



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**ESTUDIO QUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Verbesina
parviflora*.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACOBIOLOGA.**

PRESENTA

ANGÉLICA CRUZ SÁNCHEZ.

ASESOR DE TESIS

D. Q. MARIO ARMANDO GÓMEZ HURTADO.

Morelia, Michoacán Noviembre, 2011.

Contenido

Símbolos y Abreviaturas.....	I
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo general.	22
4. JUSTIFICACIÓN	23
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
5.1. Metodología.....	24
5.2. Colecta e identificación de la especie.	25
5.3. Obtención de los extractos.....	25
5.4. Bacterias utilizadas para los ensayos antimicrobianos.	26
5.5 Ensayos de actividad antibacteriana de los extractos de <i>V. parviflora</i>	26
5.6. Análisis químico del extracto hexánico de la raíz.	28
6. CONCLUSIONES.....	39

7. Parte Experimental	40
7.1. Procedimientos generales.	40
7.2. Estudios biológicos.	40
7.3. Preparación de medios de cultivo.	40
7.4. Preparación de las cepas bacterianas.	41
7.5. Estandarización del inóculo bacteriano.	41
7.6. Preparación de los extractos y de las sustancias control.	41
7.7. Método de difusión en agar (técnica de dilución).	41
7.8. Muestra vegetal.	41
7.9. Obtención del extracto de raíz de <i>V. parviflora</i>	42
8. Bibliografía.	44

Símbolos y Abreviaturas.

δ	Desplazamiento
%	Por ciento
[M]	Ion molecular
°C	Grados centígrados
AcOEt	Acetato de etilo
C.N.	Control Negativo
C.P.	Control positivo
cm	Centímetro
<i>d</i>	Señal doble
<i>dd</i>	Señal doble de dobles
EHR	Extracto hexánico de la raíz de <i>V. parviflora</i>
EMIE	Espectro de masa interacción molecular
g	Gramos
GGPP	Pirofosfato de geranilgeranilo
h	Horas
HETCOR	Correlación Heteronuclear
Hz	Hertz
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INI	Instituto Nacional Indigenista
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
L	Litros
m	Múltiples
<i>m/z</i>	Relación masa y carga
MH	Mueller-Hinton
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitros
mm	Milímetro
msnm	Metros Sobre el Nivel del Mar
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPP	Pirofosfato de isopentenilo
PFF	Pirofosfato de Farnesilo
PFI	Pirofosfato de dimetilalilo
ppm	Partes por millón
<i>q</i>	Señal cuádruple
<i>qd</i>	Señal cuádruple de dobles
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Señal simple
sa	Señal ancha
T	Temperatura
TMS	Tetrametilsilano
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
μ g	Microgramo
μ L	Microlitros

El presente trabajo se llevó a cabo en el Instituto de Investigación de Químicas Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en los Laboratorios de Química de Productos Naturales y Fisiología Celular.

Parte de este proyecto fue presentado en el 46° Congreso Mexicano de Química y 30° Congreso Nacional de Educación Química celebrado en Querétaro, Querétaro del 10 al 14 de Septiembre de 2011; con el trabajo titulado “Estudio Químico de *Verbesina parviflora*”. **PQFB. Angélica Cruz Sánchez**, Dr. Mario Armando Gómez Hurtado, QFB. Fany Elisa Álvarez Esquivel, Dr. Juan Diego Hernández Hernández, Dra. Luisa Urania Román Marín, Dra. Rosa Elva Norma Del Río Torres.

Resumen.

Desde sus inicios, el hombre ha utilizado los recursos naturales para mejorar su calidad de vida, incluyendo su salud.

En la medicina actual, se siguen utilizando con éxito una serie de principios activos obtenidos de fuentes naturales, entre ellos, los provenientes de las plantas medicinales y que a través de estudios científicos son validados para su uso como fármacos a nivel mundial.

Dentro de la gran variedad de principios activos naturales se encuentran los compuestos terpenoides a quienes se les han atribuido múltiples propiedades, entre ellas la antimicrobiana.

En este trabajo se describe el aislamiento e identificación de los triterpenos **40-42** presentes en el extracto hexánico de la raíz de *Verbesina parviflora*; de igual manera, se describe la actividad antibacteriana de dicho extracto mediante ensayos *in-vitro*.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas, animales y organismos microscópicos ofrecen una amplia diversidad de componentes, los cuales pueden servir como fármacos así mismo revelar nuevos mecanismos de acción para el control de múltiples enfermedades esto se conoce desde hace milenios, pues el hombre ha utilizado productos de origen natural para el tratamiento y cura de muchas enfermedades. Los pueblos prehistóricos tuvieron un conocimiento considerable de las plantas y desarrollaron sistemas terapéuticos que combinaban elementos empíricos, religiosos y mágicos. En el periodo neolítico, habitantes de los lagos suizos manipulaban alrededor de doscientos tipos de plantas, la mayoría de ellas dotadas de cualidades medicinales (Cortez y col., 2004).

Investigaciones históricas de la civilizaciones antiguas como la mesopotámica generaron un hallazgo de miles de tablillas de arcilla entre las cuales figuran el primer texto médico conocido, cuya acuñación se remonta al año 2100 a.C; este texto enumera treinta elementos distintos de origen animal, mineral y vegetal, muchos de ellos no identificables, y hace referencia a numerosas fórmulas y procesos, como extractos acuosos, oleosos, infusiones de vino, pulverizaciones, ebulliciones, filtraciones y unciones. Los egipcios también contaban con documentos que contenían conocimientos médicos, el más relevante es el papiro de *Ebers*, una colección de recetas escritas hacia el 1500 a.C. que contiene ochocientas once prescripciones y menciona unos setecientos fármacos; dichos remedios comprendían ingredientes de los reinos vegetal, animal y mineral. De la cultura griega se destaca la guía médica de Pedanio Dioscórides, cuyo trabajo alcanzó el apogeo entre los años 50 a.C y 70 d.C (Díaz y col., 2000). En oriente se desarrollaron amplios conocimientos para la aplicación de productos naturales en la medicina, los cuales quedaron plasmados en textos como el “*Sehn Nong Ben Zing*” (El libro de las hierbas de Sehn Nong), con más de 2000 remedios curativos a base de plantas, minerales e incluso de animales, al igual que todo tipo

de dietas. En América, la herbolaria precolombina jugó un papel muy importante en la medicina, debido a que el uso de plantas medicinales y otros productos de origen natural ya tenían una historia de por lo menos 4000 años, muchos de estos conocimientos fueron plasmados después de la conquista española en diversos documentos como el “*Códice Florentino*” de Fray Bernardino de Sahagún, “*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*” de Martín de la Cruz, “*Historia de las Plantas*” de Francisco Hernández en 1570, (Cortez Vieyle y col., 2004)

Para el siglo XIX, la fitoterapia aparece como una ciencia cuando los primeros compuestos biológicamente activos (básicamente alcaloides) fueron aislados a partir de fuentes vegetales, como por ejemplo la morfina (**1**), la estricnina (**2**) y la nicotina (**3**). Desde entonces, los medicamentos de origen natural son apreciados por su eficiencia y baja toxicidad, por lo que son ampliamente usados en productos comerciales (Waksmundzka-Hajnos y col., 2008); aproximadamente el 60% de los fármacos comerciales actuales tuvieron su origen en un producto natural (Zhu Yi-Zhun y col., 2007; Newman J. y col., 2007); incluso, en el año de 1977 la Organización Mundial de la Salud señaló en su programa “*Salud para Todos*” que, desde esa fecha hacia el año 2000 habría que incorporar en las estrategias formales de atención primaria en salud a las medicinas tradicionales y los elementos terapéuticos de reconocida utilidad, como farmacología, fitoquímica, antropología y clínica, tal como se ha venido haciendo en diversos países del mundo (Zuluaga, 1994).

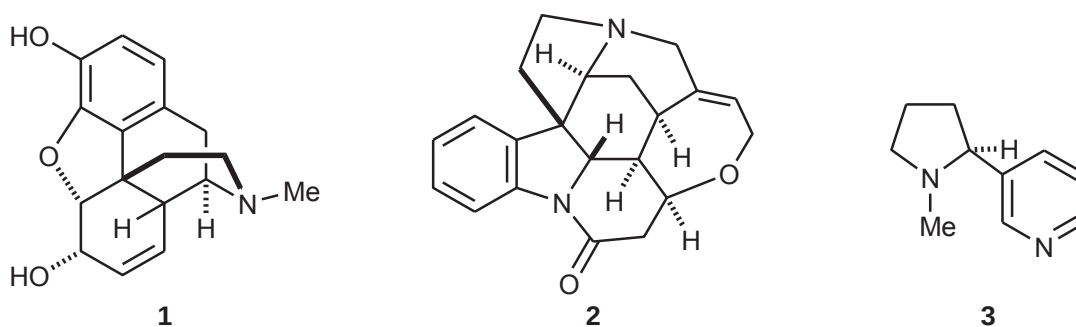


Figura 1.1 Ejemplo de alcaloides de compuestos biológicamente activos.

Las plantas medicinales se encuentran en gran variedad y distribución dentro del territorio mexicano, el cual cuenta con condiciones ambientales que

favorecen diferentes tipos de vegetación proporcionando una riqueza florística importante (Santillán y col., 2008). El Instituto Nacional Indígena (INI) en 1997, documentó cerca de 3000 especies con propiedades medicinales, mientras que el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) cuenta con un herbario con 14000 ejemplares de plantas medicinales.

Aun cuando los fármacos de origen natural se han empleado durante muchos siglos, como los que se menciona en el código Badiano, una cantidad pequeña de plantas bioactivas de México se han estudiado para una aplicación en la medicina y es menor el número de estas especies a las cuales se han realizado estudios de eficacia y seguridad con respecto a sus principios activos y tipo de extractos que los contienen. Un ejemplo de ello es que durante más de 25 años el IMSS ha desarrollado cerca de 10 medicamentos obtenidos de plantas medicinales en México por lo que es necesario realizar mayores estudios para el desarrollo de nuevos medicamentos de origen natural (Mendoza y col., 2002).

A partir de estudios fitoquímicos se han encontrado una gran variedad de principios activos contra varias enfermedades, entre las que se pueden destacar el SIDA, cáncer e infecciones microbianas. Algunos ejemplos de especies con actividad anti-VIH son la *Kadsura interior*, *Tripterygium wilfordii*, *Syzigium claviflorum* y *Lomatium suksdorfii*. Entre las especies con actividad anticancerígena destacan *Taxus brevifolia*, *Camptotheca acuminata*, *Pdophyllum pelatum*, *Brucea javanica*, entre otros (Kuo-Hsiung, 2004). Extractos de plantas como *Arctostaphylos uva-ursi*, *Vaccinium macrocarpon* y *Melissa officinalis* han sido ampliamente usados en el tratamiento de patologías infecciosas del sistema respiratorio, tracto urinario, tracto gastro-intestinal, sistema biliar y piel (Ríos J. L., 2005).

Para el caso de los antibióticos existe una problemática debido a los frecuentes casos de resistencia antibacteriana, lo cual se refiere a la sensibilidad disminuida o nula de una bacteria a un antimicrobiano. De una forma práctica también se considera resistente a una bacteria cuando no es inhibida por las concentraciones de antibiótico que se alcanzan en el lugar donde la bacteria está

produciendo una infección. Las poblaciones bacterianas con resistencias adquiridas son más prevalentes en zonas con gran consumo de antimicrobianos.

En la mayoría de los casos se debe al uso indiscriminado (en humanos y animales) que favorece la “adaptación” de las bacterias y crea una presión ambiental que hace que las poblaciones sensibles desaparezcan, predominando las resistentes. Por otra parte, la utilización de nuevos antimicrobianos implica la creación de nuevos mecanismos bioquímicos que deriva en la aparición de microorganismos con resistencia múltiple, incluso en ambientes con “alta concentraciones de antibióticos”.

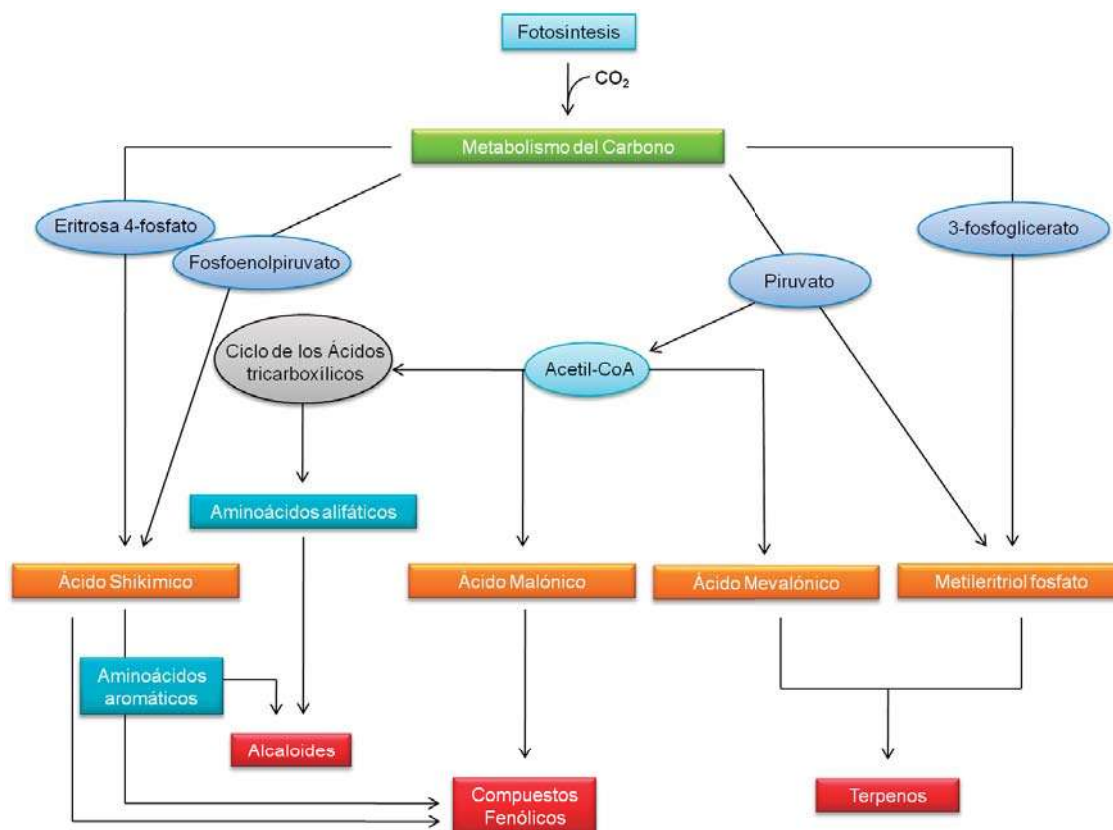
Debido a que en transcurso de los años, las diferentes especies bacterianas han obtenido resistencia contra diferentes antibióticos comerciales, existe la necesidad de encontrar nuevos agentes antimicrobianos que sean iguales o más potentes y selectivos; siendo los productos naturales una opción viable para realizar esta búsqueda (Dreser A. y col., 2008).

2. ANTECEDENTES

Las plantas son organismos muy eficientes para sintetizar moléculas orgánicas necesarias para la vida a partir de materia inorgánica por la vía de la fotosíntesis, mientras que otros seres vivos como animales y microorganismos necesitan incorporar algunos nutrientes a partir de su dieta; estos nutrientes son degradados o interconvertidos para el desarrollo de las funciones vitales. Estos procesos se observan en todos los organismos y los mecanismos están descritos dentro del metabolismo primario. Entre los mecanismos del metabolismo primario se encuentra la glicólisis que es la degradación de los carbohidratos para la obtención de energía a partir de reacciones de oxidación; la oxidación de ácidos grasos que es otra ruta para la obtención de energía; la degradación de las proteínas que provee aminoácidos necesarios para la síntesis de enzimas y otras proteínas necesarias para el organismo. Aunque todos los seres vivos tienen la capacidad de sintetizar aminoácidos, existen algunos que no son elaborados por estos organismos, los cuales son denominados aminoácidos esenciales y deben ser obtenidos de fuentes externas. En contraste a estas sustancias, existen otras que solo se encuentran en algunas especies y cuyo objetivo o beneficio para el organismo que las produce en la mayoría de los casos no son bien conocidos. Sin embargo, se considera que algunos de estos mecanismos funcionan como colorantes, atrayentes para su especie u otras distintas y como provisión de sustancias tóxicas para defensa contra depredadores. Estos mecanismos y sustancias se estudian dentro del metabolismo secundario, el cual produce la mayoría de los compuestos naturales farmacológicamente activos a los cuales denominados principios activos (Sepúlveda, 2003).

