

Programa de Estudios de Posgrado

**COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y
CITOTÓXICA AISLADOS DE RECURSOS NATURALES DE
BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos
Naturales
(Orientación en Biotecnología)

p r e s e n t a

Jesús Iván Murillo Álvarez

La Paz, Baja California Sur. Junio del 2003.

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 9:00 horas del día 15 del Mes de Abril del 2003, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., para revisar la Tesis de Grado titulada:

"Compuestos con actividad antimicrobiana y citotóxica aislados de recursos naturales de Baja California Sur, México."

Presentada por el alumno:

Jesús Iván Murillo Álvarez


Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN BIOTECNOLOGÍA.

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

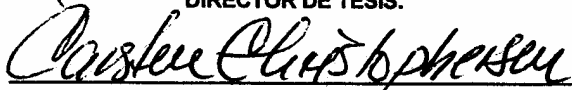
LA COMISION REVISORA



DRA. ROSALBA ENCARNACIÓN DIMAYUGA,
DIRECTOR DE TESIS.



DR. HÉCTOR NOLASCO SORIA,
DIRECTOR DE TESIS INTERNO.



DR. CARSTEN CHRISTOPHERSEN,
CO-TUTOR.



DR. WILLIAM FENICAL,
CO-TUTOR.



DRA. OFELIA ESPEJO GONZÁLEZ,
CO-TUTOR.



DRA. THELMA-ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO.

**Tesis de Doctorado en Ciencias en el
Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
con Orientación en Biotecnología.**

Jesús Iván Murillo Álvarez.

Comité Tutorial y Evaluador.

Tutor Principal: Dra. Rosalba Encarnación Dimayuga.
Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B. C. S., México.

Tutor Principal Interno: Dr. Héctor Nolasco Soria.
Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, B. C. S., México.

Co-tutor: Dr. Carsten Christophersen.
Universidad de Copenhague. Copenhague, Dinamarca.

Co-tutor: Dr. William Fenical.
Universidad de California, San Diego. San Diego, CA, Estados Unidos de América.

Co-tutor: Dra. Ofelia Espejo González.
Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.

Comisión Revisora de Tesis.

Dra. Rosalba Encarnación Dimayuga.
Dr. Héctor Nolasco Soria.
Dr. Carsten Christophersen.
Dr. William Fenical.
Dra. Ofelia Espejo González.
Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes. CIBNor, S. C.

Miembros del Jurado de Examen Doctoral

Dra. Rosalba Encarnación Dimayuga.
Dr. Héctor Nolasco Soria.
Dr. Adolfo García González. IMSS.
Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz. CIBNor, S. C.
Dr. Ricardo Vázquez Juárez. CIBNor, S. C.
Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra. CIBNor, S. C.

RESUMEN de la tesis: **COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA AISLADOS DE RECURSOS NATURALES DE BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO**, presentada por Jesús Iván Murillo Álvarez como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, con orientación en Biotecnología. La Paz, B. C. S., México. Mayo del 2003.

Aprobado por:



Dra. Rosalba Encarnación Dimayuga.
Directora de tesis.

Las plantas, animales y microorganismos de hábitat terrestre o acuático son capaces de sintetizar compuestos químicos que ejercen diversos efectos biológicos sobre otros organismos vivos. Ese es el principio que sustenta el estudio de la diversidad biológica en búsqueda de nuevos agentes biomédicos. En nuestro interés por contribuir a la solución del problema que representan el cáncer y las enfermedades infecciosas, como la tuberculosis, nos propusimos seleccionar y estudiar algunos recursos naturales de Baja California Sur, México, como fuente de compuestos con actividad antimicrobiana y citotóxica *in vitro*.

En la primer parte de esta investigación, los extractos de 25 plantas medicinales de Baja California Sur, pertenecientes a 11 familias botánicas, fueron sometidos a un estudio de selección biológica por su actividad antimicrobiana y citotóxica, con énfasis en su actividad antimicobacteriana. Los extractos etanólicos de *Bursera odorata*, *Asclepias subulata* y *Haplopappus sonorensis* fueron los más activos contra *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv. De esas plantas, *H. sonorensis* fue seleccionada para estudio considerando su actividad contra *M. tuberculosis*, el extendido uso medicinal de esta planta en Baja California Sur y la ausencia de estudios enfocados en los principios activos de esta especie. Los extractos crudos de éter de petróleo y de CH₂Cl₂ de *H. sonorensis* fueron fraccionados guiándonos con bioensayos, lográndose el aislamiento de 3 flavonas conocidas (**1** – **3**), cuya actividad antimicobacteriana es reportada por primera vez. Adicionalmente el octocoral del Golfo de California *Muricea* cf. *austera* fue seleccionado para bioprospección basándonos en reportes recientes acerca de su actividad antimicrobiana. El estudio de *M. austera* derivó en el aislamiento de 2 nuevos glucósidos esteroidales (**5** – **6**) de los cuales, **5** mostró actividad citotóxica *in vitro* contra células tumorales de colon humano. Además de esta misma fuente fue aislado un trihidroxi esterol conocido (**4**) activo contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.

Palabras claves: antimicrobianos, citotoxicidad, flavonas, esteroides, Baja California Sur.

Abstract.

Plants, animals and microorganisms from terrestrial or aquatic habitats, are capable to synthesizing chemicals that exert different biological effects on other living organisms. This fact, is the principle that supports the study of the biological diversity in search for new biomedical agents. During our efforts to contribute to the solution of the problems associated with cancer and infectious diseases, such as tuberculosis, we decided to select and study some natural resources from Baja California Sur, Mexico, as source of antimicrobial and cytotoxic compounds.

In the first part of this research, extracts from 25 medicinal plants from Baja California Sur, Mexico, belonging to 11 botanical families, were subjected to antimicrobial and cytotoxic tests, with emphasis on antimycobacterial activity. Ethanol extracts from *Bursera odorata*, *Asclepias subulata*, and *Haplopappus sonorensis* were the most active against *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv. From those plants, *H. sonorensis* was selected for study as a result of its biological activity, its extended use in the Baja Californian traditional medicine, and the lack of studies focused on active principles in this species. Light petroleum and CH₂Cl₂ extracts from *H. sonorensis* were bioassay-guided fractionated and led us to the isolation of 3 known flavones (**1 – 3**), the antimycobacterial activity of which is reported by first time. In addition, the Gulf of California octocoral *Muricea* cf. *austera* was selected for bioprospecting, based on recent reports describing its antimicrobial activity. From this selection we found 2 new steroid glycosides (**5 – 6**), of which, **5** showed cytotoxic activity against human colon tumor cells. Furthermore the known trihydroxy sterol (**4**) active against *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus subtilis* was isolated.

Key words: antimicrobials, cytotoxicity, flavones, steroids, Baja California Sur.

Agradecimientos.

Esta investigación es una contribución al conocimiento del potencial de los recursos naturales de Baja California Sur en la búsqueda de compuestos bioactivos. Aunque aún debe hacerse mucho trabajo en este campo, la maravillosa diversidad biológica de este lugar, es por si sola, una inspiración para continuar con su exploración. Cuando fui introducido al campo de la química de los productos naturales, no imaginaba cuan sorprendente sería el camino que recorrería para ir desde el océano y el desierto hasta los espectrómetros en búsqueda de aquellas moléculas maravillosas. Mi experiencia estuvo llena de satisfacciones, debido a todas aquellas personas que me acompañaron en esta “aventura”.

En primer lugar, agradezco a mi mentor, la Profesora Rosalba Encarnación Dimayuga, quien con su paciencia, sabios consejos y su devota dedicación, ha sido la persona más influyente en mi formación científica. A los Profesores Carsten Christophersen y William Fenical les agradezco la oportunidad y todas las facilidades que me brindaron para realizar dos fructíferas estancias de investigación en sus laboratorios, en donde conocí a muchos jóvenes investigadores. También les agradezco el que me hayan introducido al campo de la espectroscopía moderna, sin lo cuál mi formación no hubiera sido completa. Quiero agradecer también, a los Profesores Héctor Nolasco Soria y Ofelia Espejo González porque ellos, junto con las personas mencionadas arriba, formaron parte de mi comité tutorial y de evaluación.

Agradezco a mis amigos Dr. Joan Malmstrøm y Dr. Lik Tan Tong por su gran ayuda y útiles discusiones en la identificación estructural de los compuestos reportados en este estudio. Mil gracias a los estudiantes y personal del Laboratorio de Farmacognosia, en la Universidad Autónoma de Baja California Sur, quienes han sido como mi familia y siempre me ayudaron sin ambicionar nada a cambio, un valor que armonizó nuestra convivencia desde el principio y que seguramente continuará en el futuro.

Quiero dar el crédito correspondiente a todos aquellos que ayudaron durante esta investigación. Lorena León Deniz, Xavier Carrillo Olivares, Elodia Ruiz, Diana Medina Hernández, Sara Kelly y Anita N. Biswas estuvieron involucrados en las pruebas de actividad biológica de los extractos crudos, fracciones y compuestos puros. El M. en C. Jorge Manuel Agúndez Espinoza y el B. M. Martín García (UABCS) realizaron la identificación taxonómica de los organismos estudiados aquí. El Dr. Ellis Glazier colaboró en varias ocasiones como editor de textos en lengua inglesa. Mónica Ortiz y Juan Miguel Velasco, durante sus estancias de investigación de verano en nuestro laboratorio, participaron en el fraccionamiento de los extractos de *H. sonorensis*, a todos ellos mil gracias.

En este tiempo, tuve el placer de participar en dos cursos auspiciados por el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), el primero en la Ciudad de Mérida, y el segundo en La Paz. Estos cursos, junto con varios congresos nacionales e internacionales y dos estancias de investigación en La Universidad de Copenhague y la Universidad de California, San Diego, fueron experiencias importantes en mi formación científica y una gran oportunidad para establecer buenas relaciones con gente que trabaja activamente en el campo de los productos naturales, lo cual contribuyó

notoriamente en mi formación científica. Adicionalmente, tuve contacto con numerosas personalidades que sin saberlo fueron una fuente de inspiración para mí, a través de sus vibrantes lecturas o reveladoras discusiones, ellos son:

Profesor Emérito Paul J. Scheuer (Q.E.P.D) University of Hawaii.

Profesor Kurt Hostettmann, University of Lausanne.

Profesor Robert Verpoort, Amsterdam Vrije Universiteit.

Dr. Helmut Wiedenfeld, University of Bonn.

Profesor Carmen Rivera, Universidad Nacional Autónoma de México.

Profesor John Faulkner (Q.E.P.D.), Universidad de California, San Diego.

Profesor Arturo San Feliciano, Universidad de Salamanca.

Profesor Pedro Joseph-Nathan, Instituto Politécnico Nacional.

Dra. Valerie Paul, University of Hawaii at Manoa.

Dr. Paul Jensen, Universidad de California, San Diego.

Dr. Abimael Rodríguez, Universidad de Puerto Rico.

Profesora Clara Nogueiras Lima, Universidad de la Habana.

Dr. Andrew Marston, University of Lausanne.

Profesor Lars Bohlin, University of Uppsala.

Profesor Alberto Ximenez, Universidad de Bolivia.

Esta investigación fue financiada y conducida dentro del Programa de Investigación Farmacognóstica de los recursos naturales de Baja California Sur del Departamento de

Agronomía de la UABCS, por lo cual me siento agradecido con las autoridades universitarias por todas las facilidades brindadas para el desarrollo de este trabajo.

También debo dar las gracias a la UABCS, por haber financiado parcialmente esta investigación, al Fondo para el Mejoramiento de Educación Superior (FOMES-97) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, ref. No. 4105P-9608 y 43333100-5-34984-E). Además, agradezco al CONACYT el otorgamiento de la beca de manutención (No. 124966) que me permitió dedicarme enteramente a mi formación académica sin tener que ocuparme de otras cosas.

No puedo dejar de expresar mi profundo agradecimiento a la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. por haberme aceptado como doctorante externo en la UABCS, por todas las facilidades logístico-administrativas y por haberme ayudado con el financiamiento parcial de estancias de investigación, asistencia a congresos, cursos y las reuniones de comité tutorial.

Quiero dar las gracias a mis amigos de la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera “Bahía Tortugas”, S. C. L. por el apoyo que me brindaron a lo largo de mi formación académica.

Finalmente, agradezco profundamente a mi familia y amigos por mostrarme cuan hermosa puede ser la vida, si se hace cualquier cosa con amor.

Jesús Iván Murillo Álvarez.
Verano del 2003.

Contenido.

Página

Lista de abreviaciones.

1. Introducción	1
1.1. Importancia de los productos naturales en el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes terapéuticos	2
1.2. Baja California Sur y su diversidad biológica como fuente de compuestos activos	7
2. Materiales y métodos	12
2.1. Selección de plantas medicinales no-citotóxicas con actividad inhibitoria contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
2.1.1. Material vegetal y preparación de extractos	12
2.1.2. Organismos de prueba	14
2.1.3. Ensayo de actividad antimicobacteriana por el método radiométrico BACTEC 460	14
2.1.4. Ensayo de actividad citotóxica	15
2.1.5. Ensayo de difusión en agar por disco	15
2.2. Selección de un invertebrado marino del Golfo de California	16
2.3. Aislamiento de compuestos activos a partir de organismos seleccionados	17
2.3.1. <i>O</i> -Metil derivados del kaemferol activos contra <i>M. tuberculosis</i> a partir de <i>Haplopappus sonorensis</i>	17
2.3.2. Nuevos glucósidos con aglucón tipo pregnadieno, a partir de <i>Muricea</i> cf. <i>austera</i>	19
2.4. Elucidación estructural de los compuestos aislados	19
3. Resultados	21
4. Discusión	25
5. Conclusiones y recomendaciones	33
6. Literatura citada	34

Artículo discutidos en esta tesis.

- Murillo-Alvarez, Jesús Iván; Encarnación-Dimayuga, Rosalba; Franzblau, Scott G. (2001) Antimicrobial and cytotoxic activity of some medicinal plants from Baja California Sur (Mexico). *Pharmaceutical Biology* 39(6): 445-449.
- Murillo, Jesús I.; Encarnación-Dimayuga, Rosalba; Malmstrøm, Joan; Christophersen, Carsten; Franzblau, Scott G. (2003) Antimycobacterial flavones from *Haplopappus sonorensis*. *Fitoterapia* 74(3): 226-230.
- Murillo-Álvarez, Jesús Iván; Encarnación-Dimayuga, Rosalba. New bioactive pregnadiene-derived glycosides from the Gulf of California gorgonia *Muricea* cf. *austera*. *Pharmaceutical Biology* (En prensa). Recibido: 15 de Noviembre del 2002; aceptado: 2 de Junio del 2003.

Lista de abreviaciones.

[M] ⁺	ión molecular.
¹³ C-NMR	resonancia magnética nuclear de ¹³ C.
¹ H- ¹ H COSY	espectroscopia de correlación ¹ H a ¹ H.
¹ H-NMR	resonancia magnética nuclear de ¹ H.
ATCC	American Type Culture Collection.
CD ₃ OD	metanol deuterado.
CDCl ₃	cloroformo deuterado.
CH ₂ Cl ₂	diclorometano.
CHCl ₃	cloroformo.
DEPT	mejoramiento sin distorsión por cambio de polarización.
DMSO	dimetilsulfóxido.
EIMS	espectrometría de masas por impacto electrónico.
ESIMS	espectrometría de masas por electrospray
EtOAc	acetato de etilo.
EtOH	etanol.
FT IR	infrarrojo por transformada de Fourier.
HCT-116	línea celular de carcinoma de colon humano.
HMBC	correlación heteronuclear de enlace múltiple
HMQC	correlación heteronuclear múltiple cuántica.
HPLC	cromatografía de líquidos de alta resolución.
IC ₅₀	concentración inhibitoria media.
IC ₅₀	concentración media inhibitoria.
KBr	bromuro de potasio
LC-MS	cromatógrafo de líquidos acoplado a espectrómetro de masas.
MeOH	metanol.
MHz	megahertz.
OAc	grupo acetato.
ODS	octadecilsilano (sílica gel de fase reversa C ₁₈).
Si gel	sílica gel.
TLC	cromatografía en capa fina.
TMS	tetrametilsilano.
tol	tolueno.
ufc	unidades formadoras de colonias.

