

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE  
COMPUESTOS DE PLANTAS DEL NORESTE DE  
MEXICO CON ACTIVIDAD CONTRA CEPAS DE**  
*Sterptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus*  
*y Haemophilus influenzae*

**Por**

**M.C. LUIS ALEJANDRO PEREZ LOPEZ**

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS** con Especialidad en  
**Química Biomédica**

**ABRIL, 2005**

TD

QR201

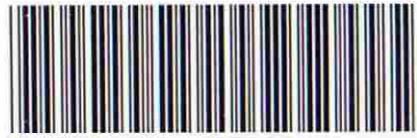
.P7

P4

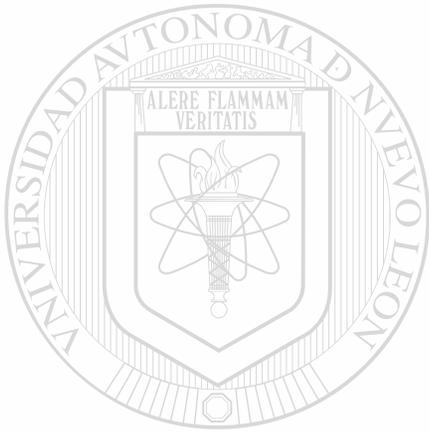
2005

c.1

**M.C. LUIS ALFJANIDRO PEREZ LOPEZ**



1080127138



# UANL

---

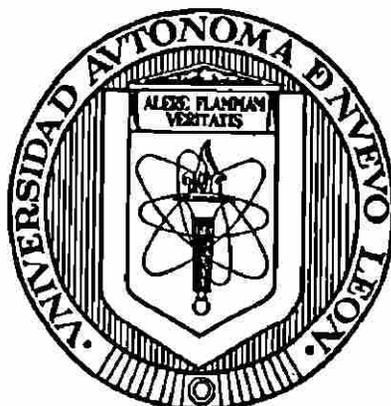
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS DE PLANTAS  
DEL NORESTE DE MÉXICO CON ACTIVIDAD CONTRA CEPAS DE**  
*Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus*  
*y Haemophilus influenzae*

Por

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS  
**M.C. LUIS ALEJANDRO PÉREZ LÓPEZ**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad  
en Química Biomédica**

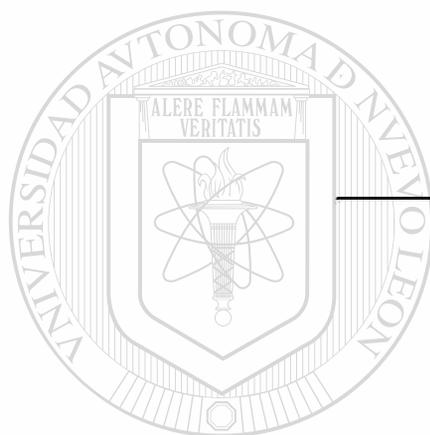
**Abril, 2005**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS DE PLANTAS  
DEL NORESTE DE MÉXICO CON ACTIVIDAD CONTRA CEPAS DE  
*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae***

**Aprobación de Tesis:**



**DRA. NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES**  
Directora de Tesis



**M.C. POLA BÉCERRIL MONTES**  
Co-Directora de Tesis

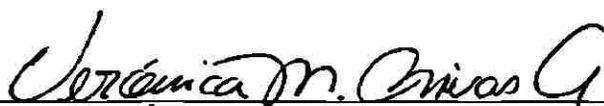


**DRA. AZUCENA ORANDAY CÁRDENAS**  
Co-Directora de Tesis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**DR. SALVADOR SAID FERNÁNDEZ**  
Comisión de Tesis



**DRA. VERÓNICA MAYELA RIVAS GALINDO**  
Comisión de Tesis



**DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

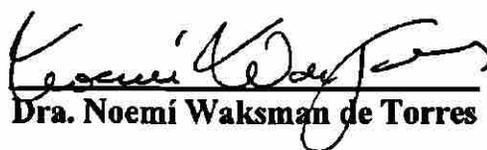
**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS DE PLANTAS  
DEL NORESTE DE MÉXICO CON ACTIVIDAD CONTRA CEPAS DE  
*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*  
y *Haemophilus influenzae***

**Presentado por:**

**M.C. Luis Alejandro Pérez López**

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS, bajo la dirección de la Dra. Noemí Waksman de Torres y la Co-dirección de la M.C. Pola Becerril Montes y la Dra. Azucena Oranday Cárdenas

**DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS  
DIRECTORA**

  
Dra. Noemí Waksman de Torres

**Co-DIRECTORA**

  
M.C. Pola Becerril Montes

**Co-DIRECTORA**

  
Dra. Azucena Oranday Cárdenas

## DEDICATORIA

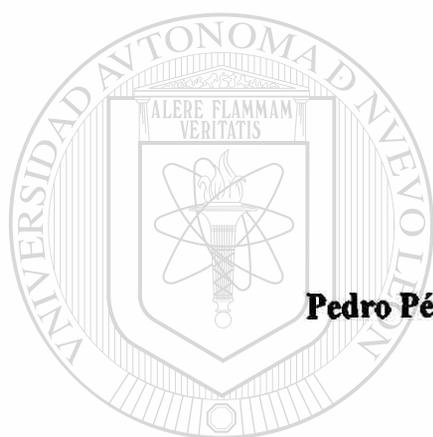
**Dedico esta tesis con cariño**

**A mis Padres**

**Pedro Pérez Gutiérrez y Ma. Alicia López Costilla**

**y**

**A mis hermanos**



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## AGRADACIEMIENTOS

**A Dios**

Por guiarme en todos sus caminos y por enseñarme un poco de su grandeza mostrada a través de la naturaleza.

**A mis Padres Pedro Pérez Gutiérrez y Ma. Alicia López Costilla** por todo el apoyo que me han dado durante toda mi vida y por impulsarme a estudiar y a seguir creciendo.

**A la Dra. Noemí Waksman de Torres** por ser un importante pilar en mi formación como estudiante de posgrado, primero durante la Maestría y posteriormente durante el Doctorado. También por su influencia en mi formación como profesional y finalmente por su valiosa dirección durante el desarrollo de este trabajo.

**A la M.C. Pola Becerril Montes** por aceptar formar parte de este trabajo y por su excelente asesoría en la parte del rastreo de actividad antimicrobiana y la revisión de escritura de este trabajo.

**A la Dra. Azucena Oranday Cárdenas** por su valiosa asesoría en la parte de bioensayos de bioautografías y en la revisión de escritura en esta investigación.

**Al Dr. Salvador Said Fernández** por permitirme desarrollar gran parte de esta investigación en las instalaciones del CIBIN-IMSS y por su colaboración en la revisión de escritura de este trabajo.

**A la Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo** por su colaboración especial en realización de espectroscopia de resonancia magnética nuclear y en la revisión de la escritura de esta tesis.

**Al Dr. Ricardo Salazar Aranda** por sus sugerencias en el desarrollo de la investigación y por su apoyo en la revisión de este trabajo.

**A la Dra. Gloria María Molina Salinas** por la valiosa ayuda en la colecta de plantas y extracción que realizamos en colaboración durante el desarrollo de nuestros trabajos de tesis

**Al Dr. Adolfo Caballero Quintero** por la ayuda brindada en la realización de espectroscopia de infrarrojo y análisis por masas de algunas muestras

**Al Biol. Humberto Sánchez** por su asesoría en la ubicación de plantas durante la colecta de plantas.

**Al Biol. Marcos Guzmán Lucio y la M.C. María del Consuelo González de la Rosa por la herborización de los especímenes colectados y la Dirección del Herbario de la Facultad de Ciencias biológicas de la U.A.N.L. por recibir un espécimen de cada planta en dicho herbario.**

**A la Tec. Laboratorista Ivonne Carrera por su asesoría durante mi estancia en el laboratorio de extracción del Depto. de Química Analítica.**

**A la Dra. Yareli Colunga González por su amistad y su agradable compañía durante todo el estudio de posgrado.**

**A los estudiantes de Químico Clínico Biólogo José Emigdio Soto González y Eloy Catillo Sandoval por su apoyo durante todo el desarrollo de este trabajo.**

**A la Q.B. P. Lucia Cenicerros Almaguer por apoyarme durante la colecta de plantas y por su apoyo técnico.**

**A todos los alumnos de posgrado que estuvieron durante mi estancia en el laboratorio de extracción.**

**A las secretarías del Depto. de Química Analítica Gloria Martínez , Martha García y Verónica Camarillo por su apoyo en la realización de papelería y compra de materiales.**

**Al personal de intendencia que también nos apoyaron en algunos momentos del desarrollo del trabajo de tesis.**

**Al CONACYT por el apoyo al Proyecto CONACYT 36544-N y por la beca de manutención con registro 118603 otorgado para la realización de mis estudios de Doctorado en Ciencias con especialidad en Química biomédica.**

En medio de la calle de la ciudad,

y a uno y otro lado del río,

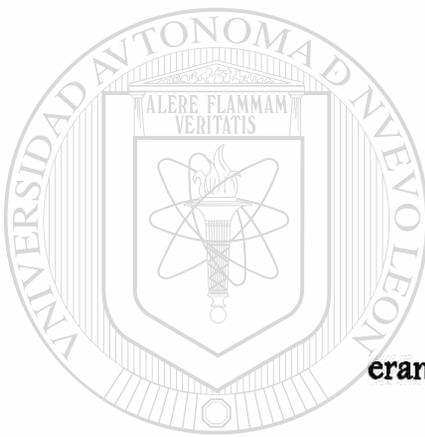
estaba el árbol de la vida,

que produce doce frutos,

dando cada mes su fruto;

y las hojas del árbol

eran para la sanidad de las naciones.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Apocalipsis  
22:2

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## Historia de la medicina

2000 A.C. Come un trozo de esta raíz.

Año 1000 Comer esas raíces es una costumbre pagana. Repite esta plegaria.

1850 Esa plegaria es una nueva superstición. Bebe esta poción.

1920 Esa poción está preparada con aceite de serpiente. Toma esta pastilla.

1945 Esa pastilla es ineficaz. Toma penicilina.

1955 ¡Oh! ... los microorganismos han mutado. Toma tetracilina.

1960-1999 Otras 39 ¡oh!...Toma este antibiótico más potente.

---

2000 ¡Los microorganismos nos han vencido! Como un trozo de esta raíz.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Anónimo

## RESUMEN

M.C. Luis Alejandro Pérez López

Fecha de graduación: Abril, 2005

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Faculta de Medicina

Título de estudio: **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS DE PLANTAS DEL NORESTE DE MÉXICO CON ACTIVIDAD CONTRA CEPAS DE *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae***

Número de páginas: 150

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Química Biomédica

Área de estudio: Química Analítica

**Propósito y Método del Estudio:** Las enfermedades respiratorias entre ellas la neumonía, representan una importante causa de muerte en todo el mundo, sobre todo en los países en desarrollo y afectan principalmente a la población infantil. Los principales microorganismos causantes de infecciones respiratorias son: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* entre otros. De los factores que influyen para que se presenten altos índices de mortalidad por infecciones del aparato respiratorio, reviste especial importancia la aparición cada vez más frecuente de cepas patógenas resistentes a los antimicrobianos de primera elección. Entre los esfuerzos para combatir esta problemática se encuentra el desarrollo de nuevos antimicrobianos a partir de principios activos de plantas usadas en la medicina popular. En esta investigación se probó la actividad antibacteriana de 68 extractos (la mayoría metanólicos) de 20 plantas colectadas en el noreste de México (Nuevo León y Coahuila), contra *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae* (una cepa resistente y una sensible a antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos de cada microorganismo) y contra dos cepas resistentes de *Streptococcus pneumoniae*. El bioensayo se realizó por el método de microdilución en caldo.

**Contribuciones y Conclusiones:** Los extractos de las plantas *Cordia boissieri*, *Schinus molle*, *Ceanothus coeruleus*, *Chrysactinia mexicana* y *Cyperus alternifolius* resultaron con actividad notable contra algunos de los microorganismos. El fraccionamiento biodirigido *Cordia boissieri* monitoreada por la técnica de bioautografía permitió aislar un compuesto puro y dos fracciones activas contra las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS

  
Dra. Noemí Waksman de Torres

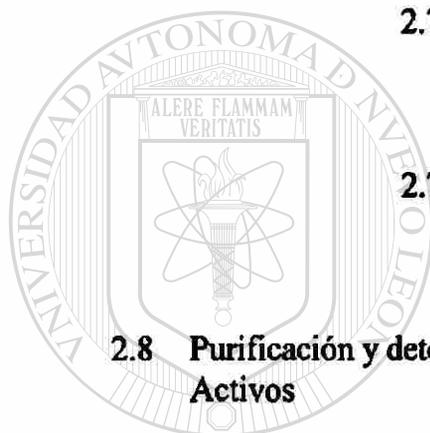
# ÍNDICE

Capítulo	Página
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Importancia de enfermedades infecciosas	1
1.2 Descripción de los principales microorganismos causantes de enfermedades respiratorias	3
1.3 Historia del desarrollo de agentes antimicrobianos	5
1.4 Resistencia de patógenos, <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	7
1.5 Estrategias contra infecciones	10
1.6 Uso de medicina tradicional	11
1.6.1 Uso de plantas medicinales	13
1.7 Actividad antimicrobiana de extractos o compuestos extraídos de plantas	17
1.8 Bioensayos	20
1.8.1 Descripción de pruebas de sensibilidad antimicrobiana	21
1.8.1.1 Método de difusión en placa	22
1.8.1.2 Método de dilución en tubo	22
1.8.1.3 Métodos de aseguramiento de proliferación o viabilidad celular	23
1.8.1.3.1 Uso de sales de tetrazolio	23
1.8.1.3.2 Uso de alamar azul en métodos de dilución en caldo	25
1.8.1.4 Bioautografía	26
1.9 Justificación	28

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
1.10 Objetivo general	28
1.11 Objetivos específicos	29
<b>2 MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>30</b>
2.1 Material, equipo y reactivos	30
2.1.1 Material	30
2.1.2 Equipo	32
2.1.3 Reactivos	33
2.1.3.1 Solventes	33
2.1.3.2 Reactivos especiales	34
2.1.3.3 Antimicrobianos	34
2.1.3.4 Medios de Cultivo	35
2.1.4 Material Biológico	35
2.1.4.1 Microorganismos	35
2.1.5 Condiciones utilizadas para bioautografía	36
2.1.6 Condiciones de Análisis para CLAR FR-C18	37
2.2 Colecta de plantas	38
2.3 Obtención de extractos metanólicos y acuosos	38
2.4 Determinación de actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos	39
2.4.1 Preparación de soluciones de los extractos	39
2.4.2 Preparación de inóculos	40
2.4.3 Preparación de controles	41
2.4.4 Descripción de la técnica de microdilución en placa	42

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
2.5 Extracción diferencial de los extractos con mayor actividad	43
2.5.1 Fraccionamiento del extracto metanólico de hojas de <i>Cordia boissieri</i>	44
2.5.2 Fraccionamiento del extracto metanólico de raíz de <i>Cyperus alternifolius</i>	44
2.6 Evaluación de la actividad antibacteriana de la fracciones obtenidas de la extracción diferencial	45
2.7 Aislamiento biodirigido de hojas de <i>Cordia boissieri</i>	45
2.7.1 Primera Extracción Masiva	45
2.7.1.1 Columna flash	46
2.7.1.1.1 Evaluación de actividad antimicrobiana de fracciones obtenidas de columna flash	47
2.7.1.2 Columna Lobar de baja presión en silica gel	48
2.7.1.2.1 Evaluación de actividad antimicrobiana de fracciones obtenidas de la columna Lobar de baja presión en silica gel	49
2.7.1.3 Columna Lobar de baja presión en fase reversa C18	50
2.7.1.3.1 Evaluación de actividad antimicrobiana de fracciones obtenidas de columna Lobar de baja presión en fase reversa C18	50
2.7.1.3.2 Análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución fase reversa C18 de fracciones obtenidas de la columna Lobar de baja presión de fase reversa C18	51
2.7.1.4 Columna de Exclusión Molecular (EM)	51
2.7.1.4.1 Análisis de las fracciones obtenidas de la columna de exclusión molecular por cromatografía líquida de alta resolución fase reversa C18	52
2.7.2 Segunda Extracción Masiva	53

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
2.7.2.1 Columna Flash	54
2.7.2.1.1 Evaluación de actividad antimicrobiana de fracciones obtenidas en la columna flash	54
2.7.2.2 Columna Lobar de baja presión en sílica	55
2.7.2.2.1 Evaluación de actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas de la columna Lobar de sílica gel	55
2.7.2.3 Columna Lobar de baja presión en fase reversa C18	56
2.7.2.3.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas de la columna Lobar de baja presión fase reversa C18	56
2.7.2.3.2 Análisis de las fracciones obtenidas de la columna Lobar de baja presión de fase reversa C18 por cromatografía líquida de alta resolución	57
<b>2.8 Purificación y determinación de la estructura química de compuestos Activos</b>	<b>57</b>
2.8.1 Análisis de pureza	57
2.8.2 Espectroscopia UV-Vis	58
2.8.3 Espectroscopia IR	58
2.8.4 Espectroscopia de RMN	58
2.8.5 Espectrometría de masas	59
2.9 Determinación de la concentración mínima inhibitoria del compuesto aislado y otras fracciones	59
<b>3 RESULTADOS</b>	<b>60</b>
3.1 Colecta de plantas a evaluar	60
3.2 Obtención de extractos metanólicos y acuosos	63



UANE

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
3.3 Determinación de actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos	66
3.4 Extracción diferencial de los extractos metanólicos con mayor actividad	68
3.5 Evaluación de la actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas de la extracción diferencial	69
3.6 Aislamiento biodirigido de hojas de <i>Cordia boissieri</i>	70
3.6.1 Primera extracción masiva	70
3.6.1.1 Columna flash	70
3.6.1.1.1 Evaluación de actividad antimicrobiana de fracciones obtenidas de columna flash	70
3.6.1.2 Columna Lobar de baja presión en sílica gel	71
3.6.1.2.1 Evaluación de actividad antimicrobiana de fracciones obtenidas de la columna Lobar de baja presión en sílica gel	71
3.6.1.3 Columna Lobar de baja Presión en Fase Reversa C18	74
3.6.1.3.1 Evaluación de actividad antimicrobiana de fracciones obtenidas de la columna Lobar de baja presión en fase reversa C18	74
3.6.1.3.2 Análisis de fracciones obtenidas de la columna Lobar de baja presión de fase reversa C18 por cromatografía líquida de alta resolución	77
3.6.1.4 Columna de exclusión molecular	83
3.6.2 Segunda extracción masiva	88
3.6.2.1 Columna flash	88
3.6.2.1.1 Evaluación de actividad antimicrobiana de fracciones obtenidas de la columna flash	88
3.6.2.2 Columna Lobar de baja presión en sílica gel	89

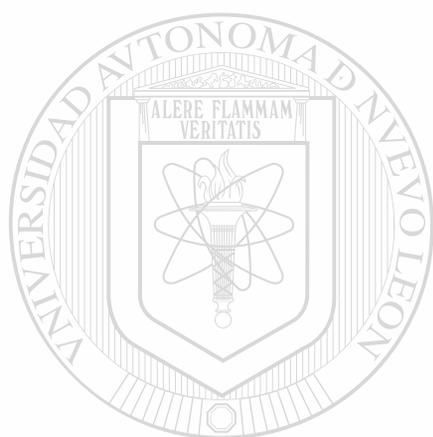
<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
3.6.2.2.1 Evaluación de actividad antimicrobiana de fracciones obtenidas de la columna Lobar de baja presión en silica gel	89
3.6.2.3 Columna Lobar de baja presión en fase reversa C-18	91
3.6.2.3.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas de la columna Lobar fase reversa C18	91
3.6.2.3.2 Análisis de las fracciones obtenidas de la columna Lobar fase reversa C18 por cromatografía líquida de alta resolución	91
<b>3.7 Purificación y determinación de la estructura química de compuestos activos</b>	<b>100</b>
3.7.1 Análisis de pureza	100
3.7.2 Espectroscopia UV-Vis	101
3.7.3 Espectroscopia IR	102
3.7.4 Espectroscopia de RMN	102
<b>3.8 Determinación de la concentración mínima Inhibitoria del compuesto aislado y otras fracciones activas</b>	<b>108</b>
<b>4 DISCUSIÓN</b>	<b>109</b>
<b>5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>140</b>
5.1 Conclusiones	140
5.2 Perspectivas	141
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>142</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Planta elegidas siguiendo criterios etnofarmacológicos y quimiotaxonómicos	61
2. Porcentajes de recuperación de extractos obtenidos de las diferentes plantas	64
3. Valores de CMI de los extractos crudos de plantas contra microorganismos causantes de infecciones respiratorias	66
4. Porcentajes de recuperación y valores de CMI de fracciones obtenidas de extractos metanólicos de hojas de <i>Cordia boissieri</i> y de raíz de <i>Cyperus alternifolius</i>	69
5. Fracciones obtenidas de la columna flash y resultados de actividad antimicrobiana	71
6. Fracciones obtenidas de las columnas Lobar de baja presión de sílica y resultados de actividad antimicrobiana	72
7. Fracciones obtenidas de la columna Lobar de baja presión de fase reversa -C18 y resultados de actividad antimicrobiana	75
8. Fracciones obtenidas de la columna Lobar de baja presión de fase reversa -C18 que fueron analizadas por CLAR FR -C18	77
9. Fracciones obtenidas de la columnas de exclusión molecular	84
10. Fracciones obtenidas de la columna flash y resultados de actividad antimicrobiana	88
11. Fracciones obtenidas de las columnas Lobar de baja presión de sílica y resultados de actividad antimicrobiana	90
12. Fracciones obtenidas de la columna Lobar de baja presión de fase reversa -C18 analizadas por CLAR FR-C18 y resultados de actividad antimicrobiana	92
13. Desplazamiento químico de carbono e hidrógenos del compuesto en los espectros de RMN	107
14. CMI del compuesto puro y dos fracciones sobre microorganismos causantes de infecciones respiratorios	108

15. **Compuestos aislados de diferentes plantas con actividad contra diferentes cepas de *Staphylococcus aureus***

139



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

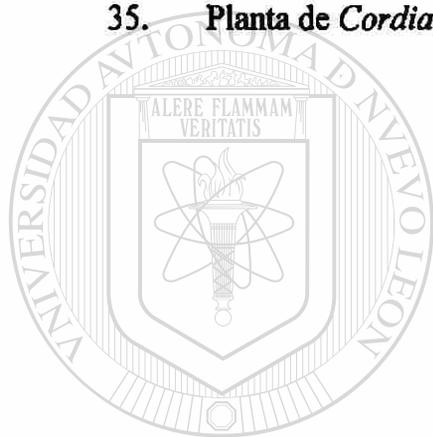
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1.	Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F3LFR-300504-29	78
2.	Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F4LFR-300504-29	78
3.	Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F5LFR-300504-29	78
4.	Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F6LFR-300504-29	79
5.	Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F7LFR-300504-29.	79
6.	Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F8LFR-300504-29	80
7.	Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F7LFR-300604-30	80
8.	Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F8LFR-300604-30	80
9.	Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F9LFR-300604-30	81
10.	Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F10LFR-300604-30	81
11.	Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F11LFR-300604-30	81
12.	Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F12LFR-300604-30	82
13.	Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F13LFR-300604-30	82

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
14. Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F14LFR-300604-30	82
15. Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F15LFR-300604-30	83
16. Cromatogramas ( $\lambda$ 270 nm) de las fracciones obtenidas de las columnas de exclusión molecular provenientes de F3LFR-300504-29, F4LFR-300504-29, F5LFR-300504-29, F6LFR-300504-29, F7LFR-300504-29, F8LFR-300504-29	86
17. Cromatogramas ( $\lambda$ 270 nm) de las fracciones obtenidas de las columnas de exclusión molecular provenientes de F7LFR-010604-30, F8LFR-010604-30, F9LFR-010604-30, F10LFR-010604-30, F14LFR-010604-30, F15LFR-010604-30	87
18. Bioautografía de fracciones obtenidas de la columna flash.	89
19. Cromatogramas ( $\lambda$ 250nm) de fracciones activas obtenidas de CLFR C18 de F3LS-151204-73	95
20. Cromatogramas ( $\lambda$ 250nm) de fracciones activas obtenidas de la CLFR C18 de F4LS-151204-73	97
21. Cromatogramas de ( $\lambda$ 250nm) fracciones activas obtenidas de la CLFR C18 de F5LS-151204-73	98
22. Cromatogramas de ( $\lambda$ 250nm) fracciones activas obtenidas de la CLFR C18 de F6LS-151204-73	99
23. Cromatogramas de ( $\lambda$ 250nm) fracciones activas obtenidas de la CLFR C18 de F7LS-151204-73	99
24. Cromatograma ( $\lambda$ 250nm) de la fracción F3LFR-261204-75 y análisis de pureza	101
25. Espectro ultravioleta-visible del compuesto F3LFR-261204-75	101
26. Espectro infrarrojo del compuesto F3LFR-261204-75	102
27. Espectro de $^1\text{H}$ RMN del compuesto F3LFR-261204-75	103
28. Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN del compuesto F3LFR-261204-75	103

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
29	Espectro DEPT 135 del compuesto F3LFR-261204-75	103
30.	Espectro HMQC del compuesto F3LFR-261204-75	104
31.	Espectro HMBC (7 Hz) del compuesto F3LFR-261204-75	104
32.	Espectro COSY del compuesto F3LFR-261204-75	105
33.	Espectro de masas del compuesto F3LFR-261204-75	105
34.	Estructura del compuesto F3LFR-261204-75 aislado de hojas de <i>Cordia boissieri</i>	106
35.	Planta de <i>Cordia boissieri</i>	126



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

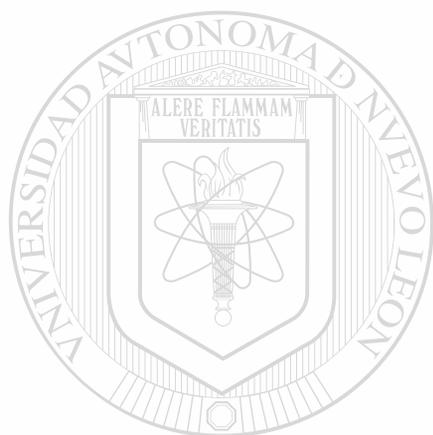
## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A.C	Antes de Cristo
AL TLC	Aluminium Thin Layer Chromatography
AMH	Agar Mueller Hinton
ATCC	American Type Culture Collection
ATR	Attenuated Total Reflection
Biol	Biólogo
CAMHB-LHB	Cation Adjusted Mueller Hinton Broth- Lysed Horse Blood
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CF	Columna Flash
CLAR FR-C18	Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Fase Reversa de Octadecilsilano
CLFRC18	Columna Lobar Fase Reversa C18
CLSG	Columna Lobar de Sílica Gel
<hr/>	
cm	Centímetros
cm <sup>-1</sup>	Centímetros a la menos uno
CMH	Caldo Mueller Hinton
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
cols	Colaboradores
COSY	Correlation Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfoxido
EM	Exclusión Molecular
Fig	Figura

<b>FT</b>	<b>Transformada de Fourier</b>
<b>g</b>	<b>Gramos</b>
<b>HMBC</b>	<b>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</b>
<b>HMQC</b>	<b>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</b>
<b>HPLC</b>	<b>High Performance Liquid Chromatography</b>
<b>HTM</b>	<b>Hamophilus Test Médium</b>
<b>Hz</b>	<b>Hertz</b>
<b>IMSS- NL/HE25</b>	<b>Instituto Mexicano del Seguro Social-Nuevo León/Hospital de especialidades 25</b>
<b>InDRE</b>	<b>Instituto de Diagnóstico yReferencia Epidemiológica</b>
<b>IR</b>	<b>Infrarrojo</b>
<b>Kg</b>	<b>Kilogramos</b>
<b>L</b>	<b>Litro</b>
<b>M.C.</b>	<b>Maestro en Ciencias</b>
<b>MDR</b>	<b>Multidrogoresistente</b>
<b>mg</b>	<b>Miligramos</b>
<b>MHZ</b>	<b>Mega Hertz</b>
<b>min</b>	<b>Minuto</b>
<b>mL</b>	<b>Mililitro</b>
<b>mm</b>	<b>Milímetros</b>
<b>MRSA</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i> meticilina-resistente</b>
<b>MSSA</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i> meticilina-sensible</b>
<b>MTT</b>	<b>bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio</b>
<b>N.L</b>	<b>Nuevo León</b>
<b>NaCl</b>	<b>Cloruro de sodio</b>

<b>NAD</b>	<b>Nicotin Adenin Dinucleotido</b>
<b>NCCLS</b>	<b>The National Committee for Clinical Laboratory Standards</b>
<b>nm</b>	<b>Nanometros</b>
<b>nOe</b>	<b>Nuclear Overhauser Effect</b>
<b>OMS</b>	<b>Organización Mundial de la Salud</b>
<b>p/p</b>	<b>Peso/peso</b>
<b>PAHO</b>	<b>Pan American Health Organization</b>
<b>ppm</b>	<b>Partes por millón</b>
<b>Rf</b>	<b>Cociente de frentes</b>
<b>RMN</b>	<b>Resonancia Magnética Nuclear</b>
<b>RP-18</b>	<b>Reverse Phase de Octadecilsilano</b>
<b>rpm</b>	<b>Revoluciones por Minuto</b>
<b>Si-60</b>	<b>Sílica gel 60</b>
<b>SIDA</b>	<b>Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida</b>
<b>SINAIS</b>	<b>Sistema Nacional de Información en Salud</b>
<b>U.S.A</b>	<b>United States of America</b>
<b>UV-Vis</b>	<b>Ultravioleta-Visible</b>
<b>VIH</b>	<b>Virus de Inmunodeficiencia Humana</b>
<b>WHO</b>	<b>World Health Organization</b>
<b>XTT</b>	<b>(Sal de sodio del ácido bencen sulfónico 3'-[1-fenilamino)-carbonil]-3,4-tetrazolio]-bis(4-metoxi-6nitro)</b>
<b><math>\lambda</math></b>	<b>Longitud de onda</b>
<b><math>\mu</math>L</b>	<b>Microlitro</b>
<b><math>\mu</math>m</b>	<b>Micrómetros</b>

$\mu\text{mol}$	<b>Micromolar</b>
%	<b>Por ciento</b>
$^{13}\text{CRMN}$	<b>Resonancia Magnética Nuclear de Carbono</b>
$^1\text{HRMN}$	<b>Resonancia Magnética Nuclear de Protón</b>
$^{\circ}\text{C}$	<b>Grados Centígrados</b>



UANL

---

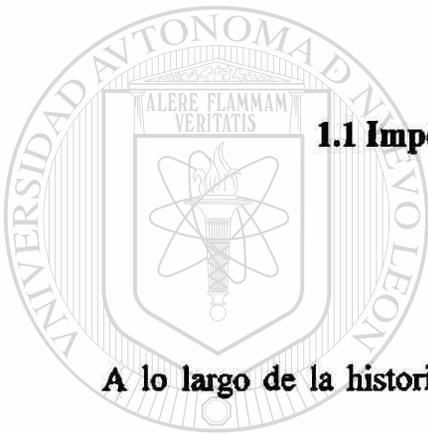
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN



### 1.1 Importancia de Enfermedades Infecciosas

A lo largo de la historia, la humanidad ha sido víctima de pandemias de cólera, peste, gripe, fiebre tifoidea, tuberculosis y otras enfermedades infecciosas, tan generalizadas que la mayoría de las personas rara vez llegaban a la edad madura. Otras dolencias aparentemente sin importancia, como infecciones de oído, piel o garganta a menudo daban lugar a sordera, deformaciones y/o muerte por septicemia y otras complicaciones. Actualmente en los países más pobres las enfermedades infecciosas, tanto las más graves como las que parecen menores, siguen contribuyendo a la muerte prematura y a la miseria de las poblaciones menos privilegiadas (Brundtland, 2000).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades infecciosas son la principal causa de muerte en todo el mundo. En el año 2002 cerca de 14.9

millones de personas, principalmente niños, murieron por esta causa (WHO Report, 2004).

Durante las dos pasadas décadas se han realizado importantes progresos en el control de algunas enfermedades infecciosas y parasitarias, como: tuberculosis, diarrea, VIH/SIDA y malaria; sin embargo, dentro del grupo de enfermedades infecciosas, las enfermedades respiratorias aún representan una importante causa de muerte. En el año 2002 la Organización Mundial de la Salud reportó 3 963 000 muertes por esta causa en todo el mundo (WHO Report 2004; Rojas y cols., 2001; Brundtland 2000). En el mismo año en México la Secretaría de Salud reportó 13,662 muertes por infecciones respiratorias agudas (SINAIS, 2002).

Las enfermedades del tracto respiratorio inferior tienen diversas manifestaciones, las cuales son causadas por microorganismos como: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bordetella pertussis*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae*, algunos hongos y virus como los virus de la gripe A o B, virus de la parainfluenza (tipos 1 al 4) entre otros.

Aunque el tracto respiratorio es una estructura continua desde la nariz a los alvéolos, resulta conveniente distinguir entre infecciones de las porciones superior e inferior, aun teniendo en cuenta que el mismo microorganismo puede causar infección en cualquier zona. El tracto respiratorio inferior sufre procesos infecciosos que tienden a

ser más graves y la elección de la terapia antimicrobiana apropiada tiene importancia y puede salvar la vida del paciente (Cedric, 1995).

## 1.2 Descripción de los Principales Microorganismos Causantes de Enfermedades Respiratorias

### *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae* o neumococo como se le llama habitualmente, continúa siendo una causa fundamental de morbilidad y mortalidad en personas de todas las edades, es la causa más común de neumonía adquirida en comunidad y una importante causa de otitis media, meningitis y septicemia; aislado inicialmente de saliva humana en estudios independientes por Sternberg y Pasteur en 1881, es un coco grampositivo encapsulado de forma oval o esférica y de 0.5 a 1.25  $\mu\text{m}$  de diámetro, y en extendidos directos de esputo y líquidos corporales puede estar solo, en pares u en cadenas cortas. La penicilina es el fármaco de elección para tratar todos los tipos de infección neumocócica, la penicilina G administrada por vía intramuscular es el agente de elección para el tratamiento de la neumonía neumocócica no complicada, la penicilina oral también puede ser utilizada de manera efectiva en pacientes ambulatorios con síntomas leves. En el caso de pacientes en shock o con neumonía y meningitis, endocarditis o artritis la penicilina cristalina debe ser administrada por vía intravenosa; a los pacientes alérgicos a penicilina se les puede dar alguna cefalosporina o eritromicina para la neumonía y cloramfenicol para la meningitis (Joklik y cols. 1998)

### *Haemophilus influenzae*

*Haemophilus influenzae* fue aislado por primera vez por Pfeiffer durante la pandemia de influenza de 1892. Es un bacilo gramnegativo pequeño y pleomórfico. En el líquido cefalorraquídeo, el líquido articular o los cultivos primarios de estos materiales en un medio enriquecido, los microorganismos predominantes son cocobacilos uniformes de 0.2 a 0.3 por 0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$ , que pueden presentar una cápsula refráctil. Los microorganismos del serotipo b son responsables de casi todas las infecciones agudas causadas por *Haemophilus influenzae*. Esta bacteria es la causa de enfermedades invasivas tales como la piartrosis, la celulitis, la neumonía y la epiglotitis aguda. En los lactantes y en los niños pequeños produce meningitis aguda. En los adultos se asocia sobre todo con enfermedad pulmonar crónica. La ampicilina o la amoxicilina que son activos contra el *Streptococcus pneumoniae* y contra la mayor parte de las cepas de *Haemophilus influenzae*, son los fármacos de elección para el tratamiento inicial de la otitis media en los niños. Existen otras alternativas como son la combinación de trimetoprim-sulfametoxazol, la penicilina o la eritromicina combinada con una sulfonamida o el cefaclor. Las cefalosporinas también se usan a menudo. Para la sinusitis aguda el antibiótico inicial adecuado es la ampicilina (Joklik y cols., 1998)

### *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* es un coco grampositivo inmóvil de 0.8 a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, que se divide en tres planos para formar grupos irregulares de células semejantes a racimos de uvas. En extensiones de pus los cocos aparecen solos, en pares, en racimos o

en cadenas cortas. Algunas cepas producen una capa de material viscoso que incrementa la virulencia del microorganismo. Para el tratamiento de estas infecciones, a menos que el paciente sea alérgico, se recomiendan análogos bactericidas de la penicilina. La elección inicial debe limitarse a los fármacos penicilinas-resistentes, puesto que la mayor parte de las cepas aisladas tanto en las infecciones hospitalarias como en las adquiridas en la comunidad son resistentes a penicilina G, la penicilina V o ampicilina. Si la prueba de sensibilidad demuestra que el estafilococo aislado es sensible a la penicilina, ésta es la droga de elección. En caso de enfermedad estafilocócica grave se recomienda la administración parenteral de nafcilina o de oxacilina. La vancomicina o las cefalosporinas son sustitutos parenterales adecuados en el paciente alérgico. El tratamiento recomendado para las infecciones causadas por cepas resistentes a la meticilina consiste en vancomicina sola o asociada con rifampicina. La rifampicina sólo se debe usar en combinación con otro antimicrobiano para prevenir la aparición de resistencia (Joklik y cols., 1998).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### **1.3 Historia del Desarrollo de Agentes Antimicrobianos**

Entre las primeras contribuciones para el desarrollo de antimicrobianos, figura la utilización por Ehrlich del arsénico (Salvarsan) para el tratamiento de la sífilis. En 1928, el científico británico Alexander Fleming descubrió la penicilina, la cual demostró ser eficaz para combatir infecciones anteriormente consideradas mortales. Posteriormente surgió toda una familia de antibióticos derivados de la penicilina. En 1927 el científico

alemán Gerhard Domagk descubrió que el Prontosil, una sulfamida, funcionaba contra estreptococos hemolíticos. Con el tiempo el Prontosil se utilizó para tratar la fiebre puerperal. En 1938, un equipo británico encabezado por A.J. Evans desarrolló otra sulfamida, la sulfadiazina 693, después llamada sulfanilamida, que también resultó eficaz para combatir estreptococos, entre ellos neumococos. En 1940 Selman Waksman aisló un hongo que con el tiempo dio lugar al desarrollo del medicamento antituberculoso estreptomina; posteriormente se desarrolló la Isoniazida. En 1957 un grupo de investigación coordinado por Piero Sensi descubrió el medicamento antituberculoso Rifampicina. Entre los descubrimientos posteriores figuran las tetraciclinas, quinolonas, antimicóticos, antiparasitarios y más recientemente antivirales. Estos medicamentos, llamados colectivamente “antimicrobianos” han salvado millones de vidas, han reducido la morbilidad y han permitido el desarrollo de complejos procedimientos quirúrgicos que antes se consideraban demasiado peligrosos debido a las infecciones post-operatorias. Al mismo tiempo, los antimicrobianos han prevenido discapacidades tales como sordera, ceguera y deformaciones causadas por enfermedades como la lepra y la elefantiasis (Brundtland, 2000).

Después de la gran abundancia de descubrimientos efectuados entre 1930 y 1970, en los 30 últimos años hubo menos hallazgos en la lucha contra las infecciones mortíferas. En el decenio de 1970 se obtuvo el Aciclovir, potente fármaco contra el herpes zóster, el herpes simple y el herpes genital. Con el advenimiento del VIH, el descubrimiento y el desarrollo de los antirretrovíricos han dado otro gran impulso a la lucha contra las enfermedades transmisibles (Brundtland, 2000).