Los metabolitos secundarios derivan de metabolitos primarios y ambos grupos comparten rutas metabólicas esenciales como la fotosíntesis, el ciclo de Krebs y la glicólisis. En la biosíntesis de metabolitos secundarios se utilizan como bloques de construcción principales a la acetil coenzima A, el ácido shikímico,

ácido mevalónico y algunos aminoácidos. De estos bloques derivan una gran cantidad de productos (Esquema 2.1) los cuales han mostrado tener aplicaciones dentro de la medicina (Ávalos y col., 2009).

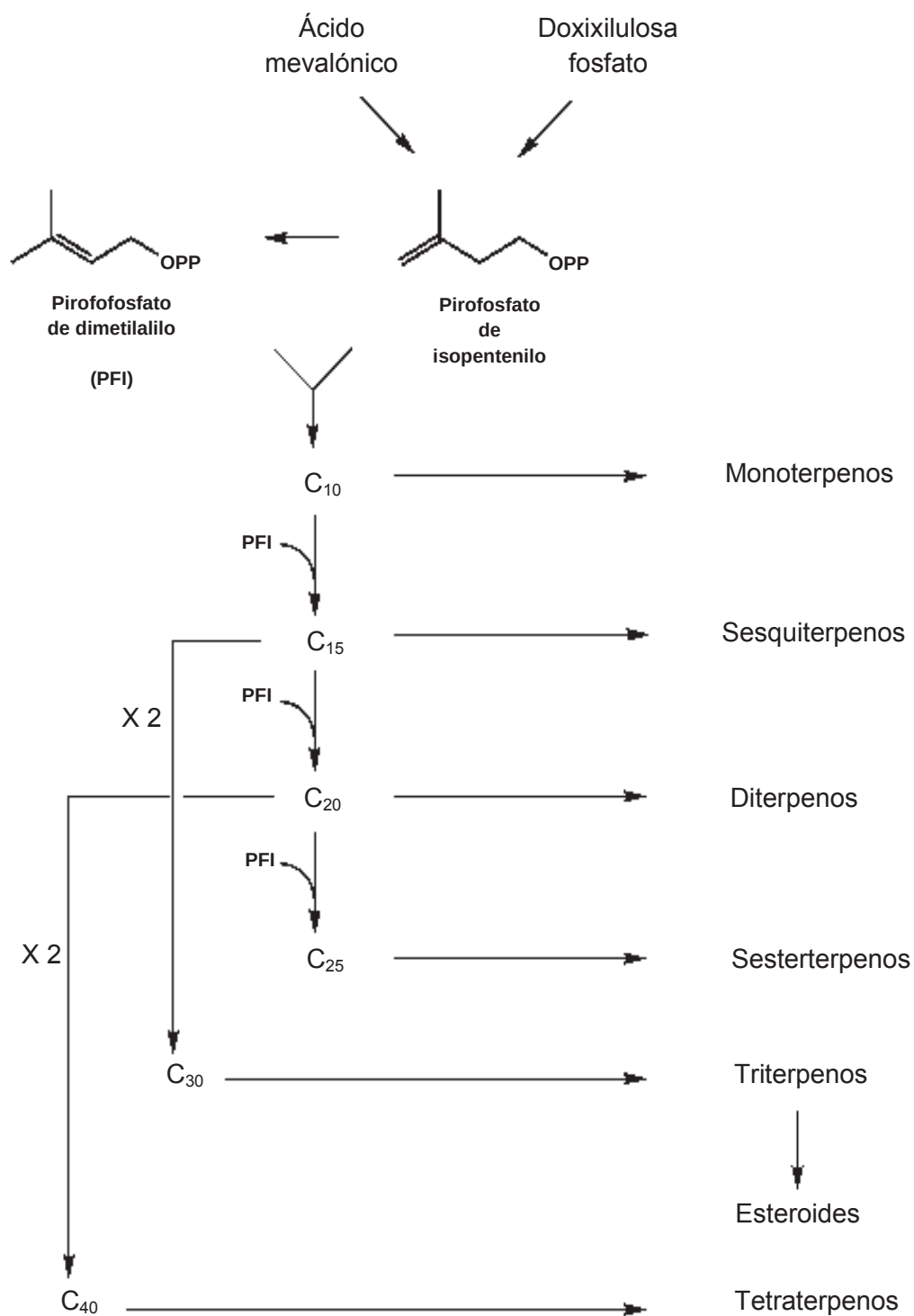


Esquema 2.1. Relación biosintética entre metabolitos primarios y secundarios (modificado de Taiz y Zeiger, 2006).

Los metabolitos secundarios pueden ser obtenidos a partir de diferentes técnicas de extracción para obtener mediante estas, extractos vegetales y/o aceites esenciales los cuales, como se ha mencionado anteriormente, cubren un amplio espectro de efectos farmacológicos mostrando diversas propiedades como antiinflamatorios, antioxidantes, y anticancerígenos. Otras actividades biológicas se reportan como biocidas en contra de una amplia gama de microorganismos como bacterias, hongos, virus y protozoarios; así como insectos y plantas (Kalemba Kunicka, 2003). Se ha comprobado que los terpenos son los principales responsables de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. Su efecto

antimicrobiano está basado en su habilidad para dañar a las biomembranas (Montes, 2009).

Los terpenos constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40000 moléculas diferentes). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas (Esquema 2.2) (Dewick, 2009). Muchos terpenoides son comercialmente interesantes debido a múltiples aplicaciones entre las cuales se describe su uso en aromas y fragancias, en alimentación y cosmética; otros tienen importancia medicinal ya que se les han atribuido múltiples propiedades farmacológicas (anticarcinogénica, antiulcerosa, antimalaria, antimicrobiana) (Ávalos y col., 2009).



Esquema 2.2. Breve descripción de la biosíntesis de terpenos (Modificado de Dewick, 2009).

Una gran variedad de plantas aromáticas tales como el limón, menta, eucalipto, tomillo, producen mezclas de alcoholes, aldehídos, cetonas y terpenoides de diversos esqueletos (**4-10**) denominadas aceites esenciales (Figura 2.1), responsables de los olores y sabores característicos de estas plantas, algunos de los cuales actúan como repelentes de insectos o insecticidas (Ávalos y col., 2009).

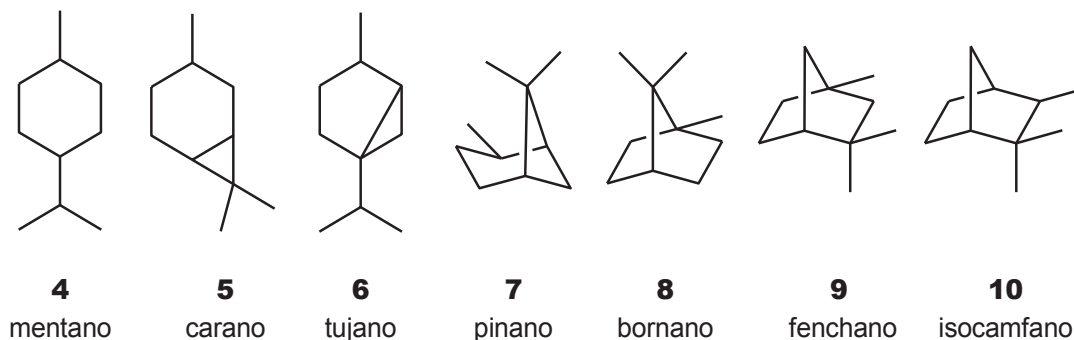
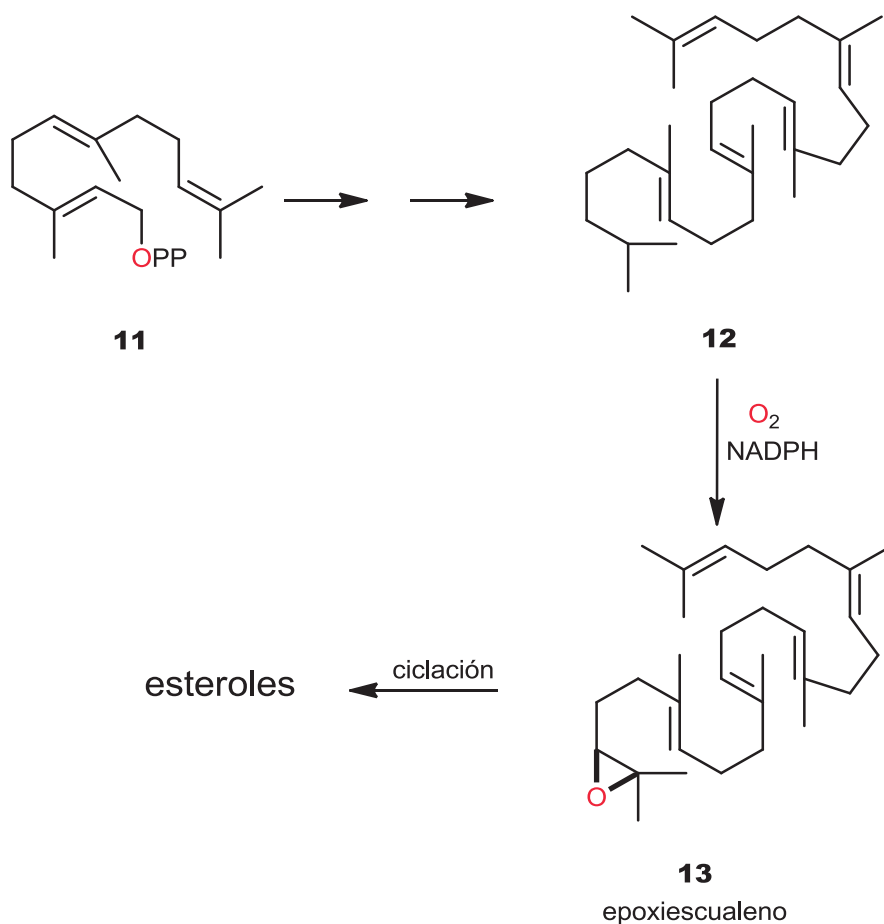


Figura 2.1. Algunos ejemplos de esqueletos base de monoterpenos.

Otros compuestos terpénicos son los denominados triterpenos, los cuales contienen 30 átomos de carbono en su estructura y se generan de la unión de dos unidades de pirofosfato de farnesilo (PFF) (**11**). Entre los triterpenos se encuentran esteroides derivados del escualeno (**12**) (Esquema 2.3), algunos en forma de glicósidos con importantes funciones en medicina y en la industria (cardenólidos y saponinas) (Ávalos y col., 2009); cuentan con un esqueleto cíclico base igual que los triterpenoides tetracíclicos de ciclopentano-perhidrofenantreno, pueden ser clasificados como esteroides, saponinas esteroidales, glicósidos cardíacos, esteroalcaloides y las llamadas hormonas esteroidales, las que hasta la década de los 60 eran consideradas exclusivamente de origen animal, pero que a partir de 1966 se han aislado de tejidos de plantas (Castilla y col., 2009).



Esquema 2.3. Biosíntesis de esteroides a partir del pirofosfato de farnesilo
(Modificado de Dewick, 2009).

Dentro de los triterpenos modificados se encuentran los limonoides que se caracterizan por conferir el sabor amargo de los cítricos y actúan como repelentes, siendo la azadiractina (**14**) (Figura 2.2) uno de los limonoides repelentes de insectos más poderosos es que se usa en la industria alimenticia y agronomía para el control de plagas (Esparza-Díaz y col., 2010).

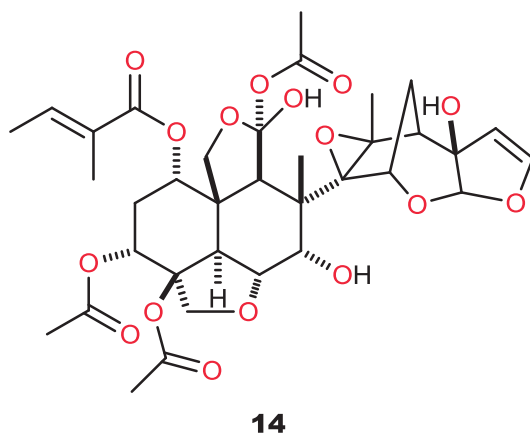


Figura 2.2. Azadiractina (**14**).

Otro ejemplo de triterpenoide con actividad biológica es el ácido betulínico (**15**) (Figura 2.3), el cual ha demostrado generar actividad inhibitoria contra el Virus Inmunodeficiencia Humana (VIH). (Bracho y col., 2009).

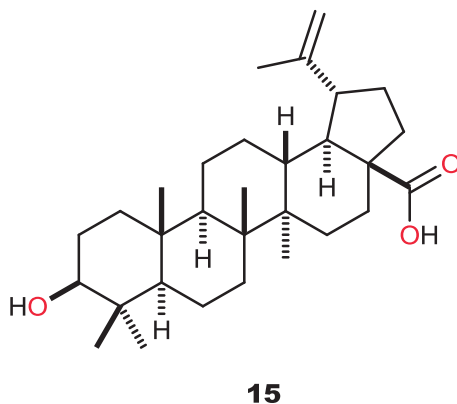


Figura 2.3. Ácido betulínico (**15**)

El ácido oleanólico (3-beta-hidroxi-28-carboxioleanano) (**16**) (Figura 2.4) es un ácido triterpénico que se encuentra en más de 130 plantas entre las que se encuentra la *Olea europea* y cuenta con una serie de actividades biológicas comprobadas (antiabortivo, anticariogénico, antifertilidad, antihepatotóxico, antiinflamatorio, antisarcómico, preventivo del cáncer, cardiotónico, diurético, hepatoprotector). (Essady y col., 1994). El ácido maslínico (2 α ,3 β -dihidroxi-28-

carboxioleanano) (**17**) (Figura 2.4), también ha demostrado interesante actividad antiinflamatoria (Essady y col., 1994).

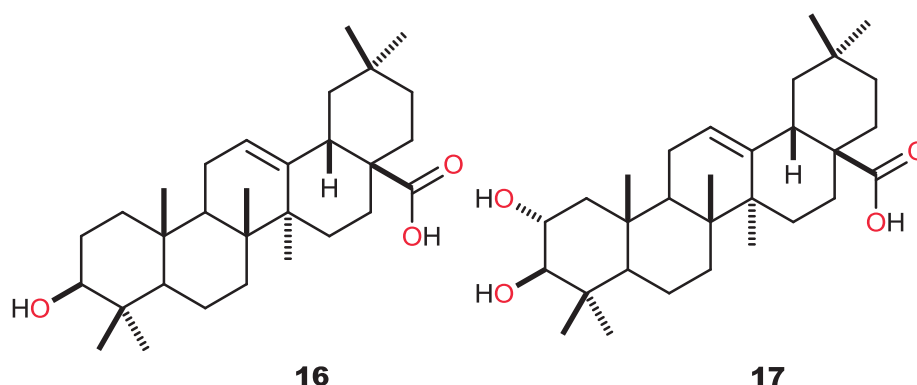


Figura 2.4. Ácido oleanólico (**16**) y ácido maslínico (**17**).