1. Introducción.

Este proyecto fue iniciado en 1998 como una parte del Programa de Investigación Farmacognóstica del Departamento de Agronomía de la Universidad Autónoma de Baja California Sur. El objetivo general de este trabajo fue estudiar algunas plantas medicinales e invertebrados marinos de la región como fuente de compuestos antimicrobianos y citotóxicos. Esta búsqueda es propiciada por la necesidad de descubrir nuevos agentes contra el cáncer y las enfermedades infecciosas, ya que los microorganismos y células que causan estos padecimientos han desarrollado diversos mecanismos de resistencia que los convierten desde un punto de vista biomédico, en un nuevo problema. La resistencia a los agentes antimicrobianos y antitumorales trae como consecuencias la reducción del índice terapéutico de los agentes disponibles y el aumento del tiempo y costo de los tratamientos (Boyd, 1992; Davies, 1994; Nikaido, 1994; Spratt, 1994; Larsen, 1996). La necesidad de nuevos agentes antimicrobianos es particularmente urgente con respecto a algunas enfermedades infecciosas, como la tuberculosis, de la cual se reportan ocho millones de nuevos casos y tres millones de muertes anualmente (Raviglione *et al.*, 1995) y el problema tiende a agudizarse debido al incremento de personas inmunodeprimidas y a la constante aparición de cepas multiresistentes (Cohn, 1997; Pablos-Mendez *et al.*, 1998). En México, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica reportó en los años de 1997 y 1998, cerca de 30,000 nuevos casos de tuberculosis del aparato respiratorio (SSA, 1999) y en algunos estudios se ha encontrado una alta proporción de cepas resistentes (Amaya-Tapia *et al.*, 2000; García-García *et al.*, 2001).

Una de las alternativas planteadas como solución a estos problemas es el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos y antitumorales, los cuales podrían ser descubiertos a partir de plantas, animales o microorganismos. En este sentido, la diversidad biológica encontrada en el estado de Baja California Sur, como consecuencia de sus condiciones climatológicas y geográficas únicas, representa una rica fuente de compuestos activos que debe ser explorada extensamente. Partiendo de esta idea, se llevó a cabo un estudio de selección antimicrobiano y citotóxico de un grupo de plantas medicinales usadas en Baja California Sur contra diversas enfermedades infecciosas. Como resultado de dicho estudio, *Haplopappus sonorensis* llamada “hierba del pasmo” fue investigada como fuente de compuestos activos contra *Mycobacterium tuberculosis*. Por otro lado, estudios previos de selección antimicrobiana realizados con invertebrados marinos del Golfo de California (Encarnación-Dimayuga y Keer-García, 1992; Encarnación-Dimayuga *et al.*, 2000) fueron la base para estudiar el octocoral *Muricea* cf. *austera* en busca de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana y citotóxica. Los resultados de esta investigación son el material de discusión de este documento.

1.1. *Importancia de los productos naturales en el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.*

Más de 3 mil millones de años de evolución y selección natural han producido una extensa variedad de formas de vida adaptadas a su ambiente natural, las cuales son incluidas dentro de 5 grandes grupos: *Monera*, *Protozoa*, *Fungi*, *Plantae* y *Animalia* (Whittaker, 1969). Todas esas formas de vidas desarrollaron adaptaciones morfológicas, anatómicas, fisiológicas y bioquímicas como estrategias de supervivencia frente a la

presión de la selección natural. De especial interés nos resultan aquellas adaptaciones que dieron origen a la aparición del metabolismo secundario, cuyos productos químicos, tales como alcaloides, policétidos, fenilpropanoides e isoprenoides, juegan importantes roles ecológicos en las complejas relaciones entre las especies y dentro de ellas mismas (Harborne, 1982). Estos compuestos son biosintetizados a partir de metabolitos primarios como: α -aminoácidos, acetil-coenzima A, ácido mevalónico, o a partir de los intermediarios de la ruta del ácido shikímico (Mann, 1994); tienen una distribución restringida, principalmente a plantas, invertebrados y microorganismos. A menudo, los metabolitos secundarios —llamados también productos naturales— son característicos de un género o una especie y aunque no son esenciales en los procesos vitales, si son importantes para aquellos organismos que los producen, ya que son utilizados con fines de defensa, depredación, comunicación y atracción (Sondheimer y Simeone, 1972; Harborne, 1982). Los diversos roles ecológicos de los metabolitos secundarios, manifiestan su marcada actividad biológica. El objeto de la farmacognosia moderna es estudiar los metabolitos secundarios desde un punto de vista biomédico según el modelo presentado por J. G. Bruhn y L. Bohlin (1997). En él, aquellos organismos que muestran algún tipo de actividad biológica, son estudiados en busca de una explicación molecular de su actividad, generalmente empleando una combinación de ensayos biológicos y métodos de separación e identificación de compuestos, lo cual puede resultar en el aislamiento de compuestos nuevos o conocidos biológicamente activos. Esos hallazgos pueden ser aplicados en la validación y estandarización de preparaciones herbales tradicionales, en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, como modelos de síntesis o precursores para semisíntesis y

como herramientas farmacológicas. Este modelo de estudio ha sido utilizado exitosamente desde mediados del siglo pasado para estudiar plantas, invertebrados y microorganismos marinos y terrestres como fuentes de compuestos activos. La importancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos es claramente mostrada en los textos; *Human Medicinal Agents from Plants* (Kinghorn y Balandrin, 1993), *The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential* (Gullo, 1994), *Drug Prototypes and their Exploitation* (Sneader, 1996) y *Drugs from the Sea* (Fusetani, 2000) donde se muestran un gran número de compuestos con potencial terapéutico aislados a partir de organismos pertenecientes a diferentes reinos.

Las dos principales áreas en donde los productos naturales han tenido mayor impacto son en el tratamiento de las enfermedades infecciosas y del cáncer. El 78% de los antibióticos y el 61% de los fármacos antitumorales aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos de América, en el periodo 1983-1994, fueron de origen natural o sus derivados (Cragg *et al.*, 1997).

Los antibióticos β -lactámicos marcaron el inicio de una nueva era en la terapéutica de las enfermedades infecciosas, cuyo descubrimiento fue seguido por el de la estreptomicina, el primer antibiótico útil para el tratamiento de la tuberculosis. Después llegaron las tetraciclinas y los macrólidos como la eritromicina A, todos ellos aislados a partir de hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Penicillium* y *Streptomyces* (Newman *et al.*, 2000; Miller, 2000). Del mismo modo, la quinina aislada de *Chinchona officinalis*, que ha sido empleada en el tratamiento de infecciones protozoarias como la malaria (Miller, 2000). Recientemente una nueva clase de antimalarials ha sido

descubierta, el primero de estos compuestos es la artemisinina aislada de una planta empleada ancestralmente en China con ese propósito (Klayman, 1993). Otra contribución de los productos naturales al tratamiento de las enfermedades infecciosas fue el aporte de los quimiotipos, spongouridina y spongotimidina (Bergmann y Burke, 1955), utilizados en el desarrollo del agente antiretroviral zidovudina comúnmente referido como AZT, el cual es empleado en el tratamiento de pacientes infectados con VIH.

La historia de los productos naturales como agentes efectivos para tratar el cáncer, empezó con el aislamiento del lignano podophyllotoxina a partir de *Podophyllum peltatum*, el cual no es empleado clínicamente debido a su alta toxicidad. Sin embargo, un lignano análogo, la 4'-demetilepipodophyllotoxina, sirvió como modelo para el desarrollo del etopósido y del tenipósido (Juslén *et al.*, 1971), los cuales son empleados para el tratamiento de cáncer testicular y algunos tipos de leucemia pediátrica. Después vino el descubrimiento de una nueva clase de compuestos anticancerígenos a partir de *Cantharanthus roseus*; la vinblastina y la vincristina (Newman *et al.*, 2000). Estos alcaloides poseen un efecto antitumoral potente. La vinblastina es empleada principalmente en el tratamiento de carcinoma testicular y linfomas, mientras que la vincristina es empleada en el tratamiento de leucemias pediátricas y tumores sólidos. La eficacia de estos productos naturales estimuló la investigación sistemática de plantas como fuente de compuestos antitumorales (Cragg *et al.*, 1993). Así, al estudiar la corteza de *Taxus brevifolia* se descubrió el paclitaxel (Wani *et al.*, 1971), un compuesto estructuralmente complejo que ha mostrado utilidad en el tratamiento de cáncer de pulmón, ovarios, mamas y sarcoma de Kaposi (Shu, 1998). Más recientemente se reportó el aislamiento de la (+)-discodermólida, a partir de una esponja marina (Gunasekera *et al.*, 1990). Este compuesto

actúa por medio de un mecanismo similar al del paclitaxel y representa una gran promesa para el tratamiento de varios tipos de cáncer multifarmacoresistentes (Horwitz *et al.*, 2001).

A pesar de la aportación de los productos naturales al mercado farmacéutico global, diversos autores piensan que la investigación en el campo de los productos naturales jugará un rol diferente, particularmente en lo referente a la investigación académica (Bruhn y Bohlin, 1997; Hostettmann, 1999; Jiménez, 2000; Cordell, 2000). Este cambio se debe a que los problemas asociados con la investigación de los productos naturales (alto costo, aislamiento de compuestos conocidos, estructuras química complejas que dificultan su síntesis y disposición en cantidades adecuadas, etcétera) resultan desalentadores para la industria farmacéutica (Cordell, 2000). Por lo que se prefiere utilizar librerías de compuestos sintéticos y la construcción de nuevas librerías basadas en química y biosíntesis combinatoria (Gordon *et al.*, 1994; Thompson y Ellman, 1996; Carreras *et al.*, 1996; Yu, 1998) y el diseño molecular modelado por computadora (Liljefors y Pettersson, 1996; Williams y Gordon, 1996). A pesar de lo anterior, la extraordinaria diversidad química de los recursos faunísticos, florísticos y microbiota debe seguir estudiándose ya que aún no ha sido explorada exhaustivamente, particularmente aquellos organismos de ambientes marinos. Por otro lado, el conocimiento generado en química de productos naturales a través de la investigación académica, puede ser aplicado en áreas diferentes al descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos, por ejemplo, en la validación de preparaciones herbales y remedios tradicionales encaminados a la estandarización de fitomedicinas, lo cual sería de utilidad para aquellos pueblos que utilizan remedios tradicionales como sistema sanitario (Phillipson, 1999). Otra gran oportunidad para la investigación académica se encuentra en la incursión en áreas terapéuticas no prioritarias

para la industria farmacéutica, tales como malaria, esquistosomiasis, filariosis, diarrea, hepatitis C y parásitos intestinales (Phillipson, 1999; Cordell, 2000), las cuales son importantes problemas de salud a nivel global (WHO, 1999).

En conclusión, la principal ventaja de los recursos naturales como fuente de compuestos activos es la gran diversidad molecular encontrada en la naturaleza como consecuencia de miles de años de evolución. De esta manera es posible obtener moléculas complejas con múltiples centros quirales las cuales fueron diseñadas para interactuar con sistemas biológicos (Young, 1999; Cordell, 2000), ya que como fue establecido desde el principio de este texto, los productos naturales son utilizados por los organismos productores como mecanismo de defensa.

1.2. *Baja California Sur y su diversidad biológica como fuente de compuestos activos.*

Baja California Sur es una entidad federal de la Republica Mexicana localizada en la parte meridional de la Península de Baja California, en el noroeste del país, sobre el trópico de Cáncer, entre los paralelos 22°52'40'' y 28° de latitud norte y entre los meridianos 109° y 115° de longitud oeste (figura 1). El estado posee extensos litorales en el Océano Pacífico y en el Golfo de California. Las condiciones climatológicas de esta área son peculiares debido a su posición geográfica y a su topografía, la cual se distingue por una cadena montañosa que la atraviesa longitudinalmente. En la costa del Océano Pacífico las temperaturas son menores a aquellas de la costa del Golfo de California debido a la influencia de los vientos del oeste que soplan durante casi todo el año y vienen cargados de humedad oceánica. La cortina montañosa peninsular reduce la influencia de estos mismo vientos sobre la costa del Golfo de California, teniendo como consecuencia dos zonas

costeras con condiciones climáticas diferentes. La precipitación pluvial varía en las diferentes regiones del estado. La temporada de lluvias ocurre en el verano y el otoño con lluvias ocasionales en Diciembre y Enero. La región del Cabo recibe la mayor cantidad de precipitación, la cual está generalmente asociada a las tormentas derivadas de los ciclones tropicales (Coria, 1997).

A consecuencia de su aislamiento geográfico y de las notables variaciones en altitud y condiciones climáticas, Baja California Sur presenta una amplia diversidad florística (Arriaga, 1994). En la Península de Baja California se han identificado más de 2700 especies vegetales, incluyendo subespecies y variedades pertenecientes a 155 familias botánicas y 884 géneros. Del total de las especies identificadas en la Península 686 son consideradas endémicas (Wiggins, 1980). La máxima diversidad florística del estado de Baja California Sur se encuentra en la porción meridional del estado en la Reserva de la Biosfera de la Sierra de La Laguna, lugar en donde se lleva a cabo la recarga de los mantos acuíferos de La Paz y Los Cabos (Arriaga, 1994). Por otro lado, tanto el Golfo de California como el Océano Pacífico al rededor de Baja California Sur, son fuentes abundantes de organismos marinos con una extraordinaria diversidad biológica (Brusca, 1980; Bastida-Zavala, 1991; Behrens, 1991; Gotshall, 1994; Solís-Marín *et al.*, 1997; Gotshall, 1998 Casas-Valdez *et al.*, 2000; Reza-Gaona y Sánchez-Rodríguez, 2000). En nuestra experiencia, en cualquier viaje realizado con el propósito de coleccionar invertebrados marinos en el Golfo de California es probable encontrar organismos que aún no han sido descritos en la literatura, lo cual no es sorprendente ya que es un hecho bien aceptado que los ecosistemas marinos han sido escasamente explorados.

