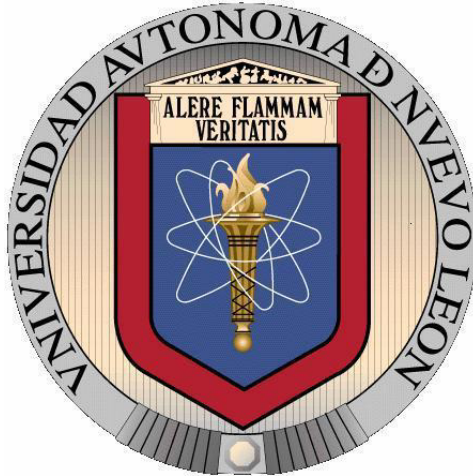


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**OBTENCIÓN DE FRACCIONES Y/O AISLAMIENTO DE COMPUESTOS  
CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA CEPAS DE  
*Staphylococcus aureus* A PARTIR DE *Cordia boissieri***

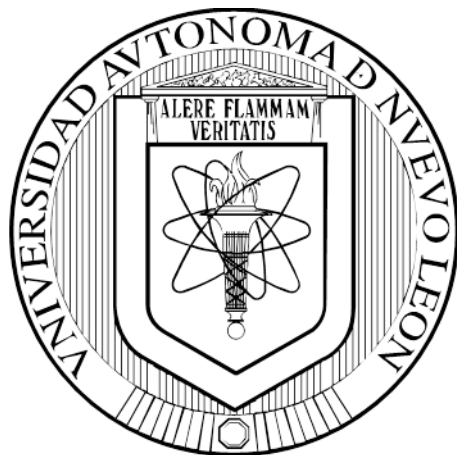
**POR**

**QCB. IRENE GUADALUPE RODRÍGUEZ VALENCIA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
QUÍMICA BIOMÉDICA**

**NOVIEMBRE, 2015**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**OBTENCIÓN DE FRACCIONES Y/O AISLAMIENTO DE COMPUESTOS  
CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA CEPAS DE  
*Staphylococcus aureus* A PARTIR DE *Cordia boissieri***

**POR**

**QCB. IRENE GUADALUPE RODRÍGUEZ VALENCIA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
QUÍMICA BIOMÉDICA**

**NOVIEMBRE, 2015**

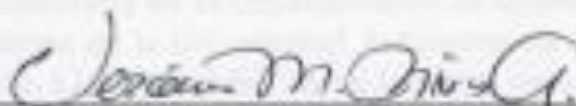
**OBTENCIÓN DE FRACCIONES Y/O AISLAMIENTO DE COMPUESTOS  
CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA CEPAS DE  
*Staphylococcus aureus* A PARTIR DE *Cordia boissieri***

Aprobación de la Tesis:



---

**Dr. Luis Alejandro Pérez López**  
Director de Tesis



---

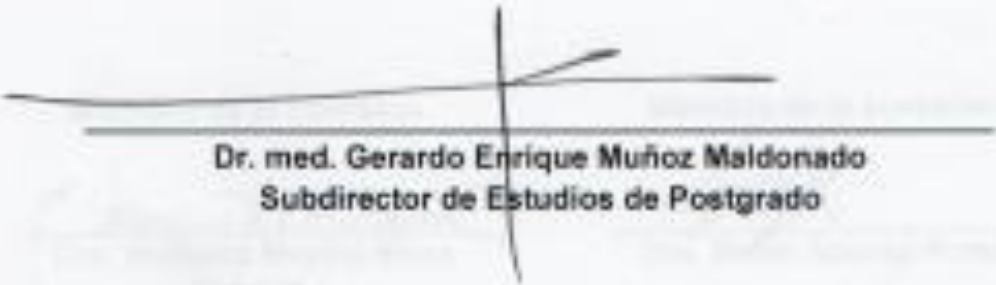
**Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo**  
Miembro de la comisión



---

**Dra. Rocio Álvarez Román**  
Miembro de la comisión

---



---

**Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado**  
Subdirector de Estudios de Postgrado

**OBTENCIÓN DE FRACCIONES Y/O AISLAMIENTO DE COMPUESTOS  
CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA CEPAS DE  
*Staphylococcus aureus* A PARTIR DE *Cordia boissieri***

Presentado por:

QCB. Irene Guadalupe Rodríguez Valencia

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Luis Alejandro Pérez López y como miembros de la comisión la Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo y la Dra. Rocio Álvarez Román.

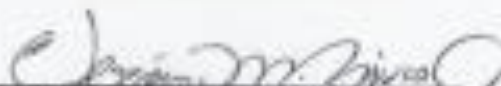
Director



---

Dr. Luis Alejandro Pérez López

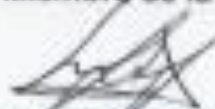
Miembro de la comisión



---

Dra. Verónica Mayela Rivas  
Galindo

Miembro de la comisión



---

Dra. Rocio Álvarez Román

## **DEDICATORIA**

Porque este no es solamente un papel,  
son más de dos años de una lucha ganada  
que al fin rindió frutos...

Dedico esta tesis:

### **A mis padres**

Irene Valencia Pantoja y Roberto Rodríguez Oviedo

Por ser las maravillosas personas que son y apoyarme a cada paso que doy

### **A mis amigas**

Paola, Cindy, Karina, Paty

Por estar a mi lado en las buenas, las malas y las peores

***A ti,  
que te has dado el tiempo de ver  
lo que con tanto esfuerzo he realizado...***

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por darme la vida y fortaleza necesaria para cumplir uno más de mis sueños.

A **mis padres**, por estar siempre a mi lado y ayudarme a seguir adelante, gracias por enseñarme a nunca rendirme.

A **mi familia**, por darme la fuerza necesaria para siempre superarme.

A **Paola Bocanegra**, por ser mi amiga incondicional y siempre apoyarme y cuidarme, por estar a mi lado incluso en la distancia. Gracias por tus palabras de aliento y comprensión absoluta a cada instante.

A **Cindy Durán, Karina Picazo y Patricia Arredondo**, por apoyarme y ser pacientes ante mis ausencias.

A mi bello grupo de **Renaser y Forogam**, por ayudarme a sobrevivir en cada parte de mi vida, gracias por su inmenso apoyo y conseguir que me mantenga en pie.

A **Nancy Rivera y Flora Cruz**, por compartir estos dos años los momentos de estrés y más importante de alegría, gracias por hacer tan maravillosamente llevadero cada instante en la escuela.

A mis **compañeros de generación** por permitirme disfrutar este tiempo a su lado y entender lo estresante de la frase “¿cómo va la tesis?”.

A mis compañeros **Héctor Salas y Yolanda Estrada** por hacerme sentir al fin parte de una generación que no es de uno, por su grandioso apoyo y estar a mi lado en las buenas y en las malas.

Al **Dr. Luis Alejandro Pérez López**, por permitirme realizar este proyecto a su lado, y aprender de sus conocimientos y experiencia, además de hacer tan absolutamente divertido cada instante durante el proyecto.

A la **Dra. Verónica Rivas y Dra. Rocío Álvarez**, por apoyarme durante la realización del proyecto, por sus consejos y maravillosas palabras de ánimo.

A la **Dra. Noemí Waksman**, por haber confiado en mí en la licenciatura e invitarme a la investigación, gracias a usted aprendí que esto era lo que más disfrutaba.

A la **Dra. Rosalba Ramírez**, por siempre apoyarme y ser una parte tan importante en mi meta. Gracias por haber creído en mí, incluso más que yo, y por saber aconsejarme y regañarme siempre tan acertadamente.

A todos los que he conocido en **Química Analítica** por sus comentarios, consejos y palabras de aliento, por ser las grandiosas personas con quienes he convivido este tiempo, por permitirme aprender de ustedes, gracias por ayudarme a crecer personal y profesionalmente En especial a mis grandiosos maestros **Idalia, Norma, María de la Luz, Lidia y Ricardo Salazar**.

A todo aquel que me apoyo de alguna manera durante este tiempo, gracias por animarme a que este trabajo vea al fin la luz.

«Si no puedes volar entonces corre,  
si no puedes correr entonces camina,  
si no puedes caminar entonces arrástrate,  
pero sea lo que hagas,  
sigue moviéndote hacia delante»

- Martin Luther King -

*Verba volant, scripta manent*

«Lo escrito permanece, las palabras se las lleva el aire»



## RESUMEN

QCB. Irene Guadalupe Rodríguez Valencia      Fecha de graduación: Noviembre, 2015

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: OBTENCIÓN DE FRACCIONES Y/O AISLAMIENTO DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA *Staphylococcus aureus* A PARTIR DE *Cordia boissieri*

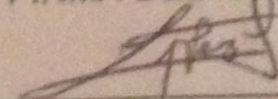
Número de páginas: 104      Candidato para la obtención del grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Química Biomédica

Área de estudio: Química Biomédica

**Propósito y Método de Estudio:** Las enfermedades respiratorias representan una importante causa de muerte en todo el mundo, de las cuales *Staphylococcus aureus* es uno de los principales agentes causales. Al mismo tiempo, se observa con más frecuencia el surgimiento de cepas resistentes a los antimicrobianos de uso común. Es así como el estudio de los productos naturales surge como una alternativa para aislar compuestos con posible actividad antimicrobiana. En este proyecto, se evaluó la actividad biológica *in vitro* frente a MRSA (*S. aureus* resistente a meticilina) de extractos obtenidos de *Cordia boissieri*. La bioautografía se utilizó como técnica para seleccionar las fracciones activas a purificar y realizar un fraccionamiento biodirigido. La CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) que poseían las fracciones aisladas frente a MRSA, fue determinada por ensayo de microdilución en caldo. La  $CC_{50}$  (Concentración Citotóxica Media) fue evaluada por medio del ensayo de Mossman (reducción de sales de tetrazolium). Además se presentan los resultados de los compuestos que fueron aislados e identificados por IR, EM, RMN de  $H^1$ ,  $C^{13}$  y 2D.

**Contribuciones y conclusiones:** El fraccionamiento biodirigido del extracto de acetato de etilo de las hojas de *Cordia boissieri* permitió obtener 56 fracciones activas frente a una cepa MRSA. Se obtuvieron 26 fracciones con CMI igual o menor a 31.25  $\mu\text{g/mL}$  (similar a la CMI para Oxacilina) y la fracción denominada como G5 presentó una CMI de 1.95  $\mu\text{g/mL}$ , lo cual es 16 veces menor al valor de Oxacilina y similar al obtenido para la Vancomicina, que es el fármaco de última elección en una infección por cepa MRSA. Se obtuvieron 11 fracciones con un índice de selectividad superior a 6, lo cual indica una buena diferencia entre la actividad biológica y citotóxica. Se aisló el compuesto Dimetoxi-3,4'-kaempherol, previamente reportado por Domínguez, X.A. (1972), no presentó actividad en bioautografía.

FIRMA DEL ASESOR



Dr. C. Luis Alejandro Pérez López

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1 INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Enfermedades infecciosas.....	1
1.2 Infecciones respiratorias.....	2
1.3 Tratamientos contra infecciones.....	4
1.4 Medicina alternativa.....	6
1.5 Uso de plantas medicinales.....	7
1.5.1 Clasificación de los metabolitos de las plantas.....	8
1.6 Técnicas de aislamiento de compuestos en productos naturales.....	10
1.7 Bioensayos .....	13
1.7.1 Método de difusión en placa.....	14
1.7.2 Método de dilución en caldo .....	16
2 ANTECEDENTES.....	18
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	18
2.2 Género <i>Cordia</i> .....	19
2.3 <i>Cordia boissieri</i> .....	21
2.4 Justificación .....	23
2.5 Objetivo general.....	24
2.6 Objetivos específicos.....	25
3 MATERIAL Y MÉTODOS .....	26
3.1 Material.....	26
3.1.1 Material biológico.....	26
3.1.1.1 Extracto de planta .....	26

3.1.1.2 Microorganismos.....	27
3.1.2 Material y equipo general .....	27
3.1.2.1 Disolventes .....	27
3.1.2.2 Reactivos .....	28
3.1.2.3 Agar, Caldo y Antimicrobianos.....	28
3.1.2.4 Materiales .....	29
3.1.2.5 Equipo general.....	30
3.2 Métodos.....	31
3.2.1 Fraccionamiento del extracto de Acetato de etilo .....	31
3.2.1.1 Fraccionamiento biodirigido de Fracción Diclorometano .	32
3.2.1.1.1 Cromatografía de Exclusión Molecular de Fracción Diclorometano .....	33
3.2.1.1.2 Extracción en fase sólida de Fracción D, E, F y G .....	34
3.2.1.1.3 Cromatografía en Columna de Sílica Gel de las Sub-Fracciones G2, G4, G5, G6 .....	35
3.2.1.2 Cromatografía en columna de Sílica Gel de la fracción H	36
3.2.2 Análisis por Cromatografía de Gases.....	36
3.2.3 Caracterización estructural de los compuestos presentes en las fracciones .....	37
3.2.3.1 Espectrometría de masas .....	38
3.2.3.2 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.....	38
3.2.3.3 Espectroscopía de Infrarrojo .....	38
3.2.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las fracciones aisladas .....	39
3.2.4.1 Preparación de las muestras .....	39
3.2.4.2 Preparación del microorganismo .....	39
3.2.4.3 Preparación de controles .....	40

3.2.4.3.1 Control de antibióticos.....	40
3.2.4.3.2 Control de disolvente.....	40
3.2.4.3.3 Control de turbidez debido al extracto.....	41
3.2.4.3.4 Control de esterilidad .....	41
3.2.4.3.5 Control de crecimiento .....	41
3.2.4.4 Técnica de Microdilución en placa .....	42
3.2.5 Determinación de la concentración citotóxica media de las fracciones aisladas con menor CMI .....	43
3.2.5.1 Conservación de las células vivas .....	43
3.2.5.2 Preparación de las muestras .....	44
3.2.5.3 Evaluación de la Citotoxicidad Media .....	44
3.2.6 Determinación del índice de selectividad .....	45
4 RESULTADOS.....	46
4.1 Fraccionamiento del extracto de Acetato de etilo .....	46
4.1.1 Fraccionamiento biodirigido de Fracción Diclorometano .....	48
4.1.1.1 Cromatografía de Exclusión Molecular de Fracción Diclorometano.....	48
4.1.2 Extracción en fase sólida de las fracciones D, E, F y G .....	50
4.1.3 Cromatografía en Columna de Sílica Gel de las Sub-Fracciones G2, G4, G5, G6.....	55
4.1.3.1 Selección del sistema de eluentes para la Cromatografía en Columna de Sílica Gel .....	56
4.1.4 Fracciones activas obtenidas del extracto de acetato de etilo.....	59
4.1.2 Cromatografía en columna de Sílica Gel de la fracción H.....	60
4.2 Análisis por Cromatografía de Gases.....	61
4.3 Caracterización estructural de los compuestos presentes en las fracciones .....	66
4.3.1 Elucidación estructural del compuesto M081214 .....	66

4.3.2 Caracterización estructural del compuesto con un tR de 73.9 minutos .....	75
4.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las fracciones activas obtenidas.....	77
4.5 Determinación de la Citotoxicidad de las fracciones con menor CMI .....	79
5 DISCUSIÓN .....	81
6 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	91
6.1 Conclusiones .....	91
6.2 Perspectivas .....	92
BIBLIOGRAFÍA.....	94

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estrategia de aislamiento general para purificación de compuestos	12
2	<i>Cordia boissieri</i> (Nombre común: Anacahuita)	21
3	Bioautografía y CCF con dos sistemas de eluentes: (A) diclorometano:metanol 19:1 y (B) hexano:acetato de etilo 3:2. Los carriles de las muestras corresponden a: (1) extracto de acetato de etilo, (2) fracción diclorometano y (3) fracción acuosa	47
4	CCF de las fracciones obtenidas de Fracción DCM con un sistema de eluentes diclorometano:metanol 19:1 a una longitud de onda de (1) 254 nm y (2) 365 nm	49
5	Bioautografía de las doce fracciones obtenidas de Fracción DCM con un sistema de eluentes diclorometano:metanol (19:1)	50
6	CCF de las sub-fracciones obtenidas de Fracción D con un sistema de eluentes diclorometano:metanol 19:1 a una longitud de onda de (A) 254 nm, (B) 365 nm y (C) revelado con ácido sulfúrico y vainillina	51

Figura		Página
7	CCF de las sub-fracciones obtenidas de Fracción E con un sistema de eluentes diclorometano:metanol 19:1 a una longitud de onda de (A) 254 nm, (B) 365 nm y (C) revelado con ácido sulfúrico y vainillina	51
8	CCF de las sub-fracciones obtenidas de Fracción F con un sistema de eluentes diclorometano:metanol 19:1 a una longitud de onda de (A) 254 nm, (B) 365 nm y (C) revelado con ácido sulfúrico y vainillina	52
9	CCF de las sub-fracciones obtenidas de Fracción G con un sistema de eluentes diclorometano:metanol 19:1 a una longitud de onda de (A) 254 nm, (B) 365 nm y (C) revelado con ácido sulfúrico y vainillina	52
10	Bioautografía de las sub-fracciones obtenidas de Fracción D con un sistema de eluentes diclorometano:metanol (19:1)	53
11	Bioautografía de las sub-fracciones obtenidas de Fracción E con un sistema de eluentes diclorometano:metanol (19:1)	54
12	Bioautografía de las sub-fracciones obtenidas de Fracción F con un sistema de eluentes diclorometano:metanol (19:1)	54
13	Bioautografía de las sub-fracciones obtenidas de Fracción G con un sistema de eluentes diclorometano:metanol (19:1)	55

Figura	Página
14 Bioautografía y CCF de las sub-fracciones obtenidas de Fracción G con un sistema de eluentes etanol:acetato de etilo 15:85 donde se observa (A) el patrón de inhibición de las fracciones G2 a G6, (B) CCF a 254nm y (C) 365nm	57
15 (A) Bioautografía y CCF a una longitud de onda de (B) 254nm y (C) 365 nm de las sub-fracciones obtenidas de Fracción G4-1.3 con un sistema de eluentes etanol:acetato de etilo 15:85 donde se observa el patrón de inhibición de las fracciones. Carriles: (1) G4-1.3, (2) G4-1.3-M, (3) G4-1.3-23, (4) G4-1.3-36 y (5) G4-1.3-1	59
16 Resumen de las fracciones activas obtenidas	60
17 CCF de las fracciones A a L a una longitud de onda de 254 nm. Se señala la mancha del compuesto M081214 a Rf de 0.65. Se utilizó un sistema de eluentes diclorometano:metanol (19:1)	61
18 Cromatograma del blanco de Diclorometano. Señal observada a un tiempo de retención de 69.9 minutos	63
19 Cromatograma de la muestra G5-6 disuelta en diclorometano. Señales observadas a un tiempo de retención de 64.8, 71.9 y 73.9 minutos	64
20 Cromatograma de la muestra G4-1.3-1 disuelta en diclorometano. Señales observadas a un tiempo de retención de 71.9 y 73.9 minutos	65



Figura	Página
21 Cromatograma de la muestra M081214 disuelta en diclorometano. La señal correspondiente a 82.1 minutos corresponde a la señal del compuesto aislado	67
22 Espectro de masas de la señal a 82.1 minutos correspondiente al compuesto M081214	68
23 Espectro de <sup>1</sup> H-RMN del compuesto M081214	69
24 Espectro de <sup>13</sup> C-RMN (azul) y DEPT-135 (rojo) del compuesto M081214	70
25 Espectro de COSY del compuesto M081214	71
26 Espectro de HMBC del compuesto M081214	72
27 Espectro de HMQC del compuesto M081214	73
28 Dimetoxi-3,4'-Kaempherol	75
29 Espectro de masas de la señal a 73.9 minutos	76
30 Fragmento propuesto para el ion de m/z 191	76
31 Espectro de infrarrojo de la muestra G4-1.3-1	77
32 Controles empleados en las microplacas. (Control de Oxacilina: cuadro naranja; Control de Vancomicina: cuadro azul; Control de Solvente: Cuadro gris; Control de Crecimiento: Cuadro amarillo; Control de Esterilidad: Cuadro rojo)	78
33 Estructura base de un compuesto de tipo lupano	87

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Estadísticas de defunciones debidas a infecciones respiratorias durante el año 2012	3
2	Sistema de gradiente de solventes empleado para las CC de Sílica Gel de las sub-fracciones obtenidas de las Fracciones G2, G4, G5, G6	58
3	Sub-fracciones analizadas por CG-MS en base a la técnica de separación empleada	62
4	Señales observadas en el espectro de $^1\text{H}$ -RMN	74
5	Señales observadas en el espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN y DEPT-135	74
6	Resultado de los controles empleados	78
7	Concentración Mínima Inhibitoria de las fracciones evaluadas	79
8	Concentración Citotóxica Media, Concentración Mínima Inhibitoria e Índice de Selectividad de las fracciones evaluadas	80

## ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etilo
AMH	Agar Mueller Hinton
ATCC	American Type Culture Collection
ATR	Attenuated Total Reflection
C18	Octadecilsilano
CC	Cromatografía en Columna
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CG	Cromatografía de Gases
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CMH	Caldo Mueller Hinton
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
COSY	Correlation Spectroscopy
CC <sub>50</sub>	Concentración Citotóxica Media
DCM	Diclorometano
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Exclusión molecular
FR	Fase Reversa
Fx	Fracción
h	Hora
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
IR	Infrarrojo
m/z	Relación masa carga
MeOH	Metanol
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
MS	Espectrometría de Masas
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NCCLS	The National Committee for Clinical Laboratory Standards
nOe	Nuclear Overhauser Effect
ppm	Partes por millón
Rf	Factor de retardo
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
tR	Tiempo de retención
UV-Vis	Espectroscopía de Ultravioleta Visible
$\lambda$	Longitud de onda

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUCCIÓN**

#### **1.1 Enfermedades infecciosas**

Las bacterias de interés médico se clasifican en microbiota normal y agentes patógenos, esto en base a su capacidad de producir enfermedades. La microbiota normal se encuentra en piel, sistema digestivo, respiratorio y urogenital, además puede adquirir factores de patogenicidad y transformarse en patógenos, por ejemplo en los casos de uso indebido de antibióticos o inmunosupresión del hospedero (Ausina Ruíz y cols., 2006).

Las bacterias son responsables de un número importante de enfermedades infecciosas, afectando cualquier órgano o sistema del organismo. Tal es el caso en enfermedades de tipo respiratorio: neumonías, bronquitis, bronquiolitis, gripe; gastrointestinales: gastroenteritis y diarrea; urogenital: uretritis e infección urinaria; dérmicas, entre otros. A pesar de los avances en el conocimiento científico, de la aplicación de las medidas de higiene y de la aparición constante

de antimicrobianos más potentes, las bacterias continúan siendo una causa fundamental de las infecciones que sufre el ser humano (Ausina Ruíz y cols., 2006).

## **1.2 Infecciones respiratorias**

Las enfermedades respiratorias agudas constituyen un padecimiento frecuente en la población. Las estadísticas correspondientes al año 2012 indican que es una de las primeras diez causas de muerte en los mexicanos, ocupando el tercer lugar de causa de muerte en menores de edad (0 a 14 años) y donde el mayor número de casos corresponde principalmente a la tercera edad (personas mayores a 60 años). Estos datos se pueden observar en la tabla 1 donde se presenta el número de defunciones por rango de edad, así como la tasa por cada 100 mil habitantes (CONAPO, 2012).

