

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud

Zoapatle
(*Montanoa tomentosa*):
Estudio Sobre la Metodología de Extracción
Fitoquímica
y
Ensayo Farmacológico

sustentante
Luz María Damián Badillo

Tesis para obtener el Grado de
Maestro en Biología Experimental

Dirección de Tesis:
Dr. Raúl Enríquez Habib

Asesores:
Dr. Rubén Román Ramos
Dra. Laura Pérez Flores
M. en C. Héctor Ponce-Monter

julio de 1991

A mi madre

A la memoria de mi padre

A Güe, Jorge y mis hermanos

6-II-92 / R. P.

CONTENIDO

I.-	PRÓLOGO	5
II.-	INTRODUCCIÓN	7
III.-	OBJETIVOS	12
IV.-	HIPÓTESIS	12
V.-	METODOLOGÍA	13
	1) Preparación de Material Vegetal	
	a) Clasificación taxonómica	
	b) Tamizado	
	2) Métodos de Extracción	
	a) Ultrasonido	
	b) Soxhlet	
	3) Métodos Cromatográficos	
	a) Cromatografía en Capa Fina	
	b) Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia	
	c) Cromatografía en Fase de Vapor	
	e) Cuantificación de ácido Grandiflorénico, Kaurenoico y Monoginoico en diferentes periodos estacionales (antes, durante y posterior a la floración)	
	4) Preparaciones Biológicas	
	a) Suspensión de Extractos Orgánicos	
	b) Comparación de componentes del extracto antes y despues de la suspensión acuosa	
	5) Pruebas <i>in vitro</i>	
	6) Métodos Espectroscópicos	
	a) Espectrometría de Masas	
	b) Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	
VI.-	RESULTADOS	18
VII.-	DISCUSIÓN	29
	1) Tamizado	
	2) Métodos de extracción	
	a) Seguimiento de la extracción por CLAE y CCF	
	b) Cuantificación de ácido Grandiflorénico, Kaurenoico y Monoginoico en diferentes periodos estacionales	
	3) Preparaciones biológicas	
	a) Identificación de ácido Grandiflorénico y Kauradienoico en el extracto acuoso	
	b) Suspensiones acuosas de extractos orgánicos	
	4) Pruebas farmacológicas <i>in vitro</i>	
VIII.-	CONCLUSIONES	34
IX.-	BIBLIOGRAFÍA	35

La maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, cuenta con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por medio del convenio de Fortalecimiento al Posgrado Nacional número ocho.

Este trabajo se realizó principalmente en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La alumna estuvo apoyada por el :

CONSEJO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACyT)

Con una beca en el período 09-88 a 06-90

con número de registro 56522.

PROLOGO

Entre las plantas usadas como abortivas entre la población mexicana, se encuentra el zoapatle (*Montanoa tomentosa*) que en la herbolaria medicinal y en estudios científicos se le atribuye propiedades uteroevacuantes.

El estudio fitoquímico de esta planta ha permitido la elucidación estructural de más de 40 compuestos, de los cuales, por lo menos seis tienen actividad contráctil en el útero, sin embargo, estos resultados no proporcionan hasta ahora una explicación clara de sus efectos conocidos popularmente.

En el análisis de los trabajos químicos y farmacológicos realizados hasta el momento, se detecta la carencia de una metodología común enfocada a la resolución del problema de asociar estructuras químicas con efectos farmacológicos. Esto originó el interés por realizar la presente investigación que tiene el propósito de conocer la dependencia de los variados resultados farmacológicos descritos hasta ahora con metodologías de extracción empleadas comúnmente por los fitoquímicos.

Se decidió abordar este problema empleando como indicadores de la actividad a tres diterpenos (i. e. ácido grandiflorénico, kaurenico y monoginoico) que han sido descritos como biológicamente activos y cuya conducta cromatográfica permite un seguimiento claro del proceso de la extracción.

Paralelamente, el uso de metodologías analíticas fue mostrando su utilidad para este propósito. Así, el empleo de la espectrometría de masas y de la resonancia magnética nuclear de pulsos fueron los métodos espectroscópicos que mejores resultados proporcionaron para la confirmación de las estructuras químicas aisladas por cromatografía líquida de alta eficiencia.

Entre las contribuciones más importantes al conocimiento del zoapatle podría mencionarse el dato de la composición del extracto metanólico por su abundante concentración de monosacáridos. Igualmente importante se considera el haber ratificado la presencia de ácido grandiflorénico en las infusiones acuosas de la planta resolviendo un problema de conflicto entre diferentes reportes científicos.

Finalmente, cabe mencionar que los resultados de este trabajo muestran la necesidad de incorporar metodologías analíticas modernas al proceso de extracción fitoquímica de plantas medicinales como condición para el logro de seguridad y reproducibilidad en los ensayos biológicos.

ABREVIATURAS.

AcOt: Acetato de etilo

B. de P.: Bencina o éter de Petróleo

CCF: Cromatografía en Capa Fina

CFV: Cromatografía en Fase Vapor

CH₂Cl₂: Diclorometano

CH₃CN: Acetonitrilo

CLAE: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

EM: Espectrometría de Masas

GA: Ácido Grandiflorénico

Glu: Glucosa

IMSSM: Herbario de Plantas Medicinales del Instituto Mexicano del Seguro Social

KA: Ácido Kaurenico

MeOH: Metanol

MO: Ácido Monoginoico

OT: Oxitocina

Ram: Ramnosa

Rib: Ribosa

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

Sac: Sacarosa

INTRODUCCIÓN.

El estudio científico de las plantas medicinales en México, se inició a finales del siglo pasado en el entonces Instituto Médico Nacional. Con una concepción que hoy pudiéramos considerar interdisciplinaria y adelantándose a su tiempo, estos investigadores abordaron los aspectos etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos e incluso clínicos. Desde entonces uno de los objetivos del estudio de las plantas medicinales ha sido su aplicación en los problemas de salud pública sin que este haya sido logrado por múltiples razones.

Entre las plantas estudiadas en esta institución se encuentra el zoapatle (Altamirano, 1895), empleada desde antes de la llegada de los españoles en decocciones acuosas para facilitar las labores del parto y probablemente evitar la concepción, por lo que se le atribuyen propiedades emenagogas y úteroevacuantes (Gallegos, 1983).

Su nombre proviene de la palabra náhuatl "cihuapatli" ("cihuatl" - mujer y "patli" - medicina). Se conoce comunmente también como "achina", "guapiojo", "hierba de la parida", "hierba de la mujer" y "too" (Béjar, 1985).

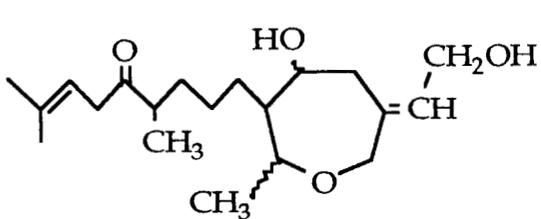
Desde el punto de vista taxonómico es una planta compuesta perteneciente al género *Montanoa* que incluye 25 especies y 6 subespecies, 21 de las cuales se pueden encontrar en la República Mexicana (Estrada, 1983). Es un arbusto de unos tres metros de altura, muy ramificado, con hojas opuestas y sus flores varían en tonos que van del blanco al amarillo, dependiendo de la especie. Antigüamente se le clasificaba como *Eriocoma*, *Montagnea* y *Montagnacea*, hasta que en 1981 Font realizó una clasificación completa de este género en la cual correlacionó la distribución geográfica de la planta con estudios citológicos de cariotipo y de número cromosómico. Aparentemente todas las especies y subespecies del género *Montanoa* han sido usadas bajo el nombre de zoapatle (Estrada, 1983).

Altamirano (1895) y Cota (1897) realizaron el primer reporte de la extracción y del ensayo biológico del zoapatle. En estudios posteriores realizados por De Lille (1933), Derbez (1945), Senties y Amayo (1964) se trató de corroborar los efectos biológicos atribuidos a esta planta sin lograr su propósito ya que se presentaron problemas en la extracción y dosificación de la misma; encontrando que los efectos de los extractos acuosos y orgánicos del zoapatle no presentaron un efecto claro y constante.

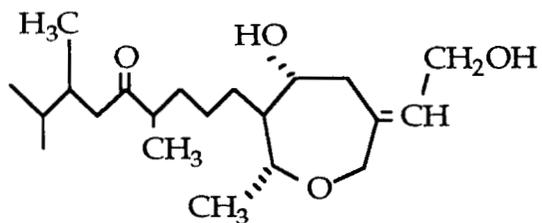
Años más tarde, se continuaron los trabajos con el zoapatle, así Caballero y Walls (1970) reportaron el aislamiento de sustancias puras mediante la extracción de la raíz de zoapatle y apuntaron que los compuestos aislados resultaron inactivos cuando se ensayaron sobre el útero aislado de rata. Calderón y colaboradores (1977) realizaron registros miográficos de los efectos del extracto de zoapatle sobre la actividad uterina de conejas; estos investigadores observaron que el extracto presentó efectos oxitócicos.

En los trabajos anteriores no se indica el estado hormonal de la hembra utilizada ni la porción del cuerno uterino donde se realizó el bioensayo.

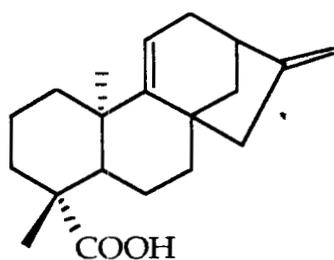
A este respecto, Landgren (1979), Gallegos (1985) y Béjar (1985) empiezan a considerar el estado hormonal y la especie animal para la realización de bioensayos con extractos acuosos y con compuestos puros aislados de esta planta. La preparación de los extractos acuosos



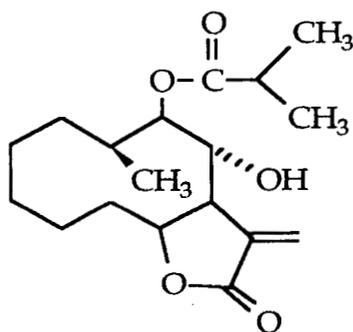
(I) zoapatanol



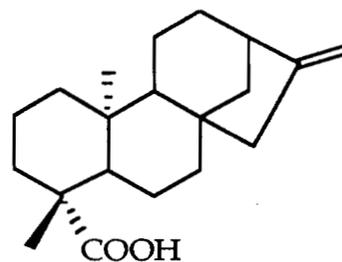
(II) montanol



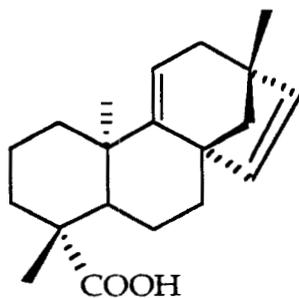
(III) ácido grandiflorénico



(IV) leucantanólido



(V) ácido kaurenoico



(VI) ácido monoginoico

empleados en los bioensayos mencionados fue realizada de la manera tradicional en que se prepara la infusión y los compuestos puros fueron ensayados disueltos en un solvente orgánico.

Se han aislado más de 40 compuestos químicos de plantas pertenecientes al género *Montanoa* entre los cuales se encuentran abundantes diterpenos (Chen *et. al.*, 1982, Kanioja *et. al.*, 1982; Kapadi *et. al.*, 1964; Kocienski, *et. al.*, 1989; Lewis, 1979; Kane *et. al.*, 1981; Lou-Cotter, 1981; Marcelle *et. al.*, 1985; Nicolaou *et. al.*, 1980; Oshima *et. al.*, 1986c; Quijano *et. al.*, 1985 a y b; Seaman *et. al.*, 1984a), terpenos (Fujita *et. al.*, 1972), sesquiterpenos (Geissman *et. al.*, 1971, Seaman *et. al.*, 1985b), germacranólidos (Bohlmann *et. al.*, 1983, 1984; Castro *et. al.*, 1984; Herz *et. al.*, 1980; Quijano *et. al.*, 1979, 1984a, 1986; Seaman *et. al.*, 1984), guayanólidos (Greene *et. al.*, 1989; Quijano *et. al.*, 1984b; Seaman *et. al.*, 1984c, 1986), eudesmanólidos (Quijano *et. al.*, 1985c; Seaman *et. al.*, 1985a), eliangólidos (Quijano *et. al.*, 1982) y flavonoides (Oshima *et. al.*, 1986b), pocos de ellos han pasado por un tamiz biológico. Así, Mateos, Levine y colaboradores (1979) aislaron independientemente zoapatanol (I) y montanol (II) de hojas de zoapatle. Posteriormente se ensayó la actividad biológica de estos compuestos en mujeres embarazadas con producto fetal muerto, encontrando que en algunos casos la administración oral de estos compuestos producía la expulsión de los productos. Al principio de la década de los 80's fue reconocida la actividad uterotónica (Lozoya y Enríquez, 1983; Gallegos, 1983; Béjar *et. al.*, 1984) de un compuesto aislado de *Montanoa tomentosa* conocido como ácido grandiflorénico o Kauradienoico (III) (Piozzi *et. al.*, 1972), El bioensayo con esta sustancia se realizó sobre útero de cobayo en condiciones *in vivo* e *in vitro*. Otro compuesto aislado del zoapatle es el denominado leucantanólido (IV) (Oshima, Y. *et. al.*, 1986a) el cual ha sido ensayado sobre un modelo experimental animal, administrando por vía intraperitoneal el compuesto a cobayas embarazadas; observándose que en algunos casos hay expulsión del producto y en otros, reabsorción del mismo.

Los resultados no han sido muy alentadores puesto que la mayoría no han sido reproducibles; algunas veces el efecto no es consistente e incluso se ha llegado a observar relajación uterina (Hahn, 1983; Perrusquía, 1985; Ponce-Monter *et. al.*, 1983, 1985, 1988; Enríquez *et. al.*, 1984; Moriwaki *et. al.*, 1986; Pedrón *et. al.*, 1985; Lu *et. al.*, 1987). Este hecho puede deberse a las diferencias que existen entre los estudios *in vitro* e *in vivo*. Mientras en los primeros se tiene la ventaja de contar con el animal íntegro, se tiene la desventaja de que el animal se encuentra anestesiado y se requieren además altas dosis de muestra; por otra parte, los estudios *in vitro* presentan una mayor facilidad en cuanto al manejo y al requerimiento de pequeñas dosis pero su inconveniente consiste en que el efecto no tiene correlación directa con lo que se observa en un animal íntegro.

Debido a la controversia que existe entre la asociación de actividad farmacológica con las estructuras químicas encontradas hasta ahora se puede suponer que son varios factores los que influyen en la manifestación o ausencia de efectos farmacológicos; entre éstos se pueden mencionar: a) especie de planta adecuada, b) estado de desarrollo de la misma c) especie y estado hormonal del sujeto en estudio, d) forma y tiempo de extracción del material vegetal, e) vía de administración, f) dosis y g) suspensión de la muestra en un vehículo adecuado (Malone *et. al.*, 1989; Ramírez, 1979)

Al estudiar las plantas medicinales, la correlación de actividad biológica con la presencia de estructuras químicas constituye el problema central y de este conocimiento, depende la

comprensión de los efectos observados experimentalmente.

En la evaluación farmacológica de una planta medicinal se pueden mencionar los siguientes pasos que deben seguirse a manera de metodología general:

- a) Conocer la procedencia del material vegetal (colecta).
- b) Clasificar e identificar a la planta.
- c) Establecer la forma de extracción.
- d) Ensayar farmacológicamente los extractos para la evaluación de actividad biológica.
- e) Seleccionar una metodología adecuada en las pruebas tanto *in vivo* como *in vitro* tomando en cuenta la especie que proporcione una respuesta apropiada, control del estado hormonal, corroboración de la respuesta al tejido previa a la incubación con los extractos y/o compuestos y reproducibilidad en los resultados.

El primer y segundo puntos dan la seguridad de trabajar con la especie adecuada, puesto que no todas las especies manifiestan el efecto farmacológico debido a que pueden variar tanto la concentración de los compuestos, como la diversidad de los componentes en un mismo género (Estrada, 1983). Es importante señalar que la época del año, las condiciones climáticas y el estado de desarrollo de la planta cuando se realiza la colecta, pueden ser otro factor importante en la manifestación del efecto.

El tercer punto permite la obtención de componentes tanto activos como no activos, debido a que el método de extracción, el tiempo de contacto entre la planta y el disolvente así como la polaridad del mismo son parámetros que deben ser considerados cada vez que se realice una extracción (Houser, 1975).

Las extracciones acuosas e hidroalcohólicas son usuales por su semejanza con la forma popular de preparación. Para la realización de ensayos farmacológicos es conveniente utilizar una suspensión de los extractos y/o componentes en agua o en medios que emplean agentes tensoactivos. Farnsworth (1988) propone que en las decocciones acuosas, la presencia de ciertas sustancias naturales, no identificadas, pero con propiedades anfotéricas, imparten carácter tensoactivo al medio y permiten la solubilidad de compuestos hidrofóbicos que en condiciones normales no serían solubles en agua. Este hecho explicaría la presencia de compuestos no polares en las decocciones.

La extracción depende pues, de la solubilidad de los compuestos en el disolvente o de la presencia de otros, que permitan o faciliten la suspensión de estos componentes, los cuales, debido a su polaridad, no serían normalmente solubles. Como consecuencia, en una decocción no sólo estarán presentes los compuestos solubles en agua, sino que pueden existir compuestos de diferentes polaridades.

Una vez realizada la extracción en los distintos disolventes orgánicos, se enfrenta uno a un nuevo problema: la necesidad de efectuar una suspensión del residuo en un vehículo adecuado para realizar las pruebas farmacológicas. Esta suspensión no se puede realizar con disolventes orgánicos puesto que normalmente resultan tóxicos al tejido o al animal íntegro. Lo anterior implica la necesidad de encontrar una metodología para obtener suspensiones

acuosas ya que esto evitaría problemas de toxicidad del vehículo.

Entre los vehículos más usuales están la goma de acacia, carboximetilcelulosa, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, glicerina, polipropilenglicol (genéricamente "Tween"), propilenglicol y polivinilpirrolidona para compuestos polares; goma de Tragacanto y "Emulfor" para compuestos de baja polaridad. La mayoría resultan tóxicos en ciertas concentraciones y se ha observado que la presencia de éstos en sistemas vivos llega a aumentar o disminuir la actividad deseada; incluso la solubilidad de los compuestos es parcial.

Finalmente, para el estudio de plantas medicinales es necesario contar con un protocolo para la realización de pruebas farmacológicas tomando en cuenta la especie adecuada, el estado hormonal del organismo, edad, peso, dieta, sacrificio adecuado (para pruebas *in vitro*), dosis y vía de administración entre otras y considerar el efecto del vehículo o agente suspensor de las sustancias en prueba (Farnsworth, 1988).

En las pruebas *in vitro*, antes y después del ensayo del extracto o compuesto, debe ser requisito indispensable corroborar la respuesta del tejido (Ponce-Monter, 1990). De esto puede depender la certidumbre en la naturaleza de la respuesta biológica, pues garantiza que el tejido responde a estímulos análogos a los efectos esperados con los extractos y/o compuestos sujetos a ensayo.

Como se puede observar, el estudio de plantas a las que se les atribuyen propiedades farmacológicas como es el zoapatle, al cual se le atribuyen empíricamente propiedades útero-evacuantes, requiere de un enfoque general que incluya todos los aspectos mencionados anteriormente para poder concluir y discutir sobre su efecto real.

Del zoapatle se conocen la mayoría de sus metabolitos secundarios tanto activos como no activos, y existe un número considerable de reportes farmacológicos en los que se han empleado diferentes especies animales, extractos, dosis y vías de administración. Sin embargo no se ha podido asociar la presencia de ciertas estructuras químicas a un efecto farmacológico específico. Por ello resulta necesario continuar el estudio de esta planta empleando nuevos enfoques con el propósito de poder correlacionar la presencia de estructuras químicas con la actividad farmacológica observada en las infusiones de zoapatle.

Es necesario subrayar que el zoapatle aún significa un reto científico en cuanto a la comprensión de su actividad farmacológica, así como el hecho de que aún no se cuenta con una correlación clara de los potentes efectos farmacológicos de la infusión en relación con las estructuras químicas presentes en la planta y que han sido aisladas hasta ahora.

104429

OBJETIVOS.