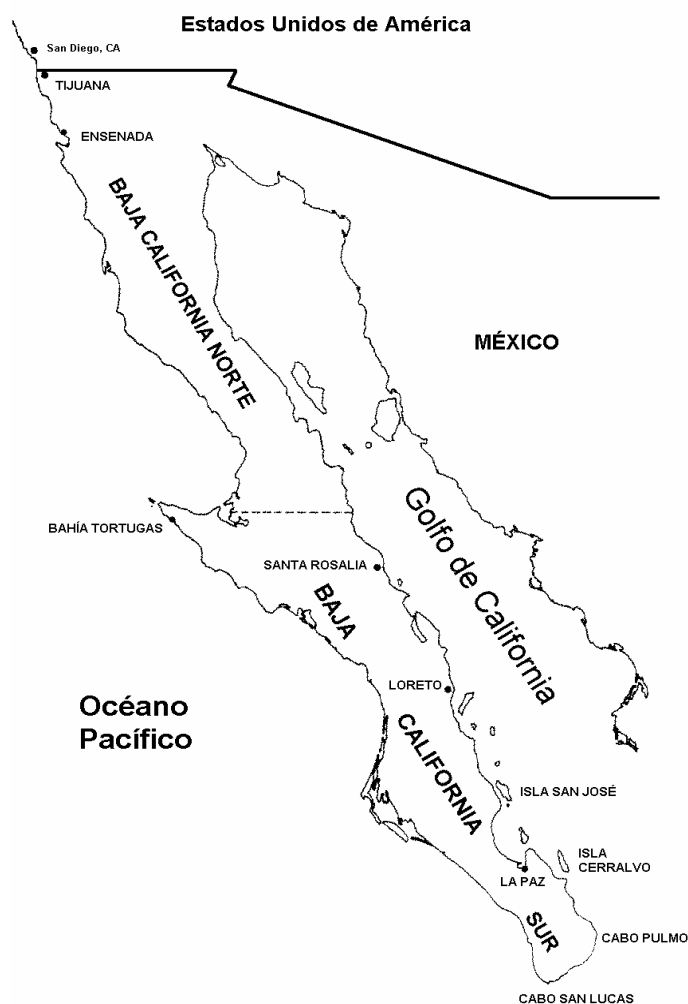


Figura 1. Ubicación geográfica del estado de Baja California Sur.

El estudio sistemático de los recursos naturales de Baja California Sur como fuente de compuestos biológicamente activos fue iniciado a principios de los años setenta con la Alfa Helix Baja Expedition (AHBE 1974) auspiciada por la U. S. National Science Foundation. El grupo multidisciplinario de científicos abordo del R/V Alpha Helix colectó en las costas bajacalifornianas más de 830 especies de algas e invertebrados marinos. Los extractos crudos fueron probados inmediatamente como inhibidores del crecimiento de

bacterias y hongos, encontrado actividad en varios phyla, particularmente en poríferas y equinodermos. Posteriormente, algunos de los extractos fueron probados como inhibidores del virus *Herpes simplex* tipo I, células L1210 (leucemia), KB (cáncer nasofaríngeo) y CV-1 (células de riñón de mono). Los extractos probados en estos últimos ensayos biológicos mostraron actividad antiviral ocasional y un gran número de ellos fueron citotóxicos (Rinehart *et al.*, 1981). Algunos extractos activos obtenidos durante la AHBE 1974 fueron investigados con más detalle y sus principios activos fueron identificados. Así, las acarnidinas 1 – 3 fueron aisladas de la esponja *Acarnus erithacus*, mientras que aeroplysinin-1 y otros compuestos relacionados fueron aislados de *Aplysina fistularis*. El estudio del alga *Laurencia decidua* produjo el laurinterol, un compuesto con potente actividad antimicrobiana y citotóxica. Posteriormente el zonarol, el yahazunol y el ácido zonaroico fueron encontrados en el alga parda *Dictyopteris undulata*, mientras que el dictyodial y el epóxido pachydictyol-A fueron identificados en *Dictyota flabellata* (Rinehart *et al.*, 1981).

En un esfuerzo independiente al de la AHBE 1974, en 1980 fue iniciado el Programa de Investigación Farmacognóstica de los Recursos Naturales de Baja California Sur en el Centro de Investigaciones Biológicas de La Paz (Encarnación, 1980), el cual ha seguido en marcha desde 1983 en la Universidad Autónoma de Baja California Sur. Durante este tiempo, Encarnación y colaboradores han sometido un número de extractos de plantas medicinales e invertebrados marinos a ensayos antimicrobianos, antiprotozoarios y citotóxicos, así como a pruebas sobre la contractilidad espontánea del músculo liso (Encarnación y Keer, 1991; Encarnación-Dimayuga y Keer-García, 1992; Encarnación-Dimayuga *et al.*, 1994; Encarnación *et al.*, 1998; Encarnación-Dimayuga *et al.*, 1998;

Encarnación-Dimayuga *et al.*, 2000). Estos estudios de actividad biológica demostraron que los recursos ensayados poseen un gran potencial como fuente de compuestos activos. La bioprospección de algunos recursos seleccionados por Encarnación ha conducido al aislamiento de varios compuestos activos, por ejemplo: carnosol, 6 β -hidroxi-carnosol y ácido ursólico, los cuales fueron aislados de *Lepechinia hastata* (Encarnación *et al.*, 1990; Encarnación-Dimayuga, 1992). El estudio del pepino de mar *Neothyone gibbosa* condujo al aislamiento de tres glucósidos triterpenoidales: neotiósido A, B, C (Encarnación *et al.*, 1989; Encarnación *et al.*, 1996; Malmstrøm *et al.*, 1998). La 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona fue aislada a partir de *Haplopappus sonorensis* (Gajhede *et al.*, 1989) y posteriormente fueron identificados en esta misma fuente: friedelina, friedelan-3 α -ol y ermanina (Encarnación-Dimayuga *et al.*, 1999).

Los principales detractores de la investigación de productos naturales argumentan que la diversidad química presente en la naturaleza ha sido agotada. Sin embargo, en Baja California Sur como en muchas otras regiones del mundo, son muchas las plantas, los animales y los microorganismos que aún no han sido estudiados y, aunque el trabajo implicado en la bioprospección de recursos naturales suele avanzar lentamente y llega a ser dificultoso, la sola idea de que estos recursos podrían ser una fuente importante de compuestos útiles para la cura de alguna enfermedad, es suficiente razón para continuar la búsqueda.

2. Materiales y métodos.

2.1. Selección de plantas medicinales no-citotóxicas con actividad inhibitoria contra *Mycobacterium tuberculosis*.

El estudio de selección de plantas medicinales como fuente potencial de compuestos no-citotóxicos con actividad antimicobacteriana fue planteado en este proyecto con el fin de seleccionar una planta potencialmente activa.

Los extractos crudos etanólicos de 25 plantas empleadas tradicionalmente en Baja California Sur para el tratamiento de enfermedades infecciosas relacionadas con bacterias, hongos, protozoarios y virus (Encarnación-Dimayuga, 1996) fueron sometidos a un estudio de selección según su actividad antimicobacteriana y citotóxica. El propósito fue seleccionar una planta con actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*, cuyo extracto crudos no mostrara citotoxicidad frente a la línea celular humana HCT-116. La figura 2, muestra un esquema general del protocolo utilizado para la selección.

2.1.1. Material vegetal y preparación de extractos.

El material vegetal utilizado fue obtenido de la Colección de Plantas Medicinales del Programa de Investigación Farmacognóstica de la Universidad Autónoma de Baja California Sur, las cuales fueron colectadas en diferentes localidades del estado en el periodo comprendido entre Octubre de 1986 y Marzo de 1993 y mantenidas en frascos de vidrio herméticamente cerrados (Encarnación y Agúndez, 1986; Encarnación *et al.*, 1987; Encarnación y Contreras, 1992; Encarnación y Agúndez, 1995).

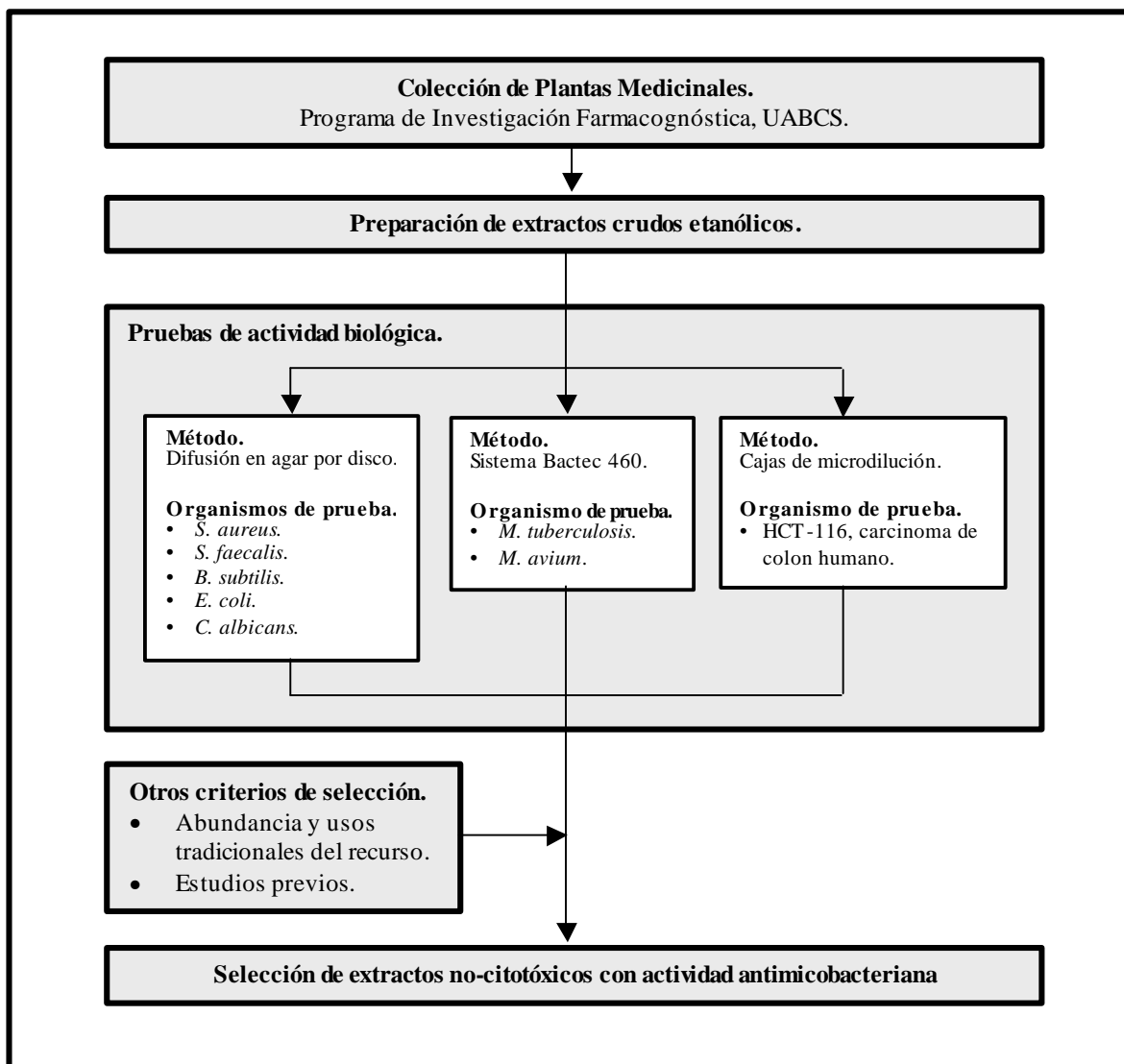


Figura 2. Esquema de selección de plantas no-citotóxicas con actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*.

Los extractos empleados fueron obtenidos a partir de 20 g de material vegetal seco y molido. La extracción fue realizada por maceración a temperatura ambiente con 100 mL etanol destilado, por 24 h. La mezcla fue filtrada y el residuo fue extraído nuevamente. Los filtrados fueron unidos y evaporados a sequedad a 40°C y presión reducida.

2.1.2. Organismos de prueba.

Siete cepas microbianas patógenas fueron utilizadas como organismos de prueba para ensayar *in vitro* su susceptibilidad a los extractos etanólicos de las plantas bajo estudio. Entre ellas se empleó un aislado clínico de *Staphylococcus aureus* resistente a la penicilina y al ácido nalidíxico. Esta cepa fue proporcionada por el Laboratorio de Análisis Especiales de La Paz. Además se emplearon *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, obtenidas del Scripps Institution of Oceanography, University of California, San Diego. Las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) y *Mycobacterium avium* (ATCC 25291) fueron obtenidas de The American Type Culture Collection. La susceptibilidad de las primeras 5 cepas fueron ensayadas usando la técnica de difusión en agar por disco (Encarnación-Dimayuga *et al.*, 1998), mientras que las dos especies de *Mycobacterium* fueron ensayadas usando el sistema radiométrico BACTEC 460 (Cantrell *et al.* 1998). La citotoxicidad de los extractos crudos fue evaluada sobre la línea celular HCT-116 (ATCC CCL-247, carcinoma de colon humano). Estas células fueron cultivada en cajas de microdilución de 96 celdas para determinar la concentración media inhibitoria.

2.1.3. Ensayo de actividad antimicobacteriana por el sistema BACTEC 460.

Cada extracto fue disuelto en DMSO y esterilizado por filtración. Cincuenta microlitros del extracto a una concentración final de 100 µg mL⁻¹ fueron adicionados a cada vial con 4 mL de medio BACTEC 12B (Becton Dickinson, Sparks, MD). Los controles recibieron 50 µL de DMSO, obteniendo una concentración final de 1.25% de DMSO. Cada

vial con medio, fue inoculado con 100 μ L de una suspensión fresca de *M. tuberculosis* o *M. avium* con una concentración celular aproximada de 4×10^5 ufc. Los cultivos fueron incubados a 37°C de 5–8 días para *M. tuberculosis* y 6 días para *M. avium*. El índice de crecimiento fue determinado diariamente en un instrumento BACTEC 460 (Cantrell *et al.*, 1998).

2.1.4. Ensayo de actividad citotóxica.

La citotoxicidad de los extractos fue ensayada sobre la línea celular HCT–116 de carcinoma de colon humano. Las células fueron mantenidas y cultivadas en medio Mc Coys 5A modificado (Invitrogene, Carlsbad, CA) y 10% de suero bovino fetal. Las células fueron cultivadas en placas de microdilución de 96 celdas a 37°C en una atmósfera humidificada y con 5% de CO₂. El periodo de incubación fue de 72 h. Los extractos crudos fueron disueltos en DMSO. Al final del periodo de incubación, las células fueron fijadas y teñidas con cristal violeta 0.0075%. La concentración inhibitoria media, IC₅₀, fue definida como la concentración a la cual las células no fueron capaces de lograr su desarrollo, manifestado por el cambio de coloración de azul a transparente.

2.1.5. Ensayo de difusión en agar por disco.

La prueba se realizó colocando un disco de papel con 2 mg de extracto crudo sobre la superficie de agar previamente inoculada con una suspensión del microorganismo de prueba. Las bacterias fueron cultivadas en agar Mueller–Hinton (BD Bioxon, Cuautitlán Izcalli, Estado de México). El hongo *C. albicans* fue cultivado en agar dextrosa Saboraud

(Becton Dickinson, Sparks, MD). Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 h. Las zonas de inhibición alrededor del disco fueron medidas y registradas al final del periodo de incubación. La pureza de cada cultivo fue verificada antes y después de cada ensayo por tinción de Gram. Todas las pruebas fueron corridas por duplicado (Encarnación-Dimayuga *et al.*, 1998).

2.2. Selección de un invertebrado marino del Golfo de California.

La selección de un invertebrado marino del Golfo de California para bioprospección se realizó con base en estudios de actividad antimicrobiana previamente realizados en este laboratorio. En ellos se muestra que los extractos crudos etanólicos de *Muricea austera* provenientes de diversas colectas realizadas en la década de los años noventas, inhibieron el desarrollo de *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Encarnación-Dimayuga y Keer-García, 1992; Encarnación-Dimayuga *et al.*, 2000). Además, en un estudio reciente de selección biológica, varias especies del género *Muricea* fueron probadas contra *Mycobacterium tuberculosis* y se determinó que algunas de ellas fueron activas contra esta bacteria a 100 y 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Encarnación-Dimayuga *et al.*, 2000). Considerando la interesante actividad antimicrobiana de *M. austera*, así como su accesibilidad y abundancia en el Golfo de California, este organismo fue elegido para ser estudiado en busca de los principios activos responsables de la actividad biológica presentada.