Los triterpenoides pueden ser utilizados como antiparasitarios, un ejemplo interesante es la cucurbitacina (**18**) (Figura 2.5) de las raíces de pepino (*Cucumissativus* L.), el cual es un compuesto con acción nematocida (Sepúlveda, 2004).

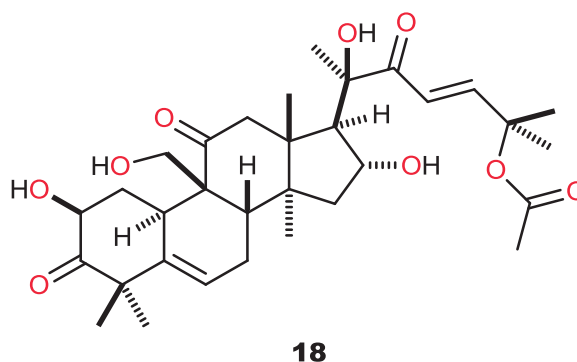


Figura 2.5. Cucurbitacina (**18**).

De la corteza de *Bursera graveolens*, se han aislado triterpenos tetracíclicos derivados del eufano o tirucalano como: ácido β -elemónico (**19**), ácido α -elemólico (**20**) y ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico (**21**) (Figura 2.6), los cuales presentan actividad antimicrobiana y actividad antiinflamatoria (Robles y col., 2005).

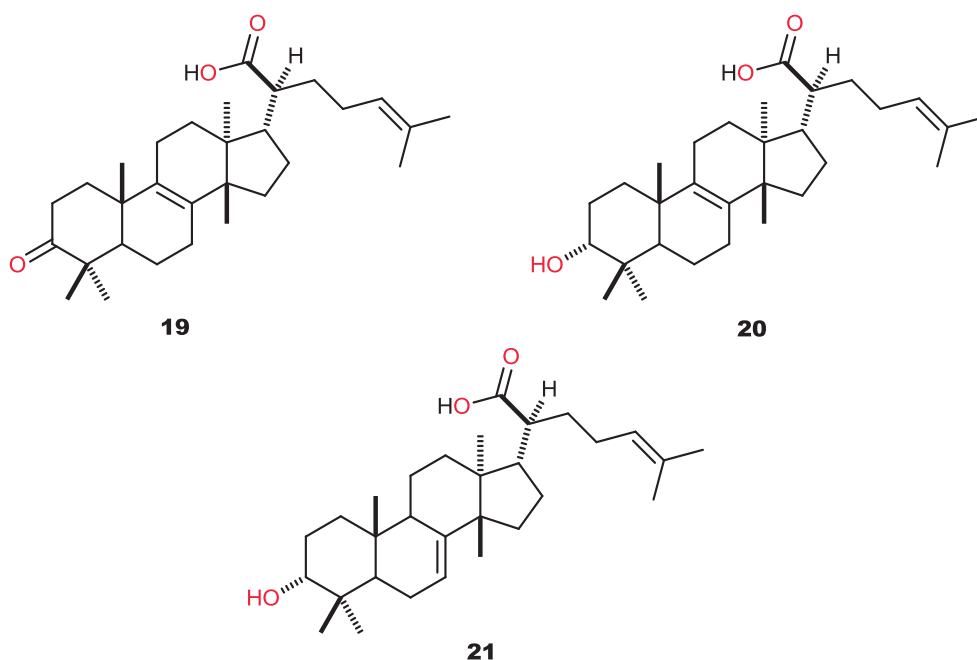


Figura 2.6. Triterpenos tetracíclicos aislado de *Bursera graveolens*.

Los fitosteroles, como el campestanol (**22**) y sitostanol (**23**) (Figura 2.7), son triterpenos saturados y son menos abundantes en la naturaleza. Estos son capaces de inhibir la absorción intestinal de colesterol, poseen propiedades inmunomoduladoras que podrían ser benéficas para la prevención del cáncer de colon, cáncer de mama y daño tisular asociado a la inflamación (Drago y col., 2006).

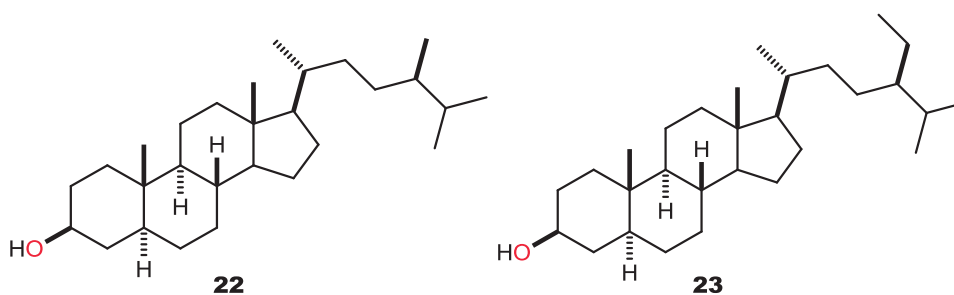


Figura 2.7. Fitosteroles anticancerígenos.

La familia *Asteraceae* cuenta con significativos antecedentes de biosíntesis de terpenos, de hecho, es la única familia en la cual se han detectado terpenos

irregulares (Figura 2.8), es decir, terpenos que no muestran la unión típica de unidades de isopreno (**24-26**) (Dewick, 2009).

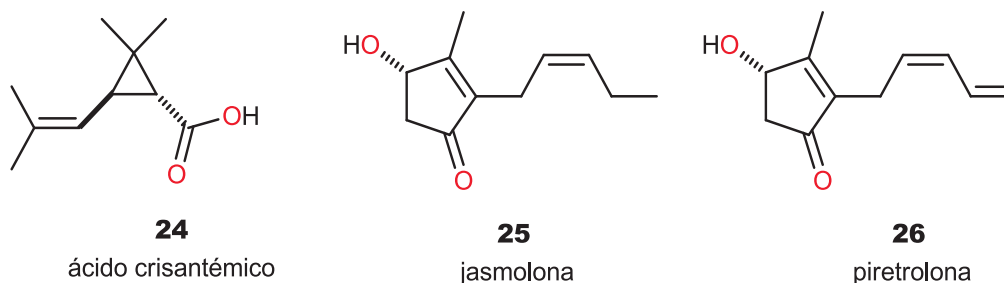


Figura 2.8. Ejemplos de terpenos irregulares.

Esta familia comprende más de 1,700 géneros y unas 24,000 a 30,000 especies distribuidas por todo el mundo, excepto en la Antártida. Se han encontrado ejemplares desde pequeñas hierbas de 1 cm de altura hasta árboles de más de 30 metros (Figura 2.9). Las características representativas son la estructura reproductiva, el capítulo donde las flores se disponen en forma sésil sobre un receptáculo ensanchado (Katinas y col., 2007).

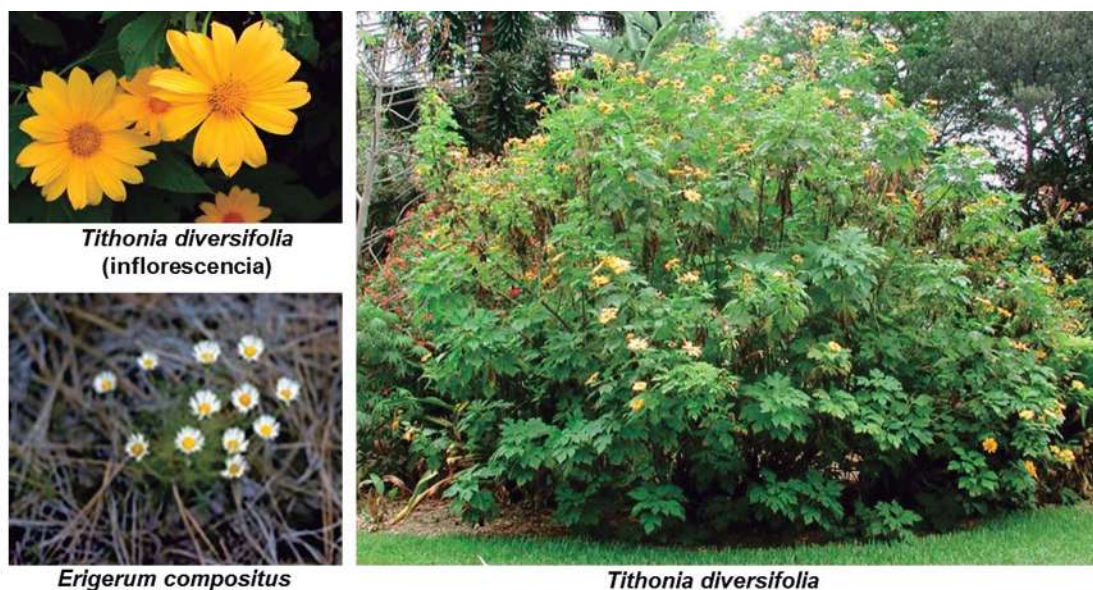


Figura 2.9. Imágenes de especies de *Asteraceae*.

Teofrasto hace 2,300 años reconoció a la familia *Asteraceae*, la cual anteriormente fue conocida con el nombre de *Compositae*, (Giseke., 1792). Henri Cassini en 1816, hizo estudios importantes de esta familia entre el periodo 1812 a

1831 en los que describió su morfología y estableció diecinueve tribus; tiempo después (Lessing, 1832) redujo a ocho el número de tribus y Candolle a tres. Sin embargo, George Bentham y Joseph Dalton en 1873, establecieron trece tribus que hoy en día se conservan (Katinas y col., 2007). El nombre de *Asteraceae* también es reconocido por el código internacional de nomenclatura botánica (Greuter y col., 2000).

Un acontecimiento importante en la historia de la taxonomía de las asteráceas fue la denominada nueva sinanterología, pues los especialistas en asteráceas se llaman sinanterólogos por que se basan para clasificar a las plantas en la morfología de las anteras; pero además se apoyan en micro caracteres (anatómicos, citológicos y químicos) en lugar de los macro caracteres para la clasificación taxonómica (Figura 2.10). Entre estos especialistas resaltan los botánicos Harlod Robinson y Robert M. King (King y Robinson, 1970). Otros hechos importantes para la clasificación y filogenia de las asteráceas fueron los estudios moleculares de ADN de Canse & Palmer en 1987 (Katinas y col., 2007).

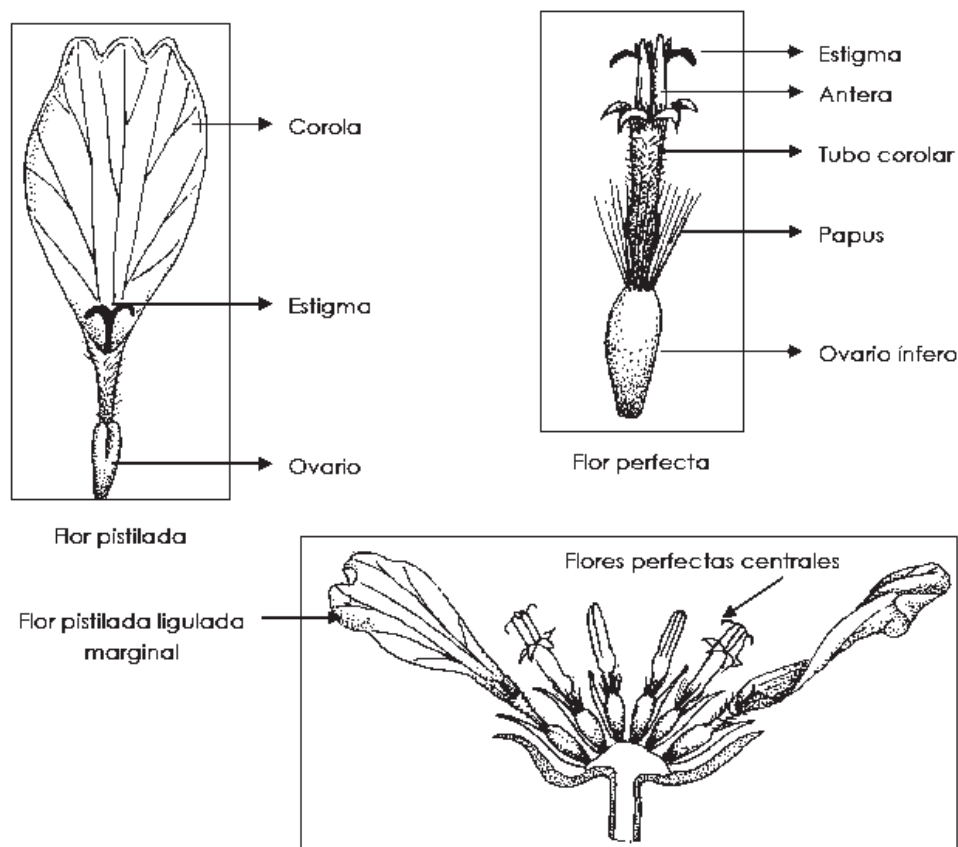


Figura 2.10. Órganos florales presentes en *Asteraceae*.

El primer cladograma de la familia *Asteraceae* fue elaborado en 1987 por el botánico sueco Karen Bremer basándose caracteres morfológicos y más tarde publicó un tratado de la familia (Bremer, 1994). La clasificación de Bremer en 1994, incluye los avances en el conocimiento de la filogenia de las asteráceas.

En México existen 371 géneros de la familia *Asteraceae*, el 18% son endémicos, los Estados más ricos florísticamente en el sureste mexicano son Chiapas, Oaxaca y Veracruz y en el oeste son Jalisco y Michoacán (Villaseñor y col., 1997); es una de las familias vegetales más representativas en la medicina tradicional de los pueblos (Katinas y col., 2007). Los estados de Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Jalisco y Michoacán cuentan con el 46.6% del total de la población de especies de esta familia en el país y el 72% de esta población es de especies endémicas (Heinrich y col., 1998, Villaseñor y col., 1998).

Dentro de *Asteraceae* se encuentra el género americano *Verbesina*, el cual pertenece a la tribu *Heliantheae* que comprende aproximadamente 300 especies distribuidas desde Canadá hasta Argentina (Tabla 2.1). Se reconocen dos importantes centros de diversidad, las montañas del centro de México y la porción norte de la cordillera de los Andes. En México se reportan poco más de 180 especies (Carrillo Pablo y col., 2010), 17 de las cuales están ampliamente distribuidas y 61 están en peligro de extinción (Harker y col., 2002). Este género ha tenido gran importancia debido a que muchas de estas especies han demostrado ser antibacterianas, fungicidas, antivirales y antitumorales (Colmenares y col., 2010).

Tabla 2.1. Lista de especies *Verbesina* pertenecientes al género *Asteraceae*.