Actualmente, el arsenal de armas antimicrobianas contra las enfermedades infecciosas es de más de 150 compuestos, pero sus costos son enormes. Las empresas farmacéuticas gastan habitualmente unos USD \$ 500 millones en investigación y desarrollo por cada compuesto nuevo que sale al mercado. Por otro lado, la farmacorresistencia es un problema que ha disminuido la eficacia de medicamentos que se tardó años en desarrollar (Brundtland, 2000).

#### **1.4 Resistencia de Patógenos, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus***

Una de las razones para explicar la alta mortalidad debida a infecciones respiratorias es la resistencia de los microorganismos a los antibióticos usados. Los patógenos adquieren resistencia a los antimicrobianos por un proceso de selección natural. Estos organismos pueden transmitir la resistencia a sus descendientes por la transferencia de sus genes de resistencia o a otras bacterias mediante conjugación. Este fenómeno natural es exacerbado por el abuso y el mal empleo de los antimicrobianos en el tratamiento de las enfermedades humanas, en la ganadería, la acuicultura y la agricultura. Las enfermedades y por lo tanto la resistencia, también prosperan en situaciones de disturbio civil, pobreza, migración masiva y degradación del medio ambiente, en los cuales un gran número de personas quedan expuestas a enfermedades infecciosas con escasa atención sanitaria básica (Brundtland, 2000).

La resistencia a múltiples agentes antimicrobianos generada a través de los años es realmente alarmante en el mundo; hoy muchas especies de bacterias que una vez parecieron estar bajo control o se creyó que eran potencialmente controlables, entre ellas cepas relativamente comunes de *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium* y *Streptococcus*, causan actualmente infecciones que son difíciles de tratar (Lester, A,1999). En las muestras de laboratorio hasta el 70% de las infecciones del tracto respiratorio suelen ser resistentes cuando menos a uno de los antimicrobianos de primera línea (Brundtland, 2000)

Ninguna población es más vulnerable a la infección por organismos polifarmacorresistentes que la de las personas hospitalizadas. A menudo los trabajadores de la salud pasan por alto las prácticas básicas de higiene (como el lavado de manos y/o el cambio de guantes) antes y después de las visitas de los pacientes. El equipo mal lavado es otro gran factor determinante de la propagación de enfermedades infecciosas. En el mundo industrializado hasta 60 % de las infecciones nosocomiales están ocasionadas por microbios resistentes a los medicamentos. Estas infecciones, las más recientes de las cuales son causadas por *Enterococcus* resistentes a la vancomicina y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, no se limitan actualmente a las salas de los hospitales sino que se han infiltrado en la comunidad en general. *Pseudomonas* y *Klebsiella* son algunas de las bacterias que manifiestan altos niveles de resistencia, particularmente en los países en desarrollo. Con la aparición de la resistencia, los tratamientos más nuevos están resultando demasiado costosos para la gran mayoría de la población de los países pobres (Brundtland, 2000).

Más que cualquier otra enfermedad infecciosa, la neumonía sigue siendo el homicida número uno en todo el mundo, principalmente de niños. La mayoría de las infecciones respiratoria agudas se presentan en países en desarrollo donde la pobreza y una atención medica insuficiente contribuyen a una mortalidad elevada. Estudios realizados en países de América Latina indican que los cuadros de neumonía más graves se asocian a causas bacterianas, con predominio de *Streptococcus pneumoniae*, seguido por *Haemophilus influenzae* tipo b. Algunos serotipos presentan resistencia a penicilina, a trimetoprim-sulfametoxazol o multidrogoresistencia (Brundtland, 2000; Hortal y cols., 1999).

Un estudio de susceptibilidad de 276 aislados de *Streptococcus pneumoniae*, 301 de *Haemophilus influenzae* y 110 de *Moraxella catarrhalis* fue llevado acabo de Noviembre de 1998 a mayo de 1999 en Taiwán. Para *Streptococcus pneumoniae* fueron encontrados altos niveles de resistencia a penicilina, cefalosporinas de amplio espectro, azitromicina, claritromicina y trimetoprim-sulfametoxazol. Para los aislados de *Haemophilus influenzae* se encontraron altos niveles de resistencia para amoxicilina y trimetoprim sulfametoxazol (Po-Ren y cols., 2000)

En Estados Unidos se llevaron a cabo pruebas de susceptibilidad por microdilución en caldo de 1476 cepas de *Streptococcus pneumoniae* y 1676 cepas de *Haemophilus influenzae* resistente a  $\beta$ -lactámicos, macrólido-azolidos y fluoroquinolonas. Entre las cepas de *Haemophilus influenzae* 41.6 % fueron  $\beta$ -lactamasa positivos, 22 % fueron susceptibles a cefuroxime, 2 % fueron susceptibles a cefaclor. Entre los aislados de

*Streptococcus pneumoniae* 49.6 % fueron susceptibles a penicilina, 17.9 mostraron una susceptibilidad intermedia y 32.5 % fueron resistentes (Jacobs y cols., 1999).

En un programa específico para medir la actividad in vitro de numerosos antimicrobianos contra *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis* aislados de muestras del tracto respiratorio y de sangre en Estados Unidos de América, Canadá, Europa, Latinoamérica y la región de Asia-pacífico, se encontró que la resistencia a penicilina es común en las cinco regiones geográficas y que existe un incremento en la resistencia a macrólidos entre los aislados de *Streptococcus pneumoniae*. También se observaron elevados niveles de resistencia a clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloramfenicol y tetraciclina. Además *Haemophilus influenzae* exhibió resistencia a amoxicilina mediada por  $\beta$ -lactamasa y a trimetoprim-sulfametoxazol (Hoban y cols., 2001).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 1.5 Estrategias Contra Infecciones

Las mejoras en las estrategias terapéuticas, los programas de inmunización, las mejoras de la higiene y la nutrición, la prohibición del uso de antimicrobianos como promotores de crecimiento animal, la intensificación de la lucha antibacteriana orientadas a poblaciones de escasos recursos han dado un gran impulso a la reducción de la propagación de enfermedades infecciosas farmacorresistentes. La estrategia mundial de la OMS para la contención de la resistencia a los antimicrobianos, ofrece

una serie de recomendaciones con miras a capacitar a los países para definir y aplicar políticas nacionales destinadas a mantener la eficacia de los antimicrobianos (Brundtland, 2000).

Otras alternativas en la lucha contra la resistencia son el desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos, de nuevas vacunas y nuevos medios diagnósticos. Una de las líneas de investigación a nivel mundial se basa en obtener principios activos de plantas contra microorganismos o bien la obtención de compuestos que con simples cambios estructurales puedan servir como antimicrobianos eficaces (Brundtland, 2000).



## 1.6 Uso de Medicina Tradicional

La medicina tradicional es un término amplio utilizado para referirse a diferentes sistemas de tratamiento de enfermedades como por ejemplo las diversas formas de medicina indígena, la medicina tradicional china, el ayurveda hindú y la medicina unani árabe. La medicina tradicional incluye terapias con medicación, si implican el uso de medicinas obtenidas de hierbas, partes de animales y/o minerales, y terapias sin medicación, como en el caso de la acupuntura, las terapias manuales y las terapias espirituales. En países donde el sistema sanitario dominante se basa en la medicina alopática, o donde la medicina tradicional no se ha incorporado en el sistema sanitario nacional, ésta se clasifica a menudo como medicina “complementaria”, “alternativa” o “no convencional”. El uso de la medicina tradicional sigue estando muy extendido en los

países en vías de desarrollo, mientras que el uso de la medicina complementaria y alternativa está aumentando rápidamente en los países desarrollados (Estrategia de la OMS sobre medicinal tradicional 2002 – 2005).

En África hasta un 80% de la población utiliza la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de salud. En Asia y en Latinoamérica, las poblaciones la siguen utilizando como resultado de circunstancias históricas y creencias culturales. En China, la medicina tradicional ocupa alrededor de un 40% de las atenciones de salud. Mientras tanto, en muchos países desarrollados, la medicina complementaria y alternativa se está haciendo cada vez más popular. El porcentaje de población que la ha utilizado al menos una vez es de un 48% en Australia, un 70% en Canadá, un 42% en EE UU, un 38% en Bélgica y un 75% en Francia (Estrategia de la OMS sobre medicinal tradicional 2002 – 2005).

En muchos lugares del mundo, los responsables de las políticas, los profesionales sanitarios y el público se debate con preguntas sobre la seguridad, la eficacia, la calidad, la disponibilidad, la preservación y el desarrollo de este tipo de atención de salud. La valoración de los productos de medicina tradicional y medicina complementaria alternativa, tales como las medicinas a base de hierbas, es especialmente difícil (Estrategia de la OMS sobre medicinal tradicional 2002 – 2005)

### 1.6.1 Uso de Plantas Medicinales

Desde los inicios de la civilización, el hombre ha utilizado materiales encontrados en el medio ambiente con una base empírica para curar varias enfermedades. Las plantas, partes de animales y microorganismos fueron inicialmente empleados sin modificar (Tyler, 1999; Agosta, 1997); de algunas plantas usadas en la medicina popular ha sido posible aislar moléculas biológicamente activas tales como Quinina, Reserpina y Salicina. Muchos remedios usados por la población también han sido incluidos en la medicina oficial después de demostrarse su eficacia científicamente (Lentini, 2000).

El hombre ha encontrado propiedades medicinales en semillas, corteza y raíces de ciertas plantas a través de ensayo y error. Los productos naturales, como extractos crudos de plantas, han sido usados por miles de años y muchas de estas formulaciones han sido registradas en literatura antigua. Hay cerca de 4000 años de historia registrada de medicina botánica de China, de Oriente medio, Sudamérica, Europa y México. Los primeros registros disponibles datan de casi 2600 años A.C.; éstos fueron encontrados en Mesopotamia (lo que ahora es Iraq, Iran y parte de Siria), en escritura cuneiforme que contiene aproximadamente 1000 diferentes formulaciones derivadas de plantas. Éstas formulaciones incluyen aceite de cedro, jugo de amapola, mirra, enebro, mandrágora, azafrán y palo dulce (Madari y cols., 2004).

A principios del siglo XIX, la investigación de varias plantas medicinales permitió descubrir algunos alcaloides biológicamente activos, entre ellos la Morfina, Atropina,

Papaverina y Codeína. Modificaciones realizadas a productos naturales con el objetivo de aumentar su actividad o selectividad y reducir efectos colaterales o toxicidad, se empezaron a hacer conforme se desarrolló la química orgánica a finales del siglo XIX; la Aspirina fue uno de los primeros productos naturales sujeto a estas modificaciones (Cordell, 2000). Hasta principios del siglo XX, la principal fuente de medicinas fueron las preparaciones obtenidas principalmente de plantas (Madari y cols., 2004).

Respecto al uso de plantas medicinales, la OMS estima que 80% de la población en países desarrollados usa casi exclusivamente medicina tradicional. Las plantas constituyen el principal componente de este tipo de medicina, lo cual significa que alrededor de 3,300 millones de personas las utilizan. Dada la popularidad mundial de las medicinas a base de hierbas, es urgente disponer de los medios apropiados y eficaces para valorarlas (Estrategia de la OMS sobre medicinal tradicional 2002 – 2005; Rojas G y cols., 2001; Agosta, 1997). Es esencial la precisión en la identificación de las plantas y el aislamiento de los ingredientes activos. Esto último es complejo, porque las propiedades de las plantas medicinales están influenciadas por el momento de colecta y por la zona de origen de la planta (incluyendo las condiciones del medio ambiente). Al mismo tiempo, una sola planta medicinal puede contener cientos de constituyentes naturales. Establecer qué constituyente es responsable de cada efecto puede ser prohibitivamente caro (Estrategia de la OMS sobre medicinal tradicional 2002 - 2005).

En la búsqueda de principios activos, el análisis etnobotánico aumenta sustancialmente la probabilidad de encontrar plantas bioactivas en comparación a un tamizaje al azar; de hecho, un gran número de fármacos modernos han sido aislados de

plantas, muchos con base en su uso en medicina étnica. La historia ha demostrado que los remedios herbales poseen compuestos con importancia medicinal (Madari y cols., 2004).

Además del criterio etnobotánico en la búsqueda de principios activos a partir de plantas, se puede recurrir a la investigación fitoquímica o taxonómica ya que ciertas taxas pueden producir el mismo o muy parecido patrón de metabolitos secundarios. Otra alternativa es basarse en investigaciones ecológicas, donde ciertas plantas predominan en un área determinada, o no se observa crecimiento de insectos sobre ellas, etc. Finalmente se pueden encontrar principios activos por serendipia, como el ejemplo de la Vinblastina, un anticancerígeno aislado de una planta con efecto hipoglucemiante, *Catharanthus roseus* (Cordell, 2000).

Los compuestos activos aislados de plantas se pueden usar como tal una vez que sean purificados, o con la ayuda de la química combinatorial y química médica pueden ser modificados o pueden usarse como farmacóforos; además se puede intentar obtenerlos por la vía de síntesis (Cordell, 2000; Nicolaou y cols., 1998).

En un estudio de fuentes de nuevos fármacos obtenidos en un período de 22 años (1981 – 2002) para el tratamiento de diferentes enfermedades en humanos, se encontró que 5% de estos fármacos son de origen totalmente natural, 23% son derivados de un producto natural por modificación sintética. Además un 4% son totalmente sintéticos pero la porción activa de la molécula (farmacóforo), fue copiada de un producto natural y un 20% son totalmente sintéticos pero obtenidos del conocimiento generado a partir

del estudio de productos naturales. En este mismo estudio se encontró que de 90 fármacos antibacterianos generados en ese tiempo, 10% son de origen completamente natural, 68% son derivados de un producto natural, y 1 % son de origen sintético con farmacóforo. Con este estudio se demostró que los productos naturales juegan un papel importante en el descubrimiento de compuestos líderes para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de enfermedades en humanos (Newman y cols., 2003). Además la importancia de la investigación de plantas como fuente de fármacos se ve reflejada en la gran diversidad estructural que representan los productos naturales, ya que aproximadamente un 40 % de éstos no están relacionados o representados por compuestos obtenidos sintéticamente (Cordell, 2000; Cremin y cols., 2002).

Las productos naturales tienen generalmente menos efectos colaterales que los fármacos sintéticos, dado que ejercen su efecto a través de múltiples mecanismos ~~activados por diferentes tipos de constituyentes químicos~~. Muchos de los productos herbales no son patentados y por lo tanto están más accesibles para la población de escasos recursos. Algunas de las fitomedicinas pueden traer efectos benéficos adicionales (Tyler, 1999).

La venta de medicina herbolaria se ha incrementado considerablemente en los últimos 10 años en los países industrializados. Este crecimiento de la tendencia a usar la medicina herbolaria para tratar un amplio número de enfermedades (insomnio, ansiedad, obesidad, asma bronquial, constipación, síndrome de inmunodeficiencia) ha sido promovido entre otras cosas, por el desarrollo de complicaciones severas para las cuales no hay aún un tratamiento adecuado (Capasso y cols., 2000), por la accesibilidad cada

vez mayor de este tipo de medicina y porque también mucha gente está interesada en tener más autonomía sobre su cuidado médico (Murphy, 1999). Aunque el progreso de la química farmacéutica y la biología molecular han suplido nuevos medios para producir sustancias terapéuticas, el incremento en el consumo de medicina herbolaria ha originado un considerable aumento en la investigación etnobotánica, que junto con la quimiotaxonomía, ayuda a encontrar nuevos principios activos en plantas (Lentini, 2000).

La cultura indígena mexicana posee una rica herencia de curación con plantas medicinales. Una encuesta nacional llevada a cabo en México en 2242 comunidades rurales de 1983 a 1985, mostró que 78% de 148 plantas medicinales más frecuentemente usadas por la población son empleadas para prevenir o curar enfermedades gastrointestinales, respiratorias y de la piel; sin embargo, la investigación científica para determinar el potencial terapéutico de estas plantas es limitada (Rojas y cols., 2001).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### **1.7 Actividad Antimicrobiana de Extractos o Compuestos Extraídos de Plantas**

Existen múltiples estudios reportados en la literatura acerca de la actividad antimicrobiana de compuestos o extractos obtenidos de plantas. Elgorashien y cols. (2004), analizaron 6 especies de Amarillydaceae de las cuales se obtuvieron 4 extractos de cloruro de metileno que tuvieron actividad contra *Staphylococcus aureus* y de un extracto contra *Klebsiela pneumoniae*. Por otra parte, Gülcin y cols. en el 2004

investigaron la actividad del extracto acuoso de *Urtica dioica* contra 9 especies de bacterias y una de hongos y encontraron que el extracto fue activo contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* a una concentración de 250 µg/disco.

En el 2004, Ram y cols. encontraron 23 plantas activas contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* asociadas a enfermedades de la piel. En este estudio la actividad fue determinada por el método de difusión en disco.

Chandrasekaran y cols. (2004) reportaron en el la actividad antimicrobiana de los extractos acuoso y metanólico de semillas de *Syzygium jambolanum* por los métodos de difusión en disco y dilución en tubo. La CMI para los extractos acuosos y metanólicos fueron 125 y 250 µg/mL respectivamente contra *S. aureus*, y 250 µg/mL contra *Pseudomonas aeruginosa* para ambos extractos. La CMI para *Klebsiella pneumoniae* fue de 250 y 500 µg/mL para los extractos acuoso y metanólico respectivamente.

Por otro lado, en un estudio realizado con la planta de pirul (*Schinus molle*) se encontró que los aceites volátiles de las hojas tienen actividad significativa contra algunas especies de bacterias como *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, (Gundiza, 1993).

Los aceites esenciales de *Phlomis fruticosa* L. inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* y

*Micrococcus luteus*. El extracto etanólico de la misma planta mostró actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (Ristic y cols., 2000).

Tsao y cols., en el 2001 reportaron la actividad in vitro del aceite de ajo y monosulfuro de dialilo, disulfuro de dialilo, trisulfuro de dialilo y tetrasulfuro de dialilo que están presentes naturalmente en este aceite, contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. El trisulfuro de dialilo y tetrasulfuro de dialilo exhibieron las CMI's más bajas y mostraron sinergismo o efecto aditivo con ceftazidime, gentamicina, imipenem y meropenem, lo que sugirió que tienen un alto potencial en la prevención o el tratamiento de infecciones bacterianas resistentes a antibióticos.

En un reporte del 2001, Inouye y cols. midieron la actividad de 14 aceites esenciales y sus mayores constituyentes contra *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*. Entre los 14 aceites esenciales los de la corteza de canela, el zacate de limón y el aceite de tomillo, mostraron la más baja concentración mínima inhibitoria.

De la raíz de *Salvia blepharochlaena* se obtuvieron dos nuevos diterpenoides: blefaeina y el éster metílico del ácido O-meilpisiánico, junto con 8 diterpenoides reportados previamente, entre los cuales están horminona y 7-acetilhorminona, que presentaron actividad contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12226 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Ulubelen, 2001).

Habibi y cols. (2000), reportaron el estudio fitoquímico del extracto clorofórmico de *Salvia leiriaefolia*, y el aislamiento del compuesto 8(17), 12 E, 14-labdatrien-6,19-olido que mostró actividad contra *Staphylococcus aureus*.

## 1.8 Bioensayos

En las etapas iniciales del proceso para encontrar fármacos, se necesita que éstos sean evaluados mediante ensayos o paneles de ensayos biológicos. Actualmente las grandes compañías farmacéuticas poseen colecciones de compuestos a ser evaluados. Dichas colecciones son llamadas “bibliotecas” y cada componente recibe el nombre de entidad química. Las entidades químicas no son solo compuestos puros sintéticos, semi-sintéticos u obtenidos de fuentes naturales (plantas, animales y microorganismos), también pueden ser extractos o fracciones semipuras. Algunas de las enfermedades que son blancos terapéuticos a los que se dirige el descubrimiento de nuevos fármacos a través del panel de ensayos son: cáncer, enfermedades del corazón, pulmón, dolor e inflamación, enfermedades infecciosas, VIH y diabetes, entre muchas otras (Cordell, 2000; Newman y cols., 2003).

Es crucial para cualquier investigación de plantas con actividad biológica que haya disponibles bioensayos adecuados para monitorear el efecto requerido. A fin de probar el gran número de extractos y fracciones de las etapas de fraccionamiento biodirigido, los sistemas de ensayo deben ser simples, rápidos, reproducibles y baratos. Si los principios

activos están presentes a bajas concentraciones en los extractos crudos, los bioensayos tienen que ser lo suficientemente sensibles para su detección. Al mismo tiempo, el número de falsos positivos debe ser reducido al mínimo. Cuando se decide cual bioensayo emplear en la investigación de constituyentes de plantas, la primera etapa es elegir organismos blanco adecuados. Estos pueden ser organismos inferiores (microorganismos, insectos, crustáceos, moluscos), sistemas subcelulares aislados (enzimas, receptores, organelos), cultivos de células humanas o de origen animal. La complejidad del bioensayo se diseña en función de las facilidades de recursos y personal disponible (Hostettmann y cols., 1996).

### **1.8.1 Descripción de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana**

A pesar de que muchas plantas son reportadas en la literatura etnobotánica con posibles propiedades antimicrobianas, los procesos de evaluación científica para probar su eficacia requieren la aplicación de nuevos y más rápidos procedimientos experimentales para detectar productos potencialmente efectivos. En la actualidad se han desarrollado varios métodos de tamizaje para detectar la actividad antimicrobiana (Navarro y cols., 1998). A continuación se detalla las características de los más frecuentemente reportados.

### **1.8.1.1 Método de Difusión en Placa**

Uno de los métodos frecuentemente empleado para estudiar los aspectos cuantitativos de la actividad antimicrobiana es “la difusión en agar”. Un medio de cultivo con agar mantenido a 45°C para evitar su solidificación se inocula con una suspensión de organismos testigo, se homogeniza y se vacía a cajas de cultivo. Sobre la superficie de las cajas, una vez solidificado el agar, se colocan discos de papel filtro, impregnados con cantidades conocidas del agente antimicrobiano. Se incuban y durante este período, el agente difunde hacia la zona que le rodea y establece un gradiente de concentración, alcanzándose la CMI a cierta distancia. Conforme pasa el tiempo, el organismo crece, excepto en la región donde la concentración de la sustancia está por arriba de la CMI; allí se observa una zona de inhibición, cuyo tamaño queda determinado por la capacidad de difusión del agente antimicrobiano y la sensibilidad del organismo a dicho antimicrobiano (Brock y cols., 1987).

En este método pueden utilizarse discos de concentración única, tirillas con un gradiente de concentraciones, volúmenes conocidos de antimicrobiano a una concentración dada colocados en orificios dentro del agar. El bajo costo y la simplicidad del bioensayo lo hace útil para la determinación de la actividad antibacteriana de extractos crudos. Este método clásico requiere que la sustancia a analizar sea soluble en agua o que pueda difundir en el agar (Brock y cols., 1987; Dimayuga y cols., 1998).

### **1.8.1.2 Método de Dilución en Tubo**

Para medir la actividad relativa de agentes antimicrobianos, se determina la concentración mínima que permite la inhibición completa del crecimiento de un

organismo testigo en tubos con caldo de cultivo en condiciones definidas de crecimiento. Cada tubo contiene una cantidad de antibiótico obtenida por dilución a partir de una solución de concentración conocida y se incluye también un control sin antimicrobiano. Los tubos se inoculan con una suspensión calibrada del microorganismo en estudio y se incuban un tiempo determinado. Después de este período, los tubos se examinan visualmente para comprobar la presencia de turbidez que indica que el microorganismo no ha sido inhibido por el antibiótico contenido en los tubos. La CMI será la concentración del tubo con la máxima dilución que inhibe el crecimiento del organismo.

La microtécnica de dilución tiene el mismo principio que el método de dilución en caldo ya descrito, excepto que la prueba se realiza en microplaca (Brock y cols., 1987. Koneman y cols., 1991).

### **1.8.1.3 Métodos de Aseguramiento de Proliferación o Viabilidad Celular**

**1.8.1.3.1 Uso de Sales de Tetrazolio.** El medio ambiente interno de las células en proliferación es más reducido que las células que no están en proliferación. Este estado reducido puede ser medido usando aceptores de electrones como las sales de tetrazolio. Las más frecuentemente usadas son MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), XTT (Sal de sodio del ácido bencen sulfónico 3'-[1-fenilamino)-carbonil]-3,4-tetrazolio]-bis(4-metoxi-6 nitro). El XTT se puede usar con células adheridas a alguna superficie y requiere la presencia de metosulfato de fenacina para una eficiente reducción. La reducción de sales de tetrazolio, como indicador de crecimiento celular ha sido usada en modelos para tamizaje de agentes citotóxicos (Biosource International).

Las sales de tetrazolio también se han empleado en diversos estudios de actividad antimicrobiana. Lechner y cols. (2004) reportaron el uso de MTT para facilitar la lectura en un ensayo para determinar la CMI de un compuesto obtenido de la planta china *Angelica dahurica*, contra cepas de *Staphylococcus aureus* meticilin-resistentes y multidrogo-resistentes. Ankli y cols. (2002), también reportaron el uso de MTT para revelar el crecimiento microbiano en un ensayo de difusión en placa donde midieron la actividad antimicrobiana de extractos de plantas contra microorganismos que causan problemas gastrointestinales. Hawser y cols. (2001), estudiaron el uso de la sal de tetrazolio XTT, en una prueba de susceptibilidad de *Aspergillus fumigatus* ante el compuesto mulundocandina y lo compararon con el método descrito por el manual NCCLS (documento M100-S12, 2002). El compuesto probado mostró menor actividad por el método del NCCLS que en el ensayo usando la sal de tetrazolio. El uso de MTT es reportado en múltiples estudios de detección de actividad antimicrobiana de extractos o compuestos puros aislados de plantas, mediante la técnica de bioautografía. Eloff (1998), reportó el uso de violeta de p-iodonitrotetrazolio como revelador en la técnica de bioautografía, en un estudio realizado para revisar el mejor solvente de extracción de 2 plantas con actividad antibacteriana. Navarro y cols. (1998), estudiaron la actividad de productos obtenidos de extractos de *Bocconia arborea*, utilizando la técnica de bioautografía y cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio. Springfield y cols. (2003), demostraron actividad de extractos de *Carpobrotus muiirii* y *Carpobrotus quadrifidus* contra *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium smegmatis* con un método de bioautografía donde utilizaron violeta de p-yodonitrotetrazolio como revelador del crecimiento microbiano.

**1.8.1.3.2 Uso de Alamar Azul en Métodos de Dilución en Caldo.** El alamar azul mide, en forma semejante a las sales de tetrazolio, la reducción del medio ambiente de las células en proliferación. El alamar azul es soluble y estable en medio de cultivo y no es tóxico. Como ocurre con las células de mamíferos, el ambiente interno de las bacterias es más reducido conforme las células proliferan y esto puede ser monitoreado por espectrofotometría o fluorimetría. La reducción de alamar azul por células bacterianas puede ser monitoreado en solución o en discos de papel en ensayos de susceptibilidad a agentes antimicrobianos. Para usar alamar azul en estos ensayos se requiere un medio no reductor como caldo soya tripticasa o caldo Mueller Hinton. En un procedimiento para bacterias capaces de crecer en Caldo Mueller Hinton, si no hay crecimiento el medio permanece azul después de agregar Alamar azul. El crecimiento hace virar el color del indicador de azul a rosa, de manera que cualquier cambio de color azul a rosa es interpretado como positivo. La CMI es la concentración de antimicrobiano del primer pozo que permanece azul (Biosource International). Salvat y cols. (2001), reportaron el uso del alamar azul en un ensayo de microdilución en placa para medir la inhibición del crecimiento microbiano de extractos metanólicos de 25 especies de plantas. Las bacterias probadas fueron *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Franzblau y cols. reportaron el uso de alamar azul en un método de microdilución y lo compararon con el sistema BACTEC-460 para determinar susceptibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a varios fármacos antimicrobianos y demostraron una alta concordancia de los resultados obtenidos con ambos métodos (Franzblau y cols., 1998).

#### 1.8.1.4 Bioautografía

Uno de los métodos más rápidos para detección de nuevos agentes antimicrobianos es la bioautografía. El primero en utilizar este método en cromatogramas desarrollados en capa delgada fue Fisher en 1961. Este método es rápido y barato, se apoya en los métodos de difusión y cromatografía y permite la localización de actividad antimicrobiana del extracto de la planta directamente en una placa de cromatografía (Navarro y cols., 1998. Verastegui, 2000). La bioautografía puede ser considerada el ensayo más eficiente para la detección de compuestos antimicrobianos, porque permite la localización de la actividad aún en una matriz compleja. El ensayo de bioautografía puede ser dividido en tres grupos: A) Bioautografía directa, donde los microorganismos crecen directamente en la placa de cromatografía en capa fina después de agregar el medio de cultivo, B) Bioautografía de contacto, donde los compuestos antimicrobianos son transferidos de la placa de cromatografía en capa fina a una placa de agar inoculada a través de contacto directo y C) Bioautografía de agar sobrepuesto, donde un agar inoculado con el microorganismo es aplicado sobre la placa de cromatografía en capa delgada (Rahalison y cols., 1991). Para desarrollar la bioautografía se realizan dos placas idénticas de cromatografía en capa fina de los extractos a analizar. Una de la placas se somete a bioautografía, se le agrega una capa de agar inoculado con el microorganismo contra el cual se quiere probar la actividad de los extractos, se incuba a la temperatura y el tiempo necesarios para cada microorganismo, el crecimiento microbiano se revela con alguna sal de tetrazolio y se revisa la inhibición del crecimiento. La otra placa se revela con un compuesto o agente adecuado y se comparan los  $R_f$  de los productos separados con la zona de inhibición del crecimiento de la primera. Esta técnica ha sido empleada en estudios para detectar actividad tanto de antibióticos como de extractos o fracciones

obtenidas de productos naturales. Se utilizó en un estudio para probar la actividad de algunos compuestos contra *Candida albicans* y *Bacillus subtilis* (Rahalison y cols. 1991). También ha sido empleada para probar actividad de extractos clorofórmicos de corteza de cuatro especies de *Buddleja* (*B. asiatica* Lour, *B. cordata* H.B.K, *B. davidii* Franch, *B. skutchii* Morton), contra el hongo *Fusarium fimicola* (Houghton y cols., 2003). En otro estudio se utilizó esta técnica para evaluar la actividad antibacteriana de 4 alcaloides contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella setubal* y *Escherichia coli* (Morel y cols., 2002). Por otra parte se ha reportado la actividad antifúngica de diferentes extractos de corteza de *Bridelia retusa* contra *Cladosporium cladosporioides*, en un ensayo realizado por bioautografía (Jayasinghe y cols., 2003). Esta técnica también ha sido probada para analizar extractos de *Carpobrotus quadrifidus* y *Carpobrotus muirii* que son empleadas en la medicina tradicional para combatir infecciones en boca y garganta y se encontró actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium smegmatis* (Springfield y cols., 2003).

## 1.9 Justificación

La aparición creciente de cepas de organismos causantes de infecciones en el tracto respiratorio que son resistentes a los medicamentos convencionales y para los cuales no existen las alternativas de tratamiento, hace necesario desarrollar nuevos compuestos o investigar fármacos obtenidos a partir de principios activos de plantas usadas en la medicina popular.

En México hay algunas regiones donde se tiene información científica acerca de las propiedades curativas de las plantas usadas en la medicina popular. (Yasunaka y cols., 2005; Ankli y cols., 2002; Rojas y cols., 2001; Navarro y cols., 1998; Dimayuga y cols., 1998). En el noreste del país; sin embargo, se tiene poca información científica al respecto, por lo que creemos conveniente investigar la actividad antibacteriana de plantas usadas en la región noreste de México para el tratamiento de enfermedades infecciosas del tracto respiratorio inferior, a través de bioensayos que resulten sencillos y rápidos.

## 1.10 Objetivo General

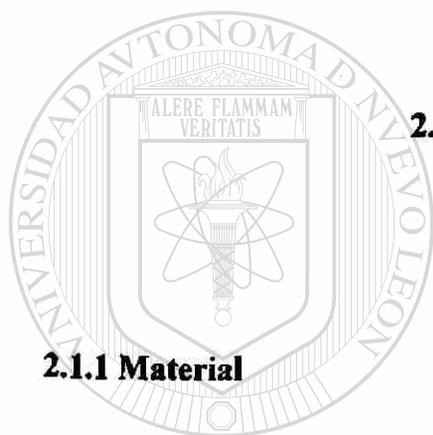
Aislar y caracterizar productos obtenidos de plantas del Noreste de México con actividad contra cepas de *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilis influenzae*.

### 1.11 Objetivos Específicos

1. Colectar plantas del noreste de México comunmente utilizadas en la medicina tradicional para el tratamientos de enfermedades del tracto respiratorio
2. Obtener extractos metanólicos y acuosos de tallo y hojas, flor, fruto y raíces de cada una de las especies colectadas
3. Realizar el tamizaje de los extractos para conocer su efecto contra las cepas de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilis influenzae* y *Staphylococcus aureus*
4. Obtener fracciones del o los extractos con mayor actividad utilizando solventes de diferente polaridad
5. Evaluar la actividad antibacteriana de cada una de las fracciones contra cepas de *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilis influenzae* por medio de la técnica de microdilución y de bioautografía
6. Realizar el aislamiento biodirigido de los componentes de las fracciones activas
7. Purificar y determinar la estructura química de compuestos activos
8. Determinar la concentración mínima inhibitoria del o los compuesto/s activo/s aislado/s y otras fracciones activas contra las cepas *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilis influenzae*

## CAPÍTULO 2

### MATERIAL Y MÉTODOS



#### 2.1 Material, Equipo y Reactivos

##### 2.1.1 Material

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

- Puntillas 100  $\mu\text{L}$ , 1000  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$  estériles con filtro
- Pipetas automáticas Wilson® de 50, 100 y 1000  $\mu\text{L}$
- Acrodiscos PTFE y GHP 13 mm de diámetro con filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  Gelman®
- Microplacas estériles de poliestireno de 96 pozos de fondo plano con tapa de baja evaporación, Costar®
- Cromatofolios AL TLC de Sílica Gel 60 F<sub>254</sub> Merck
- Columna Lobar LiChroprep® Si 60 (40 – 63  $\mu\text{m}$ ), Merck
- Columna Lobar LiChroprep® RP-18 (40 – 63  $\mu\text{m}$ ), Merck

- Columna Chromolith performance RP-18 (100 – 4.6 mm), Merck
  - Matraces Erlenmeyer Pyrex de 250, 500 y 100 mL
  - Matraces bola de 250, 500 y 1000 mL
  - Vasos de precipitado
  - Probetas de 100, 250 y 500 mL
  - Embudos de separación
  - Embudo de separación rápida
  - Pipetas lineales de 5 y 10 mL
  - Pipetas Pasteur
  - Pomaderas de vidrio oscuras
  - Tubos de ensaye 13 X 100, 18 X 150 mm
  - Tubos con tapón de rosca 13 X 100 mm
  - Tubos eppendorf de 2 mL
- 
- Frasco para liofilizar Labconco de 900 mL
  - Cubas para desarrollar cromatografías TLC 121 X 108 X 83 mm
  - Cubas para desarrollar cromatografías TLC 27.5 X 227.5 X 7.5 mm
  - Placas de porcelana (12 pocillos)
  - Capilares de 2 y 5  $\mu$ L
  - Cajas Petri desechables 15 X 100 mm
  - Cajas Petri de vidrio 15 X 100 mm
  - Jeringas 1 mL Becton –Dickinson
  - Papel filtro Whatman No 40
  - Tubos cónicos de 20 mL con tapón de rosca y estériles Daigger

- Crioviales de 2 mL estériles Daigger
- Frascos de vidrio de 100 mL

### 2.1.2 Equipo

- Licuadora OSTERIZER de 2 L
- Molino Thomas Wiley, Laboratory Mill, modelo 4, malla 2 mm
- Balanza granataria Scout Ohaus®
- Balanza analítica Sarorius
- Rotavapor BÜCHI® modelo 461 con baño de agua BÜCHI RE 121
- Liofilizadora Labconco 7522800 Freeze Dry-12, Fr
- Bomba de vacío Welch 1400 Duo Seal®
- Incubadora Shel Lab Shaking
- Refrigerador Daewoo
- Agitador Heidolph Instruments Unimax 1010
- Congelador Revco a -70 °C
- Lámpara de LUV Spectroline® Longlife™ Filter
- Cromatógrafo de líquidos Waters con bomba 600, detector arreglo de diodos 2996
- Cromatógrafo de líquidos: Alliance Waters 2690 equipado con automuestreador, sistema de desgasificación en línea y sistema de gradiente cuaternario

- **Espectrómetro de masas:** Waters Thermabeam Mass Detector con ionización electrónica
- **Detector UV-Vis** de arreglo de diodos, Waters 996
- **Espectrofotómetro de IR** con FT. Marca PE. Modelo Spectrum One. Accesorio ATR
- **Espectrómetro RMN Bruker** Modelo Avance DPX400, de 9.4 Teslas de campo magnético, operado a frecuencia para  $^1\text{H}$  de 400.13 MHz y para  $^{13}\text{C}$  de 100.61 y temperatura controlada por la unidad Eurotherm Bruker, equipado con una sonda de detección directa de 5 mm



### 2.1.3 Reactivos

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

#### 2.1.3.1 Solventes

- **Metanol** grado analítico, Fermont de Productos químicos Monterrey
- **Metanol** grado HPLC, Fermont
- **Hexano** grado analítico, Fermont de Productos químicos Monterrey
- **Éter etílico** grado analítico, Fermont de Productos químicos Monterrey
- **Acetato de etilo** grado analítico, Fermont de Productos químicos Monterrey
- **Butanol**, Fermont de Productos químicos Monterrey
- **Dimetil sulfóxido (DMSO)**, Fisher Scientific®
- **Cloroformo**, Fermont de Productos químicos Monterrey

- Nitrógeno gas de alta pureza, AGA

### 2.1.3.2 Reactivos Especiales

- Alamar Blue de Trek Diagnostic, Westlake, Ohio. OADC
- $\beta$ -NAD, Sigma Aldrich (México, importado de U.S.A.)
- Cloruro de Hemina, Sigma Aldrich (México, importado de U.S.A.)
- NaCl, Jalmeq Científica S.A. de C.V.
- Sílica gel 60 de tamaño de partícula 0.2 – 0.5mm, Merck®
- Bromuro de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio, Merck® (MTT)
- Cloroformo deuterado (100% D)

### 2.1.3.3 Antimicrobianos

- Oxacilina, Sigma Co. (México, importado de U.S.A.)
- Vancomicina, Sigma Co. (México, importado de U.S.A.)
- Cefalotina, Keflin-Lilly

La cefalotina y la vancomicina 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 a -70 °C hasta su uso

#### 2.1.3.4 Medios de Cultivo

- Agar Mueller Hinton (AMH), Becton Dickinson and Co., Sparks MD, USA
- Caldo Mueller Hinton (CMH), Becton Dickinson and Co., Sparks MD, USA
- Agar sangre, BD, BBL de Becton Dickinson México (Placas preparadas)
- Agar Chocolate BD, BBL de Becton Dickinson México (Placas preparadas)
- Caldo Haemophilus test medium (HTM), preparado de acuerdo al manual NCCLS (documento M100-S12, 2002)
- Caldo Mueller Hinton catión ajustado, suplementado con 5% de sangre de caballo lisada (CAMHB-LHB), preparado de acuerdo al manual NCCLS (documento M100-S12, 2002)

#### 2.1.4 Material Biológico

##### 2.1.4.1 Microorganismos

- *Streptococcus pneumoniae* InDRE 24-CCpn-02 (Del Instituto de Diagnostico y Referencia Epidemiológica InDRE, México D.F., México). Resistente a oxacilina, y sensible a vancomicina
- *Streptococcus pneumoniae* InDRE 49619. Resistente a oxacilina y sensible a vancomicina
- *Haemophilus influenzae* tipo b InDRE- 90-CCH-02. Sensible a ampicilina
- *Haemophilus influenzae* type b InDRE 49247. Resistente a ampicilina
- *Staphylococcus aureus* ATTC 25923. Sensible a oxacilina

- *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, Monterrey, México

### 2.1.5 Condiciones Utilizadas para Bioautografía

Cromatofolios: AL TLC de Sílica Gel 60 F<sub>254</sub> Merck 10 cm X 3 cm

Sistemas eluentes probados con saturación previa:

- A) Hexano:acetato de etilo 5:1
- B) Hexano:acetato de etilo 3:1
- C) Hexano:acetato de etilo 3:2
- D) Acetato de etilo:hexano 5:1
- E) Acetato de etilo:hexano 3:1
- F) Acetato de etilo:hexano 3:2
- G) Acetato de etilo:hexano 1:1

### 2.1.6 Condiciones de Análisis para CLAR FR-C18

Se utilizó un equipo Waters bomba 600, detector arreglo de diodos 2996

Se utilizaron las siguientes condiciones:

A)

Columna	Chromolith FR-18 Merck
Sistema de eluentes	Metanol
Flujo	1 mL/min.
Volumen de inyección	5 $\mu$ L
Tiempo de corrida	6 minutos
Longitud de onda	270 nm

B)

Columna	Chromolith FR-C18 Merck
Sistema eluente	Metanol
Flujo	1 mL/min
Volumen de inyección	15 $\mu$ L
Tiempo de corrida	6 minutos
Longitud de onda	230, 250 y 270 nm

## 2.2 Colecta de Plantas

### Plantas

Se eligieron plantas reportadas con actividad frente a enfermedades respiratorias, de acuerdo con criterios etnofarmacológicos y quimiotaxonómicos. La búsqueda se realizó en libros, tesis, revistas científicas, bases de datos etnobotánicas y etnofarmacológicos. Se tomó también como base la investigación de campo en mercados y hierberías localizadas en la región noreste de México. Se realizó la colecta en los municipios de Monterrey, Santa Catarina, Villa de García, Villa de Santiago y Agualeguas en el estado de Nuevo León y en el municipio de Arteaga del estado de Coahuila. Los especímenes fueron herborizados por el Biol. Marco Antonio Guzmán Lucio, la MC. María del Consuelo González de la Rosa y el Biol. Humberto Sánchez Vega y un espécimen de cada planta fue depositado en el Herbario institucional de la Facultad de ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León donde se les asignó un número de folio (Tabla 1).