- 1.- Realizar una evaluación de la extracción de metabolitos activos del zoapatle empleando dos métodos de extracción v. gr. ultrasonido y soxhlet.
- 2.- Aplicar la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) como metodología para el seguimiento de la extracción fitoquímica.
- 3.- Valorar una metodología de cuantificación de metabolitos secundarios con actividad biológica empleando la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia.
- 4.- Utilizar de manera conjunta modelos de trabajo químico-analíticos y biológicos en la investigación de zoapatle para establecer criterios que conduzcan a la sistematización en el estudio científico de las plantas medicinales.
- 5.- Proponer alternativas en la metodología de evaluación farmacológica de extractos de plantas buscando reducir o eliminar la presencia de efectos adicionales ocasionados por los agentes de suspensión.

HIPÓTESIS.

- 1.- Es posible contribuir al desarrollo de técnicas de estudio sistemático de plantas medicinales mediante la aplicación conjunta de criterios químico-analíticos y biológicos en la investigación del zoapatle.
- 2.- La utilización de técnicas microanalíticas como la cromatografía líquida de alta eficiencia, la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear pueden contribuir sensiblemente al seguimiento de los procesos de extracción y separación para caracterizar adecuadamente la naturaleza de los extractos que son evaluados biológicamente.

METAS.

- 1.- Extraer los componentes de la flor de *Montanoa tomentosa* por dos métodos: ultrasonido y soxhlet, empleando diferentes tiempos de contacto y disolventes de diferentes polaridades (bencina de petróleo, diclorometano-metanol y metanol).
- 2.- Observar la dinámica de la extracción en función de la cantidad del material extraído y el análisis cualitativo de sus componentes por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).
- 3.- Preparar suspensiones acuosas de los extractos obtenidos para la realización de pruebas *in vitro* y para análisis cromatográfico.
- 4.- Valorar biológicamente los extractos obtenidos con disolventes de distintas polaridades y por soxhlet y maceración en ultrasonido en úteros de cobayo *in vitro*.

METODOLOGÍA.

1.- PREPARACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ZOAPATLE.

a) CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

El material vegetal empleado en el presente estudio fue obtenido de la colecta de *Montanoa tomentosa* ssp. *tomentosa* en los alrededores del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México realizada en el mes de septiembre de 1989, depositado un ejemplar de referencia en el herbario IMSSM y en el herbario de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Las flores (1 Kg), las hojas (4 Kg) y el tallo (5 Kg) del vegetal fueron inmediatamente secados a la sombra a temperatura ambiente durante 20 días, molidos hasta un polvo fino y mantenidos en una bolsa de plástico por separado, protegidos de la luz directa hasta el momento de su uso.

La extracción se efectuó con tres disolventes de diferente polaridad para poder efectuar una extracción profunda abarcando todo el rango de polaridades. Los disolventes empleados en este orden de menor a mayor polaridad fueron: bencina de petróleo (éter de petróleo), diclorometano-metanol (CH_2Cl_2 /MeOH, 95:5) y metanol. Los métodos empleados para tal efecto fueron el ultrasonido y el soxhlet; el primero se eligió ya que representa un nuevo método de extracción y el segundo por su uso generalizado.

b) TAMIZADO DE LA PLANTA.

Para conocer el rango de partícula así como su distribución, se tamizaron 40 g de la flor de zoapatle en un juego de mallas, con vibración manual aplicada durante 10 minutos, colectando y pesando el material vegetal retenido en cada una de ellas.

2.- MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL (FLOR).

a) EXTRACCIÓN CON ULTRASONIDO:

Los extractos de la planta se obtuvieron a partir de 100 g de la flor de zoapatle que fueron depositados en un matraz erlenmeyer y se adicionó el disolvente hasta cubrir totalmente; la mezcla se llevó a un aparato de ultrasonido por un lapso de 30 minutos manteniendo la temperatura ambiente con hielo y evitando la evaporación extrema con un tapón de corcho. Se realizaron 10 extracciones consecutivas con cada disolvente. En cada cambio de polaridad se eliminó el residuo del disolvente anterior por evaporación al alto vacío.

b) EXTRACCIÓN CON SOXHLET:

Del mismo lote, se pesaron 10 g de la flor y se colocaron en un cartucho de 4 cm de diámetro por 12 cm de largo. El cartucho fue depositado en un soxhlet (Fig. 1). Una vez montado el aparato de soxhlet, se mantuvo a una temperatura de 40°C. En todos los casos se retiró el total de los extractos a las 24, 48 y 72 h. A las 72 h se hizo el cambio de disolvente. La extracción se llevó a cabo en el mismo orden de polaridades que en el caso anterior; para cada extracción se emplearon 500 ml de disolvente.

Inmediatamente después de cada extracción por ambos métodos, se filtró a través de un embudo Buchner con papel filtro Whatman #11 y el filtrado se evaporó en un rotavapor al vacío a una temperatura de 30°C. El residuo se resuspendió con acetona y/o metanol para colocarlo posteriormente en un matraz erlenmeyer de 25 ml previamente pesado; se eliminó el exceso

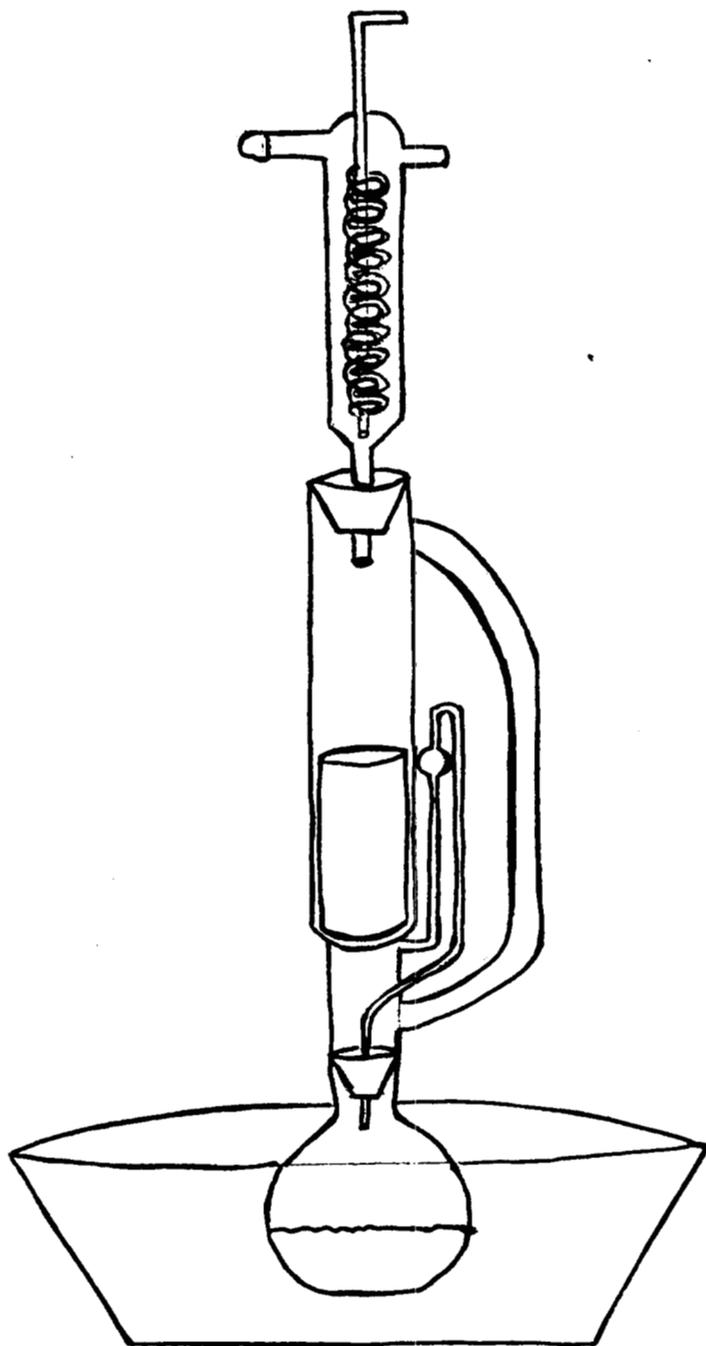


Figura 1. Extracción de material vegetal por soxhlet.

de disolvente por evaporación al alto vacío para poder pesar la cantidad de material extraído en cada ocasión y apreciar diferencias.

3.- CROMATOGRAFÍA.

a) CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.

Aproximadamente 10 μ g de todos los extractos se cromatografiaron en placas de 3 x 5 cm de sílica gel. La distancia entre muestra y muestra fue de 0.5 cm. Las placas se eluyeron con una fase móvil de hexano y acetato de etilo (AcOEt) 80:20 y se revelaron con sulfato cérico (Abbott, 1982).

b) CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (CLAE).

La separación cromatográfica se llevó a cabo en un cromatógrafo Varian 5000 con una columna Micropack MCH-10 de 30 cm x 4 mm, la determinación se hizo por medio de un detector de ultravioleta a una longitud de onda de 240 nm, un flujo constante de 1 ml por minuto en un gradiente de acetonitrilo (CH₃CN)/agua, el cual varió dependiendo del extracto. Cada inyección fue de 100 μ g del extracto previamente filtrado. Para protección de la columna, se colocó una precolumna para fase inversa (Johnson, 1978; Goewie, 1984; Kaliszan, 1984; McCown, 1986).

EXTRACTOS CON BENCINA DE PETRÓLEO (BENCÉNICOS).

La resolución de estos extractos se obtuvo por medio del siguiente gradiente de acetonitrilo/agua:

$$t_0 = t_6 \text{ CH}_3\text{CN } 68/\text{H}_2\text{O } 32; t_{17} = \text{CH}_3\text{CN } 90/\text{H}_2\text{O } 10.$$

EXTRACTOS CON DICLOROMETANO-METANOL (DICLOROMETANÓLICOS).

La elución para estos extractos fue de la siguiente manera:

$$t_0 = \text{CH}_3\text{CN } 25/\text{H}_2\text{O } 75$$

$$t_{20} = 70/30$$

$$t_{30} = 80/20$$

donde t = tiempo.

Una vez establecidos los tiempos de retención de los componentes, se prosiguió a corroborar por medio de estándares la presencia de ácido grandiflorénico, kaurenico y monoginoico por el método de adición.

Para poder comparar las diferencias entre los tiempos de extracción de un mismo disolvente, se cromatografiaron los extractos 1, 5 y 10 de los obtenidos por ultrasonido y los extractos 1, 2 y 3 correspondientes a las 24, 48 y 72 horas por soxhlet.

Para corroborar si el pH influía en la resolución de los compuestos en los extractos, se realizó una corrida del extracto bencénico obtenido por ultrasonido utilizando agua destilada con 0.01% de H₃PO₄ (pH=4).

c) CROMATOGRAFÍA DE FASE VAPOR (CFV)

Debido a que los componentes de los extractos metanólicos no se pudieron separar por CLAE, se optó por su separación en cromatografía de gases (Abbott, 1982) para lo cual se silanizaron los extractos de la siguiente forma:

A 2 mg de cada extracto metanólico 1,5, y 10 de los obtenidos por ultrasonido y 1, 2 y 3 de soxhlet, se les adicionó 200 μ l de piridina, 50 μ l de 1,1,1,3,3,3 hexametilsilano y 50 μ l de clorometilsilano. Una vez estabilizada la reacción se mantuvieron a 4°C hasta el momento de su análisis.

El análisis cromatográfico se desarrolló en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890, con una columna RSL 430 de 30 m x 0.3 mm de sílice fundida, la determinación se efectuó por medio de un detector de ionización de llama y un flujo de 10 psi de hidrógeno. La temperatura inicial de la columna fue de 80°C alcanzando a los 3 minutos una temperatura final de 200°C. En cada caso se aplicó una muestra de 1.5 ml del silanizado, equivalente a 20 μ g del extracto.

La determinación de azúcares en estos extractos se corroboró por adición de la silanización de estándares de sacarosa, glucosa, ribosa, arabinosa, ramnosa y por espectroscopía de masas.

d) CORROBORACIÓN DE LA PRESENCIA DE ÁCIDO GRANDIFLORÉNICO Y KAURENOICO EN EL EXTRACTO ACUOSO.

El material vegetal *Montanoa tomentosa* utilizado para este estudio, fue colectado en los alrededores de Ciudad Universitaria, México en el mes de octubre de 1988. Las hojas de la planta fueron secadas a la sombra a temperatura ambiente, molidas hasta un polvo fino y mantenidas en bolsas de plástico protegidas de la luz directa.

El extracto acuoso de la planta se hizo por duplicado y se preparó a partir de 2 g de las hojas molidas que fueron depositadas en un vaso de precipitados de 500 ml que contenía 200 ml agua destilada, la mezcla se llevó a ebullición y se mantuvo la temperatura por un lapso de 15 minutos. El extracto se dejó enfriar, posteriormente se filtró a través de un embudo Buchner con papel filtro Whatman # 11 y al filtrado se le extrajeron por tres veces consecutivas con 50 ml de AcOEt en cada ocasión.

Después de la extracción se lavó el mismo número de veces con agua y para romper la emulsión se agregó cloruro de sodio. Todas las extracciones con AcOEt se juntaron en un matraz de fondo redondo 24/40 de 500 ml, se llevó a evaporación en un rotavapor a vacío a una temperatura de 25°C. Se obtuvieron 50 mg de material, el cual fue resuspendido en 2 ml de acetnitrilo y filtrado; de esta suspensión se tomó una alícuota de 10 μ l para apreciar la presencia de los kaurenos en un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia.

Las condiciones de separación fueron en un medio isocrático de CH₃CN/H₂O en una porción de 75:25, con un flujo de 1.2 ml en una columna MCH-10 de 30 cm x 4 mm, detectando a una longitud de onda de 205 nm. El equipo restante fue igual al empleado para la separación en los extractos.

e) CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO GRANDIFLORÉNICO, KAURENOICO Y MONOGINOICO EN DIFERENTES PERIODOS ESTACIONALES (ANTES, DURANTE Y POSTERIOR A LA FLORACIÓN.)

El material empleado para este ensayo fue colectado de una sola planta de *Montanoa tomentosa ssp. tomentosa* (ejemplar de referencia en el herbario IMSSM), cada tercer día a las 12:00 ± 15 h a partir del 1o. de septiembre hasta el 6 de diciembre de 1989. La muestra fue de 5 hojas escogidas al azar de la parte media a la parte apical de la rama. Las hojas se dejaron secar a temperatura ambiente, moliéndose y guardándose de la luz directa en una bolsa de plástico.

Para la extracción se pesaron 2 mg de hoja las cuales fueron depositadas en ampolletas de 10 ml adicionándole 1 ml de bencina de petróleo. Las ampolletas fueron selladas con soplete y guardadas de la luz directa durante 72 h.

El análisis cuantitativo se realizó por CLAE en las mismas condiciones que los extractos bencénicos obtenidos por ultrasonido y soxhlet.

4.- PREPARACIONES BIOLÓGICAS

a) SUSPENSIÓN DE EXTRACTOS ORGÁNICOS

Las suspensiones acuosas se prepararon el mismo día en que se realizaron las pruebas farmacológicas *in vitro*; cada extracto fue tratado de manera específica:

EXTRACTO BENCÉNICO. Se tomó 1 g del material extraído y se colocó en un matraz fondo redondo 24/40 de 10 ml. Se resuspendió con acetona/agua (1:1) añadiendo primero la acetona y posteriormente el agua lentamente hasta obtener una suspensión lechosa. La mezcla se llevó a evaporación en un rotavapor a vacío con una temperatura de 20°C, removiendo toda la acetona; el residuo lechoso se filtró en un embudo de porcelana con papel filtro Whatman # 11. Se aforó a 2 ml.

EXTRACTO DICLOROMETANOLICO. Se trató en las mismas condiciones que el caso anterior a diferencia de la resuspensión inicial, la cual se efectuó en este caso con metanol.

EXTRACTO METANÓLICO. Debido a sus características altamente polares, no fue necesario resuspender previamente con solventes orgánicos, sino que directamente 1 g del extracto se diluyó en agua, se filtró y se aforó a 2 ml.

EXTRACTO ACUOSO. Una vez realizadas todas las extracciones tanto por ultrasonido como por soxhlet el resto de la flor se guardó en una bolsa de plástico, previa eliminación de disolvente por alto vacío, y se mantuvieron ocultos de la luz directa. Al igual que los casos anteriores, el día de las pruebas se pesó 1 g de esta flor y se colocó en un matraz erlenmeyer de 10 ml adicionándole 5 ml de agua destilada; se dejó hervir durante 10 min al cabo de los cuales se retiró del fuego dejándose enfriar a temperatura ambiente. Se filtró y se aforó a 2 ml.

SOLUCION KREBS BICARBONATO. Se preparó con soluciones stock 1 M de las sales. La glucosa fue pesada en cada ocasión. La composición en milimoles de la solución fue: glucosa 11.1, NaHCO₃ 15, NaCl 120, KCl 4.6, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2 y CaCl₂ 0.5. La solución se ajustó a un pH de 7.4 con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂ a una temperatura de 37°C. La solución se preparó en cada experimento.

SOLUCION ACUOSA DE OXITOCINA. Se preparó en cada sesión en una proporción de 1.25 mUI (Ponce-Monter, 1988) de oxitocina (XITOCIN) de los laboratorios Cryopharma.

b) COMPARACIÓN DE COMPONENTES DEL EXTRACTO ANTES Y DESPUÉS DE LA SUSPENSIÓN ACUOSA.

Para la realización de este estudio se emplearon hojas de zoapatle del mismo lote del anterior. 300 g de este polvo fueron depositados en un matraz erlenmeyer y se agregó hexano hasta cubrir totalmente. La mezcla se dejó reposar durante 24 h después de las cuales se filtró a través de un embudo Buchner con papel filtro Whatman # 11; el filtrado se evaporó en un rotavapor a presión reducida y el residuo fue guardado en un matraz erlenmeyer.

Una vez eliminado el residuo del disolvente, se añadió una solución de diclorometano-metanol (95:5), dejándose macerar nuevamente por 24 h; se filtró y se evaporó al igual que el caso anterior.

De este último extracto se tomaron 6 g, los cuales se repartieron en cantidades iguales de 3 g, quedando uno como referencia (extracto antes de la suspensión) y el otro se trató de la siguiente manera: se agregaron 10 ml de acetona para resuspender y posteriormente se adicionaron lentamente 10 ml de agua destilada (extracto después de la suspensión) La mezcla se evaporó en un rotavapor a vacío y a una temperatura de 20°C. Una vez removida la acetona se prosiguió a filtrar en un embudo Buchner con papel filtro Whatman # 11; al filtrado anterior se le agregó AcOEt/H₂O (1:1) y la mezcla se pasó a un embudo de separación donde se deshechó la fracción inferior y la superior se evaporó nuevamente. El residuo obtenido de esta forma y el extracto de referencia (sin resuspender en agua) se guardaron a temperatura ambiente y ocultos a la luz directa hasta el momento de su análisis.

El estudio analítico se realizó en las mismas condiciones que las empleadas para la demostración de la presencia de kaurenos en el té. Se realizó el análisis del extracto antes y después de la suspensión acuosa para su comparación

5.- PRUEBAS FARMACOLÓGICAS (MODELO *IN VITRO*)

Los experimentos *in vitro* se llevaron a cabo en segmentos de 3 x 10 mm de útero de cobayo adulto de 500 ± 50 g de la cepa Hardley con alimento y agua *ad libitum*. Los animales fueron estrogenizados a las 0 y 24 h con benzoato de estradiol (10 µ g/animal) por vía subcutánea. A las 48 h se sacrificaron por golpe en la nuca (dislocación cervical). Inmediatamente después se prosiguió a la disección.

Los segmentos de tejido se colocaron en cámaras para tejidos aislados; estos se mantuvieron a la tensión de 1 g a 37°C en 10 ml de Ringer Krebs-bicarbonato (RKb) con burbujeo constante de una mezcla gaseosa de 5% de CO₂ en O₂.

El registro de la actividad contráctil se hizo por medio de un sistema isométrico vertical con un transductor de tensión Grass modelo FT 03 conectado a un polígrafo Grass modelo 7.

Los tejidos se dejaron estabilizar por una hora lavando cada 15 min. con solución fresca de RKb. En el bionsayo se utilizaron sólo aquellos segmentos que respondieron por tres veces consecutivas a un estímulo de oxitocina (1.25 mUI/ml) (Fig. 2 y 3).

PROTOCOLO EXPERIMENTAL DEL BIOENSAYO.