<i>Especie</i>	<i>Especie</i>
<i>V. acapulcensis</i> B.L.Rob. & Greenm.	<i>V. lundellii</i> S.F.Blake
<i>V. agricolarum</i> Standl. & Steyerf.	<i>V. macdonaldii</i> B.L.Turner
<i>V. alata</i> L.	<i>V. machucana</i> B.L.Turner
<i>V. albissima</i> Sagást.	<i>V. macrophylla</i> (Cass.) S.F.Blake
<i>V. alcabrerae</i> Rzed.	<i>V. macvaughii</i> B.L.Turner
<i>V. aligera</i> S.F.Blake	<i>V. madrensis</i> Greenm.
<i>V. allophylla</i> S.F.Blake	<i>V. maldonadoensis</i> H.Rob. & Panero
<i>V. alternifolia</i> (L.) Britton ex Kearney	<i>V. mexiae</i> B.L.Turner
<i>V. altipetens</i> S.F.Blake	<i>V. mexicana</i> Cerv. ex DC.
<i>V. ampliata</i> Sagást. & Quipuscoa	<i>V. miahuatlana</i> B.L.Turner
<i>V. ancashensis</i> Sagást. & Quipuscoa	<i>V. mickelii</i> McVaugh
<i>V. angulata</i> Urb.	<i>V. microcarpa</i> S.F.Blake
<i>V. angusta</i> Maguire, Steyerf. & W.	<i>V. microcephala</i> Benth.
<i>V. angustissima</i> S.F.Blake	<i>V. microptera</i> DC.
<i>V. apiculata</i> J.R.Coleman	<i>V. minarum</i> Standl. & Steyerf.
<i>V. apleura</i> S.F.Blake	<i>V. minuticeps</i> S.F.Blake
<i>V. aramberrana</i> B.L.Turner	<i>V. mixteca</i> Brandege
<i>V. arborea</i> Kunth	<i>V. mollis</i> Kunth
<i>V. aristata</i> A.Heller	<i>V. monactioides</i> Sagást., S. Leiva & P. L.
<i>V. arthurii</i> S.F.Blake	<i>V. montanoifolia</i> B. L. Rob. & Greenm.
<i>V. aspera</i> S.F.Blake	<i>V. nana</i> (A. Gray) B. L. Rob. & Greenm.
<i>V. auriculata</i> DC.	<i>V. nayaritensis</i> B.L.Turner
<i>V. aurita</i> Phil.	<i>V. nelsonii</i> B. L. Rob. & Greenm.
<i>V. aypatensis</i> Sagást. & Quipuscoa	<i>V. neotenoriensis</i> B.L.Turner
<i>V. baccharidea</i> S.F.Blake	<i>V. neriifolia</i> Hemsl.
<i>V. barragana</i> Cuatrec.	<i>V. nervosa</i> S.F. Blake

<i>V. baruensis</i> Hammel & D'Arcy	<i>V. nudipes</i> S.F. Blake
<i>V. biserrata</i> H.Rob. & Panero	<i>V. oaxacana</i> DC.
<i>V. bolanosana</i> B.L.Turner	<i>V. occidentalis</i> (L.) Walter
<i>V. boliviana</i> Klatt	<i>V. oerstediana</i> Benth.
<i>V. breedlovei</i> B.L.Turner	<i>V. oligactis</i> S.F.Blake
<i>V. brevilingua</i> Sagást.	<i>V. oligantha</i> B.L.Rob.
<i>V. brunnea</i> Sagást. & Quipuscoa	<i>V. oligocephala</i> M. Johnst.
<i>V. calciphila</i> Standl. & Steyerl.	<i>V. olivácea</i> Klatt
<i>V. caleaefolia</i> Cabrera	<i>V. olsenii</i> B.L.Turner
<i>V. callacatensis</i> Hieron.	<i>V. oncophora</i> B.L.Rob. & Seaton
<i>V. callilepis</i> S.F.Blake	<i>V. oreophila</i> Wootton & Standl.
<i>V. calzadae</i> Panero & Villaseñor	<i>V. oreopola</i> B.L.Rob. & Greenm.
<i>V. camomilloides</i> Sessé & Moc.	<i>V. ortegae</i> S.F.Blake
<i>V. capituliparva</i> Sagást.	<i>V. otuzcensis</i> Sagást. & Quipuscoa
<i>V. caymanensis</i> Proctor	<i>V. ovata</i> (Cav.) A.Gray
<i>V. centroboyacana</i> S.Díaz	<i>V. oxylepis</i> S.F.Blake
<i>V. chachapoyensis</i> S. & Q.	<i>V. pallens</i> Benth.
<i>V. chapmanii</i> J.R.Coleman	<i>V. palmeri</i> S.Watson
<i>V. chiapensis</i> B.L.Rob. & Greenm.	<i>V. paneroi</i> B.L.Turner
<i>V. chihuahuensis</i> A.Gray	<i>V. paniculata</i> Poir.
<i>V. chilapana</i> B.L.Turner	<i>V. pantoptera</i> S.F.Blake
<i>V. cinerascens</i> B.L.Rob. & Greenm.	<i>V. papasquiara</i> Panero & Villaseñor
<i>V. citrina</i> Sagást. & Zapata	<i>V. parrasana</i> Brandege
<i>V. coahuilensis</i> A. Gray ex S. Watson	<i>V. parviflora</i> S.F.Blake
<i>V. cocuyensis</i> Cuatrec.	<i>V. pauciramea</i> "S., S. Leiva & P. Lezama"
<i>V. columbiana</i> B.L.Rob.	<i>V. pedunculosa</i> (DC.) B.L. Rob.
<i>V. corral-diazii</i> B.L.Turner	<i>V. pellucida</i> Villaseñor & Panero
<i>V. costaricensis</i> B.L.Rob.	<i>V. peninsularis</i> S.F.Blake
<i>V. coulteri</i> A.Gray	<i>V. pennellii</i> S.F.Blake
<i>V. crassicaulis</i> S.F.Blake	<i>V. perfoliata</i> Sessé & Moc.
<i>V. crassicephala</i> Sagást. & Quipuscoa	<i>V. perlanata</i> Sagást. & Quipuscoa
<i>V. crassipes</i> B.L.Rob. & Greenm.	<i>V. persicifolia</i> DC.
<i>V. crassiramea</i> S.F.Blake	<i>V. petrobioides</i> (Griseb.) S.F. Blake
<i>V. crocata</i> (Cav.) Less.	<i>V. petrophila</i> Brandege
<i>V. cronquistii</i> B.L.Turner	<i>V. petzalensis</i> Standl. & Steyerl.
<i>V. cuautlensis</i> McVaugh	<i>V. pichinchensis</i> H.Rob.
<i>V. culminicola</i> McVaugh	<i>V. pietatis</i> McVaugh
<i>V. curatella</i> McVaugh	<i>V. pilosa</i> Maguire & Wurdack
<i>V. cymbipalea</i> S.F.Blake	<i>V. pinnatifida</i> Sw.
<i>V. daviesiae</i> B.L.Turner	<i>V. planitieii</i> Cuatrec.
<i>V. densifolia</i> S.F.Blake	<i>V. platanarana</i> B.L.Turner
<i>V. dentata</i> (Bonpl.) Kunth	<i>V. platyptera</i> Sch.Bip. ex Klatt

<i>V. discoidea</i> (Brandeggee) Rzed.	<i>V. pleistocephala</i> (Donn. Sm.) B.L.Rob.
<i>V. dissita</i> A.Gray	<i>V. portlandiana</i> Proctor
<i>V. diversifolia</i> DC.	<i>V. potosina</i> B. L. Rob.
<i>V. domingensis</i> Urb.	<i>V. propinqua</i> (Britton) S. F. Blake
<i>V. durangensis</i> B.L.Turner	<i>V. pseudovirgata</i> B.L.Turner
<i>V. ekmanii</i> Urb.	<i>V. pterocarpha</i> S.F.Blake
<i>V. elegans</i> Kunth	<i>V. pterocaula</i> (Moc. & Sessé) DC.
<i>V. encelioides</i> (Cav.) B. & H.	<i>V. pterophora</i> S.F.Blake
<i>V. eperetma</i> S.F.Blake	<i>V. punctata</i> B.L.Rob. & Greenm.
<i>V. erosa</i> Brandeggee	<i>V. purpusii</i> Brandeggee
<i>V. fastigiata</i> B.L.Rob. & Greenm.	<i>V. quetamensis</i> Olsen
<i>V. fayii</i> B.L.Turner	<i>V. resinosa</i> Klatt
<i>V. felgeri</i> B.L.Turner	<i>V. reyesii</i> Panero & Villaseñor
<i>V. fragrans</i> Sessé & Moc.	<i>V. ricacosta</i> B.L.Turner
<i>V. fraseri</i> Hemsl.	<i>V. richardsonii</i> B.L.Turner
<i>V. furfurácea</i> McVaugh	<i>V. rivetii</i> S.F.Blake
<i>V. fuscasiccans</i> (D' Arcy) D' Arcy	<i>V. robinsonii</i> (Klatt) F. ex B. L. Rob. & G.
<i>V. fusiformis</i> McVaugh	<i>V. rosei</i> B.L.Rob. & Greenm.
<i>V. gentryi</i> Standl.	<i>V. rothrockii</i> B.L.Rob. & Greenm.
<i>V. gigantea</i> Jacq.	<i>V. rugosa</i> Chodat
<i>V. glabrata</i> Hook. & Arn.	<i>V. rumicifolia</i> B.L.Rob. & Greenm.
<i>V. glaucophylla</i> S.F.Blake	<i>V. rupestris</i> (Urb.) S.F. Blake
<i>V. gracilipes</i> B.L.Rob.	<i>V. saltensis</i> Cabrera
<i>V. grayii</i> (Sch.Bip.) Benth. ex. Hemsl.	<i>V. salvadorensis</i> S.F.Blake
<i>V. guadeloupensis</i> Urb.	<i>V. santanderensis</i> S.Díaz
<i>V. guaranitica</i> Chodat	<i>V. sararensis</i> Cuatrec.
<i>V. guatemalensis</i> B.L.Rob. & Greenm.	<i>V. saubinetia</i> Klatt
<i>V. guerreroana</i> B.L.Turner	<i>V. scabrida</i> Rzed.
<i>V. guianensis</i> Baker	<i>V. scabriuscula</i> S.F.Blake
<i>V. hastata</i> (Kellogg) Kellogg ex Curran	<i>V. scotiodonta</i> S.F.Blake
<i>V. hastifolia</i> S.F.Blake	<i>V. seatonii</i> S.F.Blake
<i>V. helianthoides</i> Michx.	<i>V. serícea</i> Kunth & Bouché
<i>V. heterocarpa</i> S.F.Blake	<i>V. serrata</i> Cav.
<i>V. heterophylla</i> A.Gray	<i>V. sinaloensis</i> B.L.Turner
<i>V. hidalgoana</i> B.L.Turner	<i>V. sodiroi</i> Hieron.
<i>V. hintoniorum</i> B.L.Turner	<i>V. sordescens</i> DC.
<i>V. hispida</i> McVaugh	<i>V. sororia</i> A. Gray
<i>V. holwayi</i> B.L.Rob.	<i>V. sousae</i> J. J. Fay
<i>V. howardiana</i> J.Olsen	<i>V. sphaerocephala</i> A. Gray
<i>V. huancabambae</i> S. & Q.	<i>V. standleyi</i> (Steyerm.) D. L. Nash
<i>V. humboldtii</i> Spreng.	<i>V. stenophylla</i> Greenm.
<i>V. hygrophila</i> Panero & Villaseñor	<i>V. stricta</i> (Hemsl.) A. Gray
<i>V. hypargyrea</i> B.L.Rob. & Greenm.	<i>V. strotheri</i> Panero & Villaseñor

<i>V. hypoglauca</i> Sch.Bip. ex Klatt	<i>V. subcordata</i> DC.
<i>V. hypomalaca</i> B.L.Rob. & Greenm.	<i>V. subdiscoidea</i> Toledo
<i>V. hypsela</i> B.L.Rob.	<i>V. sublobata</i> Benth.
<i>V. intermissa</i> S.F.Blake	<i>V. suncho</i> (Griseb.) S. F. Blake
<i>V. jacksonii</i> B.L.Turner	<i>V. synethes</i> S.F.Blake
<i>V. juxtlahuacensis</i> Panero & Villaseñor	<i>V. synotis</i> S.F.Blake
<i>V. karsticola</i> Proctor	<i>V. tamaulipana</i> B.L.Turner
<i>V. killipii</i> S.F.Blake	<i>V. tapantiana</i> Poveda & Hammel
<i>V. kimii</i> B.L.Turner	<i>V. tatei</i> S.F.Blake
<i>V. klattii</i> B.L.Rob. & Greenm.	<i>V. tecolotlana</i> B.L.Turner
<i>V. laevifolia</i> S.F.Blake	<i>V. teotepecana</i> B.L.Turner
<i>V. lanata</i> B.L.Rob. & Greenm.	<i>V. tequendamensis</i> Cuatrec.
<i>V. langfordae</i> B.L.Turner	<i>V. tequilana</i> J.R.Coleman
<i>V. langlassei</i> B.L.Rob.	<i>V. tetráptera</i> (Ortega) A. Gray
<i>V. latisquama</i> S.F.Blake	<i>V. torresii</i> B.L.Turner
<i>V. lehmannii</i> Hieron.	<i>V. tostimontis</i> Cuatrec.
<i>V. leivae</i> Sagást. & Quipuscoa	<i>V. trichantha</i> (Kuntze) S. F. Blake
<i>V. leprosa</i> Klatt	<i>V. trilobata</i> B.L. Rob. & Greenm.
<i>V. leptochaeta</i> A. Gray	<i>V. turbacensis</i> Kunth
<i>V. liebmännii</i> Sch.Bip. ex Klatt	<i>V. vallartana</i> B.L.Turner&Olsen
<i>V. ligulata</i> (Maguire & Wurdack) Pruski	<i>V. vicina</i> S.F.Blake
<i>V. lilo</i> S.F.Blake	<i>V. villaregalis</i> McVaugh
<i>V. lindheimeri</i> B. L. Rob. & Greenm.	<i>V. villasenorii</i> B.L.Turner
<i>V. linearis</i> (McVaugh) B. L. Turner	<i>V. virgata</i> Cav.
<i>V. litoralis</i> Alain	<i>V. virginica</i> L.
<i>V. lloensis</i> Hieron.	<i>V. walteri</i> Shinnars
<i>V. longifolia</i> (A. Gray) A. Gray	<i>V. wrightii</i> (A.Gray) Griseb.
<i>V. longipes</i> Hemsl.	<i>V. xicoana</i> B.L.Turner
<i>V. lottiana</i> E.J.Lott& Olsen	<i>V. zaragosana</i> B.L.Turner

Las especies del género *Verbesina* pueden ser árboles o hierbas; con hojas opuestas o alternas, enteras o lobuladas, márgenes dentados o subenteros, a menudo escabrosos y decurrentes con alas en los pecíolos o en los tallos. Cabezuelas heterógamas, radiadas o discoideas numerosas y dispuestas en panículas corimbosas o solitarias; involucros hemisféricos o campanulados algunas veces más cortos que las flores del disco; brácteas 2–6 seriadas, ovadas a lineales; receptáculo generalmente cónico; páleas cóncavas, envolviendo a los aquenios del disco. Flores del radio femeninas y usualmente fértiles, lígulas

blancas, amarillas o anaranjadas, cortas o largas; flores del disco amarillas o blancas, perfectas, numerosas, tubo corto, limbo grande, 5-dentado; anteras con base obtusa, ramas del estilo agudas. Aquenios comprimidos, conspicuamente alados en cada margen; vilano de 2 aristas (Robinson, 1980).

Dentro de los estudios químicos realizados en este género se encuentra *V. turbacensis* de cuyos extractos de la parte aérea se reporta la presencia de derivados de eudesmanos esterificados con ácido cinámico (**27-35**) (Figura 2.11) (Bruno y col., 2010; Amaro y col., 2002), mientras que en la raíz de *V. virginica* se encontraron eudesmanos esterificados con ácido *p*-coumárico (**36, 37**) (Xu, Wen-Hui y col., 2010).

