Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios.

El aislamiento de los metabolitos secundarios se realizó por cromatografía en columna líquida, cromatografía preparativa y cristalizaciones. Para la identificación se usaron métodos físicos y químicos como: métodos cromatográficos, reacciones para determinar grupos funcionales y métodos espectroscópicos.

2.3.1.- Métodos cromatográficos.

2.3.1.1.- Cromatografía en capa delgada.

Este método es usado para la identificación y purificación de compuestos. Las placas cromatográficas se prepararon en el Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L., utilizando silicar TLC 7-G (Mallinkrodt, USA) 30% mezclada en agua, aplicándola sobre las placas con una pipeta Pasteur, se secaron después por un periodo de una hora en la estufa a 100 °C las dimensiones de las placas fueron:

Base	Altura	espesor
5 cm	10 cm	1 mm
20 cm	20 cm	4 mm

En la placa ya seca se colocó la muestra por medio de un capilar, la placa se introdujo a una cámara de vidrio de boca ancha la cual contenía el eluyente que fué de diferente polaridad y mezclas de los mismos en diversas proporciones. Para calcular el R_f se midió la distancia del punto de aplicación de la muestra hasta la mitad de la mancha detectada y se dividirá este valor entre la distancia del punto de aplicación y el frente del eluyente.

2.3.1.2.- Agentes cromogénicos.

Para observar el cromatograma y localizar los componentes, que no son apreciables al visible se usaron: Luz ultravioleta, vapores de yodo y reactivos específicos.

2.3.1. 3.- Cromatografía en columna líquida.

Esta técnica consiste en la separación de componentes de una mezcla, mediante una fase móvil, a través de una fase estacionaria, para ésto se utilizó una columna de vidrio de 40 X 3.5cm para separar cada uno de los extractos, y como adsorbente se utilizó gel malla 60 (Merck), y gel malla 100-200 (Universal Adsorbents Inc, USA) como fase móvil se probaron disolventes de polaridad creciente y mezclas de ellos.

2.3.2.- Cristalización.

Se usó para purificar compuestos sólidos a temperatura ambiente, con disolventes apropiados siguiendo la *metodología convencional para Fitoquímica*.

2.3.3.- Métodos físicos.

2.3.3.1.- Punto de fusión

Se utilizó un aparato Melt-Temp en capilar cerrado, el termómetro que se requirió fué de 400°C. (Todos los puntos de fusión se reportaron en grados centígrados).

2.3.4.- Métodos químicos

Materia orgánica

Prueba de la flama: Esta prueba se utiliza para diferenciar un compuesto orgánico de un inorgánico. Se coloca una pequeña cantidad de muestra en una asa de platino y se lleva a la flama, si quedan cenizas se concluye que el compuesto es inorgánico.

Insaturaciones

Prueba del Br₂ /CCl₄: Se disuelven 1-2 mg de la muestra en 1mL de CCl₄ y se agrega gota a gota una solución al 2% de bromo en CCl₄, si se observa decoloración de la solución, la prueba es positiva.

Prueba del KMnO₄: Se disuelven 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua, acetona o metanol se añade posteriormente gota a gota una solución de KMnO₄ al 2% en agua, la prueba es positiva si se observa decoloración o formación de un precipitado café resultado de la formación de bióxido de magnesio.

Grupo carbonilo

Prueba de la 2-4-dinitrofenilhidracina: De 1 a 10 mg de la muestra se disuelven en etanol, se le añade a esta muestra una solución saturada de 2-4 dinitrofenilhidracina en ácido clorhídrico 6N, la formación de un precipitado amarillo o naranja indica la presencia de grupo carbonilo.

Oxhidrilos fenólicos

Prueba del FeCl₃: se disuelven 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua o etanol después se le añaden una gotas de cloruro férrico a 12.5% en agua. La aparición de un precipitado rojo, azul violeta o verde se considera positivo. En algunas ocasiones, para hacer más sensible la determinación, es necesario utilizar una

solución no acuosa de cloruro férrico a la que se le añade una base débil como por ejemplo una combinación piridina-cloroformo.

Esteroides y Triterpenos

Prueba de Liebermann-Burchard: Se disuelve una pequeña muestra en cloroformo para luego añadir el reactivo que se prepara agregando una gota de ácido sulfúrico a una mezcla de 1 mL de anhídrido acético con 1 mL de cloroformo, la aparición de cualquier color en el lapso de 1 hora determina que la prueba es positiva.

Prueba de Salkowski: Similar a la de Liebermann-Burchard la muestra en 1 mL de cloroformo se pone en contacto con 1 mL de ácido sulfúrico, desarrolla colores amarillo o rojo, para esteroides y metilesteroides.

Carbohidratos

Prueba de Molisch: En un tubo de ensaye colocar la muestra aproximadamente 1mg o 0.2 mL añadir el reactivo de Molisch el cual se prepara añadiendo 1g de α -naftol en 100 mL de alcohol etílico, después de agregar el reactivo se inclina el tubo y se agrega 1 mL de H_2SO_4 concentrado por las paredes, la prueba se considera positiva cuando se forma un anillo coloreado en la interfase.

Grupo furano

Prueba de Ehrlich: La muestra se disuelve en etanol y se agrega una solución al 5% de p-dimetilaminobenzaldehído en etanol y después se coloca en una cámara conteniendo vapores de ácido clorhídrico siendo positiva si aparece una coloración naranja.

Coumarinas

Se disuelve 1-2mg de la muestra en una solución de NaOH al 10% si aparece una coloración amarilla que desaparece al acidular es positiva.

Sesquiterpenlactonas

Prueba de Baljet: Se utilizan dos soluciones que se mezclan en iguales volúmenes antes de usarse. Solución A: 1 g de ácido pícrico en 100 mL de etanol; solución B: 10 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua. Para la prueba se ponen 2-3 mg de compuesto y de 3 a 4 gotas del reactivo siendo positiva si se forma una coloración naranja o roja oscura.

Quinonas

Prueba de Bornträger: Se hierve por 10 min un poco del material con hidróxido de potasio al 2-5%, se enfría la solución, se acidula extrayéndose posteriormente con

benceno. La capa de benceno se separa y se le agrega solución de hidróxido de potasio. Si la fase de benceno se decolora y la alcalina se torna rojo la prueba es positiva.

Flavonoides

Prueba del H₂SO₄: Una pequeña cantidad de muestra se disuelve en ácido sulfúrico concentrado y se observan coloraciones amarillo para flavonas y flavonoles; naranja-guinda para flavonas; rojo azulado para chalconas. También presenta quinonas con coloración roja-púrpura.

Prueba de Shinoda: La muestra disuelta en etanol, se trata con limaduras de magnesio se aplica calor (60 °C) y después unas gotas de ácido clorhídrico concentrado, se considera positiva la prueba si se presentan colores naranja, rojo, rosa azul y violeta.

Alcaloides

Prueba de Dragendorff: Modificación de Munier y Machelobuf.

El reactivo utilizado consta de dos soluciones:

Solución A.- Se disuelven 0.85 g de nitrato de bismuto, en una mezcla de 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua.

Solución B.- Se disuelven 8 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua.

Para el reactivo se mezclan 5 mL de la solución A, 4 mL de la solución B y 100 mL de agua. Para ésta prueba se corre una cromatografía en capa delgada y se rocía el cromatograma con el reactivo, se considera positivo si persisten por 24 hrs manchas rojo o naranja.

2.4.- Pruebas de inhibición bacteriana.

Los métodos empleados para el ensayo microbiológico se realizaron en el Departamento de Bioquímica a cargo del Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna, de la Facultad de Biología de la U.A.N.L.

2.4.1 Material biológico.

Para el presente estudio se seleccionaron bacterias causantes de enfermedades gastrointestinales tales como: *Salmonella typhi*, *Shigella flexeri*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella boydii* y *Yersinia enterocolitica*. proporcionadas por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina U.A.N.L.

2.4.2. Preparación de medios enriquecidos.

2.4.2.1 Activación de las bacterias.

Se utilizó caldo Brain Heart Infusion (BHI) en la proporción de 4.8g en 100mL de agua destilada. Se prepararon 8 tubos, se le agregó 5mL de medio, posteriormente se esterilizaron, se toma una azada de los microorganismos mencionados en el apartado 2.4.1. se incubó por 22hrs a 37°C.

2.4.2.2 Cultivo de las bacterias.

Se seleccionó el medio de cultivo C.Rivas(Dextrosa, Peptona de colágeno, Extracto de levadura) 8.6g en 100mL de agua destilada, se esterilizó y se adicionó sobre cajas petri en porciones de 20mL., utilizadas en las pruebas *in vitro* para los microorganismos mencionados en la sección 2.4.1.