### 2.3 Obtención de Extractos Metanólicos y Acuosos

Las 20 plantas colectadas se secaron a temperatura ambiente, se separaron en sus partes hojas, raíz, flor y fruto (las que fueron colectadas en época de floración o en fruto). Se molieron en molino malla de 2mm o en licuadora. Cien gramos de cada una de

las partes se extrajeron por maceración con metanol (3 x 600 mL), por 2 horas a temperatura ambiente. Para *Schinus molle* se usó hexano en lugar de metanol. Para *Chrysanthinia mexicana* se usó éter dietílico previo a la extracción con metanol. Los extractos obtenidos se filtraron y se evaporaron a presión reducida a 38 °C. Se realizaron extractos acuosos con agua destilada por maceración de algunos de los residuos de los extractos con metanol y hexano (Tabla 2). Los extractos acuosos se filtraron y sometieron a liofilización. Se calculó el porcentaje de recuperación de los extractos orgánicos y acuosos en base al material seco. Todos los extractos obtenidos se conservaron en frascos oscuros a -10 °C hasta su uso en las pruebas de actividad antimicrobiana.

#### 2.4 Determinación de Actividad Antimicrobiana de los Extractos Obtenidos

##### 2.4.1 Preparación de Soluciones de los Extractos

2 mg de cada uno de los extractos orgánicos se disolvieron en 200 µL de DMSO, se les agregó 800 µL de medio de cultivo, (CMH para *Staphylococcus aureus*, HTM para *Haemophilus influenzae* y CAMHB-LHB para *Streptococcus pneumoniae*). Los extractos acuosos se disolvieron con los medios de cultivo respectivos para cada microorganismo. La concentración final de todas las soluciones fue de 2 mg/mL. Las

soluciones orgánicas se esterilizaron por filtración con acrodiscos PTFE con filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  Gelman<sup>®</sup>. y las acuosas con acrodiscos GHP de 0.22  $\mu\text{m}$  Gelman<sup>®</sup>.

#### 2.4.2 Preparación de Inóculos

Las cepas de *Staphylococcus aureus* se inocularon en placas de AMH, se incubaron 18-24 horas a 37 °C. Cuatro a cinco colonias se transfirieron a 3 mL de CMH y se mantuvieron en las mismas condiciones de incubación; 18-24 horas a 37 °C, 0.5 mL de este cultivo se trasfirieron a 3 mL de CMH y se incubaron a 37 °C por 2 a 4 horas, con agitación a una velocidad de 150 rpm hasta obtener un crecimiento tal que se tuviera o presentara una turbidez igual al estándar 0.5 de Mc Farland. Se realizó una dilución 1:50 en CMH a partir del cultivo anterior para tener la suspensión de trabajo.

Las cepas de *Streptococcus pneumoniae* y *Hamophilus influenzae* se inocularon en placas de agar sangre y agar chocolate respectivamente y se incubaron a 37 °C por 18-24 horas. A partir del crecimiento obtenido se preparó una suspensión en HTM con una turbidez igual a la del estándar 0.5 de Mc Farland; de esta suspensión se preparó una dilución 1:50 en HTM para *Haemophilus influenzae* y 1:50 en CAMHB-LHB para *Streptococcus pneumoniae* para tener la suspensión de trabajo.

### 2.4.3 Preparación de Controles

#### A) Controles de Antibióticos

Se prepararon soluciones acuosas de 256  $\mu\text{g/mL}$  de cefalotina que se uso como control negativo y Vancomicina a la misma concentración empleada como control positivo. Estas soluciones se filtraron con acrodiscos GHP de 0.22  $\mu\text{m}$  Gelman<sup>®</sup>.

#### B ) Control de Solvente Utilizado

DMSO: Se esterilizó por filtración con acrodiscos GHP de 0.22  $\mu\text{m}$  Gelman<sup>®</sup>.

#### C) Otros controles

La preparación de los controles de extractos (control de turbidez y óxido-reducción del Alamar Azul), controles de crecimiento de los microorganismos y controles de esterilidad del medio de cultivo, se detallan en la descripción de la técnica de microdilución en placa.

#### 2.4.4 Descripción de la Técnica de Microdilución en Placa

Se depositaron 200  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada estéril a todos los pozos de la orilla (36 pozos). Se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo en el resto de los pozos, (CMH para *Staphylococcus aureus*, HTM para *Haemophilus influenzae* y CAMHB-LHB para *Streptococcus pneumoniae*). Posteriormente, se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  de la solución preparada de cada extracto y de los controles de solvente y antibióticos en los primeros pozos de cada carril. Se realizaron diluciones seriadas al doble, descartando los últimos 100  $\mu\text{L}$  de cada carril. Para los controles de extracto (control de turbidez y oxidoreducción), además del medio de cultivo se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del extracto correspondiente, posteriormente se hizo una dilución al doble para lo cual se extrajeron 100  $\mu\text{L}$  de esa solución y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  del medio de cultivo de forma que cada extracto llevó su control a una concentración de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En cada placa se incluyeron controles de medio y de crecimiento. El control de medio fue un pozo conteniendo únicamente 200  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo. Los controles de crecimiento fueron pozos en los cuales se adicionó el inóculo bacteriano pero no se les agregó fármaco o extracto.

Las concentraciones finales de cada extracto fue de 500, 250, 125, 62.5 y 31.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Las concentraciones para los medicamentos (vancomicina y cefalotina) fue de 64, 32, 16, 8 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Las microplacas se colocaron en bolsas de plástico, se incubaron de 18 a 24 horas a 37 °C y se revisó el crecimiento bacteriano visualmente. Para *Streptococcus pneumoniae* la presencia de turbidez y un color amarillo se tomó como indicador de crecimiento bacteriano. La ausencia de turbidez y color café se tomó como evidencia de no crecimiento bacteriano. Para *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae* la presencia de turbidez indicó crecimiento bacteriano y cuando se requirió, se reveló con 32 µL de una solución de Alamar Azul 1.6:1 en NaCl al 0.85%. Después de incubar por una hora a 37°C, se observó el viraje de color. Si se presentaba viraje a color rosa, se consideró que había crecimiento bacteriano.

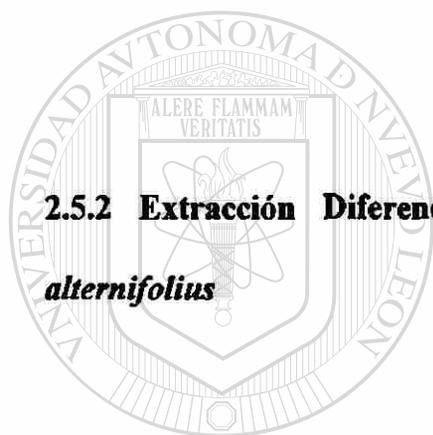
La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue definida como la concentración más baja de extracto que previene el crecimiento bacteriano.

## 2.5 Extracción Diferencial de los Extractos con Mayor Actividad

De acuerdo a resultados del objetivo anterior los extractos metanólicos de hojas de *Cordia boissieri* y de raíz de *Cyperus alternifolius* se fraccionaron por extracción líquido-líquido

### 2.5.1 Extracción Diferencial del Extracto Metanólico de Hojas de *Cordia boissieri*

Se preparó una solución de 6 gramos de extracto metanólico de hojas de *Cordia boissieri* con 200 mL de agua destilada y 50 mL de metanol. Se realizó la partición en embudo de separación con 3 x 200 mL de hexano. Al residuo acuoso se le realizó partición con 3 x 100 mL de acetato de etilo. El residuo acuoso se fraccionó con 3 x 100 mL de butanol.



### 2.5.2 Extracción Diferencial del Extracto Metanólico de Raíz de *Cyperus alternifolius*

Se preparó una solución de 6 gramos de extracto metanólico de Raíz de *Cyperus alternifolius* con 170 mL de agua destilada y 75 mL de metanol. Se realizó la partición en embudo de separación con 3 x 100 mL de hexano. Al residuo acuoso se le realizó partición con 3 x 100 mL de acetato de etilo. El residuo acuoso se fraccionó con 3 x 100 mL de butanol.

Las fracciones de hexano, de acetato de etilo y de butanol obtenidas de los dos extractos metanólicos se evaporaron a sequedad a presión reducida a 38°C y se mantuvieron en frascos oscuros de vidrio a -10°C hasta su uso.

## 2.6 Evaluación de la Actividad Antibacteriana de las Fracciones Obtenidas de la Extracción diferencial

La actividad antibacteriana de las fracciones de hexano, de acetato de etilo y de butanol, obtenidas por partición líquido-líquido de los extractos metanólicos de hojas de *Cordia boissieri* y de raíz de *Cyperus alternifolius*, se evaluó por la técnica de dilución en microplaca como se describió en el punto anterior 3.2.4. Se evaluó la actividad únicamente con las dos cepas de *Staphylococcus aureus* (IMSS-NL/HE25:01 resistente a oxacilina y ATTC 25923 sensible a oxacilina).

## 2.7 Aislamiento Biodirigido de Hojas de *Cordia boissieri*

### 2.7.1 Primera Extracción Masiva

Se realizó una colecta masiva de la planta en octubre del 2003 en el municipio de Villa de García N.L para realizar las extracciones. Se secaron las hojas a temperatura ambiente y se molieron en una licuadora. Se realizó una extracción con hexano de 800 gramos de hoja molida, por cada 50 g de muestra se usó 3 x 500 mL, para quitar la mayor parte de las grasas y aceites. Al residuo del extracto hexánico se le realizó una extracción con acetato de etilo, por cada 50 g de muestra se usó 3 x 500 mL. Las extracciones fueron realizadas con agitación a 180 rpm por 1 hora a temperatura

ambiente. Los extractos se filtraron y evaporaron a sequedad a presión reducida a 38 °C y se mantuvieron en frascos ámbar de vidrio a -10 °C hasta su uso.

### 2.7.1.1 Columna Flash (CF)

El extracto de acetato de etilo se fraccionó en columna flash con sílica gel 60 de tamaño de partícula 0.2 – 0.5 mm. Se utilizó 100 g de sílica por gramo de muestra. Se utilizó el sistema de eluentes que muestra la siguiente tabla:

Extracto sometido a columna flash	Eluente
Extracto de acetato de etilo de hojas de <i>Cordia boissieri</i>	Hexano
	Hexano : Acetato de etilo 20 : 1
	Hexano : Acetato de etilo 10 : 1
	Hexano : Acetato de etilo 7: 1
	Hexano : Acetato de etilo 5 : 1
	Hexano : Acetato de etilo 3 : 1
	Hexano : Acetato de etilo 3 : 2
	Hexano : Acetato de etilo 1 : 1
	Acetato de etilo
	Metanol

Las fracciones se evaporaron a sequedad a presión reducida a 38 °C y se mantuvieron en frascos ámbar de vidrio a -10 °C hasta su uso.

**2.7.1.1.1 Evaluación de Actividad Antimicrobiana de Fracciones Obtenidas de la Columna Flash.** Se evaluó la actividad antimicrobiana de todas las fracciones obtenidas de la columna Flash contra la cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina, (IMSS-NL/HE25:01), por medio de la técnica de bioautografía que a continuación se describe.

#### Técnica de bioautografía

Las fracciones se analizaron en cromatografía en capa fina (CCF), para lo cual se disolvieron en cloroformo y se sembraron en dos cromatofolios de aluminio de Sílica gel 60 F<sub>254</sub> de 3 x 10 cm. Se probaron los sistemas de eluentes descritos previamente (2.1.5.1) y finalmente se eligió el sistema F. Uno de los cromatofolios se usó como control para medir el R<sub>f</sub> de cada mancha observada a simple vista, por luz ultravioleta a 254 y 365 nm o revelada con vapores de yodo. El otro cromatofolio se esterilizó con luz ultravioleta a 254 nm por 1 hora, posteriormente se le colocó una capa de AMH previamente solidificado y sobre éste se añadieron 100 µL de una suspensión de *Staphylococcus aureus* (IMSS-NL/HE25:01 resistente a oxacilina) con una turbidez igual al estándar 0.5 de Mc Farland, (que se preparó por inoculación de 3 a 5 colonias del microorganismo a 3 ml de CMH e incubación a 37°C por 1-3 horas a 150 rpm hasta obtener la turbidez señalada). El cromatofolio se colocó en una caja Petri, se incubó en ambiente húmedo (colocando un algodón húmedo con agua destilada estéril), a 37 °C por 18-24 horas. Se colocó un control de esterilidad del medio. La zona de inhibición del crecimiento bacteriano se midió y se correlacionó con el R<sub>f</sub> previamente registrado. En

caso necesario se usó una solución acuosa de MTT a 2.5 mg/mL para revelar el crecimiento bacteriano (Verastegui, 2000).

### 2.7.1.2 Columna Lobar de Baja Presión en Sílica gel (CLSG)

Las fracciones F9CF-190104-14, F10CF-190104-14, F11CF-190104-14 y F12CF-190104-14, obtenidas de la columna flash, resultaron activas y se fraccionaron en columna de baja presión Lobar Si 60 (40-63  $\mu\text{m}$ ). Las fracciones se disolvieron por separado en hexano:acetato de etilo (7:1). Los sistemas de eluentes fueron los siguientes:

Fracción obtenida de CF y sometida a columna de baja presión de sílica gel	Eluente
	Hexano : Acetato de etilo 7:1
	Hexano : Acetato de etilo 5:1
	Hexano : Acetato de etilo 3:1
	Hexano : Acetato de etilo 3:2
F9CF-190104-14	Acetato de etilo
	Acetato de etilo : Metanol 40:1
	Acetato de etilo : Metanol 20:1
	Acetato de etilo : Metanol 5:1
	Acetato de etilo : Metanol 3:1
	Acetato de etilo : Metanol 1:1
	Metanol
F10CF-190104-14	Hexano : Acetato de etilo 7: 1
	Hexano : Acetato de etilo 5: 1
	Hexano:Acetato de etilo 3:1
	Hexano:Acetato de etilo 3:2
	Hexano:Acetato de etilo 1:1
	Acetato de etilo
	Metanol

Fracción obtenida de CF y sometida a columna de baja presión de sílica gel	Eluente
F11CF-190104-14	Hexano : Acetato de etilo 7: 1
	Hexano : Acetato de etilo 5: 1
	Hexano:Acetato de etilo 3:1
	Hexano:Acetato de etilo 1:1
	Acetato de etilo
	Metanol
F12CF-190104-14	Hexano : Acetato de etilo 5: 1
	Hexano:Acetato de etilo 3:1
	Hexano:Acetato de etilo 1:1
	Acetato de etilo
	Acetato de etilo : Metanol 20:1
	Acetato de etilo : Metanol 10:1
	Acetato de etilo : Metanol 5:1
	Acetato de etilo : Metanol 1:1 Metanol

Se utilizó un flujo de 1.5 mL/min. Se colectaron fracciones manualmente de acuerdo con los cambios de color observados en la columna. Las fracciones se evaporaron a sequedad a presión reducida a 38 °C y se mantuvieron en frascos ámbar de vidrio a -10 °C hasta su uso.

**2.7.1.2.1 Evaluación de Actividad Antimicrobiana de Fracciones Obtenidas de la Columna Lobar de Baja Presión en Sílica gel.** Se evaluó la actividad antimicrobiana de todas las fracciones obtenidas de las columnas Lobar de sílica gel contra la cepa de *Staphylococcus aureus* (IMSS-NL/HE25:01 resistente a oxacilina), por medio de la técnica de bioautografía como se describió previamente (2.7.1.1.1).

### 2.7.1.3 Columna Lobar de Baja Presión en Fase Reversa C18 (CLFRC18)

Las fracción F7LS-120204-16 y la fracción F10LS-120204-16F obtenidas de la columna Lobar de baja presión de sílica gel, se sometieron a columna de baja presión Lobar de fase reversa C18.

Fracciones activas obtenidas de CLSG y sometidas a columna de baja presión de FR-C18	Eluente
F7LS-120204-16	Metanol
F10LS-120204-16	Metanol

La muestra se disolvió en metanol. Se usó metanol como sistema eluente. Se utilizó un flujo de 0.25 mL/min. Se colectaron manualmente fracciones de 1.5 mL. Las fracciones se evaporaron a sequedad a presión reducida a 38 °C y se mantuvieron en frascos oscuros de vidrio a -10 °C hasta su uso.

**2.7.1.3.1 Evaluación de Actividad Antimicrobiana de Fracciones Obtenidas de la Columna Lobar de Baja Presión en Fase Reversa C18.** Se evaluó la actividad antimicrobiana de todas las fracciones obtenidas de la columna de baja presión en fase reversa C18 con la cepa de *Staphylococcus aureus* (IMSS-NL/HE25:01 resistente a

oxacilina), por medio de la técnica de bioautografía como se describió previamente (2.7.1.1.1).

**2.7.1.3.2 Análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución fase reversa C18 (CLAR FR-C18) de fracciones obtenidas de CLFRC18.** Las fracciones activas obtenidas de la columna Lobar FR-C18, se sometieron a cromatografía analítica por CLAR FR-C18 para revisar pureza. Se utilizaron las condiciones de análisis A.

Fracciones activas obtenidas de CLSG y sometidas a columna de baja presión de FR-C18	Fracciones activas obtenidas de CLFRC18 y analizadas por CLAR FRC18
F7LS-120204-16	F3LFR-300504-29
	F4LFR-300504-29
	F5LFR-300504-29
	F6LFR-300504-29
	F7LFR-300504-29
	F8LFR-300504-29
F10LS-120204-16	F7LFR-010604-30
	F8LFR-010604-30
	F9LFR-010604-30
	F10LFR-010604-30
	F11LFR-010604-30
	F12LFR-010604-30
	F13LFR-010604-30
	F14LFR-010604-30
F15LFR-010604-30	

#### 2.7.1.4 Columna de Exclusión Molecular (EM)

Las fracciones activas obtenidas de la columna Lobar FR-18, se pasaron por una columna de exclusión molecular para tratar de purificarlas, para lo cual se usó sephadex

(Lipophilic sephadex LH-20). Se utilizó metanol como sistema eluente. Las fracciones se separaron en base a la fluorescencia que presentaron en luz ultravioleta a 365 nm. Se descartaron las fracciones que mostraron fluorescencia roja que correspondía a las clorofilas.

**2.7.1.4.1 Análisis de las Fracciones Obtenidas de la Columna de Exclusión Molecular por Cromatografía Líquida de Alta Resolución Fase Reversa C18 (CLAR FR-C18).** Las fracciones obtenidas de la columna de exclusión molecular libres de clorofilas, se sometieron a cromatografía de líquidos de alta resolución FR-C18, para revisar su pureza. Las fracciones analizadas fueron las siguientes:

Fracciones activas obtenidas de CLSG y sometidas CLFR-C18	Fracciones activas obtenidas de CLFR-C18 y sometidas a EM	Fracciones obtenidas de EM y analizadas por CLAR FR-C18
F7LS-120204-16 3:1E	F3LFR-300504-29 T3	F1EM-120704-53
		F2EM-120704-53
		F3EM-120704-53
	F4LFR-300504-29 T4	F4EM-120704-53
	F5LFR-300504-29 T5	F6EM-120704-53
		F7EM-120704-53
	F6LFR-300504-29 T6	F9EM-120704-53
		F10EM-120704-53
	F7LFR-300504-29 T7	F12EM-120704-53
		F13EM-120704-53
		F14EM-120704-53
		F16EM-120704-53
	F8LFR-300504-29 T8	F17EM-120704-53
		F18EM-120704-53

Fracciones activas obtenidas de CLSG y sometidas CLFR-C18	Fracciones activas obtenidas de CLFR-C18 y sometidas a EM	Fracciones obtenidas de EM y analizadas por CLAR FR-C18
F10LS-120204-16 3:2AB	F7LFR-010604-30 T7	F1EM-180704-54
		F2EM-180704-54
	F8LFR-010604-30 T8	F4EM-180704-54
		F5EM-180704-54
	F9LFR-010604-30 T9	F7EM-180704-54
		F8EM-180704-54
	F10LFR-010604-30 T10	F10EM-180704-54
		F11EM-180704-54
	F14LFR-010604-30 T14	F13EM-180704-54
		F14EM-180704-54
	F15LFR-010604-30 T15	F16EM-180704-54
		F17EM-180704-54

### 2.7.2 Segunda Extracción Masiva

Se realizó una segunda colecta masiva de la planta *Cordia boissieri* en octubre del 2004 en el municipio de Villa de García N.L. Se secaron las hojas a temperatura ambiente y se molieron en una licuadora. Se realizó una extracción con hexano de 2 Kg de hoja molida: por cada 50 g de muestra se usó 3 x 500 mL, para quitar la mayor parte de las grasas y aceites. Al residuo del extracto hexánico se le realizó una extracción con acetato de etilo: por cada 50 g de muestra se usó 3 x 500 mL. Las extracciones fueron realizadas con agitación a 180 rpm por 1 h a temperatura ambiente. Los extractos se

filtraron y evaporaron a sequedad a presión reducida a 38 °C. y se mantuvieron en frascos ámbar de vidrio a -10 °C hasta su uso.

### 2.7.2.1 Columna Flash (CF)

El extracto de acetato de etilo se fraccionó en columna flash con sílica gel 60 de tamaño de partícula 0.2 - 0.5 mm. Se utilizó 100 g de sílica por gramo de muestra. Se utilizó el sistema de eluentes que muestra la siguiente tabla:

Extracto sometido a columna flash	Eluente
Extracto de acetato de etilo de hojas de <i>Cordia boissieri</i>	Hexano
	Hexano : Acetato de etilo 20 : 1
	Hexano : Acetato de etilo 10 : 1
	Hexano : Acetato de etilo 7 : 1
	Hexano : Acetato de etilo 5 : 1
	Hexano : Acetato de etilo 3 : 2
	Hexano : Acetato de etilo 1 : 1
	Acetato de etilo
	Metanol

Las fracciones se evaporaron a sequedad a presión reducida a 38 °C y se mantuvieron en frascos ámbar de vidrio a -10 °C hasta su uso.

**2.7.2.1.1 Evaluación de Actividad Antimicrobiana de Fracciones Obtenidas en la Columna Flash.** Se evaluó la actividad antimicrobiana de todas las fracciones obtenidas de la columna flash con la cepa de *Staphylococcus aureus* (IMSS-NL/HE25:01 resistente a oxacilina), por medio de la técnica de bioautografía como se describió previamente (2.7.1.1.1).

### 2.7.2.2 Columna Lobar de Baja Presión en Sílica (CLSG)

Las fracciones F2CF-221104-72 y F3CF-221104-72 eluidas de la columna flash, resultaron activas y se sometieron a fraccionamiento en columna de baja presión Lobar Si 60 (40-63  $\mu\text{m}$ ). Cada una de las fracciones se disolvió por separado en hexano:acetato de etilo (3:2). Los sistemas de eluentes utilizados fueron los siguientes:

Fracción obtenida de CF y sometida a columna lobar de baja presión de sílica gel	Eluente
F2CF-221104-72	Hexano : Acetato de etilo 5 : 1
	Hexano : Acetato de etilo 3 : 2
	Hexano : Acetato de etilo 1 : 1
	Acetato de etilo
	Metanol
F3CF-221104-72	Hexano : Acetato de etilo 3 : 2
	Hexano : Acetato de etilo 1 : 1
	Acetato de etilo
	Metanol

Se utilizó un flujo de 1.5 mL/min. Se colectaron fracciones manualmente de acuerdo con los cambios de color observados en la columna. Las fracciones se evaporaron a sequedad a presión reducida a 38 °C y se mantuvieron en frascos ámbar de vidrio a -10 °C hasta su uso.

**2.7.2.2.1 Evaluación de Actividad Antimicrobiana de las Fracciones Obtenidas de la Columna Lobar de Sílica gel.** Se evaluó la actividad antimicrobiana de todas las fracciones obtenidas de las columnas lobar de sílica gel con la cepa de *Staphylococcus aureus* (IMSS-NL/HE25:01 resistente a oxacilina), por medio de la técnica de bioautografía como se describió previamente (2.7.1.1.1).

### 2.7.2.3 Columna Lobar de Baja Presión en Fase Reversa C18 (CLFR-C18)

Las siguientes fracciones obtenidas de la columna lobar de sílica gel, se sometieron a columna de baja presión Lobar FR-C18.

Fracciones activas obtenidas de CLSG y sometidas a columna de baja presión de FR-C18	Eluente
F5LS-121204-72	Metanol
F6LS-121204-72	
F7LS-121204-72	
F3LS-151204-73	Metanol
F4LS-151204-73	
F5LS-151204-73	
F6LS-151204-73	
F7LS-151204-73	

Cada una de las fracciones se disolvió por separado en metanol. Se usó este mismo solvente como sistema eluente. Se utilizó un flujo de 0.25 mL/min. Se colectaron manualmente fracciones de 1.5 mL. Las fracciones se evaporaron a sequedad a presión reducida a 38 °C y se mantuvieron en frascos oscuros de vidrio a -10 °C hasta su uso. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**2.7.2.3.1 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de las Fracciones Obtenidas de la Columna Lobar de Baja Presión Fase Reversa C18.** Se evaluó la actividad antimicrobiana de todas las fracciones obtenidas de la columna Lobar FR-C18 por medio de la técnica de bioautografía como se describió previamente, (2.7.1.1.1). Se evaluó únicamente con la cepa de *Staphylococcus aureus* (IMSS-NL/HE25:01 resistente a oxacilina).

**2.7.2.3.2 Análisis de las Fracciones Obtenidas de la Columna Lobar de Baja Presión de Fase Reversa C18 por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR FR-C18).** Las fracciones activas obtenidas de la columna Lobar FR-C18, se sometieron a cromatografía analítica por cromatografía líquida de alta resolución FR-C18 para revisar pureza. Se utilizaron las condiciones de análisis B.

## **2.8 Purificación y Determinación de la Estructura Química de Compuestos Activos**



A la fracción F3LFR-261204-75 obtenida de la columna Lobar fase reversa C18 se le evaporó lentamente el solvente (metanol) y se obtuvo un precipitado blanco en forma de polvo, el cual se sometió a diversos análisis.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

---

**2.8.1 Análisis de Pureza**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

F3LFR-261204-75 se disolvió en metanol grado HPLC, se le hizo análisis de pureza por HPLC FR-C18.

Se analizó con las condiciones de análisis A

### 2.8.2 Espectroscopia UV-Vis

Se utilizó el detector de arreglo de diodos 2996 del equipo HPLC Waters bomba 600 para obtener el espectro UV-Vis en un rango de 200 a 600 nm de F3LFR-261204-75

### 2.8.3 Espectroscopia IR

Se obtuvo el espectro IR del compuesto F3LFR-261204-75 de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ . Se utilizó un espectrofotómetro de IR con FT, marca PE, modelo Spectrum One, accesorio ATR, No. Scan 32.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

### 2.8.4 Espectroscopia de RMN

Cinco mg del compuesto F3LFR-261204-75 previamente secado en pistola de desecación se disolvió en cloroformo deuterado (100 % D), se filtró y desgasificó por burbujeo de argón. Esta solución se colocó en una sonda de detección directa para RMN de 5 mm de diámetro. Se le realizaron los siguientes espectros:  $^1\text{H}$ RMN,  $^{13}\text{C}$ RMN, DEPT 135, Espectros de doble dimensión COSY, HMBC, HMQC, y experimentos nOe.

### 2.8.5 Espectrometría de masas

Un mg del compuesto F3LFR-261204-75 se disolvió en 100  $\mu$ L de metanol grado HPLC y se analizó por HPLC – espectrometría de masas por inyección en flujo. Se utilizó un equipo Waters Thermabeam Mass Detector con ionización electrónica.

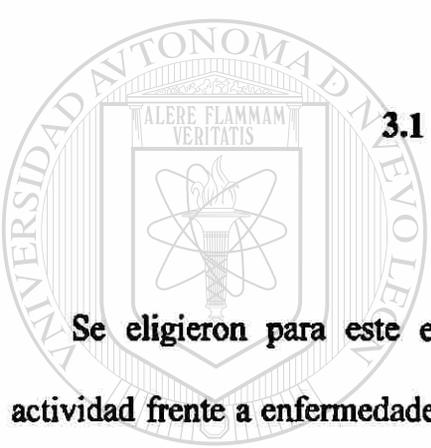
### 2.9 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del Compuesto Aislado y Otras fracciones Activas

Se determinó la concentración mínima inhibitoria del compuesto F3LFR-261204-75 y de las fracciones F6LFR-281204-78 y F8LFR-281204-78 por medio de la técnica de microdilución en placa. Las concentraciones analizadas fueron las siguientes: 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.9, 1.95, 0.976 a  $\mu$ g/mL tanto para el compuesto aislado como para las fracciones.

## **CAPÍTULO 3**

### **RESULTADOS**

#### **3.1 Colecta de Plantas a Evaluar**



Se eligieron para este estudio plantas del noreste de México reportadas con actividad frente a enfermedades respiratorias. Se realizó la colecta en los municipios de Monterrey, Santa Catarina, Villa de García, Villa de Santiago y Agualeguas en el estado de Nuevo León y en el municipio de Arteaga del estado de Coahuila. Los especímenes fueron herborizados por el Biol. Marco Antonio Guzmán Lucio, la MC. María del Consuelo González de la Rosa y el Biol. Humberto Sánchez Vega y un espécimen de cada planta fue depositado en el Herbario institucional de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León donde se les asignó un número de folio. Las plantas colectadas se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Plantas elegidas siguiendo criterios etnofarmacológicos y quimiotaxonómicos

Planta (Familia)	Nombre común	Uso popular	Estudios reportados	Lugar de Colecta	No. Voucher-UAN
<i>Ceanothus coeruleus</i> Lag. (Rhamanceae)	Conchinchilla	Fiebre, dolor de garganta	<i>C. americanus</i> Triterpenoides y flavonoides contra <i>Sreptococcus mutans</i> (Li y cols. 1997)	Arteaga Coah.	024099
<i>Clematis drummondii</i> T & G. (Ranunculaceae)	Barbas de Chivo	Congestión nasal	<i>C. hirsutaen</i> Contra hongos No activo contra <i>S. aureus</i> (Hermans y cols. 2002)	García N.L.	024164
<i>Colubrina greggii</i> Wats. (Rhamanceae)	Guajolote	Fiebre	<i>C. glabra</i> contra <i>S. aureus</i> y <i>S. faecalis</i> Dimayuga y cols. 1998)	Santiago N.L.	024169
<i>Cordia boissieri</i> A. DC. (Borraginaceae)	Anacahuita	Tuberculosis, tos	—	Monterrey N.L.	024167
<i>Chrysactinia mexicana</i> Gray (Compositae)	Hierba de San Nicolás	Infecciones respiratorias	Actividad contra <i>M. tuberculosis</i> y <i>M. avium</i> (Cantrell y cols. 1998)	Arteaga Coah.	024102
<i>Cyperus alternifolius</i> L. (Cyperaceae)	Papiro	inespecífica	<i>C. esculentes</i> contra <i>S. aureus</i> 1998) <i>C. articulatus</i> No activa contra <i>S. aureus</i> (Koné y cols. 2004)	Santiago, NL.	024101
<i>Eupatorium cardiophyllum</i> Rab. (Compositae)	—	*	<i>E. havanense</i> contra <i>M. tuberculosis</i> y <i>M. avium</i> (Cantrell y cols. 1998)	Santiago, N.L.	024094
<i>Eupatorium odoratum</i> L. (Compositae)	Crucita	Dolor de pecho, afecciones pulmonares		Santiago, N.L.	024100
<i>Heliotropium angiospermum</i> Murr (Borraginaceae)	Cola de escorpión	Afecciones pulmonares, faringitis	<i>H. subulatum</i> compuestos contra <i>S. pneumoniae</i> <i>S. aureus</i> (Singh y cols. 2002) <i>H. ellipticum</i> triterpenos contra <i>S. aureus</i> y <i>K. pneumoniae</i> (Jain y cols. 2001)	García N.L.	024172

Tabla 1. (continuación)

Planta (Familia)	Nombre común	Uso popular	Estudios reportados	Lugar de Colecta	No. Voucher- UAN
<i>Leucophyllum frutescens</i> (Berl.) I.M.Johnst. (Escrophulariaceae)	Cenizo	Tuberculosis, bronquitis	—	Monterrey, N.L.	024165
<i>Porlieria angustifolia</i> (Zigophylaceae)	Guayacán	Tuberculosis, tos, escalofríos	—	Agualeguas, N.L.	024173
<i>Phyla nodiflora</i> (L.) Greene. (Verbenaceae)	Cola de Caballo	Fiebre, escalofríos	<i>Lippia alba</i> contra <i>S. aureus</i> y <i>S. faecalis</i> (Dimayuga 1998) <i>Lippia turbinata</i> contra <i>M. tuberculosis</i> (Watcher 2001)	Santiago, N.L.	024168
<i>Rivinia humilis</i> L.(Phytolacaceae)	Coralillo	inespecífica	No activo contra <i>B. cereus</i> y <i>E. coli</i> (Ankli y cols. 2002) activo contra <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> y <i>S. aureus</i> (Salvat y cols. 2001)	Santiago, N.L.	024170
<i>Salvia chia</i> Fernald(Labiatae)	-	*	<i>S. multicaulis</i> dos compuestos	Santiago, N.L.	024103
<i>Salvia coccinea</i> Murr (Labiatae)	Mirto	*	activos contra <i>S. aureus</i> y	Santiago, N.L.	024096
<i>Salvia reflexa</i> Hornem (Labiatae)	Hierba del pajarito	*	<i>S. epidermidis</i> (Ulubelen y cols. 2001)	Santiago, N.L.	024095
<i>Sambucus mexicana</i> Presl.(Capripholiaceae)	Sauco	Congestión de pecho, tos, frío, fiebre, dolor de garganta	<i>S. mexicana</i> var. <i>bipinnata</i> No activo contra <i>S. aureus</i> (Rojas y cols. 2003)	Santiago, N.L.	024171
<i>Schinus molle</i> L.(Anacardiaceae)	Pirul	Tuberculosis, bronquitis, escalofríos, fiebre, expectorante, asma	<i>S. terebentifolius</i> contra bacterias y hongos (Martínez y cols. 1996) <i>S. molle</i> aceites esenciales contra <i>K. pneumoniae</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> (Gundiza 1993)	Arteaga, Coah.	024166

Tabla 1. (continuación)

Planta (Familia)	Nombre común	Uso popular	Estudios reportados	Lugar de Colecta	No. Voucher-UAN
<i>Scutellaria elliptica</i> Muhl (Labiatae)	---	Tos, expectorante, fiebre y escalofríos	<i>S. barbata</i> apigenina y luteolina contra <i>S. aureus</i> (MRSA) (Yu J y cols. 2004)	Arteaga, Coah.	024104
<i>Smilax bona nox</i> L. (Smilacaceae)	Zarzaparrilla	Tos, fiebre, calorfríos y expectorante	----	Santiago, N.L.	024098

\* Plantas elegidas por criterio quimiotaxonómico

### 3.2 Obtención de Extractos Metanólicos y Acuosa

Las 20 plantas colectadas se secaron, cada una de ellas se separó en sus diferentes partes, se realizaron los extractos y se calcularon los porcentajes de recuperación en base al material seco; los porcentajes de recuperación se registran en la tabla 2.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 2. Porcentajes de recuperación de extractos obtenidos de las diferentes plantas

Parte de la planta	Solvente	Porcentaje de Recuperación (p/p)
<b><i>Schinus molle</i></b>		
Hoja	Metanol	15.5
	Agua	5.6
Flor	Metanol	18.1
Corteza	Metanol	4.3
Fruto	Hexano	6.7
	Agua	11.4
Raíz	Metanol	13.2
<b><i>Cordia alliodora</i></b>		
Hoja	Metanol	10.0
Flor	Metanol	17.8
	Agua	8.8
Fruto	Metanol	5.0
	Agua	7.4
Raíz	Metanol	2.9
<b><i>Leucophyllum frutescens</i></b>		
Hoja	Metanol	22.8
	Agua	6.3
Flor	Metanol	39.2
Raíz	Metanol	7.3
<b><i>Salvia reflexa</i></b>		
Hoja	Metanol	9.8
	Agua	6.3
Flor	Metanol	13.4
Raíz	Metanol	3.8
<b><i>Salvia affinis hispanica</i></b>		
Hoja	Metanol	22.4
	Agua	6.9
Raíz	Metanol	11.0
<b><i>Salvia coccinea</i></b>		
Hoja	Metanol	32.1
Raíz	Metanol	8.0
<b><i>Smilax bona nox</i></b>		
Hoja	Metanol	27.1
	Agua	4.8
Raíz	Metanol	14.8
<b><i>Lippia nodiflora</i></b>		
Hoja	Metanol	5.5
	Agua	8.8
Raíz	Metanol	19.8
<b><i>Colubrina greggi</i></b>		
Hojas	Metanol	12.7
Flor	Metanol	12.0
Raíz	Metanol	5.6

Tabla 2. (continuación)

Parte de la planta	Solvente	Porcentaje de Recuperación (p/p)
<b><i>Ceanothus coeruleus</i></b>		
Hojas	Metanol	14.4
Flor/Fruto	Metanol	29.2
Raíz	Metanol	13.8
<b><i>Sambucus mexicana</i></b>		
Hojas	Metanol	11.1
Flor/Fruto	Metanol	24.5
<b><i>Eupatorium cadiophyllum</i></b>		
Hojas	Metanol	7.3
Flor	Metanol	5.7
Raíz	Metanol	5.3
<b><i>Eupatorium odoratum</i></b>		
Hojas	Metanol	8.5
Flor	Metanol	16.4
Raíz	Metanol	3.6
<b><i>Cyperus alternifolius</i></b>		
Hojas	Metanol	10.4
Raíz	Metanol	9.0
<b><i>Rivina humilis</i></b>		
Hojas	Metanol	6.2
Flor/Fruto	Metanol	10.2
Raíz	Metanol	18.4
<b><i>Scutellaria elliptica</i></b>		
Hojas	Metanol	1.5
Flor/Fruto	Metanol	11.0
Raíz	Metanol	12.0
<b><i>Heliotropium angiospermum</i> Murr</b>		
Hojas	Metanol	11.4
Flor/Fruto	Metanol	7.5
<b><i>Clematis drumondii</i></b>		
Hojas	Metanol	9.5
<b><i>Salvia chia</i></b>		
Hojas	Metanol	6.5
Flor/Fruto	Metanol	7.7
Raíz	Metanol	2.3
<b><i>Chrysactinia mexicana</i></b>		
Hojas	Éter etílico	2.0
	Metanol	10.4
Flor	Éter etílico	3.0
	Metanol	10.0
Flor	Éter etílico	1.2
	Metanol	3.6
<b><i>Porlieria angustifolia</i></b>		
Hojas	Metanol	14.4
Raíz	Metanol	12.0

### 3.3 Determinación de Actividad Antimicrobiana de los Extractos Obtenidos

Se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos, para lo cual se obtuvo la concentración mínima inhibitoria por la técnica de microdilución en placa. Los valores obtenidos se registran en la tabla 3.