2.3. Aislamiento de compuestos activos a partir de los organismos seleccionados.

Haplopappus sonorensis y *Muricea* cf. *austera* fueron sometidos a bioprospección después de la selección hecha con base en los estudios de actividad antimicrobiana y citotóxica descritos en las secciones 2.1. y 2.2. El aislamiento de los compuestos activos fue realizado por medio de fraccionamiento guiado por bioensayo.

2.3.1. O-Metil derivados del kaempferol activos contra *M. tuberculosis* a partir de *Haplopappus sonorensis*.

H. sonorensis fue colectada en Agosto de 1988 en Cabo Pulmo, al sur de La Paz, BCS, México. La identificación taxonómica fue hecha por Jorge Manuel Agúndez Espinoza del Herbario Fanerogámico de la Universidad Autónoma de Baja California Sur. Algunos especímenes de referencia (no. 46-T) fueron depositados en el herbario del Laboratorio de Farmacognosia, UABCS.

El material vegetal (1.56 kg) seco y molido fue extraído sucesivamente en un aparato soxhlet con éter de petróleo, seguido de CH_2Cl_2 y etanol. Cada extracto fue concentrado hasta sequedad en evaporador rotatorio a 40°C , con un rendimiento de 3.37%, 7.61% y 4.31% respectivamente (w/w basado en peso seco de planta).

Los ensayos de actividad antimicrobacteriana y citotóxica descritos en las secciones 2.1.3. y 2.1.4. fueron usado como guía en el fraccionamiento de los extractos de CH_2Cl_2 y de éter de petróleo. Los extractos crudos fueron fraccionados empleando una combinación de técnicas cromatográficas, tales como: TLC, cromatografía en columna y HPLC. El fraccionamiento del extracto de CH_2Cl_2 (figura 3) nos condujo a la obtención de los compuestos **1 – 3**.

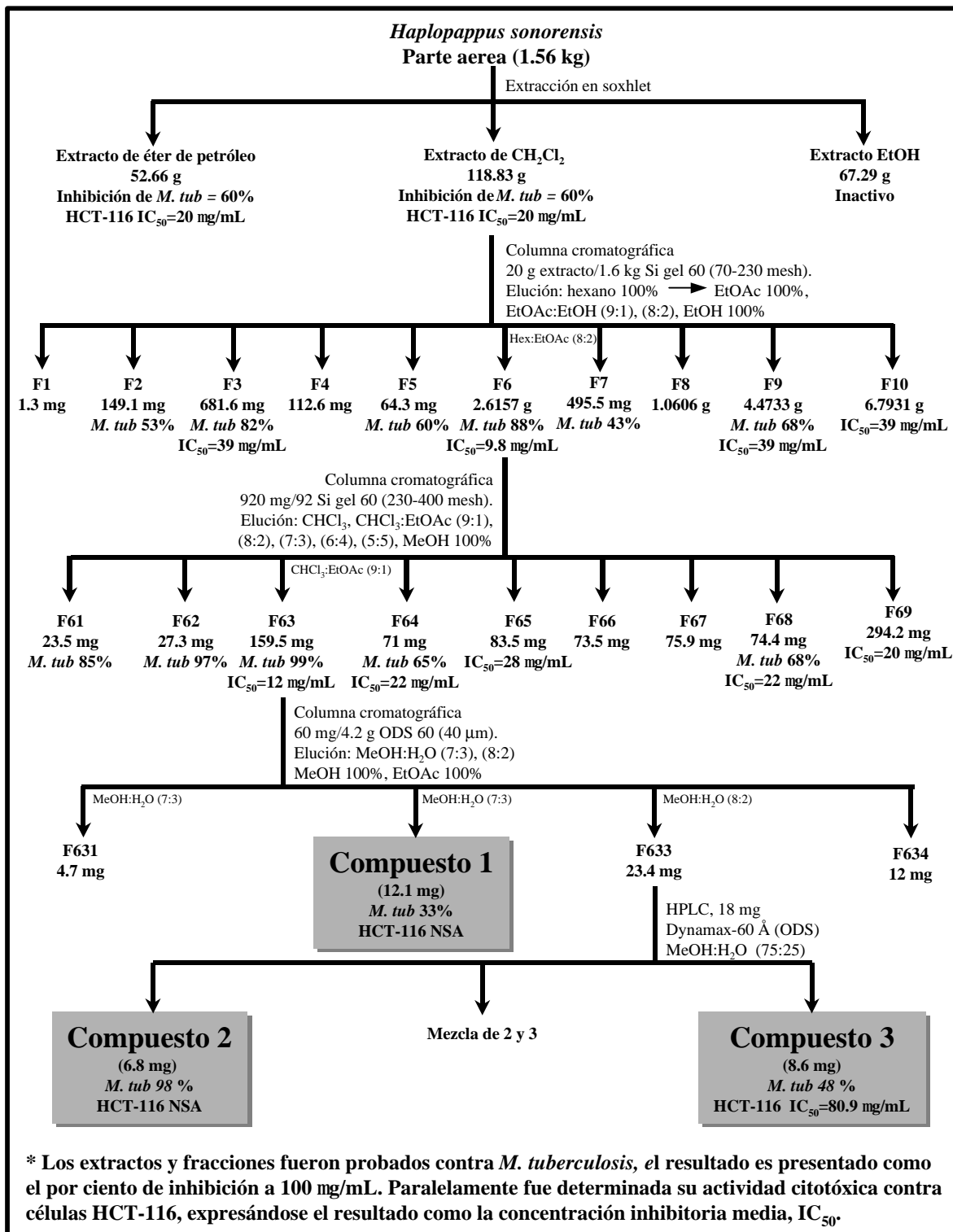


Figura 3. Aislamiento de los compuestos 1–3 a partir de *Haplopappus sonorensis*.

2.3.2. Nuevos glucósidos con aglucón tipo pregnadieno, a partir de *Muricea cf. austera*.

M. austera fue colectada en Abril de 1999, en la Bahía de La Paz (BCS, México) en el lugar conocido como El Faro de San Rafael. Los organismos fueron colectados a una profundidad media de 10 m. La identificación taxonómica fue realizada por Martín García de acuerdo a Verrill (1886). Algunos especímenes de referencia (RED-9911-34) se encuentran resguardados en el Laboratorio de Farmacognosia, UABCS. La extracción se realizó por maceración a temperatura ambiente usando 7.5 L de CH₂Cl₂:MeOH (7:3) en volúmenes de 2.5 L cada vez. El extracto fue evaporado a sequedad para producir 6.57% de extracto crudo (w/w basado en peso húmedo). Una porción del extracto crudo de *M. austera* (72 g) fue suspendida en la misma mezcla de disolventes que fue utilizada para la extracción [CH₂Cl₂:MeOH (7:3)], el sobrenadante fue filtrado y evaporado a presión reducida para dar 45.3 g de extracto orgánico. Este extracto mostró actividad inhibitoria contra *S. aureus*, *B. subtilis* y moderada citotoxicidad contra la línea celular HCT-116, por lo que fue fraccionado en búsqueda de los compuestos responsable de la actividad biológica observada. El fraccionamiento del extracto de *M. austera* fue guiado por los ensayos de difusión en agar por disco y de citotoxicidad descritos en las secciones 2.1.5. y 2.1.4. La figura 4 muestra el esquema de fraccionamiento de *M. austera*, el cual nos condujo al aislamiento de los compuestos **4 – 6**.

2.4. Elucidación estructural de los compuestos aislados.

La elucidación estructural de los compuestos **1– 6** fue realizada por interpretación y comparación de datos espectroscópicos y propiedades físicas. Los espectros de infrarrojo

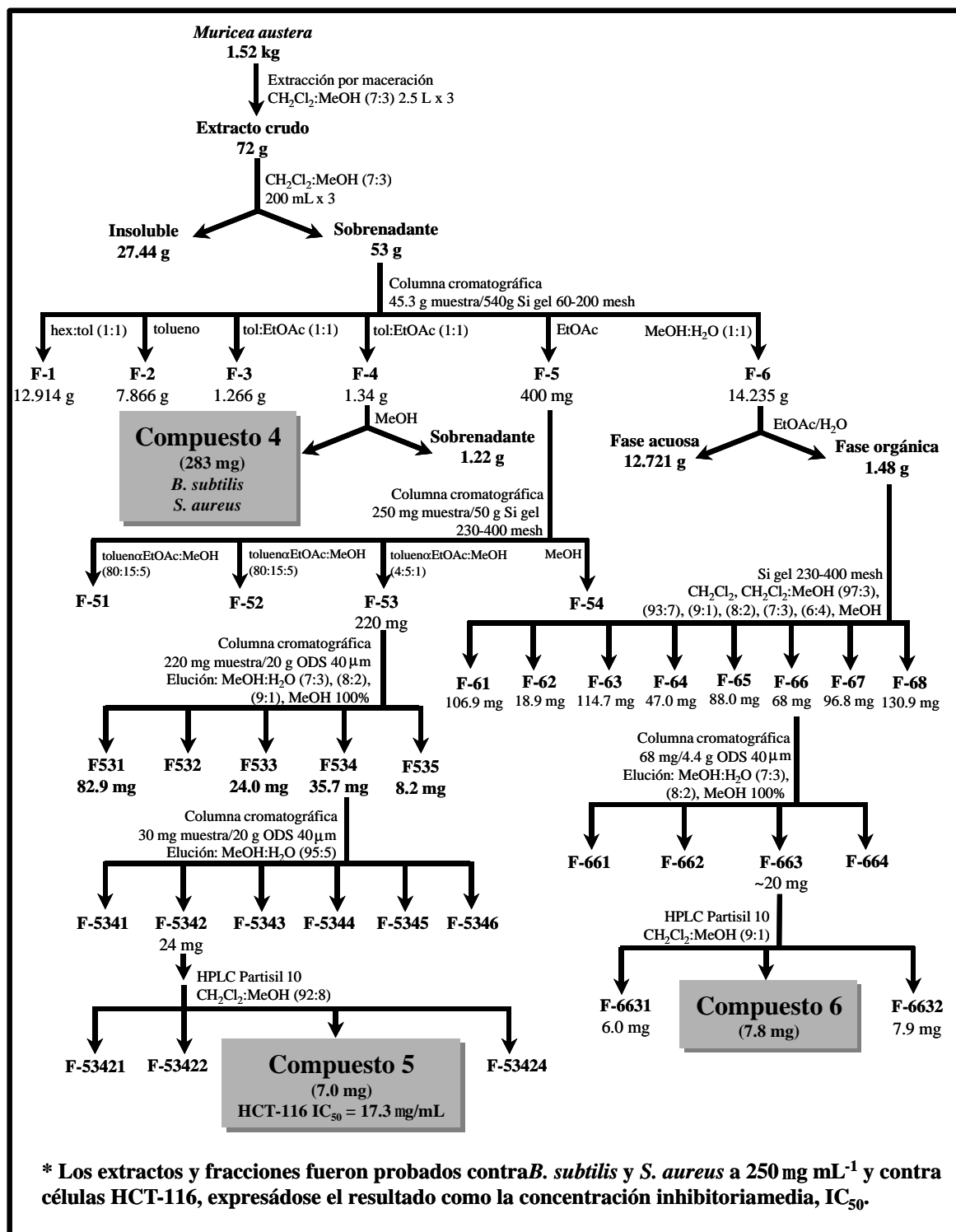


Figura 4. Aislamiento de los compuestos 4 – 6 a partir de *Muricea cf. austera*.

fueron corridos en pastillas de KBr utilizando el FT IR Paragon 500 de Perkin Elmer. La rotación óptica fue medida en el polarímetro automático AUTOPOL III (Rudolph Research Analytical, Flanders, NJ). El punto de fusión fue determinado en el MELTEMP II (Laboratory Devices) y aparecen sin corrección. El estudio espectroscópico de los compuestos **1 – 3** fue realizado en el Instituto H. C. Ørsted de la Universidad de Copenhague. Los espectros de ^1H - and ^{13}C -NMR fueron determinados en un espectrómetro Varian 400 FT-NMR operando a 400 y 100.5 MHz, respectivamente. DMSO- d_6 fue usado como disolvente y TMS como estándar interno. Los espectros de masas de estos compuestos fueron determinados en un espectrómetro JEOL JMS-HX/HX110A usando el sistema de inyección directa. Los espectros de masa de los compuestos **4 – 6** fueron obtenidos en un Agilent 1100 LC-MS usando ionización por electrospray, mientras que los espectros de ^1H y ^{13}C fueron obtenidos en un espectrómetro Varian Unity INOVA y en un Varian GEMINI operando a 300 y 100 MHz. Una mezcla de $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ (1:1) fue usada como disolvente.

3. Resultados.

La actividad biológica de los extractos de las plantas medicinales estudiadas en la sección 2.1. aparecen en la tabla I. De los 25 extractos probados, 14 mostraron algún efecto sobre el desarrollo de *M. tuberculosis*, de los cuales solo los extractos de *Haplopappus sonorensis*, *Asclepias subulata* y *Bursera odorata* fueron activos mostrando 40, 45 y 68% de inhibición a $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$. Cuando analizamos los resultados de la actividad

Tabla I. Actividad antimicrobiana y citotóxica de los extractos etanólicos de un grupo de plantas medicinales de Baja California Sur (México).

FAMILIA (Clave del espécimen) Binomio latino y Autor	Prueba de difusión en agar ^a Halo de inhibición a 2.0 mg/disco					Prueba antimicrobiana % de inhibición a 100 µg/mL		Citotoxicidad IC ₅₀ (µg/mL)
	A	B	C	D	E	F	G	H
ACANTHACEAE								
(E-40) <i>Elytraria imbricata</i> (Vahl) Pers.	—	—	—	—	—	24	—	—
(E-51) <i>Jacobinia spicigera</i> (Schlecht) Baily	—	—	—	—	—	—	—	84.3
ANACARDIACEAE								
(E-244) <i>Spondias</i> sp.	++	—	++	—	—	—	—	—
APIACEA								
(E-221) <i>Foeniculum vulgare</i> Mill	—	—	—	—	—	—	—	—
ARISTOLOCHIACEAE								
(E-36) <i>Aristolochia brevipes</i> Brandegee	+++	+	+	—	—	17	—	1.0
(E-269) <i>Aristolochia monticola</i> Brandegee	+++++	+	+++	—	—	—	—	19.7
ASCLEPIADACEAE								
(E-1) <i>Asclepias subulata</i> Decne.	—	—	—	—	—	45	—	0.4
ASTERACEAE								
(E-21) <i>Ambrosia psilostachya</i> DC.	+	++	—	—	—	33	—	81
(E-17) <i>Anaphalis margaritacea</i> (L.) A. Gray	++	—	—	—	—	—	—	—
(E-12) <i>Baccharis glutinosa</i> Pers.	+	—	—	—	—	—	—	—
(E-34) <i>Baccharis</i> sp.	+	++	—	—	—	33	8	—
(E-28) <i>Bidens pilosa</i> var. <i>radiata</i> Schultz-Bip.	—	—	—	—	—	16	—	71
(E-279) <i>Gnaphalium purpureum</i> L.	+	—	+	—	—	3	—	—
(E-46) <i>Haplopappus sonorensis</i> (A. Gray) S. F. Blake	+	—	—	—	—	40	—	35.9
(E-240) <i>Haplopappus spinulosus</i> (Pursh) DC. subsp. <i>scrabellus</i> (Greene) Hall	—	—	—	—	—	—	—	—
(E-274) <i>Hymenoclea monogyra</i> Torr. & Gray	+	+++++	—	—	+	13	—	—
(E-272) <i>Hymenoclea</i> sp.	+	+++	—	—	—	26	—	—
(E-176) <i>Pectis hankeana</i> D.C. Schu. Bip.	+	—	—	—	—	—	—	—
(E-219) <i>Xanthium strumarium</i> L.	+	—	+	—	+	18	—	84.6
AVICENNIACEAE								
(E-192) <i>Avicennia nitida</i> Jacp.	—	—	—	—	—	—	—	—
BIGNONIACEAE								
(E-131) <i>Crescentia alata</i> HBK	—	—	—	—	—	23	—	—
BORAGINACEAE								
(E-23) <i>Heliotropium curassavicum</i> L. var. <i>oculatum</i> (Heller) I. M. Jun	—	—	—	—	—	—	—	—
BRACICACEAE								
(E-327) <i>Descurainia pinnata</i> subsp. <i>menziesii</i> (DC.) Detling	—	—	—	—	—	38	—	67
(E-246) Aff <i>Capsella</i> sp.	+	—	—	—	—	—	—	—
BURSERACEAE								
(E-58) <i>Bursera odorata</i> Brandegee	—	—	—	—	—	67	—	<0.076

A = *Bacillus subtilis*

B = *Staphylococcus aureus*

C = *Streptococcus faecalis*

D = *Escherichia coli*

E = *Candida albicans*

F = *Mycobacterium tuberculosis*

G = *Mycobacterium avium*

H = Línea celular HCT-116.

