

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



**ELECCION DE LAS CONDICIONES MAS ADECUADAS  
PARA LA OBTENCION DE EXTRACTOS DE  
PLANTAS SUPERIORES CON ACTIVIDAD SOBRE  
UNA CEPA DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE**

**Por**

**Q.F.B. MARCELA DEL CARMEN OROZCO HAYEK**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS  
con Orientación Terminal en Química Biomédica**

**Marzo, 2004**

TM  
QK99  
.A1  
07  
2004  
c.1

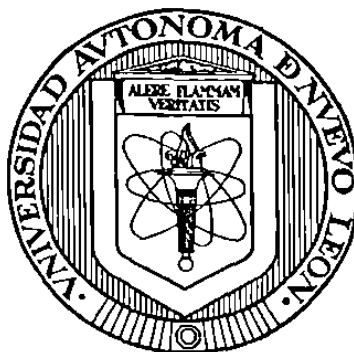
Q.F.B. MARCELA DEL CARMEN OROZCO HAYEK



1080123958

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**ELECCIÓN DE LAS CONDICIONES MÁS ADECUADAS  
PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PLANTAS SUPERIORES  
CON ACTIVIDAD SOBRE UNA CEPA  
DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE**

**Por**

**Q.F.B. MARCELA DEL CARMEN OROZCO HAYEK**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS  
con Orientación Terminal en Química Biomédica**

**Marzo, 2004**

TM

QK99

.A1

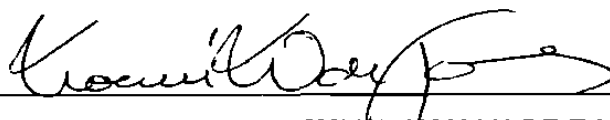
07

2004



**ELECCIÓN DE LAS CONDICIONES MÁS ADECUADAS  
PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PLANTAS SUPERIORES CON  
ACTIVIDAD SOBRE UNA CEPA  
DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE**


**Aprobación de la Tesis:**



---

**DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES**

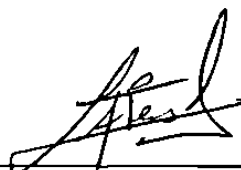
Director de Tesis



---

**DRA. VERÓNICA M. RIVAS GALINDO**

Comisión de Tesis



---

**M.C. LUIS ALEJANDRO PÉREZ LÓPEZ**

Comisión de Tesis



---

**DR. DIONICIO GALARZA DELGADO**

Subdirector de Investigación y Estudios de Posgrado

**ELECCIÓN DE LAS CONDICIONES MÁS ADECUADAS  
PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PLANTAS SUPERIORES CON  
ACTIVIDAD SOBRE UNA CEPA  
DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE**

Presentado por:

**Q.F.B. MARCELA DEL CARMEN OROZCO HAYEK**

Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. Noemí Waksman de Torres y la coasesoría de la Dra. Verónica M. Rivas Galindo y el M.C. Luis Alejandro Pérez López.

**FIRMAS**

**DIRECTOR**



Dra. Noemí Waksman de Torres

Co-Director



Dra. Verónica M. Rivas Galindo

Co-Director



M.C. Luis Alejandro Pérez López

*Si para recobrar lo recobrado  
tuve que haber perdido lo perdido,  
si para conseguir lo conseguido  
tuve que soportar lo soportado.  
Si para estar ahora enamorado  
fue menester haber estado herido,  
tengo por bien sufrido lo sufrido,  
tengo por bien llorado lo llorado.  
Por que después de todo he comprendido  
que no se goza bien de lo gozado  
sino después de haberlo padecido.  
Por que después de todo he comprobado  
que lo que tiene el árbol de florido  
vive de lo que tiene sepultado.*

Santa Teresa de Ávila



**Dedico esta tesis con profundo agradecimiento y cariño**

**A mis padres:**

**Juan José Orozco y María del Carmen Hayek**

**Por demostrar cada día que el amor tiene una meta infinita**

## AGRADECIMIENTOS

**A Dios**, por darme la vida y permitir que la viva en su presencia constante, por dejarme ver que cada fracaso siempre es recompensado con la mejor parte, por darme a tan Dulce Madre por compañera y por tener una familia maravillosa que llega hasta aquí conmigo.

**A mis padres: Juan José y María del Carmen** por su apoyo permanente, por estar junto a mí a pesar de la distancia tan grande, por su confianza y optimismo, por ser desde siempre el mejor ejemplo de entrega y servicio.

**A mis hermanos: Elías y Ana, Mary Carmen y Carlos** por darme cariño, alegría y comprensión incondicionalmente, por estar a mi lado siempre, por su invaluable ayuda en todo momento. **Mary**, gracias por tu paciencia y por compartir conmigo tus amplios conocimientos para la realización de este trabajo que también es tuyo.

**A mis pequeños sobrinos: Mary Carmen y Elías** por dejarme sentir el amor tan especial de ser tía y por ser regalos especiales en mi vida.

**A ti**, mi amigo desde siempre, el que me ayudó a salir adelante, el que creyó en mí, por los buenos momentos compartidos, por decirme sin cansancio que todo es posible.....donde quiera que estés gracias de todo corazón.

De manera especial a mi abuelita **Adela** por enseñarnos a luchar hasta el último momento, por todo lo que fuiste y por todo lo que eres en mi vida...gracias.

Con admiración a mi asesora la **Dra. Noemí Waksman de Torres** por asignarme un trabajo de tesis muy interesante del cual aprendí mucho, por sus acertados consejos, por el tiempo dedicado a enseñarme y sobre todo por ser de los pocos seres humanos que sabe predicar con el ejemplo. Muchas Gracias.

Agradezco al **M.C. Luis Alejandro Pérez López** por el privilegio de ser su primer alumna asesorada, por su valiosa ayuda recibida y el tiempo que parecía interminable dedicado a la realización de este trabajo.

A la **Dra. Verónica Rivas Galindo** co-directora de este trabajo, por su experiencia compartida en el área de productos naturales, por su profesionalismo y comentarios recibidos en la realización de esta tesis.

A mis compañeras: **Q.C.B. Adelina Hernández, Q.F.B. Elsa Ochoa, Q.C.B. Alicia Ramírez y Q.C.B. Adriana Tirado** por las gratas experiencias compartidas en clases y fuera de ellas, por distinguirme con su amistad y por todo el afecto brindado. Les deseo mucho éxito en lo que emprendan.

A mi amiga la **M.C. Gloria Molina** por toda la bibliografía otorgada al inicio de este trabajo, por ayudarme cuando lo necesité y por las pláticas siempre interesantes.

A la **T.L.C. Ivonne Carrera** por su valiosa ayuda en la parte experimental de este trabajo.

A la **Dra. María de la Luz Salazar** por saber como levantar el ánimo a cualquiera.

A todo el Departamento de Química Analítica por hacerme sentir parte del mismo, sería difícil mencionar a todos, sin embargo quiero agradecer en especial al **Dr. Adolfo Caballero, Dra. Rocío Castro, M.C. Norma Cavazos, M.C. Yareli Colunga, M.C. Aurora Garza, Gloria Martínez y M.C. Lidia Naccha** por su amistad y compañía.

A la **M.C. Nora Emma Díaz** por que desde la Facultad de Ciencias Químicas me impulsó a seguir con entusiasmo por este fascinante mundo de la Química.

A la **M.C. Karem H. García** por enseñarme con paciencia al inicio de mi carrera, por ser siempre amiga, siempre apoyo, siempre comprensión a pesar de estar tan lejos.

A mi amiga la **C.P. Cristina Sánchez Santos** por ser desde siempre un verdadero ejemplo de perseverancia y tenacidad por salir adelante.

A mi prima **Karime Hayek** por hacer de su casa mi casa, por toda la ayuda recibida en este tiempo y el gran cariño que nos une.

A mi tía **Amparo**, a las familias **Orozco Márquez, Hayek Domínguez, Pérez Hayek, Quintanilla Hayek, Hayek Pompa y Monsivais Orozco** por los lazos tan grandes que nos unen y por estar siempre al tanto de mi.

Al **Dr. Salvador Said** por permitir que se hiciera uso de las instalaciones del CIBIN-IMSS.

A la **M.C. Pola Becerril Montes** por su asesoría en la realización de las pruebas de actividad biológica.

Agradezco a **CONACYT** por la beca de manutención otorgada para la realización de mis estudios con registro 165309 y el apoyo recibido por parte del proyecto de investigación 36544 – N.

## RESUMEN

Marcela del Carmen Orozco Hayek

Fecha de graduación: Marzo del 2004

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

Título del Estudio:

ELECCIÓN DE LAS CONDICIONES  
MÁS ADECUADAS PARA LA  
OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE  
PLANTAS SUPERIORES CON  
ACTIVIDAD SOBRE UNA CEPA DE  
*Staphylococcus aureus* RESISTENTE

Número de páginas: 93

Candidato para el grado de Maestría  
en Ciencias con orientación terminal  
en Química Biomédica

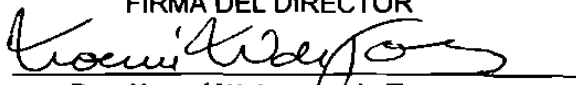
Área de Estudio: Química Biomédica

### Propósito y Método del Estudio.

En las últimas décadas se han realizado diversos estudios fitoquímicos utilizando diferentes solventes de extracción con el fin de evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas superiores; sin embargo se desconoce cual es el mejor solvente para llevar a cabo tales extracciones; tampoco se han definido las condiciones óptimas de extracción. A fin de colaborar en la búsqueda de las condiciones óptimas de extracción de plantas, en este trabajo se realizó un monitoreo general de plantas de la región Noreste de México por medio de un Diseño de Experimentos, en el cual se evaluaron las condiciones más adecuadas para la obtención de extractos de plantas. La variable de respuesta fue la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos sobre una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente. Se evaluaron cuatro factores que fueron: volumen de solvente, velocidad de extracción, tiempo de extracción y tiempo de almacenamiento. De acuerdo al análisis estadístico realizado en el Diseño de Experimentos, los factores volumen de solvente y velocidad de extracción fueron considerados como no significativos por lo que su contribución en la obtención de extractos con mayor actividad antimicrobiana fue descartada. Por el contrario, los factores tiempo de extracción y tiempo de almacenamiento resultaron ser estadísticamente significativos, por lo que su efecto en el proceso de extracción para la obtención de extractos biológicamente activos es relevante.

**Conclusiones y Contribuciones.** Se comprobó que el factor tiempo de almacenamiento es clave para la obtención de extractos con mayor actividad antimicrobiana medida sobre una cepa de *S. aureus* resistente. Además se observó que tanto los porcentajes de recuperación como la actividad antimicrobiana dependen del solvente de extracción utilizado, encontrando que las soluciones hidroalcohólicas han sido en nuestro caso la mejor opción al momento de extraer principios activos a partir de plantas. Estos resultados contribuirán al establecimiento de métodos estandarizados para el monitoreo general de alguna actividad biológica en los extractos de plantas.

FIRMA DEL DIRECTOR



Dra. Noemí Waksman de Torres

# TABLA DE CONTENIDO

Página

<b>TABLA DE CONTENIDO</b> .....	<b>X</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>XV</b>
<b>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS</b> .....	<b>XVI</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Las Plantas Medicinales .....	1
1.1.1. Importancia como Fuente de Medicamentos .....	1
1.2. El uso de Plantas Medicinales como Agentes Antimicrobianos .....	5
1.3. Preparación del Material Vegetal .....	7
1.3.1. Importancia .....	7
1.3.2. Fases de la Preparación del Material .....	7
1.4. Preparación de los Extractos .....	14
1.4.1. Importancia .....	14
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>16</b>
2.1. Descripción del Problema .....	16
2.2. Objetivos .....	20
2.2.1. Objetivo General .....	20
2.2.2. Objetivos Específicos .....	21
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
3.1. Equipo, Material y Reactivos .....	22
3.1.1. Material Biológico .....	22
3.1.2. Equipo .....	23
3.1.3. Material .....	23
3.1.4. Reactivos y Solventes .....	24
3.1.5. Medios de Cultivo .....	25
3.1.6. Antibióticos .....	25
3.1.7. Software .....	25
3.2. Métodos .....	26
3.2.1. Preparación del Material Biológico .....	26
3.2.2. Extracciones del Material Seco .....	28
3.2.3. Evaluación de la Actividad Biológica .....	31

3.2.3.1. Preparación del Medio de Cultivo .....	32
3.2.3.2. Preparación del Inóculo .....	32
3.2.3.3. Preparación de los Extractos .....	33
3.2.3.4. Preparación de Controles .....	33
3.2.3.5. Descripción de la Técnica de Microdilución en Placa .....	34
3.2.3.6. Revelado .....	35
3.2.4. Análisis de los Extractos Activos por Cromatografía en Capa Fina .....	36
3.2.5. Selección del Solvente de Extracción más Adecuado .....	37
3.2.6. Diseño de Experimentos .....	38
3.2.6.1. Trabajo Experimental: Extracciones del Material Seco .....	41
3.2.6.2. Evaluación de la Actividad Biológica .....	41
3.2.6.3. Análisis Estadístico.....	42
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
4.1. Selección del Material Biológico .....	43
4.2. Extracciones del Material Seco.....	44
4.3. Evaluación de la Actividad Biológica.....	45
4.4. Análisis de los Extractos Activos por Cromatografía en Capa Fina.....	46
4.5. Selección del Solvente de Extracción más Adecuado .....	53
4.6. Diseño de Experimentos.....	54
4.6.1. Trabajo Experimental: Extracciones del Material Seco .....	54
4.6.2. Evaluación de la Actividad Biológica .....	56
4.6.3. Análisis Estadístico .....	59
4.6.3.1. Efecto de cada uno de los Factores y sus Interacciones .....	59
4.6.3.2. Efecto de los Factores Estadísticamente Significativos en la Actividad Antimicrobiana .....	60
4.6.3.3. Optimización.....	63
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>65</b>
5.1. Selección del Material Biológico .....	66
5.2. Extracciones del Material Seco.....	67
5.3. Evaluación de la Actividad Biológica.....	69
5.4. Análisis de los Extractos Activos por Cromatografía en Capa Fina.....	70
5.5. Selección del Solvente de Extracción más Adecuado .....	71
5.6. Diseño de Experimentos.....	73
5.6.1. Trabajo Experimental: Extracciones del Material Seco .....	75
5.6.2. Evaluación de la Actividad Biológica .....	77
5.6.3. Análisis Estadístico .....	77
5.6.3.1. Efecto de cada uno de los Factores y sus Interacciones .....	78
5.6.3.2. Efecto de los Factores Estadísticamente Significativos en la Actividad Antimicrobiana .....	81
5.6.3.3. Optimización.....	84