Tabla 3. Valores de CMI de los extractos crudos de plantas contra microorganismos causantes de infecciones respiratorias.

Planta parte de planta	Extracto	Actividad Antimicrobiana, CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
		Microorganismo					
		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Haemophilus influenzae</i>		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
		Resistente IMSS- NL/HE25:01	Sensible ATCC 25923	Resistente ATCC 49247	Sensible 90-cch-02	Resistente ATCC 49619	Resistente 24- ccpn-02
<i>Schinus molle</i>							
Hoja	Metanol	NA	NA	NA	NA	500	250
	Agua	NR	NR	NA	NA	NA	NA
Flor	Metanol	NA	NA	NA	NA	250	250
Corteza	Metanol	NA	NA	500	NA	NA	250
Fruto	Hexano	NA	NA	500	NA	62.5	62.5
	Agua	NR	NR	NA	NA	NA	NA
Raíz	Metanol	NA	NA	500	500	500	250
<i>Cordia boissieri</i>							
Hoja	Metanol	250	250	500	NA	125	125
Flor	Metanol	NA	NA	NA	NA	500	250
	Agua	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fruto	Metanol	NA	NA	NA	NA	500	250
	Agua	NR	NR	NA	NA	NA	NA
Raíz	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	250
<i>Leucophyllum frutescens</i>							
Hoja	Metanol	NA	NA	NA	NA	500	500
	Agua	NR	NR	NA	500	NA	NA
Flor	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	500
Raíz	Metanol	NA	NA	NA	NA	250	250
<i>Salvia reflexa</i>							
Hoja	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	500
	Agua	NR	NR	NA	NA	NA	NA
Flor	Metanol	NA	NA	500	NA	500	500
Raíz	Metanol	NA	NA	NA	NA	500	250

Tabla 3. (continuación)

Planta partede planta	Extracto	Actividad Antimicrobiana, CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
		Microorganismo					
		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Haemophilus influenzae</i>		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
		Resistente IMSS- NL/HE25:01	Sensible ATCC 25923	Resistente ATCC 49247	Sensible 90-cch-02	Resistente ATCC 49619	Resistente24- ccpa-02
<b><i>Salvia affinis hispanica</i></b>							
Hoja	Metanol	NA	NA	NA	NA	500	500
	Agua	NR	NR	NA	NA	NA	500
Raíz	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	500
<b><i>Salvia coccinea</i></b>							
Hoja	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Raíz	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b><i>Smilax bona nox</i></b>							
Hoja	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Agua	NR	NR	NA	NA	NA	NA
Raíz	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b><i>Phyla nodiflora</i></b>							
Hoja	Metanol	NA	NA	500	NA	NA	500
	Agua	NR	NR	NA	NA	NA	NA
Raíz	Metanol	NA	NA	NA	NA	500	250
<b><i>Colubrina greggi</i></b>							
Hojas	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Flor	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Raíz	Metanol	NA	NA	NA	NA	500	500
<b><i>Cyperus alternifolius</i></b>							
Hojas	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Raíz	Metanol	500	500	500	NA	NA	500
<b><i>Rivina humilis</i></b>							
Hojas	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Flor/Fruto	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Raíz	Metanol	NA	NA	NA	NA	500	500
<b><i>Scutellaria elliptica</i></b>							
Hojas	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Flor/Fruto	Metanol	NA	NA	NA	NA	250	500
Raíz	Metanol	NA	NA	NA	NA	500	500
<b><i>Clematis drumondii</i></b>							
Hojas	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	500
<b><i>Heliotropium angiospermum</i></b>							
Hojas	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Flor/Fruto	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b><i>Ceanothus coeruleus</i></b>							
Hojas	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Flor/Fruto	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Raíz	Metanol	500	500	500	500	500	500
<b><i>Sambucus mexicana</i></b>							
Hojas	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Flor/Fruto	Metanol	NA	NA	NA	NA	500	500

Tabla 3. (continuación)

Planta partede planta	Extracto	Actividad Antimicrobiana, CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
		Microorganismo					
		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Haemophilus influenzae</i>		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
		Resistente IMSS- NL/HE25:01	Sensible ATCC 25923	Resistente ATCC 49247	Resistente IMSS-2501	Resistente ATCC 49619	Resistente 24-ccpn-02
<i>Eupatorium cadiophyllum</i>							
Hojas	Metanol	NA	NA	NA	NA	250	250
Flor	Metanol	NA	NA	NA	NA	250	250
Raíz	Metanol	NA	NA	NA	NA	250	500
<i>Eupatorium odoratum</i>							
Hojas	Metanol	NA	NA	NA	NA	250	250
Flor	Metanol	NA	NA	NA	NA	500	500
Raíz	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	500
<i>Salvia chia</i>							
Hojas	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	500
Flor/Fruto	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	500
Raíz	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	500
<i>Chrysactinia mexicana</i>							
Hojas	É. etílico	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	500
Flor	É. etílico	NA	NA	500	NA	NA	500
	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	500
Raíz	É. etílico	NA	NA	500	500	500	250
	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	500
<i>Porlieria angustifolia</i>							
Hojas	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	500
Raíz	Metanol	NA	NA	NA	NA	NA	500

NA, no activa a 500  $\mu\text{g/ml}$ . NR, no realizado.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 3.4 Extracción Diferencial del o los Extractos Metanólicos con Mayor Actividad

Los extractos metanólicos de hojas de *Cordia boissieri* y de raíz de *Cyperus alternifolius* se fraccionaron por extracción líquido-líquido con hexano, acetato de etilo y butanol. Se calcularon los porcentajes de recuperación, los resultados obtenidos se registran en la tabla 4.

### 3.5 Evaluación de la Actividad Antibacteriana de las Fracciones Obtenidas de la Extracción Diferencial

La actividad antibacteriana de las fracciones de hexano, de acetato de etilo y de butanol, obtenidas por partición líquido-líquido de los extractos metanólicos de hojas de *Cordia boissieri* y de raíz de *Cyperus alternifolius*, se evaluó por la técnica de microdilución en placa. Se evaluó la actividad con la cepa de *S. aureus* resistente a oxacilina (IMSS-NL/HE25:01 y con la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sensible a oxacilina). Los valores de CMI obtenidos se registran en la tabla 4.

Tabla 4. Porcentajes de recuperación y valores de CMI de fracciones obtenidas de extractos metanólicos de hojas de *Cordia boissieri* y de raíz de *Cyperus alternifolius*.

Planta Extracto con mejor actividad	Solvente de fraccionamiento del extracto metanólico	Porcentaje de recuperación	Actividad antimicrobiana, CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	
			Microorganismos	
			<i>Staphylococcus aureus</i> (®)	
			IMSS- NL/HE25:01	Sensible ATCC 25923
<i>Cordia boissieri</i> Metanólico de Hojas	Hexano	15.7	62.5	500
	Acetato de etilo	21.4	62.5	125
	Butanol	35.7	NA	NA
<i>Cyperus alternifolius</i> Metanólico de Raíz	Hexano	11.6	500	NA
	Acetato de etilo	8.3	125	125
	Butanol	18.3	250	250

### 3.6 Aislamiento Biodirigido de Hojas de *Cordia boissieri*

#### 3.6.1 Primera Extracción Masiva

De 800 gramos de hoja seca se obtuvieron 14 g de extracto de acetato de etilo libre grasas o con poca cantidad de éstas.

##### 3.6.1.1 Columna Flash (CF)

El extracto de acetato de etilo se fraccionó en columna flash con sílica gel 60, las fracciones obtenidas se muestran en la tabla 5.

---

**3.6.1.1.1 Evaluación de Actividad Antimicrobiana de Fracciones Obtenidas de Columna Flash.** Se evaluó la actividad antimicrobiana de todas las fracciones obtenidas de la columna flash contra la cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina (IMSS-NL/HE25:01), por medio de la técnica de bioautografía. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Fracciones obtenidas de la columna flash y resultados de actividad antimicrobiana.

Extracto sometido a columna flash	Fracciones obtenidas	Actividad antimicrobiana por bioautografía
Extracto de acetato de etilo de hojas de <i>Cordia boissieri</i>	F1CF-190104-14	(-)
	F2CF-190104-14	(-)
	F3CF-190104-14	(-)
	F4CF-190104-14	(-)
	F5CF-190104-14	(-)
	F6CF-190104-14	(+)
	F7CF-190104-14	(+)
	F8CF-190104-14	(+)
	F9CF-190104-14	(+)
	F10CF-190104-14	(+)
	F11CF-190104-14	(+)
	F12CF-190104-14	(+)
	F13CF-190104-14	(+)

### 3.6.1.2 Columna Lobar de Baja Presión en Sílica gel (CLSG)

Las fracciones F9CF-190104-14, F10CF-190104-14, F11CF-190104-14 y F12CF-190104-14 obtenidas de la columna flash, resultaron activas y se sometieron a fraccionamiento en columna de baja presión lobar Si 60 (40-63  $\mu\text{m}$ ). Las fracciones obtenidas se presentan en la tabla 6.

#### 3.6.1.2.1 Evaluación de Actividad Antimicrobiana de Fracciones Obtenidas de la Columna Lobar de Baja Presión en Sílica gel.

Se evaluó la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas de las columnas lobar de sílica gel contra la cepa de *Staphylococcus aureus* (IMSS-NL/HE25:01 resistente a oxacilina), por medio de la técnica de bioautografía. Los resultados se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Fracciones obtenidas de las columnas de sílica y resultados de actividad antimicrobiana.

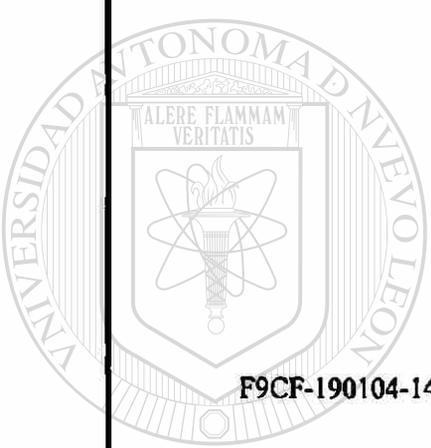
Fracción obtenida de CF y sometida a columna lobar de baja presión de sílica gel	Fracciones obtenidas	Actividad antimicrobiana por bioautografía
 <p>F9CF-190104-14</p>	F1LS-120204-16	(-)
	F2LS-120204-16	(-)
	F3LS-120204-16	(+)
	F4LS-120204-16	(-)
	F5LS-120204-16	(-)
	F6LS-120204-16	(+)
	F7LS-120204-16	(+)
	F8LS-120204-16	(+)
	F9LS-120204-16	(+)
	F10LS-120204-16	(+)
	F11LS-120204-16	(+)
	F12LS-120204-16	(-)
	F13LS-120204-16	(-)
	F14LS-120204-16	(-)
	F15LS-120204-16	(-)
	F16LS-120204-16	(-)
	F17LS-120204-16	(+)
	F18LS-120204-16	(+)
	F19LS-120204-16	(-)
	F20LS-120204-16	(-)
	F21LS-120204-16	(+)
	F22LS-120204-16	(+)
	F23LS-120204-16	(+)
	F24LS-120204-16	(+)
	F25LS-120204-16	(+)
	F26LS-120204-16	(+)
	F27LS-120204-16	(-)
	F28LS-120204-16	(-)
	F29LS-120204-16	(+)

Tabla 6 (continuación)

Fracción obtenida de CF y sometida a columna lobar de baja presión de sílica gel	Fracciones obtenidas	Actividad antimicrobiana por bioautografía
<b>F10CF-190104-14</b>	F1LS-190204-17	(-)
	F2LS-190204-17	(+)
	F3LS-190204-17	(+)
	F4LS-190204-17	(+)
	F5LS-190204-17	(+)
	F6LS-190204-17	(+)
	F7LS-190204-17	(+)
	F8LS-190204-17	(-)
	F9LS-190204-17	(+)
	F10LS-190204-17	(-)
	F11LS-190204-17	(-)
	F12LS-190204-17	(-)
<b>F11CF-190104-14</b>	F1LS-80304-18	(+)
	F2LS-80304-18	(+)
	F3LS-80304-18	(+)
	F4LS-80304-18	(+)
	F5LS-80304-18	(+)
	F6LS-80304-18	(+)
	F7LS-80304-18	(-)
	F8LS-80304-18	(-)
	F9LS-80304-18	(-)
	F10LS-80304-18	(-)
	F11LS-80304-18	(-)
	F12LS-80304-18	(-)
	F13LS-80304-18	(-)
	F14LS-80304-18	(-)
	F15LS-80304-18	(+)
	F16LS-80304-18	(-)
	F17LS-80304-18	(+)
	F18LS-80304-18	(+)
F19LS-80304-18	(+)	
F20LS-80304-18	(-)	

Tabla 6. (continuación)

Fracción obtenida de CF y sometida a columna lobar de baja presión de sílica gel	Fracciones obtenidas	Actividad antimicrobiana por bioautografía
F12CF-190104-14	F1LS-210304-19	(+)
	F2LS-210304-19	(-)
	F3LS-210304-19	(+)
	F4LS-210304-19	(+)
	F5LS-210304-19	(+)
	F6LS-210304-19	(-)
	F7LS-210304-19	(-)
	F8LS-210304-19	(-)
	F9LS-210304-19	(-)
	F10LS-210304-19	(-)
	F11LS-210304-19	(-)
	F12LS-210304-19	(-)
	F13LS-210304-19	(-)
	F14LS-210304-19	(-)
	F15LS-210304-19	(-)
	F16LS-210304-19	(-)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

### 3.6.1.3 Columna Lobar de Baja Presión en Fase Reversa C18 (CLFR-C18) <sup>®</sup>

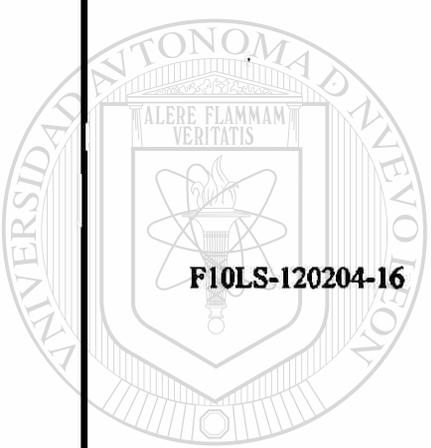
Las fracción F7LS-120204-16 y la fracción F10LS-120204-16 obtenidas de la columna Lobar de sílica gel, de F9CF-190104-14 se sometieron a columna de baja presión Lobar fase reversa C18. Las fracciones obtenidas están registradas en la tabla 7.

**3.6.1.3.1 Evaluación de Actividad Antimicrobiana de Fracciones Obtenidas de la Columna Lobar de Baja Presión en Fase Reversa C18.** Se evaluó la actividad antimicrobiana de todas las fracciones obtenidas de la columna Lobar fase reversa C18 contra la cepa de *Staphylococcus aureus* (IMSS-NL/HE25:01 resistente a oxacilina), por medio de la técnica de bioautografía. Los resultados se presentan en la tabla 7.

**Tabla 7. Fracciones obtenidas de la columna Lobar de baja presión de fase reversa -C18 y resultados de actividad antimicrobiana**

Fracciones activas obtenidas de CLSG y sometidas a CLFR-C18	Fracciones obtenidas de CLFR-C18	Actividad antimicrobiana por bioautografía
F7LS-120204-16	F1LFR-300504-29	(-)
	F2LFR-300504-29	(-)
	F3LFR-300504-29	(+)
	F4LFR-300504-29	(+)
	F5LFR-300504-29	(+)
	F6LFR-300504-29	(+)
	F7LFR-300504-29	(+)
	F8LFR-300504-29	(+)
	F9LFR-300504-29	(-)
	F10LFR-300504-29	(-)
	F11LFR-300504-29	(-)
	F12LFR-300504-29	(-)
	F13LFR-300504-29	(-)
	F14LFR-300504-29	(-)
	F15LFR-300504-29	(-)
	F16LFR-300504-29	(-)
	F17LFR-300504-29	(-)
	F18LFR-300504-29	(-)
	F19LFR-300504-29	(-)
	F20LFR-300504-29	(-)
	F21LFR-300504-29	(-)
	F22LFR-300504-29	(-)
F10LS-120204-16	F1LFR-010604-30	(-)
	F2LFR-010604-30	(-)
	F3LFR-010604-30	(-)
	F4LFR-010604-30	(-)
	F5LFR-010604-30	(-)
	F6LFR-010604-30	(-)

Tabla 7. (continuación).

Fracciones activas obtenidas de CLSG y sometidas a CLFR-C18	Fracciones obtenidas de CLFR-C18	Actividad antimicrobiana por bioautografía
 <p data-bbox="338 1030 554 1075">F10LS-120204-16</p>	F7LFR-010604-30	(+)
	F8LFR-010604-30	(+)
	F9LFR-010604-30	(+)
	F10LFR-010604-30	(+)
	F11LFR-010604-30	(+)
	F12LFR-010604-30	(+)
	F13LFR-010604-30	(+)
	F14LFR-010604-30	(+)
	F15LFR-010604-30	(+)
	F16LFR-010604-30	(-)
	F17LFR-010604-30	(-)
	F18LFR-010604-30	(-)
	F19LFR-010604-30	(-)
	F20LFR-010604-30	(-)
	F21LFR-010604-30	(-)
	F22LFR-010604-30	(-)
	F23LFR-010604-30	(-)
	F24LFR-010604-30	(-)
	F25LFR-010604-30	(-)
	F26LFR-010604-30	(-)
	F27LFR-010604-30	(-)
	F28LFR-010604-30	(-)
	F29LFR-010604-30	(-)
	F30LFR-010604-30	(-)
	F31LFR-010604-30	(-)
	F32LFR-010604-30	(-)
	F33LFR-010604-30	(-)

**3.6.1.3.2 Análisis de Fracciones Obtenidas de la Columna Lobar de Baja Presión de Fase Reversa C18 por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR FR-C18).** Las fracciones activas obtenidas de las columnas Lobar FR-C18, se analizaron por CLAR FR-C18 para revisar su pureza. Las fracciones analizadas se muestran en la tabla 8, los cromatogramas se muestran en las figuras 1 a 15.

**Tabla 8. Fracciones obtenidas de la columna Lobar de baja presión de fase reversa -C18 que fueron analizadas por CLAR FR -C18**

Fracciones activas obtenidas de CLSG y sometidas CLFR-C18	Fracciones activas obtenidas de CLFR-C18 y analizadas por CLAR FR -C18
F7LS-120204-16	F3LFR-300504-29
	F4LFR-300504-29
	F5LFR-300504-29
	F6LFR-300504-29
	F7LFR-300504-29
	F8LFR-300504-29
F10LS-120204-16	F7LFR-300604-30
	F8LFR-300604-30
	F9LFR-300604-30
	F10LFR-300604-30
	F11LFR-300604-30
	F12LFR-300604-30
	F13LFR-300604-30
	F14LFR-300604-30
	F15LFR-300604-30

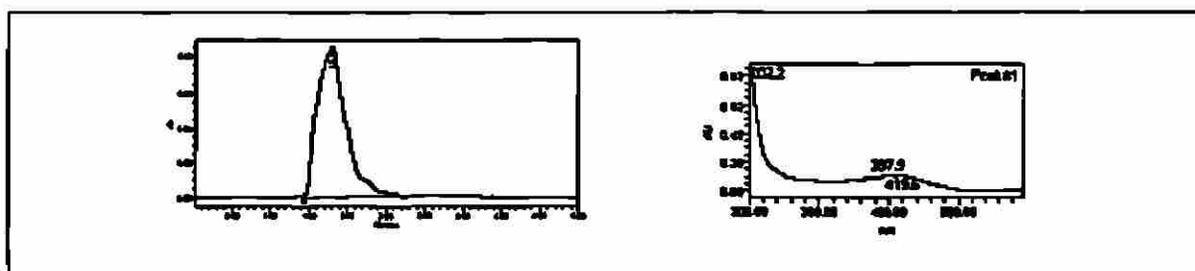


Fig. 1. Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$  270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F3LFR-300504-29

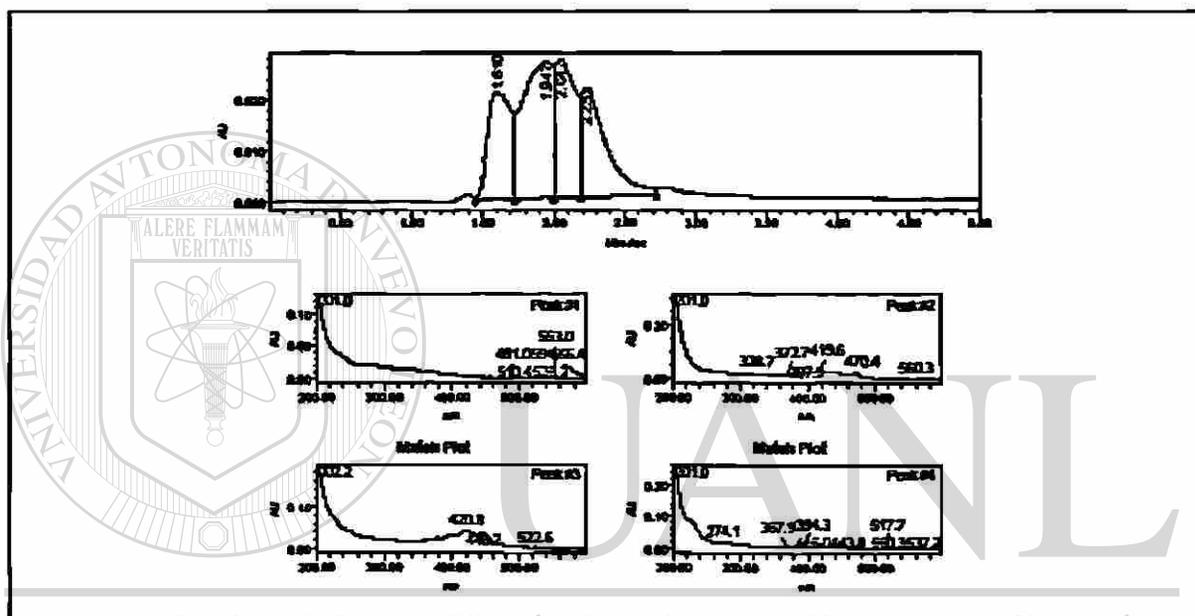


Fig. 2. Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$  270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F4LFR-300504-29

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

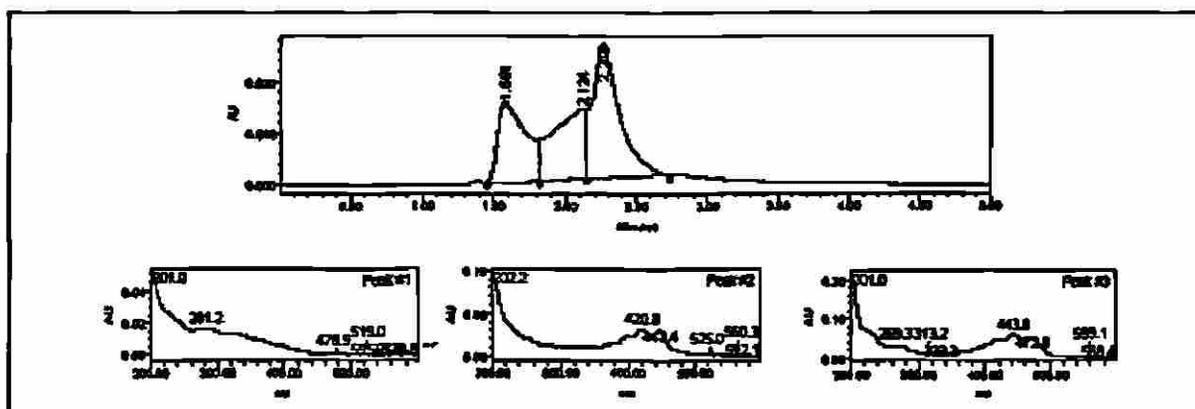


Fig. 3. Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$  270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F5LFR-300504-29

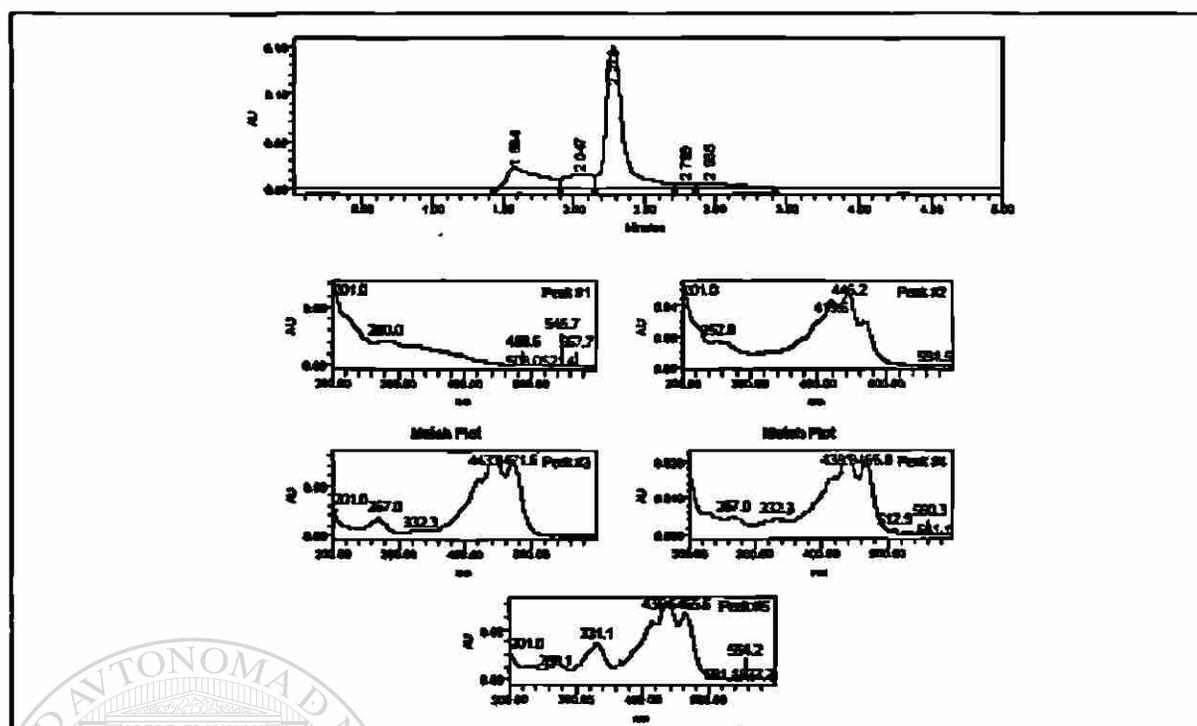
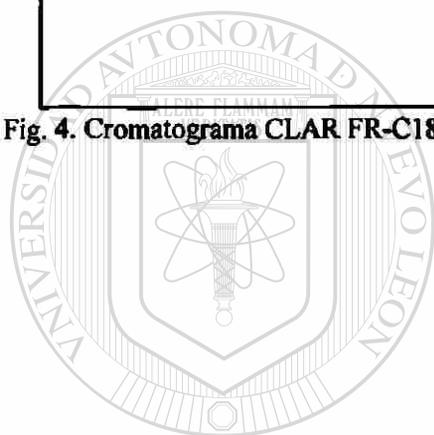


Fig. 4. Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$  270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F6LFR-300504-29



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

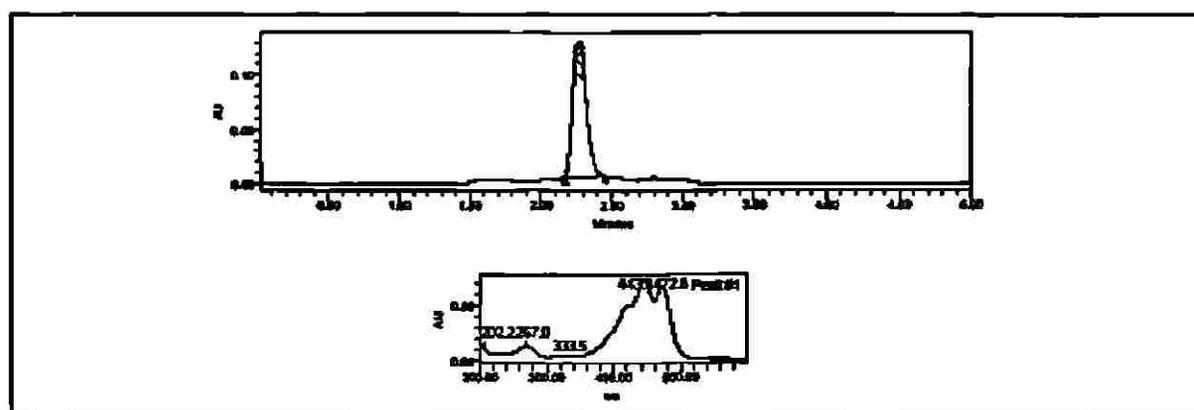


Fig. 5. Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$  270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F7LFR-300504-29

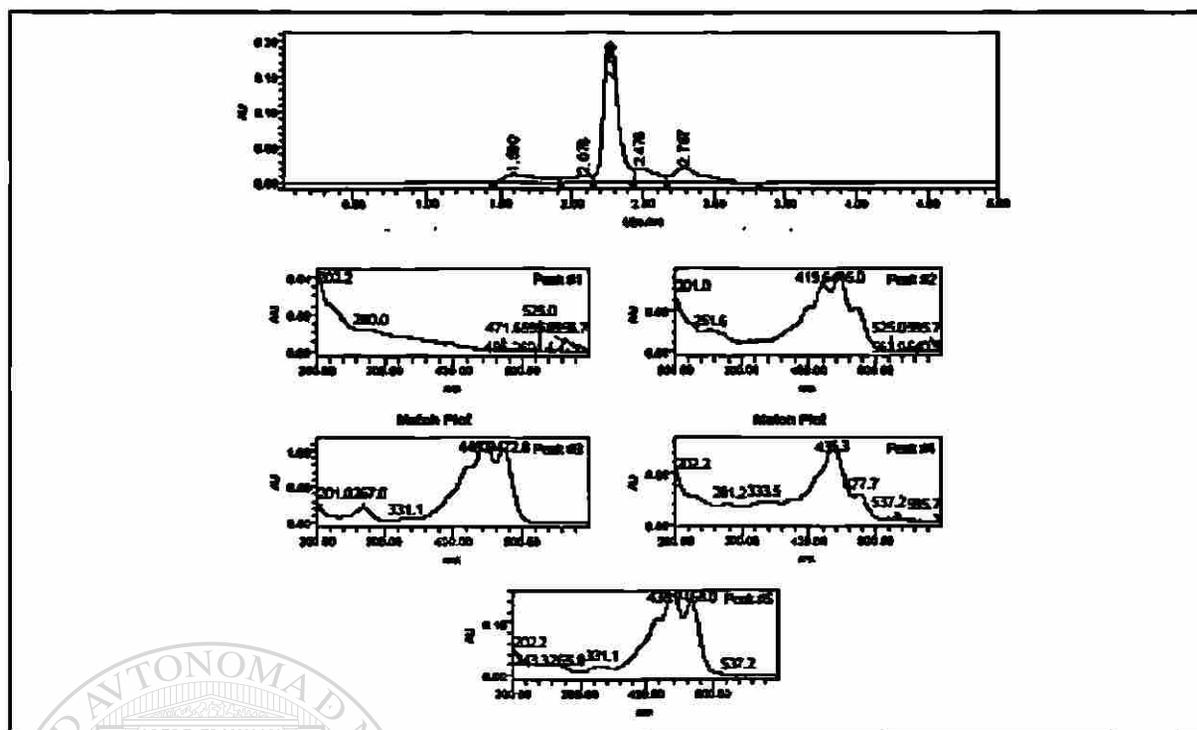


Fig. 6. Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$  270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F8LFR-300504-29

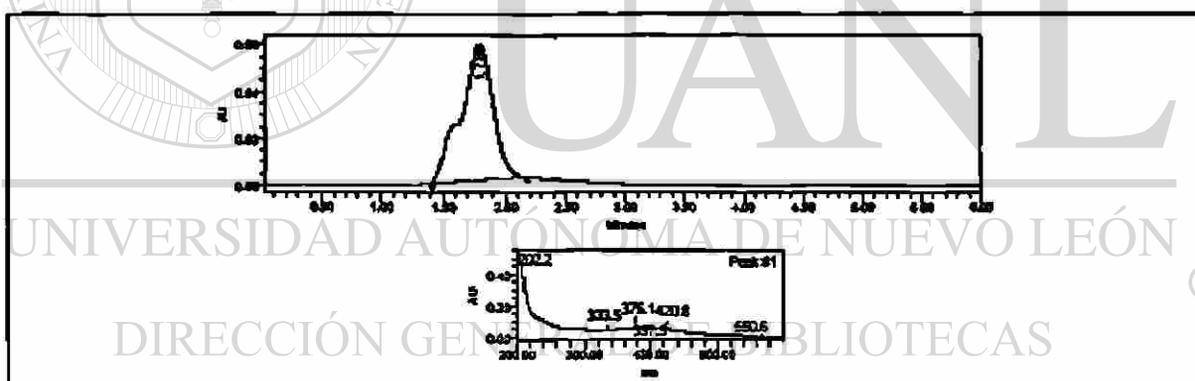


Fig. 7. Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$  270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F7LFR-300604-30

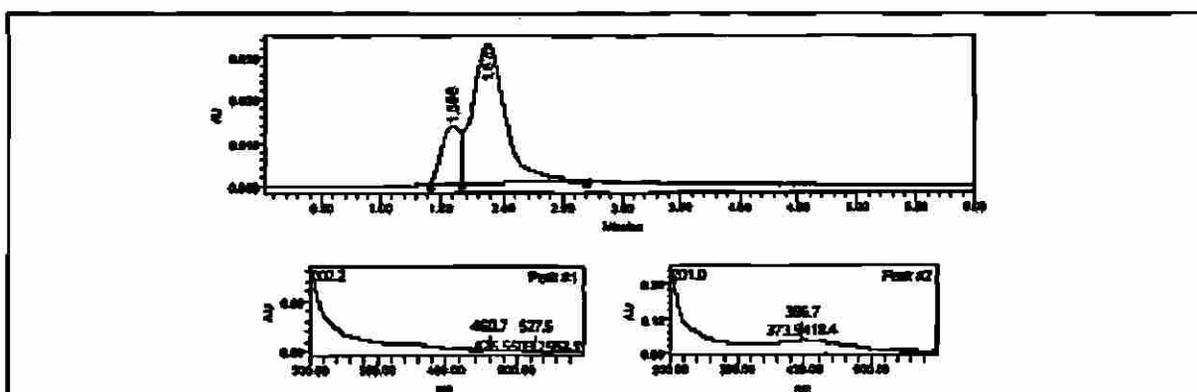


Fig. 8. Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$  270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F8LFR-300604-30

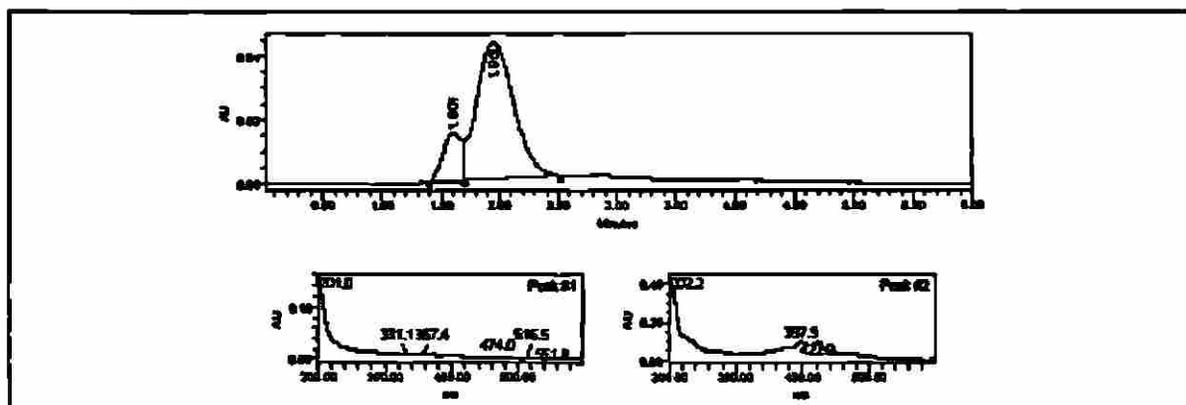


Fig. 9. Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$  270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F9LFR-300604-30