^aEscala de inhibición: —, inactivo.

+, halo de inhibición < 10 mm

++, halo de inhibición entre 10 y 13 mm

+++, halo de inhibición entre 13 y 15 mm

++++, halo de inhibición entre 15 y 17

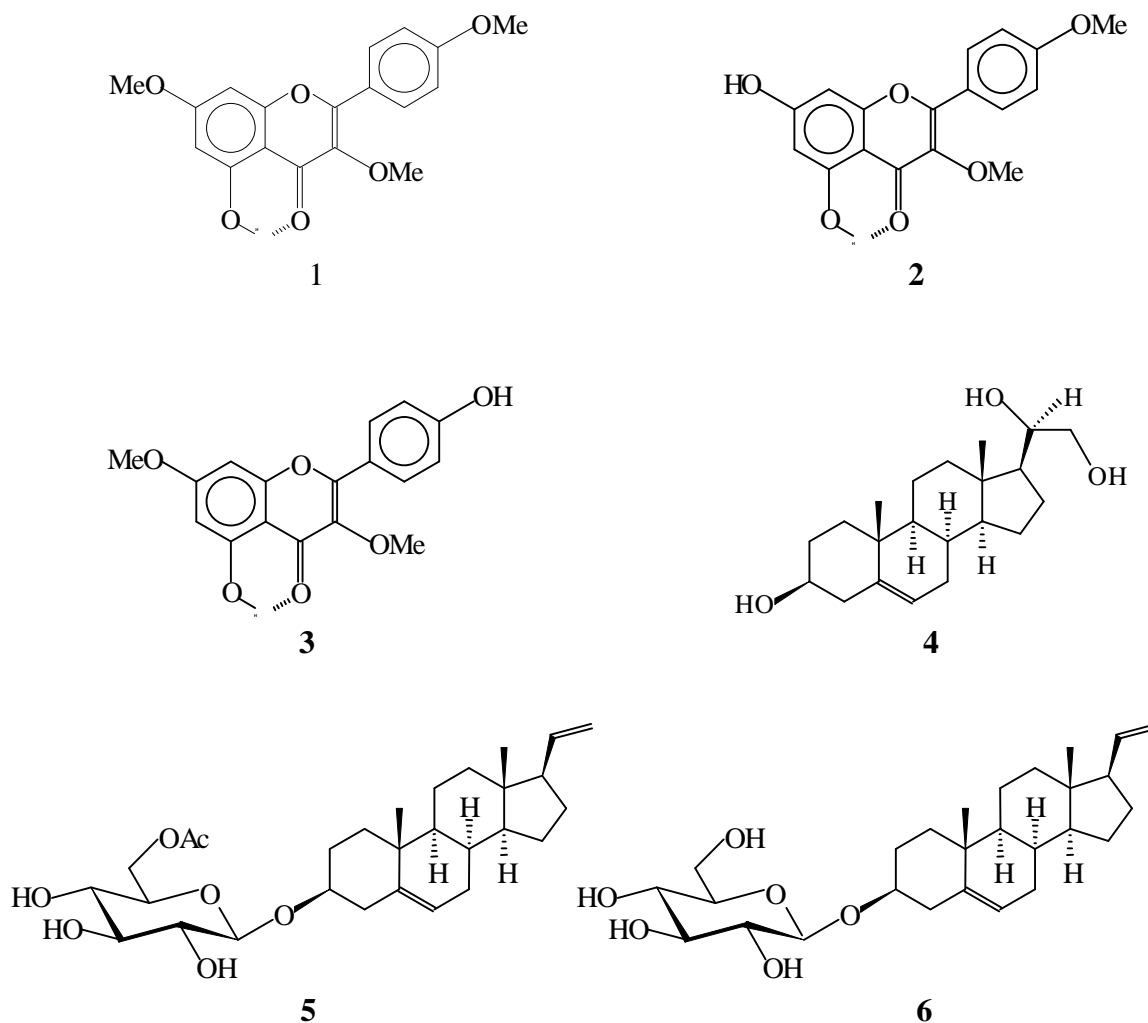
+++++, halo de inhibición > 17 mm

antimicrobiana en relación al efecto citotóxico y la actividad mostrada contra los otros organismos de prueba, fue evidente que el extracto de *H. sonorensis* fue el único que

presentó actividad antimicobacteriana, baja citotoxicidad y paralelamente el extracto fue inactivo contra el resto de los organismos de prueba, mostrando solo poca actividad contra *B. subtilis*. Estas pruebas nos llevaron a suponer que *H. sonorensis* era fuente de compuestos no-citotóxicos con actividad antimicobacteriana. Basados en esos resultados y considerando su abundancia natural, accesibilidad y sus usos medicinales en Baja California Sur, *H. sonorensis* fue elegido para bioprospección antimicobacteriana. El fraccionamiento guiado por bioensayo de los extractos crudos de éter de petróleo y de CH_2Cl_2 de *H. sonorensis* nos condujo al aislamiento de: 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (**1**), 5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona (ermanina, **2**) y 5,4'-dihidroxi-3,7-dimetoxiflavona [kumatakenina, **3**, (figura 5)]. Los compuestos **1** y **3** mostraron baja actividad contra *M. tuberculosis* (33 y 48 % de inhibición a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$), mientras que **2** mostró 98% de inhibición a la misma concentración. En el ensayo de actividad citotóxica **1** y **2** fueron inactivos, mientras que la kumatakenina, **3**, mostró una valor de $\text{IC}_{50} = 80.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra las células HCT-116. Ninguno de los compuestos aislados a partir de *H. sonorensis* inhibió el desarrollo de *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. faecalis*, *E. coli* o *C. albicans* por el método de difusión en agar.

Por otro lado, como producto de la investigación de *Muricea cf. austera*, tres compuestos fueron aislado del extracto de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (7:3): el trihidroxi esterol conocido, pregna-5-eno-3 β ,20 α ,21-triol (**4**) activo contra *B. subtilis* y *S. aureus* a $250 \mu\text{g disco}^{-1}$ y dos nuevos glucósidos con aglucón esteroidal identificados como, pregna-5,20-dieno-3-O- β -(6'-O-acetil)glucopiranosido y pregna-5,20-dieno-3-O- β -glucopiranosido

[5 y 6, (figura 5)]. De estos compuesto, **5** mostró citotoxicidad contra células de carcinoma de colon humano a una concentración de $17.3 \mu\text{g mL}^{-1}$.



- 1, 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona.
- 2, 5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona (ermanina).
- 3, 5,4' dihidroxi-3,7-dimetoxiflavona (kumatakenina).
- 4, pregna-5-eno-3 β ,20 α ,21-triol.
- 5, pregna-5,20-dieno-3-O- β -(6'-O-acetil)glucopiranósido.
- 6, pregna-5,20-dieno-3-O- β -glucopiranósido.

Figura 5. Compuestos con actividad antimicrobiana y citotóxica aislados de *Haplopappus sonorensis* y *Muricea cf. austera*.

4. Discusión.

Muchos compuestos antimicobacterianos suelen mostrar al mismo tiempo citotoxicidad (König *et al.*, 2000; Foroumadi *et al.*, 2001; Foroumadi *et al.*, 2002), manifestando una relación mecánica entre ambos efectos, lo cual es expresado como bajo índice de selectividad. Por ello, cuando lo que se persigue es identificar compuestos líderes con actividad antimicobacteriana, resulta conveniente que estos sean no-citotóxicos (König *et al.*, 2000; El Sayed *et al.*, 2000).

En la primer parte de nuestra investigación (sección 2.1.) describimos nuestro protocolo de selección de extractos vegetales basado en diferentes criterios (actividad antimicobacteriana-citotoxicidad, abundancia, accesibilidad y usos tradicionales), de donde solo los extractos de *Haplopappus sonorensis*, *Asclepias subulata* y *Bursera odorata* mostraron actividad antimicobacteriana. De ellos, *B. odorata* y *A. subulata* resultaron ser altamente citotóxicos contra células HCT-116. *A. subulata* ha sido reportada como fuente de cardenólidos estructuralmente relacionados con el dezglucouzarín, la ouabaina y la digitoxigenina los cuales poseen actividad antineoplástica (Dictionary of Natural Products on CD-ROM; Johansson *et al.*, 2001), lo cual explica la elevada citotoxicidad mostrada por el extracto de esta planta. De la misma manera, *B. odorata* pertenece a un género bien conocido por sintetizar lignanos citotóxicos como la deoxipodophyllotoxina y el burserano (Bianchi *et al.*, 1968; Cole *et al.*, 1969; Wickramaratne *et al.*, 1995). Desde nuestro punto de vista, el hecho de que *A. subulata* y *B. odorata* sean fuentes conocidas de compuestos de elevada citotoxicidad, los convierte en candidatos poco deseables para bioprospección, ya

que es muy probable que el efecto antimicobacteriano sea consecuencia de los mismo compuestos citotóxicos aislados previamente. La especie seleccionada para bioprospección antimicobacteriana, debía cumplir con la característica de ser no-citotóxica e inactiva frente a los otros organismos de prueba (*B. subtilis*, *S. aureus*, *S. faecalis*, *E. coli* y *C. albicans*), los cuales sirvieron como indicadores de selectividad antimicobacteriana. Entre las 25 plantas probadas, *H. sonorensis* mostró actividad antimicobacteriana, baja citotoxicidad y fue inactivo contra *S. aureus*, *S. faecalis*, *E. coli* y *C. albicans*, mostrando poca actividad contra *B. subtilis*.

Considerando su actividad biológica y su extendido uso en la medicina tradicional de Baja California Sur, los extractos de éter de petróleo y CH_2Cl_2 de *H. sonorensis* fueron estudiados usando el procedimiento de fraccionamiento guiado por bioensayo (sección 2.2) lográndose el aislamiento de 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (**1**), 5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona (**2**, ermanina) y 5,4'-3,7-dimetoxiflavona (**3**, kumatakenina), como los principales compuestos responsables de la actividad contra *M. tuberculosis*.

1 fue obtenido como agujas cristalinas de color amarillo, cuya información espectroscópica (^1H - ^{13}C -NMR y EIMS) fue consistente con lo reportado previamente (Rossi *et al.*, 1997; Dong *et al.*, 1999). El espectro de masas de **1** mostró el ión molecular $[\text{M}]^+$ a m/z 328 una y junto con los espectros de ^1H - ^{13}C -NMR sugirió la formula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_6$. El espectro de ^1H -NMR mostró 3 metoxilos aromáticos [d 3.86 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.90 (3H, s)], un hidroxilo fenólico enlazado [d 12.63 (1H, bd s)] y 6 protones aromáticos [d 6.36 (1H, d, $J = 2$ Hz), 6.45 (1H, d, $J = 2$ Hz), 7.02 (2H, d, $J = 9$ Hz) y 8.07 (2H, d, $J = 9$ Hz)]. El acoplamiento de los dos pares de protones a 7.02 y 8.07 ppm fue observado por el experimento de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY, lo cual sugirió

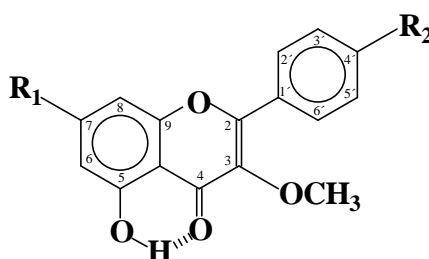
que **1** era un *O*-trimetil derivado del kaemferol. La sustitución de un grupo metilo en el oxígeno del C-3 fue determinada por ^{13}C -NMR, en donde la señal del C-2 apareció desplazada a campo bajo con respecto a la del kaemferol (Markham y Ternai, 1976). La presencia de una señal típica de hidroxilos enlazados por puente de hidrógeno sugirió que el grupo OH debía estar localizado en el C-5 próximo al carbonilo. Por lo tanto, los dos metoxilos restantes debían localizarse en las únicas dos posiciones disponibles, C-7 y C-4'. La estructura fue confirmada al comparar **1** con una muestra auténtica de 3,7,4'-*O*-trimetil kaemferol (5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona) previamente identificada por difracción de rayos X (Gajhede *et al.*, 1989).

2 y **3** fueron polvos amorfos de color amarillo, que por EIMS mostraron el ión molecular $[\text{M}]^+$ m/z 314 uma. El espectro de ^1H -NMR de ambos compuesto mostró la presencia de 2 grupos metoxilos, 2 grupos hidroxilos y 6 protones aromáticos similares a los presentes en el compuesto **1**, de donde, junto con los espectros de ^{13}C -NMR y ^1H - ^1H COSY fue inmediatamente aparente que **2** y **3** eran 3,4'-*O*-metil kaemferol (5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona) y 3,7-*O*-metilkaemferol (5,4'-dihidroxi-3,7-dimetoxiflavona). La información espectral obtenida de los compuestos **1** – **3** es consistente con lo reportado en la literatura (Calvert *et al.*, 1979; Nakatani *et al.*, 1991; Deng *et al.*, 1997; Rossi *et al.*, 1997; Dong *et al.*, 1999). La tabla II muestra los datos de ^1H - ^{13}C - NMR de los compuestos **1** – **3** y su asignación.

El género *Haplopappus* incluye cerca de 160 especies y es uno de los géneros más variables citológicamente dentro de la tribu de las Astereae (Grau, 1977) y su química también es variable. Una consulta en SciFinder Scholar, demostró que numerosas especies de este género han sido investigadas habiéndose reportado diterpenos del tipo labdano y

clerodano (Jakupovic *et al.*, 1986; Zdero *et al.*, 1990; Zdero *et al.*, 1991a; Zdero, *et al.*, 1991b; Urzúa *et al.*, 1997; Faini *et al.*, 1999; Tojo *et al.*, 1999), sesquiterpenoides (Labbé *et al.*, 1998), triterpenoides (Silva y Sammes, 1973; Encarnación-Dimayuga *et al.*, 1999) y numerosos flavonoides y cumarinas (Clark *et al.*, 1980; Ayanoglu *et al.*, 1981; Ulubelen *et al.*, 1981; Ates *et al.*, 1981; Chiang *et al.*, 1982; Ulubelen *et al.*, 1982; Núñez y

Tabla II. Tabla de asignación de señales de NMR de los compuestos 1 – 3.