<b>6. CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS .....</b>	<b>87</b>
6.1. Conclusiones.....	87
6.2. Recomendaciones.....	88
6.3. Perspectivas.....	89
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>90</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla I. Solventes de Extracción Usados en Algunos Estudios de Plantas con Actividad Antimicrobiana.....	19
Tabla II. Tipos de Reveladores Usados en Cromatografía en Capa Fina. ....	37
Tabla III. Niveles Asignados a cada uno de los Factores Evaluados en el Diseño de Experimentos. ....	39
Tabla IV. Planeación y Desarrollo del Trabajo Experimental .....	40
Tabla V. Plantas Utilizadas en la Fase Previa al Diseño de Experimentos. ....	43
Tabla VI. Cantidad Obtenida en mg de cada uno de los Extractos con Diversos Solventes en la Fase Previa al Diseño de Experimentos. ....	44
Tabla VII. Porcentajes de Recuperación Obtenidos para cada uno de los Extractos con Diversos Solventes en la Fase Previa al Diseño de Experimentos.....	44
Tabla VIII. Actividad Antimicrobiana (CMI) en µg/mL de los 24 Extractos Evaluados en la Fase Previa al Diseño de Experimentos contra la Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> Resistente IMSS-2501. ....	45
Tabla IX. Resultados de CCF con la Mezcla Éter de Petróleo + Acetato de Etilo (10:1) como Fase Móvil.....	47
Tabla X. Resultados de CCF con la Mezcla Éter de Petróleo + Acetato de Etilo (3:1) como Fase Móvil.....	48
Tabla XI. Resultados de CCF con la Mezcla Acetato de Etilo como Fase Móvil. ....	50
Tabla XII. Resumen del Número Total de Manchas Observadas con dos Sistemas de Eluentes: Éter de Petróleo + Acetato de Etilo (3:1) y Acetato de Etilo.....	52
Tabla XIII. Resultados de los Criterios de Selección Usados en los Extractos de Hojas de <i>Cordia boissieri</i> . ....	53
Tabla XIV. Resultados de los Criterios de Selección Usados en los Extractos del Fruto de <i>Schinus molle</i> .....	53

Tabla XV. Cantidad Obtenida en mg y Porcentaje de Recuperación para cada uno de los Extractos de <i>Cordia boissieri</i> en el DOE .....	54
Tabla XVI. Cantidad Obtenida en mg y Porcentaje de Recuperación para cada uno de los Extractos de <i>Schinus molle</i> en el DOE .....	55
Tabla XVII. Niveles con los que se Obtuvieron los Porcentajes de Recuperación más Altos y más Bajos en Ambas Plantas. ....	55
Tabla XVIII. Actividad Antimicrobiana (CMI) en $\mu\text{g/mL}$ de cada uno de los Extractos Obtenidos en el DOE para <i>Cordia boissieri</i> y <i>Schinus molle</i> . ....	57
Tabla XIX. Análisis de Varianza que Incluye Todos los Factores para la CMI de <i>Cordia boissieri</i> (Anacahuita). ....	60
Tabla XX. Análisis de Varianza que Incluye solo los Factores Significativos para la CMI de <i>Cordia boissieri</i> (Anacahuita). ....	61
Tabla XXI. Coeficientes y Ecuación de Regresión para la CMI de <i>Cordia boissieri</i> (Anacahuita). ....	62
Tabla XXII. Niveles con los que se Obtendría el Valor Óptimo de CMI. ....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. <i>Leucophyllum frutescens</i> .....	27
Figura 2. <i>Cyperus alternifolius</i> .....	27
Figura 3. <i>Schinus molle</i> .....	27
Figura 4. <i>Cordia boissieri</i> .....	27
Figura 5. Placa del Bioensayo Realizado con los Extractos de <i>Schinus molle</i> .....	45
Figura 6. Placa del Bioensayo Realizado con los Extractos de <i>Cordia boissieri</i> Evaluados Después de 10 días de Almacenamiento. ....	58
Figura 7. Placa del Bioensayo Realizado con los Extractos de <i>Cordia boissieri</i> Evaluados Después de 70 días de Almacenamiento. ....	58
Figura 8. Gráfico Estandarizado de Pareto que Incluye Todos los Factores para la CMI de <i>Cordia boissieri</i> (Anacahuita). ....	59
Figura 9. Gráfico Estandarizado de Pareto que Incluye Solo los Factores Significativos para la CMI de <i>Cordia boissieri</i> (Anacahuita). ....	61
Figura 10. Gráfico de los Efectos Principales para la CMI de <i>Cordia boissieri</i> (Anacahuita). ....	62
Figura 11. Gráfico de Superficie de Respuesta Estimada.....	63

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

CCF	Cromatografía en Capa Fina
CIBIN	Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
CMH	Caldo Mueller Hinton
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DMSO	Dimetil Sulfoxido
DOE	Diseño de Experimentos
<i>Et al</i>	<i>et alii</i> (y otros autores)
EM	Espectrometría de Masas
EtOH	Etanol
g	Gramo
GI	Grados de libertad
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
$\lambda$	Longitud de onda
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrómetro
mL	Mililitro
min	Minuto
NA	No Activo
nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
RPM	Revoluciones Por Minuto
$t_R$	Tiempo de Retención
U.A.N.L.	Universidad Autónoma de Nuevo León
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultravioleta

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Las Plantas Medicinales**

#### **1.1.1. Importancia como Fuente de Medicamentos**

El uso de productos naturales con propiedades terapéuticas es tan antiguo como la civilización misma y por un largo período de tiempo, las plantas fueron las fuentes principales de medicamentos (Rates, S., 2001).

Para una gran variedad de problemas relacionados con la salud la mayor parte de la población mundial todavía depende, casi exclusivamente, de lo que en muchos países desarrollados se consideran formas alternativas de tratamiento. En la mayoría de las culturas, las plantas medicinales han constituido el principal componente de estos tratamientos tradicionales o alternativos. El conocimiento ganado a partir del uso de plantas medicinales y sus ingredientes activos han servido de fundamento para la farmacología moderna. Quizá algo muy importante en el desarrollo de la farmacología ha sido el conocimiento adquirido a partir de estudios de los mecanismos de acción de los componentes naturales derivados de plantas medicinales. Estudios de derivados químicos a partir de plantas, han sido la base del desarrollo de nuevos compuestos

sintéticos que son usados en gran porcentaje en la medicina moderna (Matthews et al, 1999).

Cerca del 25% de las medicamentos indicados para tratar alguna enfermedad proviene de plantas. De los 252 medicamentos considerados como básicos y esenciales por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 11% tienen su origen exclusivamente de plantas y un número significativo de medicamentos sintéticos son obtenidos a partir de precursores naturales (Rates, S., 2001).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 80% de las personas que viven en países en desarrollo hacen uso casi exclusivo de la medicina tradicional, en especial de la fitoterapia. Esto significa que aproximadamente 3,300 millones de personas usan plantas medicinales. Por este motivo, las plantas medicinales deben ser estudiadas por seguridad y eficacia (Eloff, J. N., 1998).

Muchos productos botánicos continúan hoy en uso de una forma idéntica o muy similar a como han sido usados por miles de años. El uso a través de la historia de las plantas medicinales da credibilidad para servir de soporte sobre los efectos benéficos de las plantas en la prevención y tratamiento de la enfermedad (Matthews et al, 1999).

Una planta se denomina medicinal cuando al menos una parte de ella, posee propiedades medicamentosas (Bruneton, J., 2001).

Durante las últimas décadas, ha habido un resurgimiento del interés en las plantas como fuente de medicamentos y de nuevas moléculas. Hay un número grande de razones para esto. Primero, existe una expectativa genuina de los países en

desarrollo en que sus problemas relacionados con medicamentos pueden ser resueltos por medio de una explotación científica de las plantas medicinales, algunas de las cuales han sido usadas por generaciones por muchas poblaciones indígenas. Además, hay una revolución mundial por lo "ecológico" lo cual se ve reflejado en la creencia de que los remedios herbales son más seguros y causan menos daño al cuerpo humano que los medicamentos sintéticos.

Más aún, haciendo hincapié en este aumento del interés en las plantas, es el hecho de que muchos medicamentos importantes actualmente en uso fueron derivados a partir de las plantas o bien, a partir de moléculas precursoras cuyo origen fueron las plantas (Williamson et al, 1996).

De esta forma, existe un creciente interés mundial en el uso de medicina basada en plantas para la prevención y el tratamiento de muchas enfermedades. La extracción y caracterización de compuestos activos a partir de plantas medicinales ha resultado en el descubrimiento de nuevos medicamentos con alto valor terapéutico. Además, uno de los recursos que existen para la búsqueda de sustancias biológicamente activas es el monitoreo sistemático de plantas, el cual ha sido fuente de muchos y útiles fármacos como son: el digitalis, el taxol, la morfina, la quinina, la aspirina y la artemisinina entre otros. Sus aplicaciones clínicas han ayudado a revivir el interés en las plantas superiores como fuentes de nuevos medicamentos. Las plantas también han producido moléculas las cuales son herramientas extremadamente valiosas en la caracterización de enzimas y en la clasificación de los sistemas receptores, tal es el caso de la morfina, la muscarina, la atropina y la nicotina (Huie, C., 2002) , (Salvat et al, 2001).

A pesar de la importancia que representa el estudio de las plantas medicinales, se estima que de las 250,000 a 500,000 especies de plantas, tan solo un 10% aproximadamente ha sido investigado fitoquímicamente y más aún, un porcentaje menor ha sido estudiado adecuadamente en términos de sus propiedades farmacológicas (Rates, S., 2001).

Los constituyentes de las plantas pueden ser aislados y usados directamente como agentes terapéuticos, como materiales de inicio para la síntesis de medicamentos o bien, pueden servir como modelos para compuestos farmacológicamente activos en la síntesis de medicamentos (Hosler et al, 1987).

El mercado de los productos de fitoterapia ha experimentado asimismo una dinámica evolución. Cuantitativamente los europeos gastaron, en 1995, 35 mil millones de francos en productos farmacéuticos a base de plantas (Bruneton, J., 2001).

Es así como algunos científicos esperan que el reino vegetal tenga la clave del entendimiento de la compleja bioquímica / patología humana y la cura de muchas de las enfermedades que sufre el hombre. De esta forma, los laboratorios del mundo dedicados a la fitoquímica están comprometidos en el monitoreo de las plantas por su actividad biológica con potencial terapéutico.

Además es importante considerar el hecho de que las plantas poseen un amplio rango de diversidad estructural, consecuencia de las diferentes rutas biosintéticas que éstas han sufrido a lo largo del tiempo (Phillipson, D., 2001). Sin embargo, a pesar de los múltiples beneficios que las plantas pueden ofrecer como fuentes de medicamentos, debe considerarse que su estudio implica conocimientos tanto de



botánica como de química orgánica, ya que los extractos de tales plantas no son fácilmente estandarizados precisamente por la diversidad estructural que éstos presentan (Hasso, H., 1997).

## **1.2. El uso de Plantas Medicinales como Agentes Antimicrobianos**

A pesar de que se ha logrado un progreso importante en el control de las principales enfermedades infecciosas, en 1997 cerca del 43% del total de muertes en los países en desarrollo fueron debidas a enfermedades infecciosas y parasitarias, tales como enfermedades respiratorias agudas, tuberculosis, diarrea y VIH/SIDA. Se calcula, según datos de la OMS, que las enfermedades infecciosas causan más de 13 millones de defunciones al año. Otro dato que revela este hecho es que actualmente un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* y cada año hay de 2 a 3 millones de muertes en el mundo debido a este microorganismo (Newton et al, 2002).

La neumonía considerada la más mortal de todas las infecciones respiratorias agudas (IRA); provoca la muerte de más niños que cualquier otra enfermedad infecciosa, produciéndose principalmente en los países en desarrollo (WHO,1998), (WHO, 1999).

La medicina tradicional ha sido una importante fuente de productos para los países en desarrollo en el tratamiento de infecciones comunes; por tal motivo, distintos grupos de investigadores en todo el mundo, se han interesado en la investigación de plantas medicinales locales con propiedades anti-infecciosas con el objeto de proveer bases científicas para el conocimiento popular y tradicional. Estos estudios han

permitido la selección de nuevos productos de plantas con propiedades antimicrobianas potencialmente útiles para estudios farmacológicos y clínicos posteriores, los cuales eventualmente podrían llegar a ser nuevos medicamentos para combatir las infecciones (Navarro et al, 1998).

El descubrimiento de nuevos medicamentos útiles contra enfermedades clínicas causadas por bacterias, levaduras, hongos y virus no es raro entre plantas superiores y el potencial para encontrar quimioterapéuticos útiles a partir de plantas medicinales en México es alto, ya que la cultura indígena mexicana posee una herencia rica en el tratamiento de tales infecciones respiratorias con el uso de plantas medicinales (Rojas et al, 2001), (Dimayuga et al, 1998).

Una de las razones que respaldan con mayor fuerza la probabilidad de obtener compuestos antimicrobianos originados a partir de plantas, es el hecho de que dichos compuestos podrían inhibir el crecimiento bacteriano por un mecanismo diferente que el de los antibióticos convencionales y el resultado de estudiar dicho mecanismo, podría tener valor clínico en el tratamiento de cepas microbianas resistentes (Eloff, J. N., 1998).

Las características deseadas para los candidatos a ser “nuevos medicamentos” incluyen diferentes mecanismos de acción para evitar resistencia cruzada con los medicamentos ya existentes, propiedades biofarmacéuticas y farmacocinéticas favorables así como baja incidencia de efectos secundarios; siempre y cuando se tome en cuenta la dosis a la cual es administrado tal agente antimicrobiano (Agrawal et al, 2001).