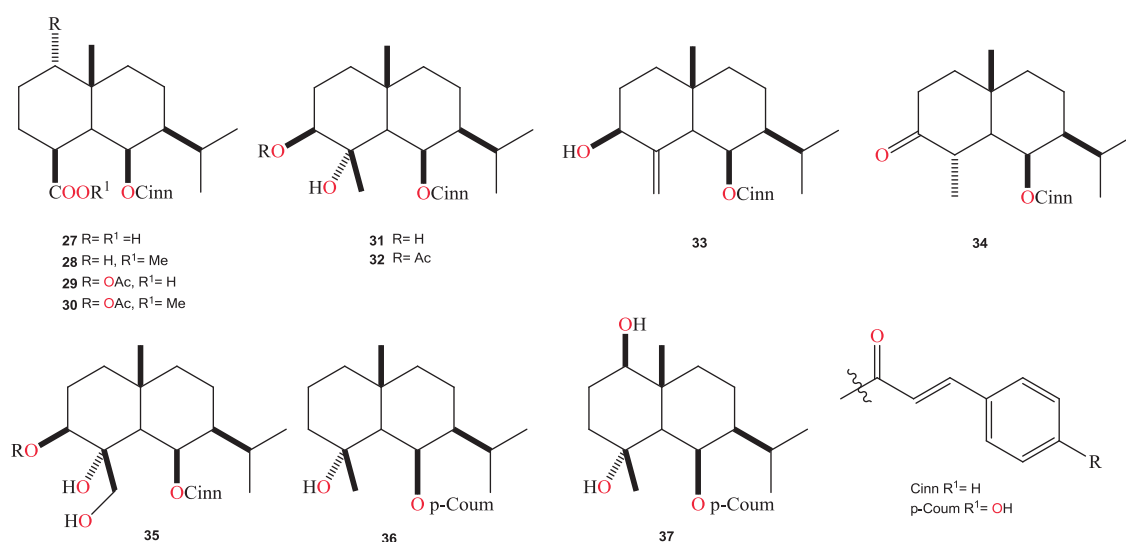


Figura 2.11. Eudesmanos aislados de *V. turbacensis*

De igual manera se describe en *V. virginica* la presencia de saponinas sustituidas con derivados del ácido gálico como el verbesinósido A (**38**) (Figura 2.12) (Xu, Wen-Hui y col., 2009).

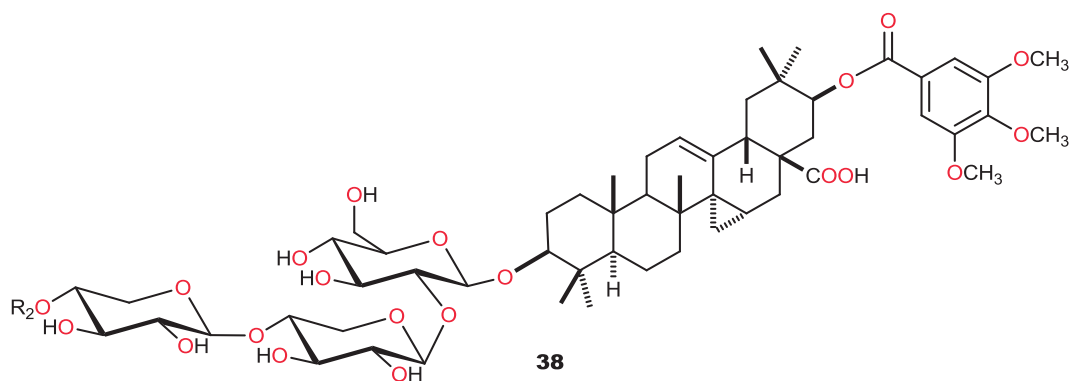


Figura 2.12 Verbesinósido A (**38**).

En el análisis químico de la parte aérea de *V. mycrocephala* se reporta la presencia del fitoesterol β -sitosterol (**39**) (Figura 2.13), así como distintos eudesmanos (Herz, Werner y col., 1981).

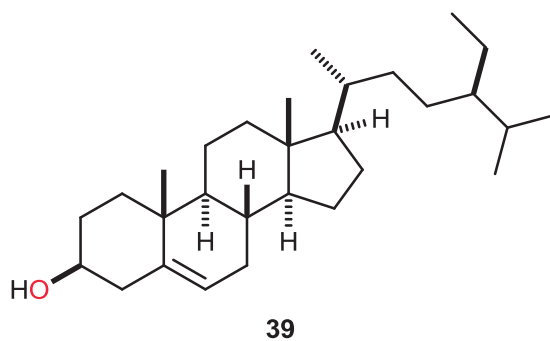


Figura 2.13. β -sitosterol (**39**).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

Es llevar a cabo el estudio químico y antimicrobiano del extracto hexánico de la raíz de *Verbesina parviflora* con la finalidad de contribuir al conocimiento de metabolitos secundarios con potencial actividad biológica para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias.

Los objetivos específicos involucran:

- Colecta de la especie.
- Preparación de extracto hexánico de la raíz de la especie.
- Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto.
- Obtención de metabolitos secundarios mediante técnicas cromatográficas y caracterización por medio de métodos físicos y espectroscópicos.

4. JUSTIFICACIÓN

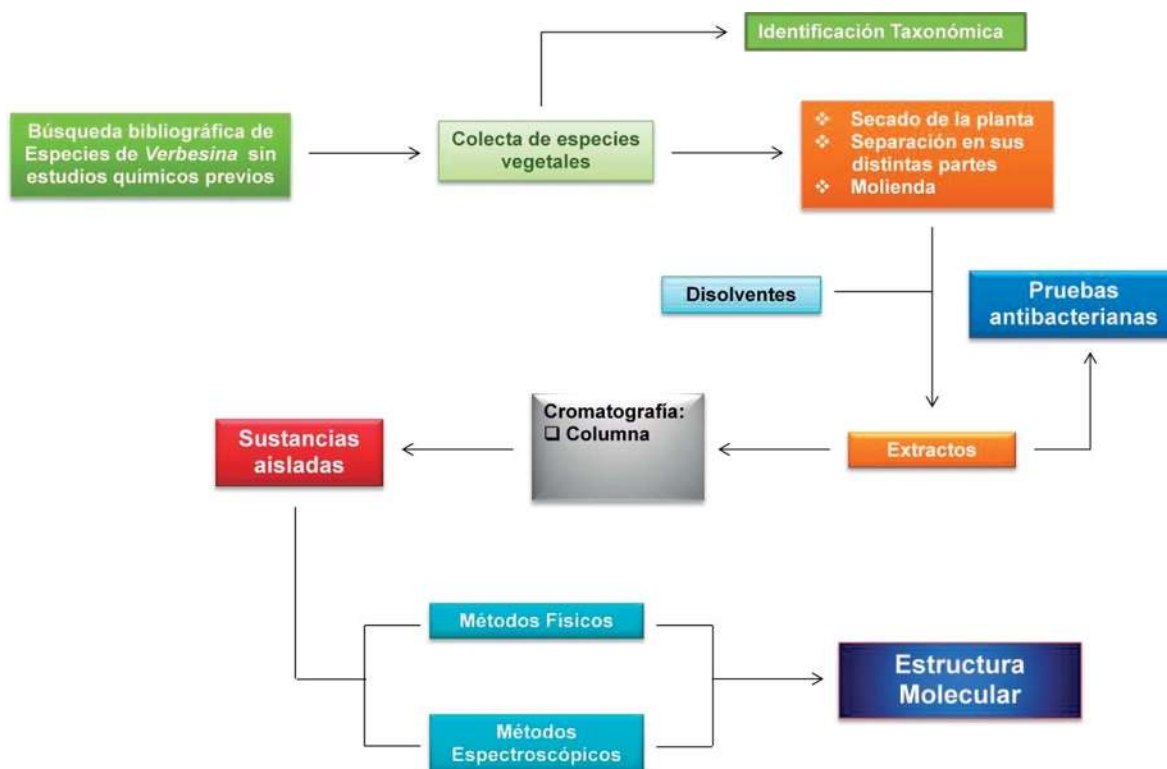
El género *Verbesina* es uno de los más abundantes y único en América Latina; en México se cuenta con más del 50% de las especies de este género, y algunas de estas además son utilizadas en la medicina tradicional en diferentes lugares de la República Mexicana. De este género se han aislado metabolitos secundarios con actividad farmacológica interesante que motivan la búsqueda de sustancias bioactivas con efecto antimicrobiano; ya que es bien sabido que las plantas son organismos sésiles que poseen un arsenal químico para la comunicación y defensa; entonces es posible aislar a partir de especies vegetales compuestos que inhiban microorganismos patógenos que afectan a la salud del ser humano.

El uso indiscriminado de antibióticos para combatir enfermedades de etiología infecciosa causada por microorganismos como bacterias y hongos ha promovido la resistencia de estos a los antibióticos de uso comercial, por lo cual es una necesidad llevar a cabo la búsqueda de nuevos compuestos químicos que nos ayuden a resolver este tipo de problemas de salud.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Metodología.

La metodología que se siguió para el desarrollo de este trabajo se muestra en el Esquema 5.1 e involucra la recolección de la especie, su clasificación botánica, el secado de la muestra vegetal, la separación y molienda de las partes aéreas y raíces, la obtención de extractos con distintos disolventes, la separación mediante métodos cromatográficos y el análisis de las sustancias a partir de métodos físicos y espectroscópicos. También se consideran ensayos biológicos para detectar actividad antimicrobiana del extracto estudiado.



Esquema 5.1. Metodología empleada para el desarrollo del proyecto.

5.2. Colecta e identificación de la especie.

Verbesina parviflora, fue colectada el 28 julio del 2008 en el kilómetro 3.5 de la carretera Tiripetio-Acuitzio del Canje en el Estado de Michoacán, a un altitud de 2045 msnm y una latitud de N 19°30′.916′, W 101° 20′.639′. Una muestra se preparó y se envió al Herbario del Instituto de Ecología A.C. en Pátzcuaro, Michoacán para su identificación botánica por parte del D.C. Jerzy Rzedowski.

5.3. Obtención de los extractos.

Para la obtención del extracto de la raíz se pesaron 410 g y se sometieron a maceración con 2 L de hexano durante tres días, después se filtró y se concentró en un rotavapor. La misma metodología se desarrolló tres veces para lograr el mejor rendimiento posible el cual fue del 0.66% (2.706 g).

5.4. Bacterias utilizadas para los ensayos antimicrobianos.

Las bacterias utilizadas en los ensayos antimicrobianos fueron obtenidas de cepas aisladas en el Hospital Civil “Dr. Miguel Silva” de la ciudad de Morelia, Michoacán y caracterizados bioquímicamente; las especies fueron las siguientes:

- Gram negativas: *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnei*, *Shigella sp.*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella sp.* y *Pseudomona aeruginosa*.
- Gram positivas: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*.

5.5 Ensayos de actividad antibacteriana de los extractos de *V. parviflora*.

Las muestras problema a ensayar al igual que los controles se prepararon de la siguiente manera: cada uno de los extractos se disolvieron en etanol al 96 % (1 g/mL), como control positivo se utilizó cefotaxima y como control negativo etanol al 96%.

Para la preparación de los medios de cultivos se utilizó agar Mueller Hinton (MH) de la casa comercial BIOXON; se agregaron 25 mL de agar MH por caja de Petri de 100 X 55 mm a utilizar, como lo indica el manual de procedimiento de la *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009), a las placas preparadas se les realizó la prueba de esterilidad incubándolas 16 h a 37°C. Cada una de las cepas bacterianas fue resembrada en placas de agar MH e incubadas entre 16 y 20 h con la finalidad de trabajar con bacterias jóvenes como lo marca el *Manual de Procedimiento para Manipulación de Microorganismos* del CLSI 2009.

Para estandarizar el inóculo de cada una de las trece cepas a una turbidez de 0.5, se tomó una colonia aislada de cada cultivo bacteriano joven y se inoculó en caldo MH, se incubó a 37 °C durante dos horas y a cada hora se determinó la turbidez a 600 nm con ayuda de un espectrofotómetro; posteriormente las bacterias se inocularon en cajas de agar MH, después se colocaron cinco discos de papel filtro estéril de 8 mm de diámetro en cada placa, tres de ellos

impregnados con la muestra problema (0.5 mg/ μ L), uno con cefotaxima (0.125 mg/ μ L) y uno con etanol 96% (0.8 mg/ μ L); se incubaron a 37°C /18 h y se reportó en halo de inhibición tanto de actividad bactericida como de actividad bacteriostática. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Los resultados obtenidos con estos ensayos mostraron que el extracto hexánico de la raíz generó un promedio 8.8 mm de inhibición (actividad bactericida) contra *B. subtilis*, mientras que para las demás cepas no mostró efectos biocidas significativos. De igual manera, en el ensayo de actividad bacteriostática no se observaron inhibiciones de crecimiento significativas (Figura 5.1).

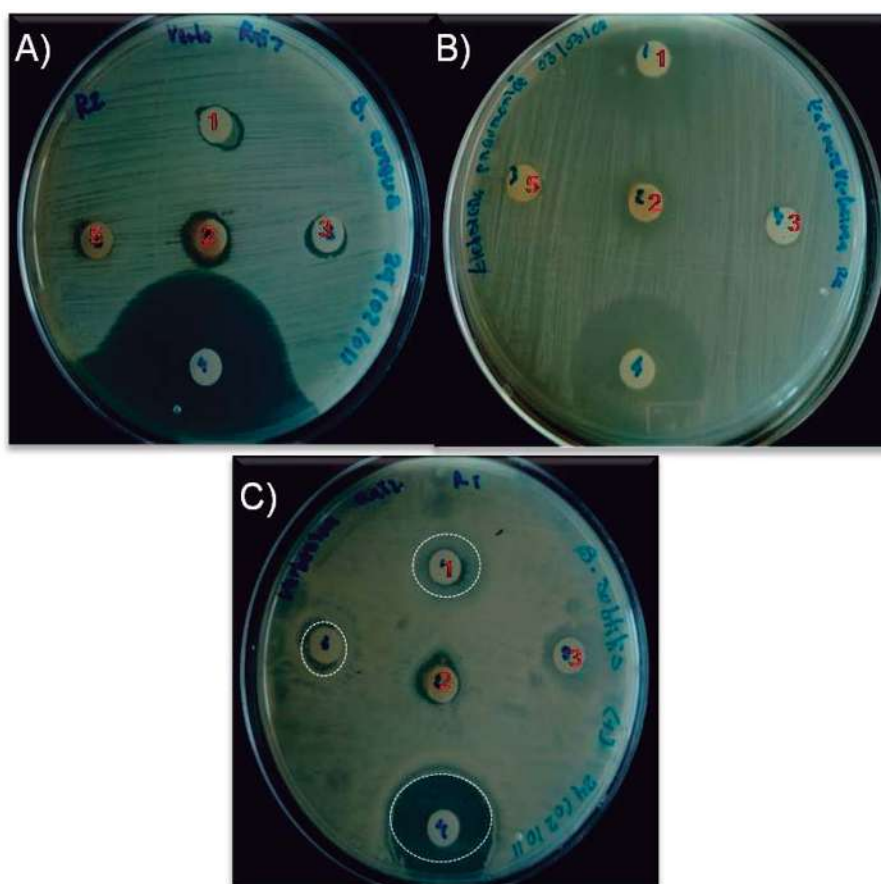


Figura 5.1. Efecto del extracto hexánico de la raíz de *V. parviflora*, sobre el crecimiento bacteriano a las 24 h. **A)** *S. aureus* **B)** *K. pneumoniae* **C)** *B. subtilis*. 1= extracto hexánico (0.5 mg/ μ L), 2,3= muestras independiente del estudio, 4= cefotaxima (0.125 mg/ μ L) y 5= etanol (0.8 mg/ μ L).