Entre los agentes causales más comunes de infecciones respiratorias se encuentran adenovirus, virus de la influenza y parainfluenza, bacterias como estreptococos beta hemolíticos, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* y *Staphylococcus aureus*, entre otros.

**TABLA 1** Estadísticas de defunciones debidas a infecciones respiratorias durante el año 2012.

Rango de edad	México			Nuevo León			
	Población general	Tasa (por 100mil habitantes)	Lugar que ocupa	Hombres (Tasa)	Lugar que ocupa	Mujeres (Tasa)	Lugar que ocupa
<b>0 a 14 años</b>	2064	6.1	3	2.5	4	1.7	6
<b>15 a 29 años</b>	533	1.7	10	2.1	8	1.7	8
<b>30 a 59 años</b>	2863	6.9	10	11.6	8	7.2	9
<b>60 años en adelante</b>	11505	105.6	7	147.7	5	128.0	5

De forma específica, no sé cuentan con estadísticas de infecciones respiratorias por agente causal, por lo que no es posible mencionar la incidencia de *S. aureus* en la población. Sin embargo, se conoce que esta bacteria es causante de infecciones nosocomiales o adquiridas por haber estado ingresado en un hospital, siendo esta bacteria una de las principales causas de infecciones de heridas quirúrgicas, infecciones relacionadas con el catéter y neumonías en pacientes sometidos a ventilación mecánica (Ausina Ruíz y cols., 2006).

Las infecciones debidas a *Staphylococcus aureus* generalmente se presentan de forma supurativa con tendencia a la formación de abscesos. Frecuentemente estas infecciones pueden derivar en bacteremias, cuyo origen suele ser en piel y raramente en el aparato respiratorio. La infección urinaria

ascendente por *S. aureus* es poco frecuente y en general se asocia a manipulaciones de la vía urinaria. Los abscesos cerebrales de origen estafilocócico suelen ser de origen hematógeno, sobre todo por endocarditis. La meningitis puede ser de origen hematógeno o por complicación de un absceso (Ausina Ruíz y cols., 2006).

El género *Staphylococcus* está constituido por cocos Gram positivos con tendencia a agruparse en racimos. Son inmóviles, no forman esporas y dan positiva la reacción de la catalasa. Son aerobios y pueden ser anaerobios facultativos. Se incluyen en esta familia a 35 especies, de las cuales, *Staphylococcus aureus* es la más importante en infecciones humanas. La principal característica de *S. aureus* que la diferencia de las demás especies es su capacidad de coagular el plasma, lo cual es considerado como potencial patógeno invasivo (Ausina Ruíz y cols., 2006; MacFaddin, 2000).

### **1.3 Tratamientos contra infecciones**

Independientemente del agente causal, la mayoría de las infecciones bacterianas requieren de tratamiento farmacológico. A pesar de la gran variedad de medicamentos antimicrobianos, su uso indiscriminado ha provocado el aumento de la aparición de cepas resistentes provocando la incapacidad de obtener éxito terapéutico (Ausina Ruíz y cols., 2006).



La elección más apropiada de un tratamiento farmacológico está condicionada a múltiples factores, entre ellos características del hospedero como antecedentes médicos, estado general de salud o posible inmunosupresión, así como características de la infección como localización, tiempo de adquirida y tipo de microorganismo. Por esto, efectuar un correcto diagnóstico del tipo y localización de la infección, identificar el agente causal y conocer el patrón de sensibilidad a los antimicrobianos es primordial (Ausina Ruíz y cols., 2006).

El tratamiento farmacológico de elección ante una infección respiratoria es en base a las penicilinas. Sin embargo, se ha observado que más del 90% de las cepas de *S. aureus* son resistentes a este grupo de fármacos. En 1960 se introdujeron en la práctica clínica la meticilina y otras penicilinas semisintéticas (cloxacilina, oxacilina o nafcilina) resistentes a la acción de las  $\beta$ -lactamasas estafilocócicas. Los primeros aislamientos de MRSA (*S. aureus* resistente a meticilina) se comunicaron en 1961. Las cepas MRSA además suelen presentar resistencia asociada a otros grupos de antibióticos, como macrólidos, quinolonas, aminoglucósidos, rifampicina o tetraciclinas, lo que provoca el interés por obtener compuestos con actividad contra cepas de este tipo (Skov y cols., 2009).

Los pacientes que se someten a tratamientos de hemodiálisis tienen cinco veces mayor riesgo de muerte debido a bacteremias por MRSA, ya que es una de las causas más significativas de infecciones intrahospitalarias. En estos

casos la Vancomicina es uno de los agentes antimicrobianos más comúnmente administrados. Sin embargo, la aparición de cepas MRSA resistentes a la Vancomicina, ha generado un problema urgente de salud debido a que éste es uno de los pocos antibióticos efectivos disponibles para tratar infecciones producidas por MRSA (Skov y cols., 2009; Li-Ping y cols., 2014).

#### **1.4 Medicina alternativa**

Debido a la resistencia farmacológica de los microorganismos, se han empleado tratamientos alternativos, entre éstos se incluyen organismos enteros (plantas, animales, o microorganismos), partes de un organismo (hojas de plantas), extractos de un organismo o compuestos puros aislados de plantas, animales o microorganismos (Skov y cols., 2009).

La rama de la ciencia que tiene como objetivo principal descubrir nuevos compuestos, derivados de plantas y los animales, que se pueden emplear en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos se conoce como etnofarmacología. La mayor parte de la literatura en etnofarmacología describe las plantas medicinales, su eficacia y toxicidad. De esta forma, se abarca un gran rango de compuestos químicos derivados y aislados de diversas fuentes biológicas (Waldstein, 2006; Skov y cols., 2009).

## 1.5 Uso de plantas medicinales

El interés en el estudio de plantas medicinales como fuente de compuestos farmacológicamente activos ha aumentado en todo el mundo. En algunos países en desarrollo, las plantas son la principal fuente medicinal para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Waldstein, 2006).

En México, al igual que otros países en desarrollo, la medicina tradicional es una fuente importante de productos para el tratamiento de infecciones comunes. Alrededor del 25% de la población mexicana depende exclusivamente del uso de plantas medicinales. Se considera que cerca de 3000 plantas medicinales son usadas en México (Molina Salinas y cols., 2007).

Se utiliza, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades respiratorias *Larrea tridentata* (goberandora), *Thymus vulgaris* (tomillo), *Tecoma stans* (tronadora), *Verbascum thapsus* (gordolobo), entre otras (Mohd-Shahid y cols., 2013).

Para las enfermedades en general, un gran número de fármacos han sido derivados de productos naturales, tales como vincristina de *Vinca rosea*, morfina de *Papaver somniferum*, Taxol de *Taxus brevifolia*, entre otros (simvastatina, pravastatina, amoxicilina, ácido clavulónico, azitromicina, ceftriaxona, ciclosporina y paclitaxel) (Sarker y cols., 2006).

### **1.5.1 Clasificación de los metabolitos de las plantas**

Comúnmente en la medicina alternativa se emplea el organismo sin procesamiento, es decir, en el caso de plantas, emplear hojas, raíz, fruto, corteza, flor. Sin embargo, la actividad biológica es debido a uno o pocos compuestos derivados de la planta. Estos compuestos derivados de productos naturales provienen de las vías biosintéticas que son necesarias para la supervivencia de las células vegetales, éstas se dividen en metabolismo básico o primario, cuyos metabolitos (azúcares, aminoácidos, nucleótidos y lípidos) se encuentran en todas las plantas y son esenciales para todo el organismo vegetal. Mientras que aquellos compuestos derivados del metabolismo secundario son diferentes dependiendo de la planta y de factores externos como temperatura, clima, radiación, entre otros. No poseen ninguna función obvia en el metabolismo primario de una planta, ni en el crecimiento, fotosíntesis, reproducción, u otras funciones primarias de las células de la planta, pero si pueden poseer un papel ecológico, como atrayentes de polinizadores, representar adaptaciones químicas a las tensiones ambientales, o para ser responsables de la defensa química de la planta frente a los microorganismos, insectos y predadores superiores (Waksmundzka-Hajnos, 2008).

En las plantas se encuentran a menudo sustancias activas que coexisten con otros compuestos que pueden mitigar sus efectos secundarios (Waksmundzka-Hajnos, 2008).

Los metabolitos secundarios se pueden clasificar sobre la base de su estructura química (por ejemplo, si tiene anillos, con o sin restos de azúcar), la composición química elemental (que contengan nitrógeno o no), la vía por la que se biosintetizan o su solubilidad en diversos disolventes (Waksmundzka-Hajnos, 2008).

Una simple clasificación basada en la composición química incluye tres grupos principales:

1. Terpenoides (compuestos casi en su totalidad por carbono e hidrógeno).
2. Fenólicos (compuestos aromáticos con sustituciones hidroxilo).
3. Compuestos que contienen nitrógeno (o también contienen partes de azufre) (Waksmundzka-Hajnos, 2008).

Los terpenoides se pueden encontrar en las plantas superiores, musgos, hepáticas, algas y líquenes, así como en los insectos o microbios. Estos se clasifican en monoterpenoides (10C), sesquiterpenoides (15C), diterpenoides (20C), sesterterpenoides (25C), triterpenoides (30C), carotenoides (40C) (Waksmundzka-Hajnos, 2008).

Los fenólicos son compuestos que tienen como matriz el fenol, pero la mayoría son compuestos polifenólicos más complejos, clasificadas por el número de átomos de carbono en el esqueleto básico. Sus derivados tienen una, dos, o tres cadenas laterales. La estructura básica de los flavonoides se deriva del esqueleto de C<sub>15</sub> de flavona. Se diferencian de otras sustancias fenólicas en el grado de oxidación de su anillo de pirano central, así como en sus propiedades biológicas. Las principales clases de compuestos fenólicos son fenoles simples, ácidos fenólicos, cumarinas, xantonas, flavonoides, lignanos, quinonas y estilbenos (Waksmundzka-Hajnos, 2008).

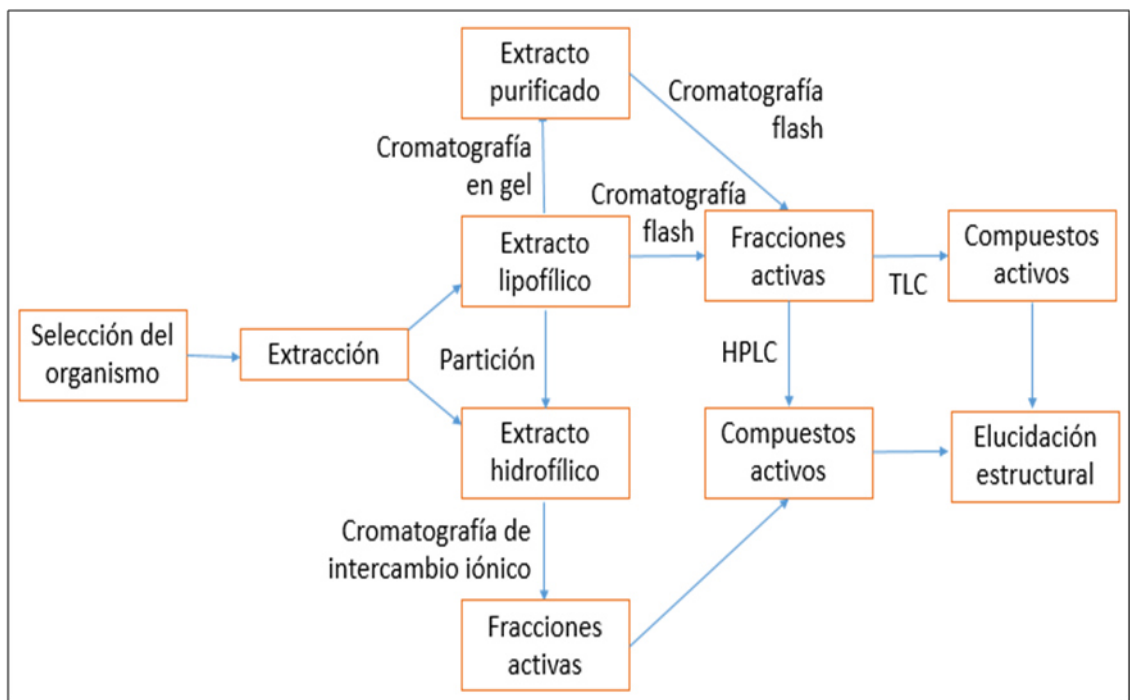
Los alcaloides son un grupo de bases que contienen un átomo de nitrógeno como parte de un sistema heterocíclico, la mayoría de ellos poseen propiedades farmacológicas significativas y son la clase más diversa de metabolitos secundarios, que van desde estructuras simples hasta muy complejas. Estos pueden clasificarse en grupos en base a la estructura nitrogenada que contienen como pirrolidina, piperidina, tropina, quinolina, isoquinolina, indol (Waksmundzka-Hajnos, 2008).

## **1.6 Técnicas de aislamiento de compuestos en productos naturales**

Los compuestos activos provenientes de productos naturales no sólo muestran una variedad estructural vasta, sino que muchos de ellos aportan actividades biológicas altamente específicas. La investigación en productos

naturales ha experimentado un mayor desarrollo gracias a los avances en las distintas técnicas de separación y detección.

Entre los principales avances en técnicas separativas se encuentra la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), que ha llegado a ser una técnica de rutina en la mayoría de los laboratorios de Química Orgánica. Otras técnicas de separación son cromatografía en capa fina (CCF) (de alta resolución, doble dimensión, gradiente, electrocromatografía planar, e incluso acoplamiento de equipos automatizados a espectrometría de masas para detección) y métodos de distribución líquido-líquido. Aunque el aislamiento de un nuevo producto natural bioactivo puede todavía ser un desafío importante, esto puede llevarse a cabo hoy día con mayor rapidez y eficacia. Además se han desarrollado diferentes estrategias de aislamiento generales para la purificación de estos compuestos como por ejemplo la mostrada en la Figura 1 (Heinrich y cols., 2012; Galbis Pérez, 2000).



**Figura 1** Estrategia de aislamiento general para purificación de compuestos.

Una vez que se logra el aislamiento de un compuesto activo, el siguiente paso es la elucidación estructural del mismo. Las técnicas de detección y análisis han mostrado al igual que las técnicas separativas un notorio avance. Los compuestos provenientes de productos naturales poseen generalmente estructuras químicas muy complejas, desde oligopéptidos cíclicos como la Ciclosporina A a complejos diterpenoides como el Paclitaxel o estructuras macrocíclicas como las de las epotilinas. Particularmente la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectrometría de Masas (EM) han resuelto este problema al hacer posible la elucidación estructural de sustancias complejas con una pequeña cantidad de muestra. (Galbis Pérez, 2000).



## 1.7 Bioensayos

Una vez que se han aislado diferentes compuestos, es necesario probar su actividad biológica. Esto se hace por medio de bioensayos.

Los bioensayos son pruebas para detectar la actividad biológica de un extracto o sustancia pura aislada obtenida a partir de un organismo. Estos podrían implicar el uso de sistemas *in vivo* (ensayos clínicos, experimentos con animales), sistemas *ex vivo* (tejidos y órganos aislados), o sistemas *in vitro* (por ejemplo, células cultivadas) (Waksmundzka-Hajnos y cols., 2008; Marston, 2011).

Los bioensayos además permiten realizar un aislamiento de forma biodirigida, es decir, ir seleccionando únicamente las fracciones activas hasta llegar a un compuesto puro.

Entre los bioensayos se encuentran las pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Estas permiten evaluar el grado en que inhibe a un microorganismo la sustancia en estudio. Además de determinar la actividad biológica, algunas de estas pruebas de sensibilidad permiten obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la sustancia, que es la concentración más baja del compuesto a la cual no hay crecimiento del microorganismo (Choma y cols., 2011).

Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana pueden clasificarse en métodos cualitativos (métodos de difusión) y cuantitativos (métodos de dilución). Los métodos de difusión clasifican al microorganismo como sensible o resistente y la inhibición es apreciable por zonas de ausencia de crecimiento en el agar. Los métodos de dilución proporcionan como resultado la CMI de una sustancia frente a un microorganismo, el grado de inhibición se evalúa en base al grado de turbidez (Choma y cols., 2011).

### **1.7.1 Método de difusión en placa**

Los métodos de difusión se basan en la inhibición del crecimiento bacteriano en el agar al estar presente una sustancia con actividad biológica frente al microorganismo. En los métodos de difusión se emplea un medio de cultivo con agar, el cual, previo a su solidificación, es inoculado con el microorganismo. El agente antimicrobiano a evaluar, se impregna en discos o tiras de papel que son colocados sobre el medio de cultivo, posterior a la incubación se observan halos de inhibición si el microorganismo es sensible al compuesto (Mohd-Shahid y cols., 2013).

El uso de CCF en conjunto con el método de difusión en placa, se conoce como bioautografía. Esta es empleada como método de *screening* para establecer la ausencia o presencia de analitos de una forma simple, barata y

rápida, que se puede realizar con un mínimo de muestra y permite la separación de una mezcla compleja para localizar los componentes activos y poder realizar un aislamiento biodirigido. Puede ser combinada con la cromatografía de capa fina (CCF), cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC), cromatografía en capa fina a presión elevada y electrocromatografía planar (PEC) (Marston, 2011).

La bioautografía ha sido ampliamente usada para el *screening* de extractos de plantas (*Coscinium fenestratum*, *Cordia gillettii*, *Diospyros usambarensis*, *Cordia boissieri*) para actividad antifúngica (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus niger*) y antibacterial (*Enterobacter cloacae*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*). La modalidad de bioautografía empleada puede ser: bioautografía de difusión en agar, bioautografía directa en la placa de CCF y bioautografía de superposición del agar (Choma, y col., 2011; Marston, 2011).

La bioautografía por difusión en agar o por contacto implica la transferencia por difusión del agente antimicrobiano a partir de una placa de CCF al agar inoculado con el microorganismo. En la bioautografía directa, los microorganismos crecen directamente en la CCF después de agregar el medio de cultivo. En bioautografía de superposición del agar, el medio se coloca sobre la capa cromatográfica, con el fin de permitir una mejor difusión del compuesto (Choma y cols., 2011).

La visualización de las zonas con presencia de antimicrobianos se lleva a cabo mediante el uso de reactivos de detección de actividad de la dehidrogenasa, los más comunes son sales de tetrazolium. La dehidrogenasa de los microorganismos vivos convierte la sal de tetrazolium en formazán coloreado intensamente, y el resultado se observa como fondo púrpura en la superficie de la placa de CCF que indica a los microorganismos vivos y zonas no teñidas que indican la inhibición del crecimiento y señalan la presencia de agentes antibacterianos (Choma y cols., 2011).

### **1.7.2 Método de dilución en caldo**

En estas pruebas de sensibilidad antimicrobiana se preparan diferentes concentraciones del compuesto a evaluar, las cuales son mezcladas con el caldo, que posteriormente es inoculado con el microorganismo e incubado. La actividad antimicrobiana se observará como ausencia de turbidez que indica inhibición del crecimiento (Choma y cols., 2011).

Este ensayo puede ser realizado mediante micro-dilución, diversas concentraciones del compuesto se colocan en los pocillos de una microplaca, a la que se añade el microorganismo. El crecimiento de los microorganismos se indica por la presencia de turbidez en los pocillos (Choma y cols., 2011).

Existen estudios comparativos entre los métodos de difusión y los métodos en caldo, donde evalúan por ambas técnicas especies de *Bifidobacterium* y *Staphylococcus*. No se ha encontrado una diferencia significativa entre el uso de estos métodos, pero los métodos de difusión acoplados a otras técnicas como la CCF permiten que sea más sencillo de emplear los métodos de difusión, además de requerir menor cantidad de muestra (Di Bonaventura y cols., 2002; Domig y cols., 2007).

## CAPÍTULO 2

### ANTECEDENTES

#### 2.1 *Staphylococcus aureus*

Debido a la amplia resistencia farmacológica de las bacterias, se han desarrollado diversos estudios para obtener nuevos fármacos contra los diferentes agentes causales de enfermedades, tales como compuestos con actividad antibacterial contra *Staphylococcus aureus*.

En el período de 2000 a 2010, 103 extractos pertenecientes a 51 plantas mexicanas fueron reportadas con actividad contra al menos una bacteria Gram positiva con CMI menor o igual a 500 µg/mL. Más de la mitad de los extractos activos mostraron actividad contra *S. aureus* (59 extractos); un tercio de estos también mostraron actividad contra cepas resistentes a los fármacos comúnmente empleados (35 extractos) (Mohd-Shahid y cols., 2013; Molina Salinas y cols., 2007).

## 2.2 Género *Cordia*

Entre las plantas que se han estudiado por su actividad biológica frente a bacterias, se encuentran diferentes tipos de *Cordia*.

El género *Cordia* (Boraginaceae) consiste en aproximadamente 320 especies, distribuidas en regiones tropicales y subtropicales del mundo. Consisten en árboles, arbustos o hierbas, distribuidos en el sur (principal) y centro de América, Asia, sur y este de África, y en Australia. Algunas especies de *Cordia* se caracterizan por el aroma que liberan de las hojas debido a la presencia de hidrocarburos terpénicos y sus derivados oxigenados (aceite esencial) que son de interés para las industrias del perfume, cosméticas, nutricionales y farmacéuticas, siendo algunas de estas de uso medicinal importante; *Cordia boissieri*, *C. myxa* y *C. sebestena* se encuentran en la farmacopea oficial de algunos países (Owis, 2014; Rapisarda y cols., 1997).

Se cuentan con antecedentes de investigaciones realizadas en determinar la actividad antimicrobiana de plantas del género *Cordia* y el aislamiento de compuestos que le confieren dicha actividad.

En el estudio de De Carvalho y cols., reportaron que aceites esenciales de *Cordia verbenacea* mostraron actividad antimicrobiana contra el 88% de las bacterias Gram positivo, el 93.3% de las levaduras, y el 20% de las bacterias

Gram negativo (De Carvalho Jr. y cols., 2004). Al mismo tiempo, en el estudio de Michielin y cols., determinaron una CMI de 250 µg/mL para extractos de acetato de etilo de esta misma planta frente a *S. aureus* (Michielin y cols., 2009).

En el estudio de Okusa y cols., determinaron actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* de raíz de *Cordia gillettii* en extractos metanólicos (CMI de 125 µg/mL) y en extractos de diclorometano (CMI mayor a 125 µg/mL); el extracto metanólico además presentó actividad contra *Candida albicans* y contra *Serratia marcescens* (CMI de 250 µg/mL) y baja actividad (mayor o igual a 500 µg/mL) frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter cloacae* (Okusa y cols., 2007).