En el punto inicial de esta estrategia, es esencial detectar la actividad antimicrobiana de cada extracto crudo obtenido de las plantas, observando la respuesta del crecimiento *in vitro* de los diferentes microorganismos frente al extracto de la planta puesto en contacto con ellos. Varios métodos de monitoreo para detectar la actividad antimicrobiana han sido desarrollados, entre los cuales se encuentran los métodos de difusión y dilución como los más frecuentemente reportados (Navarro et al, 1998).

### **1.3. Preparación del Material Vegetal**

#### **1.3.1. Importancia**

La preparación de la muestra es el primer paso en el análisis de plantas medicinales, ya que es necesario extraer los componentes químicos deseados a partir del material inicial para una posterior separación y caracterización (Huie, C., 2002).

La compleja composición de las plantas varía de acuerdo a las condiciones de crecimiento (tipo de suelo, clima y estación), los procedimientos de cosecha y las técnicas de almacenamiento (Hasso, H., 1997).

#### **1.3.2. Fases de la Preparación del Material**

La preparación del material se puede dividir en 4 fases las cuales son:

- Fase I: Selección del material
- Fase II: Colecta
- Fase III: Almacenamiento
- Fase IV: Etapa extractiva

- **Fase I: Selección**

La selección de una planta para la investigación como posible fuente de medicamentos, es el paso más crítico y frecuentemente el menos entendido de todo el proceso (Hosler et al, 1987).

Todas las plantas superiores elaboran metabolitos secundarios, los cuales pueden ser de interés médico potencial. Por lo tanto, la determinación del criterio de selección de las plantas para una subsecuente investigación fitoterapéutica es quizá tan importante como la investigación en sí (Williamson et al, 1996).

A continuación se muestran los principales criterios de selección:

**a) Selección Basada en el uso Tradicional: Criterio Etnofarmacológico**

La Etnobotánica, rama de la botánica que asume la valoración cultural que de los recursos vegetales hacen las diversas etnias, ha centrado sus esfuerzos en la clasificación científica de las especies vegetales y en la sistematización de la información popular sobre el uso, casi siempre ancestral, que de las plantas medicinales hace una comunidad en particular. La información Etnobotánica se difunde habitualmente mediante la creación de herbarios (colecciones de plantas secas taxonómicamente organizadas), libros, catálogos de modelos computarizados, que reúnen los datos sistemáticos sobre las propiedades medicinales atribuidas a las plantas medicinales, colectadas en

los territorios donde se utilizan estos recursos biológicos (Aguilar-Contreras et al, 1998).

Es a partir de la información Etnobotánica que en la actualidad se inicia el proceso de investigación científica de una planta medicinal. Este proceso implica el diseño y aplicación de una metodología que valore la utilidad del recurso vegetal utilizado en la práctica médica popular o tradicional. Mientras no se realice esta evaluación y corroboración científica de los beneficios medicinales atribuidos a una especie, la información Etnobotánica no pasará de ser solo un valioso testimonio de la cultura popular.

Utilizando este criterio, el químico esperaría encontrar en el extracto de la planta un constituyente químico con alguna actividad farmacológica apropiada (Williamson et al, 1996).

#### **b) Plantas Venenosas**

Las plantas venenosas son conocidas en la población indígena, pero debido a esto, usualmente no son utilizadas como medicinas por la gente de esa región geográfica específica. Los científicos en la búsqueda de medicamentos obtenidos a partir de plantas, frecuentemente no las incluyen como un grupo de investigación fitoquímica. Sin embargo, una búsqueda de compuestos altamente específicos y potentes que puedan ser usados como medicamentos en la medicina moderna o como pruebas para la elucidación de fenómenos biológicos, es probable que sea más productiva entre plantas venenosas que entre las plantas que son regularmente usadas en la medicina

tradicional. Muchas de las medicinas más importantes usadas actualmente y cuyo origen son las plantas, provienen de plantas venenosas. Como ejemplo se tiene la atropina, picrotoxina, muscarina y tubocurarina, entre otras (Williamson et al, 1996).

### **c) Selección Basada en la Composición Química: Criterio Quimiotaxonómico**

A veces los laboratorios dedicados al estudio de metabolitos secundarios de plantas, se especializan en aislar y estudiar solo una cierta clase de compuestos. De esta forma, diferentes especies de plantas las cuales son conocidas por contener esa clase de compuestos, son extraídas y monitoreadas en el rango más amplio de modelos como sea posible, sin importar si han sido usadas o no en medicina tradicional. Esta vía de selección del material es ampliamente ayudada por la información quimiotaxonómica que relaciona diferentes clases de compuestos a diferentes especies de plantas (Williamson et al, 1996).

### **d) Monitoreo para una Actividad Biológica Específica**

Otra forma de proceder, es decidir sobre una serie de modelos farmacológicos de laboratorio para una enfermedad específica y probar los extractos de las plantas seleccionadas de acuerdo a alguno de los criterios sobre los modelos para una posible utilidad terapéutica en el tratamiento de tal enfermedad.

Utilizando bases de datos computarizadas, es posible predecir qué especie es más probable que produzca la actividad biológica de interés. En la ausencia de un banco de datos, las plantas pueden ser monitoreadas al azar (Williamson et al, 1996).

#### **e) Combinación de Criterios**

La decisión sobre qué planta investigar puede también estar basada en una combinación de criterios. Por ejemplo, las plantas usadas en medicina tradicional y aquellas que son conocidas por contener un tipo particular de compuestos, podrían ser investigadas. Este método dependerá de la habilidad química disponible y de las facilidades que presente el laboratorio en cuanto a infraestructura se refiere; el extracto deberá ser monitoreado para un rango de actividades biológicas tan amplio como sea posible.

- **Fase II: Colecta**

Una vez que la búsqueda bibliográfica ha conducido a la elección de la planta, se deberá iniciar la adquisición de la misma. Un análisis fitoquímico requiere que el material de la planta sea reconocido como auténtico por un botánico calificado, así mismo deberá colectarse un espécimen idéntico para su conservación en un herbario. La porción de las plantas colectadas para su uso en el análisis químico, deberá ser preparada cuidadosamente para evitar la alteración de los metabolitos secundarios que serán extraídos. Deberán elegirse plantas sanas (Hosler et al, 1987).

Debe tenerse en cuenta la gran importancia que posee la forma de recolección y conservación de las plantas, ya que las células vegetales desde el mismo momento de la recolección, sufren un cierto número de transformaciones biológicas. Así al separar la parte aérea de la raíz, se provoca una interrupción del flujo alimenticio y de transpiración.

Las enzimas que contienen y que en condiciones normales favorecen la formación de materias activas, empiezan a catalizar procesos de degradación. En el organismo vegetal, las reacciones de síntesis orgánica comienzan a ser suplantadas por reacciones de degradación, y el producto se transforma desde el punto de vista químico. Estas transformaciones se manifiestan con emisión de olor, modificación de color, entre otras. Una incorrecta recolección y desecación, aumenta la cantidad de productos de degradación, por lo que la planta pierde parte de su calidad (<http://personal.redestb.es/martin/pfito.htm>).

Existen factores externos tal como la variación en la estación al momento de realizar la colecta que afectarán la presencia de metabolitos secundarios en las plantas. Está bien establecido que la producción de metabolitos secundarios en la planta está asociado con tales factores externos como el período de floreo, la temperatura, el hábitat, así como el período del día en el que se realice la colecta, entre otros factores (Hosler et al, 1987).



- **Fase III: Almacenamiento**

A pesar de que puede utilizarse material fresco o seco como fuente de componentes secundarios de plantas, la mayoría de los científicos que trabajan en el aislamiento de los componentes secundarios de plantas, tienden a usar material seco por las siguientes razones:

- Hay menos problemas asociados con la extracción a gran escala de material de plantas seco que con material fresco.
- Es más difícil trabajar con material fresco debido a las diferencias en el contenido de agua, el cual podría afectar la solubilidad o la subsecuente separación por medio de la extracción líquido-líquido.
- La mayoría de las plantas son usadas en la medicina tradicional por los curanderos en su forma seca. (Eloff, J. N., 1998).

- **Fase IV: Etapa Extractiva**

El procedimiento de extracción juega un importante papel en el esfuerzo total de asegurar y proveer productos herbales de alta calidad a los consumidores de todo el mundo (Huie, C., 1997).

Cuando la naturaleza química de los compuestos es conocida (información quimiotaxonómica) los métodos de extracción deben estar dirigidos a la obtención de estos compuestos con la mayor pureza posible.

Cuando la composición química es desconocida, el proceso de extracción puede estar basado en el uso que la planta tiene en medicina popular, o bien el llevar a cabo varias extracciones con solventes cuya polaridad se fuera incrementando (Rates, S., 1997).

## **1.4. Preparación de los Extractos**

### **1.4.1. Importancia**

La información de cómo una planta es usada por un grupo étnico es muy importante, ya que el procedimiento de preparación podría indicar cual es el mejor método de extracción para cada planta específicamente (Rates, S., 2001).

El bajo porcentaje de plantas que ha sido estudiado para algún tipo de actividad biológica, se debe en parte a las dificultades que representa el manejo de los extractos de plantas, ya que estos son considerados mezclas muy complejas y parcialmente, debido a que muchas de las regiones que cuentan con mayor biodiversidad en el mundo, han estado relativamente inaccesibles para los colectores de las plantas. El primer problema es afrontado por varios laboratorios, los cuales trabajan en mejorar los métodos de extracción, de manera que se logren obtener extractos más fáciles de fraccionar y consecuentemente, de estudiarlos (Harvey, A., 2000).

La limitación relacionada a la cantidad de material que puede ser obtenida ha sido gradualmente superada por el uso de métodos modernos de extracción, purificación, aislamiento y el desarrollo de bioensayos sensibles altamente específicos (Rates, S., 2001).

La estandarización de los productos es un trabajo necesario para confirmar la estabilidad de el o los ingredientes activos de plantas medicinales. De aquí radica la importancia de realizar bien la extracción. Por este motivo, las formulaciones de productos naturales deben estar estandarizadas para entregar una cantidad conocida de ingrediente(s) activo(s) según la dosis recomendada. La estabilidad de los principios activos aislados y cuantificados deberá ser evaluada.

## CAPÍTULO 2

### ANTECEDENTES

#### 2.1. Descripción del Problema

Como se señaló anteriormente, el proceso de extracción ha sido uno de los pasos más críticos cuando se trabaja con plantas medicinales, ya que en esta etapa se presentan con frecuencia un sinnúmero de problemas, originados sobre todo por que los extractos de plantas son considerados mezclas complejas. Esto representa una limitación considerable al momento de realizar investigaciones fitoquímicas. Se sabe, además, que dentro del proceso de extracción uno de los principales problemas radica en la elección del solvente extractante.

De acuerdo a lo reportado en la literatura por distintos grupos de investigadores, existe una gran variedad de solventes usados para la extracción de principios activos de plantas superiores lo cual a lo largo del tiempo ha impedido que se elija alguno de esos solventes como el idóneo para el monitoreo y aislamiento de los componentes antimicrobianos en plantas (Eloff, J. N., 1998).

En 1998 Eloff, J. N. llevó a cabo un estudio en el cual el objetivo fue determinar cuál solvente de extracción era el más adecuado para la obtención de extractos con actividad antimicrobiana en una cepa de *S. aureus*. Los extractos de dos plantas

originarias de Sudáfrica (*Anthocleista grandiflora* y *Combretum erythrophyllum*) fueron obtenidos con solventes de distinta polaridad, entre ellos acetona, metanol, etanol, cloruro de metileno, agua y mezclas de ellos. Para asombro de muchos, el solvente con el que se obtuvo la mayor actividad antimicrobiana fue la acetona, considerada desde siempre un solvente con pocas cualidades para ser usado en el área de productos naturales por catalizar reacciones de degradación.

Así pues, a pesar de que el uso de plantas medicinales aunado al número de investigaciones fitoquímicas ha aumentado considerablemente en las últimas décadas, la elección de uno u otro solvente ha sido y es, un problema con el que se enfrentan con frecuencia los investigadores; ya que normalmente se tiende a usar aquel solvente con el que se han tenido buenos resultados en el laboratorio; sin embargo no en todos los casos se elige el solvente más apropiado para ese fin.

En la tabla I se muestran algunos ejemplos de como en años recientes en muchas partes del mundo se han estudiado plantas con actividad antimicrobiana utilizando una gran diversidad de solventes de extracción para las mismas. Esta observación hace notar la falta de homogeneidad que existe en los criterios de selección de uno u otro solvente y al mismo tiempo, revela el alto porcentaje de plantas superiores a las que se les ha comprobado actividad antimicrobiana.

Otro punto de suma importancia con respecto a la extracción de componentes activos a partir de plantas superiores, es el hecho que se desconocen las condiciones más adecuadas para la obtención de los extractos de plantas. Nos referimos básicamente a las condiciones de trabajo, como son: la cantidad de muestra, el volumen de solvente, el tiempo y velocidad de extracción, así como el tiempo en que

tales extractos pueden ser almacenados sin perder actividad. Como fue mencionado anteriormente, de la misma manera como cada laboratorio trabaja preferentemente con uno u otro solvente, así sucede con las condiciones de trabajo; esto debido a que lo que a prueba de error funciona, se establece en la mayoría de los casos, como las condiciones de trabajo usadas con mayor frecuencia por dicho laboratorio.

Una de las líneas de investigación con las que cuenta el departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., es el Aislamiento Biodirigido de Productos Naturales con Actividad Farmacológica, enfocándose básicamente a la actividad antimicrobiana, por el impacto que las enfermedades infecciosas tiene a nivel mundial. En dicho departamento, se han realizado varios estudios fitoquímicos en los que para el monitoreo de plantas superiores con actividad antimicrobiana se ha utilizado metanol como solvente de extracción; la elección del mismo se realizó arbitrariamente, por ser el solvente que se ha usado en estudios previos con buenos resultados; sin embargo no existe un estudio que fundamente el uso del metanol como el mejor solvente de extracción.