5.6. Análisis químico del extracto hexánico de la raíz.

El extracto hexánico de la raíz (2.2 g) de *V. parviflora* se sometió a separación mediante cromatografía en columna utilizando gel de sílice 60 (230-400 mesh) y como eluyentes hexano y mezclas de hexano-AcOEt en orden de polaridad creciente de las que se obtuvieron 160 fracciones; los eluatos 16-29 (80 mg) fueron recromatografiados con gel de sílice 60 (230-400 mesh) montada en una columna de cristal de 1cm de diámetro usando como eluyentes hexano y mezclas de hexano-AcOEt en orden de polaridad ascendente obteniéndose 30 fracciones; de estas, la fracción 12 (20 mg) se purificó mediante cromatografía en columna empacada con gel de sílice 60 (230-400 mesh). De este proceso se obtuvieron cristales incoloros en forma de agujas, los cuales tuvieron un punto de fusión de 230-232 °C. En su espectro de infrarrojo (IR) se apreciaron bandas de estiramiento C-H en 2931 cm^{-1} y 2868 cm^{-1} , así como una banda de estiramiento atribuida a un grupo C=O de cetona en 1703 cm^{-1} ; su espectro de masas por impacto electrónico (EMIE) mostró un ion molecular de 426 m/z , lo cual sugirió la fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$. En su espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) se observaron siete señales simples atribuidas a grupos metilo terciarios en 0.72, 0.86, 0.89, 0.94, 0.95, 1.05 y 1.18 ppm, de igual manera se observó una señal doble perteneciente a un metilo secundario en 0.86 ppm; también se observaron señales múltiples atribuidas a protones alifáticos entre 0.91 ppm y 2.38 ppm. (Figura 5.2). En el espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) se observaron las 30 señales correspondientes a un compuesto de naturaleza triterpénica, se apreció una señal en 213.1 ppm atribuida a un carbonilo de cetona además de 29 señales pertenecientes a carbonos alifáticos entre 59.5 ppm y 6.8 ppm (Figura 5.3). Con el espectro bidimensional de correlación heteronuclear HETCOR se confirmó la correcta asignación de los carbonos protonados. Los datos físicos y espectroscópicos obtenidos (Tabla 5.1) fueron comparados con los de la literatura, los cuales coincidieron para el triterpeno denominado friedelina (**40**) (Ciangherotti y col., 2004, Díaz y col., 2007).

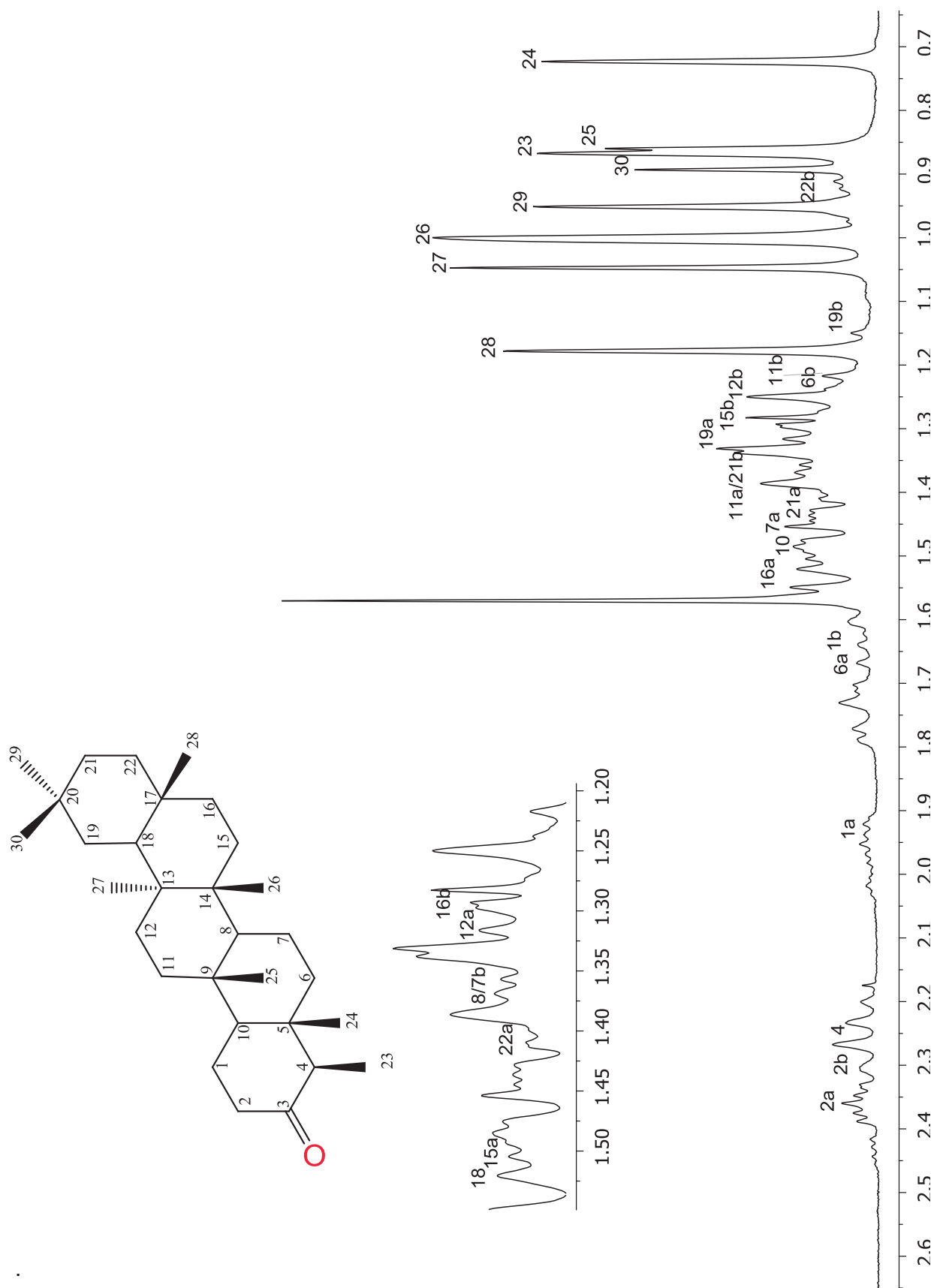


Figura 5.2. Espectro de RMN de ^1H de Friedelina (40) (400 MHz, CDCl_3).

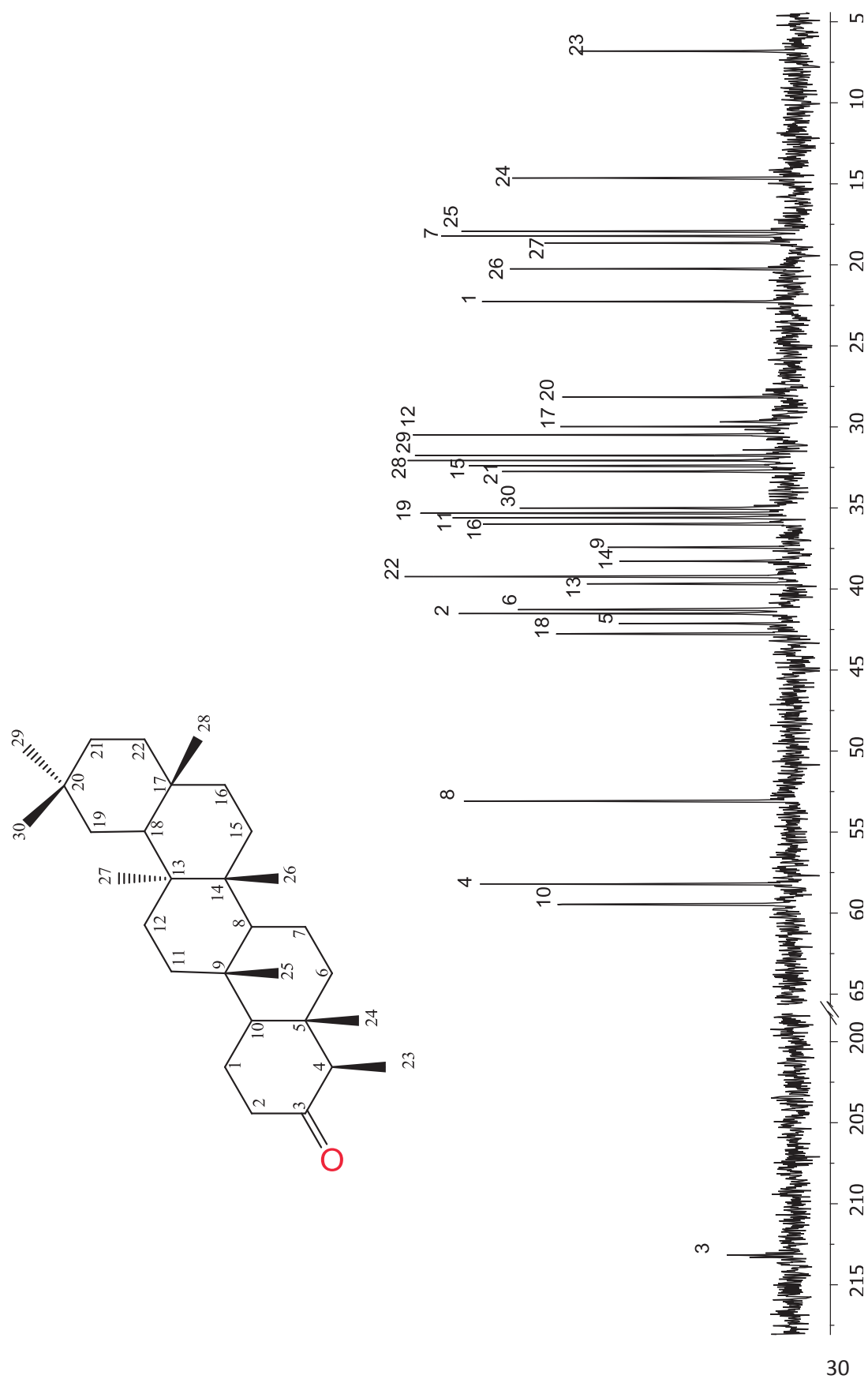


Figura 5.3. Espectro de RMN de ^{13}C de friedelina (40) (100MHz, CDCl_3).

Tabla 5.1. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H y de ^{13}C de friedelina (**40**).

Posición	^1H Exp	^1H Ref.	^{13}C Exp	^{13}C Ref.
1	a 1.92 (m), b 1.63 (m)	a 1.90 (m), b 1.65 (m)	22.2	22.2
2	a 2.38 (m), b 2.30 (m)	a 2.32 (qd), b 2.22 (m)	41.5	41.4
3	-	-	213.1	213.1
4	2.20 (q,13.4)	2.18 (q)	58.2	58.2
5	-	-	42.1	42.1
6	a 1.66 (m), b 1.23 (m)	a 1.66 (m), b 1.21 (m)	41.2	41.1
7	a 1.45 (m), b 1.35 (m)	a 1.45 (m), b 1.35 (m)	18.2	18.2
8	1.37 (m)	1.35 (m)	53.0	53.0
9	-	-	37.4	37.4
10	1.48 (m)	1.48 (m)	59.5	59.5
11	a 1.38 (m), b 1.20 (m)	a 1.38 (m), b 1.19 (m)	35.6	35.8
12	a 1.31 (m), b 1.25 (m)	a 1.31 (m), b 1.24 (m)	30.4	30.4
13	-	-	39.6	39.6
14	-	-	38.2	38.2
15	a 1.50 (m), b 1.28 (m)	a 1.49 (m), b 1.27 (m)	32.4	32.3
16	a 1.52 (m), b 1.29 (m)	a 1.50 (m), b 1.28 (m)	36.0	36.0
17	-	-	30.0	30.0
18	1.52 (m)	1.51 (m)	42.8	42.9
19	a 1.31 (m), b 1.15 (m)	a 1.31(m), b 1.14 (m)	35.3	35.0
20	-	-	28.1	28.1
21	a 1.42 (m), b 1.37 (m)	a 1.42 (m), b 1.37 (m)	32.7	32.8
22	a 1.41 (m), b 0.91 (m)	a 1.41 (m), b 0.90 (m)	39.2	39.2
23	0.86 (d,7.0)	0.81 (d)	6.8	6.7
24	0.72 (s)	0.65 (s)	14.6	14.6
25	0.86 (s)	0.80 (s)	17.9	17.8
26	0.95 (s)	0.94 (s)	20.2	20.2
27	1.05 (s)	0.98 (s)	18.6	18.6
28	1.18 (s)	1.11 (s)	32.0	32.0
29	0.94 (s)	0.93 (s)	31.7	31.8
30	0.89 (s)	0.88 (s)	35.0	35.0

δ en ppm; **Exp.** = datos experimental; **Ref.** = datos de la literatura. (multiplicidad en Hz).

De la misma cromatografía realizada con el extracto héxanico de la raíz de *V. parviflora* se obtuvo un polvo blanco (40 mg) en el eluato hexano-AcOEt 97:3, el cual se purificó mediante cristalización en frío con CH₂Cl₂ y metanol; de este proceso se obtuvieron cristales blancos cuyo punto de fusión fue de 273-275 °C; su espectro de IR mostró una banda en 3626 cm⁻¹ atribuida al estiramiento del enlace O-H y cuya señal refiere a que este grupo funcional se encuentra en posición ecuatorial y que forma puentes de hidrógeno intermoleculares, de igual manera se observaron bandas de estiramiento C-H en 2936 y 2868 cm⁻¹, en su espectro de masas (EMIE) se observó un ion molecular de 428 *m/z*, lo que sugirió la fórmula molecular C₃₀H₅₂O. En el espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) se observó una señal simple ancha en 3.73 ppm perteneciente a un protón base de hidroxilo, se observaron siete señales simples atribuidas a grupos metilo en 0.85, 0.92, 0.94, 0.95, 0.96, 0.99 y 1.16 ppm, de igual manera se observó una doble perteneciente a un metilo secundario en 0.92 ppm; también se observaron señales múltiples correspondientes a protones alifáticos entre 1.21 ppm y 1.87 ppm (Figura 5.4). En su espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) se apreciaron 30 señales de las cuales, en 72.8 ppm se observó la señal perteneciente a un carbono base de alcohol (C-3) y entre 61.3 ppm a 11.6 ppm las 29 señales correspondientes a los carbonos alifáticos del compuesto triterpénico (Figura 5.5). El espectro bidimensional de correlación heteronuclear HETCOR confirmó la correcta asignación de los carbonos protonados. Los datos físicos y espectroscópicos obtenidos (Tabla 5.2) fueron comparados con los de la literatura, los cuales coincidieron para el triterpeno denominado 3β-friedelanol (**41**) (Li-Kank Ho y col., 1995, Salazar y col., 2000).

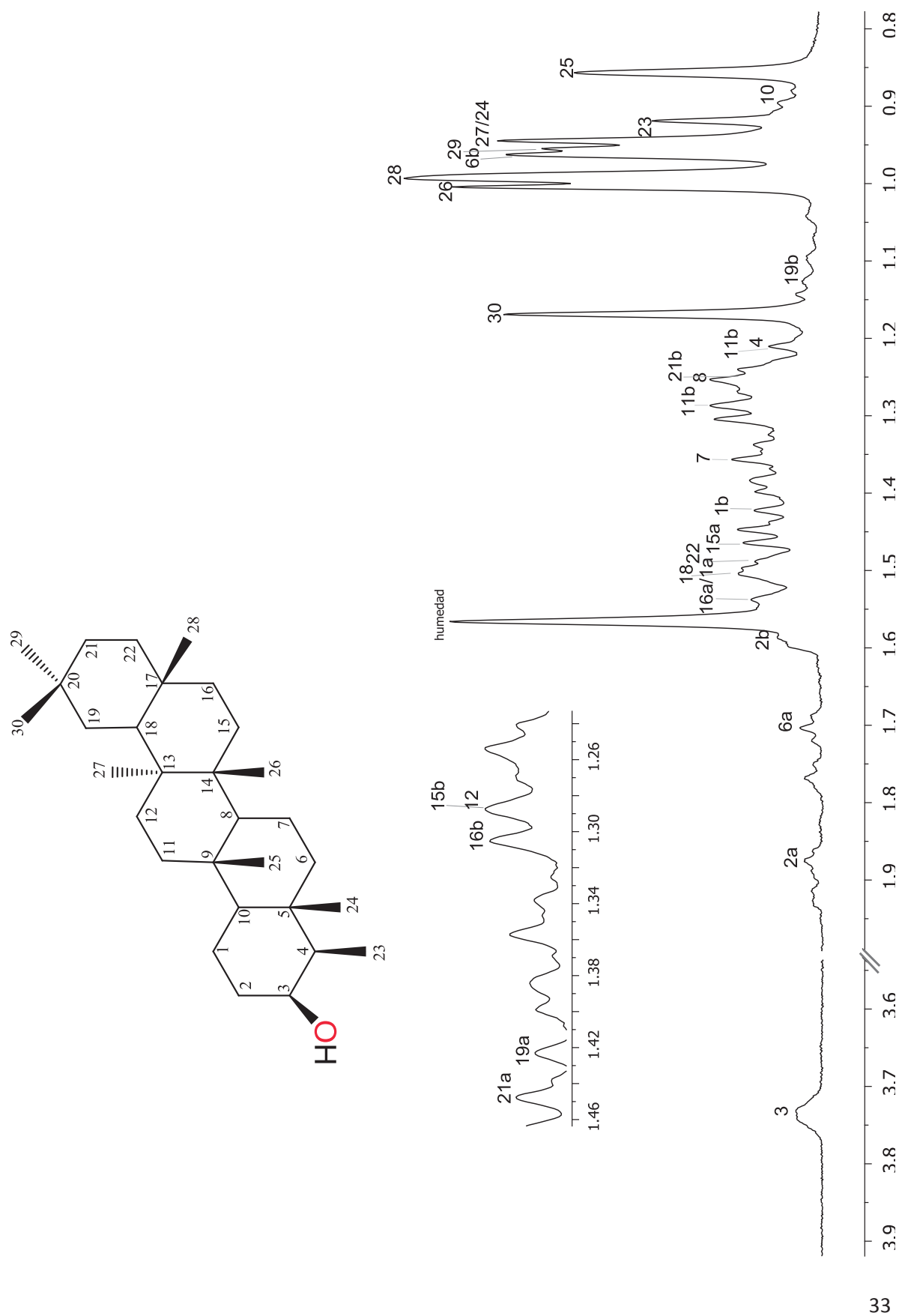


Figura 5.4. Espectro de RMN de ¹H de 3β-friedelanol (41) (400 MHz, CDCl₃).