Otra *Cordia* de la que se tienen antecedentes de actividad antibacteriana es *Cordia curassavica*. En el estudio de Hernández y cols., evaluaron la actividad antibacteriana de extractos y aceites esenciales de *C. curassavica* observando actividad frente a 10 de las 13 cepas evaluadas. Los extractos hexánico y clorofórmico, y los aceites esenciales fueron los que presentaron actividad antibacteriana. Entre los microorganismos sensibles fueron *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (CMI de 250 µg/mL para aceite esencial), *Bacillus subtilis* (CMI de 250 µg/mL para el extracto hexánico y clorofórmico), *Trichophyton mentagrophytes*, *Fusarium sporotrichum* y *Rhizoctonia solani* (Hernandez y cols, 2007).



### 2.3 *Cordia boissieri*

La planta que se utiliza para este estudio corresponde a *Cordia boissieri* de nombre común anacahuita. Es un árbol perenne que puede llegar a medir hasta 4 metros de altura, con hojas alternas y simples. Los frutos son drupas o bayas. Es una planta común y su flor blanca es representativa del estado de Nuevo León. Es nativa del Valle del Río Grande en Texas hasta gran parte del territorio de Nuevo León. Es empleada para afecciones respiratorias tales como tuberculosis, tos, asma, bronquitis, catarros y bronquiolitis (Alanís-Flores y cols., 1996; Owis, 2014; Molina-Salinas y cols., 2007).



**Figura 2** *Cordia boissieri* (Nombre común: Anacahuita).

En el estudio de Molina-Salinas, G. los extractos metanólicos de la flor y hoja de *Cordia boissieri* presentaron actividad antimicrobiana con una CMI de 250 µg/mL contra *S. aureus*, tanto cepas resistentes como sensibles a Oxacilina y Cefalotina. El extracto metanólico de hojas mostró actividad con una CMI de 500 µg/mL contra *Haemophilus influenzae* resistente a penicilina y meticilina. Así mismo se observó actividad en extractos metanólicos en hojas, flor, fruto y raíz con una CMI mayor a 125 µg/mL contra *Streptococcus pneumoniae* (Molina Salinas y cols., 2007).

Además en la tesis de Pérez-López, L.A. se realizó el aislamiento de compuestos con actividad antimicrobiana de hojas de *C. boissieri*. Una de las fracciones activas contra *S. aureus* presentó un compuesto de tipo terpeno. Este compuesto presentó una CMI de 62.5 µg/mL (Pérez-López, L.A., 2007).

## 2.4 Justificación

Debido a la importancia que representan las cepas de *Staphylococcus aureus* en infecciones comunitarias e intrahospitalarias, y debido a la aparición constante de cepas resistentes a los antimicrobianos de uso común, es evidente la necesidad de nuevos fármacos que ayuden a contrarrestar este problema de salud, donde una fuente importante de nuevos principios activos son las plantas medicinales.

*Cordia boissieri* es utilizada en la medicina tradicional para tratar afecciones del sistema respiratorio y debido a los antecedentes de su actividad antimicrobiana es importante obtener fracciones y/o aislar los compuestos que le confieren dicha actividad.

## 2.5 Objetivo general

Obtener fracciones y/o aislar compuestos a partir de *Cordia boissieri* que presenten actividad antimicrobiana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*.

## **2.6 Objetivos específicos**

1. Realizar el aislamiento biodirigido de compuestos o fracciones de los extractos por diversas técnicas.
2. Caracterizar la estructura del o los compuestos aislados.
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria del o los compuestos o fracciones aisladas.
4. Evaluar la citotoxicidad del o los compuestos o fracciones aisladas.

## **CAPÍTULO 3**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Material biológico**

###### **3.1.1.1 Extracto de planta**

Se trabajó con el extracto de acetato de etilo obtenido de hojas de *Cordia boissieri* recolectada en abril de 2013 en García, Nuevo León. Al extracto obtenido se le realizó bioautografía con la cual se demostró su actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y fue resguardado hasta su utilización en este proyecto.

### 3.1.1.2 Microorganismos

- Cepa de *Staphylococcus aureus* IMSS-NL/HE25:01, resistente a Oxacilina, aislada de un paciente con infección sistémica y caracterizada en el laboratorio clínico del Hospital Regional No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social en Monterrey, Nuevo León, México.

### 3.1.2 Material y equipo general

#### 3.1.2.1 Disolventes

Los disolventes empleados para las extracciones, CCF, CC Gravitacional, CG, para determinación de actividad biológica y citotoxicidad fueron *grado analítico*.

El cloroformo utilizado para la obtención de los espectros de RMN fue de tipo *deuterado*.

- Metanol grado analítico, Fermont de Productos químicos Monterrey
- Metanol de alta pureza, Fermont de Productos químicos Monterrey
- Etanol grado analítico, Control Técnico y Representaciones, S.A. de C.V. (Monterrey, México)

- Acetona, Control Técnico y Representaciones, S.A. de C.V. (Monterrey, México)
- Hexano grado analítico, Fermont de Productos químicos Monterrey
- Acetato de etilo grado analítico, Desarrollo de especialidades químicas, S.A. de C.V. (Monterrey, México)
- Butanol, Fermont de Productos químicos Monterrey
- Diclorometano, Fermont de Productos químicos Monterrey
- Cloroformo deuterado,  $\text{CDCl}_3$  99.8 % D con 0.1 % de TMS (v/v), Aldrich (México, importado de U.S.A.)

### **3.1.2.2 Reactivos**

- Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), Sigma-Aldrich (México, importado de U.S.A.)
- Dimetilsulfóxido (DMSO), Fermont de Productos químicos Monterrey
- Ácido acético glacial, Fermont de Productos químicos Monterrey

### **3.1.2.3 Agar, Caldo y Antimicrobianos**

- Agar Mueller Hinton (AMH), Becton Dickinson and Co., Sparks MD, USA
- Caldo Mueller Hinton (CMH), Becton Dickinson and Co., Sparks MD, USA



- Oxacilina (Oxacillin Sodium salt), BioChemik, Fluka, Sigma-Aldrich. (México, importado de U.S.A.)
- Vancomicina, Vancocin<sup>®</sup> CP, Eli Lilly y Compañía de México, S.A. de C.V. (México, D.F.)

Se disolvieron en agua a una concentración de 2.56 mg/mL. Estos estándares se dividieron en alícuotas de 0.5 mL y se almacenaron en congelación hasta su uso.

### **3.1.2.4 Materiales**

- Cajas Petri desechables de 150 x 15 mm
- Capilares de 5  $\mu$ L
- Cromatofolios de Sílica Gel 60 F<sub>254</sub> Merck<sup>®</sup>
- Sílica gel 60 de tamaño de partícula 0.2 - 0.5mm, Merck<sup>®</sup>
- Cubas para desarrollar CCF
- Embudos de separación
- Matraces bola de 250, 500 y 1000 mL
- Matraces Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 mL
- Pipetas Pasteur
- Probetas de 100, 250 y 500 mL
- Tubos con tapón de rosca 13 X 100 mm
- Tubos de ensaye 13 X 100, 18 X 150 mm
- Vasos de precipitado

- Puntillas de 0.1 a 10  $\mu\text{L}$ , 20 a 200  $\mu\text{L}$ , 100 a 1000  $\mu\text{L}$  estériles con filtro
- Pipetas automáticas de 0.1 a 10  $\mu\text{L}$ , 20 a 200  $\mu\text{L}$ , 100 a 1000  $\mu\text{L}$
- Microplacas estériles de poliestireno de 96 pozos de fondo plano con tapa de baja evaporación, Falcon® Corning Incorporated, USA.

### **3.1.2.5 Equipo general**

- Evaporaciones: Se realizaron en un rotaevaporador a presión reducida marca Heidolph modelo LABOROTA 4000 a una temperatura menor a 40°C.
- Desección de muestras: Se utilizó una pistola de desecación (Desecante: Cloruro de Calcio Anhidro, Control Técnico y Representaciones, S.A. de C.V. (Monterrey, México))
- Siembra e incubación: Se utilizó una campana de flujo laminar marca ESCO® Modelo LR2-6S2 y una incubadora SHEL LAB SHAKING
- Lectura de citotoxicidad: Se utilizó un lector de placas de Thermo Scientific™ modelo Multiskan™ FC
- Espectros de Infrarrojo: Se obtuvieron en el equipo Perkin Elmer FT-IR Spectrometer Frontier con cristal de ATR.

- Espectros de RMN: Se obtuvieron en un espectrómetro marca Bruker Modelo Advance DPX400 con gradiente de pulsos.
- Espectros de Masas: Se obtuvieron en el cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N Network CG System con 5973 Mass Selective Detector.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Fraccionamiento del extracto de Acetato de etilo**

Al extracto obtenido con acetato de etilo de las hojas de *Cordia boissieri*, se le realizó una extracción líquido-líquido en embudo de separación. Para esto 5.96 g de extracto seco se disolvieron en 80 mL de una mezcla metanol:agua (70:30), se transfirió a un embudo de separación y se le añadieron 40 mL de diclorometano. La extracción se realizó por quintuplicado. Las fracciones fueron llevadas a sequedad en un rotavapor y recuperadas con metanol.

### 3.2.1.1 Fraccionamiento biodirigido de Fracción Diclorometano

Para realizar el aislamiento biodirigido de fracciones o compuestos activos contra *S. aureus* a partir del extracto de hojas de *C. boissieri*, la actividad antimicrobiana fue monitoreada durante cada etapa de separación por medio de bioautografía de superposición del agar. Se realizaron dos CCF simultáneamente.

Se probaron dos sistemas de eluentes (hexano:acetato de etilo en una relación 3:2 y diclorometano:metanol en proporción 19:1) para seleccionar el mejor sistema que permita la mejor separación de las manchas (compuestos). Para cada sistema de eluentes se realizó la CCF y la bioautografía.

A las fracciones acuosa y diclorometano, así como el extracto de acetato de etilo se les realizó CCF con cromatofolios de Sílica gel F<sub>254</sub> cada uno realizado por duplicado. Las muestras fueron sembradas a una distancia de 1 cm y se realizó la elución hasta 8.5 cm. Para cada sistema de eluentes, uno de los cromatofolios, fue colocado en caja petri y encima de esta se colocó el agar Muller Hinton previamente solidificado. Posteriormente, se inoculó con una cepa de *Staphylococcus aureus* MRSA IMSS-NL/HE25:01 a una concentración de 0.5 en la escala de McFarland. Posteriormente se incubó a 37°C durante 24 h. El resultado se observó cómo ausencia o presencia de halos de inhibición del crecimiento bacteriano. El segundo cromatofolio se empleó para comparar las manchas con los patrones de inhibición en la bioautografía. Los patrones de

manchas se observaron con la lámpara de UV a una longitud de onda de 254 nm y de 365 nm y posteriormente se reveló con vainillina y ácido sulfúrico, ambos al 5% v/v en etanol.

La Fracción Diclorometano fue fraccionada por medio de tres técnicas de separación consecutivas, las cuales fueron Cromatografía de Exclusión Molecular, Extracción en Fase Sólida (SPE) y Cromatografía en Columna (CC) de Sílica Gel.

#### **3.2.1.1.1 Cromatografía de Exclusión Molecular de Fracción Diclorometano**

La fracción Diclorometano fue fraccionada por medio de Cromatografía de Exclusión Molecular. Se utilizó una columna de vidrio con Sephadex LH20 como fase estacionaria y metanol como fase móvil. Se colocó en cada columna 0.5 g de muestra disuelta en 1 mL de metanol y se recolectaron fracciones de 2 mL, aproximadamente 40 tubos en cada cromatografía. Posteriormente, se realizó una CCF de las 40 fracciones obtenidas con cromatofolios de sílica gel F<sub>254</sub>. Se utilizó diclorometano:metanol (19:1) como sistema de eluyente. Una vez obtenido el cromatofolio, se compararon los patrones de manchas con la lámpara de UV a una longitud de onda de 245 nm y de 365 nm y posteriormente se reveló con vainillina y ácido sulfúrico, ambos al 5% v/v en etanol. Se juntaron aquellas fracciones que presentaran el mismo patrón de manchas. Se obtuvieron finalmente un total de doce fracciones denominadas como A a la L.

Durante el fraccionamiento biodirigido se evaluaron las doce fracciones por medio de bioautografía de superposición del agar realizada de la forma descrita previamente (sección 3.2.1.1). Se utilizó el sistema de eluentes de diclorometano:metanol en proporción 19:1.

#### **3.2.1.1.2 Extracción en fase sólida de Fracción D, E, F y G**

Las fracciones activas obtenidas de Exclusión molecular (D, E, F y G) fueron sometidas a separación mediante SPE con cartucho de octadecilsilano (C-18). El cartucho fue activado con 8 mL de una solución de metanol:agua (1:1). Como fase móvil se utilizó un gradiente metanol:agua en diferentes proporciones: 1:1, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1 y metanol (se utilizaron 8 mL para cada elución). El cartucho se lavó con 15 mL de acetona. Se utilizaron 0.2 g de extracto seco disuelto en 0.5 mL de metanol para cada extracción, y se juntaron las sub-fracciones que eluyeron con el mismo sistema de gradiente metanol:agua. Se llevaron a sequedad cada una de las sub-fracciones y se recuperaron con metanol. En total se obtuvieron siete sub-fracciones de cada fracción activa (D, E, F y G).

### **3.2.1.1.3 Cromatografía en Columna de Sílica Gel de las Sub-Fracciones**

#### **G2, G4, G5, G6**

Las sub-fracciones activas de la fracción G obtenidas de la SPE fueron sometidas a separación por CC gravitacional de Sílica Gel. Para seleccionar el sistema de eluentes, primero se probaron diferentes mezclas de los siguientes solventes:

- Etanol:Acetato de etilo 15:85
- Etanol:Acetato de etilo 1:19
- Butanol:Ácido acético:Agua 10:2:1
- Acetato de etilo:Metanol:Agua:Ácido acético 13:3:3:4
- Butanol:Ácido acético:Metanol:Agua 2:1:2:1
- Butanol:Ácido acético:Metanol:Agua 2:1:0.5:1
- Diclorometano:Metanol 17:3
- Diclorometano:Metanol 2:1

En cada CC se recolectaron aproximadamente 50 tubos. Se recolectó 1 mL de cada fracción. Se realizó CCF de las fracciones obtenidas en cada CC para poder juntar aquellas fracciones que presentaran el mismo patrón de manchas. Se utilizaron cromatofolios de sílica gel F<sub>254</sub> y como eluyente etanol:acetato de etilo (15:85). Los patrones de manchas se observaron en la lámpara de UV a una longitud de onda de 254 nm y de 365 nm.

Las sub-fracción G4-1, G4-2 y G4-3 que poseían un mismo patrón de manchas en CCF se juntaron y se nombraron como Fracción G4-1.3. Se realizó una segunda CC con el procedimiento anteriormente mencionado.

### **3.2.1.2 Cromatografía en columna de Sílica Gel de la fracción H**

A la fracción H obtenida por CC de Exclusión Molecular, se le realizó una CC en Sílica Gel. Se utilizó una columna de vidrio con Silica Gel como fase estacionaria y diclorometano:metanol (19:1) como fase móvil. Se recolectaron 20 fracciones de 1 mL. A las 20 fracciones se les realizó CCF con cromatofolios de sílica gel F<sub>254</sub> y diclorometano:metanol (19:1) como sistema de eluyente. Se utilizó la lámpara de UV para comparar los patrones de manchas a una longitud de onda de 254 nm y 365 nm, posteriormente se juntaron aquellas fracciones con el mismo patrón de manchas observado.

### **3.2.2 Análisis por Cromatografía de Gases**

Las fracciones que presentaron un menor número de manchas en CCF se analizaron por CG/MS. Se utilizó una columna HP-5MS (60 m x 0.25 mm, 0.25 µm). El programa de temperatura inició a 35°C, se mantuvo 9 minutos y se



elevó a una temperatura de 150°C a razón de 3°C/minuto, se mantuvo por 10 minutos, se incrementó hasta 250°C a razón de 10°C/minuto y finalmente se incrementó hasta 270°C a razón de 3°C/minuto y se mantuvo por 30 minutos. La temperatura del inyector fue de 220°C en modo splitless. El volumen inyectado fue de 2 µL de una solución de 2 mg/mL de las fracciones en diclorometano. El flujo fue de 0.5 mL/minuto y la temperatura del detector de 150°C.

Las fracciones puras o con menor número de compuestos se utilizaron para caracterización estructural.

### **3.2.3 Caracterización estructural de los compuestos presentes en las fracciones**

Para establecer las estructuras químicas, las fracciones aisladas fueron secadas en su totalidad y analizadas por las técnicas espectroscópicas necesarias según el compuesto o fracción a analizar.

### **3.2.3.1 Espectrometría de masas**

Se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N Network CG System con 5973 Mass Selective Detector. Se utilizaron las condiciones cromatográficas de la sección 3.2.2. De los cromatogramas obtenidos se obtuvo el espectro de masas de los picos cromatográficos de mayor abundancia.

### **3.2.3.2 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear**

Se utilizó el espectrómetro Bruker Modelo Advance DPX400 con gradiente de pulsos. Se llevó el compuesto a sequedad total en la pistola de desecación y se disolvió en cloroformo-*d* (99.8% D), se colocó en un tubo para RMN y se utilizó una sonda de detección directa para RMN de 5 mm de diámetro. Se realizaron los espectros de <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN, DEPT-135, HMBC, HMQC y COSY.

### **3.2.3.3 Espectroscopía de Infrarrojo**

Se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer FT-IR Spectrometer Frontier. Se colocó la muestra sólida sobre el cristal de ATR. La obtención de los espectros se realizó en número de onda de 4000 a 650 cm<sup>-1</sup>, se realizaron diez Scan por muestra.

### **3.2.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las fracciones aisladas**

Se evaluó la actividad antimicrobiana contra *S. aureus* resistente a Oxacilina por medio del método de microdilución en caldo. El procedimiento se realizó por duplicado para las fracciones activas en bioautografía de superposición del agar.

#### **3.2.4.1 Preparación de las muestras**

Se pesaron 2 mg de cada una de las muestras y se disolvieron en 200  $\mu$ L de DMSO, posteriormente se agregaron 800  $\mu$ L de CMH. Se utilizaron 100  $\mu$ L de cada muestra y se realizó dilución seriada al doble.

#### **3.2.4.2 Preparación del microorganismo**

Se tomaron de 3 a 4 colonias de un cultivo en agar Mueller Hinton de 24-48 h de crecimiento, las cuales se depositaron en CMH y se incubaron de 24-37 h. Posteriormente 100  $\mu$ L de esta suspensión fueron transferidos a 3 mL de CMH,

se incubaron a 37°C hasta alcanzar una turbidez de 0.5 del estándar de McFarland. Por último, se realizó su dilución a una proporción 1: 50 con CMH para obtener la solución de trabajo.

### **3.2.4.3 Preparación de controles**

#### **3.2.4.3.1 Control de antibióticos**

Se utilizaron dos fármacos como controles: Oxacilina como control de resistencia para *S. aureus* y Vancomicina como control de sensibilidad para *S. aureus*. Se prepararon soluciones acuosas a una concentración de 256 µg/mL y se esterilizaron con acrodiscos de PVDF de 0.20 µm. Se utilizaron 100 µL de cada muestra y se realizó dilución seriada al doble.

#### **3.2.4.3.2 Control de disolvente**

Para asegurar que el solvente utilizado (DMSO) no tuviera un efecto de inhibición en el crecimiento bacteriano, se preparó un control de solvente con 200 µL de DMSO disueltos en 800 µL de CMH, este fue utilizado como una muestra en diluciones seriadas al doble.

#### **3.2.4.3.3 Control de turbidez debido al extracto**

Este control se empleó para verificar que la turbidez observada, correspondiera al crecimiento bacteriano y no a la turbidez propia del extracto. Para cada muestra se colocaron 100  $\mu$ L de CMH y 100  $\mu$ L de muestra para tener una concentración de 500  $\mu$ g/mL, lo cual corresponde a la concentración máxima evaluada de CMI. A este control no se le adicionó el microorganismo.

#### **3.2.4.3.4 Control de esterilidad**

También llamado control de medio de cultivo. Permite asegurar ausencia de contaminación durante el desarrollo del procedimiento. Consistió en depositar únicamente 200  $\mu$ L de CMH en cuatro pocillos de la microplaca. Se realizó para cada microplaca.

#### **3.2.4.3.5 Control de crecimiento**

Se utilizó para confirmar el correcto crecimiento bacteriano, así como de resultar ausencia de crecimiento en el bioensayo esta sea debido a actividad de la muestra y no a la ausencia del inóculo bacteriano. Este control consistió en

depositar 100  $\mu\text{L}$  de inóculo bacteriano y 100  $\mu\text{L}$  de CMH en cuatro pocillos de la microplaca. Se realizó para cada microplaca.

#### **3.2.4.4 Técnica de Microdilución en placa**

Se realizó en microplacas de 96 pocillos, a todos los pocillos de la periferia se les agregaron 200  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada estéril. A los pocillos correspondientes al control de esterilidad se les agregaron 200  $\mu\text{L}$  de CMH y a los restantes pocillos se les agregaron 100  $\mu\text{L}$  de CMH. Tanto de los controles de antibióticos, solvente y muestras se realizaron diluciones seriadas al doble obteniendo las siguientes concentraciones finales:

- Muestras: 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.9062, 1.9531, 0.9765, 0.4882, 0.2441, 0.122 y 0.061  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- Oxacilina y Vancomicina: 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 y 0.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- Solvente: 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.1562, 0.0781 y 0.039%.

Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del inóculo bacteriano a los pocillos de muestras, de controles de antibiótico, de controles de crecimiento y de controles de solvente.

La microplaca se introdujo en una bolsa de plástico y se incubó a 37°C durante 24 horas para ser revisado visualmente el crecimiento bacteriano por la presencia de turbidez. Se determinó la CMI como la concentración más baja de la muestra en la que no había crecimiento bacteriano.

### **3.2.5 Determinación de la concentración citotóxica media de las fracciones aisladas con menor CMI**

Se realizó por medio de la prueba de reducción de la sal bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,3-difeniltetrazolium (MTT) (Mosmann, 1983).

#### **3.2.5.1 Conservación de las células vivas**

Para esto se utilizaron células VERO preparadas en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) adicionado con 10 UI/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomina y 10% de suero fetal bovino. Estas células fueron incubadas a 37°C a 5% CO<sub>2</sub> por 48 horas. Se realizaron lavados con 1 mL de PBS y 1 mL de tripsina. Después 5 minutos de incubación, se agregaron 6 mL de medio DMEM y se centrifugo. Se obtuvo el paquete celular y se mantuvo a 37°C a 5% CO<sub>2</sub> por 48 horas. Se revisó el crecimiento en el invertoscopio, repitiendo el procedimiento hasta un 80% de confluencia. Se realizó lavado y posteriormente la resuspensión del paquete celular en 1 mL de DMEM y se obtiene la concentración celular con la cámara de Neubauer utilizando azul de tripano como medio de contraste.