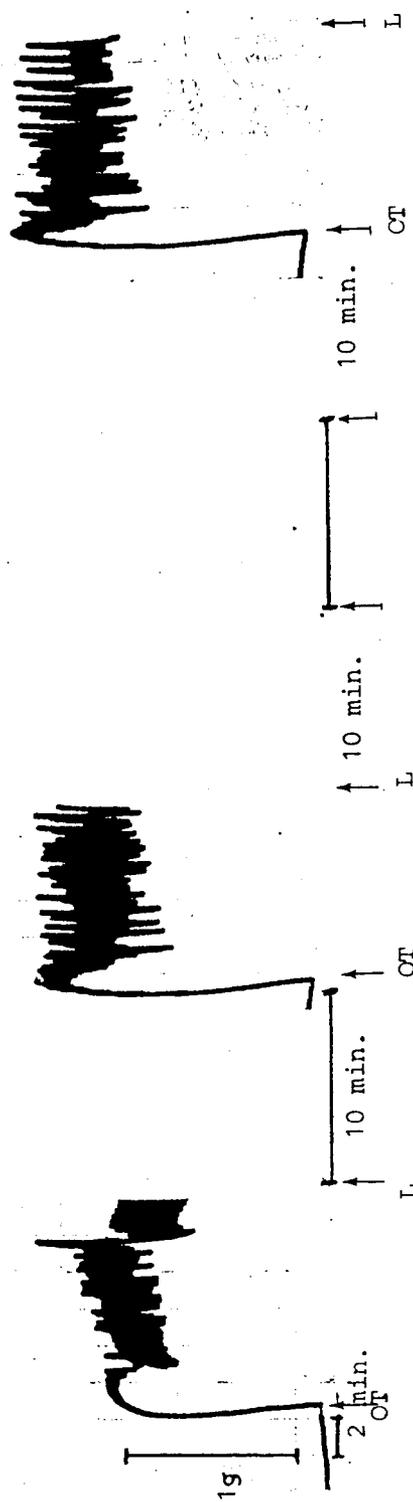


Figura 2. Trazos típicos del efecto uterotónico de 1.25 mUI/ml de oxitocina (OT) sobre un segmento de útero de cobayo estrogenizado.

L = lavado con solución Ringer Krebs bicarbonato (RKB) fresca.

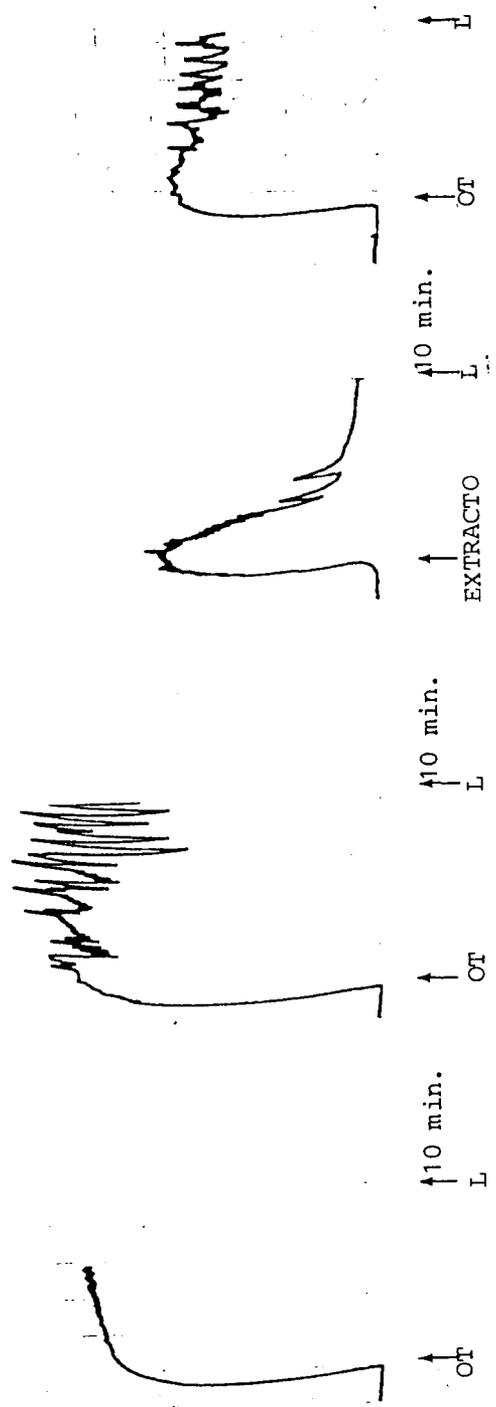


Figura 3. Efecto del extracto bencénico obtenido por ultrasonido comparado con el efecto uterotónico que produce 1.25 mUI/ml de OT en útero de cobayo estrogenizado.

RESULTADOS

1.- PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

a) IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA



PLANTAS MEDICINALES DE MEXICO
HERBARIO IMSS

Estado de D.F.

N.C.: *Montanoa tomentosa* ssp. *tomentosa*.
Fam.: Compositae.
N.P.: Zoapatle.
Loc.: Cd. Universitaria, a 10 m del Instituto de Química.
Arbusto de aproximadamente 2 m de alto con superficie
lana a tomentosa, hojas ovalolanceoladas, cabezuelas
de flores blancas.
Uso: Tomado como té estimula la labor de parto y la
menstruación.
Colect.: Luz María Damián Badillo (1)
Det.: Abigail Aguilar y Héctor Nieto. 8-Oct-90.

Figura I: ZOAPATLE

N.C.: *Montanoa tomentosa* ssp. *tomentosa*, Fam.: Compositae.

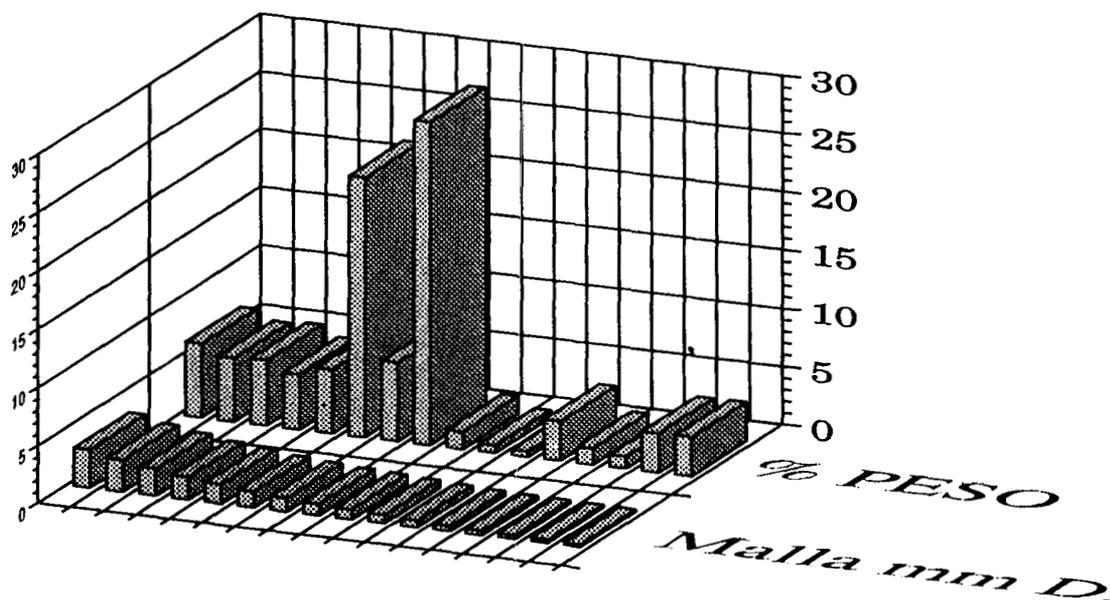
Loc.: Cd. Universitaria, a 10 m del Instituto de Química.

Uso: Tomado como té estimula el parto y la menstruación.

Col.: Luz María Damián Badillo. Det.: Abigail Aguilar y Héctor Nieto.

b) TAMIZADO.

El tamizado refleja una distribución heterogénea de partículas en la molienda (Gráfica 1). El tamaño más abundante fue de 1.4 y 1.0 mm de diámetro, donde el número de malla con mayor material retenido fue la # 18, con un 27 % del porcentaje en peso y la # 14 con el 22 %. Ambas representan aproximadamente el 50 % del material retenido; el resto del tamizado oscila entre un 3.3 y 0.2 mm de diámetro.



Gráfica 1. Distribución del tamaño de partícula y sus correspondientes porcentajes en peso después del molido de la flor de *M. tomentosa*.

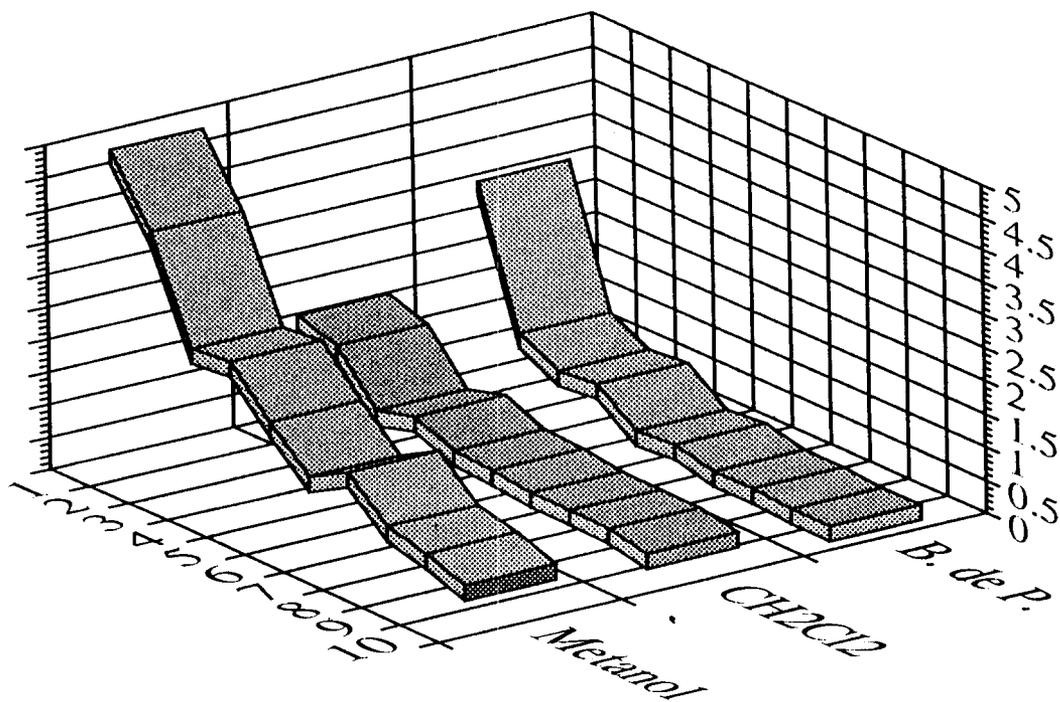
2.- MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.

a) DISTRIBUCIÓN DE LA CANTIDAD DE MATERIAL VEGETAL EXTRAÍDO POR DISTINTOS MÉTODOS (ULTRASONIDO Y SOXHLET)

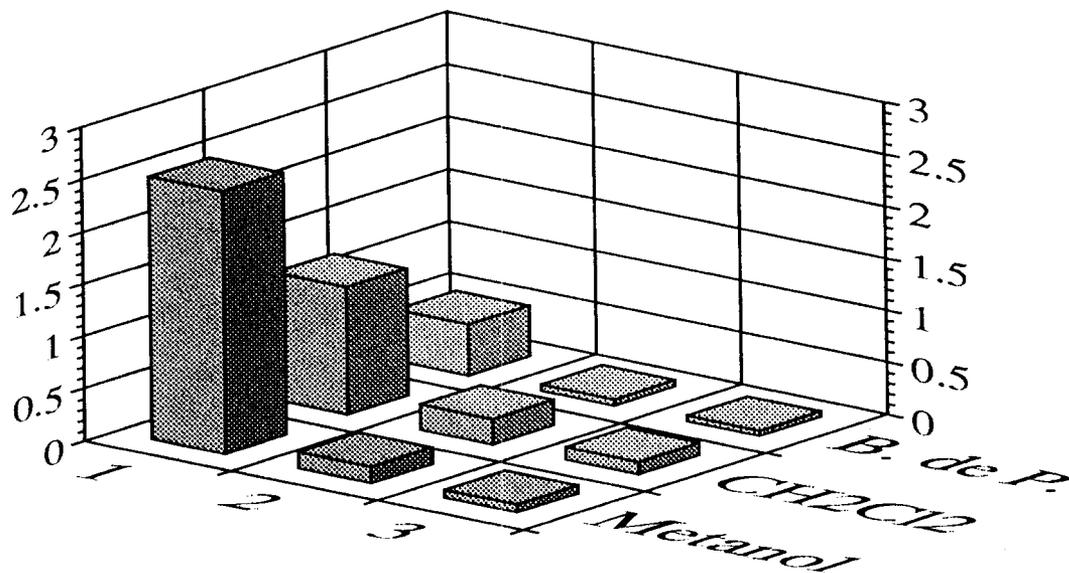
La primera extracción con cada disolvente es la más abundante (Gráfica 2, 3), las siguientes disminuyeron hasta un punto tal que la concentración del extracto prácticamente fue constante por lo que se observa una clara tendencia asintótica en ambos métodos.

La extracción por ultrasonido mostró que cerca del 50 % del material se extrajo con metanol (Gráfica 2) lo cual indica que abundan en la planta compuestos polares. La primera extracción con bencina de petróleo fue del 30 % aproximadamente. Sin embargo, las extracciones siguientes fueron menores a las obtenidas con diclorometano/metanol (95:5) cuyo porcentaje inicial fue del 15 %. Puede observarse una tendencia: a mayor polaridad, mayor cantidad de material extraído.

La extracción por soxhlet, al igual que en el caso anterior muestra que la extracción con metanol fue la más abundante (50 %), (Gráfica 3,) seguida por diclorometano-metanol con un 24 % y finalmente un 10 % con bencina de petróleo.



Gráfica 2.- Comparación de los rendimientos de la extracción de flor de *M. tomentosa* empleando la maceración con ultrasonido.



Gráfica 3.- Comparación de los rendimientos obtenidos de la extracción de flor de *M. tomentosa* con Soxhlet. Para cada disolvente se recolectó y pesó el residuo a las 24, 48 y 72 h.

b) COMPARACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA EXTRACCION.

La extracción por soxhlet es la más efectiva debido a que por este método se extrae un 50

% del total de la flor (Tabla 1), mientras que por ultrasonido sólo se extrae un 30 %. Del material extraído, el 60 % corresponde al obtenido por metanol en ultrasonido y 55 % por soxhlet con el mismo disolvente; esto muestra que la mayor cantidad de los componentes de la planta son altamente polares. El 25 ± 5 % corresponde a los extractos con diclorometano-metanol (compuestos con polaridad intermedia) y el 15 ± 3 % restante, corresponden a los compuestos no polares.

	Disolvente	Ultrasonido	Soxhelt
Peso Total del extracto (100g)	B. de P.	5.7857	6.135
	CH ₂ Cl ₂ /MeOH	6.8431	15.932
	MeOH	19.0113	27.560
% en peso del material vegetal total	B. de P.	5.78	6.13
	CH ₂ Cl ₂ /MeOH	6.84	15.93
	MeOH	19.01	27.56
TOTAL		31.64	49.62
% en peso del extracto	B. de P.	18.28	12.36
	CH ₂ Cl ₂ /MeOH	21.62	32.10
	MeOH	60.00	55.53
TOTAL		99.99	99.99

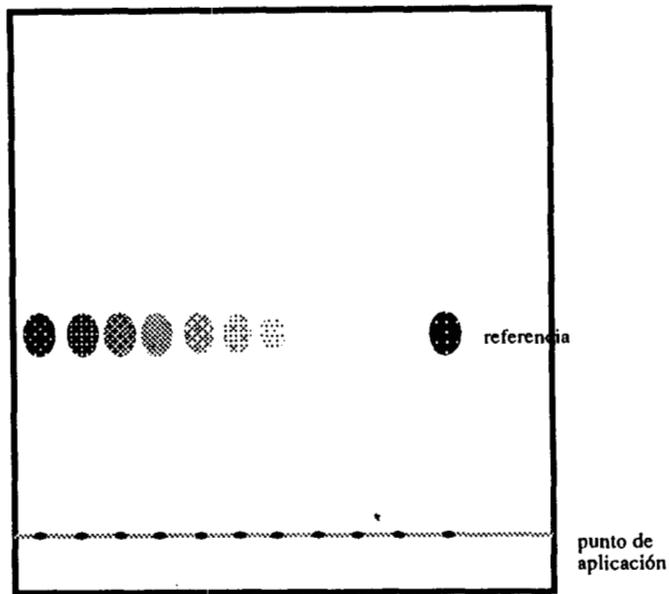
Tabla 1.-Comparación del rendimiento de la extracción en la flor de *Montanoa tomentosa*.

3.- MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.

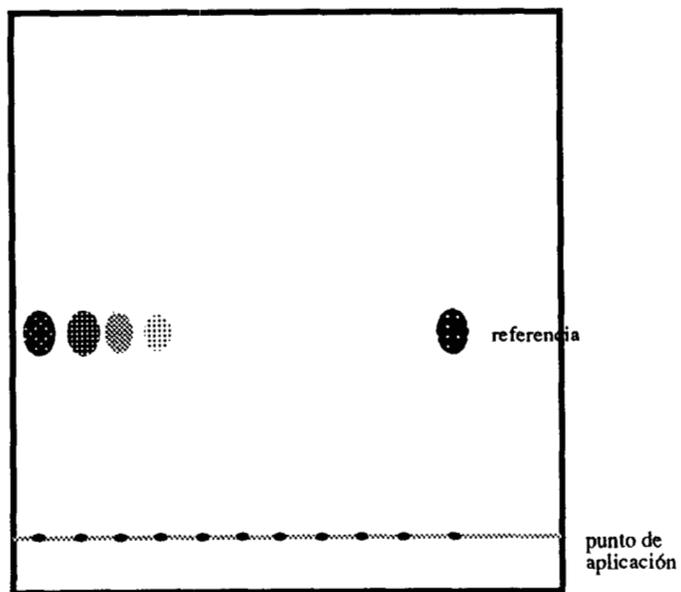
a) IDENTIFICACIÓN DE KAURENOS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.

La elución de los extractos en las condiciones citadas en la metodología permitió localizar a los kaurenos. El R_f de los kaurenos identificados en las condiciones citadas fue de 0.4 El análisis visual de estos compuestos en los diversos extractos por medio de su R_f indica que GA, KA y MO estuvieron presentes hasta el extracto séptimo con bencina de petróleo y hasta el cuarto extracto con diclorometano-metanol en las extracciones obtenidos por ultrasonido. Por soxhlet sólo estuvieron presentes a las 24 y 48 h (1° y 2° extracto) con bencina de petróleo y sólo en el primer extracto (24 h) del diclorometanólico. Esquema 1, 2 y 3. En ambos métodos no se identificaron los kaurenos en el extracto metanólico.

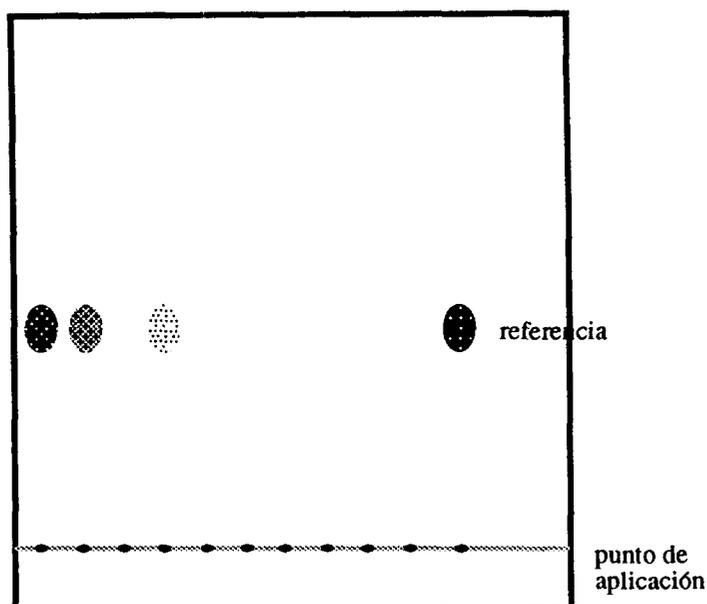
104429



Esquema 1.- Cromatografía en capa fina de los extractos con éter de petróleo (bencina de petróleo) obtenidos por maceración con ultrasonido.