Actualmente, se llevan a cabo dos proyectos de investigación en los cuales se está trabajando con diferentes plantas de la región Noreste de nuestro país con el fin de encontrar actividad antimicrobiana. En ambos proyectos, los extractos obtenidos son en su mayoría metanólicos (Molina S. Gloria, 2002), (Pérez L. Alejandro., 2003).

**Tabla I. Solventes de Extracción Usados en Algunos Estudios de Plantas con Actividad Antimicrobiana.**

Año	Investigador	País del estudio	Número de plantas	Solventes de extracción	Número de extractos activos
1998	Eloff J.N.	Sudáfrica	2	Acetona, etanol, metanol, cloruro de metileno, MeOH:CHCl <sub>3</sub> :H <sub>2</sub> O y agua.	2 acetónicos vs <i>S. aureus</i>
1998	Lall N. y cols.	Sudáfrica	20	Acetona y agua a ebullición	14 acetónicos y 6 acuosos vs <i>M. tuberculosis</i>
1998	Frame A. y cols.	Puerto Rico	50	Etanol al 95%	6 vs <i>M. tuberculosis</i>
1998	Dimayuga R. E. y cols.	México (BCS)	109	Etanol	51 vs <i>S. aureus</i> 50 vs <i>B. subtilis</i> 19 vs <i>S. faecalis</i> 3 vs <i>E. coli</i> 6 vs <i>C. albicans</i>
1998	Cantrell C. L. y cols.	USA	118	Cloruro de metileno, cloroformo, hexano, éter de petróleo, éter etílico, acetona, etanol, metanol y agua.	15 en cloruro de metileno, 2 hexánicos y 1 acetónico vs <i>M. tuberculosis</i>
2000	Rojas G. y cols.	México (Morelos)	6	Hexano, cloroformo y metanol.	3 clorofórmicos vs <i>C. albicans</i> . 6 metanólicos, 6 hexánicos y 4 clorofórmicos vs <i>S. pneumoniae</i> . 3 hexánicos, 4 clorofórmicos y 1 metanólico vs <i>S. aureus</i> .
2001	Tshibangu J. y cols.	Alemania	7	Cloruro de metileno, metanol, acetato de etilo y agua.	3 en cloruro de metileno vs <i>M. tuberculosis</i>
2001	Newton S. M. y cols.	Inglaterra	43	Metanol	3 vs <i>M. tuberculosis</i>

El contar con métodos estandarizados de monitoreo general de plantas con actividad antimicrobiana es en nuestros días una necesidad y debido a esto, se pretende establecer las condiciones más adecuadas para la obtención de extractos de plantas superiores por medio de un Diseño de Experimentos (DOE), en el cual se evalúen las variables más críticas en el procedimiento de extracción y de esta forma mejorar la efectividad de los estudios fitoquímicos.

De esta manera, el presente trabajo está dividido en dos partes, la primera concerniente a la fase previa del Diseño de Experimentos (DOE) la cual sirve como base para la selección de las plantas, las condiciones para cada variable (diferentes niveles), el monitoreo de la actividad antimicrobiana de tales plantas y el conocimiento del número de componentes de cada uno de los extractos. La segunda fase es el Diseño de Experimentos (DOE), por medio del cual se podrán definir objetivamente las condiciones adecuadas para la obtención de extractos con actividad antimicrobiana.

## **2.2. Objetivos**

### **2.2.1. Objetivo General**

Establecer las condiciones óptimas de extracción de principios activos de plantas con actividad antimicrobiana.



### 2.2.2. Objetivos Específicos

1. Seleccionar las plantas medicinales a evaluar en base a estudios previos realizados en el departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.
2. Realizar la extracción del material seco seleccionado mediante el uso de los siguientes solventes: acetona, etanol, metanol, soluciones hidroalcohólicas: mezcla metanol:agua 80:20 y mezcla etanol:agua 90:10, todos a temperatura ambiente, así como agua a ebullición.
3. Evaluar la actividad biológica de los extractos obtenidos sobre una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente.
4. Analizar los extractos activos por Cromatografía en Capa Fina.
5. Llevar a cabo la selección del solvente de extracción más adecuado.
6. Aplicar diseño de experimentos con el solvente seleccionado por medio de un análisis factorial fraccional a dos niveles (*Plakett y Burman*).

## CAPÍTULO 3

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Equipo, Material y Reactivos

##### 3.1.1. Material Biológico

- Hojas de *Cordia boissieri* (Anacahuita) provenientes de los municipios de Monterrey, N.L. y Villa de García, N.L., recolectadas en Octubre del 2000.
- Hojas de *Leucophyllum frutescens* (Cenizo) provenientes de los municipios de Monterrey, N.L. y Villa de García, N.L., recolectadas en Octubre del 2000.
- Frutos de *Schinus molle* (Pirul) provenientes del municipio de Arteaga, Coahuila, recolectados en Octubre del 2000.
- Raíces de *Cyperus alternifolius* (Papiro) provenientes del municipio de Santiago, N.L., recolectadas en Diciembre del 2002.
- Microorganismo: Cepa *Staphylococcus aureus* resistente IMSS-2501.

### 3.1.2. Equipo

- Molino Thomas Wiley, Laboratory Mill®, modelo 4, malla 2 mm
- Licuadora
- Balanza analítica Ohaus®
- Balanza analítica Ohaus®- Analytical Plus
- Pulse Vortexer Glass-Col®
- Mini-Vortex VWR – Scientific Products®
- Rotavapor BÜCHI® modelo 461 con baño de agua BÜCHI RE 121
- Rotavapor-R BÜCHI® con baño de agua HB4 Basic Kika Labortechnik®
- Pistola de desecación Desaga® Hidelberg Trockenpult, Type 134100
- Liofilizadora Labconco® 7522800 Freeze Dry – 12; Fr
- Plancha de calentamiento Corning® PC-351
- Bomba de vacío Gast® US Patent Number 3,658,350
- Incubadora a 37°C Stabil-Therm®
- Lámparas Spectroline® Highest Ultraviolet Intensity a 254 y 365 nm

### 3.1.3. Material

- Tubos de ensaye Pyrex® de 16 mm x 150 mm con tapón de rosca
- Tubos de boca esmerilada Pyrex® 24/40 de 50 mL de capacidad
- Microtubos Eppendorf® de 1.5 mL
- Pipeta automática Wilson® de 50, 100 y 1000 µL con puntillas
- Pipetas lineales

- Micropipeta multicanal Transferpette® de 8 canales
- Pipetas Pasteur
- Frasco para liofilizar Labconco® capacidad de 80 mL
- Placas de porcelana
- Cromatofolios AL TLC de Sílica Gel 60 F<sub>254</sub> Merck®
- Embudos de filtración rápida
- Cajas Petri
- Acrodiscos PTFE y GHP con filtro de 0.22 µm Gelman®
- Microplacas de 96 pozos
- Jeringas
- Espátulas delgadas
- Vasos de precipitado Pyrex®
- Cronómetro
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Parafilm®

#### **3.1.4. Reactivos y Solventes**

- Acetona grado analítico CTR®
- Etanol grado analítico CTR®
- Metanol grado analítico CTR®
- Agua destilada
- Éter de petróleo grado analítico Merck®
- Acetato de etilo grado analítico Fermont®

- Cloroformo grado analítico Merck®
- DMSO grado analítico Fisher Scientific®
- Nitrógeno gas del alta pureza, AGA®
- Yodo en cristales
- Indicador de crecimiento Alamar Azul Trek Diagnostic®

### **3.1.5. Medios de Cultivo**

- Agar Mueller Hinton DIFCO® 225250
- Caldo Mueller Hinton DIFCO® 275730

### **3.1.6. Antibióticos**

- Penicilina (Bencilpenicilina sódica)
- Vancomicina

### **3.1.7. Software**

- STATGRAPHICS Plus versión 5.0

## 3.2. Métodos

### PARTE I: Fase Previa al Diseño de Experimentos

#### 3.2.1. Preparación del Material Biológico

Las hojas de *Leucophyllum frutescens* (Cenizo), de *Cordia boissieri* (Anacahuita) y los frutos de *Schinus molle* (Pirul) fueron recolectados en Octubre del 2000. Las raíces de *Cyperus alternifolius* (Papiro) se recolectaron en Diciembre del 2002. Todas las colectas fueron hechas en la región Noreste de México

Previo a ser molidas, todas las plantas se dejaron secar a temperatura ambiente, se limpiaron, y en el caso específico de las raíces de *Cyperus alternifolius*, éstas se lavaron con agua y se secaron con papel una por una pasándoles aire fresco con una secadora. Una vez que el material vegetal se secó, fue molido en licuadora y finalmente en molino.

En las figuras 1 a la 4, se muestran las fotografías de cada una de las plantas seleccionadas.



**Figura 1. *Leucophyllum frutescens***



**Figura 2. *Cyperus alternifolius***



**Figura 3. *Schinus molle***



**Figura 4. *Cordia boissieri***

### 3.2.2. Extracciones del Material Seco

Una vez molido el material elegido, fueron pesados por separado 1g de cada una de las partes de las plantas y colocados en tubos de ensaye de 16 mm x 150 mm con tapón de rosca.

Se procedió a realizar las extracciones con cada uno de los siguientes solventes:

1. Acetona
2. Metanol
3. Etanol
4. Solución hidroalcohólica de metanol:agua (80:20)
5. Solución hidroalcohólica de etanol:agua (90:10)
6. Agua a ebullición

Todas las extracciones se realizaron a temperatura ambiente, a excepción de las extracciones realizadas con agua, en las cuales fue necesario simular la preparación de una infusión.

Cada una de las plantas fue extraída por separado usando los seis solventes mencionados, de forma tal que al final se contó con 24 extractos.

Las extracciones realizadas con acetona, metanol, etanol, solución hidroalcohólica de metanol:agua (80:20) y solución hidroalcohólica de etanol:agua (90:10), se llevaron a cabo de forma idéntica, tratando de no añadir variables a ninguna de las extracciones.



Las condiciones en cada una de las extracciones fueron las siguientes:

Volumen total de solvente:	20 mL
Tiempo total de extracción:	15 min
Número de extracciones:	3
Velocidad de agitación:	8 RPM

El procedimiento realizado en todas las extracciones a excepción de las que se llevaron a cabo con agua a ebullición es descrito a continuación: A 1g del material molido y pesado se le agregaron 10 mL del solvente correspondiente, el tubo fue tapado y agitado por 5 minutos constantemente a 8 RPM en vortex, usando cronómetro para respetar los tiempos indicados. Pasados los primeros 5 minutos, el extracto se filtró en embudo de filtración rápida con papel filtro; se recogió el filtrado en un tubo de boca esmerilada de 24/40 de 50 mL de capacidad. Posteriormente se realizó la segunda extracción al material vegetal remanente que se encontraba en el tubo, pero el volumen de solvente fue de 5 mL extrayendo nuevamente por 5 minutos a la misma velocidad. El filtrado obtenido se juntó con el correspondiente a la primera extracción. Finalmente, se realizó la tercera extracción usando 5 mL del solvente por 5 minutos a la misma velocidad, juntando el filtrado obtenido con el de las dos extracciones anteriores.

Una vez realizadas las tres extracciones, el volumen final de extracto fue sometido a evaporación en rotavapor a una temperatura controlada de 38°C. El tiempo requerido para tal propósito dependió del punto de ebullición del solvente que había sido utilizado en cada extracción, en un rango comprendido de 40 minutos como

mínimo y hasta 2.5 horas como máximo para el caso de las soluciones hidroalcohólicas. Cabe señalar que en el caso de estas últimas, fue necesario formar azeótropos mediante la adición de pequeños volúmenes de etanol, esto con el fin de lograr evaporar las pequeñas porciones de agua presentes en dichas soluciones hidroalcohólicas, que impedían la evaporación total del solvente de extracción.

Una vez secos, cada uno de los extractos se resuspendieron en metanol, mediante el uso de una espátula para raspar las paredes del tubo. Se puso especial cuidado en utilizar la menor cantidad posible de metanol para la recuperación de dichos extractos. Cada uno de los extractos resuspendidos, fueron colocados en tubos eppendorf previamente etiquetados y pesados.

Para secar por completo los extractos, se utilizó primeramente un flujo de nitrógeno usando una puntilla para cada extracto, de manera que se evitó la contaminación entre un extracto y otro. Posteriormente, los extractos se llevaron a sequedad total al vacío en una pistola de desecación a una temperatura de 38°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, los tubos se pesaron en balanza analítica para conocer la cantidad obtenida de cada extracto y así el porcentaje de recuperación de cada una de las extracciones.

Para el caso de la extracción con agua a ebullición; una vez que el agua se encontraba en ebullición, se realizó la primera de tres extracciones con 10 mL de agua sobre 1g del material seco de cada una de las cuatro plantas. Luego se filtró en embudo de filtración rápida y papel filtro, y el filtrado se recogió en un frasco para liofilizar (*Fast Freeze Flask*) de 80 mL. Posteriormente se llevaron a cabo las otras dos extracciones con un volumen de 5 mL de agua a ebullición en cada una. Las tres

extracciones se realizaron por 5 minutos a una velocidad de 8 RPM. Al igual que con el resto de los solventes, se realizó todo a las mismas condiciones.

El volumen de filtrado correspondiente a las tres extracciones acuosas de cada planta, fue liofilizado.

Los 24 extractos secos fueron almacenados a una temperatura de aproximadamente 4°C, los tubos se mantuvieron perfectamente cerrados y cubiertos con parafilm® y papel aluminio para evitar la fotodegradación. Así permanecieron hasta que fueron sometidos a las pruebas de actividad biológica.

### **3.2.3. Evaluación de la Actividad Biológica**

La evaluación de la actividad biológica de cada uno de los extractos se realizó por medio de la Técnica de Microdilución en placa (Jorgensen et al, 1999).

El microorganismo utilizado para conocer la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos, fue una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a penicilina IMSS- 2501.