### **3.2.5.2 Preparación de las muestras**

Se disolvieron 2 mg de muestra en 16  $\mu\text{L}$  de DMSO y se agregó medio DMEM hasta 2 mL. Se prepararon soluciones seriadas al doble. Las concentraciones fueron de 62.5 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

### **3.2.5.3 Evaluación de la Citotoxicidad Media**

Se utilizaron placas de 96 pocillos, se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de una suspensión celular de 1 000 000 células/mL, se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ . Se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de la muestra a evaluar y se incubaron por 72 horas para luego agregar a cada pozo 25  $\mu\text{L}$  de una solución de MTT a 4000 ppm, se incubó por 3 horas, se desechó el medio y se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de DMSO. Se midió espectrofotométricamente en un lector de placas la conversión del MTT a cristales de formazán a una longitud de onda de 540 nm, donde la absorbancia es proporcional a la cantidad de células vivas. En cada placa se colocaron controles negativos de medio, de células y de solvente.

El control negativo de células sin tratamiento corresponde al 100% de viabilidad celular. Se obtuvieron los porcentajes de inhibición de las diferentes concentraciones de fracciones o compuestos y se realizó un gráfico del



porcentaje de inhibición en función de la concentración para determinar por medio de la ecuación de la recta la concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>).

### **3.2.6 Determinación del índice de selectividad**

El índice de selectividad indica que tanta diferencia existe entre la actividad citotóxica y la actividad biológica. Este valor se obtuvo por medio de la fórmula:

$$\text{Índice de Selectividad} = \frac{CC_{50}}{CMI}$$

## **CAPÍTULO 4**

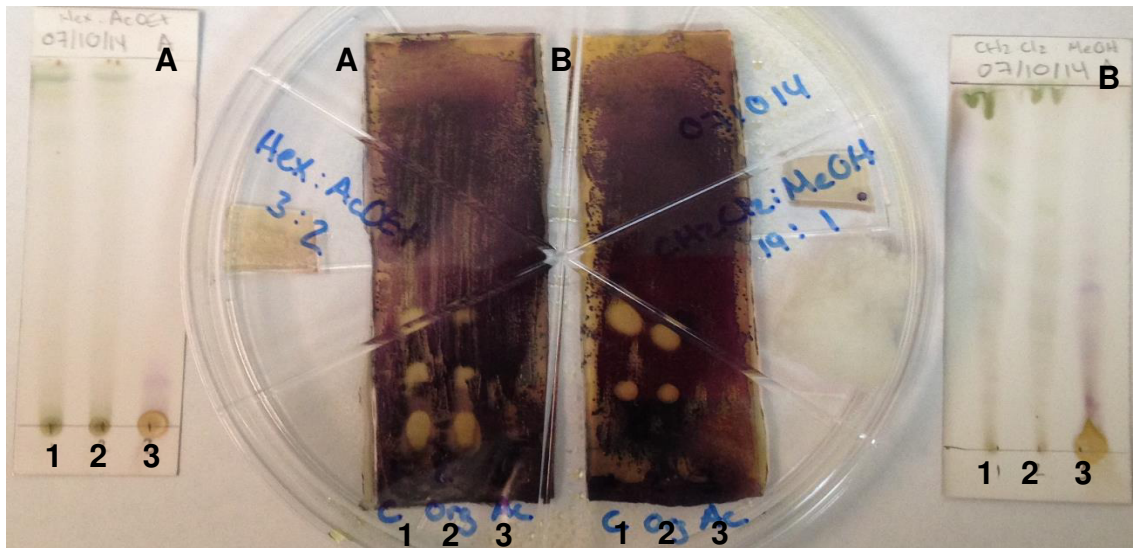
### **RESULTADOS**

#### **4.1 Fraccionamiento del extracto de Acetato de etilo**

Se trabajó con el extracto de acetato de etilo obtenido de hojas de *Cordia boissieri*. Se obtuvo una fracción con diclorometano y una fracción acuosa al realizar la extracción líquido – líquido. Las fracciones fueron llevadas a sequedad y recuperadas con metanol. Se obtuvo un 90.6% de recuperación de la fracción con diclorometano.

Se evaluó la actividad antimicrobiana de las fracciones por el bioensayo de bioautografía de superposición del agar. En la figura 3 se presentan los resultados obtenidos. En las placas A y B se puede observar inhibición del crecimiento bacteriano en los carriles 1 y 2 correspondientes al extracto de acetato de etilo y a la fracción de diclorometano. En base a esta inhibición, a la fracción denominada Fracción Diclorometano o DCM, se le realizó CC de

Exclusión Molecular. El carril 3 que corresponde a la Fracción acuosa no presentó inhibición del crecimiento bacteriano.



**Figura 3** Bioautografía y CCF con dos sistemas de eluentes: (A) diclorometano:metanol 19:1 y (B) hexano:acetato de etilo 3:2. Los carriles de las muestras corresponden a: (1) extracto de acetato de etilo, (2) fracción diclorometano y (3) fracción acuosa.

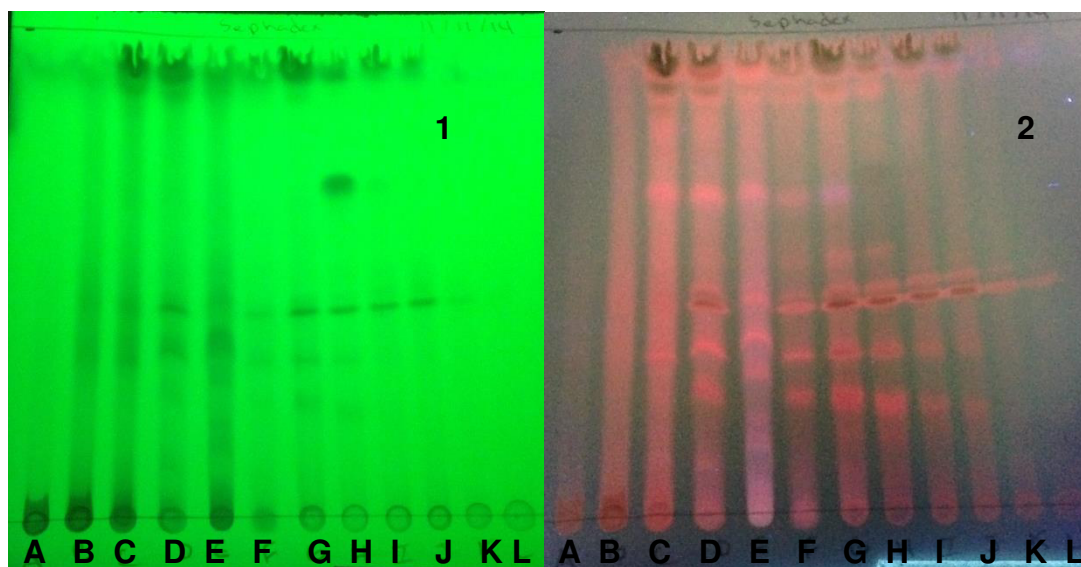
El sistema de eluentes diclorometano:metanol (19:1) mostró una mejor separación de manchas por lo que se seleccionó para las bioautografías posteriores.

#### **4.1.1 Fraccionamiento biodirigido de Fracción Diclorometano**

El fraccionamiento biodirigido se realizó por tres técnicas de separación, las cuales fueron Exclusión Molecular, SPE y CC de Sílica Gel. Se obtuvieron un número variable de fracciones con cada técnica de separación.

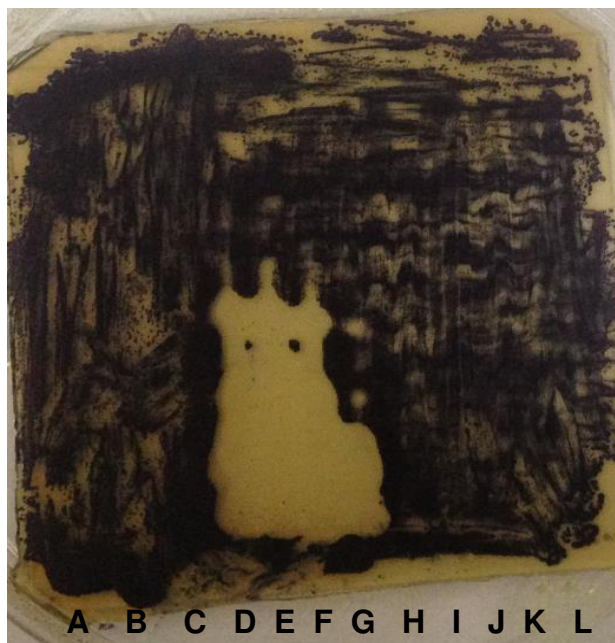
##### **4.1.1.1 Cromatografía de Exclusión Molecular de Fracción Diclorometano**

A la fracción activa Fracción DCM se le realizó CC de exclusión molecular y se obtuvieron un total de 12 fracciones denominadas con las letras A a L. Estas fracciones fueron analizadas por medio de cromatografía en capa fina utilizando la lámpara de Ultravioleta a las longitudes de onda de 254 nm y 365 nm para observar los patrones de bandas. Las CCF se muestran en la figura 4.



**Figura 4** CCF de las fracciones obtenidas de Fracción DCM con un sistema de eluentes diclorometano:metanol 19:1 a una longitud de onda de (1) 254 nm y (2) 365 nm.

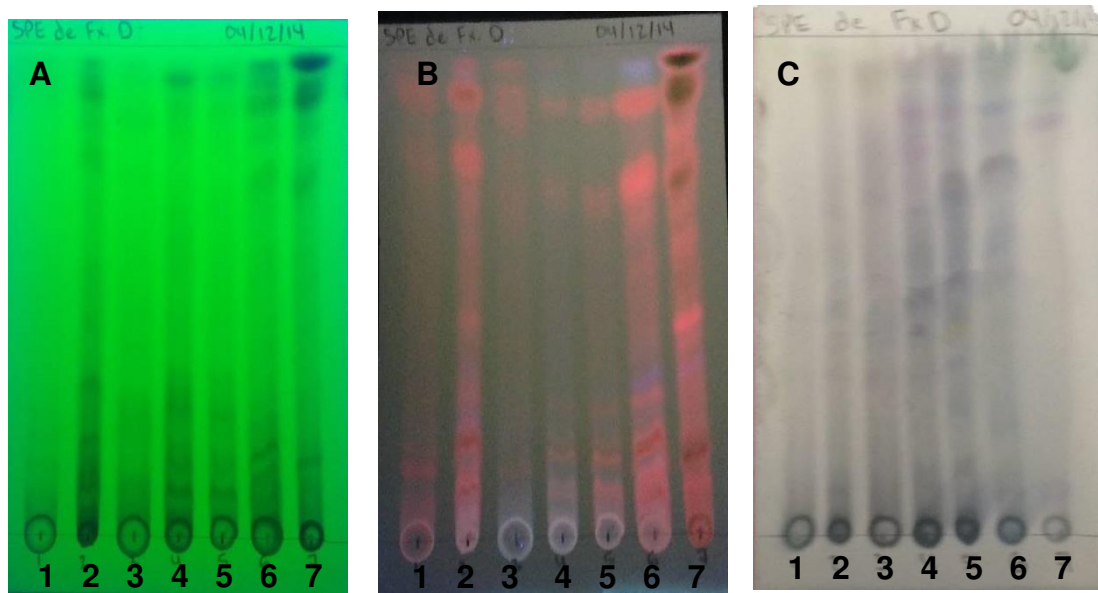
Se utilizó la CCF de la figura 4 y se realizó la bioautografía de las doce fracciones (A a la L). Se observó un patrón de inhibición del crecimiento en los carriles correspondientes a las fracciones D, E, F y G (fracciones activas). La imagen correspondiente a la bioautografía se presenta en la figura 5.



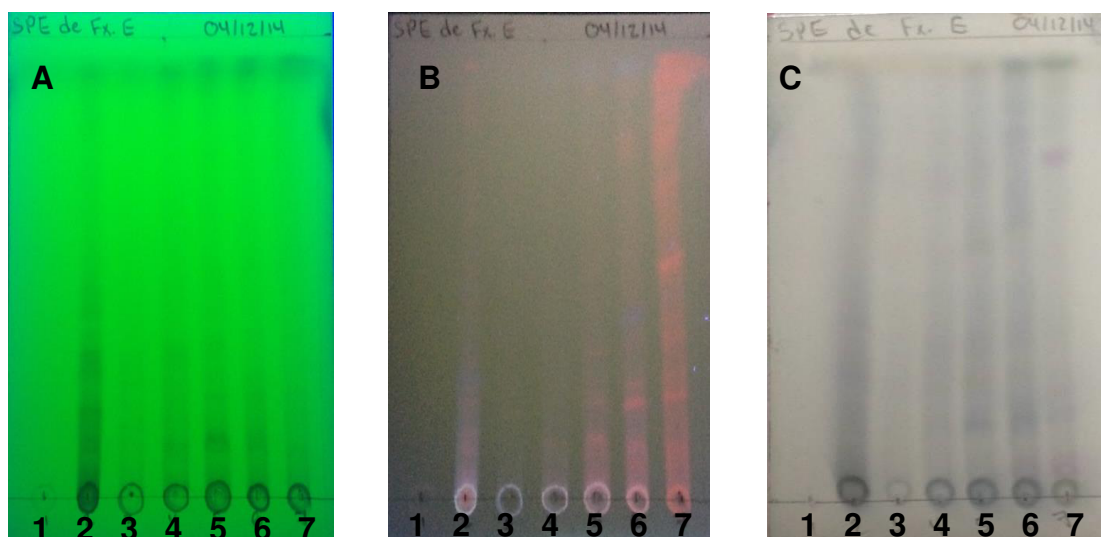
**Figura 5** Bioautografía de las doce fracciones obtenidas de la Fracción DCM con un sistema de eluentes diclorometano:metanol (19:1).

#### **4.1.2 Extracción en fase sólida de las fracciones D, E, F y G**

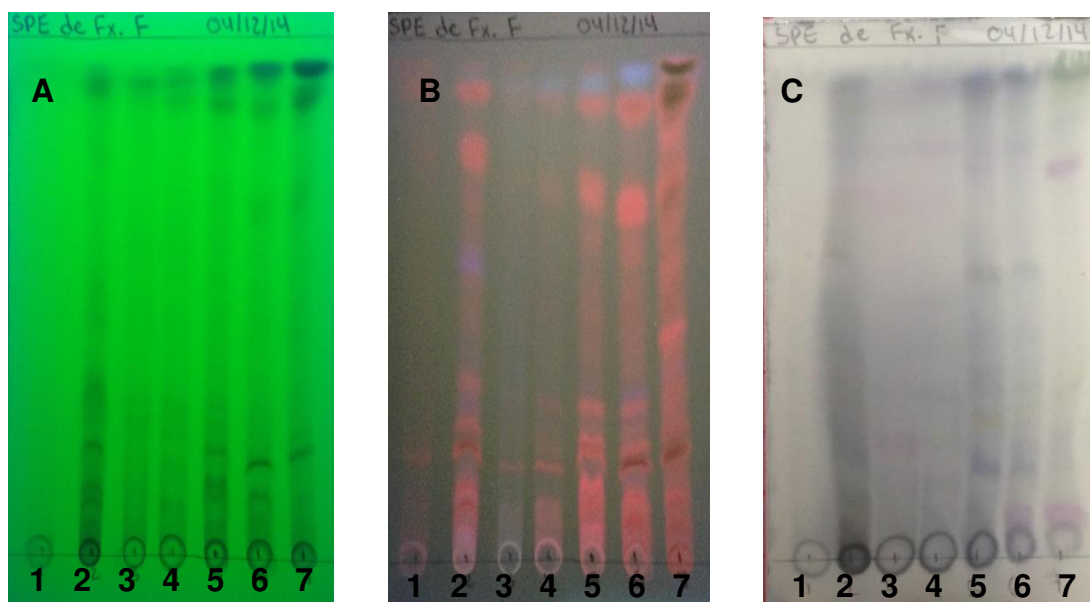
Se realizó una extracción en fase sólida de cada una de las fracciones activas (D, E, F y G) y se obtuvieron un total de 7 sub-fracciones para cada una de ellas denominadas como: D1 a D7, E1 a E7, F1 a F7 y G1 a G7, respectivamente. Estas 28 sub-fracciones obtenidas se analizaron por CCF. En las figuras 6 a 9, se muestra el patrón de bandas observado en la lámpara de UV a las longitudes de onda de 254 nm y 365 nm, y con revelado con ácido sulfúrico/vainillina y calor.



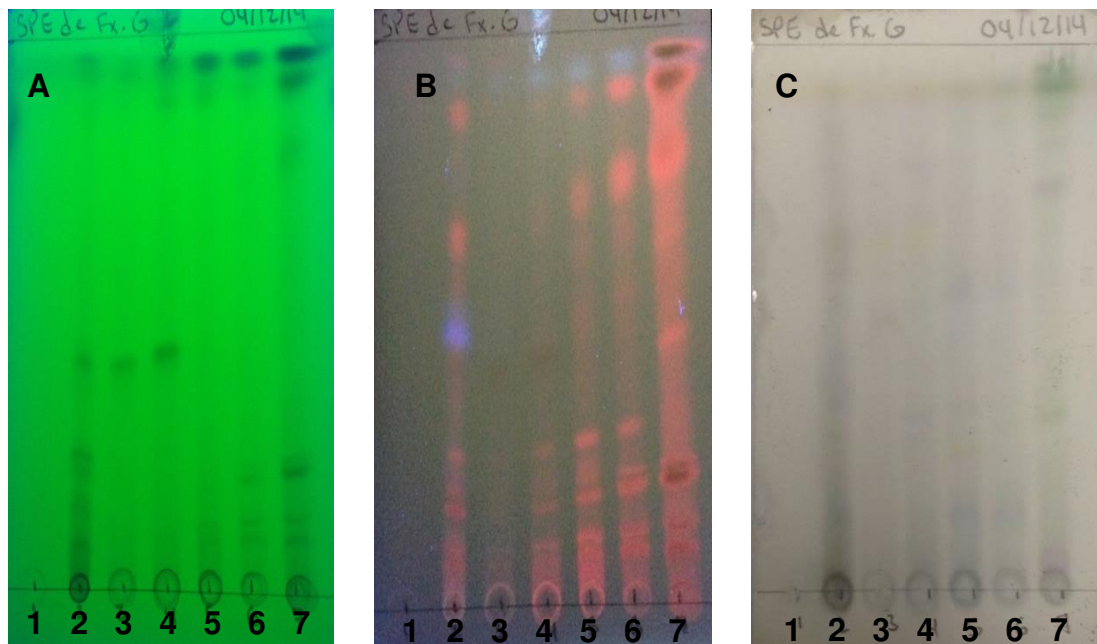
**Figura 6** CCF de las sub-fracciones obtenidas de Fracción D con un sistema de eluentes diclorometano:metanol 19:1 a una longitud de onda de (A) 254 nm, (B) 365 nm y (C) revelado con ácido sulfúrico y vainillina.



**Figura 7** CCF de las sub-fracciones obtenidas de Fracción E con un sistema de eluentes diclorometano:metanol 19:1 a una longitud de onda de (A) 254 nm, (B) 365 nm y (C) revelado con ácido sulfúrico y vainillina.



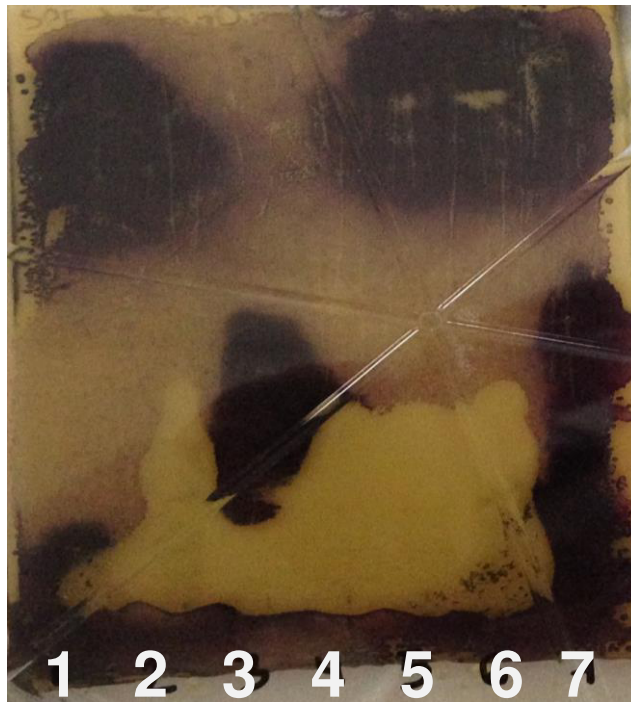
**Figura 8** CCF de las sub-fracciones obtenidas de Fracción F con un sistema de eluentes diclorometano:metanol 19:1 a una longitud de onda de (A) 254 nm, (B) 365 nm y (C) revelado con ácido sulfúrico y vainillina.



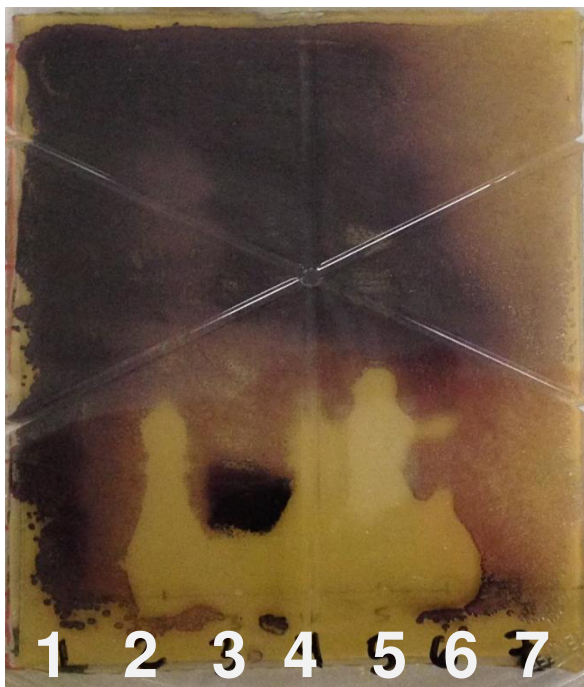
**Figura 9** CCF de las sub-fracciones obtenidas de Fracción G con un sistema de eluentes diclorometano:metanol 19:1 a una longitud de onda de (A) 254 nm, (B) 365 nm y (C) revelado con ácido sulfúrico y vainillina.



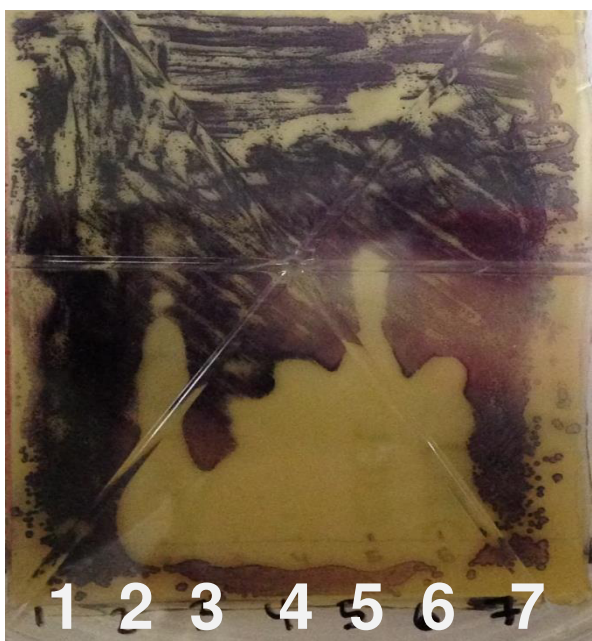
De forma paralela se realizó una segunda cromatografía en capa fina con la que se realizó la bioautografía de las 28 sub-fracciones (D1 a D7, E1 a E7, F1 a F7 y G1 a G7). En las figuras 10 a 13 se presentan las imágenes de las bioautografías obtenidas. En cada una de estas bioautografías se puede observar patrón de inhibición en los carriles 2 a 6. Las veinte sub-fracciones activas fueron D2 a D6, E2 a E6, F2 a F6 y G2 a G6.