2.4.3 Pruebas *in vitro*.

Se realizó el método de difusión en placa, colocando 60 µl del extracto sobre un orificio hecho en una placa sólida de medio C. Rivas(Dextrosa, peptona de colágeno, extracto de levadura), previamente inoculado con 200 µl de una suspensión bacteriana de concentración 15×10^8 UFC/mL, colocando 60µL de cada uno de los extractos a una dilución de 1:10 (6mg/mL). En un orificio se colocó el solvente utilizado en la extracción como control negativo y un control positivo; el cloramfenicol(25mg/mL). Se incubó a 37°C por 24 hrs después de éste período se midieron halos de inhibición en mm para cada prueba. Del extracto que presentó actividad antimicrobiana se realizaron diluciones 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, y se probó para todos los microorganismos mencionados en el apartado 2.4.1., con la misma metodología antes mencionada, como control negativo se utilizó el cloroformo; la concentración mínima inhibitoria se definió como la mínima dosis del extracto que presentó el doble de actividad comparado con el control negativo (cloroformo).

3.- RESULTADOS

3.1.- Actividad antimicrobiana de los extractos.

De los 3 extractos de la parte aérea de *Tiquilia canescens*, sólo el hexánico demostró tener efecto inhibitorio sobre todas las especies bacterianas utilizadas en esta investigación (Tabla 2). La inhibición bacteriana de las diferentes concentraciones del extracto hexánico de *Tiquilia canescens* comparado con el cloramfenicol se muestra en la Tabla 3.

Tabla 2.- Actividad antimicrobiana de los diferentes extractos de *Tiquilia canescens* sobre 8 especies bacterianas.

MICROORGANISMOS	EXTRACTOS		
	HEXANICO (1:10)	CLOROFORMICO	METANOLICO
<i>Escherichia coli</i>	++	negativo	negativo
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	negativo	negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	negativo	negativo
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+++	negativo	negativo
<i>Vibrio cholerae</i>	+++	negativo	negativo
<i>Salmonella tiphy</i>	++	negativo	negativo
<i>Shigella boydii</i>	+++	negativo	negativo
<i>Shigella flexeri</i>	++	negativo	negativo

+ INHIBICION DE 15 A 25 mm

++ INHIBICION DE 25 A 35 mm

+++ INHIBICION DE 35 A 45 mm

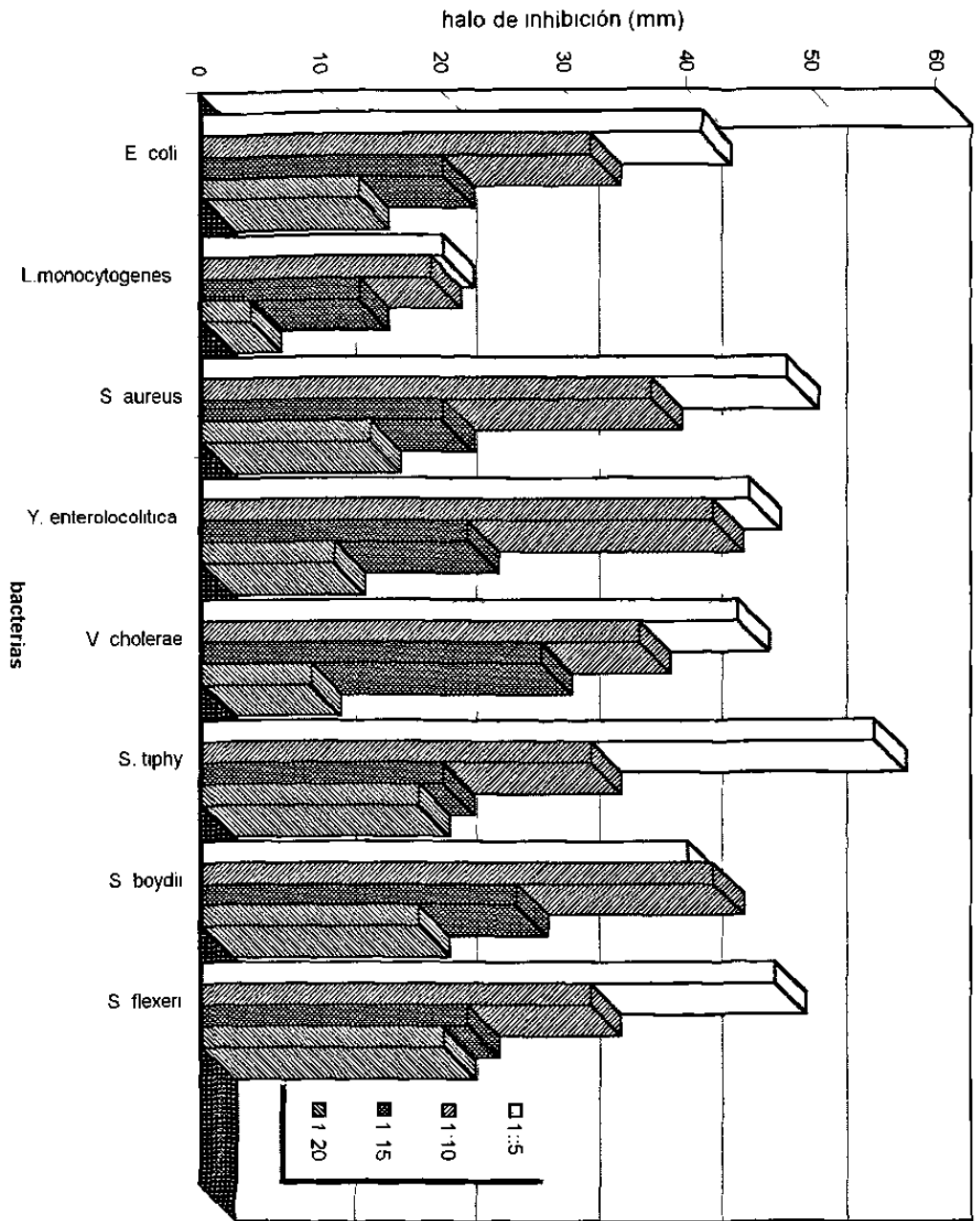
3.1.1.- DETERMINACION DE LA DOSIS MINIMA INHIBITORIA

los resultados obtenidos de las diluciones del extracto(1:5, 1:10, 1:15, 1:20) que presentó actividad antimicrobiana se muestran en la gráfica 1, determinando que la concentración de 1:20 (3mg/mL) fué la mínima dosis que presentaba inhibición bacteriana, mostró mayor susceptibilidad *Salmonella tiphy*, *Shigella flexeri* y *Shigella boydii* (fig 1,2,3). El antibiótico estandar fué el cloramfenicol, se utilizó a una concentración de 25mg/mL (250mg en 10mL de etanol), la inhibición del mismo se comparó con la dilución 1:10 del extracto hexánico. Ver gráfica 2.