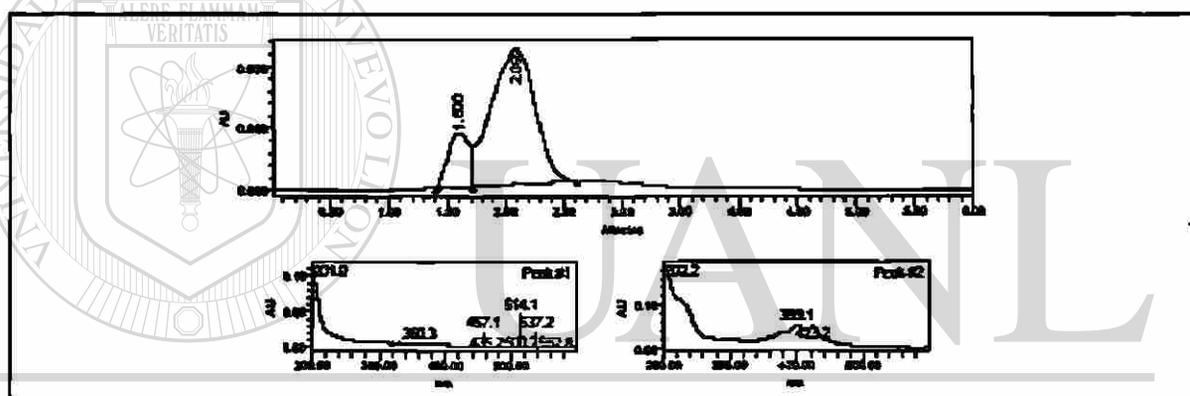


Fig. 10. Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$  270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F10LFR-300604-30

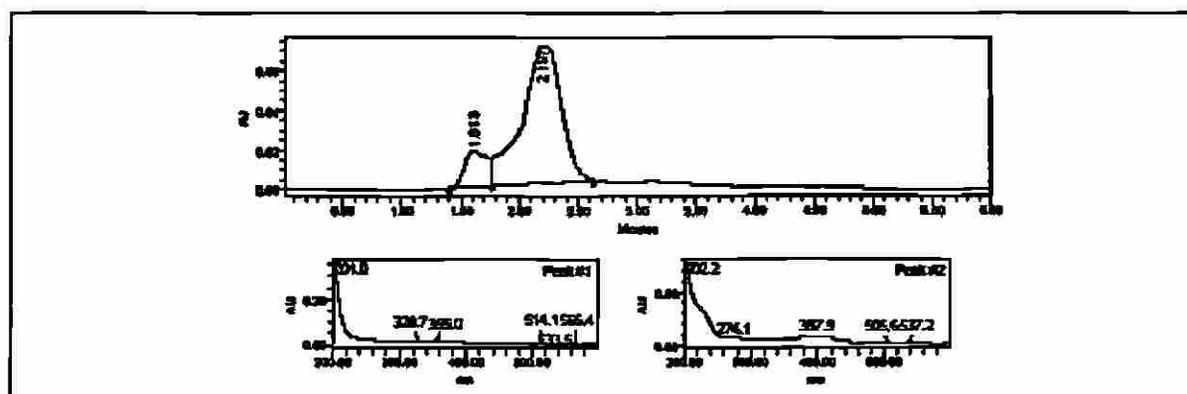


Fig. 11. Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$  270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F11LFR-300604-30

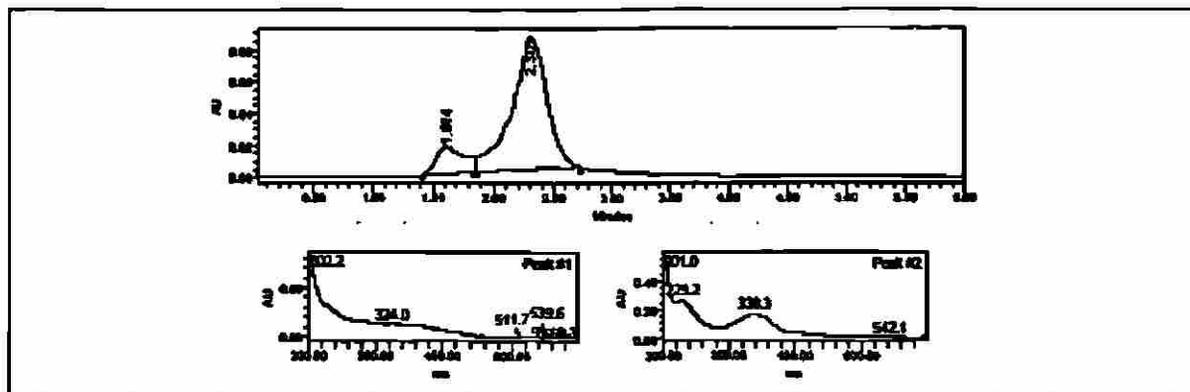


Fig. 12. Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$  270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F12LFR-300604-30

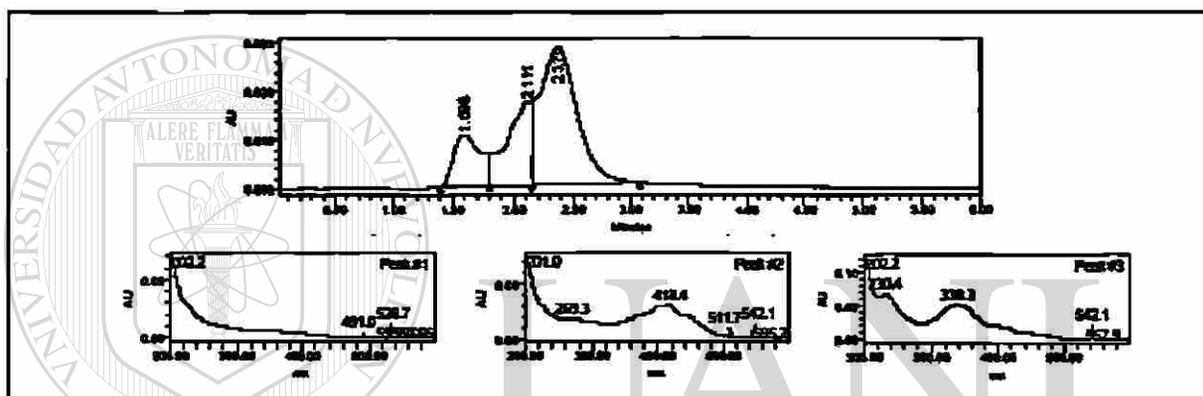


Fig. 13. Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$  270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F13LFR-300604-30

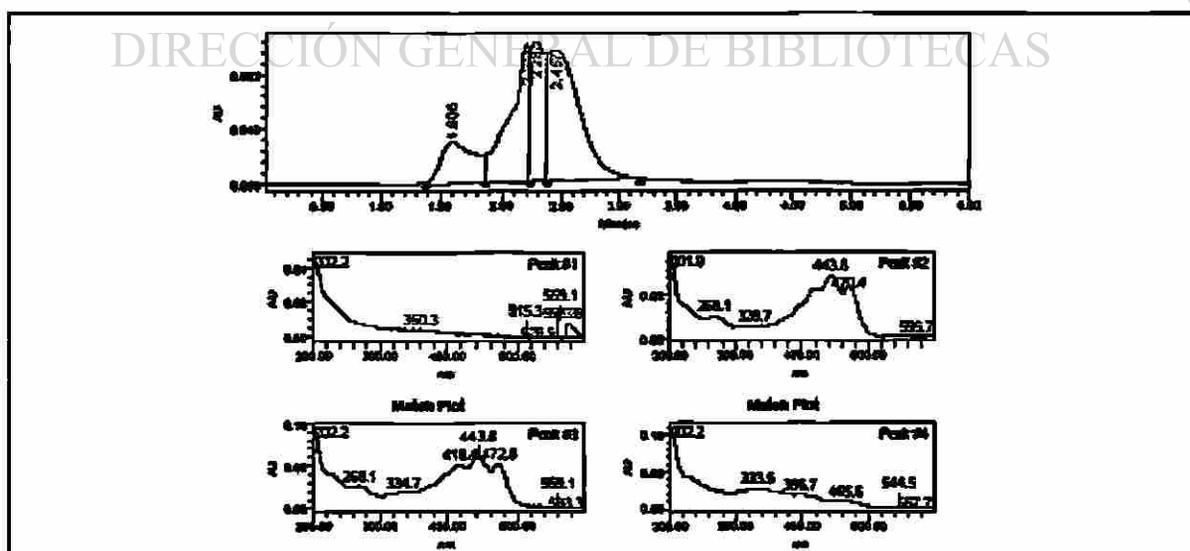


Fig. 14. Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$  270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F14LFR-300604-30

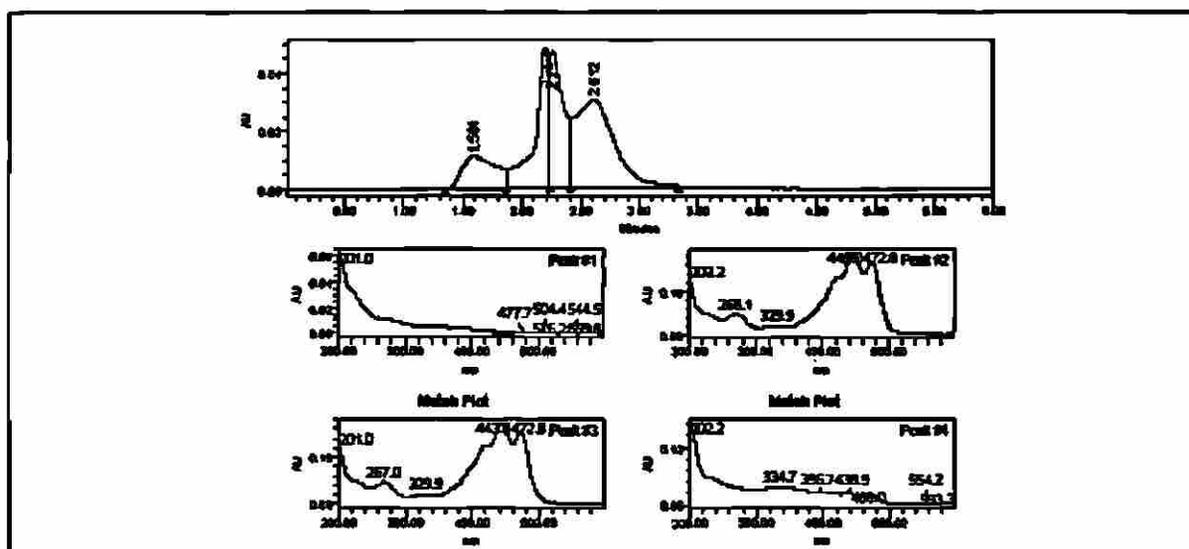


Fig. 15. Cromatograma CLAR FR-C18 ( $\lambda$  270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F15LFR-300604-30

#### 3.6.1.4 Columna de Exclusión Molecular (EM)

Las fracciones activas obtenidas de la columna Lobar FR-18 se pasaron por una columna de exclusión molecular para purificar las fracciones, se observó que se removían los pigmentos fotosintéticos, las fracciones obtenidas se analizaron por CLAR FR-C18, Los resultados se presentan en la tabla 9, los cromatogramas se presentan en las figuras 16 y 17. Las fracciones que contenían clorofilas fueron descartadas. En los cromatogramas no se observó ninguna fracción pura, además las cantidades de cada fracción no eran suficiente para continuar con la purificación por lo que se decidió realizar una segunda extracción masiva.

Tabla 9. Fracciones obtenidas de la columnas de exclusión molecular.

Fracciones activas obtenidas de CLSG y sometidas CLFR-C18	Fracciones activas obtenidas de CLFR-C18 y sometidas a EM	Fracciones obtenidas de EM	Fracciones de pigmentos fotosintéticos
F7LS-120204-16	F3LFR-300504-29	F1EM-120704-53	----
		F2EM-120704-53	----
		F3EM-120704-53	----
	F4LFR-300504-29	F4EM-120704-53	----
		F5EM-120704-53	Pigmentos fotosintéticos
	F5LFR-300504-29	F6EM-120704-53	----
		F7EM-120704-53	----
		F8EM-120704-53	Pigmentos fotosintéticos
	F6LFR-300504-29	F9EM-120704-53	----
		F10EM-120704-53	----
		F11EM-120704-53	Pigmentos fotosintéticos
	F7LFR-300504-29	F12EM-120704-53	----
		F13EM-120704-53	----
		F14EM-120704-53	----
		F15EM-120704-53	Pigmentos fotosintéticos
		F16EM-120704-53	----
	F8LFR-300504-29	F17EM-120704-53	----
		F18EM-120704-53	----
		F19EM-120704-53	Pigmentos fotosintéticos

Tabla 9. (continuación)

Fracciones activas obtenidas de CLSG y sometidas CLFR-C18	Fracciones activas obtenidas de CLFR-C18 y sometidas a EM	Fracciones obtenidas de EM	Fracciones de pigmentos fotosintéticos
F10LS-120204-16	F7LFR-010604-30	F1EM-180704-54	---
		F2EM-180704-54	---
		F3EM-180704-54	Pigmentos fotosintéticos
	F8LFR-010604-30	F4EM-180704-54	---
		F5EM-180704-54	---
		F6EM-180704-54	Pigmentos fotosintéticos
	F9LFR-010604-30	F7EM-180704-54	---
		F8EM-180704-54	---
		F9EM-180704-54	Pigmentos fotosintéticos
	F10LFR-010604-30	F10EM-180704-54	---
		F11EM-180704-54	---
		F12EM-180704-54	Pigmentos fotosintéticos
	F14LFR-0100604-30	F13EM-180704-54	---
		F14EM-180704-54	---
	F15LFR-010604-30	F15EM-180704-54	Pigmentos fotosintéticos
		F16EM-180704-54	---
		F17EM-180704-54	---
		F18EM-180704-54	Pigmentos fotosintéticos

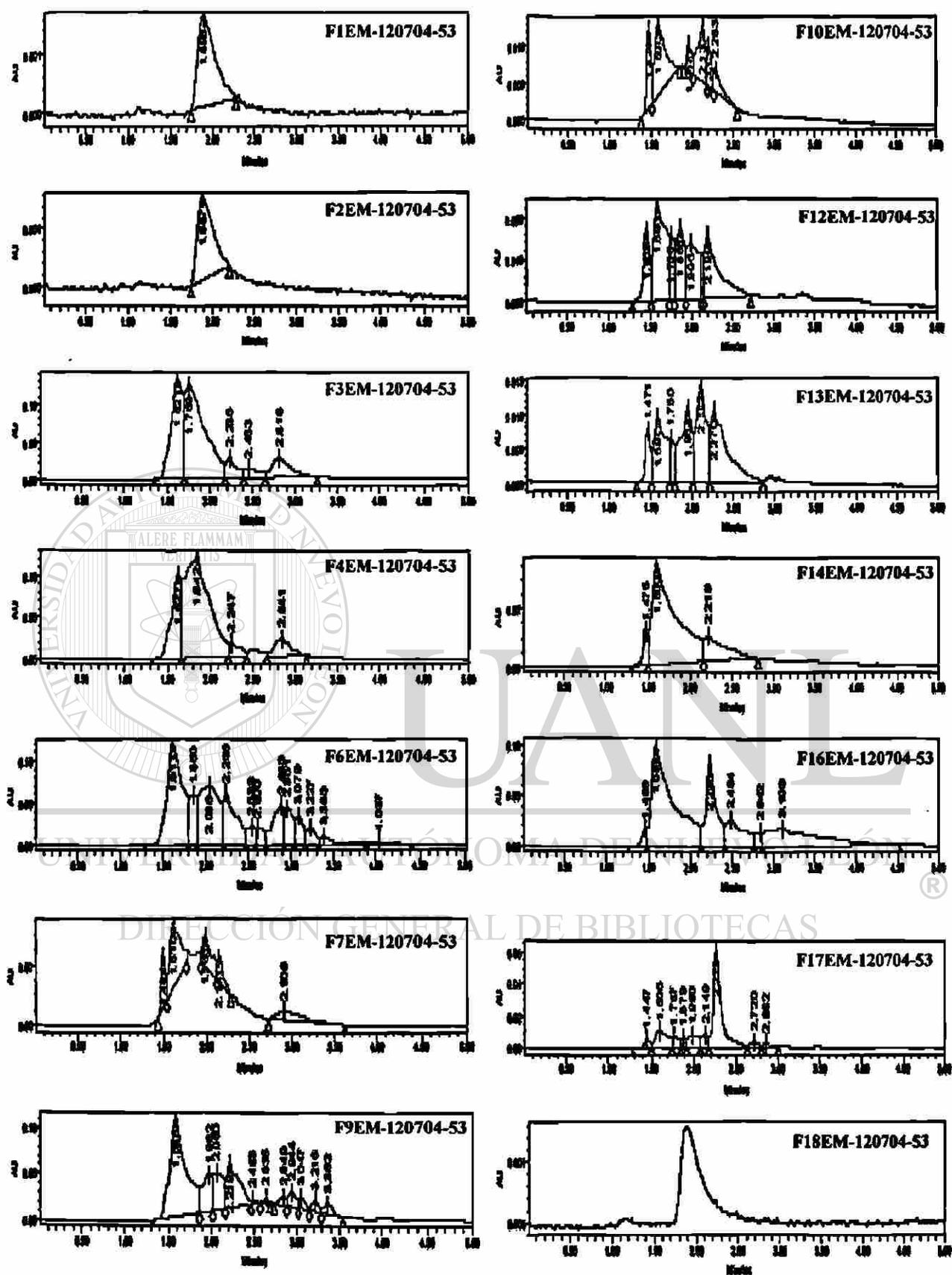


Fig. 16. Cromatogramas ( $\lambda$  270 nm) de las fracciones obtenidas de las columnas de exclusión molecular provenientes de F3LFR-300504-29, F4LFR-300504-29, F5LFR-300504-29, F6LFR-300504-29, F7LFR-300504-29, F8LFR-300504-29



### 3.6.2 Segunda Extracción Masiva

De 2 Kg de hoja molida de la planta *Cordia boissieri*, se obtuvieron 20 g de extracto de acetato de etilo libre de grasas o con poca cantidad de éstas.

#### 3.6.2.1 Columna Flash (CF)

El extracto de acetato de etilo se fraccionó en columna flash con sílica gel 60, las fracciones obtenidas se muestran en la tabla 10.

**3.6.2.1.1 Evaluación de Actividad Antimicrobiana de Fracciones Obtenidas de la Columna Flash.** Se evaluó la actividad antimicrobiana de todas las fracciones obtenidas de la columna flash contra la cepa de *S. aureus* resistente a oxacilina, (IMSS-NL/HE25:01), por medio de la técnica de bioautografía. Los resultados se muestran en la tabla 10. Una fotografía de la bioautografía de algunas fracciones obtenidas se muestra en la figura 18.

Tabla 10. Fracciones obtenidas de la columna flash y resultados de actividad antimicrobiana.

Extracto sometido a columna flash	Fracciones obtenidas	Actividad antimicrobiana por bioautografía
Extracto de acetato de etilo de hojas de <i>Cordia boissieri</i>	F1CF-221104-72	(-)
	F2CF-221104-72	(+)
	F3CF-221104-72	(+)
	F4CF-221104-72	(+)
	F5CF-221104-72	(+)
	F6CF-221104-72	(+)

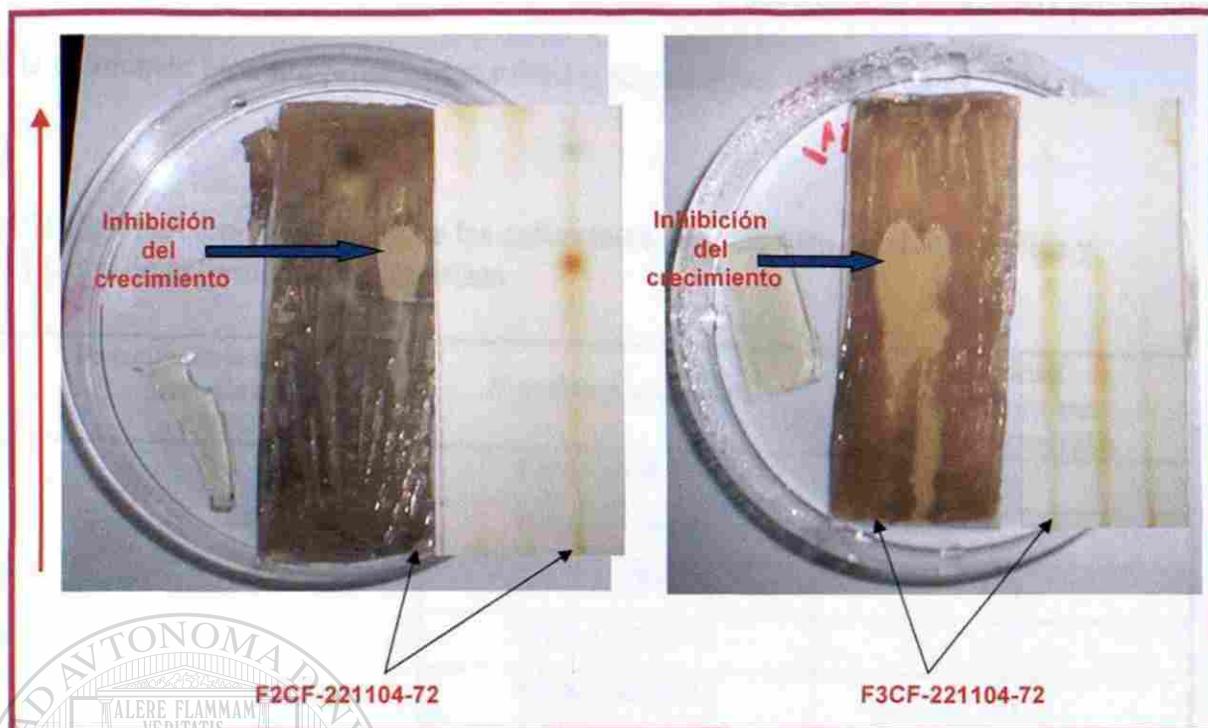


Fig. 18. Bioautografía de fracciones obtenidas de la columna flash. A la izquierda se presenta una bioautografía donde se observa un área clara de la inhibición del crecimiento causado por la fracción F2CF-221104-72, el área oscura es crecimiento microbiano revelado con MTT, también se presenta la cromatoplatea "gemela" donde se observa la mancha responsable de la inhibición del crecimiento microbiano. A la derecha se observa la inhibición de crecimiento de dos fracciones y la cromatoplatea gemela.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

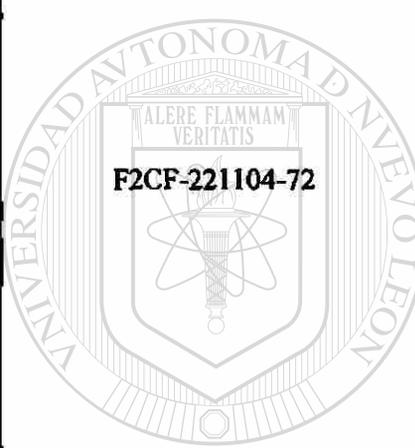
### 3.6.2.2 Columna Lobar de Baja Presión en Sílica (CLSG)

Las fracciones F2CF-221104-72 y F3CF-221104-72 eluidas de la columna flash, resultaron activas y se sometieron a fraccionamiento en columna de baja presión Lobar Si 60 (40-63  $\mu\text{m}$ ). Los fracciones obtenidas se muestran en la tabla 11.

**3.6.2.2.1 Evaluación de Actividad Antimicrobiana de Fracciones Obtenidas de la Columna Lobar de Baja Presión en Sílica gel.** Se evaluó la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas de las columnas lobar de sílica gel contra la

cepa de *Staphylococcus aureus* (IMSS-NL/HE25:01 resistente a oxacilina) por medio de la técnica de bioautografía. Los resultados se presentan en la tabla 11.

Tabla 11. Fracciones obtenidas de las columnas Lobar de baja presión de sílica y resultados de actividad antimicrobiana

Fracción obtenida de CF y sometida a CLSG	Fracciones obtenidas	Actividad antimicrobiana por bioautografía
 <p>F2CF-221104-72</p>	F1LS-121204-72	(-)
	F2LS-121204-72	(-)
	F3LS-121204-72	(+)
	F4LS-121204-72	(+)
	F5LS-121204-72	(+)
	F6LS-121204-72	(+)
	F7LS-121204-72	(+)
	F8LS-151204-72	(+)
	F9LS-121204-72	(+)
	F10LS-121204-72	(+)
	F11LS-121204-72	(+)
	F12LS-121204-72	(+)
F3CF-221104-72	F1LS-151204-73	(-)
	F2LS-151204-73	(-)
	F3LS-151204-73	(+)
	F4LS-151204-73	(+)
	F5LS-151204-73	(+)
	F6LS-151204-73	(+)
	F7LS-151204-73	(+)
	F8LS-151204-73	(+)
	F9LS-151204-73	(+)
	F10LS-151204-73	(+)
	F11LS-151204-73	(+)
	F12LS-151204-73	(+)

### 3.6.2.3 Columna Lobar de Baja Presión en Fase Reversa C-18 (CLFRC18)

Algunas fracciones provenientes de la columna Lobar de sílica gel se eligieron para separar compuestos activos y se sometieron a columna de baja presión Lobar FR-C18.

Las fracciones elegidas están registradas en la tabla 12.

**3.6.2.3.1 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de las Fracciones Obtenidas de la Columna Lobar Fase Reversa C18.** Se evaluó la actividad antimicrobiana de todas las fracciones obtenidas de la columna Lobar FR-C18 por medio de la técnica de bioautografía. Se evaluó únicamente con la cepa de *Staphylococcus aureus* (IMSS-NL/HE25:01 resistente a oxacilina). Los resultados obtenidos están registrados en la tabla 12.

**3.6.2.3.2 Análisis de las Fracciones Obtenidas de la Columna Lobar Fase Reversa C18 por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR FR-C18).** Las fracciones activas obtenidas de la columna Lobar FR-C18, se sometieron a cromatografía analítica por cromatografía líquida de alta resolución FR-C18 para revisar pureza. Las fracciones analizadas se enumeran en la tabla 12 y los cromatogramas se muestran en las figuras 19 a 23.

Tabla 12. Fracciones obtenidas de la columna Lobar de baja presión de fase reversa - C18 analizadas por CLAR FR-C18 y resultados de actividad antimicrobiana

Fracciones activas obtenidas de CLSG y sometidas a CLFR-C18	Fracciones obtenidas CLFR-C18 y analizadas CLAR FR-C18	Actividad antimicrobiana por bioautografía
F5LS-121204-72	F1LFR-30105-82	ND
	F2LFR-30105-82	ND
	F3LFR-30105-82	ND
	F4LFR-30105-82	ND
	F5LFR-30105-82	ND
	F6LFR-30105-82	ND
	F7LFR-30105-82	ND
	F8LFR-30105-82	ND
	F9LFR-30105-82	ND
	F10LFR-30105-82	ND
	F11LFR-30105-82	ND
	F12LFR-30105-82	ND
	F13LFR-30105-82	ND
	F14LFR-30105-82	ND
F6LS-121204-72	F1LFR-40105-83	ND
	F2LFR-40105-83	ND
	F3LFR-40105-83	ND
	F4LFR-40105-83	ND
	F5LFR-40105-83	ND
	F6LFR-40105-83	ND
	F7LFR-40105-83	ND
	F8LFR-40105-83	ND
	F9LFR-40105-83	ND
	F10LFR-40105-83	ND
	F11LFR-40105-83	ND
	F12LFR-40105-83	ND
	F13LFR-40105-83	ND

Tabla 12. (continuación)

Fracciones activas obtenidas de CLSG y sometidas a CLFR-C18	Fracciones obtenidas CLFR-C18 y analizadas CLAR FR-C18	Actividad antimicrobiana por bioautografía
<b>F7LS-121204-72</b>	F1LFR-40105-84	ND
	F2LFR-40105-84	ND
	F3LFR-40105-84	ND
	F4LFR-40105-84	ND
	F5LFR-40105-84	ND
	F6LFR-40105-84	ND
	F7LFR-40105-84	ND
	F8LFR-40105-84	ND
	F9LFR-40105-84	ND
	F10LFR-40105-84	ND
	F11LFR-40105-84	ND
	F12LFR-40105-84	ND
<b>F3LS-151204-73</b>	F1LFR-281204-78	(+)
	F2LFR-281204-78	(+)
	F3LFR-281204-78	(+)
	F4LFR-281204-78	(+)
	F5LFR-281204-78	(+)
	F6LFR-281204-78	(+)
	F7LFR-281204-78	(+)
	F8LFR-281204-78	(+)
<b>F4LS-151204-73</b>	F1LFR-271204-76	(-)
	F2LFR-271204-76	(-)
	F3LFR-271204-76	(-)
	F4LFR-271204-76	(+)
	F5LFR-271204-76	(+)
	F6LFR-271204-76	(+)
	F7LFR-271204-76	(+)

Tabla 12. (continuación)

<b>Fracciones activas obtenidas de CLSG y sometidas a CLFR- C18</b>	<b>Fracciones activas obtenidas CLFR-C18 y analizadas CLAR FR-C18</b>	<b>Actividad antimicrobiana por bioautografía</b>
<b>F5LS-151204-73</b>	F1LFR-261204-75	(-)
	F2LFR-261204-75	(+)
	F3LFR-261204-75	(+)
	F4LFR-261204-75	(+)
	F5LFR-261204-75	(+)
	F6LFR-261204-75	(+)
	F7LFR-261204-75	(+)
<b>F6LS-151204-73</b>	F1LFR-301204-79	(-)
	F2LFR-301204-79	(-)
	F3LFR-301204-79	(+)
	F4LFR-301204-79	(+)
	F5LFR-301204-79	(+)
	F6LFR-301204-79	(+)
	F7LFR-301204-79	(+)
<b>F7LS-151204-73</b>	F1LFR-311204-80	(-)
	F2LFR-311204-80	(-)
	F3LFR-311204-80	(-)
	F4LFR-311204-80	(+)
	F5LFR-311204-80	(+)
	F6LFR-311204-80	(-)

ND, No determinada

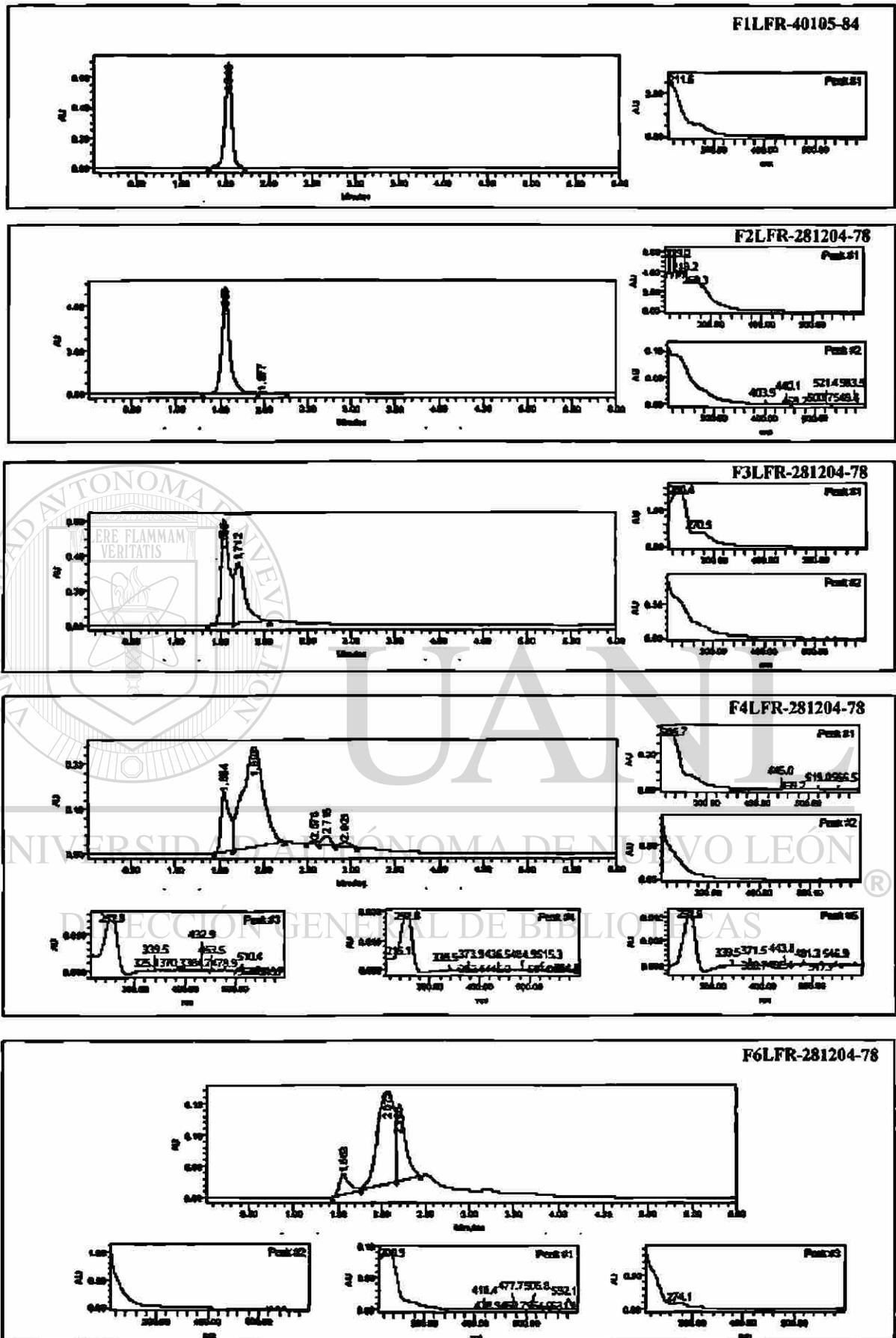


Fig. 19. Cromatogramas ( $\lambda$  250nm) de fracciones activas obtenidas de CLFR C18 de F3LS-151204-73

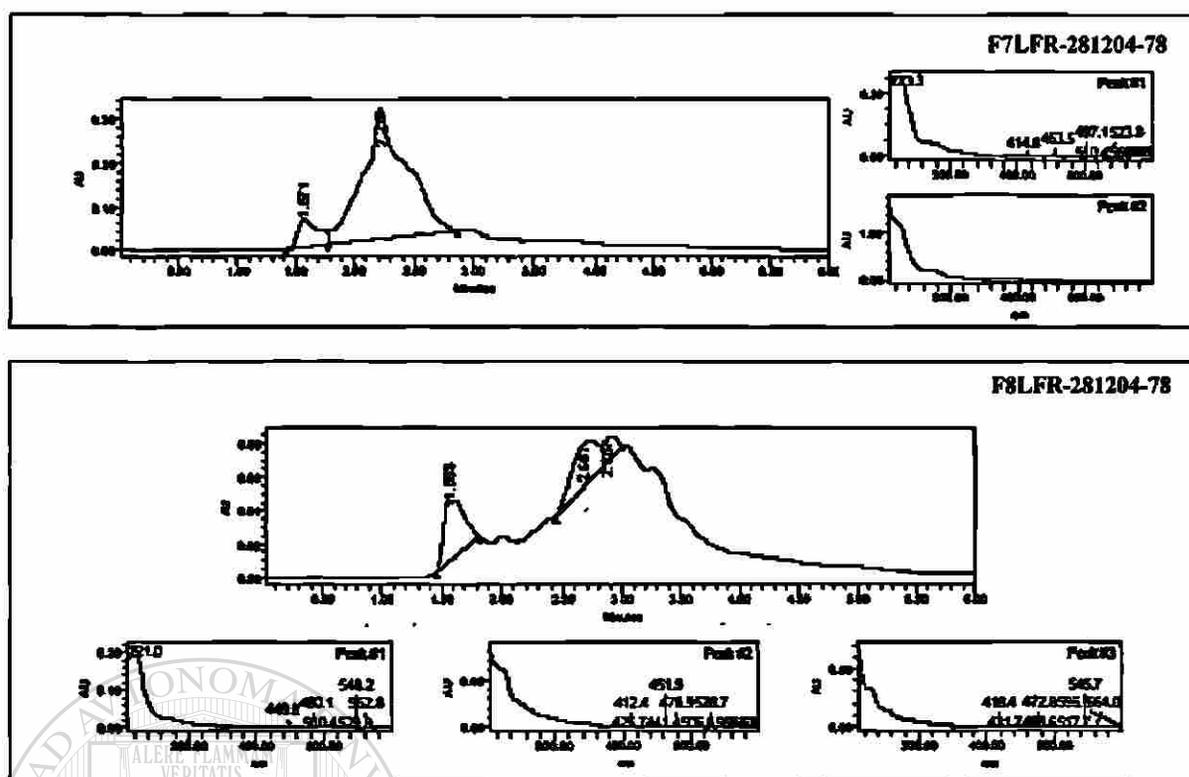
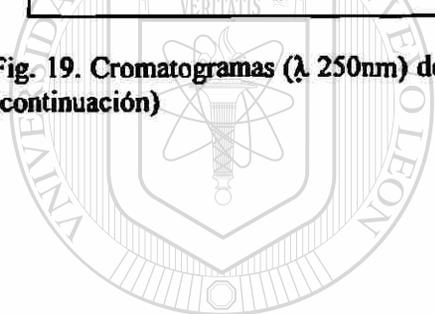


Fig. 19. Cromatogramas ( $\lambda$  250nm) de fracciones activas obtenidas de la CLFR C18 de F3LS-151204-73 (continuación)



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

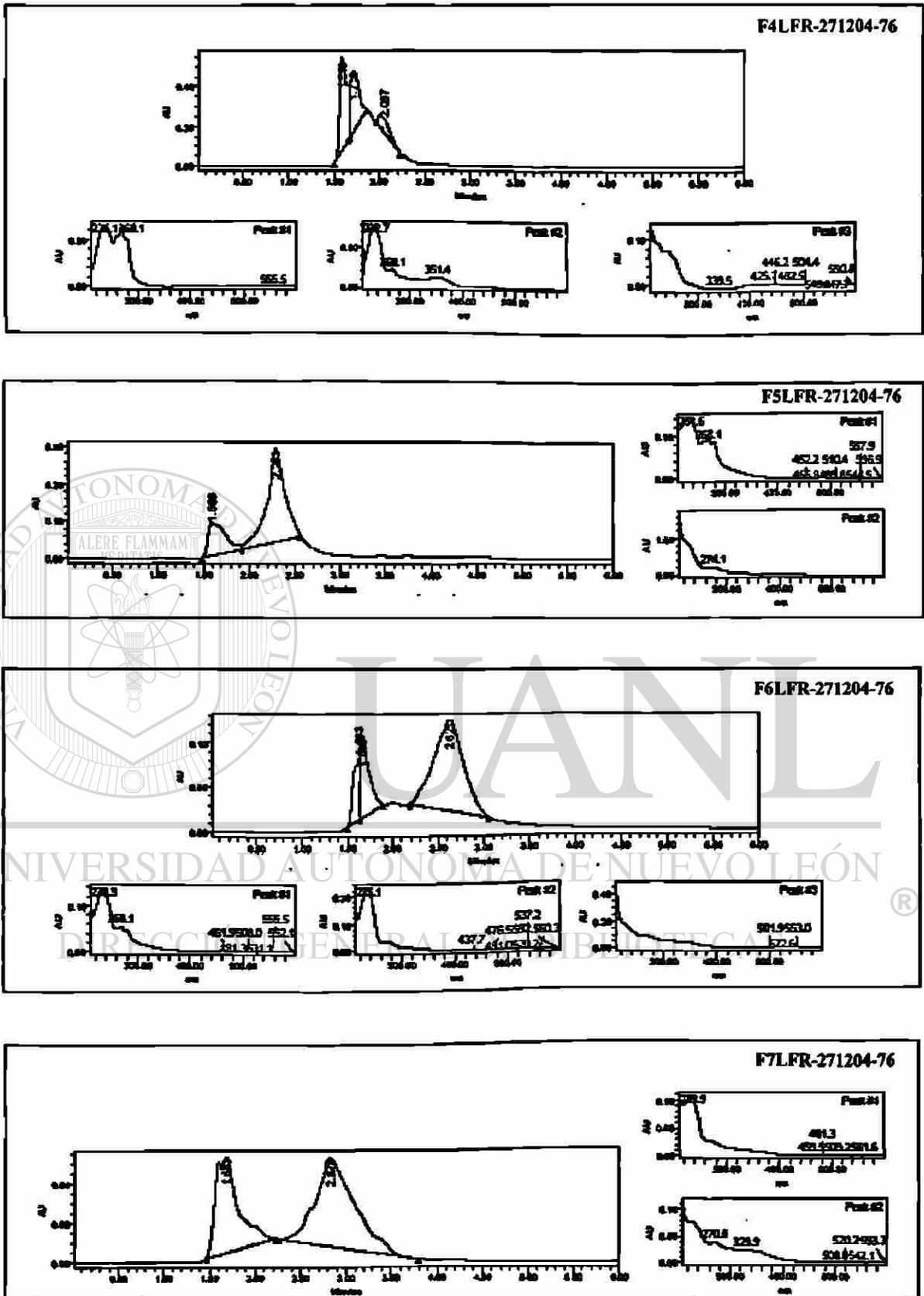


Fig. 20. Cromatogramas ( $\lambda$  250nm) de fracciones activas obtenidas de la CLFR C18 de F4LS-151204-73