Esquema 2.- Cromatografía en capa fina de los extractos de flor obtenidos con diclorometano-metanol, 95:5 por maceración en ultrasonido.



Esquema 3.- Cromatografía en capa fina de los extractos obtenidos con Soxhlet. Los tres primeros puntos de aplicación corresponden a la extracción con éter de petróleo; el cuarto, quinto y sexto puntos de aplicación corresponden a los extractos obtenidos con diclorometano-metanol, 95:5

b) SEPARACIÓN DE COMPONENTES POR CLAE.

El número de componentes así como la variabilidad de los mismos depende del número de extracciones que se realizaron con un sólo disolvente.

La extracción con bencina de petróleo por ultrasonido demuestra que la presencia de ciertos compuestos facilita la difusión de otros; este hecho se refleja al observar que en el primer extracto (30 minutos) aparecen una gama de compuestos tanto polares como de baja polaridad; en el quinto extracto (2.5 h) se presentan prácticamente los mismos componentes pero en una concentración más baja; sin embargo, en el décimo (5 h) sólo aparecen compuestos de baja polaridad (Figura 4).

Como puede observarse en la figura 5, el pH no facilita la resolución de los componentes, bajo estas condiciones, por lo que se optó por trabajar con agua destilada normal.

A pesar de que el comportamiento de los extractos obtenidos por soxhlet son semejantes a los anteriores, no se trata de los mismos componentes ya que abundan más los poco polares, aunque existen también elementos comunes entre ellos (Figura 6).

Es clara la presencia de un número mayor de compuestos en los extractos obtenidos por ultrasonido.

Al realizar un seguimiento de los kaurenos de interés, ácido grandiflorénico, kaurenoico y monoginoico, en estas condiciones, se encontró que no estaban presentes en los últimos extractos; 2.5 h para el caso de ultrasonido y 78 h para soxhlet (Tabla 2).

Debido a que los extractos obtenidos por diclorometano-metanol son más polares que los anteriormente descritos, las condiciones se invirtieron: los primeros componentes son más

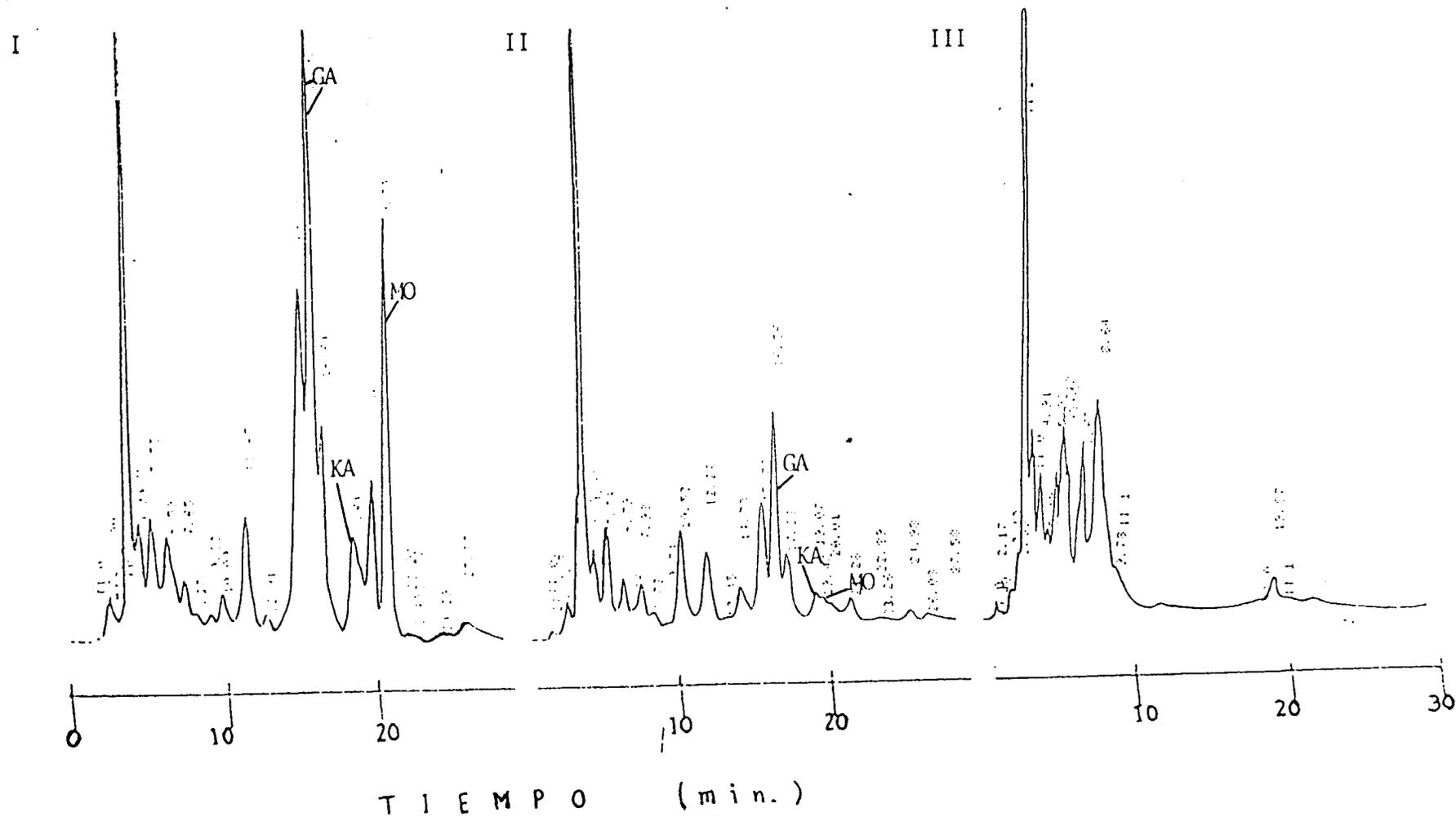


Figura 4. Comparación de los cromatogramas de los extractos con bencina de petróleo obtenidos por maceración en ultrasonido a las 0.5 (I), 2.5 (II) y 5 (III) h. Los extractos se eluyeron en un gradiente de acetonitrilo-agua en CLAE.

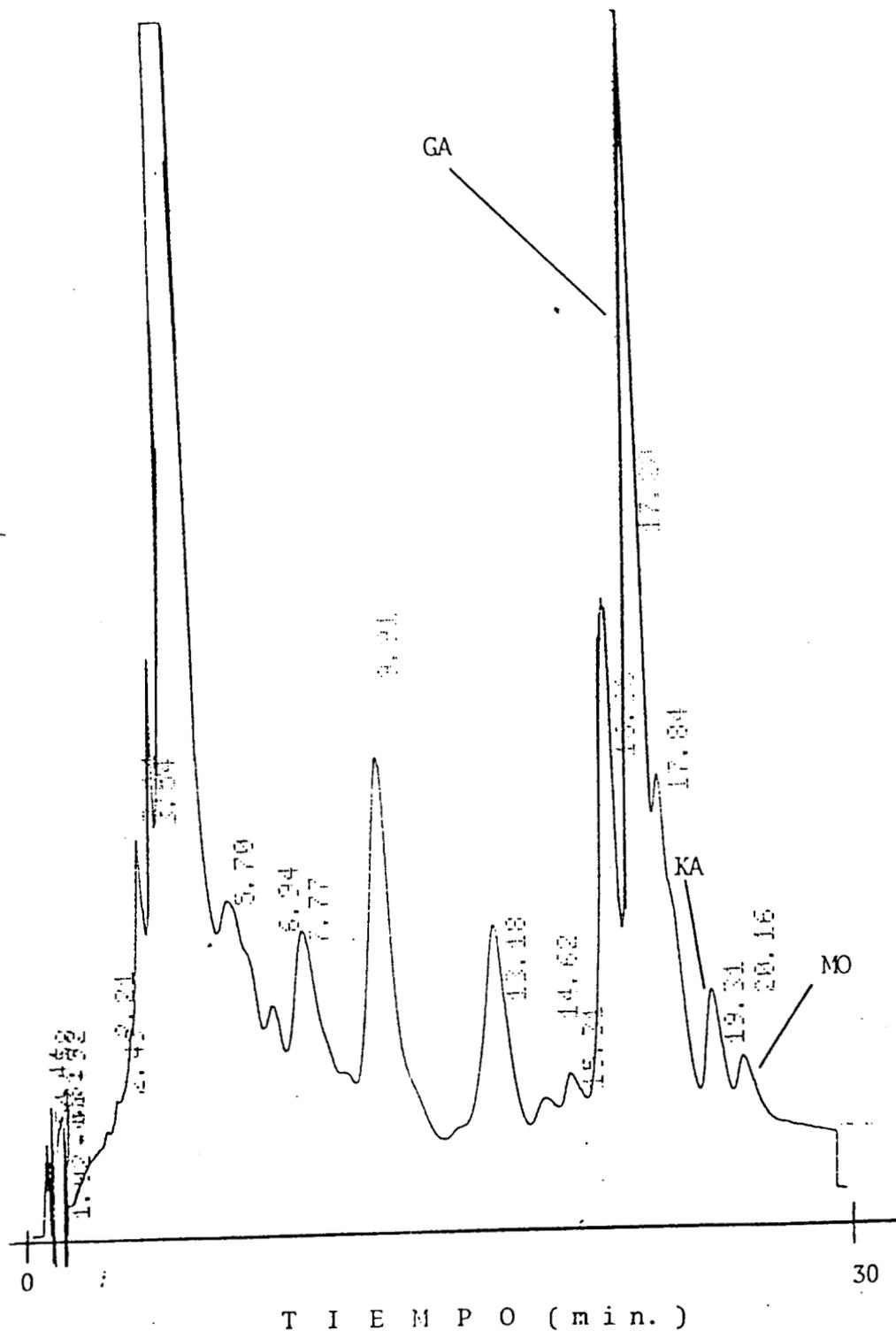
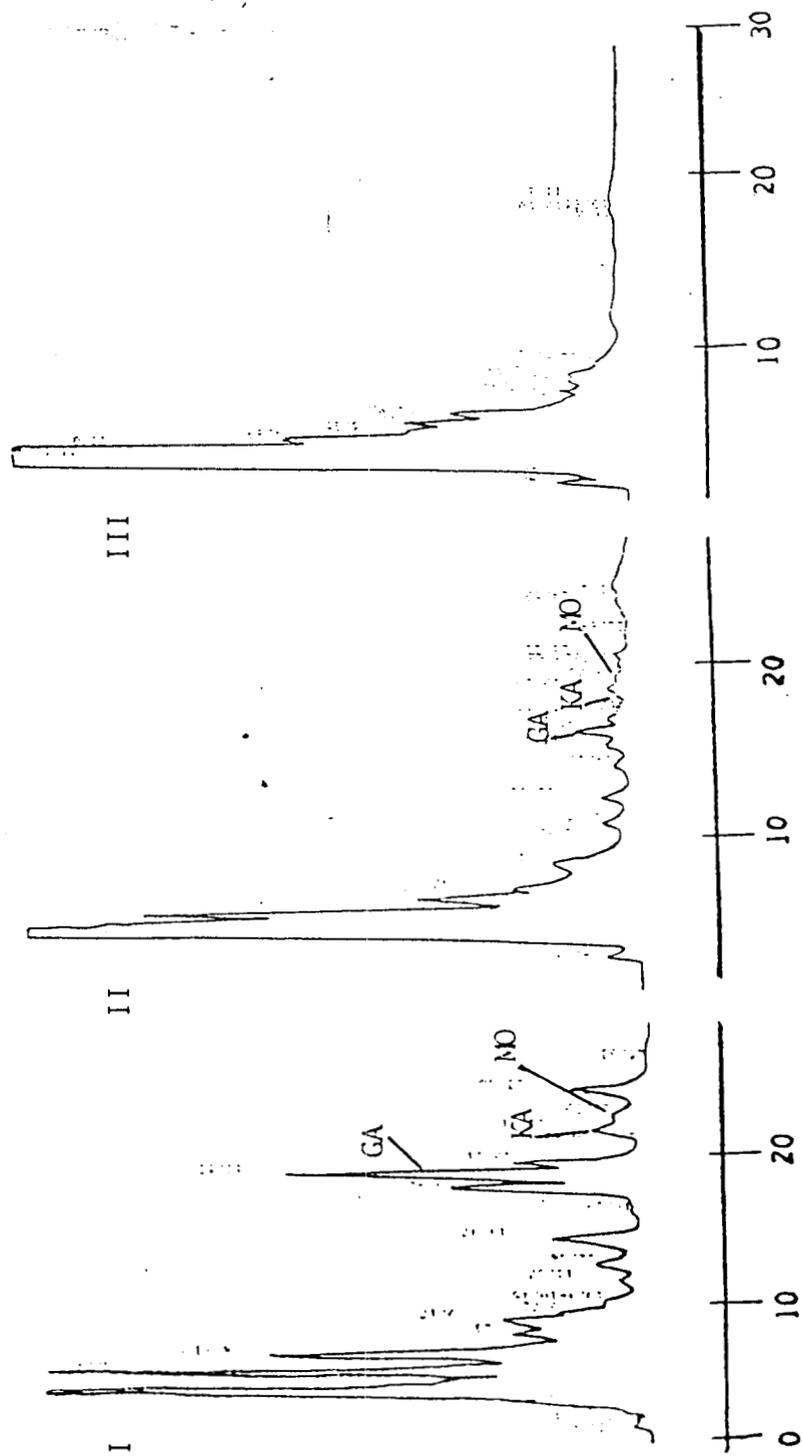


Figura 5. Cromatograma del extracto con bencina de petróleo eluido con H_3PO_4 (0.01%) en las mismas condiciones que los extractos sin control de pH.



T I E M P O (m i n .)

Figura 6. Comparación de los cromatogramas de los extractos con bencina de petróleo obtenidos por soxhlet a las 24 (I), 48 (II) y 72 (III) h. Los extractos se eluyeron en un gradiente de acetoniitrilo-agua en CLAE.

polares que los últimos. En contraste con los anteriores, se observa que a medida en que se incrementa el tiempo de extracción, disminuye la concentración de componentes, este efecto se observa en ambos métodos (Fig. 7, 8).

Es importante resaltar que vuelven a aparecer dos de los tres kaurenos importantes, grandiflorénico y kaurenoico en 2 de los extractos tratados, lo que demuestra que la presencia de ciertos compuestos ayuda a la suspensión de compuestos con polaridad diferente al disolvente (Tabla 2).

Métodos de Extracción	T (h)	DISOLVENTE								
		B. de P.			CH ₂ Cl ₂ /MeOH			MeOH		
		GA	KA	MO	GA	KA	MO	GA	KA	MO
Ultrasonido	0.5	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	2.5	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	5	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Soxhlet	24	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	48	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	72	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Tabla 2.- Seguimiento del ácido Grandiflorénico, Kaurenoico y Monoginoico en los extractos orgánicos obtenidos por los métodos de maceración con ultrasonido y extracción en Soxhlet

c) IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POR CFV

La alta polaridad de los extractos metanólicos impidió su resolución por CLAE por lo que se optó por la cromatografía en fase vapor, encontrándose que los principales componentes extraídos por los dos métodos eran azúcares como glucosa, (8.6 min) sacarosa (14.72 min.), ribosa (6.69 min.), ramnosa (6.26 min.) y arabinosa (6.6 min.) (Fig. 9, 10).

DISOLVENTE	ULTRASONIDO	SOXHLET
B de P	24 CLAE	25 CLAE
	24 CLAE	20 CLAE
	13 CLAE	13 CLAE
CH ₂ Cl ₂ /MeOH	37 CLAE	31 CLAE
	29 CLAE	26 CLAE
	29 CLAE	21 CLAE
MeOH	30 CFV	29 CFV
	40 CFV	35 CFV
	28 CFV	23 CFV

Tabla 3.- Comparación del número de componentes observados por cromatografía líquida de alta eficiencia y en fase vapor.

La identificación de este tipo de compuestos no se había reportado anteriormente en los extractos de esta planta. Se corrobora que la extracción por ultrasonido es más eficiente en

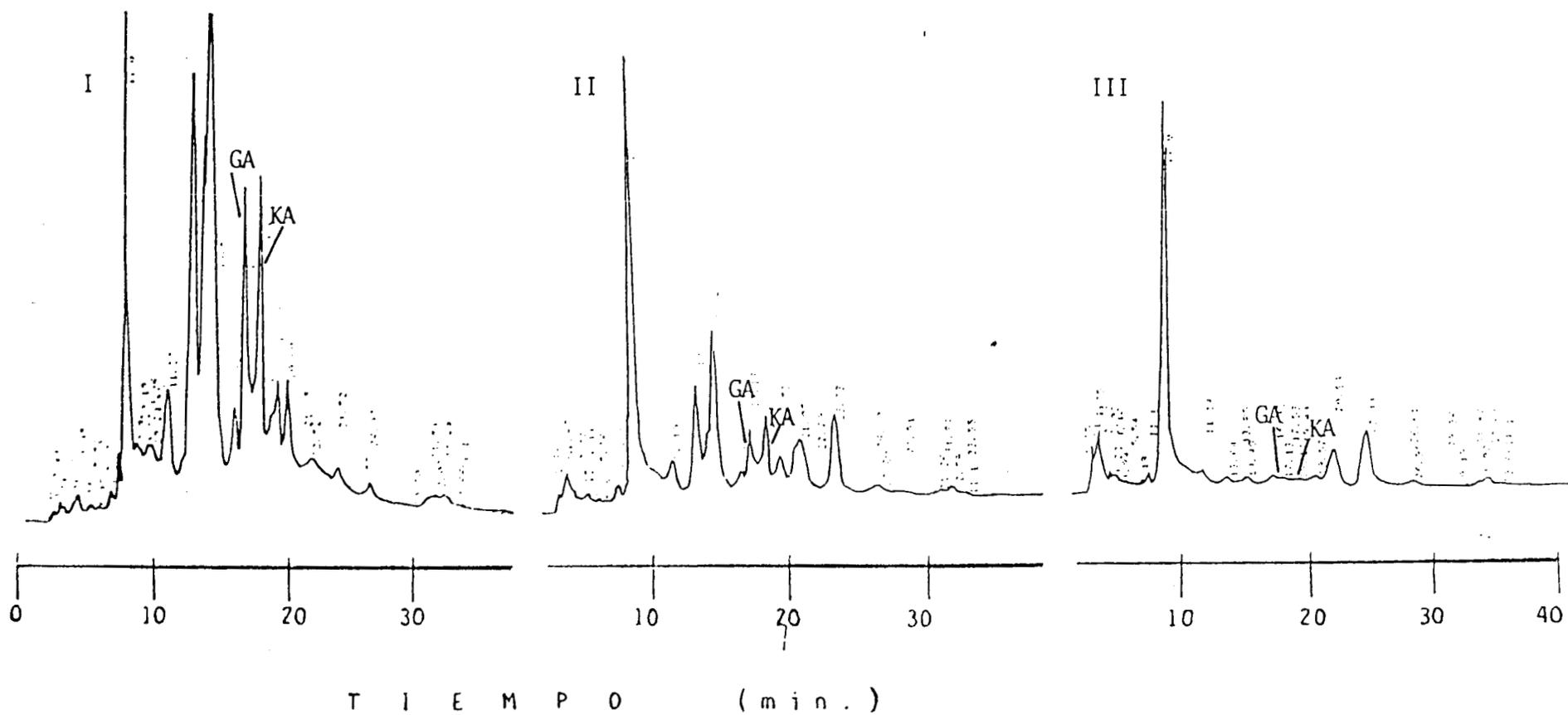


Figura 7. Comparación de los cromatogramas de los extractos con diclorometano-metanol (95:5) obtenidos por maceración en ultrasonido a las 0.5 (I), 2.5 (II) y 5 (III) h. Los extractos se eluyeron en un gradiente de acetonitrilo-agua en CLAE.