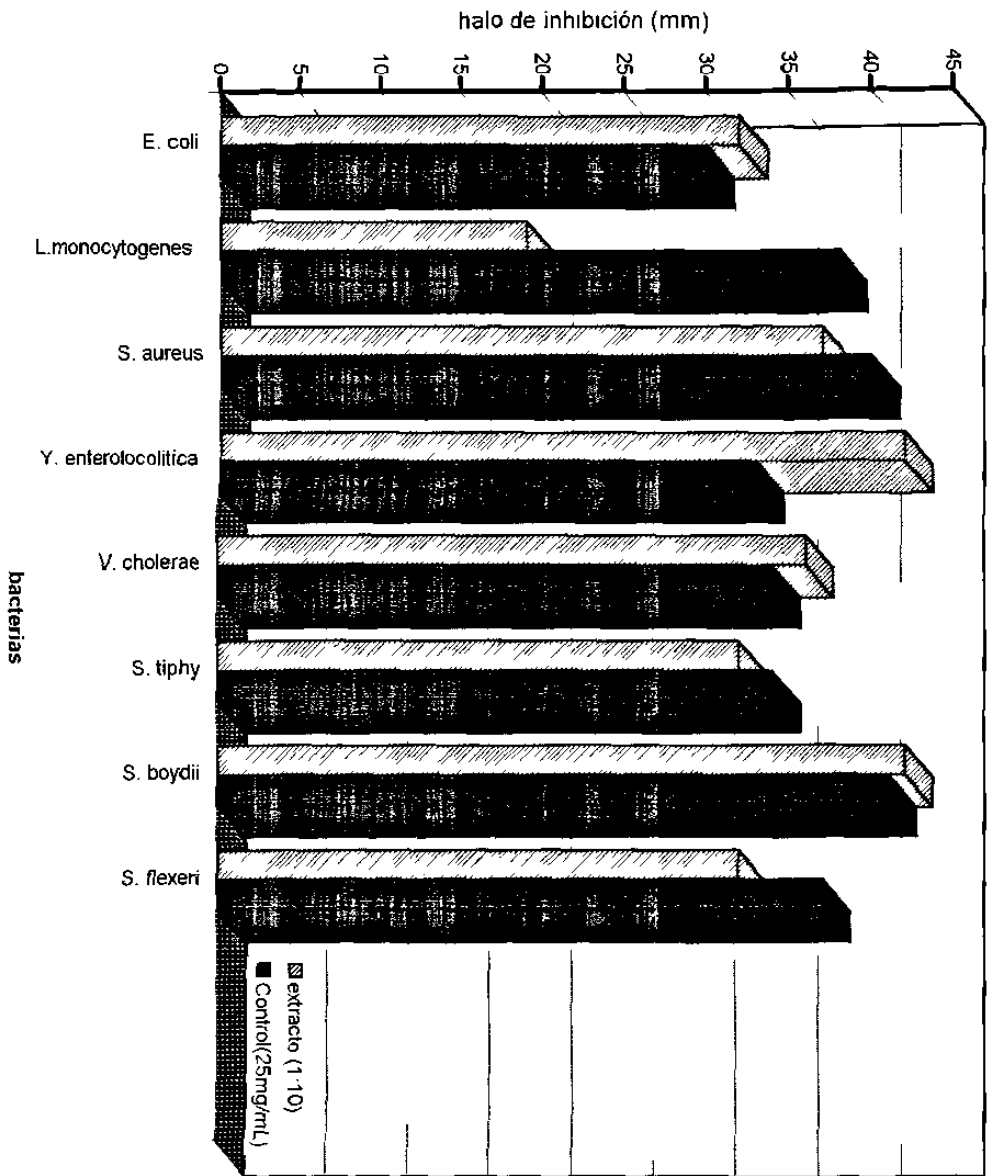
Tabla 3.- Inhibición bacteriana de las diferentes concentraciones del extracto hexánico de *Tiquilia canescens* comparado con el cloramfenicol.

MICROORGANISMOS	HALO DE INHIBICION EN mm				CLORAMFENICOL (25 mg/mL)
	1: 5	1: 10	1: 15	1: 20	
<i>Eschericha coli</i>	40.6 ± 0.5	32.3 ± 0.57	20 ± 0	12.6 ± 1.15	30 ± 0
<i>Listeria monocytogenes</i>	20 ± 0	19.3 ± 0.57	13 ± 1.73	3.6 + 1.15	37.6 ± 0.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	48 ± 0	37 ± 0	20.3 ± 0.57	14.3 ± 1.15	40 ± 0
<i>Yersima enterocolitica</i>	44.6 ± 0.5	41.6 ± 0.5	22.3 ± 0.57	10.6 ± 0.5	33 ± 0
<i>Vibrio cholerae</i>	44.3 ± 1.15	35.6 ± 0.5	28 ± 0	9.3 ± 1.15	33.6 ± 0.5
<i>Salmonella tiphy</i>	55 ± 0	31.6 ± 1.5	20 ± 0	18 ± 0	32.6 ± 0.5
<i>Shigella boydii</i>	42 ± 1.73	40 ± 0	26 ± 0	18 ± 0	41 ± 0
<i>Shigella flexeri</i>	47 ± 0	31.6 ± 0.5	22 ± 0	20 ± 0	37 ± 0

n=3 P< 0.5



Gráfica 1.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria del extracto hexánico de *Tiquilia canescens* sobre 8 especies bacterianas



Gráfica 2.- Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana del extracto hexánico de *Tiquilia canescens* con cloramfenicol en 8 especies bacterianas

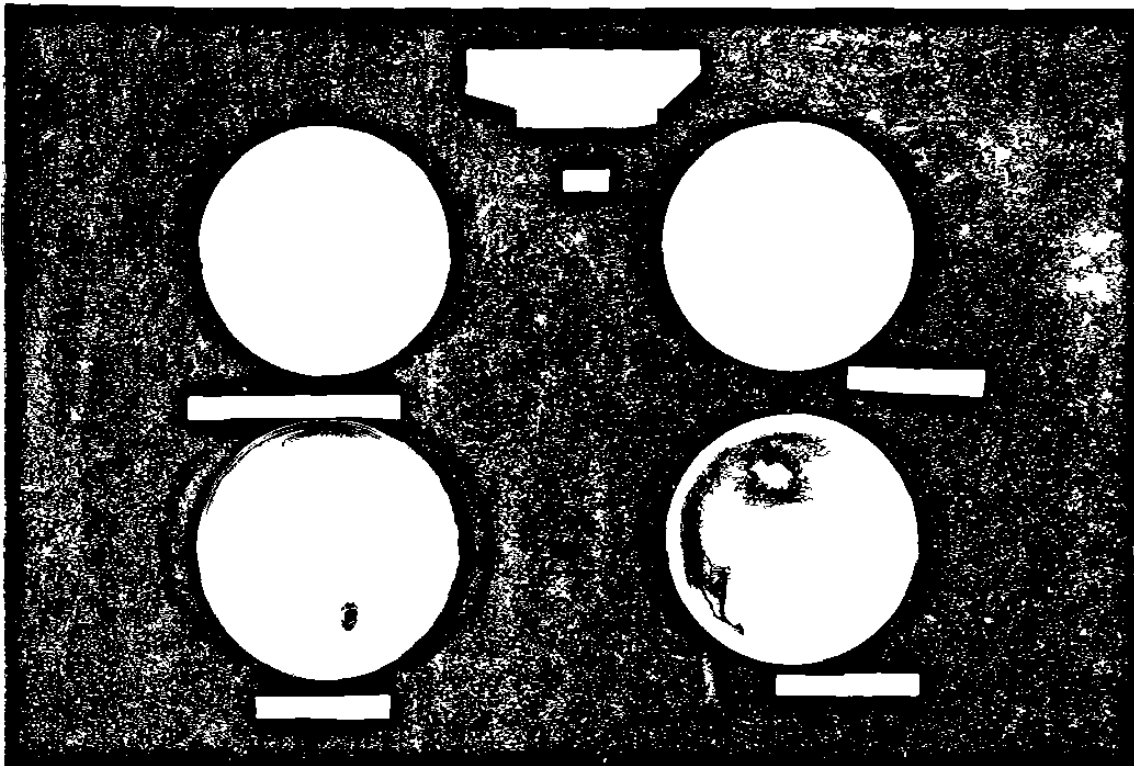


Fig. 1.- Efecto antimicrobiano del extracto hexánico sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexeri*, *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*.

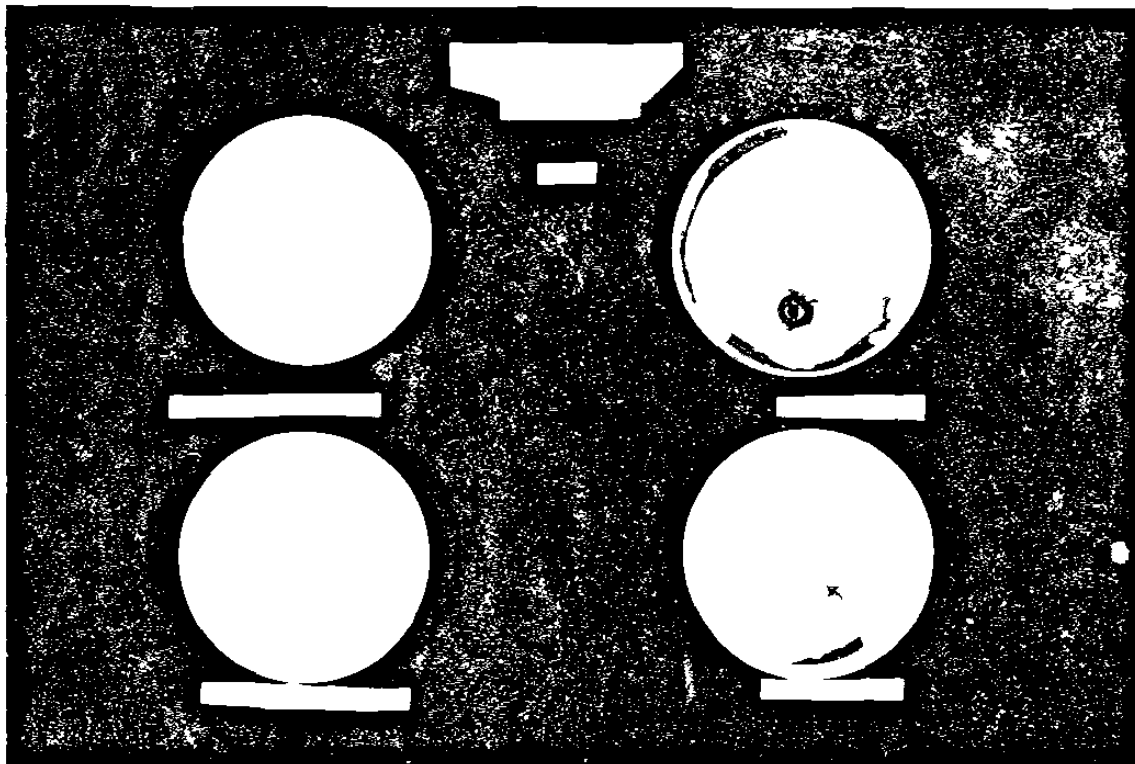


Fig 2.- Dosis mínima inhibitoria del extracto hexánico sobre el crecimiento de 4 bacterias.