**Figura 10** Bioautografía de las sub-fracciones obtenidas de Fracción D con un sistema de eluentes diclorometano:metanol (19:1).



**Figura 11** Bioautografía de las sub-fracciones obtenidas de Fracción E con un sistema de eluentes diclorometano:metanol (19:1).



**Figura 12** Bioautografía de las sub-fracciones obtenidas de Fracción F con un sistema de eluentes diclorometano:metanol (19:1).



**Figura 13** Bioautografía de las sub-fracciones obtenidas de Fracción G con un sistema de eluentes diclorometano:metanol (19:1).

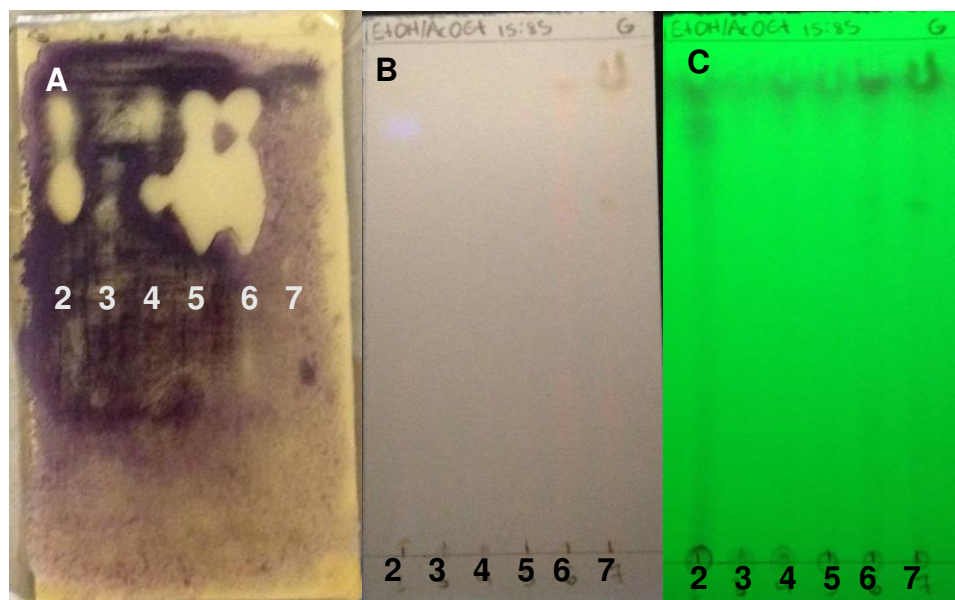
#### **4.1.3 Cromatografía en Columna de Sílica Gel de las Sub-Fracciones G2, G4, G5, G6**

Las sub-fracciones G2, G4, G5 y G6 se sometieron a proceso de separación cromatográfico en columna de Sílica Gel y previo a ello se hizo la selección del sistema de eluentes adecuado mediante pruebas con CCF.

#### **4.1.3.1 Selección del sistema de eluentes para la Cromatografía en Columna de Sílica Gel**

Para seleccionar el sistema de eluentes para las CC de Sílica Gel de las Sub-Fracciones activas obtenidas de Fracción G, se probaron los sistemas de eluentes indicados en la sección 3.2.1.1.3. El Rf o factor de retardo de las manchas se calculó dividiendo la distancia recorrida por la mancha entre la distancia recorrida por el solvente.

Se seleccionó como mejor sistema de eluentes aquel que separara las manchas del origen de la siembra de muestra (desplazarlos a Rf mayor) y en el que se observara una mejor separación de manchas. El sistema de eluentes seleccionado fue etanol:acetato de etilo en proporción 15:85. En la figura 14 se puede observar la CCF y la bioautografía utilizando el sistema de eluentes seleccionado, donde se observa que los compuestos en G2, G4, G5 y G6, se desplazaron a un Rf mayor. No se observó inhibición de crecimiento bacteriano en el carril correspondiente a G3, por lo que no se realizó el fraccionamiento de esta.



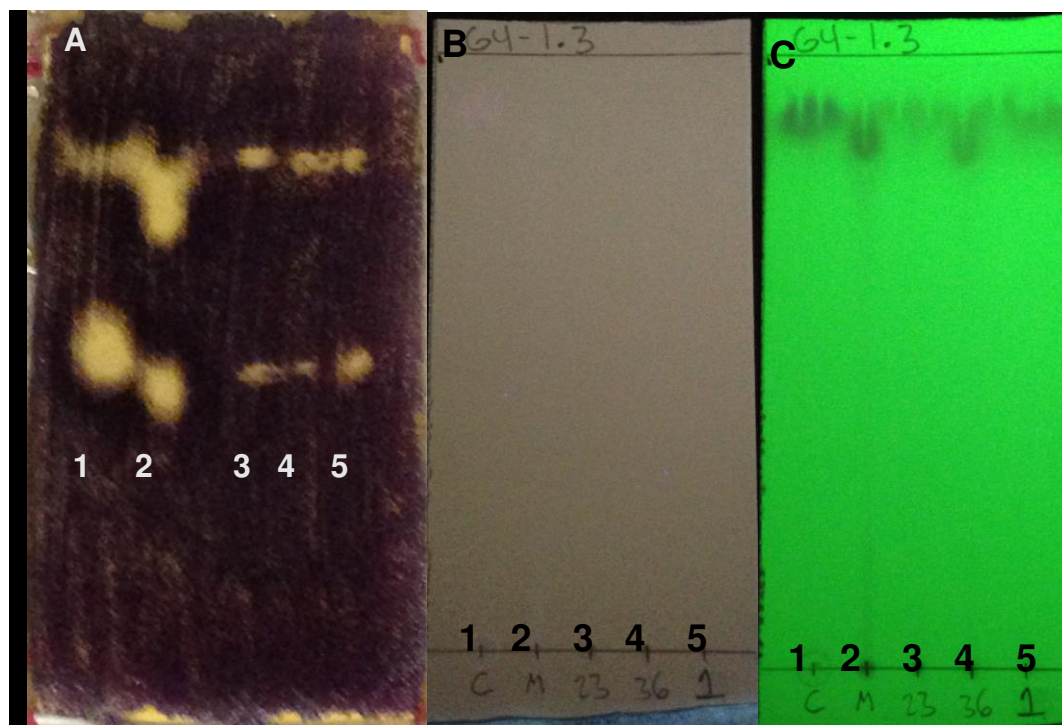
**Figura 14** Bioautografía y CCF de las sub-fracciones obtenidas de Fracción G con un sistema de eluentes etanol:acetato de etilo 15:85 donde se observa (A) el patrón de inhibición de las fracciones G2 a G6, (B) CCF a 254nm y (C) 365nm.

El sistema de eluentes empleado en las CC de Sílica Gel consistió en gradiente de etanol:acetato de etilo. La proporción de los solventes del gradiente así como los solventes de lavado de la columna se presentan en la tabla 2.

**TABLA 2** Sistema de gradiente de solventes empleado para las CC de Sílica Gel de las sub-fracciones obtenidas de las Fracciones G2, G4, G5, G6.

<b>Solventes</b> <b>Sistema</b>	<b>Acetato de etilo</b>	<b>Etanol</b>	<b>Metanol</b>	<b>Agua</b>
<b>1</b>	19	1	0	0
<b>2</b>	17	3	0	0
<b>3</b>	15	5	0	0
<b>4</b>	1	1	0	0
<b>5</b>	1	0	0	0
<b>6</b>	0	0	1	0
<b>7</b>	0	0	1	1

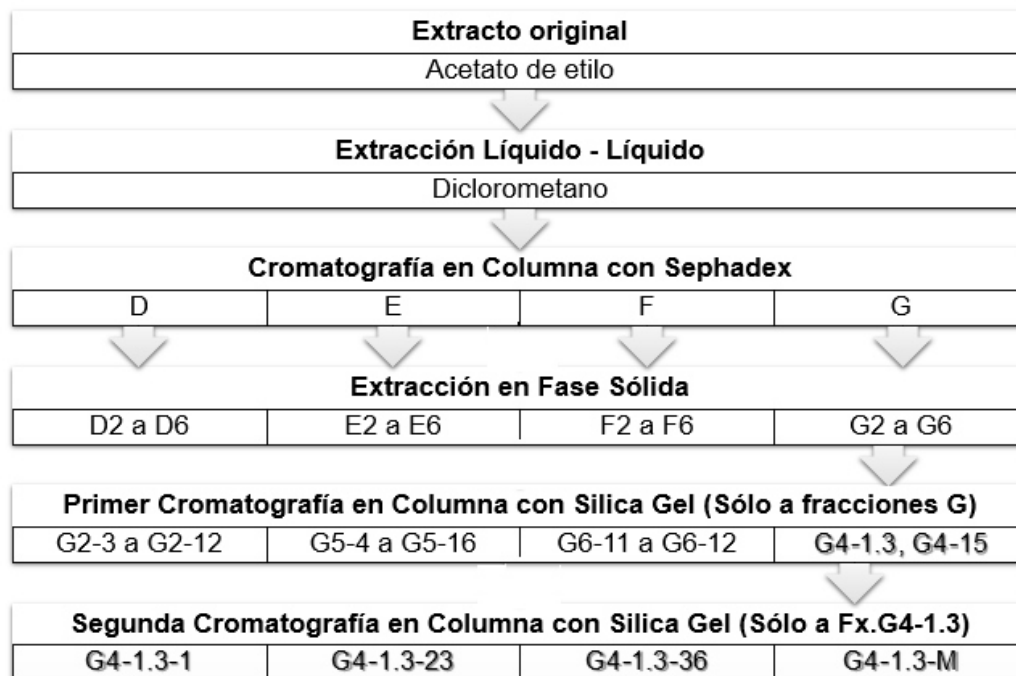
Se realizó una segunda cromatografía en columna de Sílica gel de la fracción G4. De las 15 sub-fracciones obtenidas de la Fracción G4, denominadas G4-1 a G4-15, la G4-1 a G4-3 y la G4-15, presentaron actividad en bioautografía. Las sub-fracciones G4-1 a G4-3 se juntaron denominándose como G4-1.3 y se le realizó una segunda CC obteniendo 40 sub-fracciones más el lavado con metanol. Se realizó la bioautografía y se observaron cuatro sub-fracciones activas denominadas como G4-1.3-1, G4-1.3-23, G4-1.3-36 y G4-1.3-M. En la figura 15 se presenta el patrón de inhibición de la sub-fracción G4-1.3 y de las cuatro fracciones activas obtenidas, así como la CCF observada en la lámpara de UV.



**Figura 15** (A) Bioautografía y CCF a una longitud de onda de (B) 254nm y (C) 365 nm de las sub-fracciones obtenidas de Fracción G4-1.3 con un sistema de eluentes etanol:acetato de etilo 15:85 donde se observa el patrón de inhibición de las fracciones. Carriles: (1) G4-1.3, (2) G4-1.3-M, (3) G4-1.3-23, (4) G4-1.3-36 y (5) G4-1.3-1.

#### 4.1.4 Fracciones activas obtenidas del extracto de acetato de etilo

Se obtuvieron en total 56 fracciones derivadas del extracto de acetato de etilo de hojas de *C. boissieri*. El esquema de la figura 16 resume las fracciones activas obtenidas, así como la técnica separativa de la cual provienen.



**Figura 16** Resumen de las fracciones activas obtenidas.

#### 4.1.2 Cromatografía en columna de Sílica Gel de la fracción H

La fracción H derivada de la CC de Exclusión Molecular de la fracción Diclorometano, presentó una mancha intensa en la CCF (figura 17) y además separada de los demás compuestos con un Rf de 0.65. Se utilizó una CC de Sílica Gel con diclorometano:metanol (19:1) para aislar dicho compuesto. El compuesto fue nombrado como M081214. Posteriormente se elucidó la estructura correspondiente.





**Figura 17** CCF de las fracciones A a L a una longitud de onda de 254 nm. Se señala la mancha del compuesto M081214 a Rf de 0.65. Se utilizó un sistema de eluentes diclorometano:metanol (19:1).

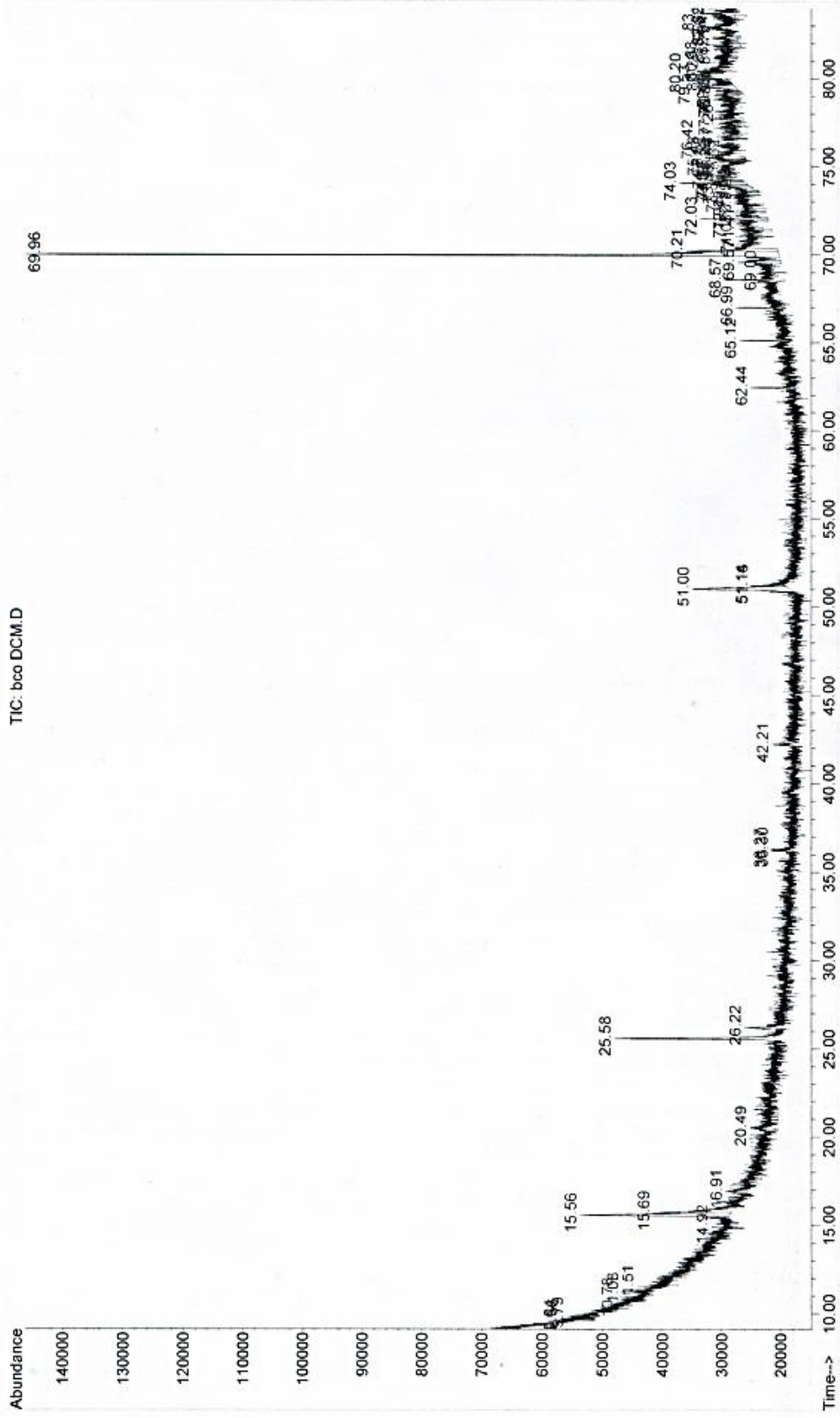
## 4.2 Análisis por Cromatografía de Gases

Se utilizó un Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrometría de Masas para el análisis de las fracciones activas que en CCF presentaron un menor número de manchas o ninguna. Se seleccionaron un total de 20 sub-fracciones para analizar. En la tabla 3 se indican las sub-fracciones analizadas por CG/MS.

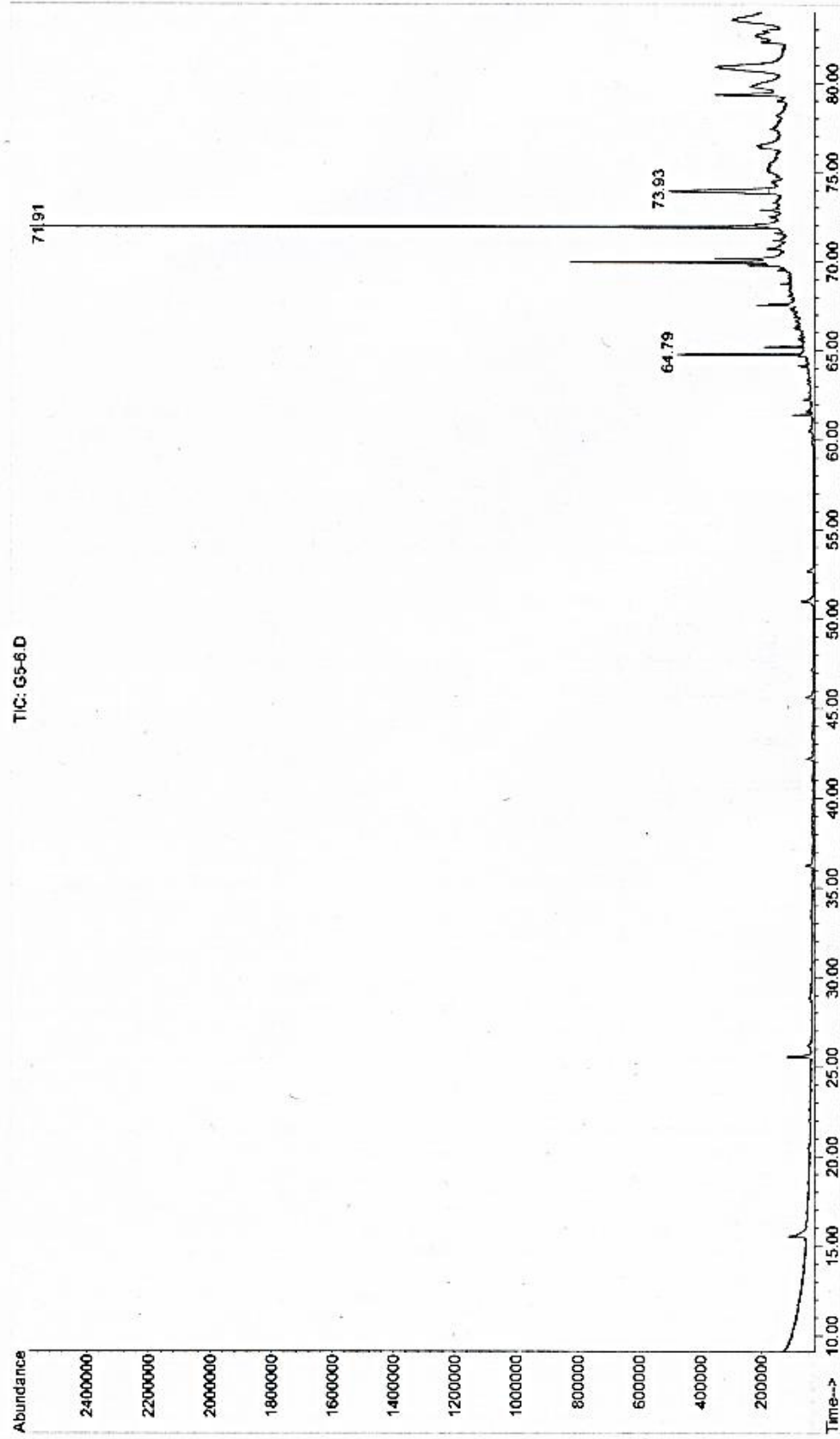
**TABLA 3** Sub-fracciones analizadas por CG-MS en base a la técnica de separación empleada.

<b>Derivadas de SPE</b>	<b>Derivadas de CC de Sílica Gel de Fracción G</b>				<b>Derivadas de CC de Sílica Gel de Fracción G4-1.3</b>
D3	G2-3		G5-4		G4-1.3-1
E3	G2-4		G5-5	G6-11	G4-1.3-23
F3	G2-5	G4-15	G5-6	G6-12	G4-1.3-36
	G2-8		G5-7		G4-1.3-M
	G2-9		G5-8		

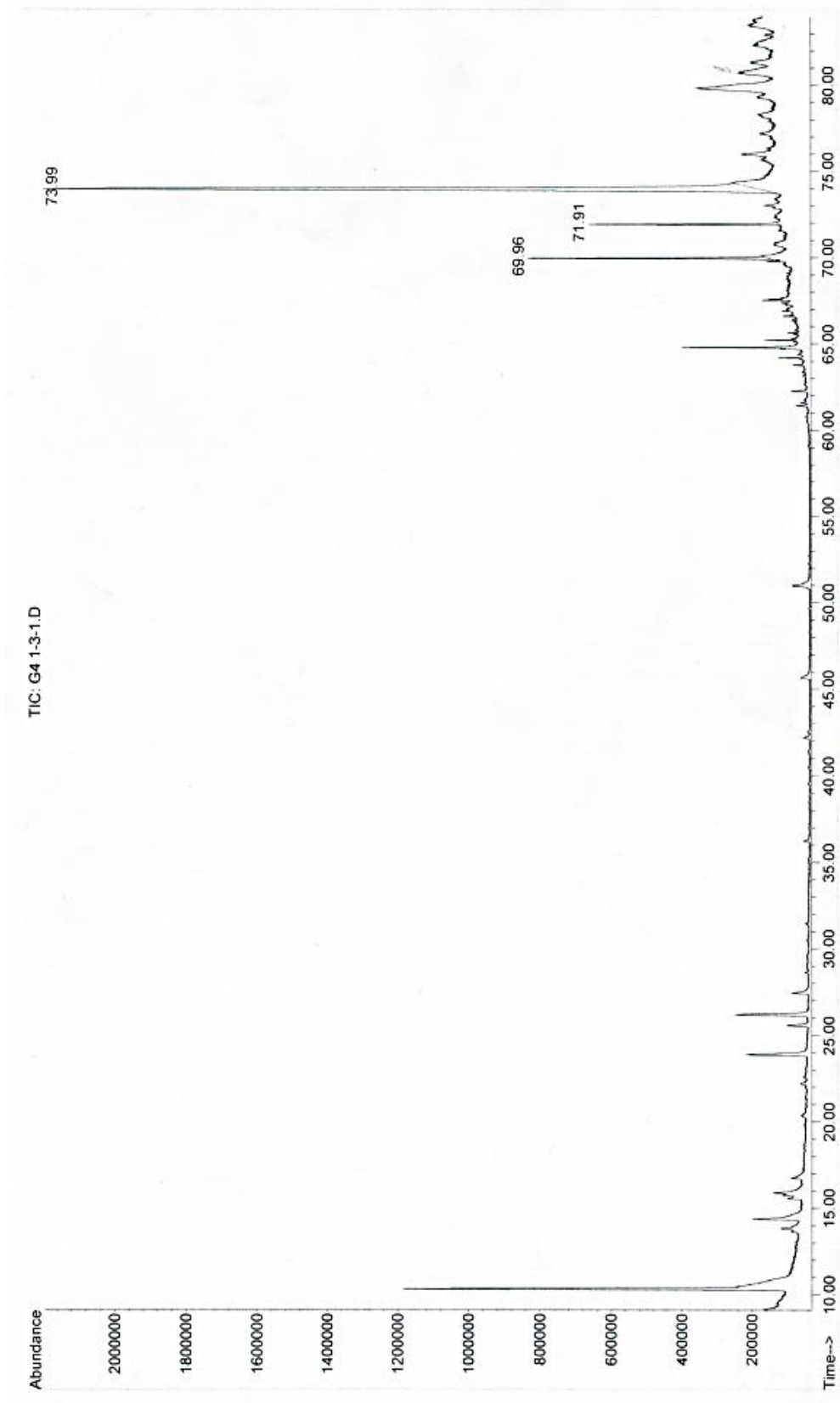
Las señales observadas en el blanco de DCM (figura 18) no se consideraron para el número de señales. En base al número de picos obtenidos en los cromatogramas de las veinte muestras (tabla 3) se observó que las sub-fracciones G5-6 y G4-1.3-1, presentaron un menor número de compuestos o componentes (figuras 19 y 20). Debido a lo anterior, las sub-fracciones G5-6 y G4-1.3-1 fueron empleadas para el análisis espectroscópico.