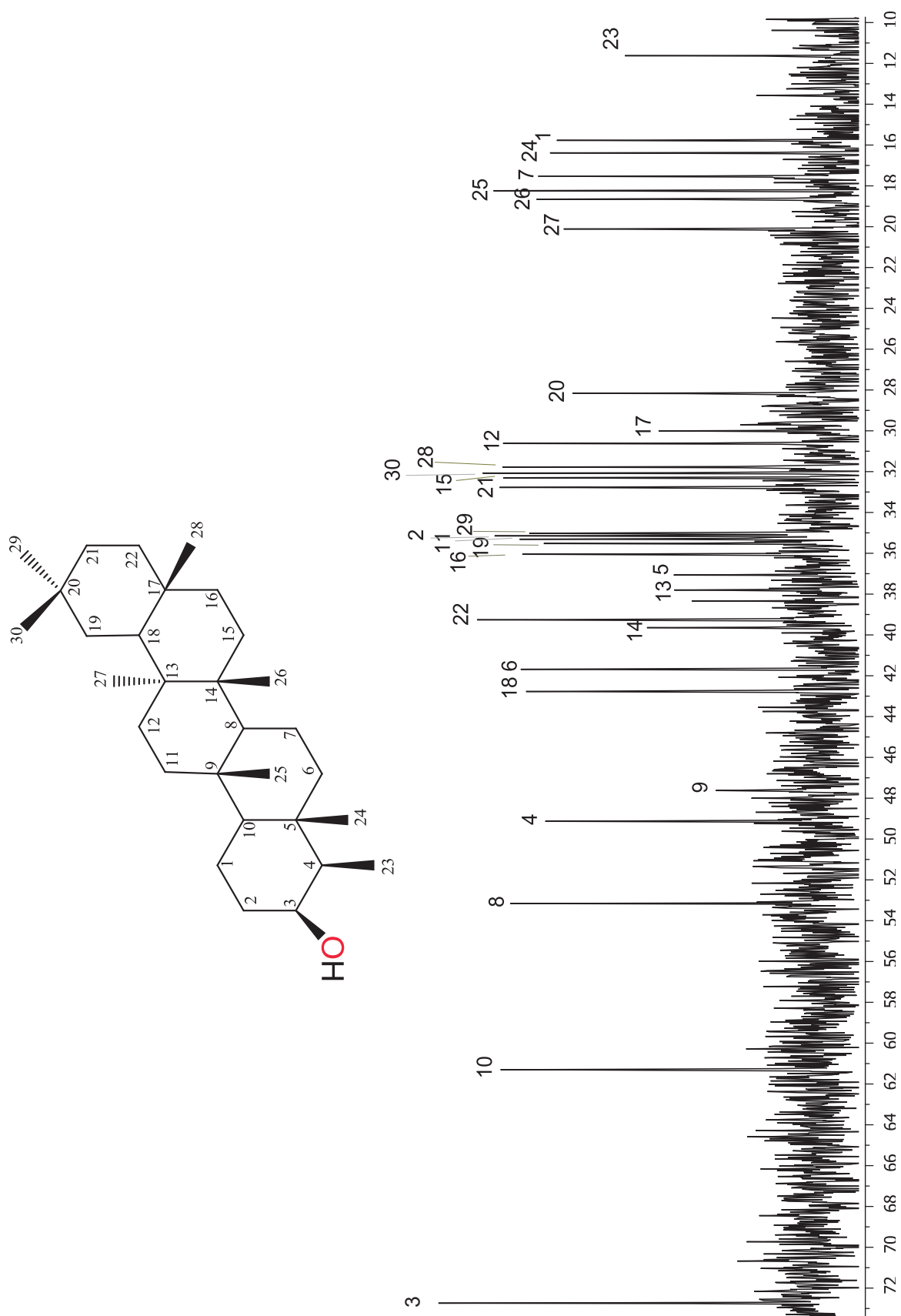


Figura 5.5. Espectro de RMN de ¹³C de 3β-friedelanol (41) (100 MHz, CDCl₃).

Tabla 5.2. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H y de ^{13}C de 3 β -friedelanol (**41**).

Posición	^1H Exp	^1H Ref.	^{13}C Exp	^{13}C Ref.
1	a 1.53 (m), b 1.42 (m)	a 1.52 (m), b 1.41 (m)	15.8	15.8
2	a 1.87 (m), b 1.56(m)	a 1.86 (qd, 9.5,3.0),b 1.56(m)	35.2	35.2
3	3.73 (sa)	3.73 (brs)	72.8	72.8
4	1.21 (m)	1.22 (m)	49.2	49.2
5	-	-	37.1	37.1
6	a 1.70 (m), b 0.94 (m)	a 1.69 (m), 0.96 (m)	41.7	41.7
7	1.36 (m)	1.36 (m)	17.5	17.6
8	1.25 (m)	1.25 (m)	53.2	53.2
9	-	-	48.4	48.4
10	0.88 (-)	0.86 (dd, 12.0,2.0)	61.3	61.4
11	a 1.28 (m), b 1.21 (m)	a 1.53 (m), b 1.42 (m)	35.3	35.3
12	1.28 (m)	1.28 (m)	30.6	30.6
13	-	-	37.8	37.8
14	-	-	39.7	39.7
15	a 1.46 (m), b 1.28 (m)	a 1.46 (m), b 1.27 (m)	32.3	32.3
16	a 1.53 (m), b 1.30 (m)	a 1.52 (m), b 1.31 (m)	36.1	36.1
17	-	-	30.0	30.0
18	1.50 (m)	1.50 (dd, 11.0,6.0)	42.8	42.8
19	a 1.42 (m), b 1.12 (m)	a 1.42 (m), b 1.11 (m)	35.5	35.6
20	-	-	28.2	28.2
21	a 1.44 (m), b 1.24 (m)	a 1.45 (m), b 1.25 (m)	32.8	32.8
22	1.47 (dd, 12.8,3.6)	1.46 (dd, 12.0, 2.0)	39.3	39.3
23	0.93 (d, 7.0)	0.91 (d, 7.0)	11.6	11.6
24	0.94 (s)	0.93 (s)	16.4	16.4
25	0.85 (s)	0.83 (s)	18.2	18.2
26	0.99 (s)	0.98 (s)	18.6	18.6
27	0.95 (s)	0.95 (s)	20.1	20.1
28	0.96 (s)	0.97(s)	31.8	31.8
29	0.92 (s)	0.92 (s)	35.0	35.0
30	1.16 (s)	1.14 (s)	32.1	32.1

δ en ppm; **Exp.** = datos experimental; **Ref.** = datos de la literatura. (multiplicidad en Hz) (sa)= señal ancha, (-) = no es apreciable.

En la fracción hexano-AcOEt 96:4 de la cromatografía del extracto hexánico de la raíz se obtuvo un polvo blanco amorfo, el cual fue sometido a separación por cromatografía en columna empacada con gel de sílice 60 y utilizando como eluyente mezclas de hexano-AcOEt en orden de polaridad creciente. De esta separación cromatográfica se aisló al triterpeno conocido como estigmasterol (**42**). Este compuesto presentó en su espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Figura 5.6) señales simples en 0.69 ppm (CH_3 -18) y otra en 1.01 ppm la cual fue atribuida a un metilo terciario en posición alílica (CH_3 -19); se apreciaron tres señales dobles típicas de metilos secundarios en 0.78, 0.84 y 1.02 ppm; también se observó una señal triple asignada a un metilo primario en 0.82 ppm; así mismo apareció una señal múltiple en 3.51 ppm perteneciente a un protón base de hidroxilo (H-3), de igual manera se observaron tres señales pertenecientes a protones vinílicos en 5.00, 5.14 y en 5.34 ppm (Tabla 5.3). Los datos fueron comparados con la literatura (Mohammed Z. y col., 2007, Ríos María y col., 2006).

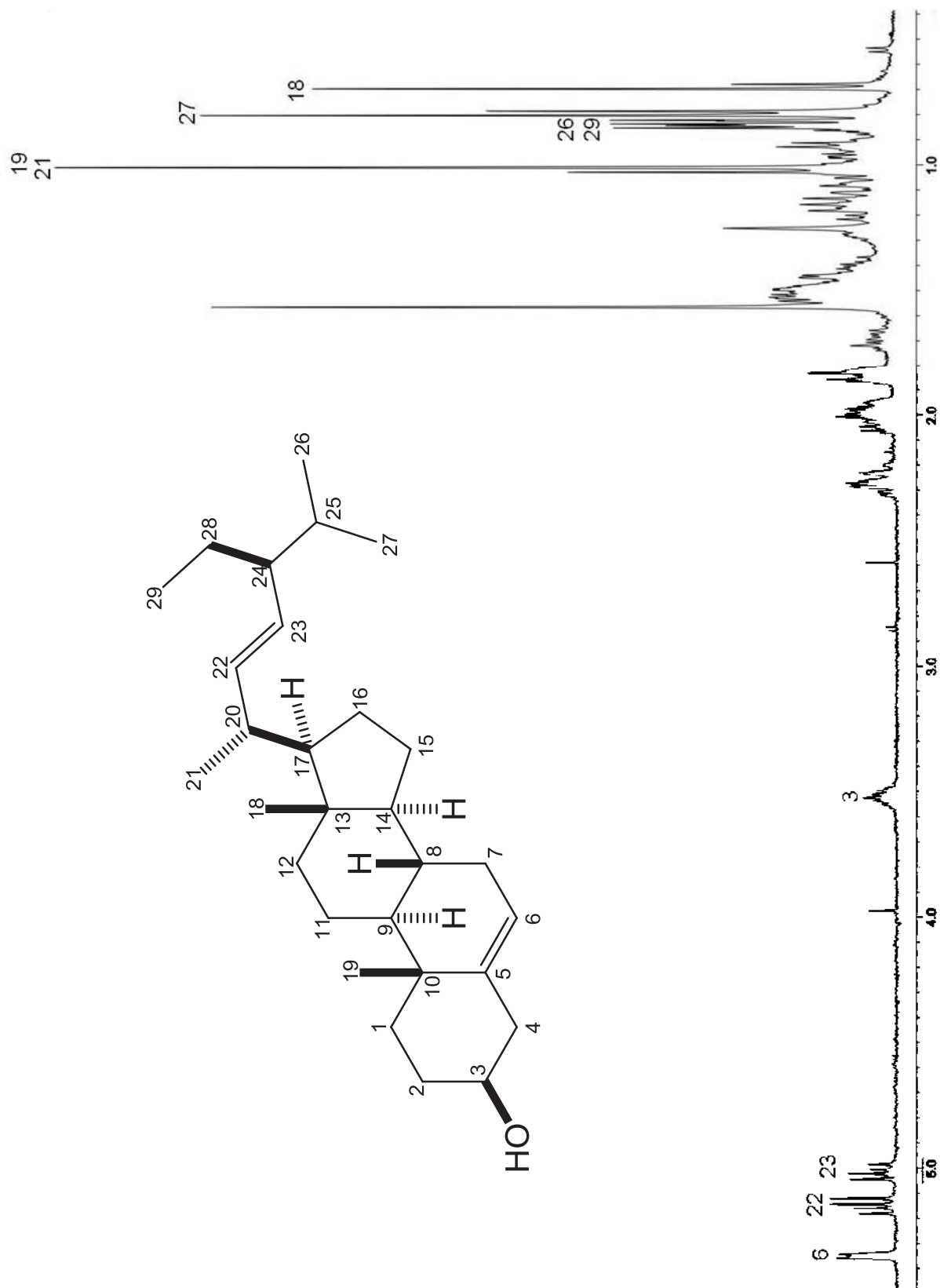


Figura 5.6. Espectro de RMN de ^1H del estigmasterol (42) (400 MHz, CDCl_3).

Tabla 5.3. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de estigmasterol (**42**).

Posición	^1H Exp.	^1H Ref.
1	-	-
2	-	-
3	3.51	3.55 (m)
4	-	-
5	-	-
6	5.34 (da, 4)	5.37 (m)
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	0.69 (s)	0.70 (s)
19	1.01 (s)	1.03 (s)
20	-	0.90 (s)
21	1.02 (d, 8.0)	0.94 (d, 7.0)
22	5.14 (dd, 16.0, 8.0)	5.16 (dd, 15.0, 6.5)
23	5.0 (dd, 12.0, 8.0)	5.03 (dd, 15.0, 9.0)
24	-	-
25	-	-
26	0.84 (d, 7.0)	0.84 (d, 7.0)
27	0.78 (d, 7.0)	0.86 (d, 7.0)
28	-	-
29	0.82 (t, 8.0)	0.82 (t, 7.0)

δ en ppm; **Exp.** = datos experimental; **Ref.** = datos de la literatura (multiplicidad en Hz).

6. CONCLUSIONES.

Este es el primer reporte de estudio químico y biológico realizado en *Verbesina parviflora*.

El estudio químico del extracto hexánico de las raíces de *V. parviflora* condujo al aislamiento y caracterización de friedelina (**40**), 3 β -friedelanol (**41**) y estigmasterol (**42**), los cuales son los componentes mayoritarios en dicho extracto.

Los ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano (actividad bacteriostática y bactericida) demostraron que el extracto hexánico de la raíz de *V. parviflora* fue efectivo únicamente contra la bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis* con una inhibición moderada de 8.8 mm; para las demás cepas no mostró efectos biocidas significativos.

El efecto antimicrobiano observado con el extracto hexánico de la raíz *V. parviflora* puede ser atribuido a la friedelina ya que datos de la literatura han reportado moderada capacidad de inhibición bacteriana (J. B Pretto y col., 2004).

7. Parte Experimental

7.1. Procedimientos generales.

Las separaciones cromatográficas se realizaron mediante cromatografía en columna utilizando columna de vidrios de 58 y 35 cm de largo con un diámetro interno de 1.5 y 1.0 cm respectivamente, como fase estacionaria se utilizó gel de sílice 60 (230-400 mesh). Los puntos de fusión se obtuvieron en un equipo Fisher Scientific y no están corregidos. Los espectros de masas se determinaron en un equipo Varian modelo Saturn 2000 mediante impacto electrónico a 70 Ev. Los espectros de IR se obtuvieron con un equipo Buck Scientific modelo 500 en CHCl_3 . Los espectros de RMN de ^1H a 400 MHz y ^{13}C a 100 MHz, así como espectros bidimensionales HETCOR, fueron obtenidos en un equipo Varian Mercury plus 400, el disolvente utilizado fue cloroformo deuterado (CDCl_3) y como referencia interna tetrametilsilano (TMS).