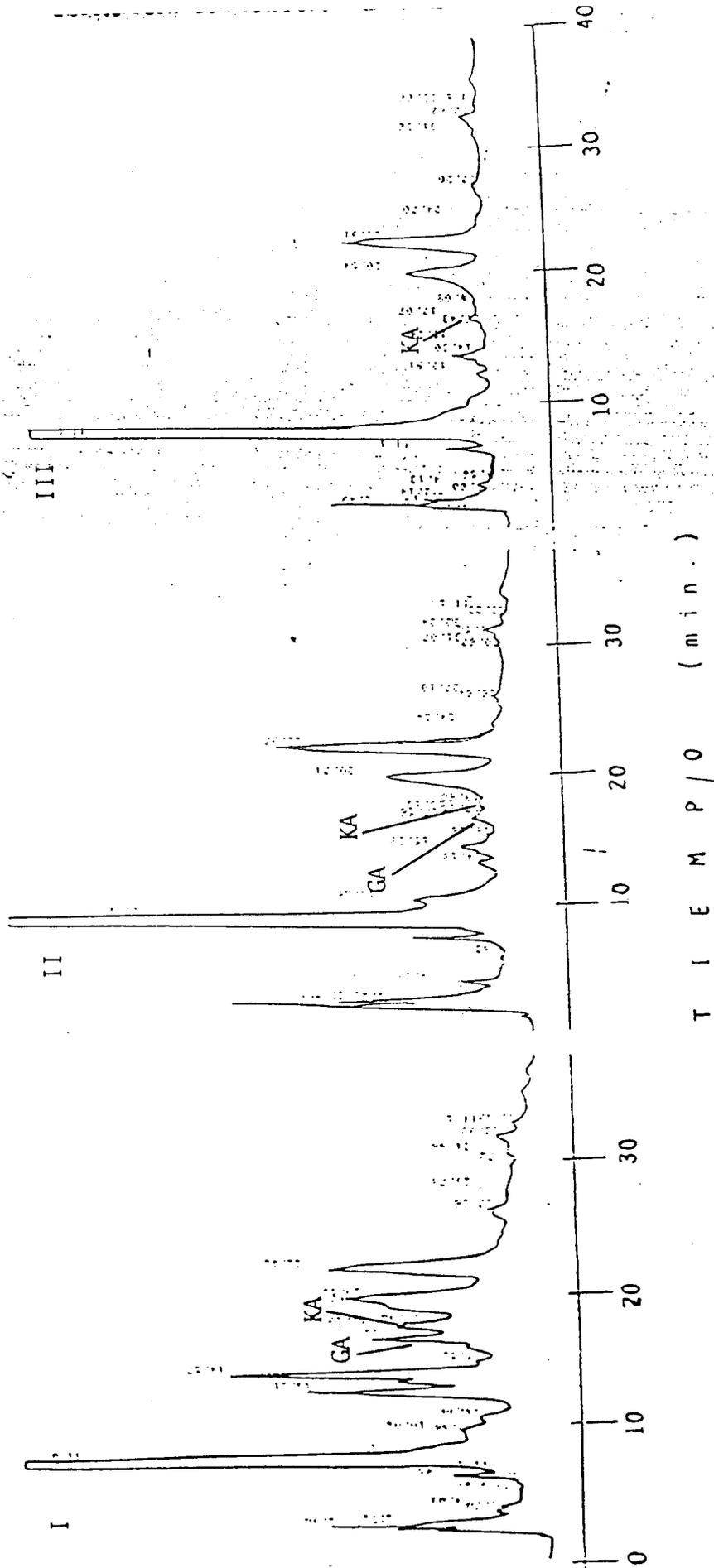
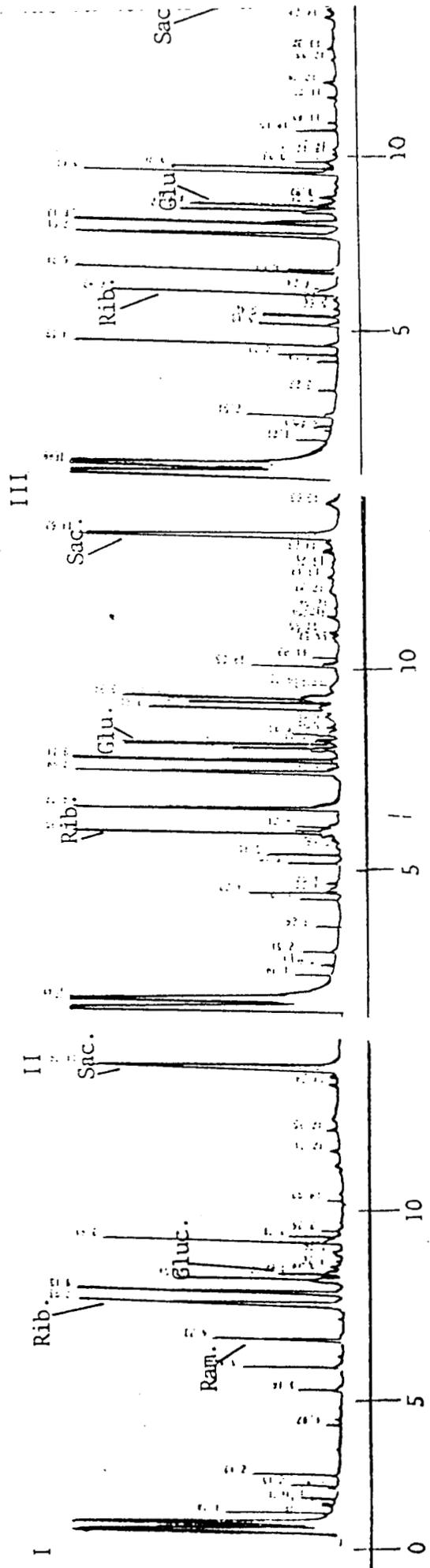
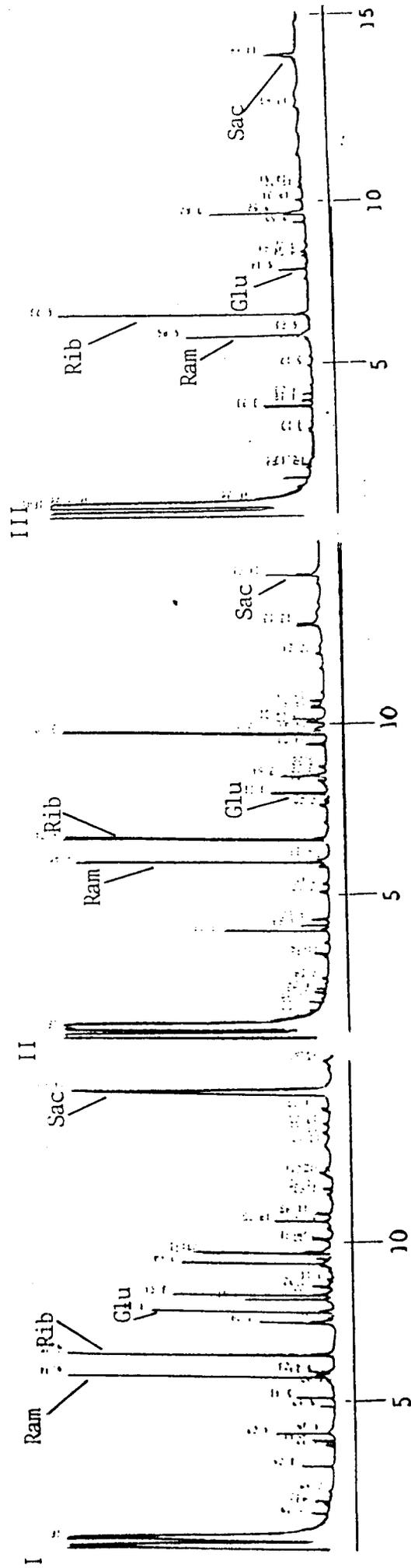


Figura 8. Comparación de los cromatogramas de los extractos con diclorometano-metanol (95:5) obtenidos por Soxhlet a las 24 (I), 48 (II) y 72 (III) h. Los extractos se eluyeron en un gradiente de acetonitrilo-agua en CLAE.



T I E M P O (m i n .)

Figura 9. Comparación de los cromatogramas de los extractos con metanol obtenidos por maceración en ultrasonido a las 0.5 (I), 2.5 (II) y 5 (III) h. Los cromatogramas se obtuvieron por CFV.



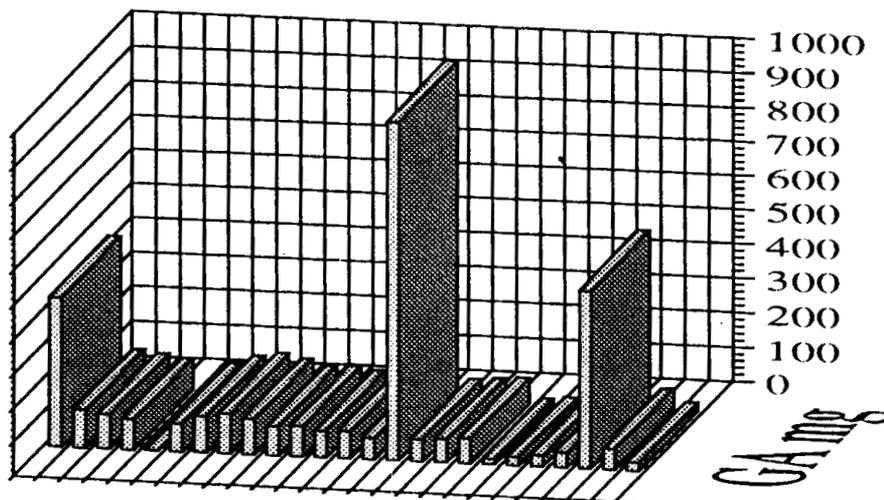
T I E M P O (m i n .)

Figura 10. Comparación de los cromatogramas de los extractos con metanol obtenidos por soxhlet a las 24 (I), 48 (II) y 72 (III) h. Los cromatogramas se obtuvieron por CFV.

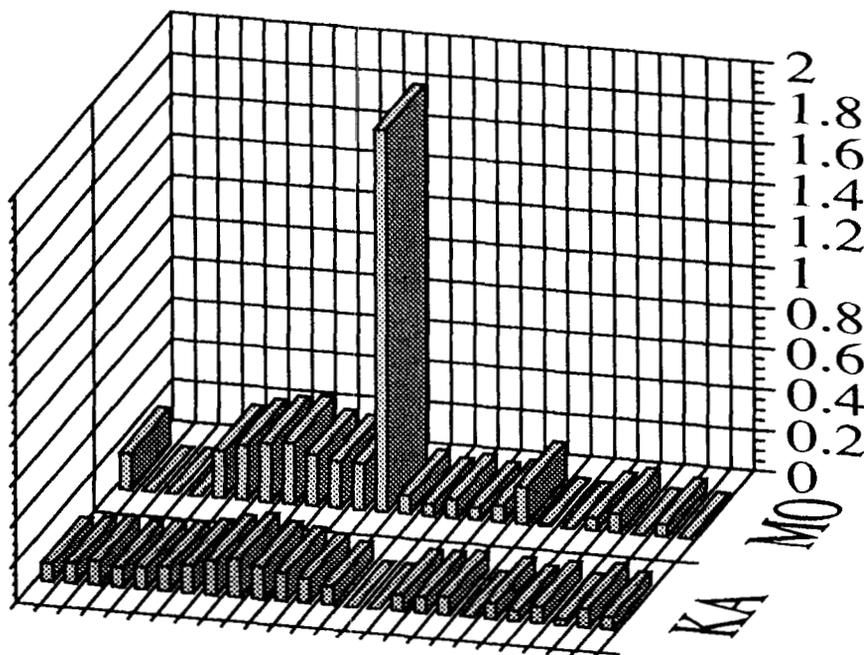
cuanto al número de compuestos (Tabla 3) aunque en este caso a diferencia de lo detectado por CLAE, el tiempo favoreció la extracción puesto que se observa un incremento de componentes en el segundo extracto, 2.5 h por ultrasonido y 78 h por soxhlet (Fig. 6,7).

d) CUANTIFICACIÓN DE LOS KAURENOS EN LOS DIFERENTES PERIODOS ESTACIONALES.

La variabilidad de la concentración de productos naturales como los kaurenos se puede comprobar al observar en las gráficas 4 y 5, donde se puede observar que la concentración de los kaurenos no es homogénea. Ciertos días se encuentran en altas concentraciones mientras que en otros, ni siquiera aparecen; lo que sí es claro, es que la concentración de grandiflorénico es mayor en comparación con el kaurenoico y monoginoico (Gráfica 4,5).



Gráfica 4.- Concentración de ácido grandiflorénico en distintos periodos estacionales (antes, durante y después de la floración). Las determinaciones comprenden el período del 1o. de septiembre al 6 de diciembre de 1989; las muestras fueron colectadas cada tercer día.



Gráfica 5.- Concentración de ácido Kaurenico y Monoginoico determinada en los mismos períodos estacionales que las muestras de la gráfica 4.

4. PREPARACIONES BIOLÓGICAS.

a) IDENTIFICACIÓN DE GRANDIFLORÉNICO Y KAURENOICO EN EL EXTRACTO ACUOSO.

Se identificaron claramente el ácido grandiflorénico y kaurenico por el método de adición; el primero con un tiempo de retención de 7.10 min. y el segundo a los 10.04 min. (Fig. 11), lo cual demuestra que sí están presentes en la decocción. La concentración de grandiflorénico fue de 1.74 mg/ml y la de kaurenico de 1.39 mg/ml en el té.

b) COMPARACIÓN DEL NÚMERO DE COMPONENTES DEL EXTRACTO ORGÁNICO ANTES Y DESPUÉS DE LA SUSPENSIÓN ACUOSA.

Las suspensiones acuosas realizadas de esta manera (suspensión previa en disolventes orgánicos), resultó ser un método eficiente, ya que se resuspende en agua prácticamente el total de los componentes del extracto orgánico. Este hecho se puede corroborar si se analizan los cromatogramas del extracto diclorometanólico de la hoja de zoapatle antes y después de la suspensión (Figura 12), donde se muestra que ambos cromatogramas presentan los mismos componentes.

5.- ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS *IN VITRO*.

Los extractos bencénicos obtenidos por ultrasonido resultaron con actividad uterotónica (Tabla 4); 40 μ g/ml de este extracto indujeron un efecto uterotónico equivalente a 0.125 ± 0.07 mUI/ml de oxitocina. Después de que los segmentos uterinos permanecieron en contacto durante 40 minutos se observa que la respuesta a 1.25 mUI/ml de oxitocina se redujo en un 30

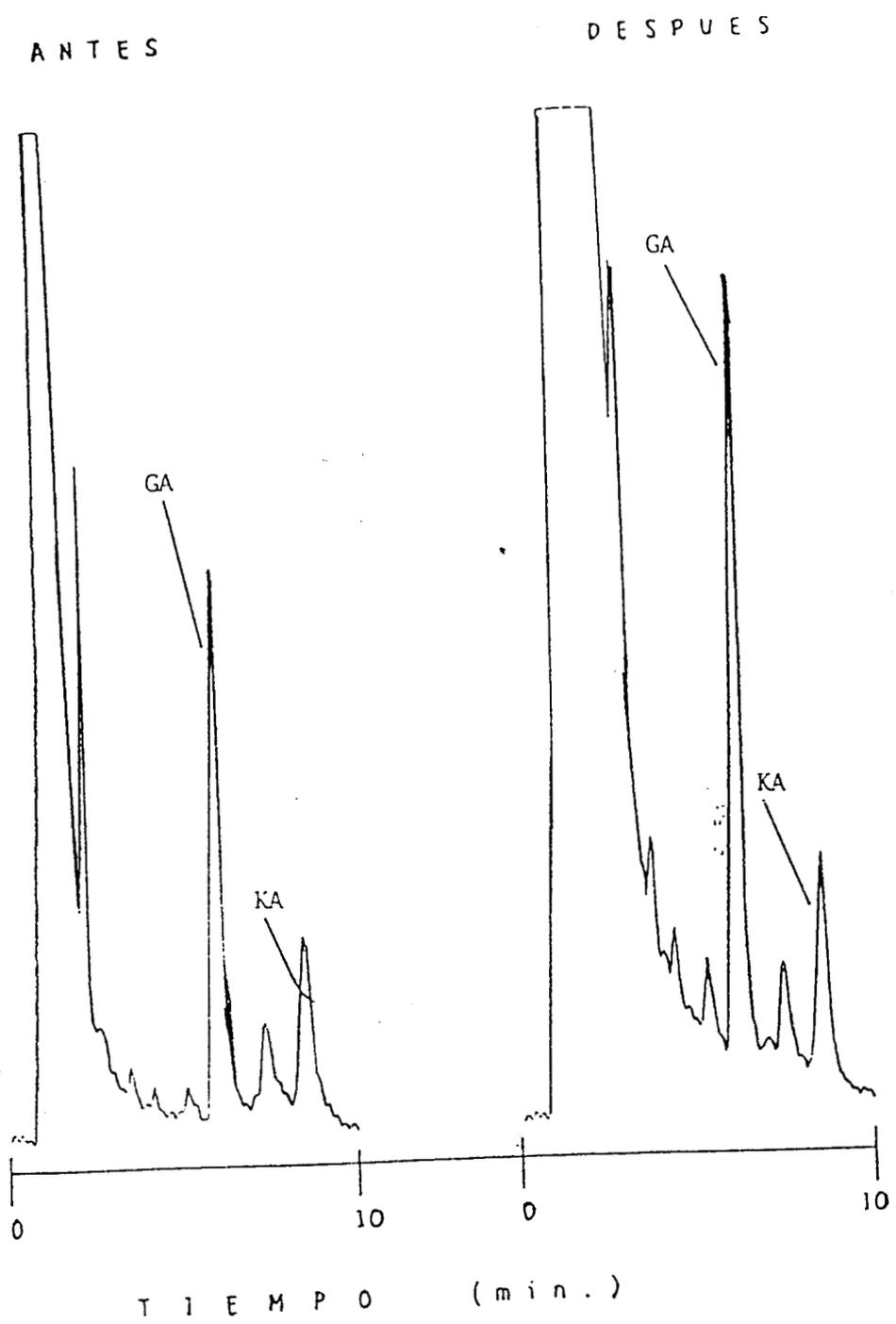


Figura 11. Comparación de los extractos con diclorometano-metanol (95:5) antes y después de la suspensión acuosa.

± 5 %.

# de PRUEBA	EXTRACTO				Modificación de la Respuesta a OT.
	B. de P.	CH ₂ Cl ₂ /MeOH	MeOH	ACUOSO	
1	activo	no activo	no activo	no activo	SI
2	activo	no activo	no activo	no activo	SI
3	activo	no activo	no activo	no activo	SI
4	activo	no activo	no activo	no activo	SI

Tabla 4.- Pruebas *in vitro* del los extractos obtenidos por maceración en ultrasonido en útero de cobayo estrogenizado. Los extractos fueron administrados en dosis de 40 µg/ml. El extracto bencénico produjo efecto uterotónico de 0.125± 0.07 mU/ml de oxitocina disminuyendo la respuesta de 1.25mU/ml de oxitocina en un 30± 5%.

Los extractos que se obtuvieron con diclorometano-metanol, metanol y agua por este mismo método, no presentaron actividad uterotónica (Tabla 5); 40 µg/ml del extracto disminuyó también en un 30 ± 5 % la respuesta de 1.25 mUI/ml de oxitocina de los segmentos uterinos que permanecieron en contacto con el extracto durante 40 minutos.

Por otra parte, los extractos bencénicos obtenidos por soxhlet no manifestaron un efecto uterotónico (Tabla 5). Los extractos con diclorometano-metanol y metanol no presentaron un efecto uterotónico repetitivo, por lo que su actividad no es clara, puesto que el 50 % de las pruebas resultaron positivas y el otro 50 % resultaron ser negativas. El extracto que sí presentó actividad fue el extracto acuoso; 40 µg/ml de este extracto indujeron una respuesta uterotónica equivalente a 0.02 ± 0.004 mUI/ml de oxitocina.

# de PRUEBA	EXTRACTO				Modificación de la Respuesta a OT.
	B. de P.	CH ₂ Cl ₂ /MeOH	MeOH	ACUOSO	
1	no activo	activo	no activo	activo	NO
2	no activo	no activo	activo	activo	NO
3	no activo	activo	activo	activo	NO
4	no activo	no activo	no activo	activo	NO

Tabla 5.- Pruebas *in vitro* de la extracción por soxhlet en útero de cobayo estrogenizado. En todos los casos se administró una dosis de 40 µg/ml de extracto. El extracto acuoso mostró efecto uterotónico de 0.02 ± 0.004 mU/ml de oxitocina. No hubo modificación de la respuesta a oxitocina.