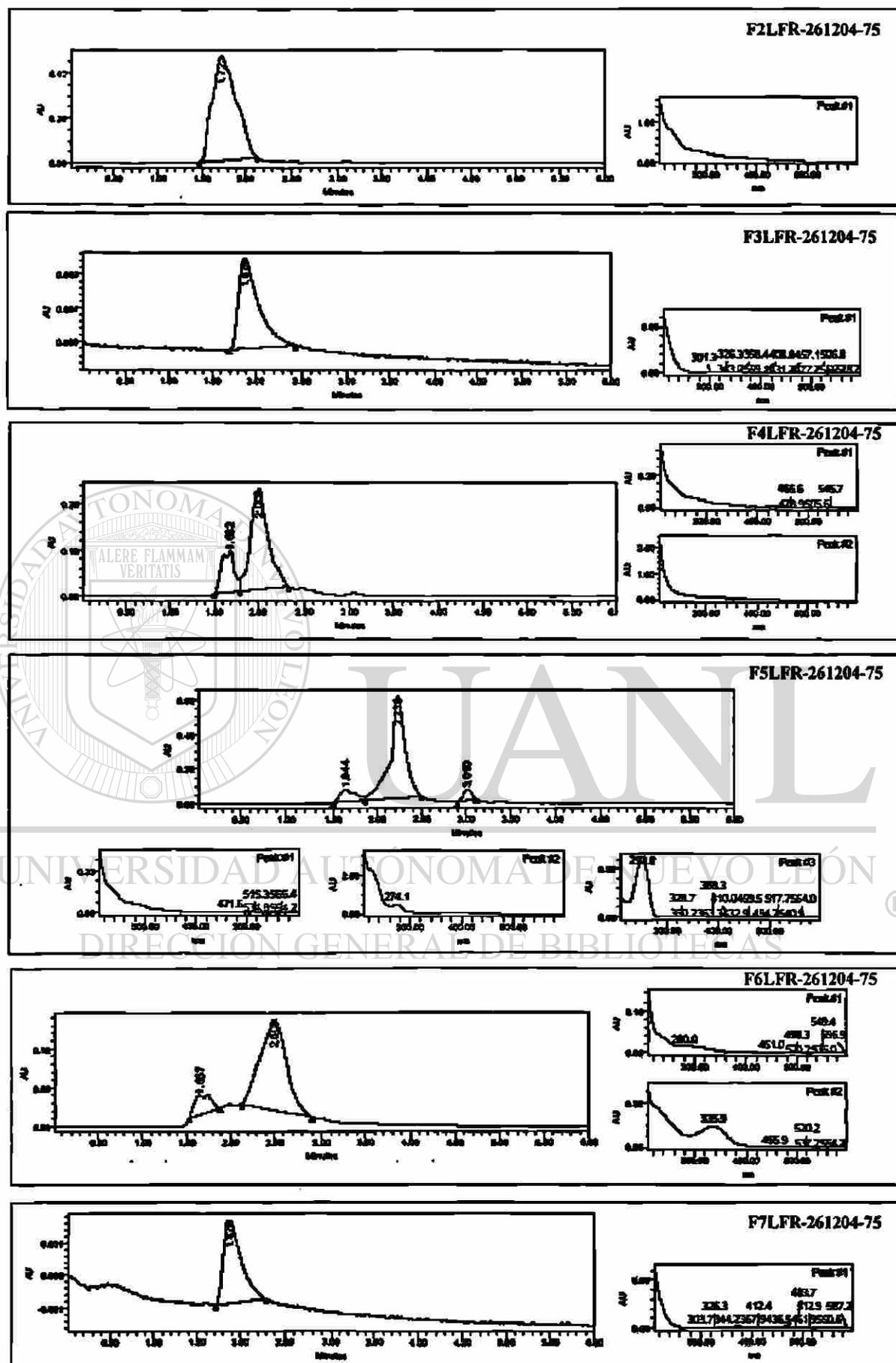


Fig. 21. Cromatogramas de ( $\lambda$  250nm) fracciones activas obtenidas de la CLFR C18 de F5LS-151204-73

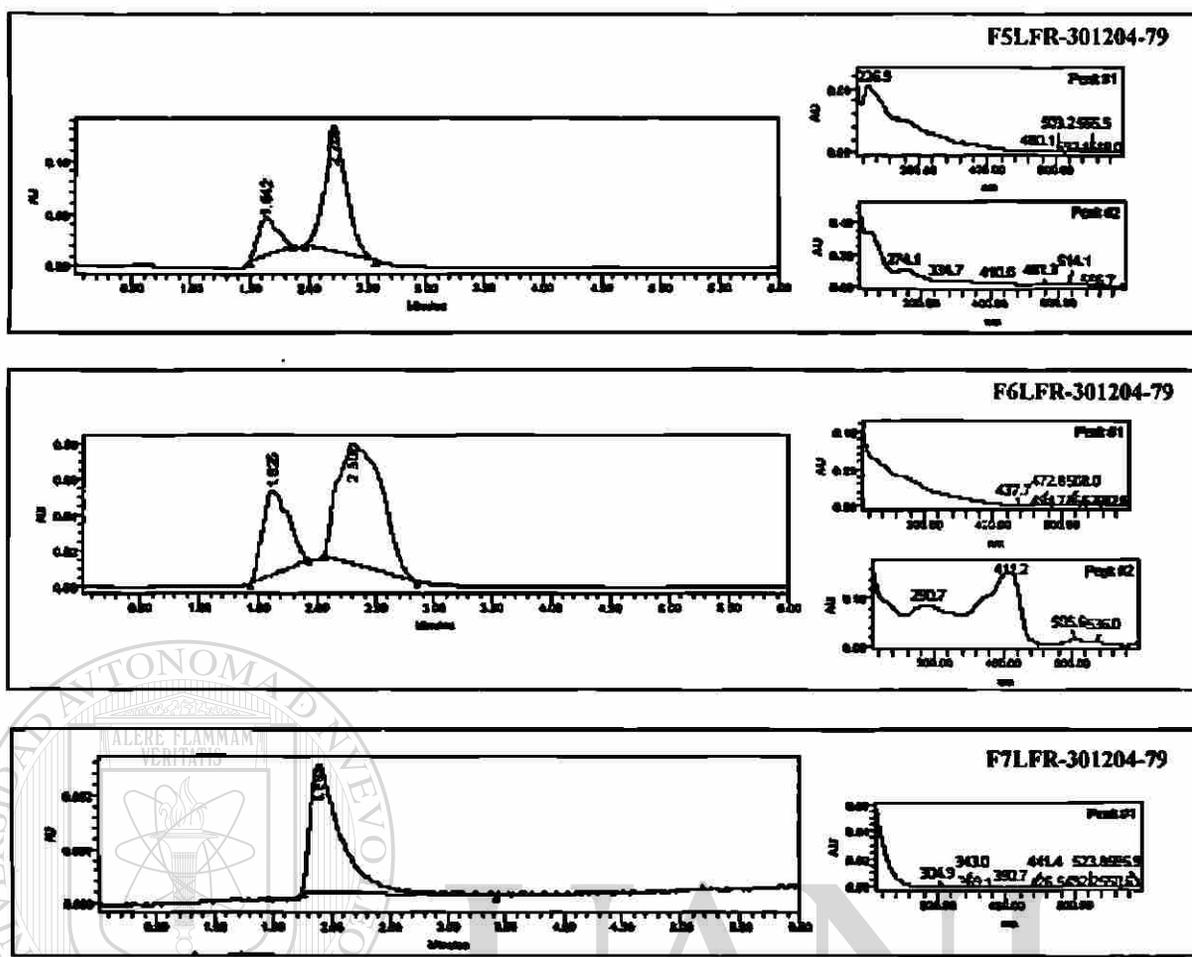


Fig. 22. Cromatogramas de ( $\lambda$  250nm) fracciones activas obtenidas de la CLFR C18 de F6LS-151204-73

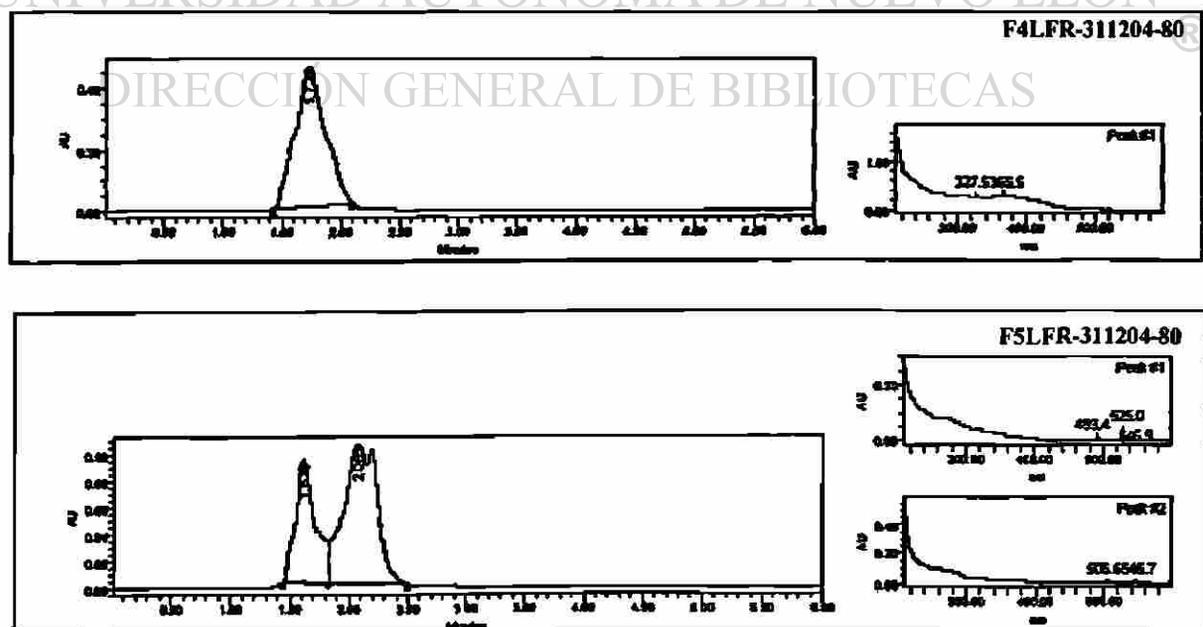


Fig. 23. Cromatogramas de ( $\lambda$  250nm) fracciones activas obtenidas de la CLFR C18 de F7LS-151204-73

### 3.7 Purificación y Determinación de la Estructura Química de Compuestos Activos

A la fracción F3LFR-261204-75 obtenida de la columna lobar fase reversa C18 se le evaporó lentamente el solvente (metanol) y se obtuvo 15.2 mg de un precipitado blanco en forma de polvo, el cual se sometió a análisis de CLAR FR-C18 para revisar su pureza, a estudios de espectroscopia UV-Vis, IR,  $^1\text{HRMN}$  y  $^{13}\text{CRMN}$ , estudios de resonancia de doble dimensión y espectrometría de masas para obtener su estructura.



#### 3.7.1 Análisis de Pureza

UANL

En el cromatograma de CLAR de la fracción F3LFR-261204-75 se observa un solo pico con tiempo de retención, 1.879 minutos, cuyo análisis de pureza indica que está puro. Este análisis se complementa con el análisis de  $^1\text{HRMN}$  que también arroja señales muy limpias que indica pureza, el cromatograma se muestra en la figura 24.

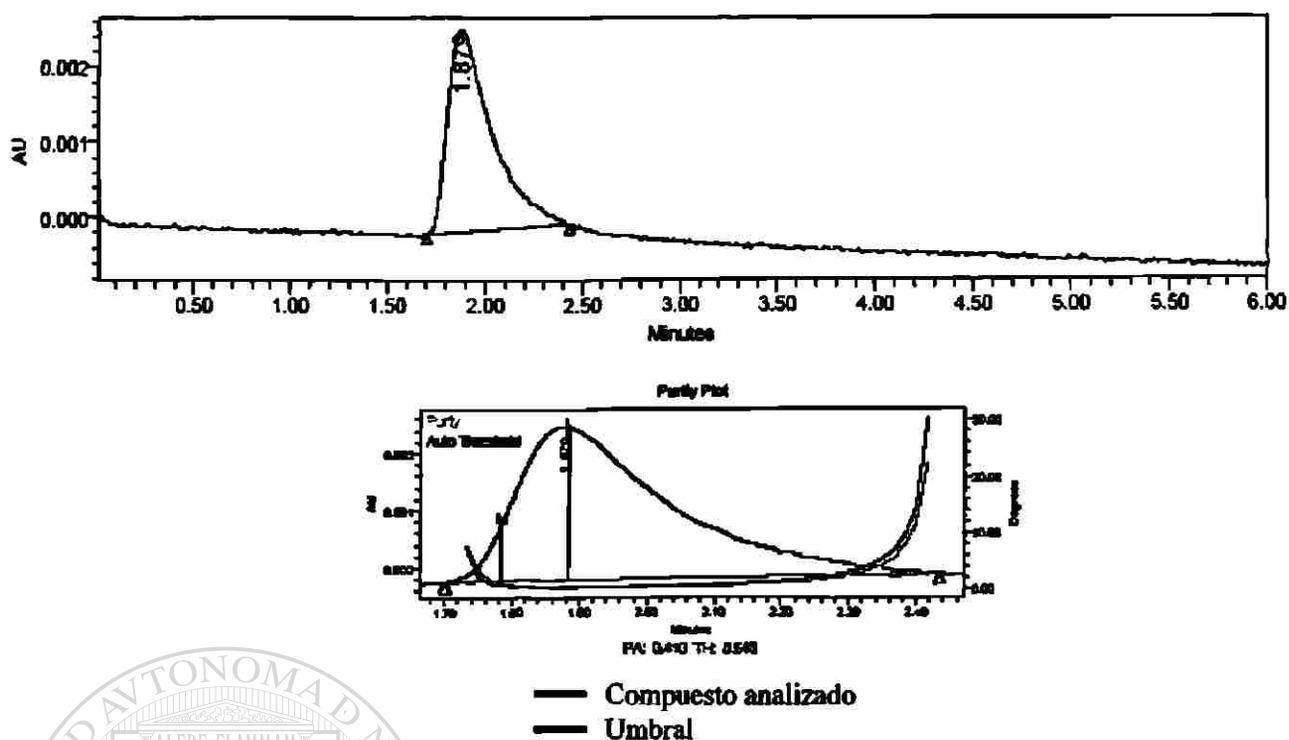


Fig. 24. Cromatograma ( $\lambda$ , 250nm) de la fracción F3LFR-261204-75 y análisis de pureza

### 3.7.2 Espectroscopia UV-Vis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El espectro UV-Vis del compuesto F3LFR-261204-75 se muestra en la figura 25. Se puede notar que el compuesto absorbe muy poco en el rango UV-Vis.

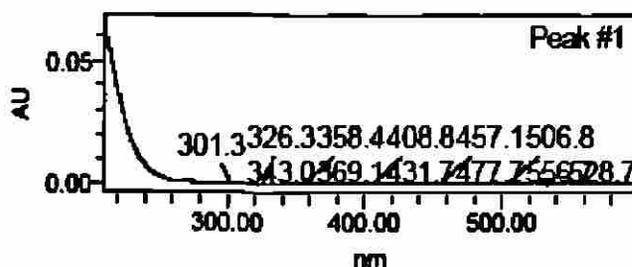


Fig. 25. Espectro ultravioleta-visible del compuesto F3LFR-261204-75

### 3.7.3 Espectroscopia IR

El espectro infrarrojo del compuesto F3LFR-261204-75 indica que la molécula tiene una función carbonilo ( $1715\text{ cm}^{-1}$ ), que presenta dobles enlaces olefinicos ( $1645\text{ cm}^{-1}$ ) y que no presenta aromáticos en su estructura. El espectro IR se observa en la figura 26.

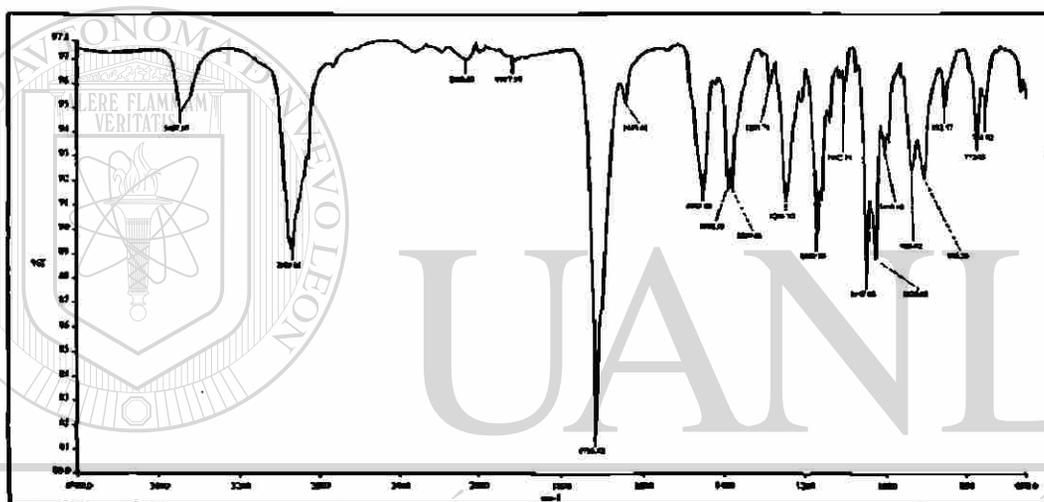


Fig. 26. Espectro infrarrojo del compuesto F3LFR-261204-75

### 3.7.4 Espectroscopia de RMN

Al compuesto F3LFR-261204-75 se le realizaron los siguientes espectros de resonancia:  $^1\text{H}$ RMN,  $^{13}\text{C}$ RMN, DEPT, espectros de doble dimensión, HMBC, HMQC, COSY y experimentos NOE (Figuras 27 a 32).

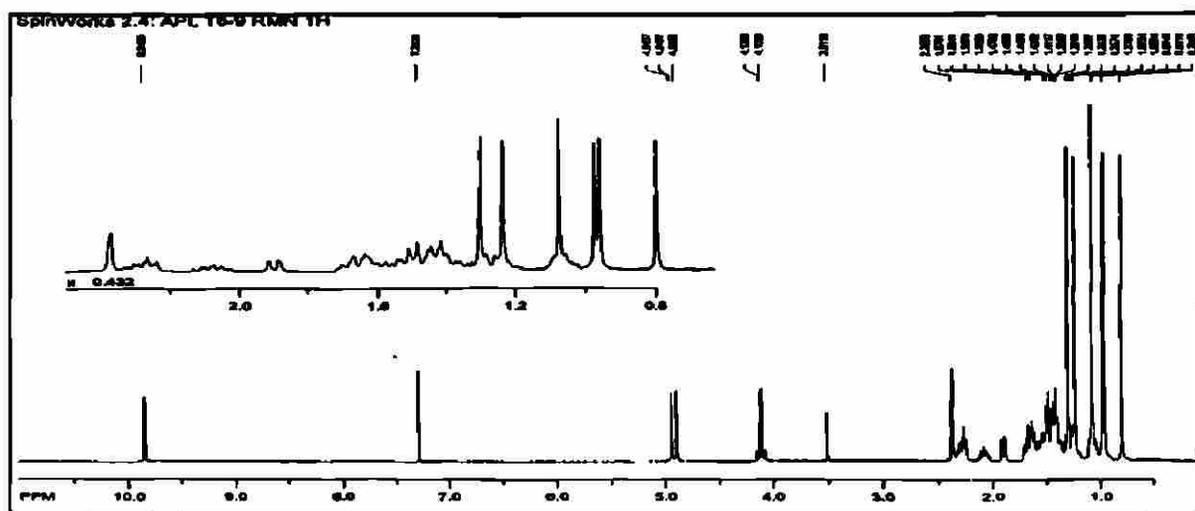


Fig. 27. Espectro de  $^1\text{H}$ RMN del compuesto F3LFR-261204-75

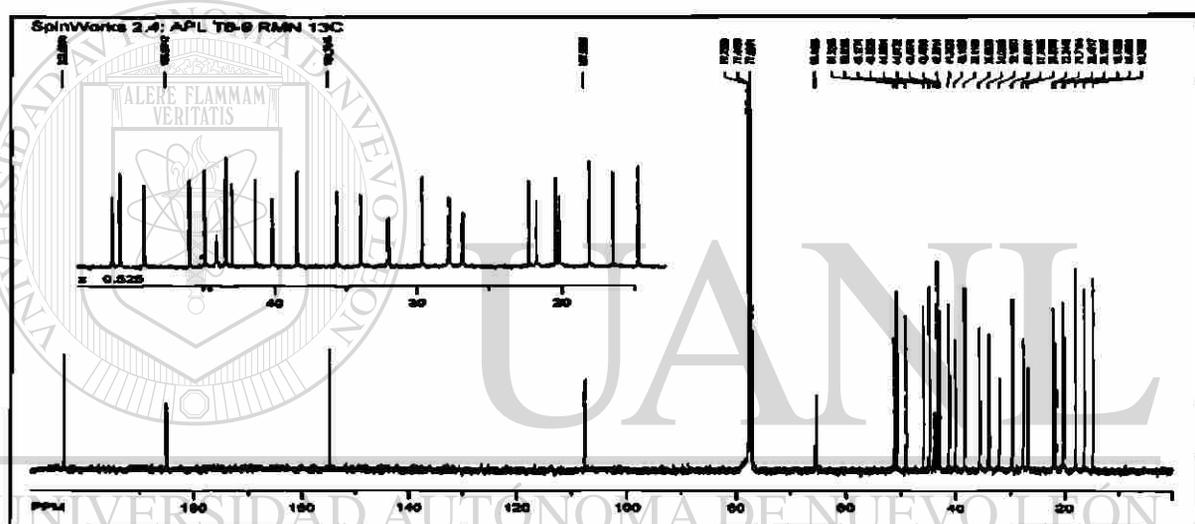


Fig. 28. Espectro de  $^{13}\text{C}$ RMN del compuesto F3LFR-261204-75

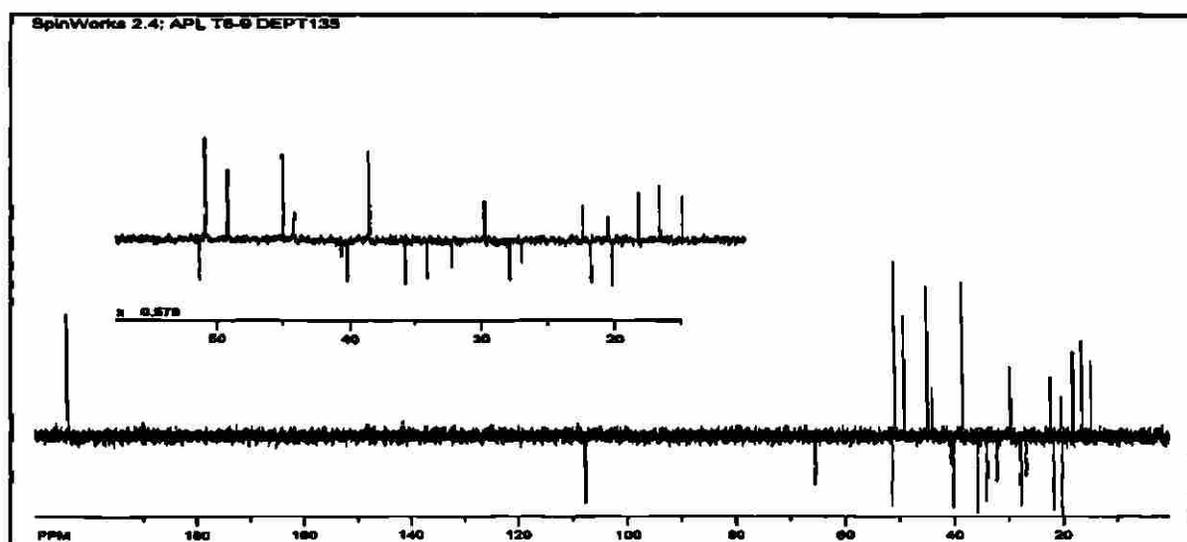


Fig. 29. Espectro DEPT 135 del compuesto F3LFR-261204-75

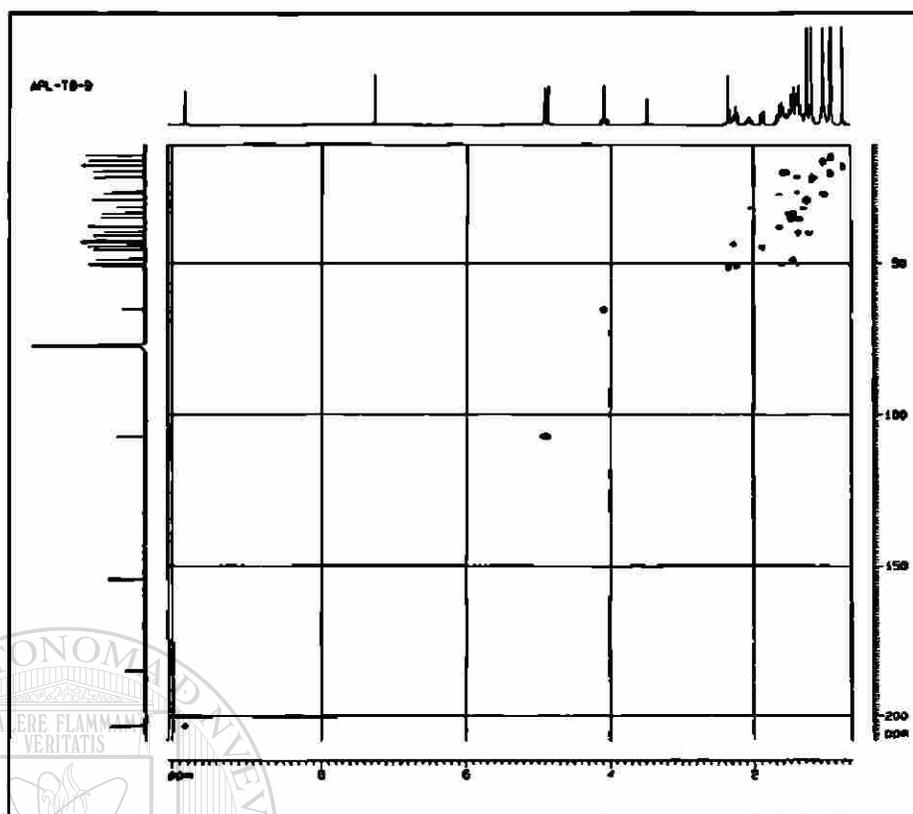


Fig. 30. Espectro HMQC del compuesto F3LFR-261204-75

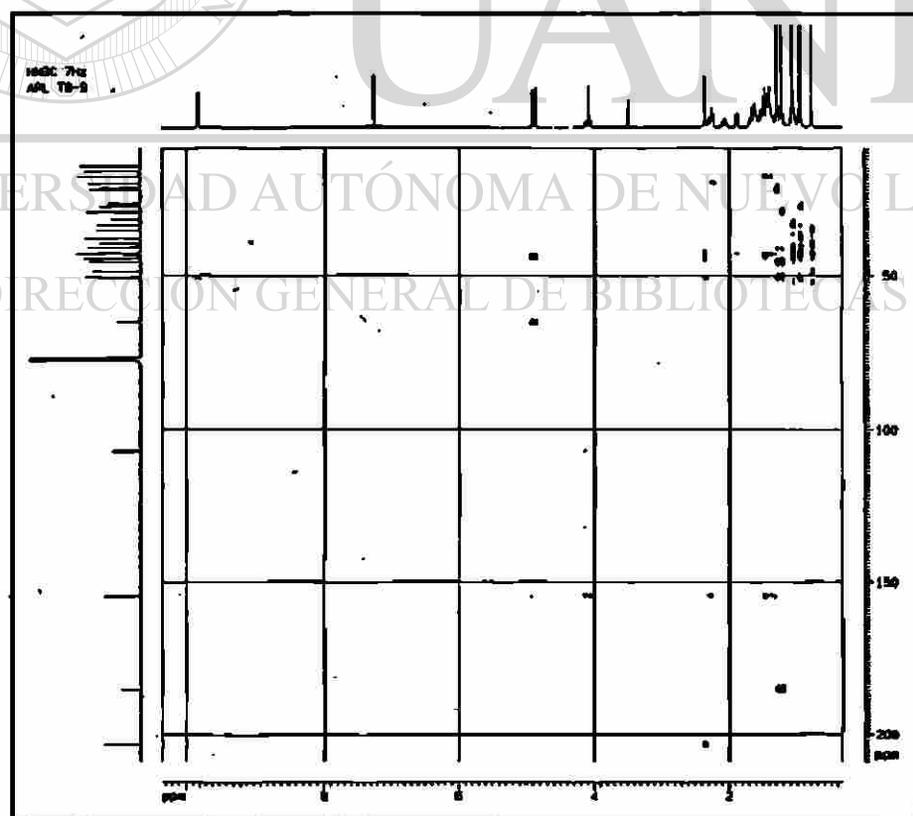


Fig. 31. Espectro HMBC (7 Hz) del compuesto F3LFR-261204-75

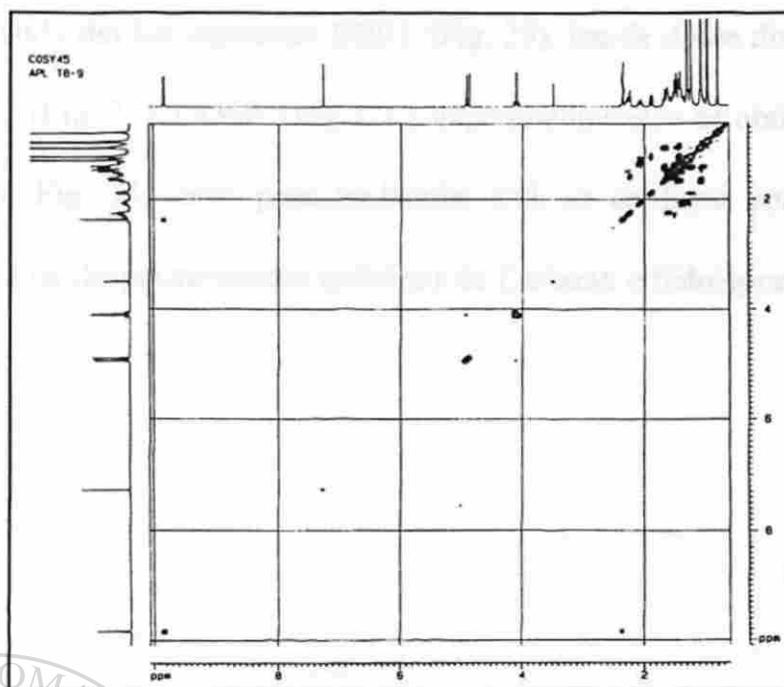
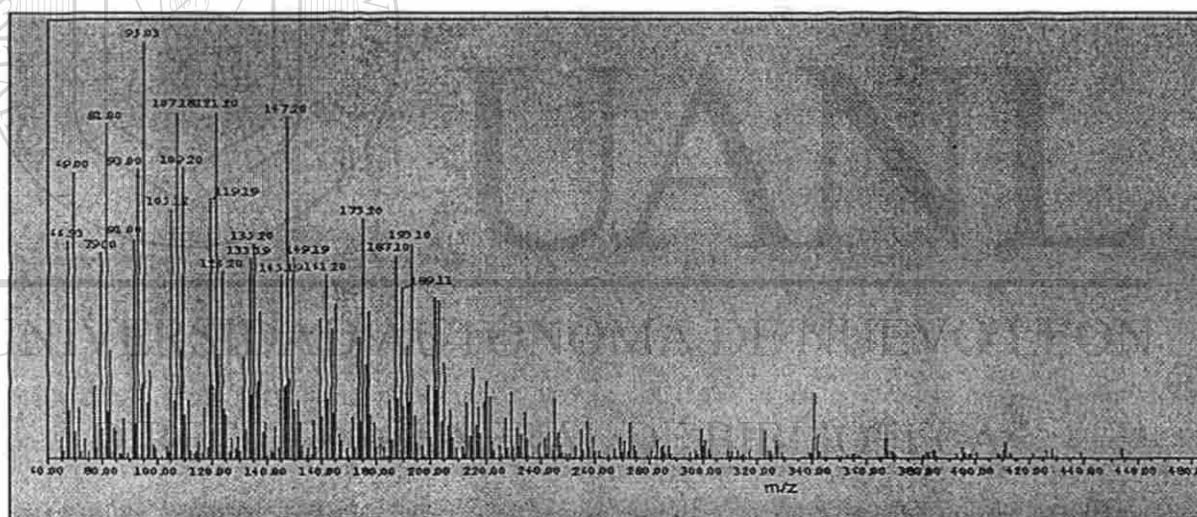


Fig. 32. Espectro COSY del compuesto F3LFR-261204-75



Con la ayuda de los espectros DEPT (Fig. 29), los de doble dimensión, HMQC (Fig. 30), HMBC (Fig. 31), COSY (Fig.32) y experimentos nOe se obtiene la estructura de un triterpeno (Fig. 34) cuyo peso molecular 454, se confirma con el espectro de masas (Fig. 33). Los desplazamientos químicos de Carbono e hidrógeno se presentan en la tabla 13.

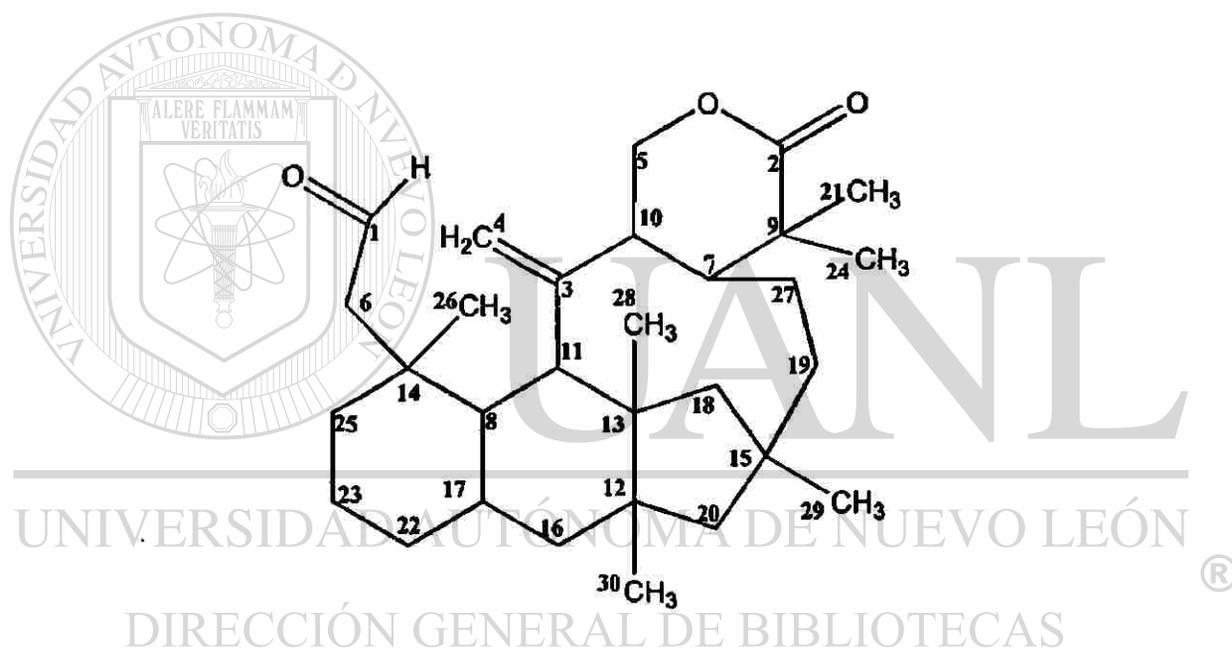


Fig. 34. Estructura del compuesto F3LFR-261204-75 aislado de hojas de *Cordia boissieri* (La numeración no sigue la nomenclatura IUPAC)

Tabla 13. Desplazamiento químico de carbono e hidrógenos del compuesto en los espectros de RMN

Carbono	Tipo	Desplazamientos químicos de Carbono (ppm)	Desplazamientos químicos de Hidrógeno (ppm)
1	CH	203.2859	9.83 (t, $J=2$ Hz)
2	C	184.6507	
3	C	154.3525	
4	CH <sub>2</sub>	107.2511	4.92 (d, $J=1.2$ Hz) 4.87 (s)
5	CH <sub>2</sub>	65.0350	4.12 (d, $J=14.4$ Hz) 4.07 (d, $J=14.4$ Hz)
6	CH <sub>2</sub>	50.9160	2.34 (s)
7	CH	50.3858	2.23 (m)
8	CH	48.7149	1.46 (m)
9	C	45.5408	
10	CH	44.4873	1.88 (dd, $J=12$ y $2.1$ Hz)
11	CH	43.6619	2.28 (m)
12	C	43.0848	
13	C	42.9975	
14	C	42.5815	
15	C	40.9508	
16	CH <sub>2</sub>	39.7563	1.38 (m) 1.23 (m)
17	CH	37.9982	1.65 (m)
18	CH <sub>2</sub>	35.2804	1.48 (m) 1.39 (m)
19	CH <sub>2</sub>	33.5893	1.48 (m)
20	CH <sub>2</sub>	31.6969	2.06 (m) 1.33 (m)
21	CH <sub>3</sub>	29.2476	1.28 (s)
22	CH <sub>2</sub>	27.3552	1.04 (m)
23	CH <sub>2</sub>	26.4292	1.42 (m)
24	CH <sub>3</sub>	21.8324	1.21 (s)
25	CH <sub>2</sub>	21.3090	1.43 (m)
26	CH <sub>3</sub>	19.9870	0.95 (s)
27	CH <sub>2</sub>	19.7454	1.60 (m)
28	CH <sub>3</sub>	17.7189	0.78 (s)
29	CH <sub>3</sub>	16.0748	1.05 (s)
30	CH <sub>3</sub>	14.3703	0.94 (s)

### 3.8 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del Compuesto Aislado y Otras Fracciones Activas

Se determinó la concentración mínima inhibitoria del compuesto F3LFR-261204-75 y de las fracciones F6LFR-281204-78 y F8LFR-281204-78 contra *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae*. Los resultados se muestran en la tabla 14.