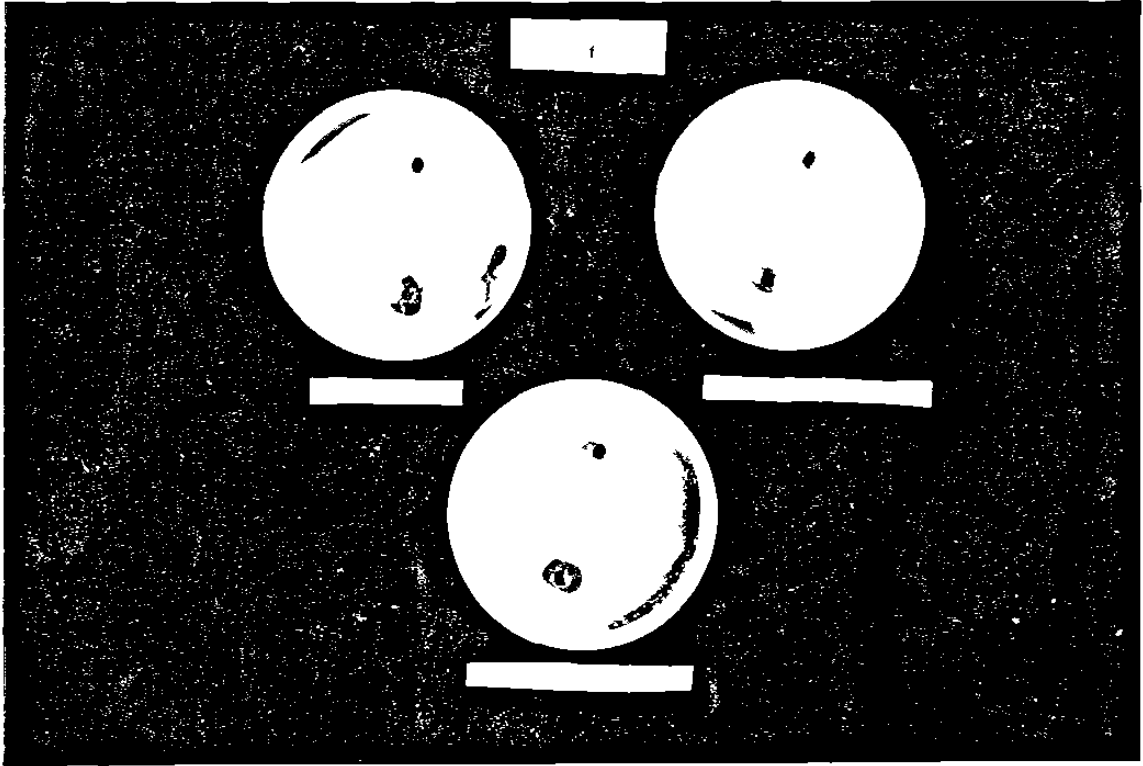


Fig3.- Inhibición bacteriana del cloramfenicol 25mg/mL (control) sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. La dilución del control se realizó en etanol, la actividad del cloramfenicol se observa en la parte superior mientras que el efecto inhibitorio del solvente se muestra en la parte inferior de la figura.

3.2.- Estudio fitoquímico de *Tiquilia canescens*.

Existe variación de los compuestos obtenidos de la planta *Tiquilia canescens* dependiendo del solvente utilizado para su extracción, la cromatografía en capa fina (CCD) indica la cantidad de compuestos presentes en los extractos, se utilizó como eluyente hexano-acetona(8:2) para el hexánico y hexano-cloroformo-metanol para el clorofórmico y metanólico en una proporción de 8:1:1 y 7:2:1 respectivamente, además de cloroformo-metanol(9:1) para el extracto hexánico. Los agentes cromogénicos utilizados fueron vapores de yodo, CoCl_2 , reactivo de Dragendorff además de observación bajo luz UV, los resultados se muestran a continuación.

Tabla 4.- CCD en placas de SiO_2 del extracto hexánico.

MANCHAS	VISIBLE	UV	VAP. DE YODO	CoCl_2	Rf
1	---	---	amarillo	café	0.97
2	---	---	amarillo	gris	0.92
3	---	rosa	amarillo	gris	0.42
4	---	violeta	amarillo	gris	0.21
5	amarillo	amarillo	amarillo	café	0.00

Tabla 5.- CCD en placas de SiO_2 del extracto clorofórmico.

MANCHAS	VISIBLE	UV	VAP. DE YODO	CoCl_2	Rf
1	----	amarillo	amarillo	amarillo	1.00
2	----	violeta	amarillo	gris	0.63
3	----	azul	amarillo	verde	0.6
4	verde	naranja	café	verde	0.56
5	verde claro	amarillo	amarillo	verde militar	0.54
6	amarillo	amarillo	naranja	verde	0.00

Tabla 6.- CCD en placas de SiO₂ del extracto metanólico.

MANCHAS	VISIBLE	UV	VAP. DE YODO	CoCl ₂	Rf
1	----	----	amarillo	verde	0.76
2	amarillo	gris	amarillo	verde	0.5
3	verde	rojo	verde	verde	0.42
4	verde claro	rosa	verde	verde	0.38
5	----	morado	verde	verde	0.37
6	naranja	rojo	verde	gris	0.35
7	café	amarillo	café	café	0.28
8	cafe	naranja	café	café	0.21
9	café	café	café	café	0.00

En las pruebas generales para alcaloides, se utilizó los reactivos de Dragendorff modificado sólo el extracto clorofórmico resultó positiva con una mancha ligeramente de color naranja que duró por 24 horas. (ver tabla 7).

3.2.1.- Separación por cromatografía en columna líquida (CCL) del extracto hexánico.

Al utilizar diferentes concentraciones del eluyente hexano-acetona, se obtuvieron 14 fracciones de 50mL cada una, a partir de 5g de extracto, en una columna de 40X3.5 cm empacada con 130g de sílica gel malla 60; todas las fracciones cristalizaron con hexano, sin embargo los sólidos aislados presentaron en CCD características muy similares por lo tanto se pudieron separar 2 sólidos.

3.2.1.1.- Compuestos aislados por CCL del extracto hexánico (EHTC).

1.- EHTC9.- Sólido fino blanco insoluble en hexano y acetona, con $P_f=80^\circ\text{C}$, se obtuvo (3.5g), mancha café con CoCl_2 $R_f=0.00$ (hexano:acetona;8:2)., no dió ninguna prueba positiva para reactivos químicos.

IR= Señales en cm^{-1} : 2919 (C-H), 2849, 1734 (C=O), 1467, 1374, 1177, 724 (C-H).
(ver fig. 4)

2.- EHTC7.- Sólido amarillo aspecto ceroso, insoluble en acetona, con Pf=64-66, se obtuvo 106mg, mancha gris con CoCl_2 , amarillo con vapores de yodo. Rf=0.42 (hexano:acetona;8:2). Positivo prueba del KMnO_4 , y la prueba de 2,4-DNFH.
 IR= Señales en cm^{-1} : 3456 (OH), 2966 (C-H), 2920, 2851, 1722 (C=O), 1460, 1375, 1260, 1150 (C-O), 1093, 1023, 801(C-H).
 (ver fig 5)