Posición	1^a, R₁=R₂=OCH₃		2^b, R₁=OH; R₂=OCH₃		3^b, R₁=OCH₃; R₂=OH	
	^c d _C	^d d _H (m, J)	^c d _C	^d d _H (m, J)	^c d _C	^d d _H (m, J)
C-2	155.9		155.2		155.9	
C-3	138.8		138.0		137.9	
C-4	178.6		178.0		178.1	
C-5	156.6		156.4		156.4	
C-6	97.7	6.36 (d, 2)	98.6	6.12 (d, 2)	97.8	6.37 (d, 2)
C-7	165.3		164.2		165.2	
C-8	92.1	6.45 (d, 2)	93.8	6.36 (d, 2)	92.4	6.74 (d, 2)
C-9	^e 161.9		^e 161.4		^e 160.9	
C-10	105.9		104.3		105.3	
C-1'	122.7		122.2		120.6	
C-2', C-6'	130.0	8.07 (d, 9)	130.0	8.0 (d, 9)	130.3	7.97 (d, 9)
C-3', C-5'	114.0	7.02 (d, 9)	114.3	7.12 (d, 9)	115.8	6.94 (d, 9)
C-4'	^e 161.6		^e 161.3		^e 160.3	
-OCH ₃ en C-3	60.1	3.90 s	59.8	3.85 s	59.8	3.86 s
-OCH ₃ en C-7	^e 55.3	^e 3.87 s			56.1	3.79 s
-OCH ₃ en C-4'	^e 55.7	^e 3.86 s	55.5	3.79 s		
-OH en C-5		12.63 bd s		12.58 bd s		12.65 bd s
-OH en C-7				8.44 bd s		

^a CDCl₃ y ^b DMSO-*d*₆ fueron usados como disolvente.

^c d_C desplazamientos químicos de carbono en ppm. Los espectros de ¹³C-NMR fueron corridos a 100 MHz.

^d d_H desplazamientos químicos de protón en ppm. La multiplicidad de las señales está representada por m, y la constante de acoplamiento, J, es expresada en Hz. Los espectros de ¹H-NMR fueron adquiridos a 400 MHz.

^e Estos valores pueden ser intercambiados.

Quiñónez, 1995). En un estudio químico preliminar los compuestos **1**, **2**, friedelina y friedelan-3 α -ol fueron aislados previamente de esta misma fuente (Encarnación-Dimayuga *et al.*, 1999), pero también **2** y **3** junto con otros 10 derivados del kaemferol fueron reportados de *Ericameria diffusa* (Urbatsch *et al.*, 1976), que es uno de los sinónimos taxonómicos de *H. sonorensis* (Shreve y Wiggins, 1968). Adicionalmente los compuestos **1** – **3** han sido aislados de numerosas especies pertenecientes a familias tales como, Meliaceae, Lamiatae, Zingiberaceae, Asteraceae, Combretaceae, Verbenaceae y Cistaceae, e incluso son conocidos como productos de síntesis (Beilstein Database, 2001). Sin embargo, nunca se había reportado su actividad antimicobacteriana.

Ermanina, **2**, fue el compuesto más activo contra *M. tuberculosis* aislado de *H. sonorensis*, mostrando 98% de inhibición a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Aunque previamente se reportó su actividad antiviral (De Meyer *et al.*, 1991, Robin *et al.*, 1998), antiinflamatoria (Yasukawa *et al.*, 1989) y citotóxica (Banskota *et al.*, 1998), esta es la primera ocasión en la cual ermanina ha sido reportada como antimicobacteriana. Su estructura química es muy similar a la de la nevadensina, la cual es una flavona con marcada actividad antimicobacteriana (Xu *et al.*, 1979). Ermanina no mostró efecto citotóxico contra células HCT-116. En contraste, ermanina ha sido reportada como potente inhibidor de células de carcinoma de colon murino y fibrosarcoma humano (Banskota *et al.*, 1998). Los compuestos **1** y **3** mostraron baja actividad contra *M. tuberculosis* y la línea celular HCT-116, pero estos compuestos han sido reportados como antimutagénicos (Miyazawa *et al.*, 2000), antiinflamatorios (Yasukawa *et al.*, 1989) y antivirales (De Meyer *et al.*, 1991). Particularmente **3** fue reportada como agente antiulceroso (Lewis, 1992).

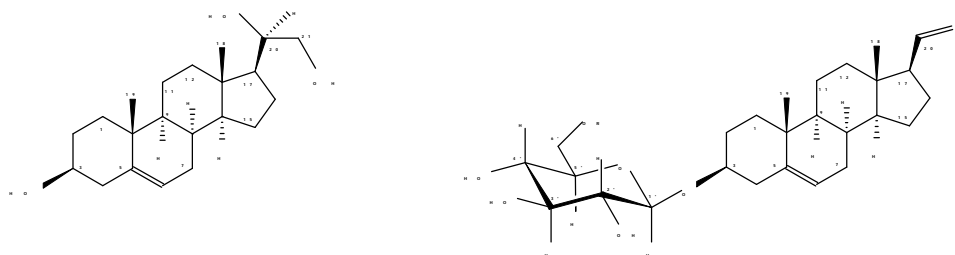
Las diversas actividades biológicas y farmacológicas de los compuestos aislados de *H. sonorensis* ayuda a justificar el uso tradicional de esta planta en el noroeste de México, donde se emplea en el tratamiento de úlceras de la piel, dolor de muelas, tos, resfriado común, dolor de cabeza, reumatismo y problemas cardíacos (López e Hinojosa, 1988; Encarnación-Dimayuga, 1996).

Por otro lado, los organismos marinos representan una enorme fuente de compuestos estructuralmente novedosos y con potencial biomédico (Faulkner, 1999; Fusetani, 2000), por ello en nuestro laboratorio como en muchos otros, el estudio de estos organismos desde el punto de vista farmacognóstico es una prioridad. La selección del gorgónido *M. austera* se basó en reportes previos sobre su actividad antimicrobiana (Encarnación-Dimayuga y Keer-García, 1992; Encarnación-Dimayuga *et al.*, 2000), la cual ha sido ensayada desde principios de los años noventa y el extracto etanólico de este organismo ha mostrado actividad inhibitoria contra *B. subtilis* y *S. aureus* de forma consistente. La selección fue apoyada al considerar que, según una consulta en SciFinder Scholar, solamente 3 sesquiterpenos derivados del germacreno; sericenina, neosericenina e isosericenina, habían sido reportados de *M. austera* previamente (Izac *et al.*, 1982). Por estas razones decidimos investigar este organismos. Los especímenes colectados fueron extraídos exhaustivamente por maceración con una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH (7:3). Después de evaporación del disolvente a presión reducida, el residuo fue suspendido en la misma mezcla de extracción para separar las sales inorgánicas. El extracto orgánico fue fraccionado por cromatografía en columna y HPLC (figura 4). Los ensayos de actividad antimicrobiana y citotóxica (secciones 2.1.4. y 2.1.5.) fueron empleados como guía de fraccionamiento, conduciéndonos al aislamiento de los compuestos **4 – 6**.

El compuesto **4** fue el producto mayoritario aislado en forma de agujas blancas (p.f. 223-235°C, MeOH) e identificado como *pregna-5-en-3 β ,20 α ,21-triol*. El espectro de masas de **4** mostró un ión pseudomolecular a m/z 335 $[M + H]^+$, el cual junto con el espectros de ^{13}C -NMR sugirió la fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_3$ con 5 equivalentes de doble enlace consistente con una estructura tetracíclica monoinsaturada. A partir de la inspección detallada de los espectros de ^1H y ^{13}C -NMR fue claramente evidente que **4** era el *pregna-5-en-3 β ,20 α ,21-triol*, lo cual fue confirmado en base a un extenso estudio espectral por medio de 2D-NMR y por comparación de sus propiedades físicas con lo reportado en la literatura (Kirk y Rowell, 1970). Este compuesto es un constituyente conocido de fluidos corporales de recién nacidos e infantes (Gustafsson *et al.*, 1969; Shackleton *et al.*, 1971), el cual ya había sido aislado de *M. austera* en 1990 (Encarnación y Rios, 1990), pero no encontramos reportes de su aislamiento a partir de ninguna otra fuente marina.

El análisis espectral de **5** y **6** por ESIMS, ^1H y ^{13}C -NMR sugirió la fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_6$ y $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_7$, respectivamente. Los espectros de ^1H y ^{13}C -NMR de ambos compuestos mostraron evidencia de una hexosa cíclica de configuración β -anomérica. Por medio del análisis completo de los datos NMR bidimensional, la porción tetracíclica de **5** y **6** fue fácilmente identificada como *pregna-5,20-dien-3 β -ol*, el mismo aglucón identificado previamente en la esponja *Damiriana hawaiiana* (Delseth *et al.*, 1978) y en los octocorales *Gersemia rubiformis* (Kingston *et al.*, 1979), *Muricea fructicosa* (Bandurraga y Fenical, 1985) *Pseudoplexaura wagnaari* (Wasylyk *et al.*, 1989), *Pieterfaurea unilobata* (Beukes *et al.*, 1997) y *Eunicea* sp. (Cóbar *et al.*, 1997). La tabla III muestra la asignación de señales de ^1H y ^{13}C -NMR para los compuestos **4** – **6**.

Tabla III. Asignación de señales de ^1H y ^{13}C -NMR para los compuestos 4 - 6.^a



	4		5, R = Ac		6, R = H	
Carbón	d_C (DEPT)	d_H (J en Hz)	d_C (DEPT)	d_H (J en Hz)	d_C (DEPT)	d_H (J en Hz)
1	38.2 (CH ₂)	1.08 m, 1.83 m	38.2 (CH ₂)	1.13 m, 1.86 m	38.3 (CH ₂)	1.10 m, 1.85 m
2	32.7 (CH ₂)	1.52 m, 1.84 m	30.4 (CH ₂)	1.62 m, 1.94 m	30.4 (CH ₂)	1.64 m, 1.96 m
3	72.0 (CH)	3.42 m	80.2 (CH)	3.55 m	79.6 (CH)	3.60 m
4	42.7 (CH ₂)	2.23 m, 2.35 m	39.5 (CH ₂)	2.29 m, 2.42 m	39.5 (CH ₂)	2.27 m, 2.43 m
5	141.6 (C)		141.2 (C)		141.3 (C)	
6	121.9 (CH)	5.34 d (5)	122.3 (CH)	5.38 brd (5.4)	122.3 (CH)	5.37 brd (4.5)
7	32.0 (CH ₂)	1.58 m, 1.96 m	32.8 (CH ₂)	1.63 m, 1.98 m	32.9 (CH ₂)	1.60 m, 1.98 m
8	32.6 (CH)	1.50 m	32.9 (CH)	1.51 m	33.0 (CH)	1.44 m
9	51.3 (CH)	0.96 m	51.5 (CH)	0.99 m	51.6 (CH)	0.98 m
10	37.4 (C)		37.6 (C)		37.7 (C)	
11	21.7 (CH ₂)	1.46 m, 1.56 m	21.5 (CH ₂)	1.44 m, 1.55 m	21.6 (CH ₂)	1.45 m, 1.56 m
12	39.5 (CH ₂)	1.16 m, 1.86 m	38.2 (CH ₂)	1.72 m, 1.92 m	38.3 (CH ₂)	1.68, 1.94 m
13	42.3 (C)		44.1 (C)		44.2 (C)	
14	57.5 (CH)	1.10 m	56.8 (CH)	1.09 m	56.9 (CH)	1.04 m
15	25.0 (CH ₂)	1.18 m, 1.67 m	25.6 (CH ₂)	1.13 m, 1.74 m	25.9 (CH ₂)	1.17 m, 1.65 m
16	25.8 (CH ₂)	1.54 m, 1.79 m	28.0 (CH ₂)	1.55 m, 1.76 m	28.1 (CH ₂)	1.55 m, 1.78 m
17	53.7 (CH)	1.47 m	56.3 (CH)	1.98 m	56.4 (CH)	1.95 m
18	13.1 (CH ₃)	0.74 s	13.1 (CH ₃)	0.63 s	13.2 (CH ₃)	0.62 s
19	19.8 (CH ₃)	1.02 s	19.8 (CH ₃)	1.03 s	19.8 (CH ₃)	1.03 s
20	74.4 (CH)	3.58 ddd (2.4, 7.8, 15.6)	140.1 (CH)	5.75 m	140.2 (CH)	5.75 m
21	66.6 (CH ₂)	3.35 dd (7.8, 10.8), 3.67 dd (2.4, 10.8)	114.7 (CH ₂)	4.95 d (14.7) 4.96 d (12.3)	114.7 (CH ₂)	4.95 d (15.3) 4.96 d (12.3)
1'			102.2 (CH)	4.39 d (7.7)	102.0 (CH)	4.40 d (7.8)
2'			74.6 (CH)	3.21 dd (8, 7.7)	74.6 (CH)	3.19 dd (8, 7.8)
3'			77.4 (CH)	3.32 m	77.3 (CH)	3.30 m
4'			71.2 (CH)	3.35 m	71.2 (CH)	3.34 m
5'			74.7 (CH)	3.45 m	77.6 (CH)	3.30 m
6'			64.5 (CH ₂)	4.23 dd (6.3, 12.0) 4.37 dd (2.4, 12.0)	62.5 (CH ₂)	3.69 dd (5.1, 12.0) 3.86 dd (2.1, 12.0)
1''			172.2 (C)			
2''			20.9 (CH ₃)	2.04 s		

^a Una mezcla de CDCl_3 : CD_3OD (1:1) fue usado como disolvente.

Los desplazamientos químicos fueron expresados en partes en ppm relativos al tetrametilsilano, y las constantes de acoplamiento, J fueron expresadas en Hertz.

Todas las asignaciones fueron hechas con base en experimentos ^1H - ^1H COSY, HMBC y HMQC.

Nuestros hallazgos son consistentes con lo reportado en la literatura, donde es evidente que los organismos del género *Muricea* son una rica fuente de esteroides marinos (Block, 1974; Popov *et al.*, 1983; Benito-Pruna *et al.*, 1983; Bandurraga y Fenical, 1985; Ortega *et al.*, 2002). Incluso han sido reportados algunos esteroides con esqueletos derivados del pregnano caracterizados por poseer una cadena lateral vinílica (Bandurraga y Fenical, 1985; Ortega *et al.*, 2002), los cuales son un grupo minoritario entre el gran número de esteroides de origen marino (Kerr y Baker, 1991, De' Auria *et al.*, 1993).

Los compuestos **4** – **6** fueron probados contra células HCT-116 y contra *B. subtilis* y *S. aureus*. **5** mostró moderada citotoxicidad con un valor de IC₅₀ igual a 17.3 µg mL⁻¹ y **4** inhibió el crecimiento de *B. subtilis* y *S. aureus* a una concentración de 250 µg disco⁻¹.

5. Conclusiones y recomendaciones.

El objetivo de este estudio fue la búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana y citotóxica en recursos seleccionados de Baja California Sur. Para cumplir este objetivo fueron investigados los extractos etanólicos de 25 plantas empleadas en la medicina tradicional de Baja California Sur, como fuente potencial de compuestos no-citotóxicos con actividad antimicobacteriana, de las cuales *H. sonorensis* fue seleccionado. Adicionalmente, el octocoral *M. austera* fue investigado con base en reportes previos sobre su actividad antimicrobiana.