**Figura 18** Cromatograma del blanco de Diclorometano. Señal observada a un tiempo de retención de 69.9 minutos.



**Figura 19** Cromatograma de la muestra G5-6 disuelta en diclorometano. Señales observadas a un tiempo de retención de 64.8, 71.9 y 73.9 minutos.



**Figura 20** Cromatograma de la muestra G4-1.3-1 disuelta en diclorometano. Señales observadas a un tiempo de retención de 71.9 y 73.9 minutos.

### **4.3 Caracterización estructural de los compuestos presentes en las fracciones**

#### **4.3.1 Elucidación estructural del compuesto M081214**

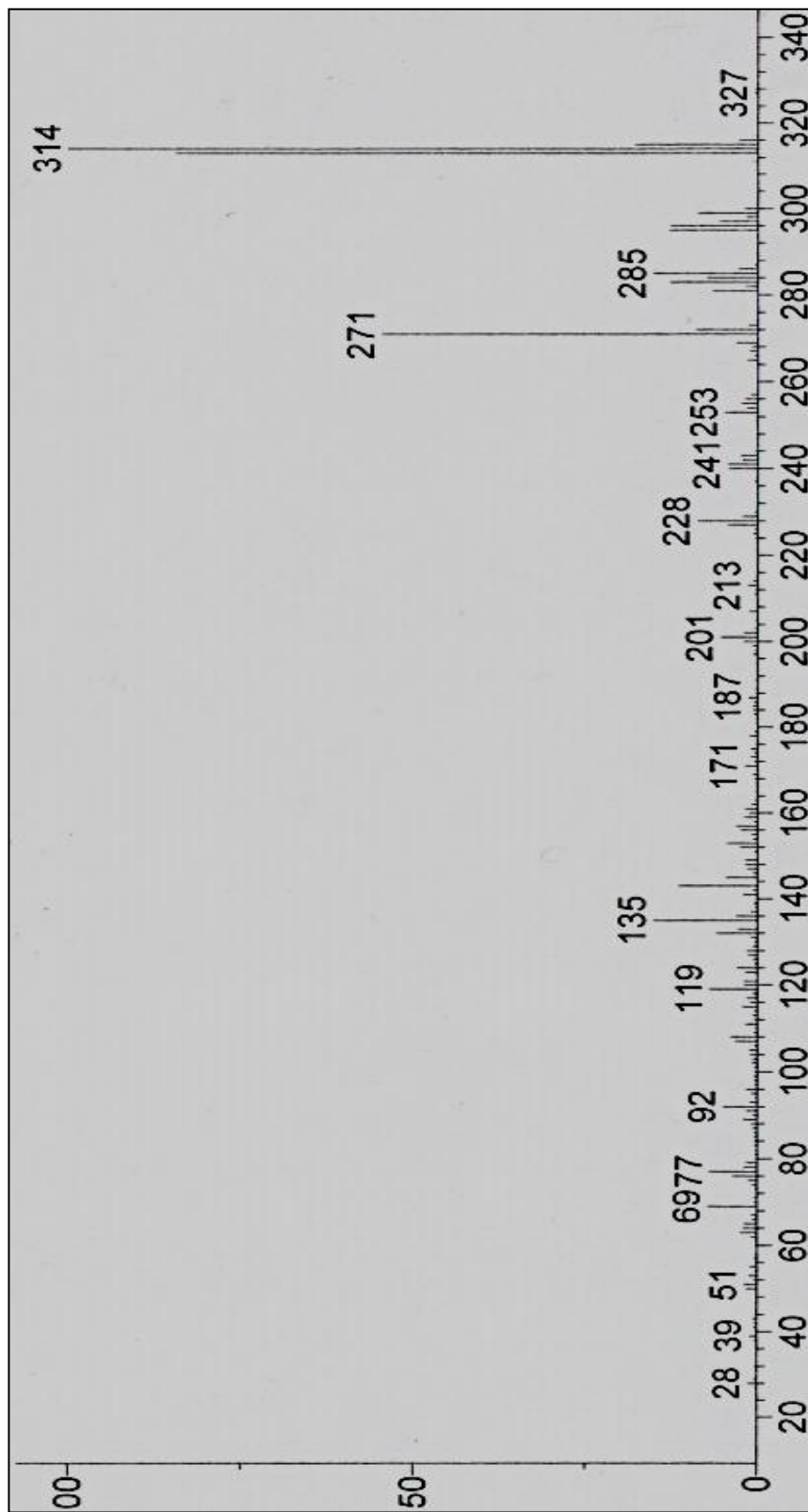
Para la obtención de la estructura química del compuesto aislado denominado M081214, se adquirió el espectro de masas de la señal correspondiente a 82.1 minutos, del cromatograma obtenido en el análisis por CG-MS. Se puede observar dicho cromatograma en la figura 21 y el correspondiente espectro en la figura 22. En este se observa un pico base que corresponde al ion molecular a  $m/z$  de 314.

Además se obtuvieron los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, DEPT-135, HMBC, HMQC y COSY. Los espectros se muestran en las figuras 23 a 27.



**Figura 21** Cromatograma de la muestra M081214 disuelta en diclorometano. La señal correspondiente a

82.1 minutos corresponde a la señal del compuesto aislado.



**Figura 22** Espectro de masas de la señal a 82.1 minutos correspondiente al compuesto M081214.



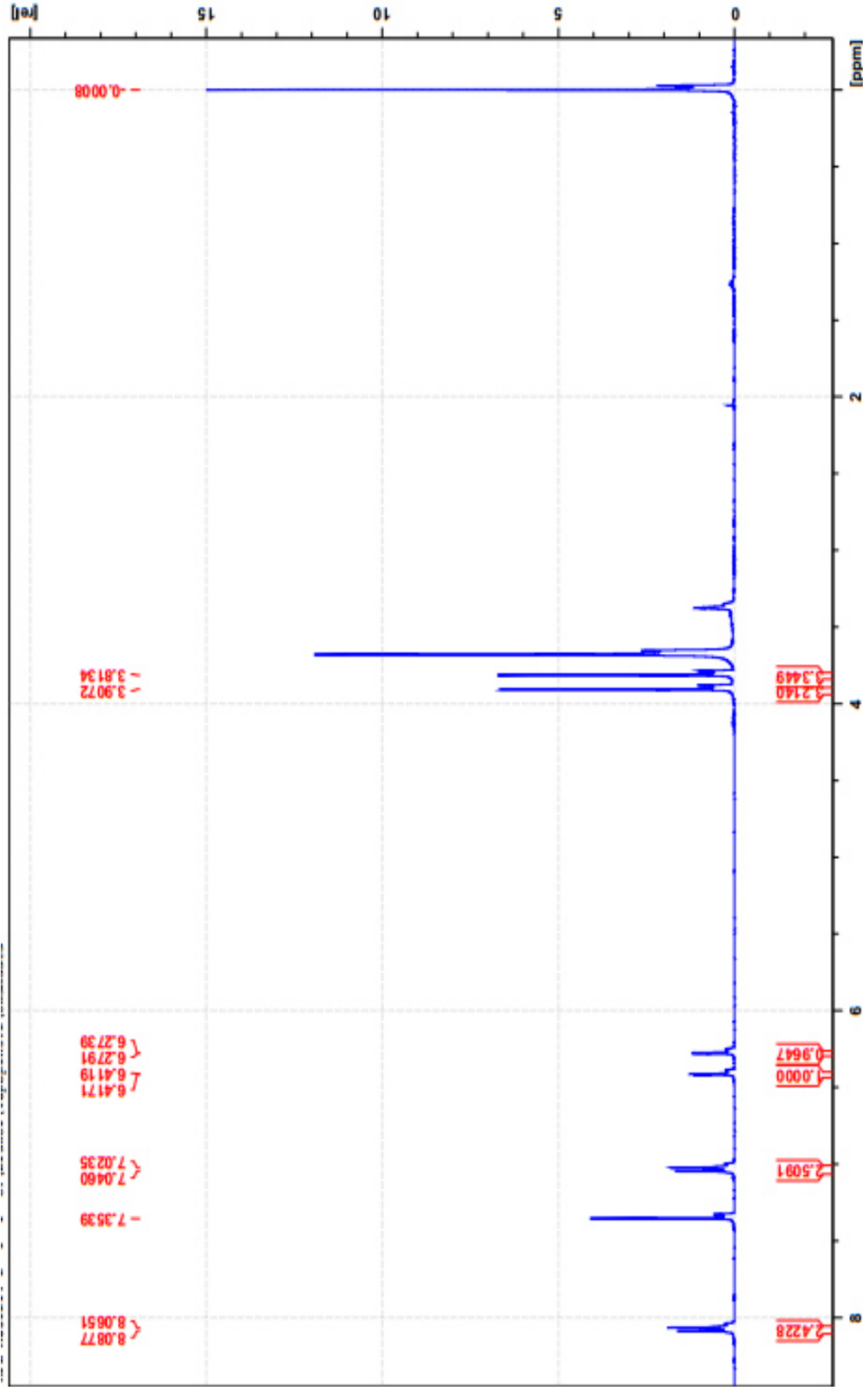


Figura 23 Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del compuesto M081214.

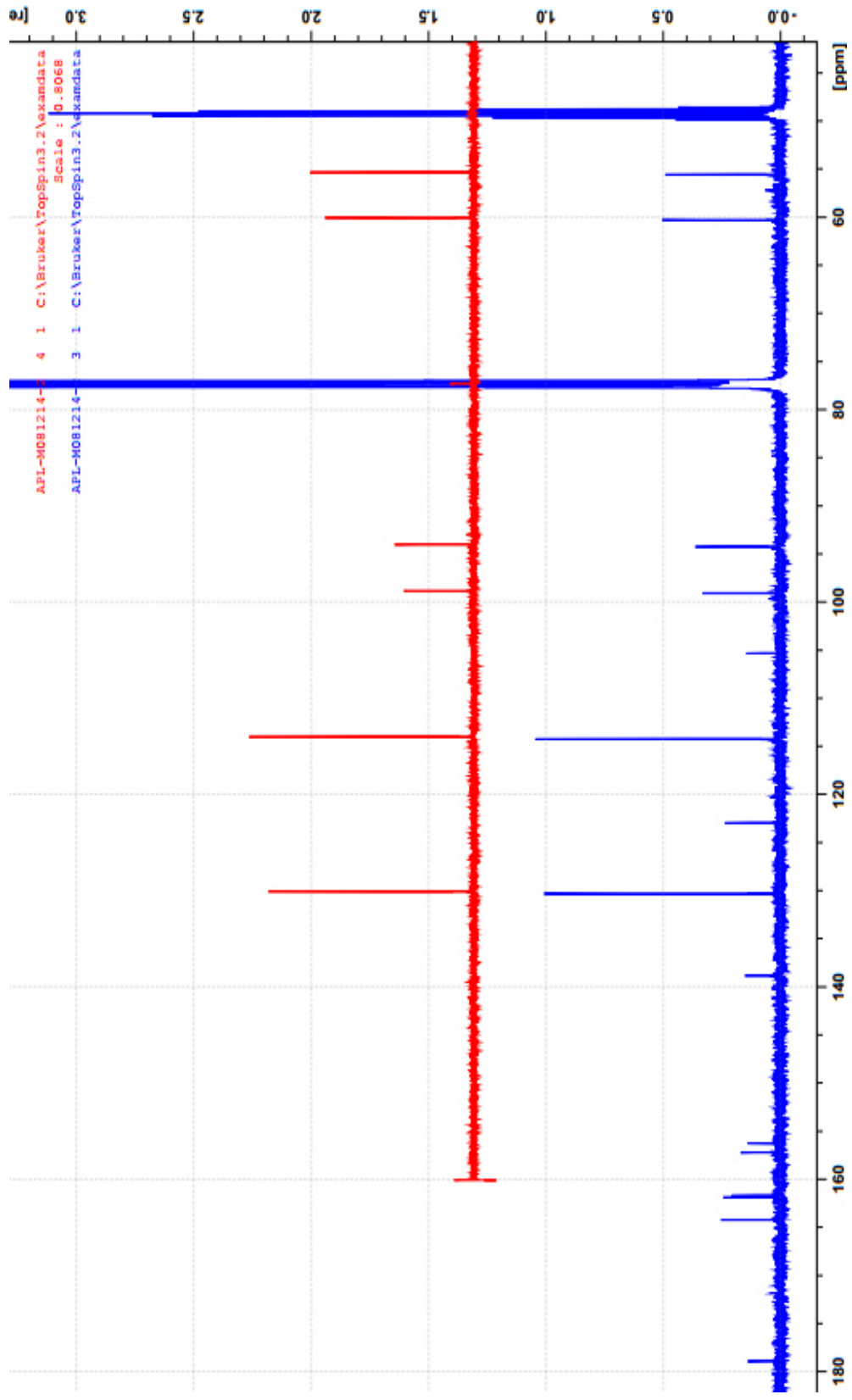


Figura 24 Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (azul) y DEPT-135 (rojo) del compuesto M081214.

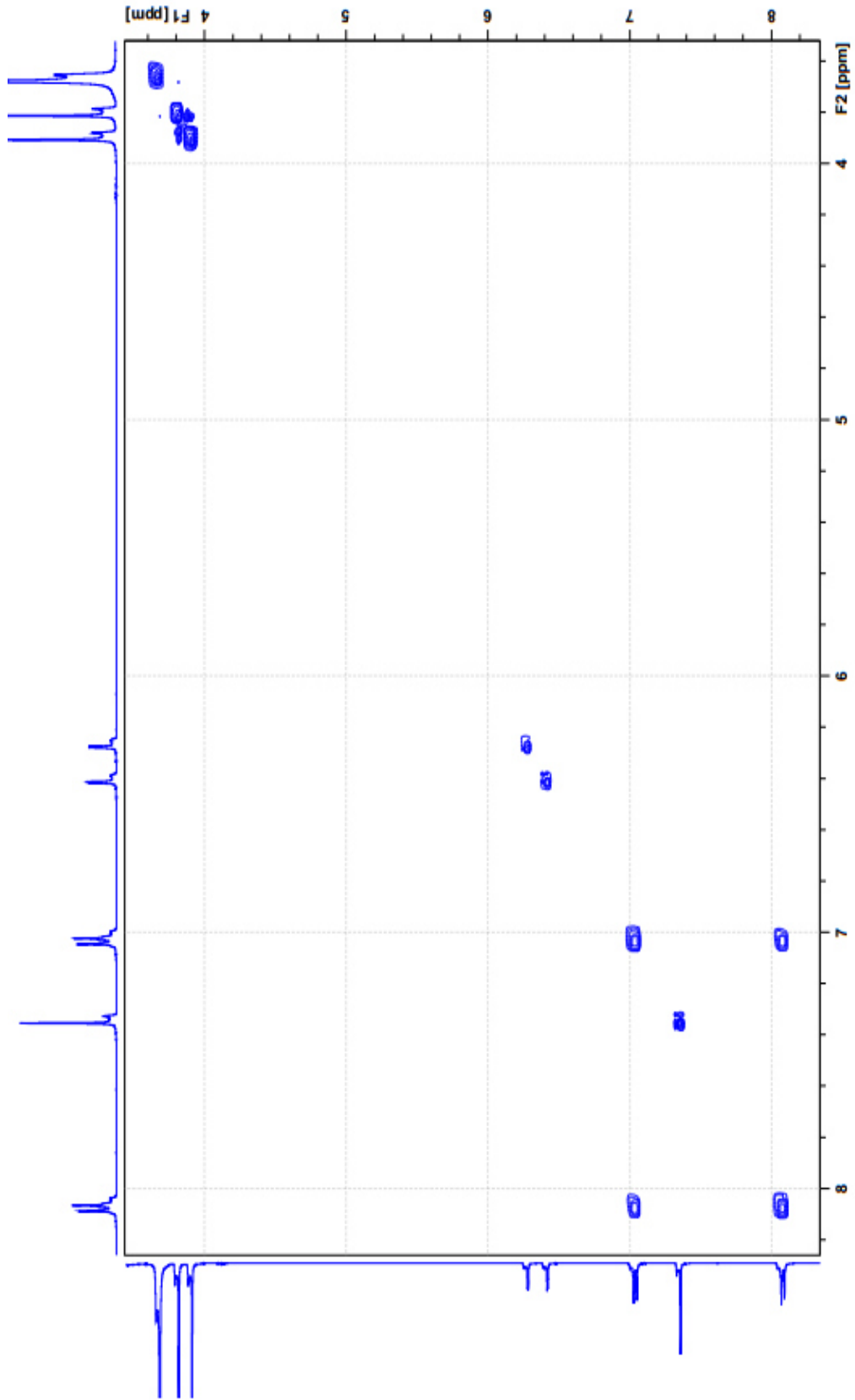


Figura 25 Espectro de COSY del compuesto M081214.

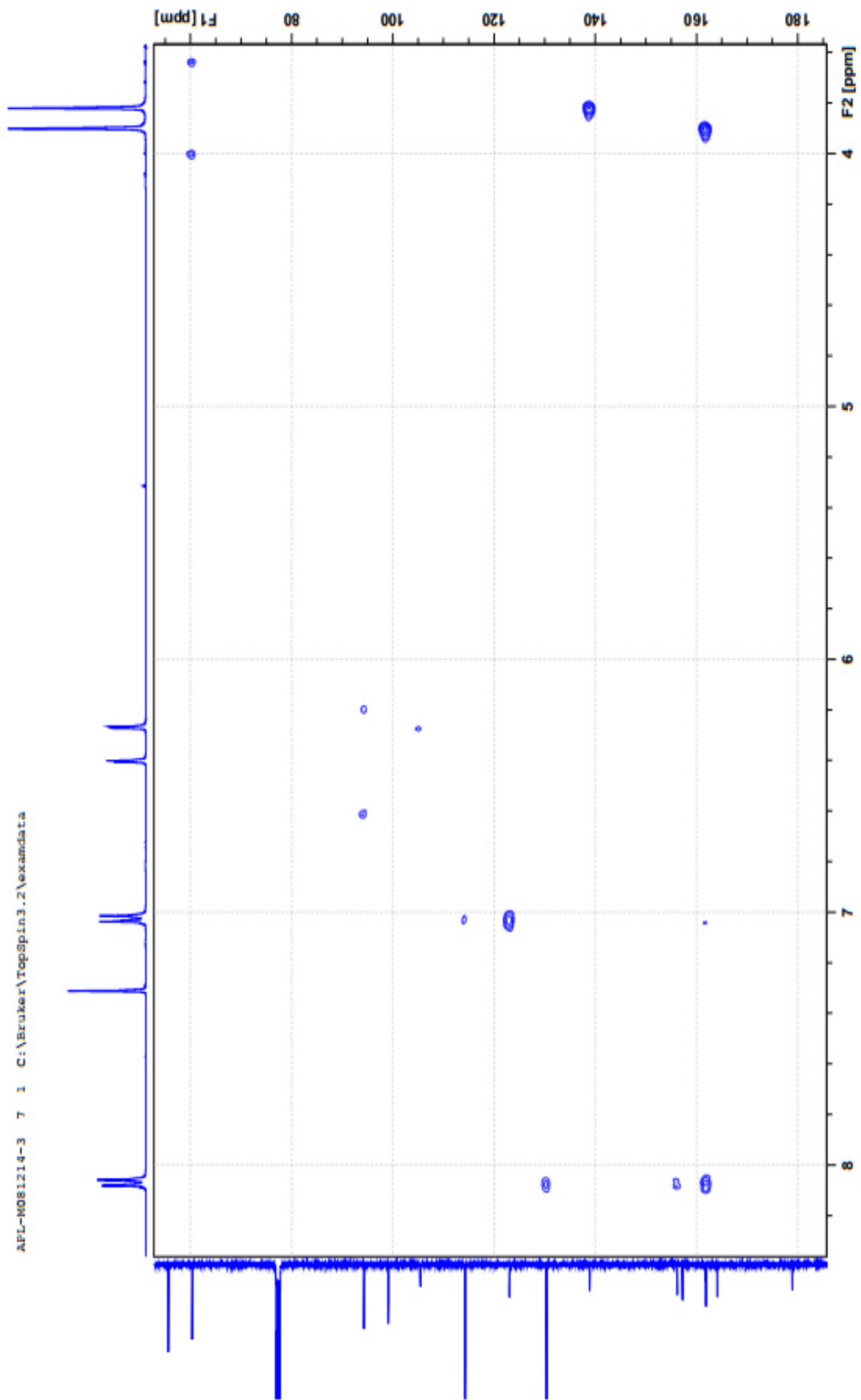


Figura 26 Espectro de HMBC del compuesto M081214.