En todos los extractos obtenidos por soxhlet no se observó modificación en la respuesta a oxitocina después de que los segmentos uterinos permanecieron en contacto con el extracto durante 40 minutos.

6.- METODOS ESPECTROSCÓPICOS.

a) ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Los tres ácidos derivados del Kaurano V. Gr. Kauradienoico, Kaurenoico y monoginoico fueron analizados por espectrometría de masas para corroborar sus estructuras cotejando los espectros obtenidos con los descritos previamente en la literatura (Caballero, 1970; Cannon,

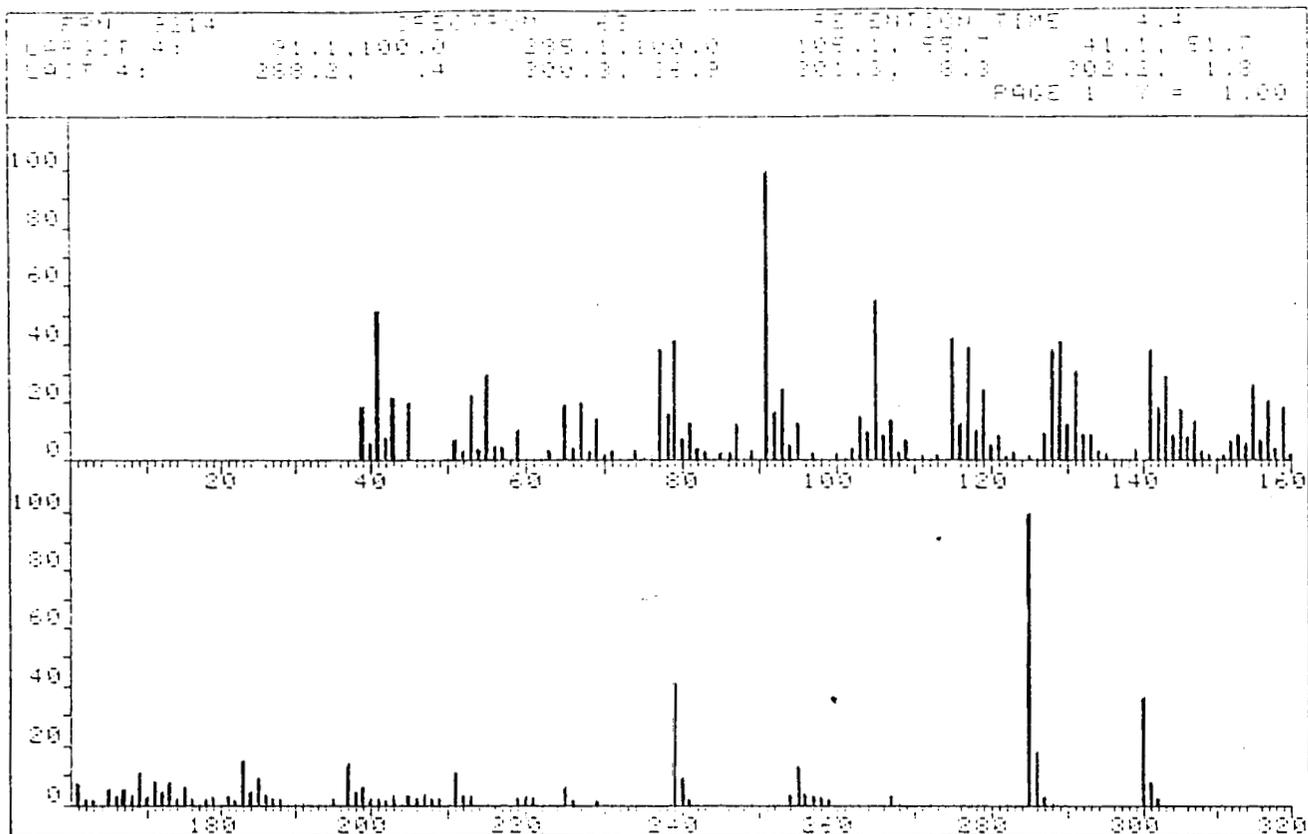


Figura 12. Espectro de masas del ácido grandiflorénico.

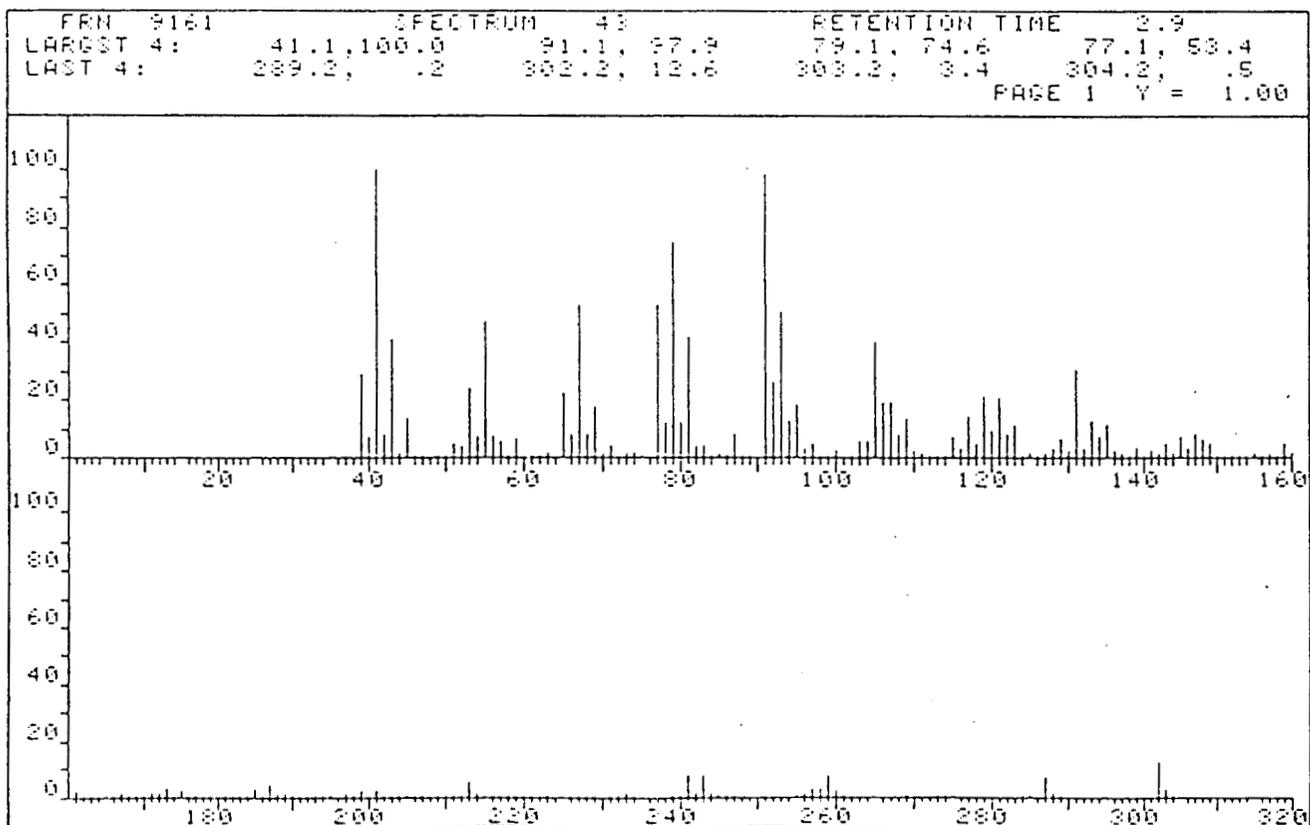


Figura 13. Espectro de masas del ácido kaurenoico.

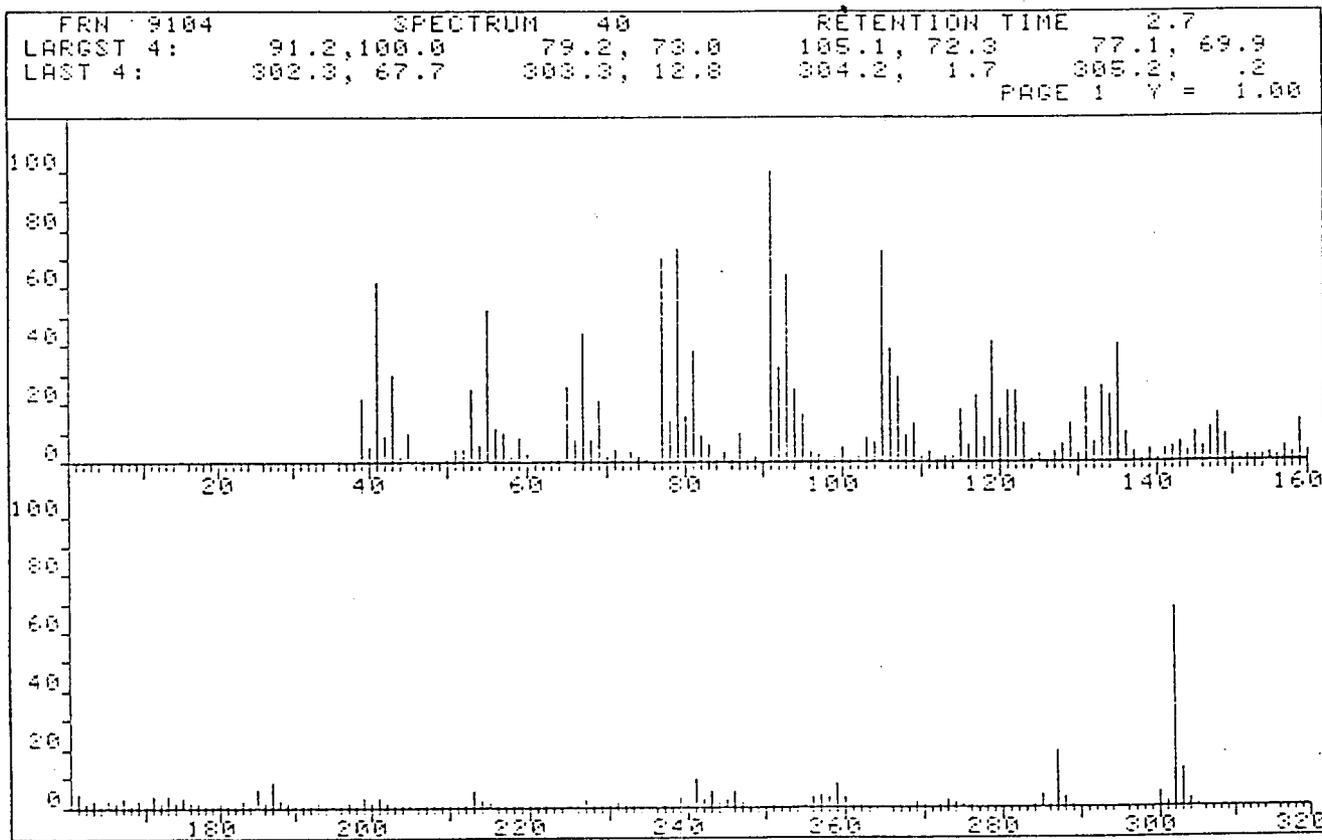


Figura 14. Espectro de masas del ácido monoginoico.

1966; Bohlman *et. al.*, 1983; Brieskorn *et. al.*, 1969; Kalinovsky *et. al.*, 1971). Los tres compuestos pudieron ser identificados para su seguimiento en cromatografía líquida.

b) RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.

Una vez puros y cotejados los espectros de masas obtenidos con los reportados anteriormente, se analizaron las sustancias por resonancia magnética nuclear de pulsos en un espectrómetro Varian VXR-300S de 300 MHz. Las muestras fueron disueltas en cloroformo deuteriado y sus espectros de rmn obtenidos en temperatura ambiente. Los desplazamientos químicos están dados en partes por millón. El régimen de acumulación de espectros permitió obtener en lapsos de 10 a 15 minutos trazos con suficiente relación señal/ruido para discernir claramente cada una de las estructuras.

Tanto el ácido Monoginoico como el Kaurenoico muestran la presencia de impurezas cada uno del otro.

Así, las fracciones eluidas del cromatógrafo de líquidos pudieron ser analizadas directamente por RMN de pulsos y sus estructuras corroboradas.

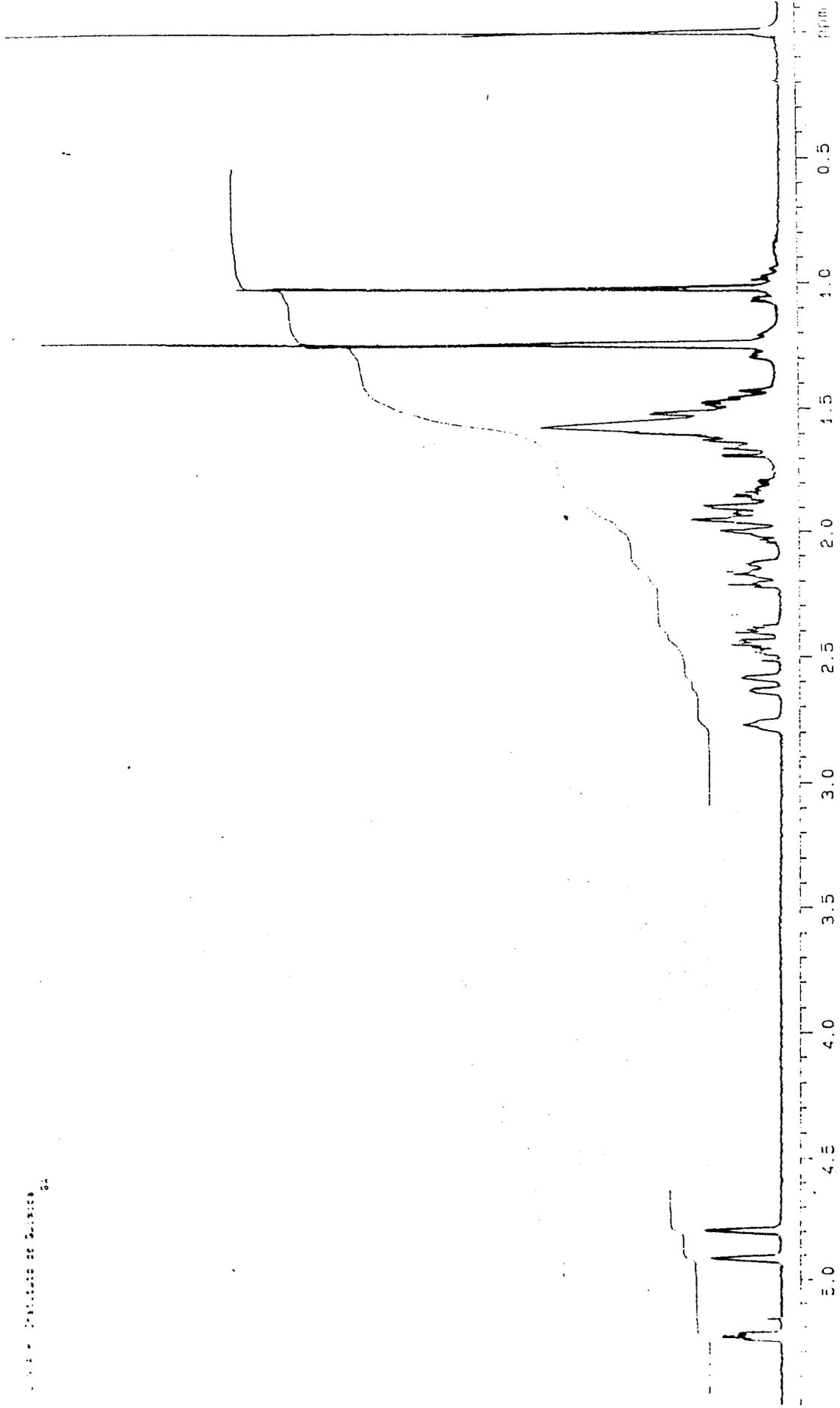


Figura 15. Espectro de RMN del ácido grandiflorónico.

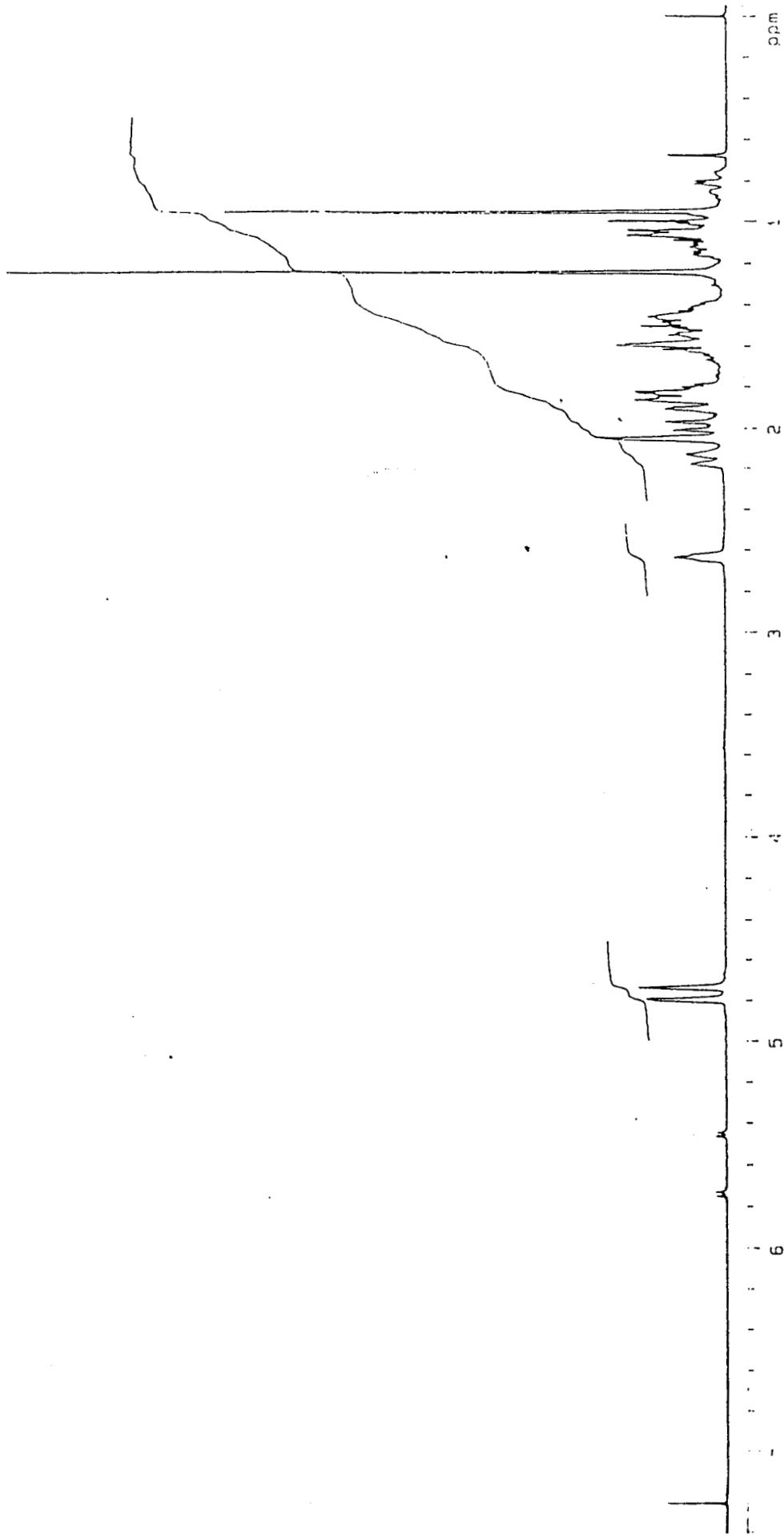


Figura 16. Espectro de RMN del ácido kaurenoico.