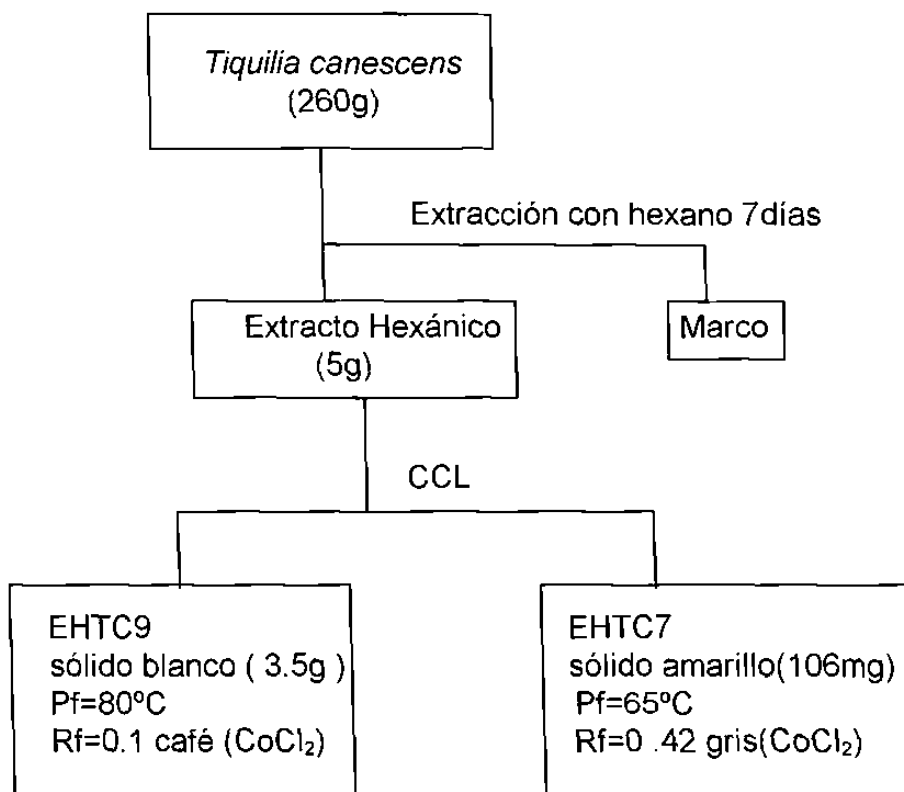


DIAGRAMA DE SEPARACION DE LA PARTE AEREA DE TIQUILIA CANESCENS CON HEXANO

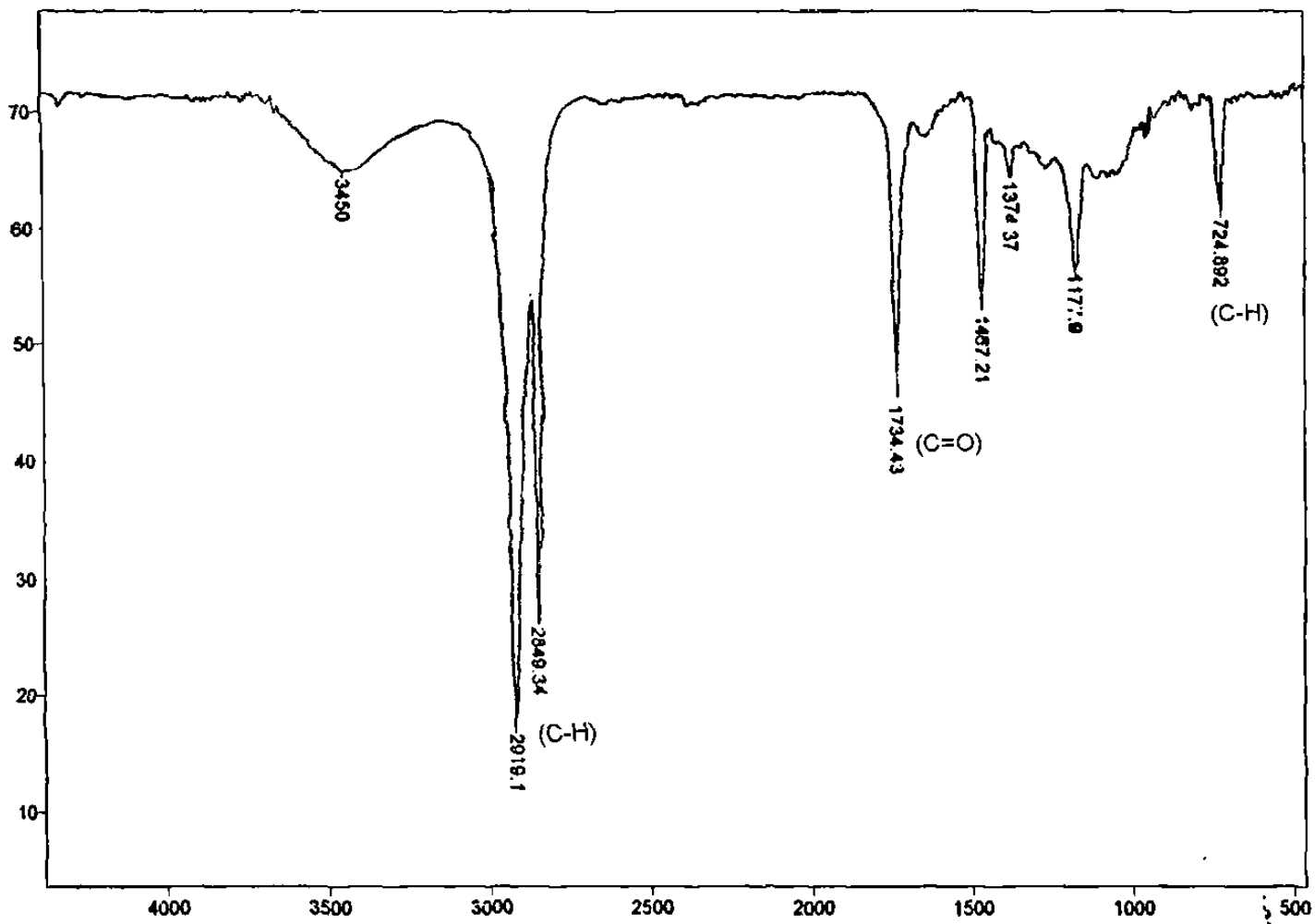


Fig. 4.- Espectro IR de EHTC9

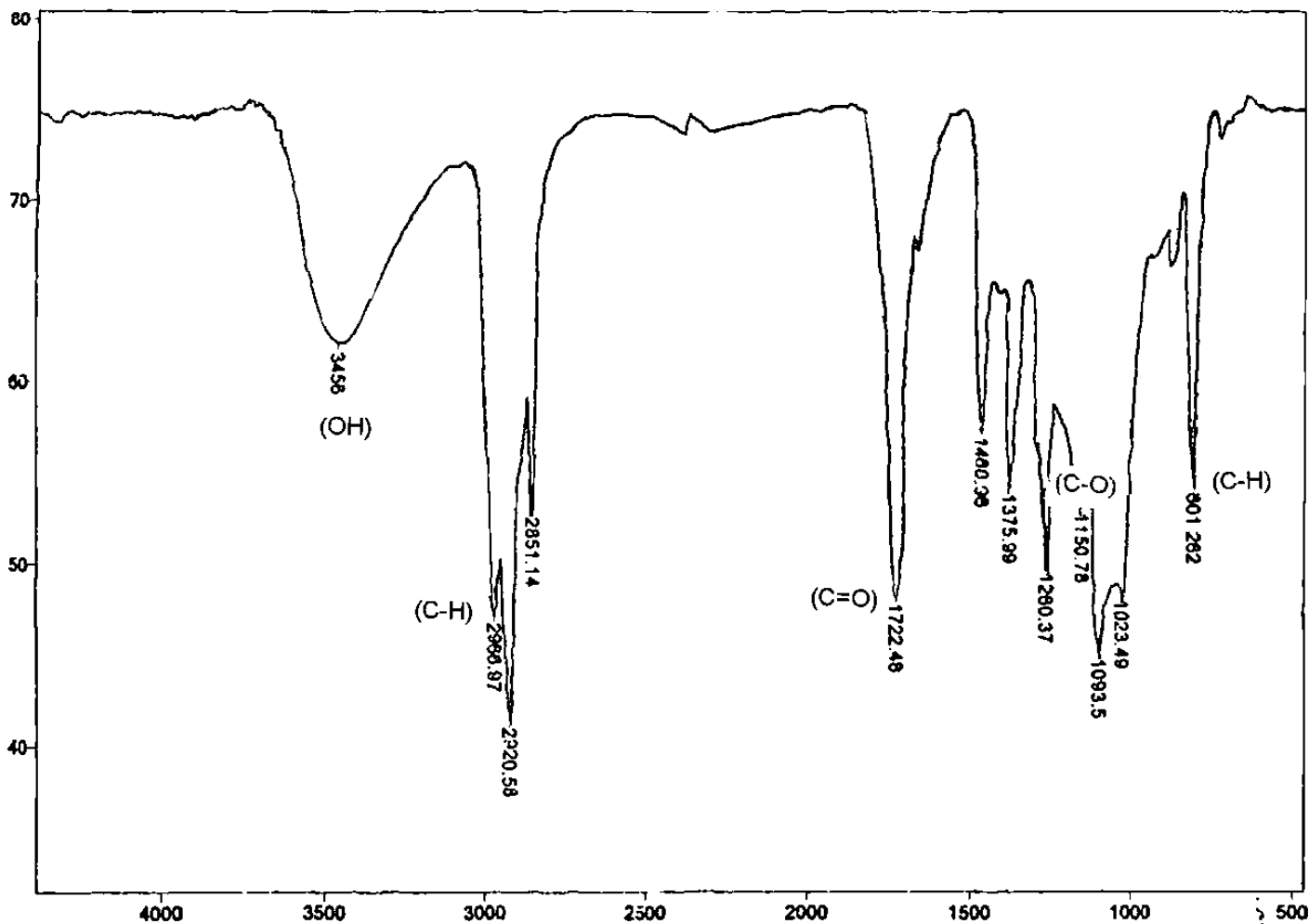


Fig. 5.- Espectro IR de EHTC7

3.2.2.- Separación por cromatografía en columna líquida (CCL) del extracto clorofórmico.