### 3.2.3.1. Preparación del Medio de Cultivo

- Agar Mueller Hinton: Se preparó la cantidad requerida para cada experimento según las indicaciones del envase. Se suspendieron 38 gramos del polvo en un litro de agua destilada. Se mezclaron vigorosamente calentando con frecuente agitación, se dejó hervir por 1 minuto para disolverlo por completo. Finalmente se colocaron en la autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Caldo Mueller Hinton (Base para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de microorganismos aeróbicos por métodos de dilución en caldo). Se preparó la cantidad requerida para cada experimento según las indicaciones del envase. Se suspendieron 21 gramos del polvo en un litro de agua destilada, luego se calentó suavemente para disolver. Posteriormente se llevó a la autoclave a 121°C por 15 minutos; manteniendo un pH final de  $7.3 \pm 0.1$ .

### 3.2.3.2. Preparación del Inóculo

A partir de la cepa de *S. aureus* resistente a penicilina IMSS-2501, se sembró en estriado en agar Mueller Hinton, se incubó de 18 a 24 horas. Pasado este tiempo, cuatro a cinco colonias fueron resuspendidas en 3 mL de caldo Mueller Hinton y se incubó el mismo período de tiempo. A partir del cultivo en caldo, se inocularon 50  $\mu$ L a 3 mL de Caldo Mueller Hinton (CMH) y se incubó bajo las mismas condiciones hasta alcanzar 0.5 en la escala de Mc Farland, para posteriormente realizar una dilución 1:50 con el mismo medio de cultivo.

### 3.2.3.3. Preparación de los Extractos

Se pesaron 2 mg de cada extracto en tubos eppendorf y se disolvieron en 200  $\mu$ L de DMSO para el caso de los extractos de *Leucophyllum frutescens* (Cenizo) y *Cyperus alternifolius* (Papiro); 50  $\mu$ L de etanol fue usado para los extractos de *Schinus molle* (Pirul) y para los extractos de *Cordia boissieri* (Anacahuita) se utilizó únicamente CMH ya que estos extractos se solubilizaron rápidamente en el medio de cultivo. Una vez solubilizados los extractos, el volumen fue completado a 1000  $\mu$ L con el mismo medio de cultivo, para posteriormente ser filtrados en acrodiscos PTFE y GHP con filtro de 0.22  $\mu$ m.

Los extractos acuosos de Cenizo, Papiro y Pirul así como todos los extractos de Anacahuita fueron filtrados en acrodiscos GHP; el resto de los extractos se filtraron con acrodiscos PTFE.

### 3.2.3.4. Preparación de Controles

#### A) Controles de Antibióticos

Se utilizó como control negativo Penicilina (Bencilpenicilina sódica) y como control positivo Vancomicina. Para la Vancomicina, se preparó una solución stock de 256  $\mu$ g/mL; mientras que para la Penicilina, se preparó una solución de 25.6  $\mu$ g/mL. Una vez preparadas estas soluciones, se filtraron en filtros GHP de 0.22  $\mu$ m para esterilizarlos.

## **B) Control del Solvente Utilizado**

- DMSO: Se filtró 1 mL en acrodiscos GHP.
- Etanol: Se preparó una solución con 50  $\mu$ L de etanol y 950  $\mu$ L de CMH, se filtró en acrodiscos GHP.

La preparación de los controles de extractos (control de óxido-reducción), controles de crecimiento del microorganismo y controles de esterilidad del medio de cultivo, se detallan en la descripción de la técnica de Microdilución en Placa (3.2.3.5.).

### **3.2.3.5. Descripción de la Técnica de Microdilución en Placa**

La técnica de Microdilución en placa se realizó en placas de 96 pozos (12 x 8). El primer paso consistió en colocar 200  $\mu$ L de agua bidestilada estéril a todos los pozos de la orilla (36 pozos). Se colocaron 100  $\mu$ L de medio de cultivo al resto de los pozos. Posteriormente, de la solución preparada con cada extracto y de los controles de solventes y antibióticos, se colocaron 100  $\mu$ L en los primeros pozos de cada carril. Se realizaron diluciones seriadas al doble con una micropipeta multicanal, descartando los últimos 100  $\mu$ L. Para los controles de extracto (control de óxido reducción), además del medio de cultivo se les adicionaron 100  $\mu$ L del extracto correspondiente, se diluyeron al doble para lo cual se sacaron 100  $\mu$ L de esa solución y se agregaron 100  $\mu$ L del medio de cultivo de forma que cada extracto llevó su control a una concentración de 500  $\mu$ g/mL. Se dejaron pozos con 100  $\mu$ L de medio de cultivo para control de

esterilidad del medio y pozos para control de crecimiento del microorganismo. A los pozos de control de esterilidad se les agregaron 100  $\mu\text{L}$  del medio de cultivo para completar a 200  $\mu\text{L}$ . Al resto de los pozos se les agregaron 100  $\mu\text{L}$  de la dilución 1:50 del microorganismo para completar a 200  $\mu\text{L}$  (ver figura 5).

Las concentraciones para los controles de antibióticos quedaron de la siguiente forma:

Para Vancomicina: 64, 32, 16, 8 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente.

Para Penicilina: 6.4, 3.2, 1.6, 0.8 y 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente.

La concentración de los controles de extracto fue de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para cada extracto.

Las placas fueron incubadas de 18 a 24 horas a 37 °C.

#### **3.2.3.6. Revelado**

Se preparó una solución con 12  $\mu\text{L}$  de solución salina y 20  $\mu\text{L}$  de Alamar Azul. Se agregaron los 32  $\mu\text{L}$  a cada pozo. Después de incubar por una hora, se observó el viraje del color. Si el color azul permanecía, se consideró que había inhibición del crecimiento. Si se presentaba viraje a color rosa, se consideró que había crecimiento bacteriano.

### 3.2.4. Análisis de los Extractos Activos por Cromatografía en Capa Fina

De los extractos que resultaron activos contra la cepa seleccionada, se llevó a cabo la evaluación del número de manchas presentes en cada uno de ellos, por medio de la técnica de Cromatografía en Capa Fina (CCF).

Para la realización de las pruebas de CCF, los extractos secos fueron disueltos en una gota de cloroformo, en la mayoría de los casos de forma rápida. El único extracto que no pudo disolverse en cloroformo fue el correspondiente a las hojas de *Cordia boissieri* extraído con la mezcla de etanol:agua (90:10), para el cual se usó acetato de etilo para disolverlo.

Para las pruebas de CCF, se evaluaron cuatro sistemas de eluentes, a saber:

1. Éter de petróleo
2. Éter de petróleo + acetato de etilo (10:1)
3. Éter de petróleo + acetato de etilo (3:1)
4. Acetato de etilo

Los sistemas de revelado utilizados en CCF fueron tres:

1. Lámpara UV a 365 nm
2. Lámpara UV a 254 nm
3. Vapores de yodo

Estos sistemas de revelado se seleccionaron en base a lo reportado en la literatura (Orioll et al, 2002), misma que se muestra en la tabla II:



**Tabla II. Tipos de Reveladores Usados en Cromatografía en Capa Fina.**

<b>Revelador</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Tipo de sustancias observables</b>
Luz UV 254-366 nm	Manchas fluorescentes sobre fondo oscuro	Compuestos orgánicos fluorescentes
Luz UV 254-366 nm	Manchas oscuras sobre fondo fluorescente	Compuestos aromáticos y heterocíclicos
Vapores de yodo	Manchas pardas sobre fondo amarillo	Compuestos orgánicos especialmente insaturados

### 3.2.5. Selección del Solvente de Extracción más Adecuado

Para llevar a cabo la selección del solvente de extracción más adecuado, fueron considerados tres parámetros en orden de prioridad:

- La actividad antimicrobiana medida en CMI
- El porcentaje de recuperación
- Los resultados de CCF obtenidos para los extractos activos

## PARTE II: Diseño de Experimentos

Las plantas usadas en el DOE fueron las siguientes:

- Hojas de *Cordia boissieri* (Anacahuita) extraída con mezcla de etanol:agua (90:10).
- Frutos de *Schinus molle* (Pirul) extraídos con metanol.

### 3.2.6. Diseño de Experimentos

Para este fin, fue utilizado un análisis factorial fraccionado a dos niveles  $2^4$  (Método de *Plakett* y *Burman*) (Box, G. et al, 2001). Los cuatro factores evaluados fueron: el volumen de solvente, la velocidad de extracción, el tiempo de extracción y el tiempo de almacenamiento. Para definir el valor de cada nivel, se partió de un nivel medio el cual correspondió a las condiciones de trabajo descritas en la sección 3.2.2; se trabajó con un nivel por arriba y un nivel por debajo de los valores asignados en la fase previa al DOE.

La tabla III muestra los valores asignados para cada uno de los factores con las unidades utilizadas.

**Tabla III. Niveles Asignados a cada uno de los Factores Evaluados en el Diseño de Experimentos.**

<b>Factores</b>	<b>Nivel Bajo (-1)</b>	<b>Nivel Medio (0)</b>	<b>Nivel Alto (+1)</b>
<b>Volumen de solvente</b>	13 mL	20 mL	27 mL
<b>Velocidad de extracción</b>	6 RPM	8 RPM	10 RPM
<b>Tiempo de Extracción</b>	9 min	15 min	21 min
<b>Tiempo de almacenamiento</b>	10 días	40 días	70 días

Un diseño factorial  $2^4$  fraccionado (media fracción), implica 8 combinaciones diferentes para los distintos factores en sus niveles alto y bajo. Adicionalmente fue incluida una combinación en la que se trabajó con las condiciones originales, es decir, todos los factores en su nivel medio que resultaron en 9 combinaciones diferentes. Considerando que se trabajó con una réplica para conocer la variabilidad de la respuesta bajo condiciones idénticas, el diseño seleccionado consta de 18 ensayos para cada planta, de forma que el total de extracciones (ensayos) fue de 36.

Cabe señalar que para ambas plantas, las combinaciones realizadas fueron exactamente las mismas, las cuales se muestran en la tabla IV. Los bloques 1 y 2 indican la réplica realizada para cada combinación.

**Tabla IV. Planeación y Desarrollo del Trabajo Experimental**

Bloque	Volumen de solvente	Velocidad de extracción	Tiempo de extracción	Tiempo de almacenamiento	# de ensayo de <i>C. boissieri</i>	# de ensayo de <i>S. molle</i>
1	13 ml	6 rpm	9 min	10 días	1	11
1	27 ml	6 rpm	9 min	70 días	21	30
1	13 ml	10 rpm	9 min	70 días	23	31
1	27 ml	10 rpm	9 min	10 días	3	13
1	13 ml	6 rpm	21 min	70 días	25	33
1	27 ml	6 rpm	21 min	10 días	5	15
1	13 ml	10 rpm	21 min	10 días	7	17
1	27 ml	10 rpm	21 min	70 días	27	35
1	20 ml	8 rpm	15 min	40 días	10	19
2	13 ml	6 rpm	9 min	10 días	2	12
2	27 ml	6 rpm	9 min	70 días	22	29
2	13 ml	10 rpm	9 min	70 días	24	32
2	27 ml	10 rpm	9 min	10 días	4	14
2	13 ml	6 rpm	21 min	70 días	26	34
2	27 ml	6 rpm	21 min	10 días	6	16
2	13 ml	10 rpm	21 min	10 días	8	18
2	27 ml	10 rpm	21 min	70 días	28	36
2	20 ml	8 rpm	15 min	40 días	9	20

### **3.2.6.1. Trabajo Experimental: Extracciones del Material Seco**

El procedimiento de extracción se llevó a cabo siguiendo el mismo esquema que en el punto 3.2.2 a con las combinaciones establecidas en la tabla IV:

Todas las extracciones fueron realizadas con 1g de material seco y molido. Se llevaron a cabo en tubos de ensaye con tapón de rosca y se agitó con vortex.

De la misma manera como se hizo en la fase previa al DOE, los extractos fueron evaporados en rotavapor a 38°C. Posteriormente fueron recuperados con metanol y secados con nitrógeno en tubos eppendorf para llevarlos a sequedad total en pistola de desecación a 38°C.

Después de haber secado por completo los extractos, los tubos fueron pesados para conocer la cantidad obtenida de cada uno de ellos y así calcular el porcentaje de recuperación de cada una de las extracciones.

Todas las extracciones se realizaron por duplicado.

### **3.2.6.2. Evaluación de la Actividad Biológica**

La evaluación de la Actividad Biológica se realizó siguiendo el mismo protocolo descrito en la sección 3.2.3 de la parte I correspondiente a la fase

previa al DOE; las concentraciones de los extractos fueron de: 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.8, 3.9 y 1.95  $\mu\text{g/mL}$ .

### **3.2.6.3. Análisis Estadístico**

Se realizó por medio de un análisis factorial  $2^4$ , media fracción. Para este fin se hizo uso del software STATGRAPHICS Plus versión 5.0.

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS

#### PARTE I: Fase Previa al Diseño de Experimentos

##### 4.1. Selección del Material Biológico

La tabla V muestra los nombres científicos y comunes de las plantas seleccionadas, así como las partes de la plantas que fueron objeto de estudio.

**Tabla V. Plantas Utilizadas en la Fase Previa al Diseño de Experimentos.**

<b>Nombre científico de la planta</b>	<b>Nombre común de la planta</b>	<b>Parte utilizada de la planta</b>
<i>Leucophyllum frutescens</i>	Cenizo	Hojas
<i>Cyperus alternifolius</i>	Papiro	Raíz
<i>Schinus molle</i>	Pirul	Fruto
<i>Cordia boissieri</i>	Anacahuita	Hojas

## 4.2. Extracciones del Material Seco

La tabla VI muestra la cantidad obtenida (en mg) de cada uno de los extractos realizados durante la fase previa al Diseño de Experimentos.

**Tabla VI. Cantidad Obtenida en mg de cada uno de los Extractos con Diversos Solventes en la Fase Previa al Diseño de Experimentos.**

Planta	Acetona	Metanol	Etanol	Metanol:agua (80:20)	Etanol:agua (90:10)	Agua a ebullición
<i>L. frutescens</i>	4.6 mg	51.4 mg	25.1 mg	114.5 mg	74.3 mg	98.1 mg
<i>S. molle</i>	105.4 mg	196.4 mg	154.6 mg	179.8 mg	198.1 mg	178.1 mg
<i>C. boissieri</i>	15.7 mg	59 mg	42.5 mg	56.9 mg	80.7 mg	152.8 mg
<i>C. alternifolius</i>	5.9 mg	17.3 mg	23 mg	54.7 mg	60.4 mg	72.3 mg

En la tabla VII se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos en las 24 extracciones realizadas con 6 solventes distintos a las 4 plantas seleccionadas.