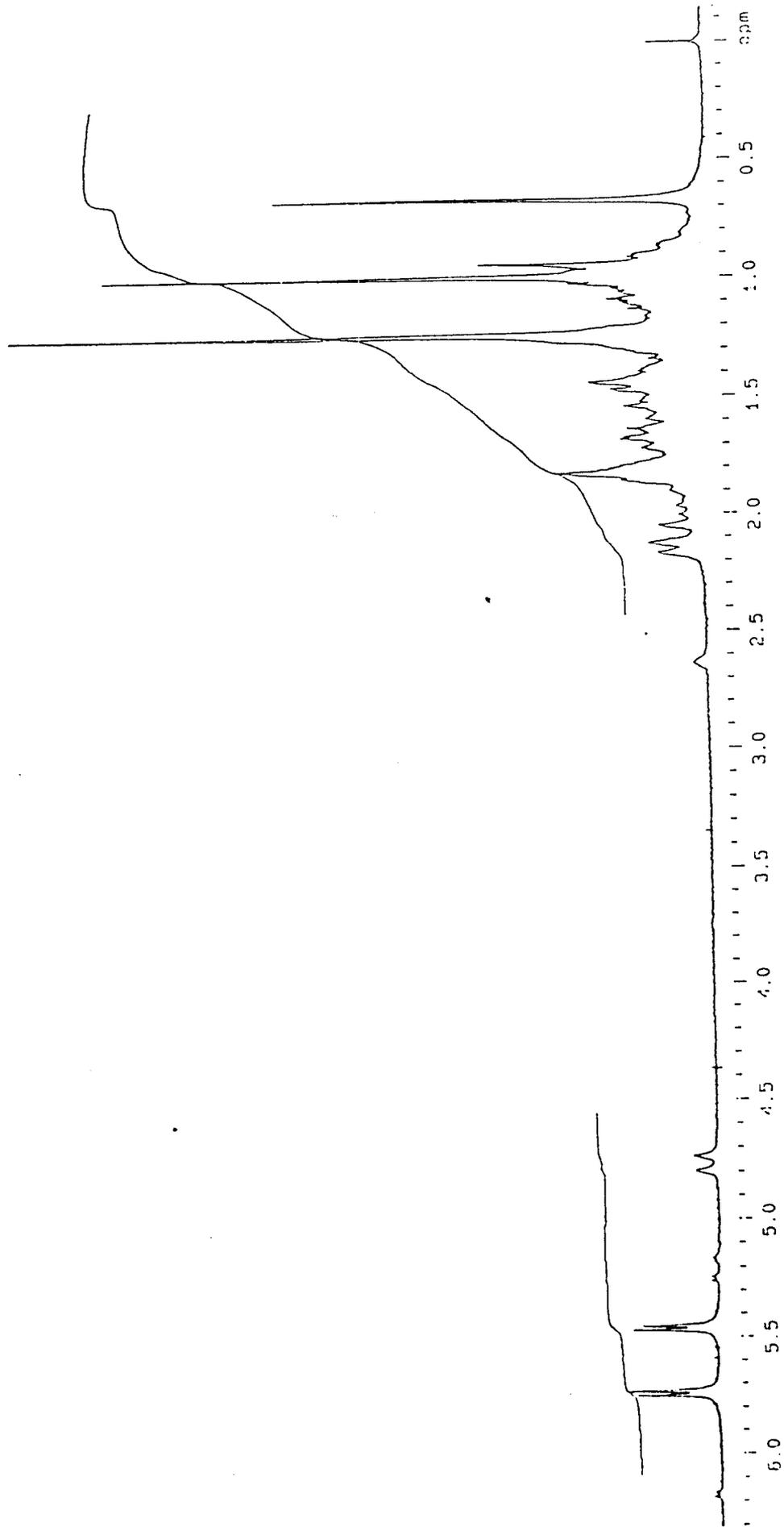


Figura 17. Espectro de RMN del ácido monoginoico.

DISCUSIÓN.

1.- TAMIZADO.

a) DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA EN EL TAMIZADO DE LA FLOR DE ZOAPATLE.

El conocer de una manera general la distribución de la partícula en un molido de planta implica de alguna manera el tener una idea de la extracción que se efectuará, ya que es bien sabido que entre mayor sea el área de contacto con el disolvente, la extracción será más efectiva. Al contrario de lo que se esperaba, no se observa una distribución homogénea (gausiana) en la distribución de partículas, sino que por el contrario, parece ser que se trata de una distribución heterogénea, al azar, donde el mayor número de material se encuentra en un rango de 1 a 1.4 mm de diámetro (Gráfica 1).

El hecho de que la distribución sea heterogénea, puede provocar que la extracción sea también heterogénea y que por consiguiente, las diferencias que existen en la manifestación del efecto puedan ser ocasionadas por este fenómeno de distribución. Esto conlleva a posteriores investigaciones donde sería conveniente realizar extracciones con cada una de las fracciones colectadas y poder detectar si existe o no variación en el número y tipo de componentes, así como en la manifestación o no de la actividad biológica atribuida a esta planta y que en un momento dado sirva como parámetro para estudios fitoquímicos en otras plantas medicinales.

2.- MÉTODOS Y DINÁMICA DE EXTRACCIÓN.

a) SEGUIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN POR CLAE Y CCF.

Es claro que en la extracción intervienen varios factores: el disolvente, su tiempo de contacto y el método particular de extracción empleado. En primera instancia se encuentra el método o tipo de extracción, esto es, si se trata de una decocción, infusión o extracción orgánica. Cada una es diferente, puesto que en la decocción e infusión, la temperatura facilita tanto la suspensión de sustancias hidrofóbicas como hidrofílicas debido al cambio conformacional que ocasiona el cambio de temperatura o por la presencia de compuestos anfotéricos. Por el contrario, en una extracción orgánica, la naturaleza química de los compuestos dependerá de la polaridad del disolvente que se utilice para tal efecto, sin olvidar que la presencia de ciertos compuestos facilita la difusión de otros en una polaridad muy diferente a la del disolvente empleado. Este fenómeno puede deberse a un cambio en la tensión superficial del medio, provocado por la naturaleza de los compuestos extraídos inicialmente.

En cuanto al método, se puede observar en los resultados (Gráfica 2,3) que efectivamente es otro parámetro, el cual debe ser considerado cada vez que se realicen extracciones. No se obtienen los mismos compuestos por ultrasonido que por Soxhlet (Figura 4, 6, 7 y 8), lo cual implica, que si se realizara una extracción por otro método como la maceración en reposo, los componentes pueden ser diferentes a los obtenidos por los métodos mencionados anteriormente.

Sin embargo, existirán compuestos comunes que pueden ser extraídos independientemente del método que se utilice quizá por su fácil difusión o por su mayor concentración en la planta.

La diferencia entre estos métodos, puede ser ocasionada por que en el soxhlet, la temperatura acelera y facilita la suspensión de compuestos, mientras que en una maceración simple, la extracción se efectúa por simple difusión de los compuestos en el medio; esta última es más lenta aunque segura, en cuanto a que la temperatura no es una variable a controlar, factor que puede interferir en la presencia de compuestos biológicamente activos. El ultrasonido por su parte, presenta ciertas ventajas sobre los anteriores y de hecho, este trabajo propone su empleo en este tipo de investigaciones fitoquímicas por su fácil manejo y velocidad de extracción; la eficiencia no es menor, ya que el ultrasonido, permite la ruptura de la membrana celular, provocando la difusión de un gran número de compuestos, semejante quizá, a la suspensión que podría encontrarse en la decocción; aunque también se debe tener cuidado en mantener la temperatura ambiente para evitar que esta variable no interfiera en los resultados.

El tiempo de contacto con el disolvente influye en la saturación de los compuestos difundidos durante la extracción así como con la naturaleza y concentración de los mismos, recalcando que aparentemente no se lleva a cabo una extracción exhaustiva, sino que se llega a un punto tal, en el que el tiempo deja de ser una variable dependiente y la cantidad del extracto obtenido es mínima pero constante. En los resultados puede observarse (Figura 4,6,7 y 8) que con un mismo disolvente, la extracción y concentración de compuestos varía con respecto al tiempo.

En el zoapatle, se encontraron ciertos aspectos de interés como es que en las primeras extracciones se obtiene la mayor cantidad de material extraíble (Gráfica 2,3). Esto no quiere decir, que una sola extracción sea suficiente, ya que en los cromatogramas (Figura 4,6,7 y 8) se observa que después de 5 y 78 h (por ultrasonido y soxhlet respectivamente) los compuestos que se extraen son de diferente polaridad; con los extractos bencénicos (Figura 4,6) se observa que en el primer cromatograma, por la forma de elución con el gradiente de acetonitrilo/agua, aparecen una serie de compuestos tanto ligeramente polares como no polares, prevaleciendo los primeros en los extractos finales. Esto resultaría ser ilógico si se considera que la bencina de petróleo es un disolvente no polar; por lo que se debería esperar únicamente compuestos hidrofílicos.

Con los extractos dicloro-metanólicos se observa un hecho semejante (Figura 7,8), en el primer extracto aparecen tanto compuestos polares como poco polares, prevaleciendo los primeros. Lo interesante en esta extracción se observa en los primeros extractos, donde se pueden determinar compuestos como los kaurenos (GA, KA y MO), los cuales no habían sido extraídos totalmente en la extracción con bencina de petróleo. Este hecho parece corroborar la hipótesis de que es necesaria la presencia de ciertas estructuras químicas para la extracción de compuestos con características diferentes al medio.

Los extractos metanólicos por su parte, mostraron algo nunca antes reportado en esta planta: la alta concentración de azúcares y de otros compuestos altamente polares, los cuales representan cerca de un 50 % del material extraído. Esto constituye un nuevo hallazgo siendo otra área que puede explotarse en cuanto a la identificación de estos compuestos polares y a la posibilidad de poder correlacionarlos con la actividad biológica o bien, para relacionarlos

con otras especies del mismo género (quimiotaxonomía).

Estos comportamientos fueron similares en los métodos de extracción empleados, a diferencia de que no todos los compuestos eran totalmente idénticos a los determinados por CLAE en un extracto obtenido por un método o por otro, lo que corrobora que el método es fundamental para la extracción de compuestos activos.

Al parecer, el aumento de polaridad, incrementa la cantidad de material extraído (Tabla 3) pues en general, se extrae un 15 ± 3 % del total del extracto con bencina de petróleo, un 25 ± 5 % con diclorometano-metanol y 55 ± 5 % con metanol, lo cual quiere decir, que para esta planta, se extrae la mayor cantidad de material al incrementarse la polaridad del disolvente.

b) CUANTIFICACIÓN DE LOS KAURENOS ANTES, DURANTE Y POSTERIOR A LA FLORACIÓN.

Desde que se iniciaron los estudios fitoquímicos en el zoapatle, no se ha observado un efecto uterotónico claro, por lo que se ha hipotetizado el hecho de que la época de colecta de la planta es fundamental, ya que la concentración de metabolitos puede no ser constante durante todo el año (Estrada, 1983); sin embargo, no se había realizado ningún trabajo al respecto. Aprovechando que en esta planta se conocen más de 40 compuestos, de los cuales 6 presentan efecto uterotónico, se decidió hacer un seguimiento de la concentración de 3 de ellos: ácido grandiflorénico, kaurenoico y monoginoico antes, durante y posterior a la floración y observar si ubiese o no un cambio radical en su concentración durante este período.

Los resultados muestran que en realidad estos compuestos no son constantes en todo el tiempo (Gráfica 4, 5), sino que existen días en los cuales su concentración es muy elevada, como es el caso del ácido grandiflorénico, y monoginoico y en otras ocasiones, pueden incluso no estar presentes. Curiosamente, los compuestos que tienden a estar presentes en menor cantidad son monoginoico y kaurenoico, aunque la biosíntesis de ellos parece estar ligada, si se observa la gráfica 5, donde hay un incremento en la concentración de ambos el mismo día. Con base en estos resultados, se propone realizar un estudio más profundo en este tema para reafirmar estos datos, tanto en el zoapatle como en cualquier otra planta medicinal, tomando otros parámetros fisiológicos como referencia e incluso se podría hacer un seguimiento desde el momento de la germinación hasta el estado de madurez de la planta.

Por otra parte, no se debe olvidar que existen otros factores como el trabajar con la especie adecuada (especie con mayor respuesta farmacológica), ya que no todas las especies de un mismo género presentan la misma respuesta. Además de la especie, también influyen la humedad, temperatura, altura, estado silvestre o las condiciones controladas de la misma (*v. gr.* crecimiento dentro de un invernadero) (Estrada, 1983).

104429

3.- PREPARACIONES BIOLÓGICAS.

a) IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDO GRANDIFLORÉNICO Y KAURENOICO EN EL EXTRACTO ACUOSO.

Recientemente apareció un artículo en cual se refutó que los kaurenos (GA, KA y MO) se encontraban en la decocción del zoapatle (Dong, 1989). Ello contradecía lo publicado

anteriormente por Enríquez *et. al.* (1983). Esto provocó el interés por corroborar la presencia de estos compuestos en el té y de este modo asegurar o no su presencia en esta forma de extracción. Esto es un factor importante por la atribución que se les ha hecho a estos compuestos en cuanto a la atribución del efecto uterotónico de esta planta. Los resultados muestran claramente que sí se encuentran presentes en la decocción acuosa (Figura 11) y por consiguiente no quedan excluidos como productos naturales biológicamente activos. Esta aparente contradicción se discute en términos de la forma de preparación de la muestra cuando se analiza por CLAE.

b) SUSPENSIONES ACUOSAS DE EXTRACTOS ORGÁNICOS

La necesidad de tener una suspensión acuosa permite un estudio más fidedigno y repetitivo que en otro tipo de suspensiones, las cuales pueden incluso ser nocivas al tejido u organismo con que se esté trabajando. Esta forma de suspensión de los extractos orgánicos, permite la resuspensión de prácticamente todos los compuestos extraídos (Figura 11).

El poder resuspender un extracto orgánico en un medio acuoso, medio semejante en el que se encuentran todos los tejidos vivos, evita el uso de estándares que podrían alterar la respuesta, por la presencia de sustancias sintéticas (polivinilpirrolidona, etilénglicól entre otras) y sobre todo, se elimina el efecto tóxico de las mismas.

4.-PRUEBAS FARMACOLÓGICAS *IN VITRO*.

Hasta la fecha no se ha establecido tampoco un método común para evaluar farmacológicamente los extractos tanto acuosos como orgánicos, provenientes de plantas medicinales con propiedades uterotónicas. En este trabajo se buscó establecer un bioensayo con segmentos uterinos de cobayo en condiciones controladas, es decir, los animales que se utilizaron se trataron con benzoato de estradiol para uniformizar el estado endócrino del animal (estro), lo cual permite una estandarización de la respuesta a oxitocina como lo muestran nuestros resultados. Los tejidos que no cumplían con este requisito fueron deshechados.

La diferencia de actividades entre los extractos obtenidos por ambos métodos puede deberse a que el ultrasonido rompe las membranas de las células permitiendo la liberación de todo el contenido intracelular, lo que hace una extracción más profunda en comparación con otros métodos. La presencia de tales compuestos dentro de toda la planta, provoca una cierta toxicidad al tejido incubado con los extractos obtenidos por este método. Esto habla de la presencia de compuestos tóxicos dentro de la planta, como son los kaurenos a los cuales se les ha atribuido propiedades antimicrobianas (Davino, 1989); o bien por la tolerancia que presenten éstos en el tejido.

Por otra parte, la extracción por soxhlet permite que a pesar de que se logre una extracción más eficiente, en cuanto a la cantidad de material extraído, la eficiencia en cuanto al número de componentes puede suponerse menor, debido a que no se incorporan algunas sustancias contenidas intracelularmente. También, la temperatura puede provocar modificaciones en la estructura química de los compuestos presentes en la planta y éstas a su vez, pueden modificar el efecto tóxico, en uno uteroevacuante.

Los resultados obtenidos con los extractos acuosos (soxhlet) pueden atribuirse a la presencia del ion potasio en estos extractos, el cual de acuerdo con Bulbring y Tomita (1969) este ion produce cambios electrofisiológicos en la membrana postsináptica y en consecuencia produce una contracción. Los efectos contráctiles de algunos extractos acuosos sobre la musculatura lisa se deben a la presencia del ion potasio contenido en los extractos acuosos provenientes de plantas como lo ha reportado Queiroz - Neto y Melito (1990). Ellos sugieren que el efecto contráctil producido por la infusión liofilizada de *Phoradendrom latiolium* sobre el músculo liso del conducto deferente de cobayo es resultado principalmente del efecto del ion potasio contenido en este liofilizado.

Como se puede observar, este trabajo ha permitido contribuir un poco en la elucidación de la dinámica que se sigue en la extracción de plantas con actividad farmacológica (específicamente el zoapatle), no con ello se quiere decir que este patrón de extracción deba repetirse en todos los casos, sino para que en próximos estudios se consideren los factores que se han mencionado anteriormente y que con esto se pueda estandarizar metodológicamente el estudio fitoquímico de plantas medicinales y así poder conocer con certeza lo que desde años atrás se ha manejado de manera tradicional y no se ha podido comprobar experimentalmente.

CONCLUSIONES.

El tiempo y la forma de extracción son determinantes para lograr la extracción reproducible de compuestos biológicamente activos, hecho que se refleja en la respuesta biológica de los extractos orgánicos.

El análisis de los extractos por cromatografía líquida de alta eficiencia muestra que la presencia de ciertos componentes facilita la difusión de otros con polaridad diferente al disolvente empleado para la extracción.

La extracción por soxhlet es más efectiva en función a la cantidad de material extraído, sin embargo, sólo los extractos acuosos presentaron actividad uterotónica.

La extracción con ultrasonido es más efectiva en cuanto al número de componentes pero la respuesta a oxitocina disminuye en los tejidos incubados con estos extractos

El extracto metanólico del zoapatle es el más abundante en ambos modos de extracción, aunque sin actividad uterotónica, y se compone principalmente de glucósidos o azúcares del tipo monosacárido. Este constituye el primer reporte sobre la naturaleza del extracto metanólico de zoapatle.

La forma de suspensión acuosa empleada en este estudio es un método rápido y eficiente que disminuye sensiblemente el factor de influencia de los vehículos de suspensión usualmente empleados en este tipo de modelo biológico.

La concentración de los compuestos dentro del zoapatle no son constantes en el tiempo, sino que presenta variaciones, lo que permite sugerir que además de todos los factores que se mencionaron anteriormente, la concentración de metabolitos específicos debe ser considerada al realizar un estudio fitoquímico con plantas medicinales.

BIBLIOGRAFÍA.

- ABBOTT, D. Introducción a la cromatografía. Alhambra. España. 121 pp. 1982.
- ALTAMIRANO, F. Estudio sobre el zihopactli o sinhuapaste. An. Ins. Med. Nac. Mex.1: 108-111.1895.
- BOHLMANN, F., CASTRO, V. AND JAKUPOVIC, J. Germacra-(10), 4-dien-cis-6, 12-olidos and elemanolidos from *Montanoa atriplicifolia*. Phytochem. 22 (5): 1223 - 1225. 1983.
- BOHLMANN, F., HIRSCHMANN, S. AND JAKUPOVIC, J. Further 6,12-cis-germacranolidos and eudesmanolidos from *Montanoa* species. J. Nat. Prod. 47 (4): 663 - 672. 1984.
- BEJAR, E. The *in vitro* effect of grandiflorene acid and zoapatle aqueous crude extract upon spontaneous contractility of the rat uterus during oestrus cycle. J. of Ethnopharmacol. 11: 87 - 97. 1984.
- BEJAR, E., LOZOYA, X., ENRIQUEZ, R. Y ESCOBAR, L. Efecto comparativo de los productos del zoapatle (*Montanoa tomentosa*) y del verapamil sobre la contractilidad uterina de la rata *in vitro*. Arch. Invest. Med. 15: 223 - 235. 1984.
- BEJAR, E. El efecto de la decocción de *Montanoa tomentosa* ssp. *tomentosa* (Zoapatle) y de su constituyente activo el ácido grandiflorénico sobre la contractilidad uterina. Tesis de maestría. en Biología Experimental U.A.M.-I. 1985.
- BRIESKORN, C. AND POHLMANN, E. Kauradien-(9(11), 16)-saure-(19) und 15a-acetoxycarenen-(16)-saure-(19). Chem. Ber. 102:2621-2628. 1969.
- BULBRING, E. AND TOMITA, T. Increase of membrane conductance by adrenaline in the smooth muscle of guinea pig *Taenia coli*. Proceeding of the Royal Society of London. B 172: 89-102. 1969.
- CABALLERO, Y. Y WALLS, F. Productos naturales del zoapatle. Bol. Inst. Quim. UNAM. 22: 79 - 102. 1970.
- CALDERON, J., OCAMPO, L. Y FERRER, J. Registros miográficos de los efectos del extracto de *Montanoa tomentosa* (zoapatle) sobre la actividad uterina de conejas de Nueva Zelanda. Veterinaria Mex. 8:78 - 80. 1977.
- CANNON, J., CHOW, P., JEFFERIES, P. AND MEEHAN, G. Isolation of (-)-kaura-16-en-19oic acid and 15B-hidroxy-(-) 1-1 kaura-16-en-19-oic acid from *Phebalium rude*. Aust. J. Chem. 19: 861-863. 1966.
- CASTRO, V. AND JAKUPOVIC, J. Two further 6,12-cis-germacranolidos from *Montanoa tomentosa* subsp. *xanthiifolia*. Phytochem. 24(10):2449-2450. 1985.
- CHEN, R. AND ROWARD, A. Total synthesis of (+) zoapatanol. J. Org. Chem. 47(7):1310-1339. 1982.
- COTA, F. Algo sobre el zihuatpatli. An. Inst. Med. Nac. Mex. 2: 43-60.1897.