La CCL se realizó en una columna de características similares a la usada en la separación del extracto hexánico. El eluyente fué hexano-cloroformo-metanol en proporciones diferentes, se obtuvieron 14 fracciones de 50mL cada una de 8g de extracto. Debido a que éste extracto no presentó actividad antimicrobiana, solamente se procedió a buscar metabolitos de importancia Fitoquímica que estuvieran en mayor concentración en la cantidad de extracto utilizado (8g) además de pruebas químicas para determinación de grupos funcionales (Tabla 7).

3.2.2.1.-- Compuestos aislados por CCL del extracto clorofórmico (ECTC).

1.- ECTC3.- Sólido blanco (200mg), compuesto inorgánico que a la flama da un color violeta Pf=>350°C.

2.- ECTC5-11.- Sólidos color amarillo (6mg), cristalizan con acetona Rf=0.29(hexano:cloroformo:metanol;6:2:2), Pf=120°C.

PRUEBAS QUIMICAS POSITIVAS:

Ignición = orgánico

Dragendorff =alcaloides

KMnO₄ = insaturaciones

2,4 DNFH = grupos carbonilos

3.- ECTC13-14.- Sólido color café (100mg), cristalizable en acetona Rf=0.22(hexano:cloroformo:metanol;6:2:2), Pf=>320°C.

PRUEBAS QUIMICAS POSITIVAS:

Ignición = orgánico

Salkowski = esteroides

Liebermann-Burchard =triterpenos

Molisch =carbohidratos

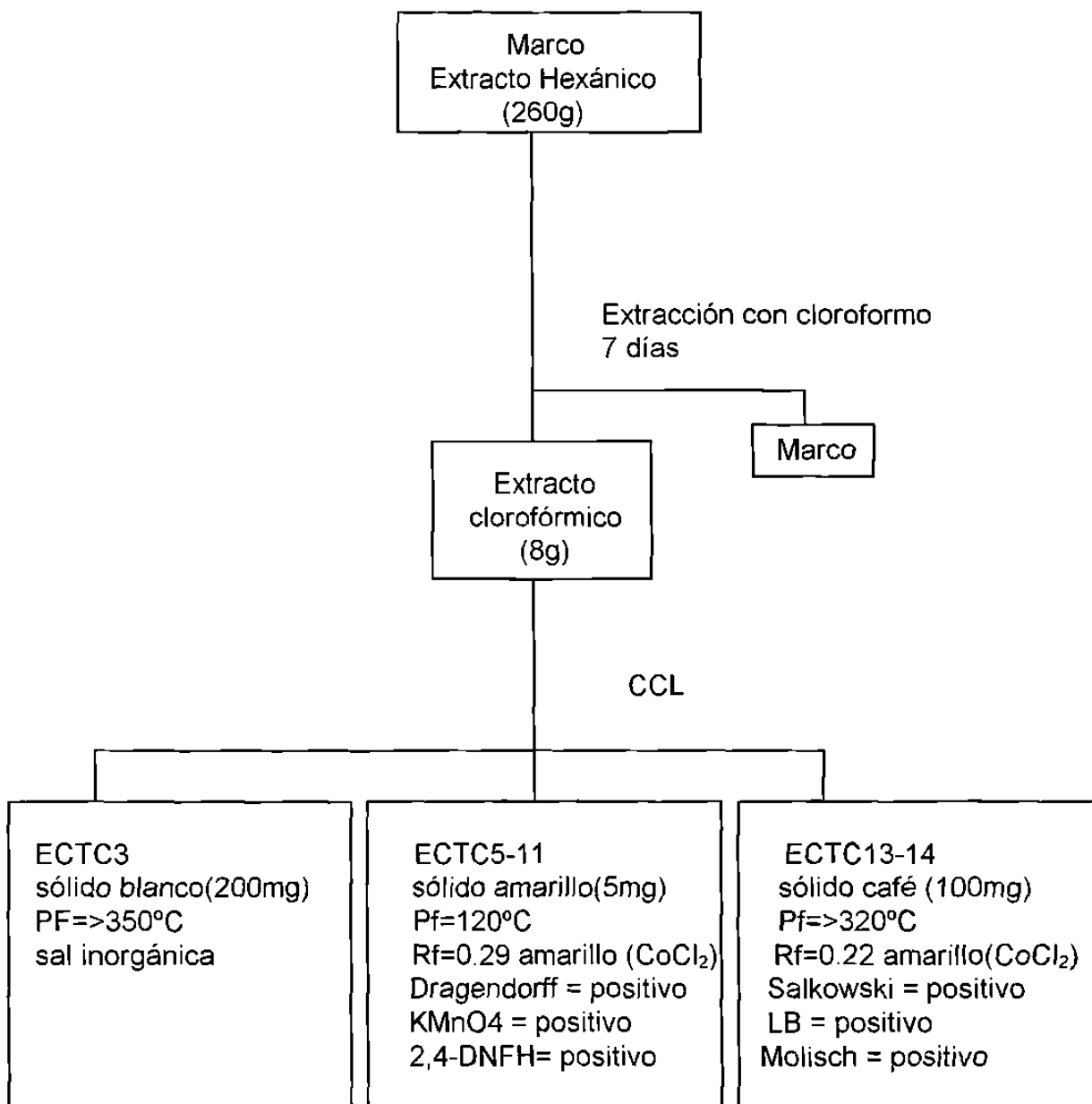


DIAGRAMA DE SEPARACION DEL EXTRACTO CLOROFORMICO

3.2.3.- Separación por CCL del extracto metanólico.

Con una columna de las mismas características utilizada para los extractos anteriores, se realizó la separación de los compuestos del extracto metanólico. Se obtuvieron 12 fracciones de 8g de extracto, con el eluyente hexano:cloroformo:metanol en diferentes concentraciones, al igual que el extracto clorofórmico no demostró tener actividad antimicrobiana el extracto obtenido con metanol, solamente se realizaron pruebas químicas para determinación de metabolitos secundarios de importancia Fitoquímica (Tabla 8).

3.2.3.1.- Compuestos aislados por CCL del extracto metanólico (EMTC).

1.- EMTC8-12.- Sólido fino color amarillo (760mg), cristizable en eter etílico-metanol(1:1). Pf>300°C.

PRUEBAS QUIMICAS POSITIVAS:

Ignición = orgánico

Salkowski = esteroides

Liebermann-Burchard = triterpenos

KMnO₄ = insaturaciones

FeCl₃ = oxhidrilos fenólicos

Molisch = carbohidratos

2,4DNFH = carbonilos

Borträger = antraquinonas, naftaquinonas

Bajlet = sesquiterpenlactonas

A continuación se muestra el diagrama de separación

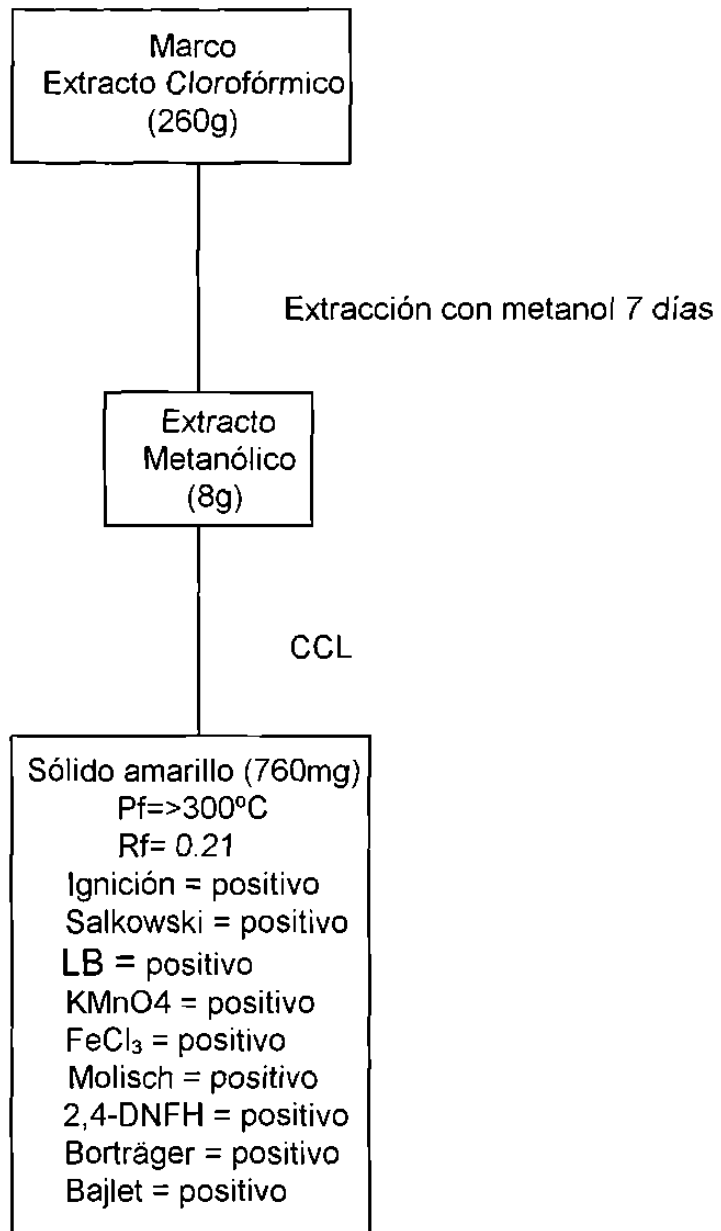


DIAGRAMA DE SEPARACION DEL EXTRACTO METANOLICO

Tabla 8.- Pruebas químicas para identificación de grupos funcionales del extracto metanólico.

Reactivos	Fracciones EMTC											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
P. de ignición(arde=orgánico)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P. Salkowski (esteroles)	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
P. Liebermann-Burchard(triterpenos)	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
P. de $KMnO_4$ (insaturaciones)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P. de $FeCl_3$ (oxhidrilos fenólicos)	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
P. Shinoda(flavonoides)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. H_2SO_4 (flavonoides)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. de Mollisch(carbohidratos)	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
P. Dragendorff, Wagner(alcaloides)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. de Coumarinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. 2,4-DNFH(carbonilos)	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P. Bornträger(quinonas)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
P. de Ehrlich(grupos furanos)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. Bajlet (sesquiterpenlactonas)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

DISCUSION

La presente investigación confirma la presencia de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana en el extracto hexánico de la parte aérea de *Tiquilia canescens*. El antibiótico que se utilizó como control positivo fué el cloramfenicol a una concentración de 25mg/mL comparado con el extracto hexánico que se usó a una concentración de 6mg/mL.

El compuesto EHTC2 del extracto hexánico de acuerdo con las señales de IR obtenidas, indica la presencia de una cetona alifática por la banda de 1734cm^{-1} y las bandas $2919, 2849\text{cm}^{-1}$ que indican presencia de enlaces C-H, éste resultado concuerda con el obtenido por Verde en 1987 (56), donde reporta una cetona alifática, aislada del extracto hexánico de la parte aérea de *Tiquilia canescens*.

Para el compuesto EHTC7 obtenido del extracto hexánico, se determinó su espectro de IR el cual muestra señales que indican la presencia de un aldehído, por la banda 3456cm^{-1} y la banda 1150cm^{-1} . Los 2 sólidos aislados de la parte aérea de *Tiquilia canescens* no son de importancia Fitoquímica, su acción antimicrobiana se pudo deber a la acción sinérgica de éstos compuestos.

La CCD determinó la cantidad de compuestos de los extractos clorofórmico y metanólico, éstos no mostraron actividad antimicrobiana, a la concentración inicial de 6mg/mL (1:10), las pruebas químicas realizadas a éstos extractos indican la presencia de metabolitos de importancia Fitoquímica.

El compuesto ECTC5-11 del extracto clorofórmico por las pruebas químicas realizadas se determina que es un alcaloide, éste resultado concuerda con los antecedentes quimiotaxonómicos de la familia Boraginaceae (1,42,39,52) .sin embargo no se puede asegurar que sean alcaloides pirrolizidínicos.

El compuesto ECTC3 del extracto clorofórmico al presentar el color violeta a la flama y dejar ceniza como residuo de la ignición, se concluye que es una sal de potasio, estas sales tienen puntos de fusión más altos de 400°C no se pudo determinar con el aparato Melt-Temp que se disponía (máximo 400°C).

ECTC13-14 del extracto clorofórmico por las pruebas químicas positivas se puede tratar de un compuesto esteroidal por dar positiva las pruebas de LB y Salkowski. Su punto de fusión es mayor de 320°C , no se pudo purificar por solventes comunes.

El compuesto más abundante del extracto metanólico identificado como ECTC8-12 por las pruebas químicas de grupos funcionales tales como Bornträger, Molisch,

FeCl₃, Baljet, 2,4 DNFH, Salkowski, LB; cuyos resultados fueron positivos y mostró Pf >300°C por lo que se sospecha que se trate de un compuesto esteroidal con grupos carbonilos, y oxhidrilos fenólicos. Por desarrollar un color amarillo verdoso con el reactivo de Borträger, se sospecha la presencia de una antraquinona en forma de glicósido por esa razón se podría justificar su presencia en el extracto metanólico, este compuesto no se pudo purificar con solventes convencionales (12); éste resultado concuerda con los antecedentes que reportan la presencia de quinonas en otras especies de la familia Boraginaceae(4,6,14,19,20,21,43),

CONCLUSIONES

De los extractos aislados de la parte aérea de *Tiquilia canescens*, sólo mostró actividad antimicrobiana el extracto hexánico a una concentración de 6mg/mL, que es 4 veces menor que el cloramfenicol sobre todos los microorganismos probados presentando mayor actividad en *Salmonella tiphy*, *Shigella boydii* y *Shigella flexeri*, por lo que *Tiquilia canescens* podría utilizarse para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales causadas por microorganismos.

Por los espectros de IR que se obtuvieron de los 2 sólidos del extracto hexánico podemos concluir que se trata de una cetona alifática (EHTC2) y de un aldehído (EHTC7), aunque a éstos compuestos no se les ha demostrado actividad biológica, la acción antimicrobiana del extracto hexánico se pudo deber a la acción sinérgica de los compuestos presentes en el extracto.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Asibal, C; Glinski, A; Gelbaum, L; Zalkow, H. 1989. Pyrrolizidine alkaloids from *Cynoglossum creticum*: synthesis of the pyrrolizidine alkaloids echinatine rinderine and analogues. J. Nat. Prod. 52(1): 109-118.
- 2.- Auf'mkolk, M; Kohrle, J; Gumbinger, H; Winterhoff, H. 1984. Antihormonal effects of plant extracts: iodothyronine deiodinase of rat liver is inhibited by extracts and secondary metabolites of plants. Horm. Metab. Res. 16(4): 188-192.
- 3.- Auf'mkolk, M; Ingbar, J.C; Amir, S.M. et. al. 1984. Inhibition by certain plants extracts of the binding and adenylate cyclase stimulatory effect of bovine thyrotropin in human thyroid membranes. Endocrinology. 115(2): 527-534..
- 4.- Aynehchi, Y; Salehi, S; Amin, G. 1985. Survey of Iranian plants for saponins alkaloids, flavonoids and tannins. Int. J. Crude Drug Res. 23(1): 33-41.
- 5.- Benson, L. 1979. Plant Classification. 2o Ed. Editorial Heath and Company. pp: 270-275, 509.
- 6.- Bi, F; Sadiq, H. 1984. A phytochemical survey of some plants of Pakistan for alkaloids, flavonoids, saponins, tannins and coumarins. Karachi Univ. J. Sci. 12(2): 183-199.
- 7.- Bierhorst, D. 1971. Morphology of Vascular Plants. Editorial The Macmillan Company. pp: 4-5.
- 8.- Boakye-Yiadom, N.I. Y. Fiagbe and J.S.K. Ayim. 1977. Antimicrobial Properties of Some West African Medicinal Plants IV. Antimicrobial Activity of Xylopic Acid and Other Constituents of the Fruits of *Xylopic aethiopica* (Annonaceae). Lloydia. 40(6): 543-545.
- 9.- Cheeke, P.R. 1988. Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids. J. Anim. Sci. 66(9): 2343-2350.