**Tabla VII. Porcentajes de Recuperación Obtenidos para cada uno de los Extractos con Diversos Solventes en la Fase Previa al Diseño de Experimentos.**

Planta	Acetona	Metanol	Etanol	Metanol:agua (80:20)	Etanol:agua (90:10)	Agua a ebullición
<i>L. frutescens</i>	0.46 %	5.1 %	2.5 %	11.5 %	7.4 %	9.8 %
<i>S. molle</i>	10.5 %	19.6 %	15.5 %	18 %	19.8 %	17.8 %
<i>C. boissieri</i>	1.6 %	5.9 %	4.3 %	5.7 %	8.07 %	15.3 %
<i>C. alternifolius</i>	0.59 %	1.7 %	2.3 %	5.5 %	6 %	7.2 %



### 4.3. Evaluación de la Actividad Biológica

De un total de 24 extractos analizados por medio de la Técnica de Microdilución en placa, 14 mostraron actividad antimicrobiana contra la cepa de *S. aureus* resistente IMSS-2501: Seis correspondieron a las hojas de *C. boissieri* (Anacahuita), cuatro a la raíz de *C. alternifolius* (Papiro) y cuatro al fruto de *S. molle* (Pirul); tal como puede apreciarse en la tabla VIII.

Tabla VIII. Actividad Antimicrobiana (CMI) en  $\mu\text{g/mL}$  de los 24 Extractos Evaluados en la Fase Previa al Diseño de Experimentos contra la Cepa de *Staphylococcus aureus* Resistente IMSS-2501.

Planta	Acetona	Metanol	Etanol	Metanol:agua (80:20)	Etanol:agua (90:10)	Agua a ebullición
<i>L. frutescens</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>S. molle</i>	500 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	NA	500 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	NA
<i>C. boissieri</i>	500 $\mu\text{g/mL}$	31.25 $\mu\text{g/mL}$	31.25 $\mu\text{g/mL}$	62.5 $\mu\text{g/mL}$	31.25 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$
<i>C. alternifolius</i>	NA	500 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	NA

NA = No activo a 500  $\mu\text{g/mL}$

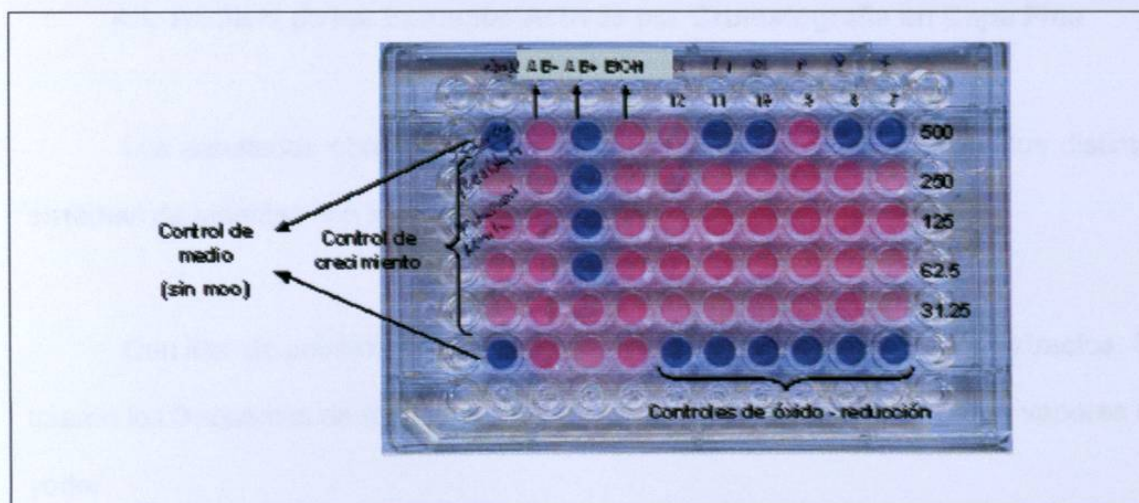


Figura 5. Placa del Bioensayo Realizado con los Extractos de *Schinus molle*.

En la figura 5 se ilustra una de las cuatro placas de los bioensayos realizados. En este ejemplo, se muestran los resultados de actividad antimicrobiana obtenidos para los extractos de *Schinus molle*. Los valores mostrados de 500 a 31.25  $\mu\text{g/mL}$  representan las concentraciones a las cuales se trabajó según las diluciones seriadas descritas en el capítulo 3, sección 3.2.3.5. El carril indicado como EtOH (etanol) representa al control del solvente utilizado en este caso específico para disolver los extractos secos de *S. molle*. Se muestran los controles de antibiótico tanto positivo indicado como "AB +" y negativo indicado como "AB -". Los números del 7 al 12 indican los carriles usados para cada uno de los 6 extractos. Así mismo, son señalados los controles de los extractos (óxido reducción), de crecimiento del microorganismo y el control de esterilidad del medio de cultivo.

Es importante hacer mención que cada pozo posee la misma cantidad de bacterias, siendo éstas del orden de  $1.8 \times 10^6$  UFC, según la preparación del inóculo, descrita en la sección 3.2.3.2 (Jorgensen et al, 1999).

#### **4.4. Análisis de los Extractos Activos por Cromatografía en Capa Fina**

Los resultados obtenidos a partir de los 14 extractos activos con los distintos sistemas de eluentes son los siguientes:

Con éter de petróleo: No se observó separación en ninguno de los extractos. Se usaron los 3 sistemas de revelación: Lámpara UV a 365 y 254 nm así como vapores de yodo.

Con la mezcla éter de petróleo + acetato de etilo (10:1): Se lograron separar solo 8 componentes a partir de 4 extractos, todos de la raíz de *S. molle*. Los 10 extractos restantes no mostraron separación alguna, tal y como se observa en la tabla IX.

Con la mezcla éter de petróleo + acetato de etilo (3:1): Se observaron 61 manchas distintas a partir de los 14 extractos activos. Estos datos se muestran en la tabla X.

Con acetato de etilo: Se lograron observar 37 manchas distintas a partir de los 14 extractos activos, según se aprecia en la tabla XI.

**Tabla IX. Resultados de CCF con la Mezcla Éter de Petróleo + Acetato de Etilo (10:1) como Fase Móvil.**

Frente de la fase móvil: 3.4 cm.				
Planta	Solvente de extracción	R <sub>F</sub> a $\lambda$ 365 nm	R <sub>F</sub> a $\lambda$ 254 nm	R <sub>F</sub> con yodo
<i>S. molle</i>	Acetona	No se observó separación	0.30	0.09
<i>S. molle</i>	Metanol	No se observó separación	0.30	0.09
<i>S. molle</i>	Metanol:agua (80:20)	No se observó separación	0.30	0.09
<i>S. molle</i>	Etanol:agua (90:10)	No se observó separación	0.30	0.09

Tabla X. Resultados de CCF con la Mezcla Éter de Petróleo + Acetato de Etilo (3:1) como Fase Móvil.

Frente de la fase móvil: 3.9 cm.				
Planta	Solvente de extracción	R <sub>F</sub> a λ 365 nm	R <sub>F</sub> a λ 254 nm	R <sub>F</sub> con yodo
<i>S. molle</i>	Acetona	0.04	0.04	0.04
			0.12	0.12
			0.30	0.30
			0.40	
		0.86		0.65
			0.79	
			0.92	
<i>S. molle</i>	Metanol	0.04	0.04	0.04
			0.12	0.12
			0.30	0.30
				0.65
		0.86		0.79
			0.92	
<i>S. molle</i>	Metanol:agua (80:20)	0.04	0.04	0.04
			0.12	0.12
			0.30	0.30
			0.40	
			0.71	0.65
		0.79		
			0.92	
<i>S. molle</i>	Etanol:agua (90:10)	0.04	0.04	0.04
			0.12	0.12
			0.30	
				0.63
		0.86		0.92
<i>C. boissieri</i>	Acetona		0.06	0.06
		0.29		0.16
			0.31	0.22
			0.29	
<i>C. boissieri</i>	Metanol	0.16		0.05
		0.29	0.29	0.16
			0.58	0.22
		0.70		0.29
		0.86		0.58
			0.88	

Continuación de la tabla X.

Planta	Solvente de extracción	R <sub>F</sub> a λ 365 nm	R <sub>F</sub> a λ 254 nm	R <sub>F</sub> con yodo
<i>C. boissieri</i>	Etanol	0.29 0.71 0.86	0.08 0.23 0.29	0.05 0.16 0.23 0.29
<i>C. boissieri</i>	Metanol:agua (80:20)	0.27 0.87	0.05	0.05 0.27 0.87
<i>C. boissieri</i>	Etanol:agua (90:10)	0.27 0.36 0.87	Ninguna mancha	0.04 0.18 0.87
<i>C. boissieri</i>	Agua a ebullición	Ninguna mancha	Ninguna mancha	Ninguna mancha
<i>C. alternifolius</i>	Metanol	0.89	Ninguna mancha	Ninguna mancha
<i>C. alternifolius</i>	Etanol	0.89	Ninguna mancha	Ninguna mancha
<i>C. alternifolius</i>	Metanol:agua (80:20)	0.89	Ninguna mancha	Ninguna mancha
<i>C. alternifolius</i>	Etanol:agua (90:10)	0.89	Ninguna mancha	Ninguna mancha

Tabla XI. Resultados de CCF con la Mezcla Acetato de Etilo como Fase Móvil.

Frente de la fase móvil: 3.7 cm.				
Planta	Solvente de extracción	R <sub>F</sub> a $\lambda$ 365 nm	R <sub>F</sub> a $\lambda$ 254 nm	R <sub>F</sub> con yodo
<i>S. molle</i>	Acetona	0.58 0.92	0.58	0.05 0.47 0.92
<i>S. molle</i>	Metanol	Ninguna mancha	0.58	0.05 0.58 0.95
<i>S. molle</i>	Metanol:agua (80:20)	0.62 0.93	0.62 0.90	0.05 0.62 0.90 0.93 0.96
<i>S. molle</i>	Etanol:agua (90:10)	0.64 0.91	0.04 0.09 0.64 0.91 0.95	0.12 0.51 0.64 0.68 0.95 0.97
<i>C. boissieri</i>	Acetona	Ninguna mancha	0.92	0.84 0.92 0.97
<i>C. boissieri</i>	Metanol	0.97	0.92	0.92 0.97
<i>C. boissieri</i>	Etanol	0.96	0.91	0.84 0.91 0.96
<i>C. boissieri</i>	Metanol:agua (80:20)	Ninguna mancha	Ninguna mancha	0.97
<i>C. boissieri</i>	Etanol:agua (90:10)	0.97	0.91	0.91 0.97
<i>C. boissieri</i>	Agua a ebullición	Ninguna mancha	Ninguna mancha	0.97

Continuación de la tabla XI.

Planta	Solvente de extracción	R <sub>F</sub> a $\lambda$ 365 nm	R <sub>F</sub> a $\lambda$ 254 nm	R <sub>F</sub> con yodo
<i>C. alternifolius</i>	Metanol	0.89	Ninguna mancha	Ninguna mancha
<i>C. alternifolius</i>	Etanol	0.89	Ninguna mancha	Ninguna mancha
<i>C. alternifolius</i>	Metanol:agua (80:20)	0.89	Ninguna mancha	Ninguna mancha
<i>C. alternifolius</i>	Etanol:agua (90:10)	0.89	Ninguna mancha	Ninguna mancha

En la tabla XII se puede apreciar el total de manchas separadas con la mezcla éter de petróleo + acetato de etilo en proporción (3:1) y con acetato de etilo, como fases móviles de las respectivas CCF realizadas a los 14 extractos activos.

**Tabla XII. Resumen del Número Total de Manchas Observadas con dos Sistemas de Eluentes: Éter de Petróleo + Acetato de Etilo (3:1) y Acetato de Etilo.**

Planta	Solvente de extracción usado	Número total de manchas	
		Sistema revelador: Éter de petróleo + acetato de etilo (3:1)	Sistema revelador: Acetato de etilo
<i>S. molle</i>	Acetona	8	4
<i>S. molle</i>	Metanol	7	3
<i>S. molle</i>	Metanol:agua	8	5
<i>S. molle</i>	Etanol:agua	6	9
<i>C. boissieri</i>	Acetona	5	3
<i>C. boissieri</i>	Metanol	8	2
<i>C. boissieri</i>	Etanol	7	3
<i>C. boissieri</i>	Metanol:agua	3	1
<i>C. boissieri</i>	Etanol:agua	5	2
<i>C. boissieri</i>	Agua a ebullición	0	1
<i>C. alternifolius</i>	Metanol	1	1
<i>C. alternifolius</i>	Etanol	1	1
<i>C. alternifolius</i>	Metanol:agua	1	1
<i>C. alternifolius</i>	Etanol:agua	1	1



#### 4.5. Selección del Solvente de Extracción más Adecuado

En las tablas XIII y XIV se muestran los dos criterios que se tomaron en consideración para la selección del solvente de extracción más adecuado. Para ambas plantas el primer criterio de selección fue la actividad antimicrobiana (menor valor de CMI) y el segundo criterio de selección fue el porcentaje de recuperación de los extractos biológicamente activos.

Tabla XIII. Resultados de los Criterios de Selección Usados en los Extractos de Hojas de *Cordia boissieri*.

Solvente de extracción	Primer criterio	Segundo criterio
	CMI $\mu\text{g/mL}$	Porcentaje de recuperación
Metanol	31.25	5.90 %
Etanol	31.25	4.30 %
Etanol:agua (90:10)	31.25	8.07 %

Tabla XIV. Resultados de los Criterios de Selección Usados en los Extractos del Fruto de *Schinus molle*.