- DAVINO, S., GIESBRECHT, A. AND ROQUE, N. Antimicrobial activity of kaurenoic acid derivatives substituted on carbon-15. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 22:211-225.1989.
- DE LILLE, J. Y RAMIREZ, E. Acción de *Montanoa myriocephala* sobre el músculo uterino. *Anal. Inst. Biol.* 4(2): 95-102.1933.
- DERBEZ, J., PARDO, E. Y DEL POZO, E.C. El cihuapatli activador de la motilidad uterina. *Bol. Inst. Est. Med. Biol.* III(56): 127-139.1945.
- DONG, X., HAMBURGER, M.,CORDELL, G. AND FONG, H. HPLC analysis of *Montanoa* species for pharmacologically active constituents. *Planta Medica* 55 (2):185-187. 1989.
- ENRIQUEZ, R., ESCOBAR, L., ROMERO, M., CHAVEZ, A. AND LOZOYA, X. Determination of grandiflorenic acid in organic and aqueous extracts of *Montanoa tomentosa* (zoapatle) by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chrom.* 358:297-301. 1983.
- ENRIQUEZ, R., BEJAR, E. Y LOZOYA, X. Importancia del ácido cauradienoico y su ester metilico en el efecto producido por *Montanoa tomentosa* sobre la contractilidad uterina *in vitro*. *Arch. Invest. Med.* 15:236-338. 1984.
- ESTRADA, A., ENRIQUEZ, R., LOZOYA, X., BEJAR, E., GIRON, H., PONCE-MONTER, H. AND GALLEGOS, A. The zoapatle II. Botanical and ecological determinants. *Contraception* 27(3): 227-237. 1983.
- FARNSWORTH, N. Preparation of suitable dosage forms of plants extracts for pharmacological evaluation in animals. University of Illinois at the Medical Center. Chicago, U.S.A.1988.
- FLORES, H., AYORA, T., MENDEZ, M. Y LOYOLA, V. Obtención de metabolitos secundarios a partir de raíces transformadas. *Ciencia y desarrollo XV* (86): 86-87. 1989.
- FONT, V. Distribution of genus *Montanoa* in Mexico and Central America. Tesis de Doctorado. University of Texas, Austin. 351 pp. 1981.
- FUJITA, E., FUJITA, T. AND NAGAO, Y. Terpenoids - XIX. Chemical conversion of enmein into ent-15-kaurene and ent-16-kaurene. *Tetrahedron* 28: 555-563. 1972.
- GALLEGOS, A. A traditional remedy from Mexico emerges to modern times. *Contraception* 27 (3): 211-225. 1983.
- GALLEGOS, A. The zoapatle VI. Revisited. *Contraception* 31 (5):487-497. 1985.
- GEISSMAN, T. AND GRIFFIN, T. Sesquiterpene lactones tomentosin from *Montanoa tomentosa* Cerv. *Rev. Latinoam. Quim.* 2: 81-83. 1971.
- GONZALEZ, A., RUIZ, I., ESTRADA, A., PEDRON, N. AND GALLEGOS, A. The zoapatle VIII. Ultrastructural changes in endometrium of rats. *Contraception* 31(5): 509-521. 1985.
- GOEWIE, C. E. Optimization of precolumn design in liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 301: 325-334. 1984.

- GREENE, A. AND MARK, E. Synthesis of oxoisodehydroleucodin: a novel guaianolide from *Montanoa imbricata*. *J. Org. Chem.* 54(6): 1468-1470. 1989.
- HAHN, D., ERICSON, E., LUI, M. AND PROBST, A. Antifertility activity of *Montanoa tomentosa* (zoapatle). *Contraception* 23(7): 133-140. 1983.
- HERZ, W. AND GOVINDAN, S. Trans, trans-germacra-1(10), 4-dien-cis-6, 12-olides from *Montanoa hibiscifolia*. *J. Org. Chem.* 45(6): 1113-1116. 1980.
- HOUSER, T., BIFTU, T. AND HSIEH, P. Extraction rate equation for Paprika and tumeric with certain organic solvents. *J. Agr. Food Chem.* 23(2):353-355. 1975.
- JOHNSON, F. Basic liquid chromatography. Varian. USA. 354 pp. 1978.
- KALINOVSKY, A., SEREBRYAKOV, E., SIMOLIN, A., KUCHEROV, V. AND CHIZHOV, O. The mass spectrometry of kaurene derivates II. *Organic Mass Spectrometry* 5: 33-39. 1971.
- KALISZAN, R. High performance liquid chromatography as a source of structural information for medical chemistry. *J. Chromatogr. Sci.* 22: 362-370. 1984.
- KANE, V. AND DOYLE, D. Total synthesis of (+) zoapatanol. *Tetrahedron letters* 22(32): 3031-3034. 1981.
- KANIOJA, R., WATCHER, M., LEVINE, S., ADAMS, R., CHEN, R., CHIM, E., COTTER, L., HIRCH, A., HUETTEMANN, R., KANE, V., OSTROWSKI, P. AND SHAW, C. Isolation and structural elucidation of zoapatanol and montanol, novel oxepane diterpenoids from the mixican plant zoapatle. *J. Org. Chem.* 47(7): 1310-1319. 1982.
- KAPADI, A. AND DEV, S. The diterpenoids of *Erythroxylon monynum* III. *Tetrahedron letters* 38: 2751-2757. 1964.
- KOCIENSKI, P., LOVE, C. AND WHITBY, R. A total synthesis of (+) zoapatanol and demethyl-ORF 13811. *Tetrahedron letters* 45(12): 3839-3848. 1989.
- LANDGREN, B., AEDO, A., HAGENFELDT, K. AND DICZFALUSY, E. Clinical effects of orally administered extracts of *Monanoa tomentosa* in early human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 135(4): 480-484. 1979.
- LEVINE, S., ADAMS, R., CHEN, R., COTTER, L., HIRSCH, A., KANE, V., KANIOJA, R., SHAW, C., WATCHTER, M., CHIN, E., HUETTEMANN, R. AND OSTROWSKI, P. Zoapatanol and montanol, novel oxepane diterpenoids from tha mexican plant zoapatle (*Montanoa tomentosa*). *J. Am. Chem. Sci.* 101(12): 3404-3405. 1979.
- LEWIS, N. Methyl migration in derivatives of grandiflorenic acid. *J. Chem. Soc.* 1279-1282. 1979.
- LOU-COTTER, M. ¹³C NMR spectral studies of zoatanol and montanol, novel diterpenes from *Montanoa tomentosa* (zoapatle) and their chemical derivatives. *Org. Mag. Res.* 17(1): 14-17. 1981.
- LOZOYA, X., ENRIQUEZ, E., BEJAR, E., ESTRADA, A., GIRON, H., PONCE-MONTER, H. AND GALLEGOS, A. The zoapatle V. The effect of kauradienoic acid upon uterine contractility. *Contraception.* 27(3): 267-279. 1983.

LU, Z., XUE, H., TU, Z., KONNO, C., WALLER, D., SOEJARTO, D., CORDELL, G. AND FONG, H. Studies on zoapatle VII. Angeloylgrandifloric acid, a spontaneous uterine contraction inhibitor (SUCI) from *Montanoa tomentosa* ssp. *tomentosa*. J. Nat. Prod. 50(5): 995-997. 1987.

MALONE, M. The pharmacological evaluation of natural products general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. J. of Ethnopharmacol. 8: 127-147. 1989.

MARCELLE, G., BUNYAPRAPHATSARA, N., CORDELL, G. AND FONG, H. Studies of zoapatle I. The extraction of zoapatle (*Montanoa tomentosa*) and the identification of 21-normontanol as the initial decomposition product of zoapatanol. J. Nat. Prod. 48(5): 739-745. 1985.

MATEOS, J.L., NOREIGA, R., HUETTEMAN, R. AND KANOJIA, R. M. Purification of uteroevacuant extracts from plant substances. U.S. PAT. 3996132. 1979.

Mc. COWN, L. Solvent properties and their effects on gradient elution high performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 352: 493-509. 1986.

MORIWAKI, K., GOMI, M., ITOH, Y., IIDA, S., TSUGAWA, M., TARUI, S., FUJI, K., NODE, M. AND KAJIMOTO, T. Steroidogenic effect of ent-kaur-16-en-15B-ol (kaurenol) on isolated rat adrenal cells. Life Science 38(5): 453-458. 1986.

NICOLAOU, K., CLAREMON, D. AND BARNETTE, W. Total synthesis of (+) zoapatanol. J. Am. Soc. 102(21): 6611-6612. 1980.

OSHIMA, Y., WONG, S., KONNO, C., CORDELL, G., WALLER, D., SOEJARTO, D. AND FONG, H. Studies on zoapatle II. Leucanthanolide, a novel sesquiterpene lactone from *Montanoa leucantha* ssp. *leucantha*. J. Nat. Prod. 49(2): 313-317. 1986a.

OSHIMA, Y., CORDELL, G. AND FONG, H. Studies on zoapatle III. Flavonoid glycosides from *Montanoa tomentosa* ssp. *tomentosa*. J. Nat. Prod. 49(3): 552-553. 1986b.

OSHIMA, Y., CORDELL, G. AND FONG, H. Oxepane diterpenes from *Montanoa tomentosa*. Phytochem. 25(11): 2567-2568. 1986c.

PEDRON, N., ESTRADA, A., PONCE-MONTER, H., VALENCIA, A., GUZMAN, A. AND GALLEGOS, A. The zoapatle VII. Antiimplantation effect in the rat of zoapatle aqueous crude extract (ZACE) from *Montanoa tomentosa* and *Montanoa frutescens*. Contraception 31(5): 499-507. 1985.

PERRUSQUIA, M., SANCHEZ, E., PONCE-MONTER, H., ESTRADA, A., PEDRON, N., VALENCIA, A. AND GALLEGOS, A. The zoapatle XI. Effects elicited by *Montanoa tomentosa* and *Montanoa frutescens* on rat uterine strips. Contraception 31(5): 543-551. 1985.

PIOZZI, F., SPRIO, V., PASSANNANTI, S. EMONDELLI, R. Struttura dell'acido grandiflorolico. Gazz. Chim. Ital. 98: 907-910. 1968.

PIOZZI, F., MARINO, M. AND SPRIO, V. Structure of grandiflorenic acid. Can. J. Chem. 50: 109-112. 1972.

PONCE-MONTER, H., GIRON, H., LOZOYA, X., ENRIQUEZ, R., BEJAR, E., ESTRADA, A. AND GALLEGOS, A. The zoapatle III. Botanical and uterotonic properties of aqueous plant extract. *Contraception* 27(3): 227-237. 1983.

PONCE-MONTER, H., ESTRADA, A., PEDRON, N., VALENCIA, A. AND GALLEGOS, A. The zoapatle X. The in vitro effect of zoapatle aqueous crude extract (ZACE) and histamine upon rat and guinea pig uterine strips. *Contraception* 31(5): 533-541. 1985.

PONCE-MONTER, H., CAMPOS, G., PEDRON, N., DE LA TORRE, L., VILLANUEVA, T., GALLEGOS, A., ROMO DE VIVAR, A., AZPEITIA, E. AND PEREZ, A. The zoapatle XV. Activity of 16 α -hidroxy-ent-kauran-19-oic acid isolated from *Montanoa hibiscifolia* and its methyl ester on rat guinea pig uterus. *J. Ethnopharmacol.* 24:127-134. 1988.

PONCE MONTER, H. Comunicación personal. 1990.

QUEIROZ-NETO, A. AND MELITO, I. Changes in sensitivity of the isolated guinea-pig vas deferens induced by lyophilized *Phoradendron latifolium* leaf infusion. *J. of Ethnopharmacol.* 28:183-189. 1990.

QUIJANO, L., CALDERON, J., GOMEZ, F. AND RIOS, T. Montafrusin, a new germacrolide from *Montanoa frutescens*. *Phytochem.* 18: 843-845. 1979.

QUIJANO, L., CALDERON, J., GOMEZ, F. AND RIOS, T. Zoapatanolide A and B, two new heliangolides from *Montanoa tomentosa*. *Phytochem.* 21(8): 2041-2044. 1982.

QUIJANO, L., CALDERON, J., GOMEZ, F., LOPEZ, J., RIOS, T. AND FRONCZEK, F. The crystal structure of 6-epi-desacetyl-laurenobiolide a germacra-1(10), 4-diene-12, 8 α -olide from *Montanoa grandiflora*. *Phytochem.* 23(9): 1971-1974. 1984a.

QUIJANO, L., GOMEZ, F., CALDERON, J., LOPEZ, J. AND RIOS, T. Zoapatanolides C and D. Two guaianolides from *Montanoa tomentosa*. *Phytochem.* 23(1): 125-127. 1984b.

QUIJANO, L., CALDERON, J., GOMEZ, F., ROSARIO, V. AND RIOS, T. Oxepane diterpenoids and sesquiterpene lactones from "zoapatle" (*Montanoa tomentosa*) a mexican plant with oxytocic activity. *Phytochem.* 24(10): 2337-2340. 1985.

QUIJANO, L., CALDERON, J., GOMEZ, F., ROSARIO, V. AND RIOS, T. Acyclic precursors of the uterotonic oxepane diterpenoids of "zoapatle" (*Montanoa tomentosa*). *Phytochem.* 24(11): 2741-2743. 1985.

QUIJANO, L., CALDERON, J., GOMEZ, F., BAUTISTA, S. AND RIOS, T. Four eudesmanolides from *Montanoa frutescens*. *Phytochem.* 24(4): 861-862. 1985.

QUIJANO, L., CALDERON, J., GOMEZ, F., BAUTISTA, S. AND RIOS, T. Montafrusin B, a germacrolide from *Montanoa frutescens* and the molecular structure of montafrusin A. *Phytochem.* 25(3): 695-697. 1986.

RAMIREZ, E. Contribución al estudio de la acción farmacodinámica del zoapatle. *Rev. Mex. de Biol.* 125-130.1979.

SEAMAN, F., MALCOLM, A. AND FISCHER, N. Tomexanthin, an oxepane diterpene from *Montanoa tomentosa*. *Phytochem.* 23(2): 464-465. 1984a.

SEAMAN, F., MALCOLM, A. AND FISCHER, N. Germacra-12, 6B-olides from *Montanoa revedii* and *Montanoa mollissima*. *Phytochem.* 23(5): 1063-1066. 1984b.

SEAMAN, F., MALCOLM, A., FRONCZEK, F., LEE, I. AND FISCHER, N. Guaianolide-type sesquiterpene lactones of *Montanoa tomentosa* ssp. *xanthiifolia* and *Montanoa tomentosa* ssp. *rosei* and the molecular structures of two pumilin analogs. *Phytochem.* 23(4): 817-822. 1984c.

SEAMAN, F. AND BENCSATH, A. A eudesmane acid from *Montanoa speciosa*. *Phytochem.* 24(3): 607-608. 1985a.

SEAMAN, F., MALCOLM, A. AND FISCHER, N. Sesquiterpene lactones of *Montanoa guatemalensis* and *Montanoa tomentosa* ssp. *xanthiifolia*. *Phytochem.* 24(9): 2003-2005. 1985b.

SEAMAN, F. Isodehydroleucodin and another novel cis-lactonized guaianolide from *Montanoa imbrincata*. *Phytochem.* 25(11):2663-2664. 1986.

SEGURA, J. Otención de metabolitos secundarios de interés farmacológico a partir de cultivo de tejidos vegetales. *Rev. Soc. Quim. Mex.* 33(2): 30-41. 1989.

SENTIES, L. Y AMAYO, R. IV. Symposium sobre avances en el estudio de la contractilidad uterina. Efecto del cihuapatli sobre el utero humano grávido. *Gac. Med. Mex.* XCIV. 4:343-350.1964.

SMITH, B., SMITH, E., LEFER, A. AND NICOLAOU, K. Spasmogenic effects of the anti-fertility agent zoapatanol. *Life Sciences* 28(24): 2743-2745. 1981.

SOUTHAM, L., PEDRON, N., PONCE-MONTER, H., GIRON, H., ESTRADA, A., LOZOYA, X., ENRIQUEZ, R., BEJAR, E. AND GALLEGOS, A. The zoapatle IV. Toxicological and clinical studies. *Contraception* 27(3): 255-259. 1983.

WANI, M., VISHNUVAJALA, R., SWAIN, W., RECTOR, D., COOK, C., PETROW, V., REEL, J., ALLEN, K. AND LEVINE, S. Synthesis and biological activity of zoapatanol analogues. *J. Med. Chem.* 26(3): 426-430. 1983.

WENS, M., VALENCIA, A., PEDRON, N., PONCE-MONTER, H., GUZMAN, A. AND GALLEGOS, A. The zoapatle IX. In vitro effect of *Montanoa tomentosa* and *Montanoa frutescens* upon sperms and red cells. *Contraception* 31(5): 523-532. 1985.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco sinceramente al Dr. Raúl Enríquez Habib por la dirección del presente trabajo.

A mis asesores, Dra. Laura Pérez Flores, Dr. Rubén Román Ramos y al M. en C. Héctor Ponce-Monter, por su valiosa colaboración y constante apoyo.

Quiero expresar también mi agradecimiento a la Quím. Lucía del Carmen Márquez por su gran aportación en el desarrollo analítico del trabajo experimental; al Quím. Fernando Jáuregui y al Quím. Luis Velasco por su cooperación en el análisis de espectroscopía de masas. Al Dr. José Calderón Pardo por las facilidades institucionales otorgadas en la realización de este trabajo.

También deseo dar reconocimiento a la M. en C. Abigaíl Aguilar y al Biól. Héctor Nieto por su participación en la preparación e identificación taxonómica del zoapatle. A la MVZ Laura Godínez y a la Biól. Patricia Campos, por su ayuda en la realización de las pruebas farmacológicas.

Agradezco sinceramente al Sr. Abelardo Cuéllar por el material fotográfico que preparó; al Sr. Rafael García Yáñez y al Sr. Reynaldo García Delgado por su disponibilidad en la proporsión de material de laboratorio. A Irma Evelia Arenas y Jorge Villamil por su colaboración en la parte de cómputo.

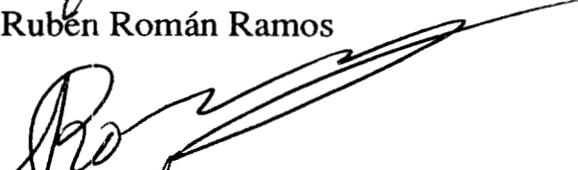
Finalmente deseo dar las gracias a mis compañeros de laboratorio: Quím. Fidel Pérez Moreno, Erick Pettersen, Gil Alfonso Magos Guerrero, José Luis Arias Téllez y Rocío Ortiz, por su constante apoyo, así como al Dr. Eduardo Díaz, Dr. Armando Cabrera y Dr. Noé Rosas; a mis amigos: Cirenía Pérez González, Jaime Figueroa Daza, María Elena Jaime, Mónica Fernández, Norma Nájera, Francisco Alarcón, Jose Luis Flores, Alicia Lara y Sandra Mallorca.

104429

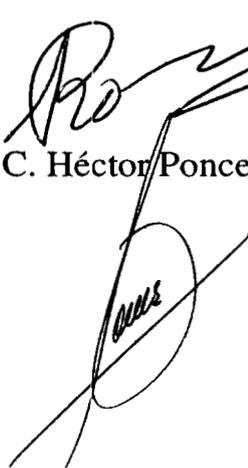
El jurado designado por el Departamento de Ciencias de la Salud de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, aprobó la presente tesis de maestría el día /o de julio de 1991.



Dr. Raúl Enríquez Habib



Dr. Rubén Román Ramos



M. en C. Héctor Ponce-Monter