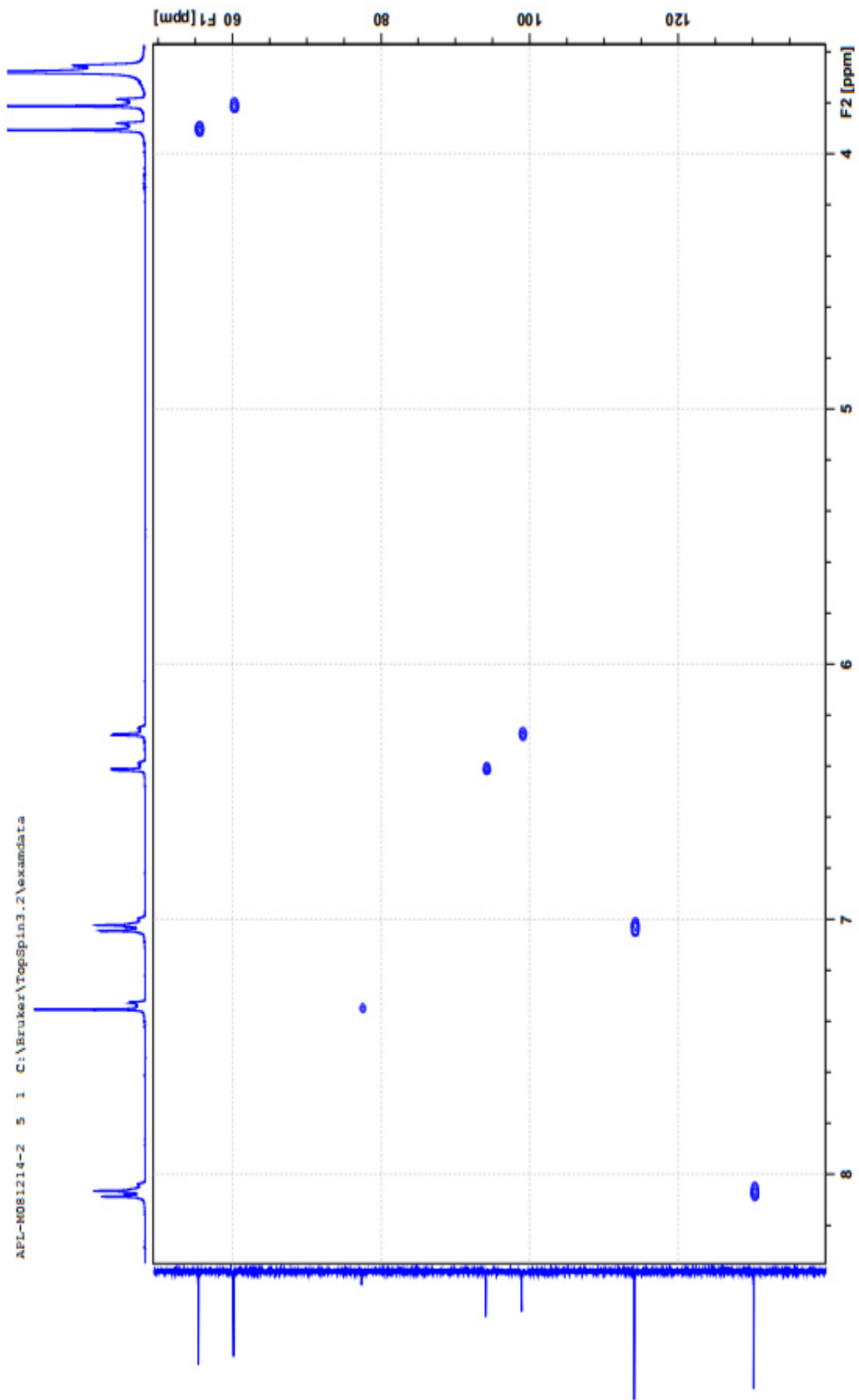


Figura 27 Espectro de HMQC del compuesto M081214.

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN mostró las señales indicadas en la tabla 4.

**TABLA 4** Señales observadas en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN.

Señal	Desplazamiento químico	Integración	Forma de señal	J (Hz)
1	3.8 ppm	3	Singulete	
2	3.9 ppm	3	Singulete	
3	6.2 ppm	1	Doblete	2.08
4	6.4 ppm	1	Doblete	2.08
5	7.0 ppm	2	Doblete	9.00
6	8.1 ppm	2	Doblete	9.04

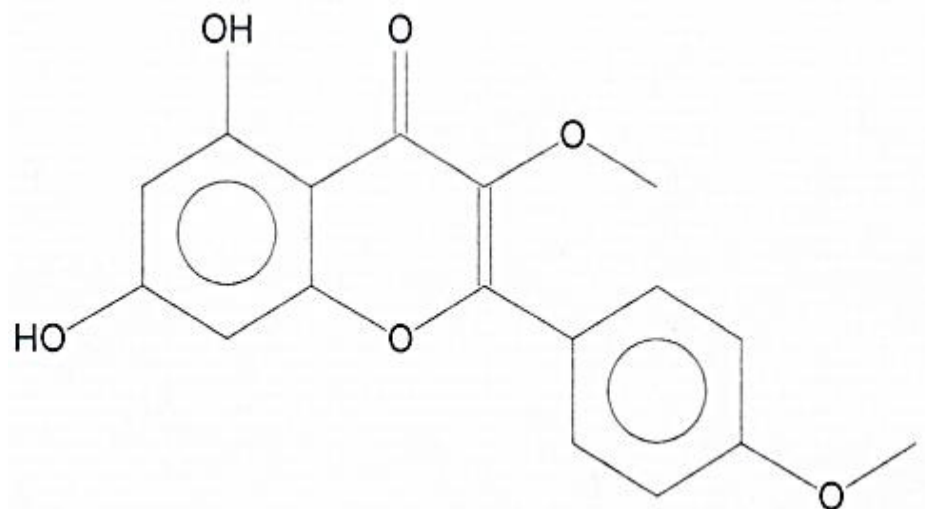
El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN mostró las señales indicadas en la tabla 5.

**TABLA 5** Señales observadas en el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN y DEPT-135.

Señal	Desplazamiento químico	Tipo de C
1	52 ppm	CH <sub>3</sub> -O-
2	60 ppm	CH <sub>3</sub> -O-
3	94 ppm	CH
4	99 ppm	CH
5	106 ppm	C
6	114 ppm	CH
7	123 ppm	C
8	130 ppm	CH
9	139 ppm	C
10	156 ppm	C
11	157 ppm	C
12	161 ppm	C
13	162 ppm	C
14	164 ppm	C
15	179 ppm	C

Además se verificaron los acoplamientos de las señales de protón y de carbono en los espectros de COSY, HMBC y HMQC. Con el conjunto de estos

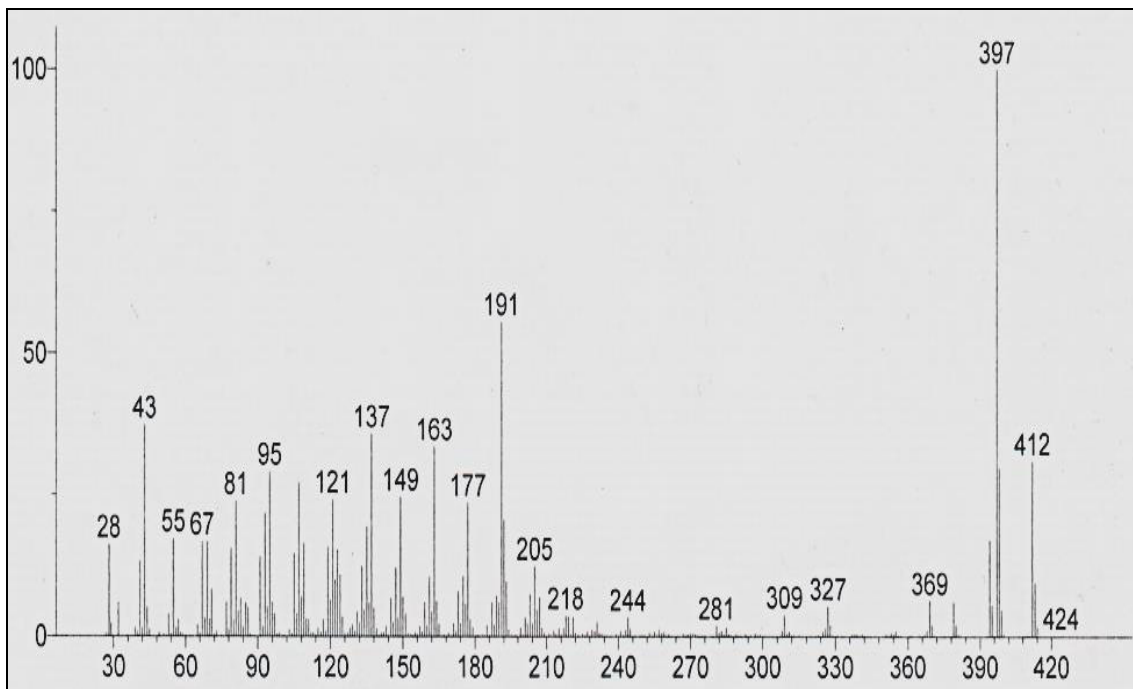
espectros se obtuvo la estructura del compuesto de la figura 28. El compuesto corresponde al Dimetoxi-3,4'-Kaempferol, con fórmula molecular de  $C_{17}H_{14}O_6$ .



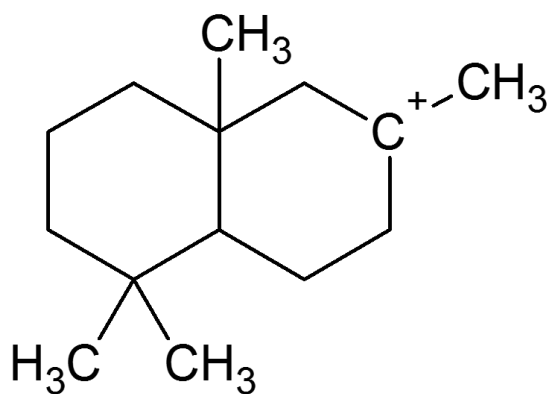
**Figura 28** Dimetoxi-3,4'-Kaempferol.

#### 4.3.2 Caracterización estructural del compuesto con un tR de 73.9 minutos

En los cromatogramas de las figuras 19 y 20, que corresponden a las subfracciones G5-6 y G4-1.3-1, se observó la señal de 73.9 minutos. De la fracción G4-1.3-1, se adquirió el espectro de masas de la señal (figura 29). Se observa un pico base a  $m/z$  de 397 y un ion molecular a  $m/z$  de 412. Además se observa el pico a  $m/z$  de 191, la cual es característica del fragmento presentado en la figura 30. Los picos a  $m/z$  43 y 369 indican un grupo isopropil.



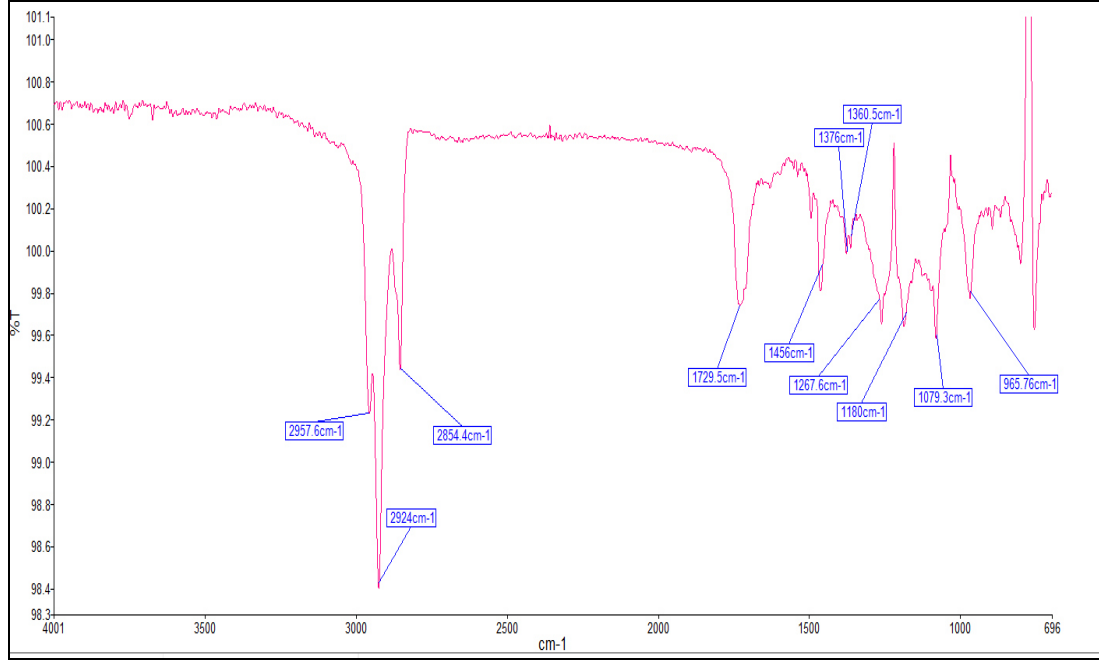
**Figura 29** Espectro de masas de la señal a 73.9 minutos.



**Figura 30** Fragmento propuesto para el ion de m/z 191.

El espectro de infrarrojo observado en la figura 31 muestra bandas características a 2854 y 1729  $\text{cm}^{-1}$ , las cuales pueden indicar un grupo aldehído.

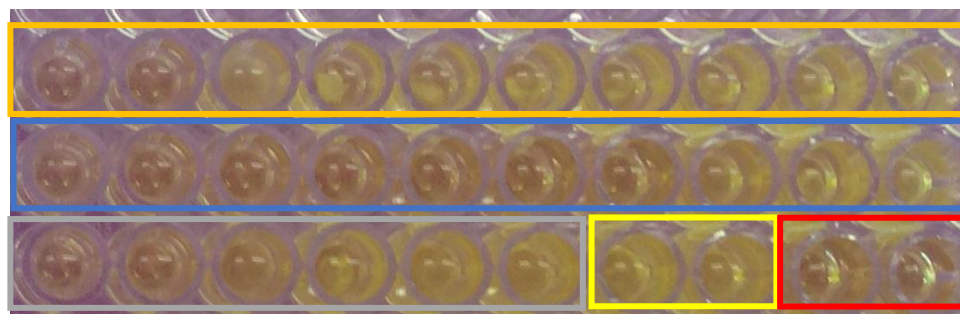




**Figura 31** Espectro de infrarrojo de la muestra G4-1.3-1.

#### **4.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las fracciones activas obtenidas**

La CMI de 43 de las fracciones activas identificadas por bioautografía, se determinó en base a la presencia o ausencia de turbidez en los pocillos (sección 3.2.4.4). Los resultados de los controles se muestran en la figura 32 y corresponden a lo descrito en la tabla 6. Los resultados de las fracciones se muestran en la tabla 7.



**Figura 32** Controles empleados en las microplacas. (Control de Oxacilina: cuadro naranja; Control de Vancomicina: cuadro azul; Control de Solvente: Cuadro gris; Control de Crecimiento: Cuadro amarillo; Control de Esterilidad: Cuadro rojo).

**Tabla 6** Resultado de los controles empleados.

<b>Control</b>	<b>Resultado</b>
Oxacilina	CMI de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Vancomicina	CMI de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Solvente DMSO	Turbidez
Esterilidad	Ausencia de turbidez
Crecimiento	Turbidez

**Tabla 7** Concentración Mínima Inhibitoria de las fracciones evaluadas.

Muestra	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )
Acetato de etilo	31.25
Diclorometano	15.63
D	7.81
E	7.81
F	7.81
G	31.25
D3	62.50
E3	62.50
F3	31.25
G2	31.25
G2-3	insuficiente
G2-4	250.00
G2-5	125.00
G2-6	31.25
G2-7	31.25
G2-8	7.81
G2-9	62.50
G2-10	7.81
G2-11	62.50
G2-12	62.50
G3	62.50
G4	insuficiente

Muestra	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )
G4-1.3	insuficiente
G4-1.3-36	insuficiente
G4-1.3-M	insuficiente
G4-15	31.25
G5	1.95
G5-4	15.63
G5-5	31.25
G5-6	62.50
G5-7	7.81
G5-8	31.25
G5-9	31.25
G5-10	insuficiente
G5-11	7.81
G5-12	15.63
G5-13	31.25
G5-14	7.81
G5-15	15.63
G5-16	insuficiente
G6	3.91
G6-11	15.63
G6-12	125.00

\*Insuficiente: No hay muestra para repetir ensayo

#### 4.5 Determinación de la Citotoxicidad de las fracciones con menor CMI

Se determinó la  $CC_{50}$  en células Vero de las fracciones, que tuvieran menores valores de CMI (tabla 7) y una buena cantidad de muestra (mayor a 4 mg). Así mismo, se determinó el índice de selectividad como se describe en la sección 3.2.5. Los resultados de  $CC_{50}$  y la CMI se muestran en la tabla 8.

**Tabla 8** Concentración Citotóxica Media, Concentración Mínima Inhibitoria e Índice de Selectividad de las fracciones evaluadas.

<b>Muestra</b>	<b>CC<sub>50</sub> ± Desv. Est. µg/mL</b>	<b>CMI µg/mL</b>	<b>Índice de Selectividad</b>
Acetato de etilo	515.38 ± 119.73	31.25	16.49
Diclorometano	280.44 ± 43.16	15.63	17.94
D	302.04 ± 18.75	7.81	38.67
E	>1000	7.81	>128.04
F	>1000	7.81	>128.04
F3	209.13 ± 34.26	31.25	6.69
G	>1000	31.25	>32.00
G2-6	513.69 ± 29.89	31.25	16.44
G2-8	214.56 ± 9.55	7.81	27.47
G2-10	245.76 ± 35.19	7.81	31.47
G5-9	201.15 ± 23.67	31.25	6.44
G6	221.97 ± 26.31	3.91	56.77

## CAPÍTULO 5

### DISCUSIÓN

En este trabajo se investigó la actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* del árbol comúnmente conocido como Anacahuita (Nombre científico: *Cordia boissieri*), está se encuentra en gran parte del territorio de Nuevo León, por lo que el acceso a ella es realmente sencillo (Alanís-Flores y cols., 1996).

*Cordia boissieri* cuenta a su vez con antecedentes etnofarmacológicos, es empleada para afecciones de tipo respiratorio desde un catarro hasta una tuberculosis, lo cual sugiere la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana. También se cuentan con reportes que muestran que *C. boissieri* presenta actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* (Molina Salinas y cols., 2007).

La mayoría de las infecciones bacterianas, independientemente de cuál sea el agente causal, suelen requerir de tratamiento farmacológico. Lamentablemente debido a su uso indiscriminado, ha ido en aumento la

aparición de cepas resistentes a los antimicrobianos de uso común. En el caso de *S. aureus*, más del 90% de las cepas son resistentes a las penicilinas, que es el tratamiento de elección ante una enfermedad de tipo respiratorio. Esta resistencia a fármacos motivó el desarrollo e introducción de la meticilina. En la actualidad la meticilina no es empleada debido a sus efectos secundarios y es sustituida por fármacos de la misma familia como oxacilina, nafcilina y dicloxacilina. Posteriormente se observó la aparición de las cepas MRSA o resistentes a meticilina (y a los fármacos de la misma familia), además de cepas nombradas como VRSA o resistentes a vancomicina que es el antibiótico de última elección ante una infección por cepas MRSA. Esto ha generado como necesidad urgente de salud obtener nuevos antibióticos efectivos para tratar este tipo de infecciones (Ausina Ruíz y cols., 2006, Skov y cols., 2009; Li-Ping y cols., 2014).

Para este trabajo se utilizó el extracto de acetato de etilo obtenido de hojas de *C. boissieri*, de una colecta del 2013, este extracto fue obtenido y resguardado en congelación. Al inicio de este trabajo se confirmó su actividad frente a *S. aureus*.

El seguimiento de la actividad antibacteriana de *C. boissieri* se realizó con la técnica de bioautografía de superposición del agar. Esta técnica permitió seleccionar las fracciones y sub-fracciones que inhibían a *S. aureus*, es decir, las fracciones que contenían los compuestos activos. Esta técnica ha sido ampliamente usada como *screening* o búsqueda rápida de compuestos activos

para actividad antifúngica y antibacterial, entre los microorganismos evaluados se encuentra *Staphylococcus aureus* (Choma, y col., 2011; Marston, 2011).

La técnica de bioautografía permite determinar la actividad antimicrobiana como patrones de inhibición del crecimiento. Aunque la inhibición es apreciable a simple vista, se utilizó el reactivo de MTT como revelador para evidenciar el crecimiento de la bacteria en fondo oscuro.

Una vez demostrada la actividad antimicrobiana del extracto de acetato de etilo de hojas de *C. boissieri*, se realizó la extracción líquido-líquido, primero se disolvió el extracto en metanol y se utilizó diclorometano como disolvente orgánico. Se obtuvo un porcentaje de recuperación del 90.6% para la fracción orgánica. En base a los resultados obtenidos en la bioautografía correspondiente (figura 3), en la fracción orgánica están presentes los compuestos con actividad antibacteriana. La fracción orgánica fue denominada como Diclorometano.

La fracción Diclorometano fue posteriormente fraccionada por cromatografía de exclusión molecular, con Sephadex como fase estacionaria y metanol al 100% como fase móvil. Se obtuvieron doce fracciones denominadas como A a la L y se observó en la correspondiente bioautografía que únicamente presentaron actividad frente a *S. aureus*, cuatro de las doce fracciones. Las cuatro fracciones activas fueron denominadas como D, E, F y G.

Un segundo paso de separación fue extracción en fase sólida, esto con la finalidad de eliminar las clorofilas presentes en el extracto, aunque esto no fue posible, si se logró fraccionar los diferentes componentes de los extractos. Este paso separativo se realizó a las fracciones activas D, E, F y G, obteniendo de cada una de estas siete sub-fracciones. Al realizar la bioautografía se observó que en cada una de ellas, las sub-fracciones 2 a 6 presentaban inhibición del crecimiento. Es decir, las veinte fracciones correspondientes a D2 a D6, E2 a E6, F2 a F6 y G2 a G6, contienen compuestos con actividad antibacteriana.

De las veinte fracciones activas obtenidas en el paso anterior, se seleccionaron las derivadas de G2 a G6 para proseguir con su fraccionamiento, debido a que los compuestos activos se encuentran en un Rf bajo. Las manchas observadas estaban cercanas al origen de siembra de muestra a diferencia de las manchas no activas con un Rf mayor. Cabe mencionar que, a pesar de que la cantidad de muestra en cada sub-fracción era baja, se pudo observar su actividad en la bioautografía (figura 13).

Para el tercer paso de separación se utilizó CC de sílica gel gravitacional. Se realizan pruebas en CCF para seleccionar el sistema de eluentes que permitiera una mejor separación de los componentes en una fracción, y posteriormente extrapolar las condiciones a la CC. Este procedimiento únicamente se realizó a las fracciones G2, G4, G5 y G6, ya que fueron las que presentaron un menor número de manchas (compuestos) en la CCF (figura 14). La fracción G3 fue descartada, esto por no presentar actividad al repetir el ensayo en



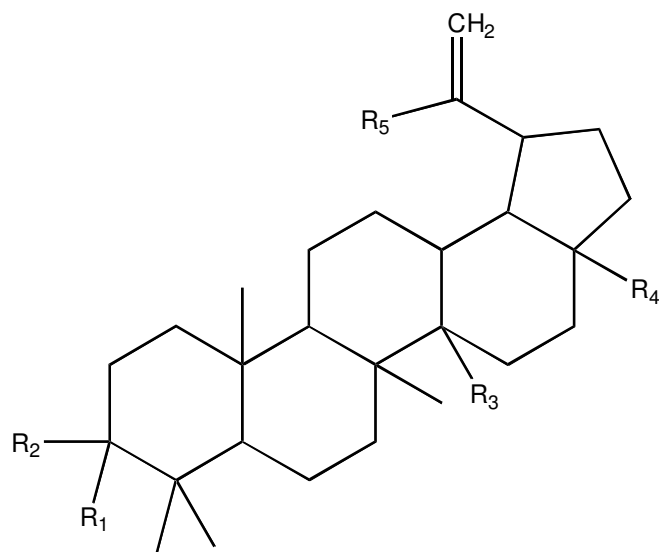
bioautografía. Para las CC, inicialmente se probaron varios sistemas de eluentes, y se determinó que con el sistema etanol:acetato de etilo (15:85) se obtenía una mejor separación de manchas permitiendo una fácil identificación.