La estrategia de estudio seguida en esta investigación resultó ser exitosa en la búsqueda de los compuestos activos de los organismos seleccionados. En el presente

estudio fue posible aislar 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (**1**), ermanina (**2**) y kumatakenina (**3**) a partir de *H. sonorensis*; pregna-5-en-3 β ,20 α ,21-triol (**4**), pregna-5,20-dien-3-*O*- β -(6'-*O*-acetil)-glucopiranosido (**5**) y pregna-5,20-dien-3-*O*- β -glucopiranosido (**6**) a partir de *M. austera*. Los compuestos **1** – **3** fueron identificados como los principales compuestos activos contra *M. tuberculosis*, siendo **2** el más activo de ellos. El trihidroxi esterol **4** fue activo contra *B. subtilis* y *S. aureus*, mientras que el nuevo compuesto **6** presentó actividad citotóxica contra células de carcinoma de colon humano.

Aunque dos de los seis compuestos aislados fueron nuevos, su hallazgo se relaciona con un evento fortuito, por ello, en el futuro la estrategia de selección podría incluir la dereplicación de los extractos y fracciones activas con la idea de optimizar la búsqueda de nuevos compuestos activos.

6. Literatura citada.

- Amaya-Tapia, G.; Martin-Del Campo, L.; Aguirre-Avalos, G.; Portillo-Gomez, L.; Covarrubias-Pinedo, A.; Aguilar-Benavides, S. (2000) Primary and acquired resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Western Mexico. *Microbial Drug Resistance* 6(2): 143-145.
- Arriaga, L. (1994) Estrategias para la conservación de la Sierra de La Laguna. CIBNor, S.C., La Paz. pp. 16-18.
- Ates, N.; Ulubelen, A.; Clark, W. D.; Brown, G. K.; Mabry, J.; Dellamonica, G.; Copian, J. (1981) Flavonoids of *Haplopappus scrobiculatus* and *Haplopappus sericeus*. *Journal of Natural Products* 45(2): 189-190.
- Ayanoglu, E.; Ulubelen, A.; Clark, W. D.; Brown, G. K.; Kerr, R. R.; Mabry, T. J. (1981) Myricetin and quercetin metil ethers from *Haplopappus integerrimus* var. *punctatus*. *Phytochemistry* 20(7): 1715-1717.
- Bandurraga, M.; Fenical, W. (1985) Isolation of muricins. Evidence of a chemical adaptation against fouling in the marine octocoral *Muricea fruticosa* (Gorgonacea). *Tetrahedron* 41(6): 1057-1065.

- Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Prasain, J. K.; Matsushige, K.; Saiki, I.; Kadota, S. (1998) Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *Journal of Natural Products* 61(7): 896-900.
- Bastida-Zavala, J. R. (1991) Poliquetos (Annelida: Polychaeta) del sureste de la Bahía de La Paz, BCS., México. Taxonomía y aspectos biogeográficos. Tesis de la Universidad Autónoma de Baja California Sur.
- Behrens, D. W. (1991) Pacific coast nudibranchs. Sea Challengers. Monterey, California.
- Beilstein Intitut zur Foerderung der Chemischen Wissenschaften. Beilstein Database 2001. (parámetros de búsqueda: CAS Registry Number: 15486-34-7, 20869-95-8, 3301-49-3).
- Benito-Pruna, L.; Llerena-Martínez, E.; Izquierdo-Lozano, J.; Meras-Cepero, M.; Henriques, R. D. (1983) Chemical studies of Cuban gorgonians. IX. 24-methylenecholesterol in *Muricea muricata* gorgonia. *Revista Cubana de Farmacia* 17(1): 23-27.
- Bergmann, W.; Burke, D. C. (1955) Marine products. XXXIX. The nucleosides of sponges. III. Spongothymidine and spongouridine. *Journal of Organic Chemistry* 20, 1501-1507.
- Beukes, D. R.; Davies-Coleman, M. T.; Eggleston, D. S.; Haltiwanger, R. C.; Tomkowics, B. (1997) New polyhydroxylated pregnadienes from the south african soft coral *Pieterfaurea uniloba*. *Journal of Natural Products* 60(6): 573-577.
- Bianchi, E.; Caldwell, M. E.; Cole, J. R. (1968) Antitumor agents from *Bursera microphylla* (Burseraceae) I. Isolation and characterization of deoxypodophyllotoxin. *Journal of Pharmaceutical Science* 57(4): 696-697.
- Block, J. H. (1974) Marine sterols from some gorgonians. *Steroids* 23(3): 421-424.
- Boyd, M. R. (1992) The future of new drug development. En: Neiderhuber, J. E. (ed.) Current therapy in oncology. B. C. Decker, Inc. Philadelphia. pp. 11-22.
- Bruhn, J. G.; Bohlin, L. (1997) Molecular pharmacognosy: an explanatory model. *Drugs Discovery Trends* 2(6): 243-246.
- Brusca, R. C. (1980) Common intertidal invertebrates of the Gulf of California. The University of Arizona Press. USA.
- Calvert, D. J.; Cambie, R. C.; Davis, B. R. (1979) ¹³C-NMR-spectra of polymethoxyflavonols and methylenedioxyflavones. *Organic Magnetic Resonance* 12(10): 583-586.
- Cantrell, C. L.; Fischer, N. H.; Orbatch, L.; McGuire, M. S.; Franzblau, S. G. (1998) Antimycobacterial crude plant extracts from South Central North America. *Phytomedicine* 5(2): 139-147.
- Carreras, C. W.; Pieper, R.; Khosla, C. (1996) Efficient synthesis of aromatic polyketides *in vitro* by the actinorhodin polyketide synthase. *Journal of the American Chemical Society* 118(21): 5158-5159.
- Casas-Valdez, M.; Núñez-López, R. A.; Cruz-Ayala, M. B.; Sánchez-Rodríguez, I.; Vázquez-Borja, R.; López, G. E. (2000) Biodiversity and biogeographic affinities of the algal flora of Baja California Sur, México. En: Munawar, M.; Laurences, S.; Munawar, I. F.; Malley, D. (eds.) Aquatic ecosystems of México: Status and scope. Ecovision World Monograph Series, 435 pp.

- Chiang, M. T.; Bittner, M.; Silva, M.; Mondaca, A.; Zemelman, R.; Sammes, P. G. (1982) A prenylated coumarin with antimicrobial activity from *Haplopappus multifolius*. *Phytochemistry* 21(11): 2753-2755.
- Clark, W. D.; Urbatsch, L. E.; Hartman, R. L.; Mayes, R. A.; Mabry, T. J. (1980) Systematic implications of flavonoid patterns in *Haplopappus* segregates. *Biochemical Systematics and Ecology* 8(3): 257-259.
- Cóbar, O. M.; Rodríguez, A. D.; Padilla, O. L. (1997) A new steroidal glycoside from a caribbean gorgonian, *Eunicea* sp. *Journal of Natural Products* 60(11): 1186-1188.
- Cohn, D. L.; Bustreo, F.; Raviglione, M. C. (1997) Drug-resistant tuberculosis: Review of the worldwide situation and the WHO/IUATLD Global Surveillance Project. *Clinical Infectious Diseases* 24: S121-S130.
- Cole, J. R.; Bianchi, E.; Trumbull, E. R. (1969) Antitumor agents from *Bursera microphylla* (Burseraceae). II. Isolation of a new lignan-burseran. *Journal of Pharmaceutical Science* 58(2): 175-176.
- Cordell, G. A. (2000) Biodiversity and drug discovery—A symbiotic relationship. *Phytochemistry* 55(6): 463-480.
- Coria, R. (1997) Climatología. En: Arriaga, L.; Rodríguez, R. (eds.) Los oasis de la Península de Baja California. SIMAC CIB, La Paz. pp. 27-29.
- Cragg, G. M.; Boyd, M. R.; Cardellina, J. H., II; Grever, M. R.; Schepartz, S. A.; Snader, K. M.; Suffness, M. (1993) Role of plants in the National Cancer Institute Drug Discovery and Development Program. En: Kinghorn, A. D. y Balandrin, M. F. (eds.) Human medicinal agents from plants. ACS Symposium Series 534; American Chemical Society, Washington, D.C., 80-95.
- Cragg, G. M.; Newman, D. J.; Snader, K. M. (1997) Natural products in drug discover and development. *Journal of Natural Products* 60(1): 52-60.
- Davies, J. (1994) Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264: 375-382.
- De'Auria, M. V.; Minale, L.; Riccio, R. (1993) Polyoxigenated steroids of marine origen. *Chemical Reviews* 93(5): 1839-1895.
- De Meyer, N.; Haemers, A.; Mishra, L.; Pandey, H. K.; Pieters, L. A. C.; Vanden-Berghe, D. A.; Vlietinck, A. J. (1991) 4'-Hydroxy-3-methoxyflavones with potent antipicornavirus activity. *Journal of Medicinal Chemistry* 34(2): 736-746.
- Delseth, C.; Carlson, R. M. K.; Djerassi, C.; Erdman, T. R.; Scheuer, P. J. (1978) *Helvetica Chimica Acta* 61: 1470-1476.
- Deng, B. L.; Lepoivre, J. A.; Lemiere, G.; Dommissse, R.; Claeys, M.; Boers, F.; De Groot, A. (1997) A practical synthesis of 3-methoxyflavones. *Liebigs Annalen-Recueil* 0(10): 2169-2175.
- Dictionary of Natural Products on CD-ROM (Version 9:2). Chapman & Hall, Electronic publishing division.
- Dong, H.; Gou, Y. L.; Cao, S. G.; Chen, S. X.; Sim, K. Y.; Goh, S. H.; Kini, M. R. (1999) Eicosenones and methylated flavonols from *Amomum koenigii*. *Phytochemistry* 50(5): 899-902.
- El Sayed, K. A.; Bartyzel, P.; Shen, X.; Perry, T. L.; Zjawiony, J. K.; Hamann, M. T. (2000) Marine natural products as antituberculosis agents. *Tetrahedron* 56(7): 949-953.

- Encarnación, R. (1980) Nuevos proyectos. Investigación farmacognóstica de productos naturales. Informe general de labores. Centro de Investigaciones Biológicas de La Paz. p. 307.
- Encarnación, R.; Agúndez, J. (1986) Traditional medicine of Baja California Sur (Mexico) I. *Journal of Ethnopharmacology* 17(2): 183-193.
- Encarnación, R.; Fort, R.; Pantoja, M. (1987) Traditional medicine of Baja California Sur (México) II. *Journal of Ethnopharmacology* 20(3): 209-222.
- Encarnación, D.; Carrasco, G.; Espinoza, M.; Anthoni, U.; Nielsen, R. H.; Christophersen, C. (1989) Neothyoside A, proposed structure of a triterpenoid tetraglycoside from the Pacific sea cucumber *Neothyone gibbosa*. *Journal of Natural Products* 52(2): 248-251.
- Encarnación, R.; Rios, T. (1990) Comunicación personal.
- Encarnación, D.; Nielsen, P. H.; Christophersen, C. (1990) Traditional medicine of Baja California Sur (México) III. Carnosol a diterpene antibiotic from *Lepechinia hastata*. *Journal of Ethnopharmacology* 31(1): 43-48.
- Encarnación, R.; Keer, S. (1991) Antimicrobial screening of medicinal plants from Baja California Sur, México. *Journal of Ethnopharmacology* 31(2): 181-192.
- Encarnación-Dimayuga, R. (1992) Pharmacognostical studies of naturales resources from Baja California Sur, Mexico. *Acta Universitatis Upsaliensis* 101: 25-28.
- Encarnación, R.; Contreras, G. (1992) Medicina tradicional de Baja California Sur, México IV. *Revista Médica del IMSS* 30(4): 297-307.
- Encarnación-Dimayuga, R.; Keer-García, S. (1992) Compuestos con actividad antimicrobiana de organismos marinos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 22(6): 33-41.
- Encarnación-Dimayuga, R.; Aoki-Maki, K.; Cortes-Arroyo, A. (1994) Effect of marine organisms extracts on smooth muscle spontaneous contractility. *International Journal of Pharmacognosy* 32(4): 320-329.
- Encarnación, R.; Agúndez, J. (1995) Medicina tradicional de Baja California Sur. México V. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 26(1): 25-44.
- Encarnación-Dimayuga, R. (1996) Medicina tradicional y popular de Baja California Sur. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz.
- Encarnación, R.; Murillo, J. I.; Nielsen, J.; Christophersen, C. (1996) Neothyoside B, a triterpenoid diglycoside from the marine sea cucumber *Neothyone gibbosa*. *Acta Chemica Scandinavica* 50: 848-849.
- Encarnación-Dimayuga, R.; Virgen, M.; Ochoa, N. (1998) Antimicrobial activity of medicinal plants from Baja California Sur (Mexico). *Pharmaceutical Biology* 36(1): 33-43.
- Encarnación, R.; Altamirano, L.; Aoki, K. (1998) Screening of medicinal plants from Baja California Sur (Mexico) by their effects on smooth muscle contractility. *Pharmaceutical Biology* 36(2): 124-130.
- Encarnación-Dimayuga, R.; Murillo, J. I.; Malmstrøm, G.; Christophersen, C. (1999) Constituents of *Haplopappus sonorensis*. *Fitoterapia* 70(5): 536-537.
- Encarnación-Dimayuga, R.; Franzblau, S.; Tapia, C. A.; Cedillo-Rivera, R. (2000) Screening of marine organisms for antimicrobial and antiprotozoal activity. *Pharmaceutical Biology* 38(5): 379-384.