Solvente de extracción	Primer criterio	Segundo criterio
	CMI $\mu\text{g/mL}$	Porcentaje de recuperación
Acetona	500	10.5 %
Metanol	500	19.6 %
Metanol:agua (80:20)	500	18.0 %
Etanol:agua (90:10)	500	19.8 %

## PARTE II: Diseño de Experimentos

### 4.6. Diseño de Experimentos

#### 4.6.1. Trabajo Experimental: Extracciones del Material Seco

En la tablas XV y XVI se observa la cantidad obtenida en mg y los porcentajes de recuperación para cada uno de los extractos de hojas de *Cordia boissieri* y fruto de *Schinus molle* realizados durante el DOE.

Tabla XV. Cantidad Obtenida en mg y Porcentaje de Recuperación para cada uno de los Extractos de *Cordia boissieri* en el DOE

# de ensayo de <i>C.boissieri</i> (según tabla IV)	mg de extracto obtenidos	% de recuperación
1	25.1 mg	2.51 %
21	35.5 mg	3.55 %
23	20.1 mg	2.01 %
3	45.0 mg	4.50 %
25	24.5 mg	2.45 %
5	51.9 mg	5.19 %
7	19.2 mg	1.92 %
27	57.8 mg	5.78 %
10	66.8 mg	6.68 %
2	29.4 mg	2.94 %
22	39.3 mg	3.93 %
24	18.9 mg	1.89 %
4	45.4 mg	4.54 %
26	28.1 mg	2.81 %
6	61.9 mg	6.19 %
8	20.8 mg	2.08 %
28	47.8 mg	4.78 %
9	44.6 mg	4.46 %

**Tabla XVI. Cantidad Obtenida en mg y Porcentaje de Recuperación para cada uno de los Extractos de *Schinus molle* en el DOE**

<b># de ensayo de <i>S. molle</i> (según tabla IV)</b>	<b>mg de extracto obtenidos</b>	<b>% de recuperación</b>
11	109.2 mg	10.92 %
30	171.1 mg	17.11 %
31	92.2 mg	9.22 %
13	173.9 mg	17.39 %
33	140.5 mg	14.05 %
15	214.8 mg	21.48 %
17	145.1 mg	14.51 %
35	212.8 mg	21.28 %
19	182.6 mg	18.26 %
12	111.9 mg	11.19 %
29	214.1 mg	21.41 %
32	120.3 mg	12.03 %
14	187.9 mg	18.79 %
34	172.9 mg	17.29 %
16	223.4 mg	22.34 %
18	142.4 mg	14.24 %
36	212.3 mg	21.23 %
20	190.0 mg	19.00 %

En la tabla XVII se aprecian los niveles con los que se obtuvieron los porcentajes de recuperación más altos y más bajos tanto para *Cordia boissieri* como para *Schinus molle*.

**Tabla XVII. Niveles con los que se Obtuvieron los Porcentajes de Recuperación más Altos y más Bajos en Ambas Plantas.**

<b>Factor</b>	<b>Mayor % de recuperación</b>	<b>Menor % de recuperación</b>
Volumen de solvente	Nivel alto	Nivel bajo
Tiempo de extracción	Nivel alto	Nivel bajo
Velocidad de extracción	Nivel bajo	Nivel alto

#### 4.6.2. Evaluación de la Actividad Biológica

En la tabla XVIII se muestran los resultados de actividad antimicrobiana (CMI) obtenida en  $\mu\text{g/mL}$  para cada uno de los extractos de ambas plantas según la planeación y el desarrollo del trabajo experimental resumido en la tabla IV del capítulo 3.

En las figuras 6 y 7 se muestran como ejemplo dos de las placas de los bioensayos realizados en esta parte del DOE correspondiente a los extractos de *Cordia boissieri* evaluados después de 10 y 70 días de almacenamiento respectivamente.

En la figura 6 los números del 1 al 5 indican el carril usado para cada uno de los extractos, al igual que en la figura 7 indicados con los números del 25 al 28; los valores de 500 a 1.95  $\mu\text{g/mL}$  son las concentraciones a las cuales se trabajó según las diluciones seriadas descritas en las secciones 3.2.3.5 y 3.2.6.2. La Vancomicina fue el antibiótico usado como control positivo y la Penicilina fue el antibiótico usado como control negativo. Así mismo se indican los pozos correspondientes a los controles de esterilidad del medio de cultivo, de crecimiento del microorganismo y de los extractos (óxido-reducción); según lo descrito en la sección 3.2.3.5.

**Tabla XVIII. Actividad Antimicrobiana (CMI) en  $\mu\text{g/mL}$  de cada uno de los Extractos Obtenidos en el DOE para *Cordia boissieri* y *Schinus molle*.**

Volumen de solvente	Velocidad de extracción	Tiempo de extracción	Tiempo de almacenamiento	CMI <i>C. boissieri</i>	CMI <i>S. molle</i>
13 ml	6 rpm	9 min	10 días	7.8	250
27 ml	6 rpm	9 min	70 días	15.62	>500
13 ml	10 rpm	9 min	70 días	15.62	>500
27 ml	10 rpm	9 min	10 días	7.8	>500
13 ml	6 rpm	21 min	70 días	62.5	>500
27 ml	6 rpm	21 min	10 días	7.8	125
13 ml	10 rpm	21 min	10 días	7.8	>500
27 ml	10 rpm	21 min	70 días	62.5	>500
20 ml	8 rpm	15 min	40 días	15.62	>500
13 ml	6 rpm	9 min	10 días	7.8	500
27 ml	6 rpm	9 min	70 días	15.62	>500
13 ml	10 rpm	9 min	70 días	31.25	>500
27 ml	10 rpm	9 min	10 días	7.8	>500
13 ml	6 rpm	21 min	70 días	62.5	>500
27 ml	6 rpm	21 min	10 días	15.62	500
13 ml	10 rpm	21 min	10 días	15.62	>500
27 ml	10 rpm	21 min	70 días	62.5	>500
20 ml	8 rpm	15 min	40 días	31.25	250

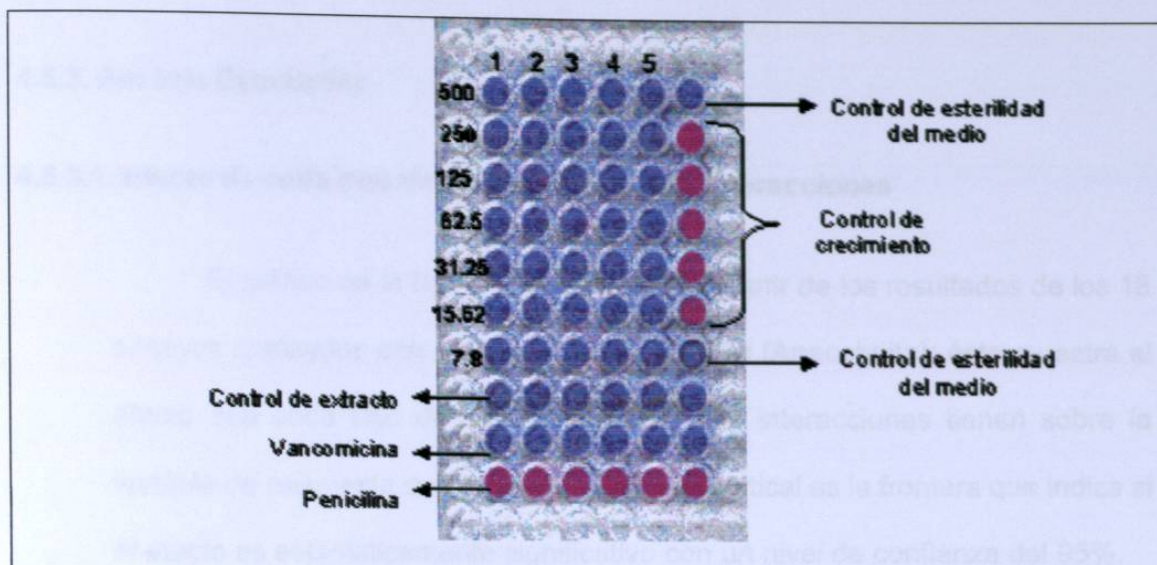


Figura 6. Placa del Bioensayo Realizado con los Extractos de *Cordia boissieri* Evaluados Después de 10 días de Almacenamiento.

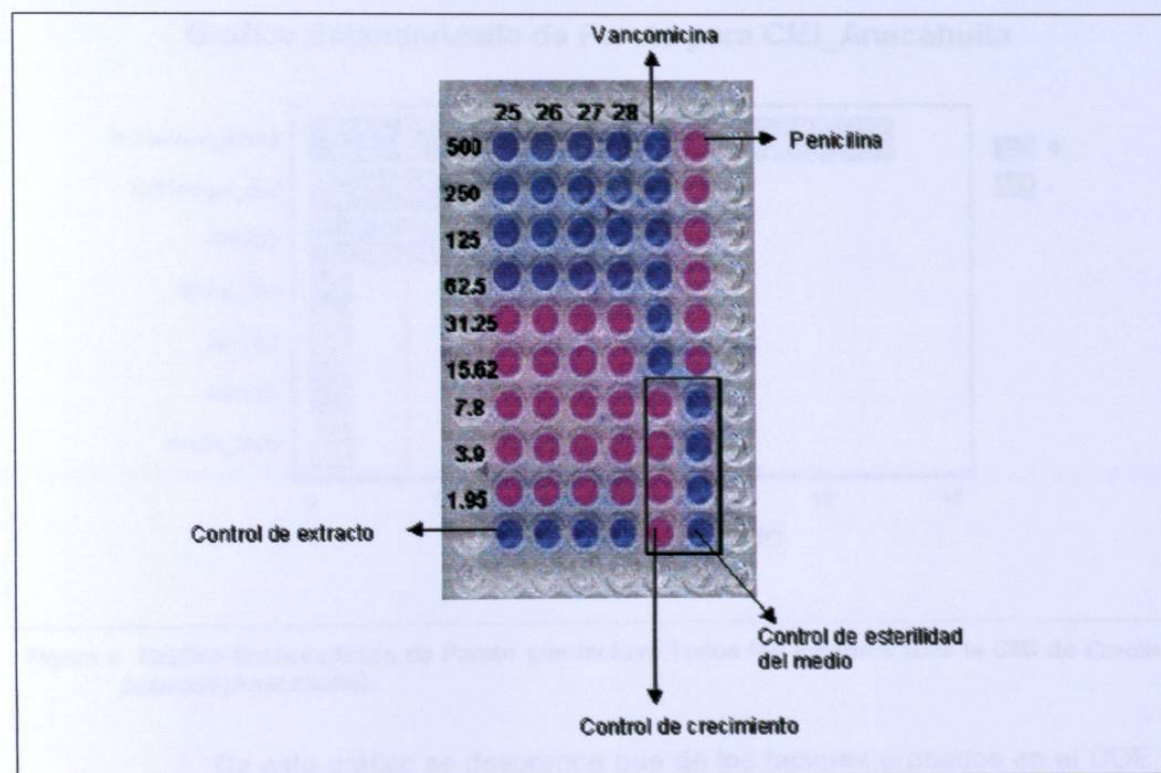


Figura 7. Placa del Bioensayo Realizado con los Extractos de *Cordia boissieri* Evaluados Después de 70 días de Almacenamiento.

### 4.6.3. Análisis Estadístico

#### 4.6.3.1. Efecto de cada uno de los Factores y sus Interacciones

El gráfico de la figura 8 se construyó a partir de los resultados de los 18 ensayos realizados con las hojas de *C. boissieri* (Anacahuíta); éste muestra el efecto que cada uno de estos factores y sus interacciones tienen sobre la variable de respuesta que es la CMI. La línea vertical es la frontera que indica si el efecto es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95%.

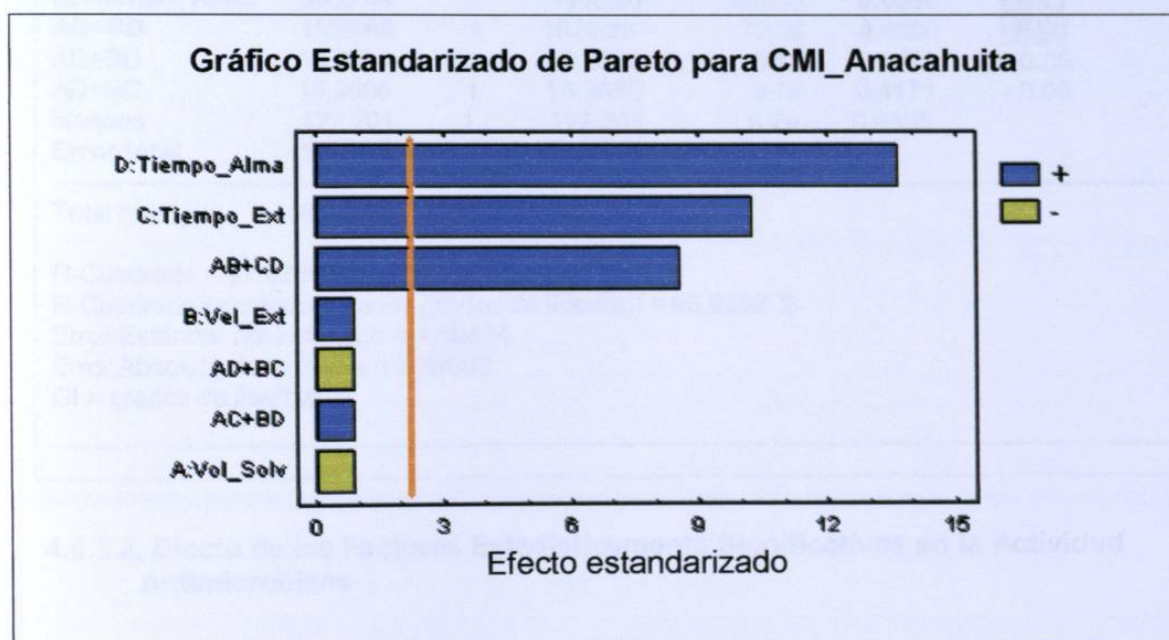


Figura 8. Gráfico Estandarizado de Pareto que Incluye Todos los Factores para la CMI de *Cordia boissieri* (Anacahuíta).