Para la fracción G4 se obtuvieron dos fracciones activas (G4-1.3 y G4-15), de una de las cuales se realizó una segunda CC y se obtuvieron cuatro fracciones activas (G4-1.3-1, G4-1.3-23, G4-1.3-36, G4-1.3-M). Para la fracción G2 se obtuvieron diez fracciones activas (G2-3 a G2-12). Para la fracción G5 se obtuvieron 13 fracciones activas (G5-4 a G5-16). Y para la fracción G6 únicamente se obtuvieron dos fracciones activas (G6-11 y G6-12). Debido a que la cantidad de muestra de cada fracción era muy baja (menor a 10 mg para cada una), no fue posible realizar más pasos separativos. Es decir, los componentes activos presentan una baja recuperación, lo que hace difícil su aislamiento.

En resumen, se obtuvieron un total de 56 fracciones activas derivadas del extracto inicial de acetato de etilo, y debido a la baja recuperación no fue posible proseguir con un aislamiento. Sin embargo, de estas fracciones se seleccionaron veinte de ellas que presentaban una CCF con menor número de manchas para ser analizadas por CG/MS y seleccionar aquellas que presentaran un menor número de picos para su análisis espectroscópico.

En el cromatograma obtenido por CG/MS, las fracciones G5-6 y G4-1.3-1 mostraron un pico a 73.93 minutos (figuras 19 y 20). Para la obtención de la

estructura química del compuesto, se adquirió el espectro de masas (figura 29). El pico a 73.93 minutos corresponde a un compuesto de peso molecular 412 g/mol y fórmula molecular  $C_{29}H_{48}O$ , con un pico base de m/z 397. El pico a m/z de 191, es característico del fragmento indicado en la figura 30 y los picos a m/z 43 y 369 indican un grupo isopropilo. Además el espectro infrarrojo indica bandas características a 2854 y 1729  $cm^{-1}$ , las cuales pueden indicar un grupo aldehído. Los espectros de RMN no dieron señales adecuadas. Los datos espectroscópicos son inconcluyentes para definir la estructura química del compuesto de tiempo de retención de 73.93 minutos, pero es posible en base a las características de infrarrojo y masas, además de los antecedentes bibliográficos sugerir un compuesto de tipo terpeno y definirlo como un lupano cuya estructura base se observa en la figura 33. Sin embargo, faltaría definir los grupos funcionales de R1 a R5 para poder concluir la estructura del compuesto. En este trabajo no fue posible concluir que dicho compuesto es el responsable de la actividad antimicrobiana de las fracciones analizadas, esto porque no correspondían a compuestos puros. Sin embargo, existen antecedentes que indican que compuestos de tipo lupano aislados de otras especies de *Cordia*, presentan actividad frente a *S. aureus*. (Pérez-López, L.A., 2007; Gallo, M.B.C. y col., 2009; Rushdi, A. y cols., 2014).



**Figura 33** Estructura base de un compuesto de tipo lupano.

A pesar de que una parte importante de este trabajo es el aislamiento biodirigido de compuestos con actividad biológica frente a *S. aureus*, no se logró obtener un compuesto puro activo. Sin embargo, se logró purificar un compuesto a partir de la fracción H derivada de la fracción Diclorometano. Dicho compuesto no presentó actividad en la bioautografía, pero se encontró en buena concentración, con un  $R_f$  de 0.65 en CCF con el sistema de eluentes diclorometano:metanol en proporción 19:1 y de aparente fácil purificación. Debido a lo anterior se decidió aislarlo por CC gravitacional de Sílica Gel con el sistema de eluentes antes mencionado, y se obtuvieron 7 mg del compuesto puro, y se identificó como M081214. Posteriormente se analizó por medio de CG/MS, en donde se observó un pico cromatográfico a 82.1 minutos con un buen grado de pureza, con una masa de 314 g/mol correspondiente a una fórmula molecular de  $C_{17}H_{14}O_6$ . Además se obtuvieron los espectros de RMN de  $^1H$ -RMN,  $^{13}C$ -RMN, DEPT-135, HMBC, HMQC y COSY. El conjunto de los

datos espectroscópicos analizados nos indica que el compuesto corresponde al Dimetoxi-3,4'-Kaempferol, cuya estructura se muestra en la figura 28. Este compuesto fue aislado previamente de *C. boissieri* por Domínguez, X.A. en 1973, sin embargo no hay antecedentes de reporte sobre su actividad. En nuestro estudio se evaluó su actividad antibacteriana frente a *S. aureus* por medio de bioautografía de superposición del agar, encontrando que dicho compuesto no presentaba actividad.

Además de las 56 fracciones activas por bioautografía de superposición del agar, se evaluó la concentración mínima inhibitoria de 43 de éstas que corresponden al extracto inicial de Acetato de etilo, Fracción Diclorometano, las fracciones activas obtenidas de Exclusión Molecular, las derivadas de Fx G, y también D3, E3 y F3.

La CMI se obtuvo por medio de la técnica de microdilución en caldo mediante el protocolo del manual NCCLS del CLSI.

Las CMI evaluadas de las muestras fueron entre 0.061 y 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sin embargo, por el antecedente de la planta, donde el extracto de acetato de etilo presentó una actividad de 7.81  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Salazar-Favela, P., 2014), se esperaba una mejor actividad con los pasos de fraccionamiento sucesivo. Además de este antecedente de buena actividad en un extracto con el mismo disolvente, se reportó que un extracto etanólico de hojas de esta planta presentaron una CMI

de 125 µg/mL (Salazar-Aranda, R. y cols., 2011) y en un extracto metanólico una CMI de 250 µg/mL (Molina-Salinas, G.M. y cols., 2007).

Aunque las 43 fracciones presentaron actividad frente a la cepa de *S. aureus* en bioutografía de superposición del agar (tabla 7), no fue posible determinar la CMI de siete de ellas debido a la escasa cantidad de muestra que se obtuvo.

Para categorizar la actividad antimicrobiana de las fracciones como buena, otra forma es en base a los controles de antibióticos. El control de antibiótico para evaluar la resistencia farmacológica de la cepa MRSA fue la Oxacilina, la cual posee una CMI de 32 µg/mL y para la sensibilidad farmacológica fue la Vancomicina, de la que se obtuvo una CMI de 2 µg/mL. En base a los valores de los controles, se puede catalogar a una fracción con buena actividad como aquella que presente un valor menor o similar a la Oxacilina, y como muy buena actividad a una fracción que presente un valor menor o similar a la Vancomicina.

El valor para considerar que un compuesto o fracción posee una buena actividad, no ha sido uniformizado en la literatura, sin embargo Mohd-Shahid y cols. del 2013, clasifican como plantas medicinales con actividad antimicrobiana a aquellas que presentaran un valor igual o menor a 500 µg/mL. En base a este valor de corte, 37 de las fracciones (incluido el extracto original) presentan una buena actividad por poseer un valor menor a 500 µg/mL.

Por lo anterior, veintiséis de las fracciones obtenidas presentaron buena actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* resistente a Oxacilina (tabla 7), todas ellas con valores menores o iguales a 31.25 µg/mL. De estas veintiséis fracciones, la fracción G5 presentó muy buena actividad con un valor de CMI de 1.95 µg/mL, que corresponde a una actividad 16 veces menor a la Oxacilina y a una actividad similar a la Vancomicina de 2 µg/mL.

Se pudo observar que la actividad antimicrobiana (CMI) de las fracciones aumentó en algunos casos y disminuyó en otros con los pasos separativos. Por ejemplo, se observa una clara sinergia en las fracciones G5, debido a que la actividad disminuyó considerablemente al someterla a fraccionamiento, lo cual indica que los compuestos participan entre ellos para inhibir al microorganismo.

Por último se decidió evaluar la citotoxicidad que presentaban las fracciones con menor CMI y de cantidad suficiente para llevar a cabo esta evaluación. Debido a lo anterior, se evaluaron catorce fracciones de las cuales se obtuvieron doce con una concentración citotóxica media superior a 200 µg/mL, con lo que los índices de selectividad obtenidos son mayores a 6 (tabla 8). No se cuenta con un antecedente de evaluación de citotoxicidad con la línea celular VERO, por lo que no es posible hacer una comparación real. Pero en el estudio de Salazar-Favela, P. 2014 se evaluó la citotoxicidad utilizando la línea celular HepG2 para el extracto de acetato de etilo y obtuvieron un valor de 401 µg/mL, lo cual es similar al valor obtenido en nuestro estudio que es de  $515.38 \pm 119.73$  µg/mL.

## CAPÍTULO 6

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

#### 6.1 Conclusiones

- El fraccionamiento biodirigido del extracto de acetato de etilo de hojas de *Cordia boissieri* en conjunto con la técnica de bioautografía en superposición del agar, permitió obtener 56 fracciones activas frente a *Staphylococcus aureus* resistente a Oxacilina.
- La CMI del extracto de acetato de etilo de hojas de *Cordia boissieri* es de 31.25 µg/mL para la cepa resistente de *Staphylococcus aureus*, este valor es similar al obtenido para la Oxacilina de 32 µg/mL.
- Se obtuvieron 26 fracciones con CMI igual o menor a 31.25 µg/mL para la cepa resistente de *Staphylococcus aureus*.

- La fracción denominada como G5 presentó una CMI de 1.95 µg/mL, lo cual es 16 veces menor al valor de Oxacilina y similar al obtenido para la Vancomicina de 2 µg/mL.
- Se presentaron doce fracciones con un índice de selectividad mayor a 6, lo cual indica una buena relación entre la CMI y la citotoxicidad.
- Las fracciones G5-6 y G4-1.3-1 presentaron un compuesto de tipo terpeno, el cual es probablemente el responsable de la actividad antimicrobiana de dichas fracciones, sin embargo, no se logró elucidar su estructura.
- Se aisló el compuesto Dimetoxi-3,4'-kaempferol previamente reportado por Domínguez, X.A. (1973), sin embargo no presentó actividad contra *Staphylococcus aureus*.

## 6.2 Perspectivas

- Realizar la elucidación estructural del compuesto de tipo terpeno (posible lupano).
- Aislar los componentes que presentaron actividad contra *Staphylococcus aureus* de las diferentes fracciones de *Cordia boissieri*.



- Evaluar sí los componentes activos de *Cordia boissieri* son bactericidas o bacteriostáticos frente a *Staphylococcus aureus*.
- Realizar el fraccionamiento biodirigido de las fracciones de *Cordia boissieri* contra otros microorganismos o diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*.
- Evaluar otras actividades biológicas de extractos derivados de *Cordia boissieri*.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1) Ausina-Ruíz, V. y Moreno-Guillén, S. *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Editorial Médica Panamericana. Madrid, 2006.
- 2) Alanís-Flores, G.J., Cano-Cano, G. y Rovalo-Merino, M. *Vegetación y flora de Nuevo León. Una guía botánico-ecológica*. Editorial CEMEX. México, 1996.
- 3) Alanís, A.D., Calzada, F., Cervantes, J.A., Torres, J. y Ceballos, G.M. «*Antibacterial properties of some plantas used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders.*» *Journal of Ethnopharmacology*, 2005: 153-157.
- 4) Bringmann, G., Lang, G., Steffens, S, Günther, E. y Schaumann, K. «*Evariquinone, isoemericellin, and stromemycin from a sponge derived strain of the fungus Emericella varicolor.*» *Journal of Phytochemistry*, 2003: 437-443.
- 5) Chauhan, M.C., Chavan, S.S. «*Pharmacognosy and biological activity of Cordia rothii Roem. & Schult. bark.*» *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 2009: 598 - 601.

- 6) Choma, I.M. y Grzelak, E.M. «*Bioautography detection in thin-layer chromatography.*» Journal of Chromatography A, 2011: 2684-2691.
- 7) Ciesla, L. y Waksmundzka-Hajnos, M. «*Two-dimensional thin-layer chromatography in the analysis of secondary plant metabolites.*» Journal of Chromatography A, 2009: 1035-1052.
- 8) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. NCCLS: CLSI document. USA, 2007.
- 9) Coello, R., Glynn, J.R., Gaspar, C., Picazo, J.J., Fereres, J. «*Risk factors for developing clinical infection with methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) amongst hospital patients initially only colonized with MRSA.*» Journal of Hospital Infection, 1997: 39 - 46.
- 10) Cona, E. «*Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar.*» Revista Chilena de Infectología, 2002: 77-81.
- 11) CONAPO (Consejo Nacional de Población), *Ganancia en la esperanza de vida 1990-2012 y principales causas de muerte 2012, en México y las entidades federativas.* <http://www.conapo.gob.mx/en/CONAPO/Mortalidad> (Consultado el 27 de Octubre de 2014).

- 12) De Carvalho Jr., P.M., Rodrigues, R.F.O., Sawaya, A.C.H.F., Marques, M.O.M. y Shimizu, M.T. «*Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil Cordia verbenacea D.C.*» Journal of Ethnopharmacology, 2004: 297-301.
- 13) Di Bonaventura, G., D'Antonio, D., Catamo, G., Ballone, E. y Piccolomini, R. «*Comparision of Etest, agar dilution, broth microdilution and disk diffusion methods for testing in vitro activity of levofloxacin against Staphylococcus spp. isolated from neutropenic cancer patients.*» International Journal of Antimicrobial Agents, 2002: 147-154.
- 14) Domig, K.J., Mayrhofer, S., Zitz, U., Mair, C., Peterson, A., Amtmann, E., Mayer, H.K. y Kneifel, W. «*Antibiotic susceptibility testing of Bifidobacterium thermophilum and Bifidobacterium pseudolongum strains: Broth microdulition vs. agar disc diffusion assay.*» International Journal of Food Microbiology, 2007: 191 – 195.
- 15) Domínguez, X.A. «*Métodos de Investigación Fitoquímica.*» Editorial Limusa. México, 1988.
- 16) Domínguez, X.A. «*Dimethyl-3,4'-kaempferol de Cordia boissieri.*» Phytochemistry, 1973, Vol. 12. 724-725

- 17) Galbis-Pérez, J.A. *Panorama actual de la química farmacéutica*. Primera Edición. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla. España, 2000.
- 18) Gallo, M.B.C., Sarachine, M.J. «*Biological Activities of Lupeol.*» International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, 2009: 46 – 66.
- 19) Garza-González, E., Dowzicky, M.J. «*Changes in Staphylococcus aureus susceptibility across Latin America between 2004 and 2010.*» The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2013: 13 – 19.
- 20) Hanberger, H., Walther, S. «*Increased mortality associated with methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infection in the Intensive Care Unit: results from the EPIC II study.*» International Journal of Antimicrobial Agents, 2011: 331 – 335.
- 21) Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S. y Williamson, E.M. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Segunda Edición. Editorial Churchill Livingstone Elsevier. 2012.
- 22) Hernández, T., Canales, M., Tera, B., Ávila, O., Duran, A. García, A.M., Hernández, H., Ángeles-López, O., Fernández-Araiza, M. y Ávila, G. «*Antimicrobial activity of the essential oil and extractas of Cordia*

- curassavica (Boraginaceae).*» Journal of Ethnopharmacology, 2007: 137-141.
- 23) Hoefnagels, A., Borremans, A., Peetermans, W. «*Origin and transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in an endemic situation: differences between geriatric and intensive-care patients.*» Journal of Hospital Infection, 1997: 209 – 222.
- 24) Peters, K.E., Walters, C.C., Moldowan, J.E. *The Biomarker Guide*. Vol. 2. Biomarkers and isotopes in petroleum systems and Earth History. Editorial Cambridge. Reino Unido, 2005. P.p. 538 – 579.
- 25) Li-Ping, K., Jung-Chung, L., Sheng-Kang, C., Yeng-Chen, Y., Te-Yu, L., Ya-Sung, Y., Yung-Chih, W., Ning-Chi, W., Kuo-Ming, Y. y Feng-Yee, C. «*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia in hemodialysis and nondialysis patients.*» Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 2014: 15-22.
- 26) MacFaddin, J.F. «*Pruebas bioquímicas para la Identificación de bacterias de importancia clínica.*» Editorial Médica Panamericana. 2000.
- 27) Marston, A. «*Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry.*» Journal of Chromatography A, 2011: 2676-2683.

- 28) Michielin, E.M.Z., Salvador, A.A., Riehl, C.A.S., Smania Jr., A., Smania, E.F.A. y Ferreira, S.R.S. «*Chemical composition and antibacterial activity of Cordia verbenacea extracts obtained by different methods.*» Bioresource Technology, 2009: 6615-6623.
- 29) Molina-Salina, G.M., López-Pérez, L.A., Becerril-Montes, P., Salazar-Aranda, R., Said-Fernández, S. y Waksman de Torres, N. «*Evaluation of the flora of Northern Mexico for in vitro antimicrobial and antituberculosis activity.*» Journal of Ethnopharmacology, 2007: 435-441.
- 30) More, G., Tshikalange, T.E., Lall, N., Botha, F., Meyer, J.J.M. «*Antimicrobial activity of medicinal plantas against oral microorganisms.*» Journal of Ethnopharmacology, 2008: 473 – 477.
- 31) Mosmann, T. «*Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays.*» Journal of Immunological Methods, 1983: 55-63.
- 32) Mutai, C., Bii, C., Abatis, D., Roussis, V. «*Antimicrobial activity of Acacia mellifera extracts and lupane triterpenes.*» Journal of Ethnopharmacology, 2009: 143 - 148.

- 33) Nogueira, R.T., Shepherd, G.J., Laverde Jr., A., Marsaioli, A.J. y Imamura, P.M. «*Clerodane-type diterpenes from the seed pods of Hymenaea courbaril var. stilbocarpa.*» Journal of Phytochemistry, 2001: 1153-1157.
- 34) Nogueira, T., Silva, D., Tavares, J. «*First Chemical Constituents from Cordia exaltata Lam and Antimicrobial Activity of Two Neolignans.*» Molecules, 2013: 11086 – 11099.
- 35) Okusa, P.N., Penge, O., Devleeschouwer, M. y Duez, P. «*Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of Cordia gillettii De Wild (Boraginaceae).*» Journal of Ethnopharmacology, 2007: 476-481.
- 36) Owis, A.I. «*Composition of essential oil from flowers of Cordia Boissieri A.DC. and revision on the use of sesquiterpenes as taxonomic markers for genus Cordia.*» World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2014: 133-141.
- 37) Passos, G.F., Fernandes, E.S., Cunha, F.M. «*Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from Cordia verbenacea.*» Journal of Ethnopharmacology, 2007: 323 – 333.
- 38) Pérez-López, L.A. «*Aislamiento y caracterización de compuestos de plantas del noreste de México con actividad contra cepas de Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus y Haemophilus influenzae.*» Tesis de



doctorado en Química Biomédica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, 2005.

- 39) Ramírez-Durón, R. «*Obtención de derivados funcionales de la peroxisomicina A1.*» Tesis de doctorado en Química Biomédica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, México, 1998.
- 40) Rapisarda, A., Lauk, L. y Ragusa, S. «*Micromorphological study on leaves of some Cordia (Boraginaceae) species used in traditional medicine.*» *Economic Botany*, 1997: 385-391.
- 41) Salazar-Aranda, R., Pérez-López, L.A., y Waksman, N. *Antimicrobial and antioxidant activities of plants from Northeast of Mexico.* *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011.
- 42) Salazar-Favela, P. «*Actividad antibacteriana de Cordia boissieri, Schinus molle y Chrysactinia mexicana sobre E. coli O157 H7, L. monocytogenes, S. aureu, S. typhimurium.*» Tesis de Licenciatura en Médico Veterinario, Universidad Autónoma de Nuevo León, México, 2014.
- 43) Sarker, S.D., Latif, Z. y Gray, A.I. *Natural Products Isolation.* Segunda Edición. Editado por Sarker, S.D. *Methods in biotechnonology* Volumen 20. Editorial Humana Press. New Jersey, 2006.

- 44) Shahid, M., Shahzad, A., Malik, A. y Shaid, A. *Recent trends in biotechnology and therapeutic applications of medicinal plants*. Editorial Springer. 2013.
- 45) SINAIS (Sistema Nacional de Información en Salud), 2008. <http://www.sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.html> (Consultado el 18 de Abril de 2014).
- 46) Silva-Mares, D. «*Aislamiento biodirigido de compuestos con actividad antiviral contra VHS-1 y VHS-2 a partir de plantas del Noreste de México.*» Tesis de doctorado en Química Biomédica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, México, 2012.
- 47) Skov, R.L., y Jensen, K.S. «*Community-associated meticillin-resistant Staphylococcus aureus as a cause of hospital-acquired infection.*» *Journal of Hospital Infection*, Septiembre 2009: 364-370.
- 48) Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J. y Kowalska, T. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. Editado por Cazes, J. Vol. Chromatographic Science Series 99. Editorial CRC Press Taylor & Francis Group. USA & Poland, 2008.

- 49) Waldstein, A. «*Mexican migrant ethopharmacology: Pharmacopeia, classification of medicines and explanations of efficacy.*» *Journal of Ethnopharmacology*, 2006: 299-310.
- 50) Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada-Pérez, L., López-Villafranco, E., Estrada-Muñiz, E., Aguilar, A. y Reyes-Chilpa, R. «*Antibacterial activity of crude extractas from Mexican medicinal plantas and purified coumarins and xanthones.*» *Journal of Ethnopharmacology*, 2005: 293-299.

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Irene Guadalupe Rodríguez Valencia

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Química Biomédica

**Título de Tesis:** OBTENCIÓN DE FRACCIONES Y/O AISLAMIENTO DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA CEPAS DE *Staphylococcus aureus* A PARTIR DE *Cordia boissieri*.

**Área de Estudio:** Química Biomédica

### **Biografía:**

**Datos Personales:** Nacida en Monterrey, Nuevo León, el 30 de octubre de 1989, hija de Irene Valencia Pantoja y Roberto Rodríguez Oviedo.

**Educación:** Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, de la Facultad de Medicina con el grado obtenido de Químico Clínico Biólogo.

**Experiencia profesional:** Química Analista en OCA Hospital, Monterrey, Nuevo León durante Octubre de 2011 a Abril de 2012. Perito Químico en el Laboratorio de Química Forense del Instituto de Criminalística y Servicios Periciales de la PGJ de Nuevo León durante Mayo de 2012 a Agosto de 2014.