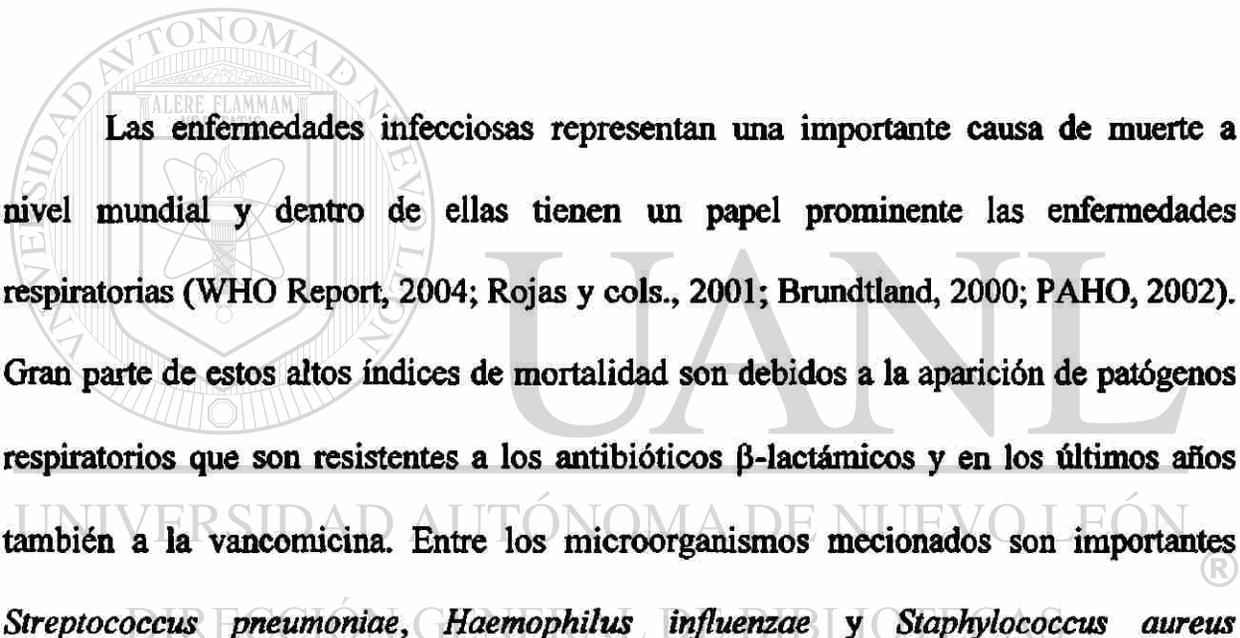
Tabla 14. CMI del compuesto puro y dos fracciones sobre microorganismos causantes de infecciones respiratorias.

Microorganismo	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) $\mu\text{g/mL}$ / $\mu\text{mol}$				
	Extracto original	Compuesto aislado F3LFR-261204-75	F6LFR-281204-78	F8LFR-281204-78	Cefalotina
<i>Staphylococcus aureus</i> IMSS-NL/HE25:01 Resistente a oxacilina	250	62.5 / 0.137	7.81	7.81	31.25 / 0.078
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923. Sensible a oxacilina	250	NR	31.25	125	0.030 <sup>®</sup>
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619 Resistente a oxacilina	125	31.25 / 0.068	NA	NA	0.95 / 0.002
<i>Streptococcus pneumoniae</i> InDRE 24-CCpn-02 Resistente a oxacilina,	125	31.25 / 0.068	250	250	7.81 / 0.019
<i>Haemophilus influenzae</i> tipe b ATCC- 49247. Resistente a ampicilina	500	NA	NA	NR	0.48
<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b InDRE- 90-CCH-02. Sensible a ampicilina	NA	NA	NA	NR	0.95

NA, No activo a las concentraciones probados. NR, No realizado.

## CAPÍTULO 4

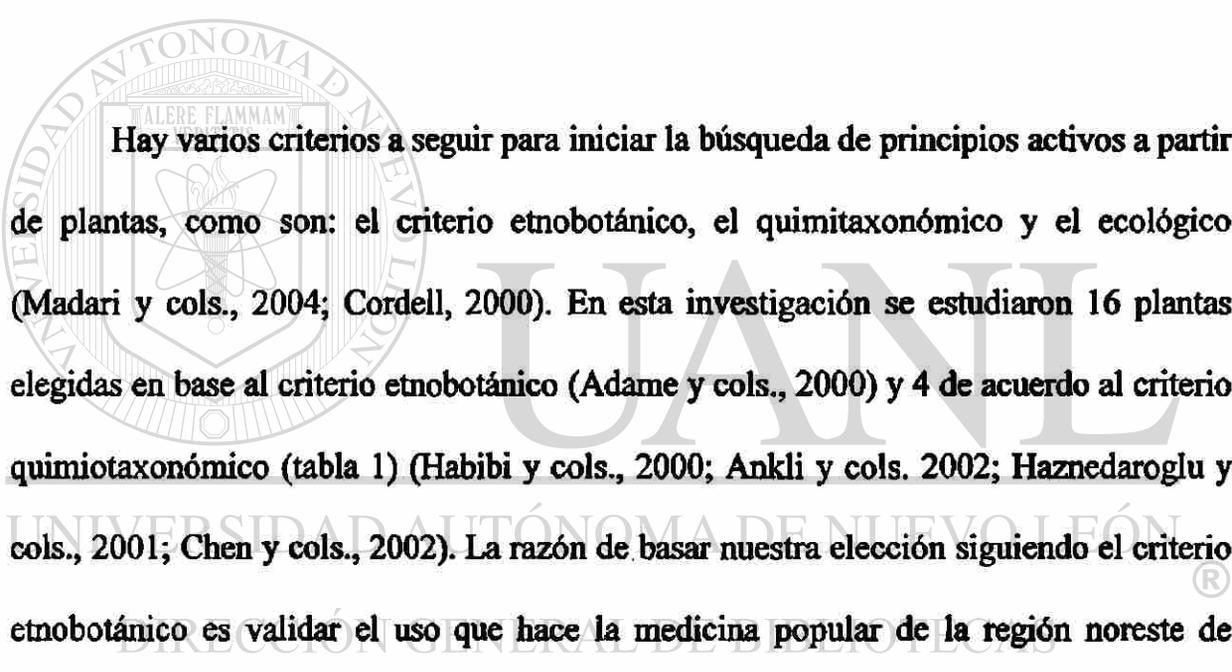
### DISCUSIÓN



Las enfermedades infecciosas representan una importante causa de muerte a nivel mundial y dentro de ellas tienen un papel prominente las enfermedades respiratorias (WHO Report, 2004; Rojas y cols., 2001; Brundtland, 2000; PAHO, 2002). Gran parte de estos altos índices de mortalidad son debidos a la aparición de patógenos respiratorios que son resistentes a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y en los últimos años también a la vancomicina. Entre los microorganismos mencionados son importantes *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus* (Brundtland, 2000). Por otra parte, el aumento en el uso de las plantas medicinales para el tratamiento de muchas enfermedades, entre ellas las que afectan a las vías respiratorias, hace necesario su estudio sistemático para conocer sus principios activos (Estrategia de la OMS sobre medicinal tradicional 2002 – 2005). Además de contener compuestos con alguna actividad terapéutica, las plantas pueden contener tóxicos que es necesario conocer y por lo tanto se deben analizar para hacer uso racional de ellas (Capasso y cols., 2000; Tyler, 1999). Otro aspecto importante de estudiar la

composición química de las plantas usadas en medicina tradicional, es que entre los compuestos con diversas actividades que se han aislado de plantas hay un gran número con actividad antimicrobiana o que sirven de base para obtener compuestos con ésta actividad. (Cremin y cols., 2002; Murphy, 1999; Nicolau y cols., 1998).

En la región noreste de México se ha investigado poco acerca de las principios activos de las plantas. Por esta razón se decidió realizar este proyecto para investigar plantas usadas para el tratamiento de infecciones respiratorias.



Hay varios criterios a seguir para iniciar la búsqueda de principios activos a partir de plantas, como son: el criterio etnobotánico, el quimitaxonómico y el ecológico (Madari y cols., 2004; Cordell, 2000). En esta investigación se estudiaron 16 plantas elegidas en base al criterio etnobotánico (Adame y cols., 2000) y 4 de acuerdo al criterio quimiotaxonómico (tabla 1) (Habibi y cols., 2000; Ankli y cols. 2002; Haznedaroglu y cols., 2001; Chen y cols., 2002). La razón de basar nuestra elección siguiendo el criterio etnobotánico es validar el uso que hace la medicina popular de la región noreste de México de esas plantas. Las 3 especies de salvia y *Eupatorium cardiophyllum* se eligieron por criterio quimiotaxonómico porque al realizar la revisión bibliográfica de plantas con actividad antimicrobiana, se encontraron especies activas, relacionadas taxonómicamente con las que se reportan en este trabajo (Ulubelen y cols., 2001; Cantrell y cols., 1998).

En los estudios sobre actividad antimicrobiana de plantas, se han utilizado diversos métodos de extracción, con solventes de diferentes polaridades o mezclas de

algunos de ellos. La elección de un solvente en particular está basada en algunos criterios: por ejemplo si ya se conoce la naturaleza del compuesto que se busca o el grupo fitoquímico de que se trata (Springfield y cols., 2003); algunos autores eligen la técnica y solventes con base en antecedentes de extractos o compuestos obtenidos de especies o géneros relacionados con la planta sujeta a investigación. Por otra parte, también se toma en cuenta el tipo de estudio que se va a realizar, si es con una sola planta o si se va a hacer un tamizaje con varias plantas. Entre algunos solventes y métodos reportados en diferentes estudios se encuentran maceración con cloroformo (Navarro y cols., 1998; Hababi y cols., 2000; Rojas 2001), maceración del material vegetal con etanol (Dimayuga y cols., 1998), hexano y diclorometano en extracciones sucesivas en Soxhlet (Lechner y cols., 2004), una mezcla de diclorometano y metanol por maceración (Ankli y cols., 2002), metanol, acetato de etilo o acetona por maceración o agitación del material vegetal (Yasunaka y cols., 2005; Salvat y cols., 2001; Elof, 1998; Li y cols., 1997), metanol en Soxhlet (Morel y cols., 2002). Murphy (1999) en una revisión bibliográfica sobre los solventes utilizados en extracciones y el tipo de compuestos obtenidos que resultaron activos contra microorganismos, encontró que el metanol es el solvente más usado y con el que se extrae más amplia gama de compuestos. En el presente trabajo se utilizó metanol para la extracción en la mayoría de las plantas estudiadas, ya que se trataba de obtener el mayor número de constituyentes posibles para probar su actividad antimicrobiana. Solamente para dos plantas se utilizó otro solvente: hexano para extraer metabolitos del fruto de *Schinus molle* ya que se conoce la naturaleza aceitosa de esta parte de esta planta. Para el caso de *Chrysactinia mexicana* se usó éter etílico previo al tratamiento con metanol, por ser una planta con alto contenido en aceites esenciales.

Los porcentajes de recuperación obtenidos para los extractos orgánicos están en un rango entre 1.2% para el extracto de éter etílico de la raíz de *Chrysactinia mexicana* y 39.2% para el extracto metanólico de flor de *Leucophyllum frutescens* (tabla 2). El dato del porcentaje de recuperación es importante, ya que en caso de aislar un compuesto con buena actividad antimicrobiana se puede estimar si es costeable o no su aislamiento en grandes cantidades o se puede intentar obtenerlo de otras fuentes naturales (como por ejemplo algunas especies relacionadas) o por la vía de síntesis.

La determinación de la actividad antimicrobiana se realizó por la técnica de microdilución en caldo como lo indica el manual NCCLS (documento M100-S12, 2002, 2002). Para el desarrollo de la técnica en microplacas se depositan 200  $\mu\text{L}$  de agua destilada en los pozos de la orilla para evitar la evaporación de los pozos de prueba y las condiciones de análisis no sufran variación. En lo que respecta a las concentraciones de los extractos a analizar, no existe una guía que indique cual concentración de un extracto debe considerarse como la más alta para que dicho extracto se considere activo. Se realizó una búsqueda bibliográfica y se encontró que los rangos de concentraciones analizadas varían mucho en los diferentes estudios: por ejemplo, en un estudio por técnica de microdilución se tomó la concentración de 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  como alta actividad para un extracto, una concentración de 128 a 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  como actividad moderada y se tomó como ausencia de actividad antimicrobiana una concentración igual o mayor de 1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Yasunaka y cols., 2005); para otro autor la concentración del punto de corte es de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Salvat y cols., 2001); otros autores aunque no indican cual es la concentración más alta a la que consideran activo un extracto, utilizan en sus bioensayos

concentraciones de hasta 50, 000  $\mu\text{g/mL}$  (Springfield y cols., 2003). En este estudio se tenía que fijar un rango de concentraciones donde la concentración más alta, no dejara fuera de posteriores estudios a plantas de uso popular que pudieran resultar importantes y por otra parte que dicho punto de corte permitiera en caso de llegar a obtener un compuesto puro activo, que éste pudiera competir con los antimicrobianos convencionales. Finalmente para el estudio de los extractos analizados en este trabajo se decidió usar como punto de corte 500  $\mu\text{g/mL}$ , por lo que se prepararon concentraciones en un rango de 31.25  $\mu\text{g/mL}$  a 500  $\mu\text{g/mL}$ .

Es importante encontrar nuevos fármacos o alternativas de tratamiento contra los microorganismos elegidos para este estudio ya que son los causantes de un amplio espectro de infecciones pediátricas y de adultos adquiridas en la comunidad así como intrahospitalarias; dichas afecciones incluyen: otitis media, sinusitis, exacerbaciones agudas de bronquitis crónica, neumonía, bacteremia y meningitis (Jacobs y cols., 1999; Cedric, 1995). La neumonía cobra alrededor de 2.7 millones de vidas por año en menores de 5 años de edad y constituye la principal causa de morbimortalidad en la infancia (Hortal y cols., 2000), este problema se acentúa debido a la resistencia de estos microorganismos a los diversos antimicrobianos como los  $\beta$ -lactámicos, macrólidos, trimetoprim-sulfametoxazol, vancomicina entre otros. (Hsueh y cols., 2000; Mitscher y cols., 1999; Brundtland, 2000; Jacobs y cols. 1999). Dada la importancia de los microorganismo causantes de estas infecciones resistentes a diversos antibióticos, en este estudio se incluyó una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina aislada y caracterizada en el IMSS, dos cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a

oxacilina y una cepa de *Haemophilus influenzae* resistente a ampicilina. aisladas y caracterizadas en el InDRE.

El crecimiento de los microorganismos estudiados en este trabajo es de fácil observación por ser bacterias de crecimiento rápido, su desarrollo en caldo puede leerse a simple vista por observación de turbidez del medio de cultivo; sin embargo, en la presente investigación se utilizó el alamar azul que es un revelador que indica presencia de actividad metabólica; este indicador se usó únicamente para evidenciar el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Hemophilus influenzae*. Hay pocos trabajos reportados para evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas que describen el uso del alamar azul para revelar el crecimiento de los microorganismos (Salvat y cols., 2001; Franzblau y cols., 1998; Biosource).

Los extractos utilizados en la determinación de alguna actividad normalmente presentan color, lo cual representa alguna dificultad al momento de revisar los resultados, en este trabajo además de presentarse esta situación, algunos extractos después de la incubación presentaban turbidez que se pensaba era debido al crecimiento microbiano, pero al revisar su correspondiente control de extracto más medio de cultivo sin microorganismo, también se observaba turbidez; para resolver este problema el uso del alamar azul resultó de gran ayuda, ya que al revisar el color del medio se evidenciaba si había o no actividad metabólica por crecimiento del microorganismo aunque hubiera turbidez del extracto.

Para *Streptococcus pneumoniae* no se utilizó el alamar azul ya que el color de éste presentaba interferencia con el color normal del medio de cultivo y no se lograba distinguir los pozos donde había crecimiento. Para leer los resultados de la actividad de los extractos contra este microorganismo, la presencia de turbidez se tomó como indicador de crecimiento bacteriano. La ausencia de turbidez se tomó como evidencia de no crecimiento bacteriano. Además el color del medio cambió de rojo a amarillo cuando hubo crecimiento.

Se encontraron tres extractos metanólicos activos para las dos cepas, tanto la sensible como la resistente de *Staphylococcus aureus*; estos fueron el extracto de hojas de *Cordia boissieri*, raíz de *Ceanothus coeruleus* y raíz de *Cyperus alternifolius* (tabla 3).

Resultaron 10 extractos activos para las cepa de *Haemophilus influenzae* resistente a ampicilina ATCC 49247; estos fueron los extractos metanólicos de la corteza y raíz de *Schinus molle*, el extracto hexánico del fruto de la misma planta, los extractos metanólicos de hojas de *Cordia boissieri*, de raíz de *Ceanothus coeruleus*, de raíz de *Cyperus alternifolius*, de hojas de *Phyla nodiflora*, de flor de *Salvia reflexa* y el extracto de éter etílico de la raíz y de la flor de *Chrysactinia mexicana*. Para la cepa sensible de *Haemophilus influenzae* InDRE 90-cch-02, 4 extractos resultaron activos, los extractos metanólicos de raíz de *Schinus molle* y el de la raíz de *Ceanothus coruleus*, además el extracto acuoso de las hojas de *Leucophyllum frutescens*, y el extracto de éter etílico de la raíz de *Chrysactinia mexicana*. Es importante mencionar que para ninguna

de las dos cepas de *Haemophilus influenzae* estudiadas los valores de CMI fueron inferiores a los 500 µg/mL (tabla 3).

Se encontraron 25 extractos activos provenientes de 13 plantas para la cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 resistente a oxacilina. Fueron activos los extractos metanólicos de hoja, flor y raíz de *Schinus molle* además del extracto hexánico de fruto. También resultaron activos los extractos metanólicos de hoja, flor y fruto de *Cordia boissieri*, de hoja y raíz de *Leucophyllum frutescens*, de flor y raíz de *Salvia reflexa*, de hojas de *Salvia affinis hispanica*, de raíz de *Phyllanthus nodiflora*, de raíz de *Colubrina greggi*, de raíz de *Rivina humilis*, de raíz de flor/fruto de *Scutellaria elliptica*, de raíz de *Ceanothus coeruleus*, de flor/fruto de *Sambucus mexicana*, de hojas, flor y raíz de *Eupatorium cardiophilum*, de hojas y flor de *Eupatorium odoratum* y el extracto de éter etílico de la raíz de *Chrysactinia mexicana*. Para la otra cepa de *Streptococcus pneumoniae* InDRE 24-ccpn-02 también resistente a oxacilina, se encontraron 44 extractos activos provenientes de 18 plantas, las únicas plantas que no presentaron actividad fueron *Salvia coccinea*, *Smilax bona nox* y *Heliotropium angiospermum*. De los resultados obtenidos se puede notar que las dos cepas de *Streptococcus pneumoniae* fueron las más sensibles a la mayoría de los extractos probados, aunque 28 de ellos con un valor de CMI de 500 µg/mL; sin embargo, los resultados más notables se obtuvieron con los extractos hexánicos del fruto de *Schinus molle* que presentaron un valor de CMI de 62.5 µg/mL para ambas cepas resistentes a oxacilina (tabla 3).

De las 16 plantas elegidas por criterio etnobotánico para la realización de esta investigación, 87.5 % resultaron activas al menos para un microorganismo (tablas 1 y 3). Los resultados de actividad, justifican de cierta manera el uso de estas plantas en la medicina tradicional.

Cabe aclarar que si bien la mayoría de las especies se seleccionaron siguiendo el uso de la medicina tradicional de la región noreste de México o porque existían reportes de especies relacionadas en uso actualmente en la medicina herbolaria (Díaz, 1976; Mendieta y cols., 1981; Enciclopedia de medicina herbolaria, 1994 y Adame y cols., 2000), también existen reportes científicos de la actividad antimicrobiana de algunas de las especies colectadas o de otras pertenecientes al mismo género.

Existen reportes científicos de actividad antimicrobiana de 13 plantas (o especies relacionadas a ellas) que en este trabajo mostraron actividad, (tabla 1). Estas plantas son: *Ceanothus coeruleus*, *Clematis drummondii*, *Colubrina greggii*, *Cordia boissieri*, *Chrysactinia mexicana*, *Cyperus alternifolius*, *Eupatorium cardiophyllum*, *Eupatorium odoratum*, *Phyla nodiflora*, *Rivinia humilis*, *Salvia chia*, *Salvia reflexa* y *Schinus molle*.

En la medicina herbolaria están reportadas especies del género *Heliotropium* y del género *Smilax* contra afecciones respiratorias; además del género *Heliotropium* se han aislado compuestos activos contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Klebsiella Pneumoniae*; sin embargo, en el tamizaje realizado en esta investigación ambas plantas resultaron inactivas a las concentraciones probadas contra las cepas sometidas a estudio.

De las plantas analizadas, las más interesantes por la actividad que presentaron contra el mayor número de cepas analizadas son el extracto metanólico de *Cordia boissieri*, y los extractos metanólicos de raíz de *Ceanothus coeruleus* y *Cyperus alternifolius*. En la literatura está reportado el uso en la medicina popular de *Cordia bossieri*, *Cordia. dodecandra*, *Cordia. globosa*, *Cordia sebestena* y *Cordia sonora*, como antitusivos (Díaz, 1976; Adame y cols., 2000) también se reporta a *Cordia boissieri* y *Cordia dodecandra* como anticatarrales y a *Cordia alliadora* para enfermedades del sistema respiratorio en general (Díaz, 1976). Por otra parte, El-Sayed y cols. (1998), reportaron el uso de *Cordia macleodii* en infecciones urinarias, enfermedades pulmonares y como astringente y aislaron compuestos fenólicos y flavonoides, aunque no mencionan la realización de pruebas de actividad antimicrobiana. Existen otros estudios donde se revisó la actividad anti-inflamatoria de *Cordia francisci*, *Cordia martinicensis*, *Cordia myxa*, *Cordia serratifolia* y *Cordia ulmifolia* (Rapisarda y cols., 1992). Otros reportes de compuestos activos aislados de plantas de este género se discutirán más adelante.

#### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

De las plantas relacionadas con *Ceanothus coeruleus*, Xing-Cong-Li y cols. (1997), reportaron el uso popular de *Ceanothus americanus* en lavados bucales y dolor de dientes, también describieron el aislamiento de triterpenos y flavonoides que presentan actividad contra bacterias bucales como *Streptococcus mutans* entre otras. Como ya se mostró en los resultados, en esta investigación se encontró actividad de *Ceanothus coeruleus* contra las 6 cepas analizadas aunque con un valor de CMI de 500

µg/mL que se consideró en este trabajo como punto de corte para catalogar cualquier extracto como activo.

En lo que se refiere a *Cyperus alternifolius*, Dimayuga y cols. (1998), describieron el uso popular de la especie relacionada *Cyperus esculentus* para tratar fiebre, tos, resfriado, dolor de cuerpo y reportaron actividad del extracto etanólico de la planta entera contra *Staphylococcus aureus*. En otro estudio Koné y cols. (2004), probaron la actividad de un extracto hidroalcohólico de la raíz de *Cyperus articulatus* contra *Staphylococcus aureus* pero no encontraron actividad contra este microorganismo. En el tamizaje realizado en el presente trabajo se encontró actividad de *Cyperus alternifolius* contra las dos cepas de *Staphylococcus aureus*, una de *Haemophilus influenzae* y una de *Streptococcus pneumoniae*.

Con respecto a especies relacionadas con *Schinus molle*, Martínez y cols. (1996), mencionan la actividad antimicrobiana de *Schinus terebenthifolius* contra bacterias y hongos. Por otra parte Gundiza (1993) reportó la actividad de aceites esenciales de hojas de *Schinus molle* contra *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, entre otras bacterias. En el bioensayo realizado, se encontró actividad del extracto de todas las partes de *Schinus molle* contra las dos cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a oxacilina y actividad solo de algunas partes de la planta contra las cepas de *Haemophilus influenzae*, algunos de estos extractos con valores de CMI de 65 µg/mL.

Cantrell y cols. (1998) reportaron el uso en la medicina natural de *Chrysactinia mexicana* y también describieron la actividad de la parte aérea de esta planta contra *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium avium*. En el tamizaje aquí presentado se encontró actividad contra las 2 cepas de *Haemophilus influenzae* y las 2 cepas de *Streptococcus pneumoniae*, aunque la mayoría de los extractos analizados presentaron CMI de 500 µg/mL que fue la concentración de corte elegido para considerar un extracto como activo.

Las dos especies analizadas del género *Eupatorium*, *E. cardiophyllum* y *E. odoratum*, también presentaron actividad. En la literatura etnobotánica hay pocas plantas de este género reportadas con actividad contra enfermedades respiratorias, prácticamente sólo el caso de *Eupatorium perfoliatum* que es reportado como expectorante, anticatarral y para tratar la bronquitis (Enciclopedia de Medicina Herbolaria, 1994); otras especies son reportadas con actividades diferentes, por ejemplo: *Eupatorium odoratum* es reportado como astringente (Mendieta y cols., 1981), *Eupatorium hemipteropodum* se reporta como antirreumático (Díaz, 1976) y *Eupatorium albicaule* es reportado contra asma y cálculos (Mendieta y cols., 1981). Por su parte, Cantrell y cols. (1998), reportaron la actividad de un extracto de la parte aérea de *Eupatorium havanense* colectada en el noreste de México (estado de Tamaulipas) contra *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium avium*.

Existen reportes del uso en la medicina natural de *Salvia officinalis* como enjuague bucal para el tratamiento de la faringitis y amigdalitis. También se reporta el uso del aceite de salvia como antimicrobiano (Enciclopedia de Med. Herbolaria, 1994).

Por otra parte, Ulubelen y cols. (2001) reportaron la actividad antifúngica y antibacteriana incluyendo anti *Mycobacterium tuberculosis* de varias especies de Salvia; de manera particular describen la actividad antituberculosis de *Salvia multicaulis* y además mencionan el aislamiento de dos compuestos, hormonina y 7-acetilhormonina que presentan actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. En la presente investigación dos de las especies de Salvia analizadas, *Salvia reflexa* Hornem, y *Salvia chia* Fernald, presentaron actividad en el punto de corte solamente contra las dos cepas de *Streptococcus pneumoniae*.

Hay algunas especies de *Heliotropium* reportadas en la medicina etnobotánica con actividad para afecciones del tracto respiratorio como *Heliotropium indicum* y *Heliotropium parviflorum* usados como antitusivos y anticatarrales (Díaz, 1976. Mendieta y cols., 1981), *Heliotropium subulatum* reportada con actividad contra fiebre, infecciones de garganta, y de la cual se aislaron compuestos activos contra *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* (Singh y cols. 2002), y *Heliotropium ellipticum* que aunque está reportado en la medicina popular con actividad contra úlceras y dolor de oídos, se aislaron de esta planta triterpenoides con actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* (Jain, 2001). A pesar de los reportes descritos, en el bioensayo realizado en este estudio con *Heliotropium angiospermum* no se encontró actividad contra ninguna de las 6 cepas analizadas.

En este estudio se encontró débil actividad (500µg/mL) de la raíz de *Rivinia humilis* sobre una de las cepas de *Streptococcus pneumoniae*. Ankli y cols. (2002) mencionaron su uso dermatológico, e investigaron su actividad contra *Bacillus cereus* y *Escherichia coli* resultando inactivo. Por otra parte Salvat y cols. (2001) reportaron la actividad de esta planta contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* a concentraciones debajo de 750 µg/mL y con actividad contra *Staphylococcus aureus* a 2000 µg/mL, que es un valor de CMI superior al punto de corte que fue considerado en ese estudio.

*Sambucus nigra* es reportada en la medicina natural como antirreumático y *Sambucus mexicana* como antitusivo, de uso contra amigdalitis, catarro y en general contra enfermedades pulmonares (Díaz, 1976; Mendieta y cols., 1981, Adame y cols., 2000). Por otra parte, Rojas R. y cols. (2003) reportaron el uso de *Sambucus mexicana* var. *bipinnata* para combatir la tos, fiebre y uretritis, además investigaron su actividad contra *Staphylococcus aureus*, y obtuvieron resultados negativos. En los bioensayos realizados en el presente estudio se encontró actividad ligera (500 µg/mL) de la parte flor/fruto de *Sambucus mexicana* contra *Streptococcus pneumoniae*.

Díaz (1976) describe el uso en la medicina popular de *Phyla escabebrima*, una especie relacionada a *Phyla nodiflora* que fue analizada en este estudio y menciona que se usa como anticatarral. *Phyla* es un género relacionado con el género *Lippia*, de hecho en un tiempo *Phyla nodiflora* era considerada como *Lippia nodiflora*. Hay varios estudios que indican actividad antimicrobina de varias especies del género *Lippia*. Se ha

reportado actividad de extractos etanólicos de *Lippia alba* contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis* (Dimayuga y cols., 1998). Wätcher y cols. (2001), reportaron el uso de *Lippia turbinata* en la medicina natural como antibacteriana y antifúngica, y aislaron triterpenoides con actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*. En el bioensayo aquí reportado se encontró solamente ligera actividad del extracto metanólico de las hojas y raíz de *Phyla nodiflora*, 500 y 250 µg/mL respectivamente contra una de las cepas resistentes de *Streptococcus pneumoniae*.

En cuanto a *Colubrina greggi*, en esta investigación sólo se encontró ligera actividad de la raíz de esta planta contra las dos cepas de *Streptococcus pneumoniae* estudiadas (500 µg/mL). Por otra parte, Mendieta y cols. (1981) describen el uso de esta planta en la medicina popular como antitusivo y contra tuberculosis; también hay reportes de uso popular de especies relacionadas, como *Colubrina glabra* usada contra neumonía y de la cual se reportó actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus faecalis* (Dimayuga y cols., 1998).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

De las especies relacionadas con *Smilax bona nox* L. Adame y cols., (2000) reportan el uso en la medicina natural de *Smilax medica* para el tratamiento general de afecciones en el pulmón, para la lepra y hepatitis y también se reporta a *Smilax mexicana* Griseb, *Smilax moranensis* y *Smilax spinosa* Miller como antirreumáticos (Díaz,1976; Mendieta y cols., 1981). En el tamizaje que se llevó a cabo en esta investigación no se detectó actividad contra ninguno de los microorganismos a las concentraciones estudiadas.

En el tamizaje realizado en este trabajo se observó actividad del extracto metanólico de las hojas de *Clematis drummondii* T & G, sólo contra una de las cepas resistentes de *Streptococcus pneumoniae* a la concentración de 500 µg/mL. Existen pocos reportes de actividad de otras plantas de este género, Hermans y cols. (2002), describieron el uso de *Clematis hirsuta* en la medicina popular contra diarrea, lepra y mal del pinto, además realizaron una investigación probando esta planta contra varios hongos, virus y bacterias incluyendo una cepa de *Staphylococcus aureus*, pero encontraron actividad solo contra las 4 especies de hongos estudiados.

En lo que se refiere al género *Scutellaria*, en la medicina tradicional se describen algunas especies con usos diferentes al antimicrobiano, como ser sedante, antiespasmódico, anticonvulsivo; las especies *Scutellaria lateriflora* L. y *Scutellaria baicalensis* se utilizan, además como remedio para la hepatitis (Enciclopedia de medicina herbolaria, 1994). Mendieta y cols., (1981) describe el uso de *Scutellaria gaumeri* Leonard como antitusivo. Yu J. y cols. (2004) y Sato y cols. (2000) reportaron la actividad de aceites esenciales y de los compuestos apigenina y luteolina aislados de *Scutellaria barbata* contra *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes, aunque esta planta está reportada en la medicina herbolaria con actividad antiinflamatoria y como agente antitumoral. En la presente investigación, se encontró actividad de los extractos metanólicos de las partes flor/fruto y raíz de *Scutellaria elliptica* contra las dos cepas resistentes de *Streptococcus pneumoniae*, 3 de estos extractos fueron activos con valores de MIC de 500 µg/mL y uno de ellos a 250 µg/mL.

Con respecto a las especies de *Leucophyllum frutescens* y *Porlieria angustifolia* sólo se reporta su uso en la medicina tradicional para males respiratorios en general. Molina (2004), reporta el aislamiento de dos compuestos de *Leucophilum frutescens* activos contra *Mycobacterium tuberculosis*. En los resultados de esta investigación se encontró actividad de la mayoría de los extractos de *Leucophyllum frutescens* contra las dos cepas resistentes de *Streptococcus pneumoniae* analizadas. De la planta *Porlieria angustifolia* hubo actividad sólo contra una de las cepas de *Streptococcus pneumoniae*.

Con el fin de continuar con el estudio de aislamiento biodirigido de productos con actividad antimicrobiana, se tenía que elegir entre las plantas que presentaron mejor actividad, para lo cual se tomó como criterio aquellos extractos crudos que presentaron actividad contra el mayor número de microorganismos analizados; de aquí que se eligieron el extracto metanólico de hojas de *Cordia boissieri*, ya que fue activo contra cinco de las seis cepas analizadas y los extractos metanólicos de raíz de *Cyperus alternifolius* L y *Ceanothus coeruleus* que resultaron activos contra cuatro y todas las cepas analizadas respectivamente. El siguiente criterio que se tomó en cuenta es la facilidad de manejo de la muestra. Por esto se decidió continuar el estudio con las hojas de *Cordia boissieri* ya que es una planta abundante en la región y la muestra es fácil de coleccionar. La otra planta elegida fue la raíz de *Cyperus alternifolius* por ser una planta pequeña y la raíz de fácil manejo, ya que la raíz de *Ceanothus coeruleus* es leñosa y difícil de manipular.

Los extractos metanólicos de hojas de *Cordia boissieri* y de raíz de *Cyperus alternifolius* se fraccionaron por partición líquido-líquido con hexano, acetato de etilo y

butanol para obtener compuestos no polares, medianamente polares y polares respectivamente. Se probó la actividad antimicrobiana de las fracciones solamente contra las dos cepas de *Staphylococcus aureus* (la cepa resistente a oxacilina (IMSS-NL/HE25:01 y con la cepa ATTC 25923 sensible a oxacilina). Aunque se encontraron varias fracciones de las dos plantas con valores de CMI aceptables (tabla 4), se eligió la fracción de acetato de etilo de hojas de *Cordia boissieri* que presentó una CMI de 62.5 µg/mL para continuar con el aislamiento de productos activos.

*Cordia boissieri* es una planta que pertenece a la familia Boraginaceae, se distribuye en la región noreste de México en los estados de Nuevo León, Coahuila, Tamaulipas y San Luis Potosí además del estado de Texas en los Estados Unidos de Norte América. Se le conoce con los nombres de Anacahuíta y Olivo de Texas. En la figura 35 se muestra una fotografía de *Cordia boissieri*.



Fig. 35. Planta de *Cordia boissieri*.

En una revisión bibliográfica se encontró que varias especies del género *Cordia* tienen actividad antimicrobiana. Coelho y cols. (2004), reportaron la actividad del extracto metanólico de la parte aérea de *Cordia mosperma* contra *Bacillus cereus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Esta planta tradicionalmente es utilizada en Brasil como antiinflamatorio al igual que *Cordia curassavica*, la cual no tuvo actividad contra los microorganismos que estudiaron. Hernández y cols. (2003), reportaron la actividad del extracto hexánico de la parte aérea de *Cordia curassavica* contra una cepa de *Staphylococcus aureus*; también reportaron actividad de este extracto contra *Sarcina lutea* y *Salmonella typhi*, esta planta es reportada en la medicina tradicional en el sur de México para el tratamiento de diarrea. Ioset y cols (2000; 1998) reportaron el aislamiento de naftoquinonas meroterpenoides (llamadas cordioquinona A, B, J y K) de la raíz de *Cordia curassavica* y de la raíz de *Cordia linnaei* con actividad antifúngica y contra la larva de *Aedes aegypti*. Martson y cols. (1988) reportaron el aislamiento de compuestos polifenólicos con actividad antifúngica de un extracto metanólico de la corteza de *Cordia goetzei*, una planta medicinal usada en Tanzania para el tratamiento de lepra y malaria. Matsuse y cols. (1999), reportaron un extracto acuoso de las hojas de *Cordia spinescens* con fuerte actividad como inhibidor de la transcriptasa reversa del virus de la inmunodeficiencia humana.

Una vez que se seleccionó la fracción activa se realizó una colecta masiva de *Cordia boissieri* en el mes de octubre del 2003, que corresponde al mismo período del año en que se había colectado la primera vez para el tamizaje, esto es para tratar de tener las mismas condiciones ambientales y que no hubiera gran variación en la producción de

metabolitos secundarios. Se inició la extracción con 800 gramos de hoja seca y molida para tratar de asegurar buena cantidad de algún producto puro.

Primero se realizó una extracción con hexano con el fin de retirar las grasas y aceites de la muestra y se continuó con una extracción con acetato de etilo; este extracto, que fue el que resultó activo contra *Staphylococcus aureus*, se siguió fraccionando. La fracción de acetato de etilo se paso por a una columna flash de sílica; las fracciones obtenidas se analizaron para determinar actividad antimicrobiana por el método de bioautografía. Es importante mencionar que por razones prácticas todo el aislamiento biodirigido se realizó solamente con la cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina, (IMSS-NL/HE25:01).

La técnica de bioautografía ha sido ampliamente usada por diferentes autores en la detección de compuestos activos contra bacterias y hongos (Rahalison y cols., 1991; Houghton y cols., 2003; Morel y cols., 2002; Jayasinghe y cols., 2003 y Springfield y cols., 2003). De las diferentes tipos de bioautografías descritos por Rahalison y cols. (1991), en el presente trabajo se utilizó la bioautografía de agar sobrepuesto. En esta técnica, una vez que se realiza la cromatografía, se coloca una capa de agar inoculado antes de que solidifique, pero en la bioautografía realizada en este trabajo, el agar se dejó solidificar, se colocó sobre la placa de cromatografía en capa fina y posteriormente se inoculó con el microorganismo a probar (Verástegui, 2000). El crecimiento microbiano o la inhibición de éste, se pudo ver a simple vista; sin embargo, se reveló el crecimiento con la sal de tetrazolio MTT para confirmar el resultado. El MTT es un colorante que identifica células con metabolismo activo y por lo tanto evidencia las zonas de

inhibición del crecimiento (Biosource International). Por otra parte, para la realización de la bioautografía se probaron varios sistemas de eluentes, finalmente el sistema que presentó una mejor separación fue el F (sección 2.1.5). Aunque Rahalison y cols. (1991) mencionan que es mejor usar placas de sílica gel con base de vidrio por las condiciones en que se usa la técnica original, en este trabajo se utilizaron cromatofolios de aluminio ya que se intentó preparar placas de sílica gel en portaobjetos, pero el grosor de la capa de sílica, la lectura de las manchas después de correr la cromatografía, así como la manipulación de las placas resultó problemática. Por otra parte hay autores que describen el uso de cromatofolios de aluminio (Jayasinghe y cols., 2003).

La técnica de bioautografía resultó muy útil para la realización del fraccionamiento biodirigido del extracto de hojas de *Cordia boissieri*, ya que se pudo analizar la actividad antimicrobiana de varias fracciones obtenidas en las diferentes columnas de manera simultánea, rápida y sencilla, lo cual permitió celeridad en la selección de las fracciones de interés.

#### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Nueve de las 13 fracciones obtenidas de la columna flash resultaron activas (tabla 5). Al revisar las bioautografías correspondientes a estas fracciones, se observaban zonas largas de inhibición de dos tercios de la placa para abajo, como si el compuesto responsable de la acción corriera en la placa cromatográfica como un barrido. Al revisar la placa cromatográfica “gemela” de cada bioautografía, a simple vista no se lograba observar nada, pero al iluminar con luz ultravioleta a 254 nm se observaron manchas que corrieron barridas, a 365 nm se observaron manchas que fluorescen naranjas como si estuvieran extendidas o barridas a lo largo de toda la placa, eran más largas que el área

de inhibición en la bioautografía; esto impidió identificar algún compuesto activo y obtener un  $R_f$  de la o las manchas responsables de la actividad. Estos resultados parecieran indicar que el sistema eluyente F (2.1.5) no era el correcto, pero de todos los probados fue el de mejores resultados ya que en los demás la muestra se quedaba en el sitio de aplicación o corría con el frente de solvente. Por otra parte las cromatografías también indicaban que las fracciones estaban muy ricas en pigmentos fotosintéticos identificados por su fluorescencia naranja a 365 nm, los cuales se esperaba eliminar en etapas posteriores del aislamiento. En este punto lo que se hizo fue identificar las fracciones activas, elegir las que presentaran una zona de inhibición definida, además de que hubiera una buena cantidad de ellas para continuar con el aislamiento biodirigido. De acuerdo con estos criterios se eligieron 4 fracciones, F9CF-190104-14, F10CF-190104-14, F11CF-190104-14 y F12CF-190104-14, las cuales se sometieron a fraccionamiento en columna de baja presión lobar de sílica gel; las fracciones obtenidas se sometieron nuevamente a bioautografía.

De las 4 columnas lobar de sílica gel se obtuvieron 77 fracciones en total, de las cuales 37 resultaron activas contra la cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina (tabla 6). En las bioautografías correspondientes a estas fracciones, también se observaron zonas largas de inhibición como en las bioautografías de las fracciones de la columna flash. Cuando se revisó la placa cromatográfica “gemela” de cada bioautografía, bajo luz ultravioleta, a 254 nm se observaron manchas que corrieron barridas y a 365 nm se observaron manchas con fluorescencia naranja; no se logró distinguir alguna mancha bien definida en lo que corresponde a la zona de inhibición del crecimiento; se observaban como si estuvieran extendidas o barridas en diferentes zonas

de la placa; además algunas se observaban sobrepuestas. Las manchas naranjas mostraban que las clorofilas no se habían eliminado de las fracciones activas, lo que indica que la sílica no es una buena fase para eliminarlas. Hasta aquí, no se podía definir un compuesto o algunos compuestos responsables de la actividad, por lo tanto se identificaron fracciones activas y se eligieron las fracciones F7LS-120204-16 y F10LS-120204-16 obtenidas de la columna de sílica gel a partir de la fracción F9CF-190104-14, para continuar con el aislamiento biodirigido. Estas fracciones se sometieron a columna de baja presión de fase reversa C18 y la actividad de las fracciones obtenidas se analizó por bioautografía.

Se obtuvieron 55 fracciones en total, 15 de éstas resultaron activas (tabla 7). En la placa cromatográfica de cada fracción activa no se observó ninguna que estuviera pura; sólo se observaron ligeras manchas de clorofila en algunas fracciones, lo que podía indicar que la fase reversa C-18 podría funcionar para quitar pigmentos fotosintéticos de las fracciones. Todas las fracciones activas se analizaron por CLAR FR-C18 (Fig. 1 a 15), los cromatogramas y los espectros de UV mostraron que la fracción F7LFR-300504-29 parecía estar pura y la F6LFR-300504-29 y la F8LFR-300504-29 tenían impurezas en poca cantidad, que también se evidenciaban en la cromatografía en capa fina. Cada una de las fracciones activas se sometió a cromatografía de exclusión molecular; las fracciones obtenidas se analizaron por CLAR FR-C18.

No hubo separación de los compuestos activos después de aplicar esta cromatografía; sin embargo, se separaron las clorofilas. Se pensó entonces, que el Sephadex podría funcionar para separar las clorofilas, pero en experimentos posteriores

con mayores volúmenes, la separación no fue tan eficaz. Las fracciones obtenidas de la columna de exclusión molecular no estaban puras y eran cantidades pequeñas que no ameritaban una purificación (Fig. 16 y 17).

Debido que las cantidades obtenidas después del proceso anterior fueron muy escasas, se realizó una segunda colecta masiva en el mes de octubre del 2004, en el municipio de García Nuevo León, tratando de que coincidiera con la misma fecha de la primera colecta masiva de la planta *Cordia boissieri*; en esta ocasión se inició la extracción con 2 Kg de hojas seca y molida. Se siguió el mismo procedimiento de extracción del aislamiento anterior, primero se realizó una extracción con hexano para retirar las grasas y aceites de la muestra; se continuó con una extracción con acetato de etilo para obtener el extracto que fue activo contra las cepas de *Staphylococcus aureus*. La fracción de acetato de etilo se sometió a una columna flash de sílica; las fracciones obtenidas se analizaron para determinar actividad antimicrobiana por el método de bioautografía.

#### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Se obtuvieron 6 fracciones de la columna flash, de las cuales 5 resultaron activas (tabla 10). Las fracciones F2CF-221104-72 y F3CF-221104-72, presentaron una zona de inhibición bien definida con un  $R_f$  de 0.51. La fracción F3CF-221104-72, presentó además una zona de inhibición con  $R_f$  menor. Estas fracciones se obtuvieron en una buena cantidad y a pesar de que tenían pigmentos fotosintéticos, se eligieron para continuar con el aislamiento biodirigido, por lo que se sometieron a fraccionamiento en columna de baja presión sobre sílica gel; la actividad de las fracciones obtenidas se probó por bioautografía.

Se obtuvieron 24 fracciones, de las cuales 20 resultaron activas contra la cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina (tabla 11). En las bioautografías correspondientes a estas fracciones, se observaron zonas de inhibición del crecimiento; cuando se revisó la placa cromatografica “gemela” de cada bioautografía, en algunas fracciones se observó un ligero barrido muy tenue a 254 nm, en todas las fracciones se veía un barrido con fluorescencia naranja a 365 nm, lo que indicaba que aún tenían mucha clorofila. Con estos resultados no se podía definir un compuesto o algunos compuestos responsables de la actividad, por lo tanto solamente se identificaron fracciones activas. Se eligieron las fracciones F3LS-151204-73, F4LS-151204-73, F5LS-151204-73, F6LS-151204-73, F7LS-151204-73 que provienen de la fracción F3CF-221104-72, que presentaban una zona de inhibición bien definida y de las cuales se contaba con cantidades suficientes para continuar con el aislamiento biodirigido. Estas fracciones se sometieron a columna de baja presión Lobar de fase reversa C18.

De las columnas a baja presión de fase reversa de F3LS-151204-73, F4LS-151204-73, F5LS-151204-73, F6LS-151204-73, F7LS-151204-73 se obtuvieron 35 fracciones (tabla 12) a las que se les realizó bioautografía; se obtuvieron 25 fracciones activas. Aquí es importante señalar que la mayoría de las fracciones no se podían observar a simple vista ni en luz ultravioleta (254 y 365 nm), esto se acentuó particularmente en las fracciones provenientes de la columna F3LS-151204-73 (tabla 12); solamente se hicieron evidentes después de revelar con vapores de yodo. También es importante mencionar que solamente las últimas fracciones de cada columna de fase reversa C-18 contenían manchas naranjas, por lo tanto se confirmó que esta fase resultó adecuada para eliminar los pigmentos fotosintéticos. En la placa cromatográfica de cada

fracción activa, se observaron varias manchas que estaban ligeramente barridas y no se pudieron obtener valores de Rf.

Todas las fracciones activas de las columnas de fase reversa se analizaron por CLAR FR-C18 (Fig. 19 a 23). El cromatograma de la fracción F3LFR-261204-75 que proviene de la fracción F5LS-151204-73 mostraba un solo pico, lo que indicaba que el compuesto estaba puro, resultado que se confirmó con cromatografía en capa fina. Otras fracciones presentaban un solo pico en CLAR FR-C18 (F7LFR-261204-75, F7LFR-301204-79) pero en cromatografía en capa fina se observaban otras manchas. Los cromatogramas de las demás fracciones activas obtenidas de todas las columnas de fase reversa C18 indicaron que estaban impuras.

Por evaporación del solvente (metanol) de la fracción F3LFR-261204-75 se obtuvo 15.2 mg de un precipitado blanco en forma de polvo, el cual posteriormente se sometió a estudios de espectroscopia UV-Vis, IR,  $^1\text{HMRN}$  y  $^{13}\text{CRMN}$ , estudios de resonancia de doble dimensión y espectrometría de masas para obtener su estructura.

El cromatograma de la figura 24 muestra que en la fracción F3LFR-261204-75 aparece un solo pico, lo cual puede indicar que se trata de un único compuesto. Por otra parte en un análisis de pureza por comparación del ángulo de umbral contra el ángulo de contraste espectral, se encontró que este último (0.410) es menor que el ángulo de pureza de umbral (0.540) y por lo tanto el compuesto F3LFR-261204-75 se considera puro (Waters, 1999).

El análisis del espectro UV-Vis (Fig. 25) indica que el compuesto absorbe muy poco en este rango, lo que podría explicar por qué era difícil observar los compuestos en CLAR y en las placas cromatográficas en la lámpara de luz ultravioleta.

El espectro IR del compuesto aislado se observa la señal de un grupo carbonilo a  $1675\text{ cm}^{-1}$ ; también una señal a  $1645$  que indica que existen dobles enlaces de olefinas; no hay señales de aromáticos (Fig. 26).

El espectro de  $^1\text{HRMN}$  (Fig. 27) del compuesto F3LFR-261204-75 indica la presencia de señales que puede ser de un aldehído ( $9.8\text{ ppm}$ ); también hay señales de olefinas ( $4.8$  y  $4.9\text{ ppm}$ ); 6 señales de hidrógenos de metilos (región de hidrógenos alifáticos) y una señal que probablemente se trate un grupo metileno muy desapantallado ( $4.1\text{ ppm}$ ) En este espectro no se observan señales de aromáticos ( $7$  a  $9\text{ ppm}$ ).

La figura 28, muestra el espectro de  $^{13}\text{CRMN}$  del compuesto puro F3LFR-261204-75, donde se ve que la estructura del compuesto tiene 30 carbonos. También indica un carbono a  $203\text{ ppm}$  que se puede tratar de un aldehído o cetona y de un carbono a  $185\text{ ppm}$  que puede ser de ácido carboxílico o de un éster. Se observa la presencia de dos carbonos olefínicos a  $154$  y  $107\text{ ppm}$  y en la zona alifática la presencia de un carbono desplazado a  $65\text{ ppm}$  que puede ser de un carbono de metileno.

El espectro DEPT 135 se muestra en la figura 29. En este espectro se pueden observar 12 señales que corresponden a metilenos y 12 señales repartidas entre metilos o metinos. En este espectro la señal de  $203$  aparece como doblete es un carbono que tiene

unido un hidrógeno lo cual confirma que es un aldehído. La señal de 65 ppm es confirmada como un metileno, el espectro también indica que la señal de 107 ppm de la olefina es un metileno y la otra señal de la olefina a 154 ppm no aparece lo cual indica que es un carbono cuaternario, esto significa que la estructura debe tener un doble enlace terminal.

La información hasta aquí obtenida se completó con los datos de los espectros de doble dimensión, HMQC (Fig. 30), HMBC, (Fig. 31) COSY (Fig.32) y experimentos NOE y se obtuvo la probable estructura de un triterpeno (Fig 34) cuyo peso molecular es 454; estos resultados se confirmaron con el espectro de masas (Fig. 33). Los desplazamientos de carbono e hidrógeno aparecen en la tabla 13. El compuesto obtenido en esta investigación no está reportado en la literatura.

En vista de que se obtuvieron muchas fracciones activas de las columna de fase reversa se consideró importante determinar la concentración mínima inhibitoria de algunas de éstas. Se eligieron las fracciones F6LFR-281204-78 y F8LFR-281204-78 además del compuesto puro F3LFR-261204-75. En el bioensayo se determinó la concentración mínima inhibitoria contra todos los microorganismos incluidos en el presente estudio.

Los resultados (tabla 14) muestran que la CMI del compuesto puro F3LFR-261204-75 (62.5 µg/mL) es menor comparado con la CMI del extracto metanólico (250 µg/mL) para la cepa resistente de *Staphylococcus aureus* IMSS NL/HE25:01; este valor

sólo es más elevado en un factor de 2 con respecto a la cefalotina para este mismo microorganismo. Las fracciones F6LFR-281204-78 y F8LFR-281204-78 resultaron muy activas contra este mismo microorganismo, los valores de CMI obtenidos para ambas fracciones fueron de 7.8 µg/mL; es interesante notar que la CMI de la cefalotina para el microorganismo mencionado fue aproximadamente 4 veces mayor a la que presentan las fracciones.

La CMI del compuesto puro F3LFR-261204-75 para las dos cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a oxacilina (ATCC 49619 e InDRE 24-CCpn-02) fue de 31.25 µg/mL, para ambas cepas, valor inferior al que presentó el extracto crudo (125 µg/mL); sin embargo, es mayor que la CMI que presenta la cefalotina para este microorganismo (tabla 14). Las fracciones F6LFR-281204-78 y F8LFR-281204-78 sólo se analizaron contra la cepa *Streptococcus pneumoniae* InDRE 24-CCpn-02; se obtuvo una CMI de 250 µg/mL para las dos fracciones, este valor es superior al obtenido con el extracto crudo (125 µg/mL); posiblemente hay compuestos activos contra esta cepa que están en otras fracciones del extracto.

Para las dos cepas de *Haemophilus influenzae* no se encontró actividad del compuesto puro ni de las fracciones analizadas. Estos resultados podían esperarse, ya que para la cepa resistente, la CMI del extracto crudo estaba en el punto de corte y para la cepa sensible no había actividad.

Es importante señalar que para el compuesto puro y para la cefalotina, los resultados de CMI también se expresan en  $\mu\text{mol}$ , ya que es una expresión de concentración que involucra el peso molecular de los compuestos y de esta manera es posible comparar más efectivamente los resultados de CMI

Los valores de CMI bajos de las dos fracciones obtenidas contra la cepa resistente de *Staphylococcus aureus*, indican que estas fracciones tienen algún compuesto puro muy activo, o que hay varios compuestos activos cuyas acciones se suman o que existe sinergismo entre los diferentes constituyentes de estas fracciones, estas suposiciones deberán ser estudiadas en investigaciones posteriores.

Existen pocos reportes de la actividad de plantas contra *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* (Singh y cols., 2002); sin embargo, existen muchos reportes de compuestos aislados de plantas con actividad contra diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* (tabla 15). En la presente investigación los valores de CMI del compuesto aislado contra la cepa de *Staphylococcus aureus* es de  $62.5 \mu\text{g/mL}$ ; en general se puede decir que está dentro de los valores de la mayoría de los compuestos aislados; sin embargo, al comparar su actividad con la cefalotina, se encontró que sólo es mayor que este antibiótico en un factor de dos (tabla 15).

Tabla 15. Compuestos aislados de diferentes plantas con actividad contra diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*

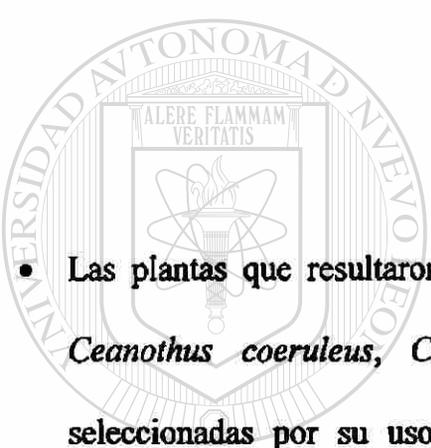
Autor	Planta	Compuestos aislados	CMI ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Cepa
Lechner y cols. (2004)	<i>Angelica dahurica</i>	Falcarindiol	8 a 32	Varias MDR y MRSA
Morel y cols. (2002)	<i>Condalia buxifolia</i>	Condalina-A	12.5	ATCC 6538
		Escutianina-B	32.12	
Ulubelen y cols. (2001)	<i>Salvia blepharochlaena</i>	Hormonina	6.5	ATCC 6538
		7-metilhormonina	10	
Yasunaka y cols. (2005)	<i>Calophyllum brasiliense</i>	2 cumarinas y 2 xantonas	1 a 8	FDA 209P MSSA No. 3208 MRSA No. 80401 MRSA
Sato y cols. (2000)	<i>Scutellaria barbata</i>	Apigenina, luteolina y SB-1	3.9 a 125	Varias MRSA y MSSA
Zgoda-Pols y cols. (2002)	<i>Vatica oblongifolia</i>	hopeafenol A	100	MRSA
		vaticafenol A	50	
Tada y cols. (2002)	<i>Prangos pabularia</i>	4 cumarinas	31.25 a 250	4 cepas MRSA
Feresin y cols. (2003)	<i>Baccharis grisebachii</i>	Un diterpeno	125	MSSA y MRSA
Feresin y cols. (2003)	<i>Oxalis erythrorhiza</i>	Embelina	62	MRSA
Rahman y cols. (2002)	<i>Feronia limonia</i>	Seis compuestos	50 a 100	NCTC 10788
Presente investigación	<i>Cordia boissieri</i>	Compuesto obtenido	62.5	IMSS-NL/HE25:01 Resistente a oxacilina
	----	Cefalotina (control)	31.25	IMSS-NL/HE25:01 Resistente a oxacilina

MDR, Multidrogoresistente; MRSA, *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente; MSSA, *Staphylococcus aureus* meticilina-sensible.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

#### 5.1 CONCLUSIONES

- 
- Las plantas que resultaron con mejor actividad (*Cordia boissieri*, *Schinus molle*, *Ceanothus coeruleus*, *Chrysactinia mexicana*, *Cyperus alternifolius*), fueron seleccionadas por su uso en la medicina tradicional. De esta manera nuestros

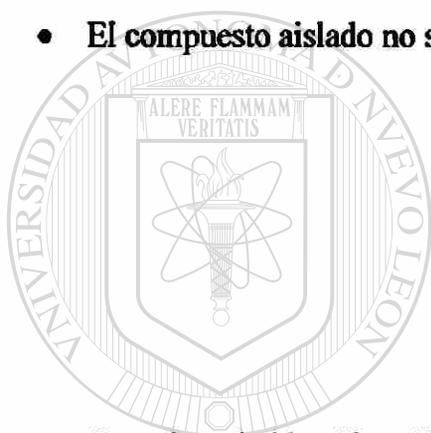
---

resultados corroboran el uso popular de dichas plantas.

- DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
- El uso del método de bioautografía resultó de gran utilidad para el fraccionamiento biodirigido de extractos con actividad antimicrobiana.
  - El fraccionamiento biodirigido de extractos de hojas de *Cordia boissieri* permitió identificar varias fracciones activas y el aislamiento de un compuesto activo puro.
  - La CMI del compuesto puro obtenido de hojas de *Cordia boissieri* es de 62.5 µg/mL para la cepa resistente de *Staphylococcus aureus* y 31.25 µg/mL para las dos cepas

resistentes de *Streptococcus pneumoniae* y no es activo para las dos cepas de *Haemophilus influenzae*.

- Las dos fracciones obtenidas de las hojas de *Cordia boissieri* presentan una CMI de 7.8 µg/mL para la cepa resistente de *Staphylococcus aureus*. Para la cepa sensible, una de las fracciones tiene una CMI de 31.25 µg/mL y para la otra presenta una CMI de 125 µg/mL.
- El compuesto aislado no se encontró reportado en la literatura.



## 5.2 PERSPECTIVAS

- Completar la identificación del compuesto aislado.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

- Aislar y caracterizar los componentes de las otras fracciones activas de *Cordia boissieri* identificadas en este trabajo.

- Realizar el fraccionamiento biodirigido de los extractos de las otras plantas activas por ejemplo: raíz de *Chrysactinia mexicana*, fruto de *Schinus molle*, raíz de *Ceanothus coeruleus*, raíz de *Cyperus alternifolius* y hojas de *Eupatorium cardiofolium* y *Eupatorium odoratum*.
- Aplicar el método de bioautografía para el fraccionamiento biodirigido de extractos activos contra otros microorganismos.

## BIBLIOGRAFÍA

Adame, M. J., Adame, M. H. Plantas curativas del noreste mexicano. 1ª edición. Editorial Castillo. (2000).

Agosta, W. C. Medicines and drugs from plants. J. Chem. Educ.. 74 (7): 857-860. July. (1997).

Ankli, A., Heirich, M., Burk, P., Wolfram, L., Bauerfeind, P., Brun, R., Schmid, C., Weiss, C., Bruggisser, R., Gertsch, J., Wasescha, M., Sticher, O. Yucatec mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. J. Ethnopharmacol. 79: 43-53. (2002).

BioSource International, Inc. USA. [www.biosource.com](http://www.biosource.com)

Brock, T. D., Smith, D. W., Madigan, M. T. Microbiología. 4a Edición. Editorial Prentice Hall. 247-248. (1987).

Brundtland, H. Contengamos la resistencia microbiana. OMS

Cantrell, C. L., Fischer, N. H., Urbatsch, L., McGuire, M. S., Franzblau, S. G. Antimycobacterial crude plant extracts from South, Central and North America. Phytomedicine. 5 (2): 137-145. (1998).

Capasso, R., Izzo, A. A., Pinto, L., Bifulco, T., Vitobello, C., Mascolo I. Phytotherapy and quality of herbal medicines. Fitoterapia. 71:558-565. (2000).

Cedric A Mims BSC, MD, FRC Path. Microbiología Médica. 1ª. Edición. Editorial Mosby/Doyoma libros. (1995).

Chandrasekaran, M., Venkatesalu, V. Antimicrobial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* J. Ethnopharmacol. 91: 105-108. (2004).

Chen, X., Ding, J., Ye, Y-M., Zhang, J-S. Bioactive abietane and seco-abietane diterpenoids from *Salvia prionitis*. J. Nat. Prod. 65: 1016-1020. (2002).

Coelho de Souza, G., Haas, A. P. S., von Poser, G. L., Schapoval, E. E. S., Elisabetsky, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. J. Ethnopharmacol. 90: 135-143. (2004).

Cordell, G. A. Biodiversity and drug discovery – a symbiotic relationship. Phytochemistry. 55: 463-480. (2000).

Cos, P., Hermans, N., De Bruyne, T., Apers, S., Sindambiwe, J. B., Vanden Berghe, D., Pieters, L., Vlietinck, A. J. Further evaluation of Rwandan medicinal plant extracts for their antimicrobial and antiviral activities. J Ethnopharmacol. 79: 155-163. (2002).

Cremin, P. A., Zeng, L. High-throughput analysis of natural product compound libraries by parallel LC-MS evaporative light scattering detection. Anal. Chem. 74 (21): 5492-5500. Nov. (2002).

Díaz, J. L. Uso de las plantas medicinales de México. Monografías científicas II. Instituto mexicano para el estudio de las plantas medicinales. A. C. (1976).

Dimayuga, R. E., Virgen, M., Ochoa, N., Antimicrobial activity of medicinal plants from Baja California Sur. (México). Pharmaceutical Biology. 36 (1): 33-43. (1998).

Elgorashi, E.E., Staden, J. V. Pharmacological screening of six Amaryllidaceae species. J. Ethnopharmacol. 90: 27-32. (2004).

Eloff, J. N. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? J Ethnopharmacol. 60: 1-8. (1998).

El-Sayed, N. H., Aboutabl, F. A. K., Abdel-Allim, M. A., Mabry, T. J. Phenolics and flavonoids of *Cordia macleodii*. Rev. Latinoamer. Quím. 26 (1):30-35. (1998).

Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005, OMS. Ginebra.

Feresin, G. E., Tapia, A., Gimenez, A., Gutierrez Ravelo, A., Zacchino, S., Sortino, M., Schmeda-Hirschmann, G. Constituents of the Argentinian medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* 89: 73-80. (2003).

Feresin, G. E., Tapia, A., Sortino, M., Zacchino, S., Rojas de Arias, A., Inchausti, A., Yaluff, G., Rodríguez, J., Theoduloz, C., Schmeda-Hirschmann, G. Bioactive alkyl phenols and embelin from *Oxalis erythrorhiza*. *J. Ethnopharmacol.* 88: 241-247. (2003).

Franzblau, S. G., Witzig, R. S., McLaughlin, J. C., Torres, P., Madico, G., Henández, A., Degnan, M. T., Cook, M. B., Quenzer, V. K., Ferguson, R. M., Gilman, Rapid, low-technology MIC with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate alamar blue assay. *J. Clin. Microbiol.* 362-366. Feb. (1998).

Gülcin, I., Küfrevioğlu, O. I., Oktay, M., Büyükokurğlu, M. E. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.) *J. Ethnopharmacol.* 90: 205-215. (2004).

Gundiza, M. Antimicrobial activity of essential oil from *Schinus molle* Linn. *Cent. Af. J. Med.* 39 (11): 231-4. Nov. (1993).

Habibi, Z.; Eftekhari, F.; Samiee, K.; Rustaiyan, A. Structure and Antimicrobial Activity of a New Labdane Diterpenoid from *Salvia leriensis*. *J. Nat. Prod.* 63(2): 270-1. (2000).

Hawser S. P., Jessup, C., Vitullo, J., Ghannoum, M. A. Utility of 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenyl-amino)carbonyl)-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) and minimum effective concentration assays in the determination of antifungal susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to the lipopeptide class of compounds. *J. Clin. Microbiol.* 2738-2741. Jul. (2001).

Haznedaroglu, M. Z., Karabay, N. U., Zeybek, U. Antibacterial activity of *Salvia tomentosa* essential oil. *Fitoterapia.* 72: 829-831. (2001).

- Hernández, T., Canales, M., Ávila, J. G., Duran, A., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Lira, A. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *J. Ethnopharmacol.* 88: 181-188. (2003).
- Hoban, D. J., Doern, G. V., Fluit, A. C., Roussel-Delvallez, M., Jones, R. N. Worldwide Prevalence of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J. Antimicrob. Chemother.* 47 (5): 623-629. May. (2001).
- Hortal, M., Ruvinsky, R., Rossi, A., Agudelo, C. I., Castañeda, E., Brandileone, C., Camou, T., Palacio, R., Echaniz, G., D'Fabio, J. L., Impacto de *Streptococcus pneumoniae* en la neumonía del niño latinoamericano. Grupo SIREVA-Vigia. *Rev. Panam Salud Publica. Pan Am J. Public Health.* 8 (3) (2000).
- Hostettman, K., Wolfender, J. L., Rodríguez, S. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. *Planta Med.* 63: 2-10. (1997).
- Houghton, P. J., Mensah, A. Y., Iessa, N., Hong, L. Y. Terpenoids in *Buddleja*: relevance to chemosystematics, chemical ecology and biological activity. *Phytochemistry.* 64: 385-393. (2003).
- 
- Inouye, S., Takizawa, T., Yamaguchi, H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Microbial Lett.* 20, 198 (1): 9-13. Apr. (2001).
- Ioset, J. R., Marston, A., Gupta, M. P., Hostettman, K. Antifungal and larvicidal meroterpenoide naphthoquinones and naphthoxirene from the roots of *Cordia linnaei*. *Phytochemistry.* 47 (5): 729-734. (1998).
- Ioset, J. R., Marston, A., Gupta, M. P., Hostettmann, K. Antifungal and larvicidal cordiaquinones from the roots of *Cordia curassavica*. *Phytochemistry.* 53: 613-617. (2000).
- Jacobs, M. R., Bajaksouzian, S., Zilles, A., Lin G., Pankuch, G, A., Appelbaum, P. C. Susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to 10 Oral Antimicrobial Agents Based on Pharmacodynamic Parameters: U.S. Surveillance Study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1901-1908, Aug. (1999).

- Jain, S. C., Singh, B., Jain, R. Antimicrobial activity of triterpenoids from *Heliotropium ellipticum*. *Fitoterapia*. 72: 666-668. (2001).
- Jayasinghe, L., Kumarihamy, M. B. M., Jayarathna, K. H. R. N., Udishani N.W.M, G. Bandara, B. M. R., Hara, N., Fujimoto, Y. Antifungal constituents of *Bridelia retusa*. *Phytochemistry*. 62: 637-641. (2003).
- Joklik, W. K., Phil, D, Willett, H. P., PH.O D. Bernard AMOS, MD, Wilfert, C. M. *Microbiología*. Zinzer. 20<sup>a</sup> Edición. Editoria Médica Panamericana. (1998).
- Koné, W. M., Atindehou, K. K., Terreaux, C., Hostettmann, K. Traoré, D., Dosso, M. Traditional medicine in north Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol*. 93: 43-49. (2004).
- Koneman, E. W., Allen, S., Dowell, V. R., Somers, H. *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica Panamericana S.A. 382 (1991).
- Lechner, D., Stavri, M., Oluwatuyi, M., Pereda-Miranda R., Gibbons, S. The anti-staphylococcal activity of *Angelica dahurica* (Bai Zhi). *Phytochemistry*. 65: 331-335. (2004).
- Lentini, F. The role of ethnobotanics in scientific research. State of ethnobotanical knowledge in Sicily. *Fitoterapia*. 71: 583-588. (2000).
- Li , X-C., Cai, L., Wu, C. D. Antimicrobial compounds from *Ceanothus americanus* against oral pathogens. *Phytochemistry*. 46 (1): 97-102. (1997).
- Madari, H., and Jacobs R. S. An analysis of cytotoxic botanical formulations used in the traditional medicine of ancient Persia as abortifacients. *J. Nat. Prod*. 67: 1204-1210. (2004).
- Marston, A., Potterat, O., Hostettmann. K. Isolation of biologically active plant constituents by liquid chromatography. *J. Chromatogr*. 450: 3-11. (1998).
- Martínez, M. J., Betancourt, J., Alonso-González, N., Jauregui, A. Screening of some cuban medicinal plants for antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol*. 52 (3): 171-174. (1996).

Matsuse, I. T., Lim, Y. A., Hattori, M., Correa, M., Gupta, M. P. A search for anti-viral properties in panamanian medicinal plants. The effects on HIV and its essential enzymes. *J. Ethnopharmacol.* 64: 15-22. (1999).

Mendieta, R. M., Del Amo, R. S. *Plantas medicinales del estado de Yucatán.* (1981).

Mitscher, L. A., Pillai, S. P., Gentry, E. J., Shankel, D. M. *Multiple Drug Resistance.* John Willey & Sons, Inc. (1999).

Molina Salinas, G. M. Aislamiento y caracterización de compuestos con actividad bactericida y/o bacteriostática de plantas del noreste de México sobre cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensibles y multidrogorresistentes. Tesis doctoral. Facultad de Medicina. U.A.N.L. Dic. (2004)

Morel, A. F., Araujo, C. A., Da Silva, U. F., Hoelzel, S. C.S.M., Záchia, R., Bastos, N. R. Antibacterial cylopeptide alkaloids from the bark of *Condalia buxifolia*. *Phytochemistry.* 61: 561-566. (2002).

Murphy, M. C. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Reviews.* 564-582. Oct. (1999).

Navarro, V., Rojas, G., Delgado, G. and Lozaya, X. Antimicrobial compounds detected in *Bocconia arborea* Extracts by a direct bioautographic method. *Arch. Med. Research.* (29)2: 191-194. (1998).

NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twelfth informational supplement. NCCLS document M100-S12 [ISBN 1-56238-454-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002

Newman, D. J., Cragg, G. M. and Snader, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 66: 1022-1037. (2003).

Nicolaou, K. C., Sorensen, E. J. and Winssinger, N. The art and science of organic and natural products synthesis. *J. Chem. Educ.* 75. (10): 1225-1258. Oct. (1998).

Nueva enciclopedia de medicina herbolaria y propiedades botánicas. R. C. Wren. Editorial Grijalbo S.A de C.V. (1994).

Po-Ren, H., Yung-Chiang L., Jann-Ming, S., Tsu-Lan W., Jing-Jou, Y., Jiunn-Jong W., Hsieh-Shong, L., Yin-Ching, C., Yeu-Jen I., Kwen-tay L. Multicenter Surveillance of Antimicrobial Resistance of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in Taiwan during the 1998-1999 Respiratory Season. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1342-1345 May. (2000).

Rahalison, L., Hamburguer, M. and Hostettman, K. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochem. Anal.* 2: 199-203. (1991).

Rahman, M. M., Gray A. I. Antimicrobial constituents from the stem bark of *Feronia limonia*. *Phytochemistry.* 59: 73-77. (2002).

Ram, A. J., Bhakshu, L. M., Raju, R.R. V. In vitro antimicrobial activity of certain medicinal plants from Eastern Ghats, India, used for skin diseases. *J. Ethnopharmacol.* 90: 353-357. (2004).

Rapisarda, A., Barbera, R., De Pasquale, A., Ficarra, P., Ficarra, R., Tommasini, S., Calabró, M. L. and Ragusa S. *Cordia francisi*, *C. martinicensis*, *C. myxa*, *C. serratifolia* and *C. ulmifolia* leaves as new sources of rutin: analgesic and anti-inflammatory activity. *Planta med.* 58 (1): A643. (1992).

Ristić MD, Duletić-Laišević; Knězević-Vukcević J; Marin PD; Simić D; Vukujević J; Janić Ković P; Vajs V. Antimicrobial activity of essential oils and ethanol extract of *Phlomis fruticosa* L. *Phytoter. Res.* 14 (4): 267-271 Jun. (2000).

Rojas, G., Lévaro, J., Tortoriello, J., Navarro, V. Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *J. Ethnopharmacol.* 74 (1): 97-101. Jan. (2001).

Rojas, R., Bustamante, B., Bauer, J., Fernández, I., Albán, J., Lock, O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 88: 199-204. (2003).

Salvat, A., Antonnacci, L., Fortunato, R. H., Suarez, E.Y., Godoy, H.M. Screening of some plants from northern Argentina for their antimicrobial activity. *Lett. Appl. Microbiol.* 32: 293-297. (2001).

Sato, Y., Suzuki, S., Nishikawa, T., Kihara, M., Shibata, H., Higuti, T. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* 72: 483-488. (2000).

SINAIS (Sistema nacional de información en salud), México.(20002).

Singh, B., Sahu, P. M., Singh, S. Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids from *Helliotropium subulatum*. *Fitoterapia.* 73: 153-155. (2002).

Springfield, E. P., Amabeoku, G., Weitz, F., Mabusela, W., Johnson, G. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. *Phytomedicine.* 10 (5): 434-439. Jun. (2003).

Tada, Y., Shikishima, Y., Takaishi, Y., Shibata, H., Higuti, T., Honda, G., Ito, M., Takeda, Y., Kodzhimatov, O. K., Ashurmetov, O., Ohmoto, Y. Coumarins and  $\gamma$ -pyrane derivatives from *Prangos pabularia*: antibacterial activity and inhibition of cytokine release. *Phytochemistry.* 59:649-654. (2002).

---

The world health report 2004, WHO.

Tsao, Sm., Yin Mc. In vitro activity of garlic oil and four diallyl sulphides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 47(8): 565-73. May. (2001).

Tyler, V. E. Phytomedicines: Back to the future. *J. Nat. Prod.* 62: 1589-1592. (1999).

Ulubelen, A., Öksüz, S., Topcu, G., Goren, A. C., Voelter, W. Antibacterial diterpenes from the Roots of *Salvia blepharochlaena*. *J. Nat. Prod.* 64 (4): 549-551. April. (2001).

Verastegui, M. M. A. Evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos de agaves y su acción sobre tigmotropismo y dimorfismo de *Candida albicans*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. U.A.N.L. Jun. (2000).

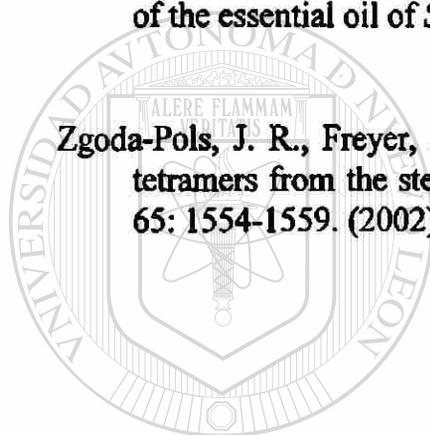
Wächter, G. A., Valcic, S., Franzblau, S. G., Suarez, E., Timmermann, B. N. Antitubercular activity of triterpenoids from *Lippia turbinata*. *J. Nat. Prod.* 64: 37-41. (2001).

Water 996 PDA Detector Operator's guide; 5.1 – 5.10 (1999).

Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada-Pérez, L., López-Villafranco, E., Estrada, M. E., Aguilar, A., Reyes-Chilpa, R. Antibacterial activity of crude extracts from mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. *J. Ethnopharmacol.* 97: 293-299. (2005).

Yu, J., Lei, J., Yu, H., Cai, X., Zou, G. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria barbata*. *Phytochemistry.* 65: 881-884. (2004).

Zgoda-Pols, J. R., Freyer, A. J., Killmer, L. B., Porter, J. R. Antimicrobial reveratrol tetramers from the stem bark of *Vatica oblongifolia* ssp. *oblogifolia*. *J. Nat. Prod.* 65: 1554-1559. (2002).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

**Luis Alejandro Pérez López**

**Candidato para el grado de**

**Doctor en Ciencias con Especialidad en Química Analítica**

**Título de Tesis: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS DE PLANTAS DEL NORESTE DE MÉXICO CON ACTIVIDAD CONTRA CEPAS DE *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae***

**Área de Estudio: Química Analítica**

**Biografía:**

**Datos personales:** Nacido en Monterrey, Nuevo León, México, el 13 de Agosto de 1968, hijo del Sr. Pedro Pérez Gutiérrez y la Sra. Ma. Alicia López Costilla.

**Escolaridad:** Egresado de:

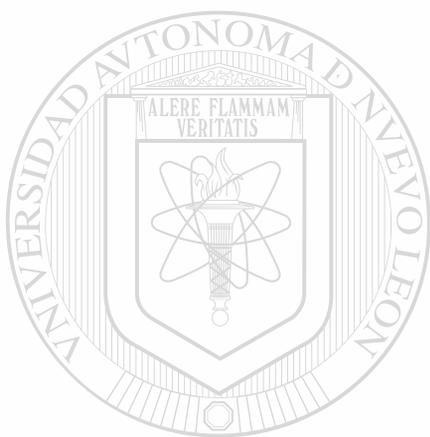
Facultad de Ciencias Biológicas. U.A.N.L.

Grado obtenido: Químico Bacteriólogo Parasitólogo.

Facultad de Medicina. U.A.N.L.

Grado obtenido: Maestría en Ciencias con Especialidad en Química Analítica Biomédica

**Experiencia Profesional:** profesor de Análisis cualitativo en la Facultad de Ciencia Biológicas, U.A.N.L. en 1992. Químico en el Depto. de diagnóstico de cólera en el Laboratorio Estatal de Salud, N.L. 1992 – 1993. Químico en el laboratorio de análisis clínicos, Hospital “El Buen Pastor”, San Quintín B.C, de 1993 – 1994. Químico en Servicios de Agua y Control Ambiental, Mty, N.L. de 1994 – 1995. Profesor de Química y Biología, preparatoria en el Universitario de las Américas en 1995. Personal profesional no docente en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.A.N.L. de 1996 – 1997. Personal profesional no docente en la Facultad de Medicina del 2000 – 2005.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