- Faini, F.; Labbé, C.; Torres, R.; Delle Monache, F.; Delle Monache, G. (1999) Diterpenes from *Haplopappus chrysanthemifolius*. *Phytochemistry* 52(8): 1547-1550.
- Faulkner, J. (2000) Highlights of marine natural products chemistry (1972–1999). *Natural Products Reports* 17(1): 1-6, y artículos previos en esta serie
- Foroumadi, A.; Asadipour, A.; Mirzaei, M.; Karimi, J.; Emami, S. (2002) Antituberculosis agents. V. Synthesis, evaluation of *in vitro* antituberculosis activity and cytotoxicity of some 2-(5-nitro-2-furyl)-1,3,4-thiadiazole derivatives. *Farmaco* 57(9): 765-769.
- Foroumadi, A.; Mirzaei, M.; Shafiee, A. (2001) Antituberculosis agents II. Evaluation of *in vitro* antituberculosis activity and cytotoxicity of some 2-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole derivatives. *Farmaco* 56(8): 621-623.
- Fusetani, N., ed. (2000) *Drugs from the sea*. Karger. Basel.
- Gajhede, M.; Encarnación, R.; Christophersen, C.; Nielsen, P. H.; Leal, G. C. (1990) *Acta Crystallographica C* 45(12): 440-441.
- García-García, M. de L.; Sifuentes-Osornio, J.; Jiménez-Corona, M. E.; Ponce de León, A.; Jiménez-Corona, A.; Bobadille del Valle, M.; Palacios-Martínez, M.; Canales, G.; Sanguinés, A.; Jaramillo, Y.; Martínez-Gamboa, A.; Balandrano, S.; Valdespino-Gómez, J. L.; Small, P. (2001) Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a los antimicrobianos en Orizaba, Veracruz. Implicaciones para el Programa de Prevención y Control de la Tuberculosis. *La Revista de Investigación Clínica* 53(4): 315-323.
- Gordon, E. M.; Barret, R. W.; Dower, W. J.; Fodor, S. P. A.; Gallop, M. A. (1994) Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 2. Combinatorial organic synthesis, library screening strategies, and future directions. *Journal of Medicinal Chemistry* 37(10): 1385-1401.
- Gotshall, D. W. (1994) *Guide to marine invertebrates. Alaska to Baja California*. Sea Challengers. Monterrey, California.
- Gotshall, D. W. (1998) *Sea of Cortez marine animals. A guide to the common fishes and invertebrates Baja California to Panama*. Sea Challengers. Monterrey, California.
- Grau, J. (1977) Astereae - systematic review. En: Heywood, V.; Harborne, J.; Turner, B. L. (eds.) *The biology and chemistry of the Compositae*. Academic Press, London. 539-565.
- Gullo, V. P., ed. (1994) *The discovery of natural products with therapeutic potential*. Butterworth-Heinemann. Boston.
- Gunasekera, S. P.; Gunasekera, M.; Longley, R. E.; Schulte, G. K. (1990) Discodermolide: A new bioactive polyhydroxylated lactone from the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *Journal of Organic Chemistry* 55, 4912-4915.
- Gustafsson, J. A.; Shackleton, C. H. L.; Sjoval, J. (1969) Steroids in newborns and infants. C19 and C21 steroids in feces from infants. *European Journal of Biochemistry* 10(2): 302-311.
- Harbone, J. B. (1982) *Introduction to ecological biochemistry*. Academic Press. Londres.
- Horwitz, S. B.; Martello, L. A.; Yang, C-P. H.; Smith, A. B., III; McDaid, H. M. (2001) Discodermolide and taxol: A synergistic drug combination in human carcinoma cell lines. *Anticancer Agents*. ACS Symposium Series 796; American Chemical Society, Washington, D.C., 81-96.
- Hostettmann, K. (1999) Comunicación personal, en oportunidad del taller: Metodologías para la búsqueda de nuevos compuestos líderes en plantas. Llevado a cabo en el

- Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán, del 5 al 9 de Julio de 1999, bajo el auspicio del CYTED, CONACYT y el CYCY.
- Izac, R. R.; Bandurraga, M. M.; Wasyluk, J. M.; Dunn, F. W.; Fenical, W. (1982) Germacrene derivatives from diverse marine soft-corals (Octocorallia). *Tetrahedron* 38(2): 301-304.
- Jakupovic, J.; Baruah, R. N.; Zdero, C.; Eid, F.; Pathak, V. P.; Chau-Thi, T. V.; Bohlmann, F.; King, R. M.; Robinson, H. (1986). Further diterpenes from plants of the Compositae, subtribe Solidagininae. *Phytochemistry* 25(8): 1873-1881.
- Jiménez, C. (2000) Comunicación personal, en oportunidad del curso: El mar como fuente de moléculas bioactivas. Impartido por: Luis D´Croz, José Luis Carballo, Francisco J. Flores, Javier Fernández, Carlos Jiménez, Douglas McKenzie, y Agustín Pérez-Aranda. Llevado a cabo en la Universidad Autónoma de Baja California Sur, del 19 al 24 de Noviembre de 2000, bajo el auspicio del CYTED y la UABCS.
- Johansson, S.; Lindholm, P.; Gullobo, J.; Larsson, R.; Bohlin, L.; Cleason, P. (2001) Cytotoxicity of digitoxin and related cardiac glycosides in human tumor cells. *Anticancer drugs* 12(5): 475-483.
- Juslén, C. K.; Kuhn, M.; Wartburg, A. V.; Stähelin, H. (1971) Synthesis and antimetabolic activity of glycosidic lignan derivatives related to podophyllotoxin. *Journal of Medicinal Chemistry* 14, 936-940.
- Kerr, R. G.; Baker, B. J. (1991) Marine sterols. *Natural Products Reports* 8(5): 465-497.
- Kinghorn, A. D.; Balandrin, M. F., eds. (1993) Human medicinal agents from plants. ACS Symposium Series 534. American Chemical Society. Washington, D. C.
- Kingston, J. F.; Gregory, B.; Fallis, A. G. (1979) Marine natural products novel 21 carbon Δ -20 pregnanes from the sea-raspberry *Gersemia rubiformis*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* 0(8): 2064-2068.
- Kirk, D. N.; Rowell, F. J. (1970) Urinary steroids. VIII. Exploration of routes to pregnane-20 α ,21-diol derivatives. *Journal of the Chemical Society C* 0(10): 1495-1502.
- Klayman, D. L. (1993) *Artemisia annua*: From weed to respectable antimalarial plant. En: Kinghorn, A. D. y Balandrin, M. F. (eds.) Human medicinal agents from plants. ACS Symposium Series 534. American Chemical Society. Washington, D. C. pp. 242-255.
- König, G. M.; Wright, A. D.; Franzblau, S. G. (2000) Assessment of antimycobacterial activity of a series of mainly marine derived natural products. *Planta Medica* 66(4): 337-342.
- Labbé, C.; Faini, F.; Coll, J.; Carbonell, P. (1998) Guaiane sesquiterpenoids from *Haplopappus foliosus*. *Phytochemistry* 49(3): 793-795.
- Larsen, I. K. (1996) Anticancer agents. En: Krogsgaard-Larsen, P.; Liljefors, T.; Madsen, U. (eds.) A textbook of drug design and development. Harwood Academic Publishers. Amsterdam. pp. 460-507.
- Lewis, D. A. (1992) Antiulcer drugs from plants. *Chemistry in Britain* 28(2): 141-144.
- Liljefors, T.; Pettersson, I. (1996) Computer-aid development of three-dimensional pharmacophore models. En: Krogsgaard-Larsen, P.; Liljefors, T.; Madsen, U. (eds.) A textbook of drug design and development. Harwood Academic Publishers. Amsterdam. pp. 60-93.

- López, R. y Hinojosa, A. (1988) Catálogo de las plantas medicinales sonorenses. Universidad de Sonora, Hermosillo. p. 5.
- Malmstrøm, J.; Encarnación, R.; Murillo, J. I.; Christophersen, C. (1998) Glucósidos triterpenoidales del pepino de mar *Neothyone gibbosa* Deichmann (Cucumaridae). Presentación oral en el XXXI Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas (1998). Veracruz, México. Libro de resúmenes, resumen No. 3.
- Mann, J. (1994) Chemical aspects of biosynthesis. Oxford Science Publications. Londres.
- Markham, K. B.; Ternai, B. (1976) ¹³C NMR of flavonoids. II. Flavonoids other than flavones and flavonol aglycones. *Tetrahedron* 32: 2607-2612.
- Miller, J. B. (2000) *The Pharmaceutical Century: Ten Decades of Drug Discovery*, Supplement to ACS Publications, 21-63.
- Miyazawa, M.; Okuno, Y.; Nakamura, S.; Kosaka, H. (2000) Antimutagenic activity of flavonoids from *Pogostemon cablin*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(3): 642-647.
- Nakatani, N.; Jitoe, A.; Masuda, T.; Yonemori, S. (1991) Flavonoid constituents of *Zingiber serumbet*. *Agricultural Biological Chemistry* 55(2): 455-460.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. (2000) The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Products Reports* 17: 215-234.
- Nikaido, H. (1994) Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Science* 264: 382-388.
- Núñez-Alarco, J.; Quiñónez, M. (1995) Flavonoids and coumarins of *Haplopappus multifolius*. *Biochemical Systematics and Ecology* 23(4): 453-454.
- Ortega, M. J.; Zubía, E.; Rodríguez, S.; Carballo, J. L.; Salvá, J. (2002) Muricenones A and B: New degraded pregnanes from a gorgonian of the genus *Muricea*. *European Journal of Organic Chemistry* 19: 3250-3253.
- Pablos-Mendez, A.; Raviglione, M. C.; Laszlo, A.; Binkin, N.; Reider, H. L.; Bustreo, F.; Cohn, D. L.; Lambregts-van; Weezenbeek, C. S.; Kim, S. J.; Chaulet, P.; Nunn, P. (1998) Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *New England Journal of Medicine* 338(23): 1641-1649.
- Phillipson, J. D. (1999) New drugs from nature—It could be yew. *Phytotherapy Research* 13(1): 2-8.
- Popov, S.; Carlson, M. K.; Djerassi, C. (1983) Occurrence and seasonal variation of 19-norcholest-4-en-3-one and 3 β -monohydroxy sterols in the Californian gorgonian, *Muricea californica*. *Steroids* 41(4): 537-548.
- Reza-Gaona, M.; Sánchez Rodríguez, A. (2000) Variaciones espaciales en la comunidad de gorgónidos en el sur del Golfo de California. Tesis de la Universidad Autónoma de Baja California Sur.
- Rinehart, K. L.; Shaw, P. D.; Shield, L. S.; Gloer, J. B.; Harbour, G. C.; Koker, M. E. S.; Samain, D.; Schwartz, R. E.; Tymiak, A. A.; Weller, D. L.; Carter, G. T.; Munro, M. H. G.; Hughes Jr., R. G.; Renis, H. E.; Swynenberg, E. B.; Kuentzel, S. L.; Li, J. H.; Bakus, G. J.; Brusca, R. C.; Craft, L. L.; Young, D. N.; Connor J. L. (1981) Marine natural products as sources of antiviral, antimicrobial, and antineoplastic agents. *Pure and Applied Chemistry* 53: 795-817.

- Rivaglione, M. C.; Snider, D. E.; Kochi, A. (1995) Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemiology. *Journal of the American Medical Association* 273: 220-226.
- Robin, V.; Boustie, J.; Amoros, M.; Girre, L. (1998) In-vitro antiviral activity of seven *Psiadia* species, Asteraceae: Isolation of two antipoliiovirus flavonoides from *Psiadia dentate*. *Pharmacy and Pharmacology Communications* 4(1): 61-64.
- Rossi, M. H.; Yoshida, M.; Soares-Maia, J. G. (1997) Neolignans, styrylpyrones and flavonoids from an *Aniba* species. *Phytochemistry* 45(6): 1263-1269.
- Shackleton, C. H. L.; Gustafsson, J. A.; Sjoval, J. (1971) Steroids in newborns and infants. Identification of steroids in urine from newborn infants. *Steroids* 17(2): 265-280.
- Shreve F. y Wiggins, I. L. (1968) Vegetation and Flora of the Sonoran Desert. Stanford University Press, Stanford. p. 1482.
- Shu, Y. Z. (1998) Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products* 61(8): 1053-1071.
- Silva, M.; Sammes, P. G. (1973) New diterpenic acid an other constituents of *Haplopappus angustifolius*. *Phytochemistry* 12(7): 1755-1758.
- Sneider, W. (1996) Drug prototypes and their exploitation. John Wiley & Sons. Nueva York.
- Solís-Marín, F. A.; Reyes-Bonilla, H.; Herrero Pérezrul, D.; Arizpe-Covarrubias, O.; Laguarda-Figueras, A. (1997) Sistemática y distribución de los equinodermos de la Bahía de La Paz. *Ciencias Marinas* 23(2): 249-263.
- Sondheimer, E.; Simeone, J. B., eds. (1972) Chemical ecology. Academic Press. Nueva York.
- Spratt, B. G. (1994) Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 264: 388-393.
- SSA/Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (1999) Casos de notificación inmediata y semanal. Semana 1. *Epidemiología* 16: 3.
- Thompson, L. A.; Ellman, J. A. (1996) Synthesis and applications of small molecule libraries. *Chemical Reviews* 96(1): 555-600.
- Tojo, E.; Rial, M. E.; Urzua, A.; Mendoza, L. (1999) Clerodane diterpenes from *Haplopappus deserticola*. *Phytochemistry* 52(8): 1531-1533.
- Ulubelen, A.; Ayanoglu, E.; Clark, W. D.; Brown, G. K.; Mabry, T. J. (1982) Flavonoids from *Haplopappus foliosus*. *Journal of Natural Products* 45(3): 363-364.
- Ulubelen, A.; Clark, W. D.; Brown, G. K.; Mabry, T. J. (1981) Flavonoids of *Haplopappus rengifoanus* Remy in Gay. *Journal of Natural Products* 44(3): 294-295.
- Urbatsch, L. E.; Mabry, T. J.; Miyakado, M.; Ohno, N.; Yoshioka, H. (1976) Flavonol methyl ethers from *Ericameria diffusa*. *Phytochemistry* 15(3): 440-441.
- Urzúa, A.; Mendoza, L.; Andrade, L.; Miranda, B. (1997) Diterpenoids in the trichome resinous exudates from *Haplopappus shumannii*. *Biochemical Systematics and Ecology* 25(7): 683-684.
- Verrill, A. E. (1868) Review of the corals and polyps of the west coast of America. *Transactions of the Connecticut Academy of Art and Sciences* 1(6): 377-567.
- Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. (1971) The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society* 93(9): 2325-2327.

- Wasylyk, J. M.; Martin, G. E.; Weinheimer, A. J.; Alam, M. (1989) Isolation and identification of a new pregnene glycoside from the gorgonian *Pseudoplexaura wagenari*. *Journal of Natural Products* 52(2): 391-394.
- Whittaker, R. H. (1969) New concepts of kingdoms of organisms. *Science* 163: 150-161.
- WHO (1999) World health report 1998. WHO. Geneva.
- Wickramaratne, D. B.; Mar, W.; Chai, H.; Castillo, J. J.; Farnsworth, N. R.; Soejarto, D. D.; Cordell, G. A.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. (1995) Cytotoxic constituents of *Bursera permollis*. *Planta Medica* 61(1): 80-81.
- Wiggins, I. L. (1980) Flora of Baja California. Stanford University Press, Stanford. p. 267.
- Williams, M. y Gordon, E. M. (1996) Drug Discovery: An overview. En: Krogsgaard-Larsen, P.; Liljerfors, T. y Madsen, U. (eds.) A textbook of drug design and development. Harwood Academic Publishers. Amsterdam. pp. 460-507.
- Xu, Y.; Hu, Z. B.; Feng, S. Ch.; Fan, G. J. (1979) Studies on the anti-tuberculosis principles from *Lysionotus pauciflora* Maxim. I. Isolation and identification of nevadensin. *Yao Hsueh Pao* 14(7): 447-448.
- Yasukawa, K.; Takido, M.; Takeuchi, M.; Nakagawa, S. (1989) Effect of chemical constituents from plants on 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 37(4): 1071-1073.
- Young, R. N. (1999) Importance of Biodiversity to the Modern Pharmaceutical Industry. *Pure & Applied Chemistry* 71(9): 1655-1661.
- Yu, T. W.; Shen, Y.; McDaniel, R.; Floss, H. G.; Khosla, C.; Hopwood, D. A. y Moore, B. S. (1998) Engineered biosynthesis of novel polyketides from *Streptomyces* spore pigment polyketide synthases. *Journal of the American Chemical Society* 120(31): 749-7759.
- Zdero, C.; Bohlmann, F.; Niemeyer, H. M. (1990) Diterpenes and umbelliferone derivatives from *Haplopappus deserticola*. *Phytochemistry* 29(1) 326-329.
- Zdero, C.; Bohlmann, F.; Niemeyer, H. M. (1991a) Seco-, nor-, normal and rearranged labdanes from *Haplopappus parvifolius*. *Phytochemistry* 30(11): 3683-3691.
- Zdero, C.; Bohlmann, F.; Niemeyer, H. M. (1991b). Friedolabdanes and other constituents from chilean *Haplopappus* species. *Phytochemistry* 30(11): 3669-3677.