- 10.- Correll, D. 1970. Manual of the Vascular Plants of Texas. Texas Research Foundation. pp: 1280-1284.
- 11.- Delgado, A. 1995. Laboratorio de Microbiología. Editorial McGraw-Hill pp:141-164.
- 12.- Dominguez, X. A. 1979. Fitoquímica. Editorial Limusa. pp:91-229.
- 13.- Espinosa, C. 1990. Estudio Químico de *Krameria interior* y *Aristolochia brevipes* Tesis. FCB. UANL. pp: 1-2.
- 14.- Fell, K. R.; Peck, J. M. 1968. Phytochemical investigations of some species of the Boraginaceae. *Planta Med.* 16(4): 411-420.
- 15.- Galle, A. M; Joseph, M. 1993. Biosynthesis of γ linolenic acid in developing - seeds of borage (*Borago officinalis* L.). *Biochim. Biophys. Acta* 1158 (1): 52-58.
- 16.- Gerbert, I. Y; Leven, P.I. and Bysheuskii, A. 1988. Anticoagulant action of the - polyphenol-containing fraction of the epigeal part of *Pulmonaria* ----- *mollissima* A. Kerner. *Rastit. Resur.* 24(3): 429-434.
- 17.- Glasby, J. 1977. Encyclopedia of the alkaloids. Vol. 3. Plenum Press pp:72-406
- 18.- Hethelyi, E; Tetenyi, P; Dabi, E; Danos, B. 1987. The role of mass spectrometry in medicinal plant research. *Biomed. Environ Mass Spectrum* 14(- 11): 627-632.
- 19.- Huajuca, G. E. 1995. Contribución al estudio fitoquímico y determinación antibiótica de *Senecio candidissimus*. Tesis. FCB. UANL. pp: 1-26.
- 20.- Kamata, H; Saga, H. 1989. Naphthoquinone compounds and their manufacture with Boraginaceae. *Jpn. Kokai. Tokkyu. Koho.* JP: 63, 133, 996: [88, 133, 996] Appl. 86: 6.

- 21.- Kaminski, B. 1969. Flavonoids in the Boraginaceae family. I. Chromatographic study of glycoside fractions. *Acta. Pol.Pharm* 26(6): 559-564.
- 22.- Kaminski, B. 1971. Flavonoids in boraginaceae II. Cromatographic study of -- aglycone fraction of Bugloss (*Anchusa gmelini*. Led). *Herb. Acta. Pol Pharm.* 28(1): 89-92.
- 23.- Kugelman, M; et. al. 1976. Indicine-N-oxide: The antitumor principle of - *Heliotropium indicum*. *Lloydia.* 39(2-3): 125-128.
- 24.- Lawrence, G. 1963. *Taxonomy of Vascular Plants*. The Macmillan Company. -- New York. pp: 684-685.
- 25.- Longworth, C. 1966. *Flora of Texas*. Vol. 1. Texas Research Foundation. pp: -- 129-134.
- 26.- Maffei, M. 1994. Discriminal analysis of leaf wax alkanes in the Lamiaceae --- and four other plants families. *Biochem. Syst. Ecol* 22(7): 711-728.
- 27.- Maldonado, R. 1985. *Los productos de las plantas: una visión integral*. Vol. 1 - Centro de Investigación en Química Aplicada Universidad Autónoma -- ma de Coahuila. pp: 1-2.
- 28.- Man'ko; et. al. 1977. Isolation and study of "ces" series preparations with con - ceptive activity from plants of the borage family (Boraginaceae Don).*I. Farm-Zh.* 3:60-65.
- 29.- Marston, A; Zargorski, G; Hostettmann, K. 1988. Antifungal polyphenols from- *Cordia goetzei* Guerke. *Helv. Chim. Acta.* 71(5) : 1210-1219.
- 30.- Marston, A; Potterat, O. 1988. Isolation of biologically active plants constituen ts by liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 450(1): 3-11.
- 31.- Medrano, A; Masoud, T. A; Martínez, M. C. 1992. Mineral and proximate com- position of borage. *J. Food. Compos. Anal.* 5(4) : 313-318.

- 32.- Miyamoto, Y; Fukuzaki; et. al. 1987. Antidiabetic polysaccharide lithospermum and its manufacture with boraginaceae callus tissue culture. Jpn. -- Kokai. Tokkyo. Koho J.P. 62,201,594 [87, 201, 594]. Appl. 86: 9.
- 33.- Morton, J. 1977. Major Medicinal Plants. Botany, culture and uses. Charles C. Thomas Publisher. pp: 1-18.
- 34.- Muñoz, F. 1987. Plantas medicinales y aromáticas. Ediciones Mundiprensa. pp : 17-23.
- 35.- Olayiwola, A; et. al. 1988. The Conservation of Medicinal Plants. Cambrige University Press. pp: 1-361.
- 36.- Omar, M. De Feo, J. 1983. Chemical and toxicity studies of *Trichodesma africanum* L. J. Nat. Prod. 46(2):153-156.
- 37.- Pelletier, W. 1988. Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives. Vol. 6. Willey-Interscience. pp: 50.
- 38.- Raisa, M. 1981. Plantas Medicinales del Estado de Yucatán. Editorial Continental. pp: 11-15.
- 39.- Richardson, A. 1976. Reinstatemente of he genus *Tiquilia* (Boraginaceae: Ehretioideae) and descriptions of four new species. Sida 6(3): 235-240.
- 40.- Rickett, H. 1983. Wild Flowers of the United States Vol. 3. Mc Graw-Hill pp: 40-50.
- 41.- Rizk, A; Hammoud, M; et. al. 1988. Constituents of plants growing in Qatar: Part XV. Chemical investigation and pharmacotoxicity of pyrrolizidine -alkalois of *Moltkiopsis ciliata*. Int. J. Crude Drug Res. 26(2): 112-116.
- 42.- Romussi, G; Cafaggi, S. 1980. Hemolytic action and surface activity of triterpene saponins from *Anchusa officinalis* L. Pharmazie. 35(8): 498-499.

- 43.- Romussi, G; Cafaggi, S. 1988. Constituents of Boraginaceae: IX. Anchusoside II. A new minor saponin from *Anchusa officinalis* L. Arch. Pharm - (Weinheim) 321(10): 753-754.
- 44.- Roitman, J. 1988. Longitubine and neolatifoline, new pyrrolizidine alkaloids -- from *Hackelia longituba*. Aust. J. Chem. 42(12): 1827-1834.
- 45.- Sabahi, M. Ramezani, M; Jaffari, G; et. al. 1985. Survey of Iranian plants -- for saponins, alkaloids, flavonoids and tannins IV. The plants of -- Kerman Province. Int. J. Crud Drug Res. 23(4): 165-175.
- 46.- Sanchez, G. C. 1995. Efecto de extractos de 33 plantas sobre el crecimiento - de 11 especies bacterianas causantes de enfermedades gastroin - testinales. Tesis. FCB. UANL. pp:10-11.
- 47.- Satyavathi, D. V. L.; Narayana, L. L. 1987. Chemotaxonomy of some Boragina ceae. J. Econ. Taxon. Bot. 11(1): 95-102.
- 48.- Sertie, J. A; Basile, A.C; et. al. 1990. Antiinflammatory activity and subacute toxic - ity of artemetin. Planta Med. 56(1): 36-40.
- 49.- Sewon, P; Tyystjarvi, E. 1993. Stearidonic and γ -linolenic acid contents of co - mmon borage leaves. Phytochemistry. 33(5): 1029-1032.
- 50.- Singh, V; Kavita, M; Meena, S. 1988. Desert medicinal plants: A source of steroids. Oikoassay. 5(2): 41-42.
- 51.- Swain, C. 1966. Comparative phytochemistry. Academic Press. pp: 248-249.
- 52.- Swiatek, L; Grabias, B; Rozga, M. 1987. Phenolic acids and coumarins in -- *Lithospermum aruense* L. and *Lycopus europaeus* L. Herba. Pol. - 33(2): 87-98.
- 53.- Tamayo, M. 1991. El proceso de la investigación científica. 2a. ed. Editorial Li-

- musa. pp: 80-83.
- 54.- Telezhenetskaya, M. V; Matkarinov. 1987. Alkaloids of some Central Asian plants. *Khim. Prir. Soedin.* 3: 463-464.
- 55.- Verastegui, M. M. 1995. Análisis del efecto antifúngico de 20 extractos de plantas. Tesis. FCB. UANL. pp: 2-5.
- 56.- Verde, S. M. 1987. Estudio Químico de *Krameria cytisoides*, *K. ramosissima* *K. sonora*, *K. grayi*, *Tiquilia canescens*, *Petalonyx crenatus* y *Kallstroemia máxima*. Tesis. ITESM pp: 1-136.
- 57.- Winterhoff, H; Hans, G; Surgens, H. 1988. On the antigonadotropic activity of - *Lithospermum* and *Lycopus* species and some of their phenolic constituents. *Planta Med.* 54(2): 102-106.