7.2. Estudios biológicos.

Los estudios de inhibición bacteriana de los extractos se realizaron con 13 cepas bacterianas obtenidas de cepas aisladas del Hospital Civil “Dr. Miguel Silva” de las cuales nueve fueron gram negativas: *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *S. sonnei*, *Shigella sp*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*; y cuatro gram positivas: *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. aureus* y *B. subtilis*, caracterizadas bioquímicamente.

7.3. Preparación de medios de cultivo.

Se utilizó agar Mueller Hinton (MH) de la casa comercial BIOXON en caja de Petri 100 X 55 mm; se adicionaron 25ml de agar MH por placa, una vez vertido el agar se dejó solidificar, se les realizó la prueba de esterilidad incubándolas durante 16 h a 37°C.

7.4. Preparación de las cepas bacterianas.

Cada una de las cepas bacterianas fue resembrada en placas de agar MH y utilizadas entre 16 y 20 h de crecimiento con la finalidad de trabajar con bacterias jóvenes.

7.5. Estandarización del inóculo bacteriano.

De un cultivo bacteriano joven se tomó una colonia aislada y se inoculó en caldo MH, se incubó a 37°C, cada hora se determinó la turbidez a 600 nm en un espectrofotómetro hasta lograr un valor de 0.5, este proceso se repitió para cada una de las trece cepas.

7.6. Preparación de los extractos y de las sustancias control.

El extracto hexánico de raíz se disolvió en etanol al 96 % (1 g/mL), como control positivo se utilizó cefotaxima y como control negativo etanol al 96%. De cada muestra se agregó un volumen de 6µL a las siguientes concentraciones finales: extractos (0.5 mg/mL), cefotaxima (0.125 mg/µL) y etanol 96% (0.8 mg/µL).

7.7. Método de difusión en agar para bacterias (técnica de dilución).

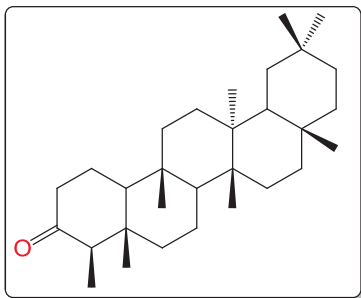
Las bacterias se inocularon en cajas de agar MH con ayuda de un hisopo estéril, después se colocaron discos de papel filtro estéril con las muestras impregnadas en una placa. Se incubaron a 37°C /18 h y se reportó en halo de inhibición. Este ensayo se realizó por triplicado.

7.8. Muestra vegetal.

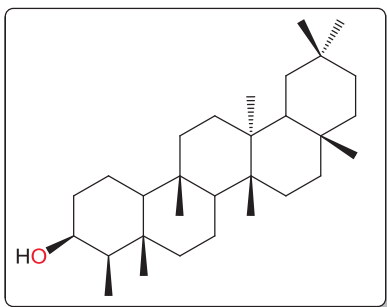
Verbesina parviflora se colectó en el mes de Julio del 2008 en el kilómetro 3.5 de la carretera Tiripetio-Acuitzio del Canje en el Estado de Michoacán. Una muestra se preparó y se envió al Herbario del Instituto de Ecología A.C. en Pátzcuaro, Michoacán para su identificación botánica por parte del Doctor Jerzy Rzedowski.

7.9. Obtención del extracto de raíz de *V. parviflora*.

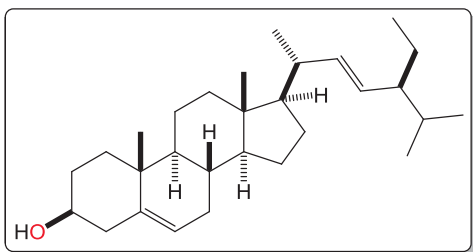
La especie se separó en sus distintas partes (flores, hojas, tallo y raíces), se secaron a la sombra durante 10 días y se obtuvieron los extractos de hexano tanto de la raíz como las otras partes mediante maceración por tres días hasta agotar componentes con cada uno de los disolventes.



Friedelina (40). El extracto hexánico de la raíz (2.2 g) de *V. parviflora* fue sometido a cromatografía en columna utilizando gel de sílice 60 y como eluyentes hexano y mezclas de hexano-AcOEt; tras sucesivas cromatografías se obtuvieron cristales blancos en forma de agujas (15mg); p.f.= 230-232 °C; EMIE 70 eV. m/z (intensidad relativa) 426 $[M]^+$ (14.8), 342 (16.6), 273 (48.7), 231 (65.9), 206 (44.0), 192 (55.3), 163 (55.2), 149 (31.0), 123 (78.1), 109 (76.0), 95 (100.0), 67 (98.7); IR (CHCl_3) 2931, 2868, 1703, 1462, 1389 cm^{-1} ; RMN de ^1H y ^{13}C ver Tabla 5.1 y Figuras 5.2, 5.3.



3β-Friedelanol (41). De la cromatografía del extracto hexánico de la raíz, en la polaridad hexano-AcOEt 97:3 se obtuvo un polvo blanco el cual fue cristalizado con una mezcla de cloruro de metileno y metanol, de este proceso se obtuvieron cristales en forma de prismas cuyo punto de fusión fue de 273–275 °C; EMIE 70 eV. m/z (intensidad relativa) 428 $[M]^+$ (3.6), 414 (22.0), 395 (24.2), 341 (1.5), 275 (18.2), 231 (50.1), 205 (34.1), 191 (48.0), 165 (70.2), 147 (51.4), 121 (63.5), 109 (88.1), 95 (100), 67 (86.3), IR (CHCl_3), 3626, 2936, 2868, 1461, 1387 cm^{-1} , RMN de ^1H y ^{13}C ver Tabla 5.2 y Figuras 5.4, 5.5.



Estigmasterol (42). En la fracción hexano-AcOEt 96:4 de la cromatografía del extracto hexánico de la raíz se obtuvo un polvo blanco amorfo (120 mg), tras una recromatografía en columna usando como eluyente una mezcla hexano-AcOEt 24:1 se aisló al estigmasterol, RMN de ^1H ver Tabla 5.3 y Figura 5.6.

8. Bibliografía.

Amaro L., Juan M., Ramírez I.; Delgado Méndez P., Zacarias J. D. "Eudesmane Derivatives from *Verbesinturbacensis*". *J. Braz. Chem. Soc.*, **2002**, 13:352-357.

Ávalos García A., Pérez-Urrea Carril E. "Metabolitos secundarios de plantas". *Reduca Biología. Serie Fisiología Vegetal*, **2009**, 3:119-145.

Bracho Pérez J. C., Rodríguez Best C., Llames F. "Triterpenos pentacíclico en propolio". *Rev. Soc. Quím. Perú*, **2009**, 75:439 -452.

Bremer K. "Tribe Eupatorieae. En: *Asteraceae: Cladistics and classification*". Timber Press, Portland, Oregon, **1994**, 23: 625 - 680.

Bruno Colmenares J., Amaro Luis J. M., Ramírez I., Delgado Méndez P., Díaz Delgado G. "Absolute Configuration of two Eudesmane Derivatives from *Verbesina turbacensis* H.B.K.". *J. Chem. Crystallogr.*, **2010**, 40:110-115.

Carrillo Reyes P, Rzedowski J., Calderón Rzedowski G. "Cuatro nuevas especies de *Verbesina* (compositae Heliantheae) del centro de México". *Acta Botánica Mexicana*, **2010**, 93:127-143.

Castilla V., Ramírez J., Coto C. E. "Prospectiva del uso de esteroides de plantas como antivirales". *Revista Química Viva*, **2009**, 8:8-24.

Ciangherotti C., Buitrago D., Morales A. "Estudio de los componentes químicos de las hojas y tallos de *Cestrum buxifolium* Kunth". *Rev. Fac. farm.*, **2004**, 46:31 - 34

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards of Antimicrobial Dist Susceptibility Tests; Approved Standard*. Tenth Edition CLSI documento M02-A10 (15BN 1-56238-688-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road. Surte 1400, Wayne.

Pennsylvania, **2009**.

Colmenares Bruno J, Amaro Luis J. M., Ramírez I., Delgado Méndez P., Díaz Delgado G. "Absolute configuration on of two Eudesmane derivatives from *Verbesina turbacensis* H.B. K". *J. Chem. Crystallogr.*, **2010**, 40: 110-115.

Cortez Gallardo V., Macedo-Cejas J. P., Hernández-Arroyo M., Arteaga Aureoles G., Espinosa Galván D., Rodríguez Landa J. F."Farmacognosia breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas" *Rev. Biomed.*, **2004**, 15:123-136.

Dreser A., Writz V. J, Corbett K. K, Echániz G. "Uso de antibióticos en México revisión de problemas y políticas". *Salud Pública de México*, **2008**, 50:480-487.

Dewick M. Paul. "*Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*". 3er Edición. Ed. Wiley, United Kingdom, **2009**.

Díaz Jiménez M. C., Suárez Mora M. J. "Preparaciones farmacéuticas elaboradas con base en productos naturales regulación sanitaria". Trabajo de grado, Pontificia Universidad Javeriana. Santafé Bogotá D.C.- Colombia **2000**.

Díaz B., Compagnone R. S, Suárez Alirica I. "Secondary metabolites from *Podocalyx loranthoides*". *Rev. Fac. Farm.*, **2007**, 70:28-33.

Drago Serrano M. E., López López M., Sainz Espuñes T. R. "Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal". *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, **2006**, 37:58-68.

Essady D., Najid A., Simon A., Denizot Y., Chulia A. J., Delage C. *Mediators of Inflammation*, **1994**, 3:181-184.

García L. C., Martínez R. A., Ortega S. J. L., Castro B. F. "Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales". *Rev. Química Viva*, **2010**, 2:86-96.

Giseke P. D. *Praelectiones in ordines naturals plantarum*. Humburg, Germany, **1792**.

Greuter W. McNeill J., Barrie F. R., Burdet H.M., Demoulin V., Filgueiras T. S., Nicolson D. H., Silva P. C., Skog J. E., Trehane P. Turland N. J., Hawksworth D. L. International Code of Botanical Nomenclature (St. Louis Code), adopted by the Sixteenth International Botanical Congress, St. Louis, Missouri, July-August 1999. Regnum Vegetabile 138. Koeltz Scientific Books, Königstein, **2000**.

Harker M., Jiménez Reyes N. "*Verbesina barrancae* (Compositae, Heliantheae), a new species from Jalisco, México". *Brittonia*, **2002**, 54:181-189.

Heinrich M., Robles M., West Jan, Ortiz de Montellano Bernardo, Rodriguez E. "Etnnopharmacology of Mexican Asteraceae". *Rev. Pharmacol. Toxicol*, **1998**, 38: 539 -565.

Herz W., Kumar N., Blount J. F. "Aromatic and Other constituents of Four *Verbesina* species: structure and stereochemistry of verbesindiol". *Phytochemistry*, **1981**, 20: 247-250.

Jain S. C., Kamal R., Rathore. A. K. "A note on phytosterols in some species". *Indian Drugs* **1980**, 17:145.

Juliana B. Pretto, Valdir Cechinel-Filho, Vania F. Noldin, Mara R. K. Sartori,

Daniela E. B. Isaías, Alexandre Bella Cruz. "Actimicrobial activity of fraction and Compounds from *Calophyllum brasiliense*". *Z. Naturforsch*, **2004**, 59:657-662.

Kalemba D., Kunicka A. "Antibacterial and antifungal properties of assential oils". *Cum. Med. Chem.*, **2003**, 10:813-829.

Katinas L., Gutiérrez D. G., Grossi M. A., Crisci J. V. "Panorama de la Familia Asteraceae (Compositae) en la República Argentina". *Bol. Soc. Argent. Bot.*, **2007**, 42:113-129.

Khondaker M. R., Kamrun N., Mohammad Gias U. K., Choudhury M. H. "Phytochemical and biological studies on *Nephelium longan*". *Bol. Latinonoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas*, **2007**, 6: 68-72.

Krishna C, Singh P., Singhi C. L. "Chemical constituents of *Verbesina encelioides* and *Holmskioldia sanguine*". *Journal of the Indian Chemical Society*, **1983**, 60:905-906.

Kundu. J. k. "HIV-Inhibitory diterpenoid from anisometes indica". *Fitoterapia*, **2000**, 71: 574-576.

Li-Kank Ho, Chiann-Rong Chang, Yuan-Shiun Chang. "Chemical Components from *Triumfetta bartramia*". *Journal of the Chemical Society*, **1995**, 42:93-95.

Mendoza Patino N., Rodríguez J. L., Figueroa Hernández J. L. "Actualidades *Farmacológicas, Herbolaria*", **2002**.

Mohammed Z. R., Shirin J. S., Chowdhury F. F., Faisol F., Mohammad S. R., Mohammad S. I, Mohammad A. Rashid. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **2007**, 15:140-145.

Montes-Belmont R. "Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos". *Revista Mexicana de Microbiología*

2009, 29:72-82.

Newman J. David; Cragg M. Gordon. *Journal Natural Products*, **2007**, 70:461-477.

Ramesh N, Viswanathan M. B, Saraswathy A. "Phytochemical and antimicrobial studies of *Bridelia crenukta*". *Pharmaceutical biology*, **2001**, 39:460-464.

Ríos J.L, Recio MC., "Medicinal plants and antimicrobial activity". *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**, 100: 80 - 84.

Robinson H. "Studies in the Heliantheae (Asteraceae).XXIII. New Andeanspecies of *Verbesina* and *Viguiera*". *Phytologia*, **1980**, 45: 456 -459.

Robles J., Torre Negra R. I., Gray A., Piñeros C., Ortiz L., Sierra M. "Triterpenos aislados de la corteza *Bursera graveolens* (Burseraceae)". *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **2005**, 15:283-286.

Salazar, G. C. M, Silva, G. D. F., Duarte, L. P, Vieira-Filho, S. A, Lula, I. S. "Two epimeric friedelane triterpenes isolated from *Maytenus truncata* Reiss ¹H y ¹³C Chemical shift assignments". *Magn. Reson. Chem*, **2000**, 38:977-980.

Santillá Ramírez M. A., López Villafranco M. E., Aguilar Rodríguez S., Aguilar Contreras A. "Estudio etnobotánico, arquitectura foliar y anatomía vegetal de *Agastache mexicana* ssp. *Xolocotziana*". *Revista Mexicana de Biodiversidad*, **2008**, 79:513-524.

Sepúlveda Jiménez G. "La participación de los metabolitos en defensa de las plantas". *Revista Mexicana de Fitología*, **2004**, 21:355-363.

Waksmundzka H., Sherma J., Kowalska T. "*Thin Layer Chromatopgraphy in Phytochemistry*". Ed Taylor &Francis Group,UnitedStates of America, **2008**.

Xu Wen-Hui, Jacob Melissa R, Agarwal Ameeta K, Clark Alice M, Liang Zong-Suo, Li Xing-Cong. "Verbesinosides A-F, 15,27-Cyclooleanane Saponins from the American Native Plant *Verbesina virginica*". *J. Nat. Prod.*, **2009**, 72: 1022 - 1027.

Xu Wen-Hui, Liang Quian, Liang Zong-Suo, Li Xing-Cong, "Two New Eudesmane Derivatives from *Verbesina virginica*". *Chinese Chemical Letter*, **2010**, 21: 693-695.

Zhu Yi-Zhun, K-H Tan Benny, Bay Boon-Huat, Liu Chang-Hong. "Natural Products Essential Resources For Human Survival". *Ed World Scientific Publishing, United States of America*, **2007**.

Zuluaga R. G. "Programa de recuperación de plantas medicinales en las comunidades". *Director del Grupo de Estudio en Sistemas Tradicionales de salud*, **1994**, 1-16.