De este gráfico se desprende que de los factores probados en el DOE, los que afectan a la actividad antimicrobiana son el tiempo de almacenamiento y el tiempo de extracción.

En la tabla XIX se muestra el Análisis de Varianza (ANOVA) complementario a la figura 8, en el cual se expresa de forma numérica el efecto de todos los factores y sus interacciones.

Tabla XIX. Análisis de Varianza que Incluye Todos los Factores para la CMI de *Cordia boissieri* (Anacahuita).

Análisis de Varianza para la CMI_Anacahuita						
Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	
A:Vol_Solv	15.2686	1	15.2686	0.72	0.4171	>0.05
B:Vel_Ext	15.2686	1	15.2686	0.72	0.4171	>0.05
C:Tiempo_Ext	2197.97	1	2197.97	104.11	<b>0.0000</b>	<b>&lt;0.05</b>
D:Tiempo_Alma	3908.44	1	3908.44	185.13	<b>0.0000</b>	<b>&lt;0.05</b>
AB+CD	1525.88	1	1525.88	72.28	<b>0.0000</b>	<b>&lt;0.05</b>
AC+BD	15.2686	1	15.2686	0.72	0.4171	>0.05
AD+BC	15.2686	1	15.2686	0.72	0.4171	>0.05
bloques	122.201	1	122.201	5.79	0.0395	
<b>Error total</b>	<b>190.004</b>	<b>9</b>	<b>21.1116</b>			
<hr/>						
Total (corr.)	8005.56	17				
R-Cuadrada = 97.6266 %						
R-Cuadrada (ajustada para los grados de libertad) = 95.9652 %						
Error Estándar del Estimado = 4.59474						
Error Absoluto de la Media = 2.89506						
Gl = grados de libertad						

#### 4.6.3.2. Efecto de los Factores Estadísticamente Significativos en la Actividad Antimicrobiana

En la figura 9 se muestra un gráfico estandarizado de barras realizado una vez removidos los factores que no resultaron significativos para la CMI de *C. boissieri*. En la tabla XX se muestra el ANOVA complementario al gráfico de barras.



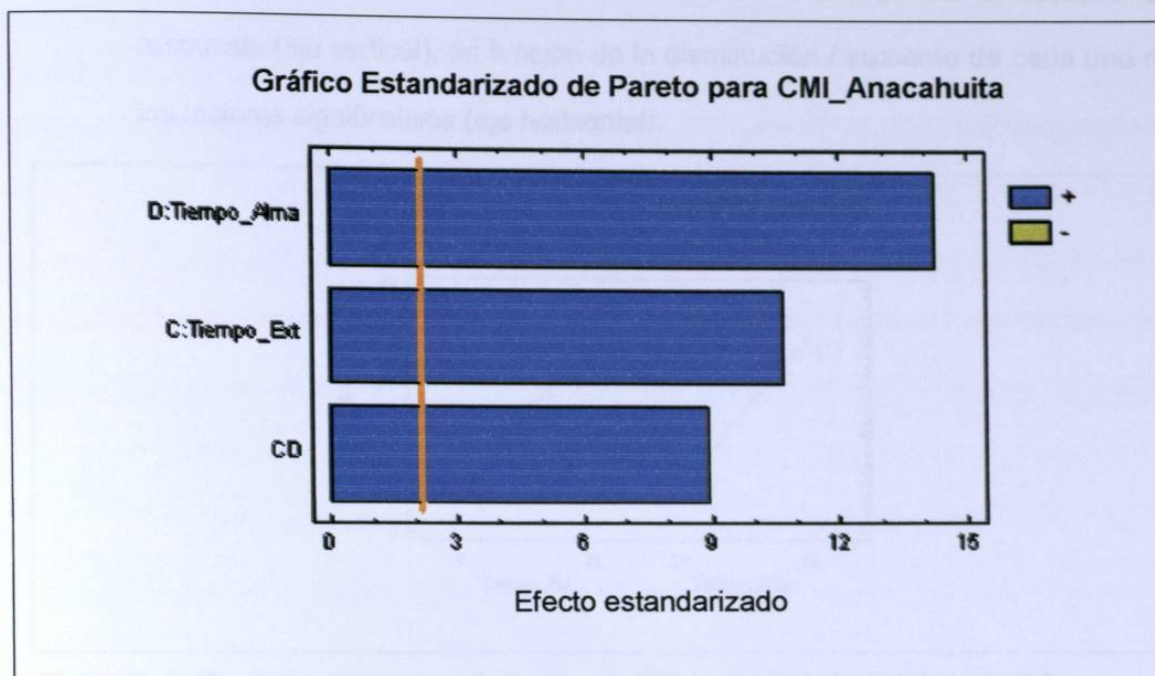


Figura 9. Gráfico Estandarizado de Pareto que Incluye Solo los Factores Significativos para la CMI de *Cordia boissieri* (Anacahuita).

Tabla XX. Análisis de Varianza que Incluye solo los Factores Significativos para la CMI de *Cordia boissieri* (Anacahuita).

Análisis de Varianza para la CMI_Anacahuita					
Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
C:Tiempo_Ext	2197.97	1	2197.97	113.80	0.0000
D:Tiempo_Alma	3908.44	1	3908.44	202.37	0.0000
CD	1525.88	1	1525.88	79.00	0.0000
bloques	122.201	1	122.201	6.33	0.0258
<b>Error total</b>	<b>251.079</b>	<b>13</b>	<b>19.3137</b>		
Total (corr.) 8005.56 17					
R-Cuadrada = 96.8637 %					
R-Cuadrada (ajustada para los grados de libertad) = 96.1916 %					
Error Estándar del estimado = 4.39474					
Error Absoluto de la Media = 3.01566					
GI = grados de libertad					

La figura 10 muestra la disminución / aumento de la variable de respuesta (eje vertical), en función de la disminución / aumento de cada uno de los factores significativos (eje horizontal).

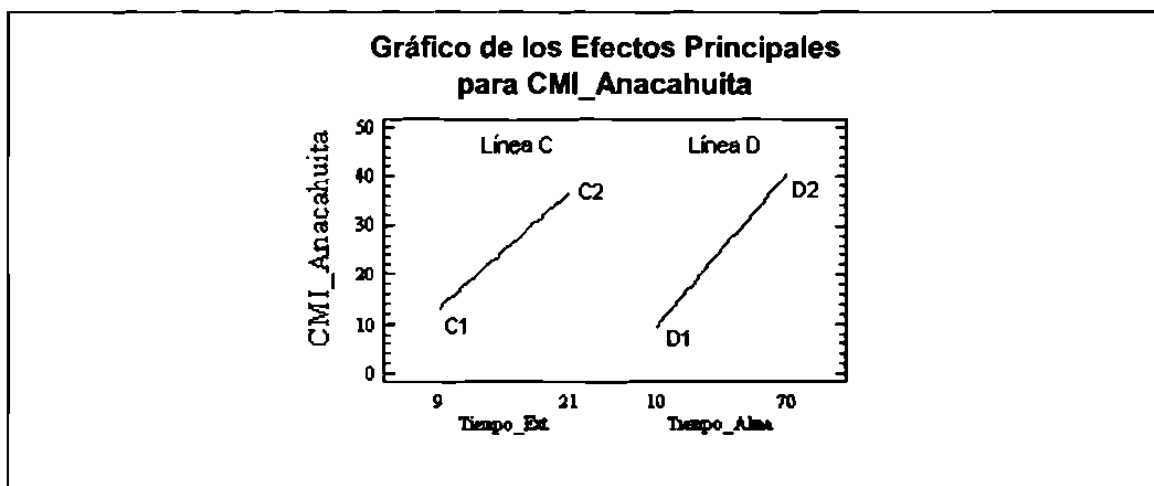


Figura 10. Gráfico de los Efectos Principales para la CMI de *Cordia boissieri* (Anacahuita).

En la tabla XXI se muestran los coeficientes y la ecuación de regresión para la CMI de *C. boissieri*, donde los valores de los factores se encuentran especificados en sus unidades originales (tiempo de almacenamiento en días, tiempo de extracción en minutos).

Tabla XXI. Coeficientes y Ecuación de Regresión para la CMI de *Cordia boissieri* (Anacahuita).

Coeficientes de regresión para CMI_Anacahuita	
Constante	= 7.57913
C:Tiempo_Ext	= -0.216701
D:Tiempo_Alma	= -0.292823
CD	= 0.0542535
Ecuación de regresión:	
$\text{CMI\_Anacahuita} = 7.57913 - 0.216701 * \text{Tiempo\_Ext} - 0.292823 * \text{Tiempo\_Alma} + 0.0542535 * \text{Tiempo\_Ext} * \text{Tiempo\_Alma}.$	

#### 4.6.3.3. Optimización

Con el fin de conocer los niveles con los que se obtendrían valores de CMI más pequeños, se realizó la optimización del DOE con la ayuda del software, la cual es mostrada a continuación. En la figura 11 se muestra el gráfico de superficie de respuesta estimada, realizado con los factores que resultaron significativos: tiempo de extracción y tiempo de almacenamiento. Finalmente se muestran los valores sugeridos como óptimos para la obtención de extractos con mayor actividad antimicrobiana.

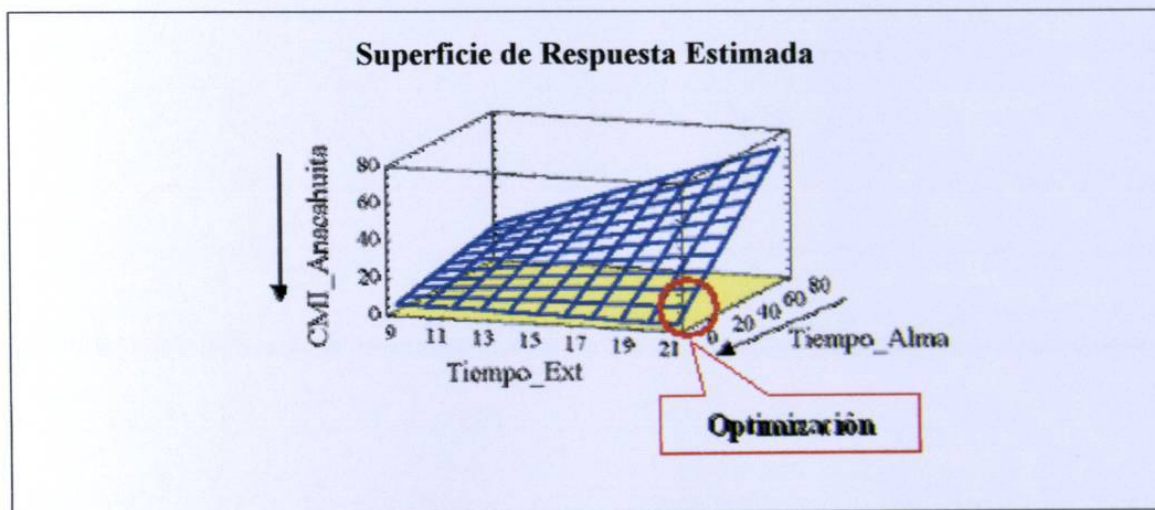


Figura 11. Gráfico de Superficie de Respuesta Estimada

**Tabla XXII. Niveles con los que se Obtendría el Valor Óptimo de CMI.**

Optimización de la respuesta.  
La meta es: **Minimizar la CMI**

<b>Factor</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Óptimo</b>
<b>Tiempo de Extracción</b>	3 min	21 min	21 min
<b>Tiempo de Almacenamiento</b>	1 día	70 días	1 día

**Valor óptimo de la variable de respuesta (CMI mínimo) = 3.87  $\mu\text{g/mL}$**

## CAPÍTULO 5

### DISCUSIÓN

El presente trabajo fue realizado en dos partes; la primera de ellas fue la fase previa al Diseño de Experimentos (DOE), en la cual se realizaron extracciones de diferentes plantas usando diversos solventes extractantes; cada una de las extracciones se planearon para ser realizadas bajo las mismas condiciones de trabajo, de manera que se lograran obtener resultados de actividad antimicrobiana representativos de cada extracto, que permitiera comparar objetivamente los resultados obtenidos. En la segunda parte del estudio, se realizó el Diseño de Experimentos (DOE) utilizando análisis factorial fraccional a dos niveles (Método de *Plakett y Burman*), en el que los niveles (bajo y alto) de cada variable, estuvieron definidos en base a las extracciones realizadas en la primera fase del trabajo (nivel medio).

## PARTE I: Fase Previa al Diseño de Experimentos

### 5.1. Selección del Material Biológico

Estudios previos realizados durante la tesis doctoral de Pérez L. Alejandro en el Departamento de Química Analítica, nos permitieron seleccionar tres plantas para este estudio en base a la actividad antimicrobiana que presentaron sus extractos metanólicos contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilina.

Dicha actividad antimicrobiana, medida en CMI, fue de 500 µg/mL para la raíz de *Cyperus alternifolius*, 500 µg/mL para el fruto de *Schinus molle* y 250 µg/mL para las hojas de *Cordia boissieri*. De esta forma, las plantas se seleccionaron en función del microorganismo contra el que presentaron actividad; sin embargo, en este tipo de estudios es importante contar con un control negativo que sirva de referencia al momento de comparar los resultados. Dado que las hojas de *Leucophyllum frutescens* no mostraron actividad antimicrobiana contra la cepa de *Staphylococcus aureus* resistente, fue considerada el control negativo en el presente estudio (Pérez L. Alejandro, 2003).

Además en esta fase previa al DOE se trabajó también con distintas partes de las plantas, a saber: hojas de *L. frutescens* y de *C. boissieri*, raíces de *C. alternifolius* y frutos de *S. molle*, de tal manera que los resultados no fueran dependientes de la naturaleza del material original.

Las cuatro plantas seleccionadas se encuentran con cierta abundancia en el Noreste de México y además, son plantas ampliamente usadas en medicina tradicional para tratar enfermedades respiratorias.

## **5.2. Extracciones del Material Seco**

La elección de los solventes se realizó bajo diferentes criterios:

De acuerdo a lo previamente descrito en los antecedentes, en un estudio realizado por Eloff, J. N., la acetona se encuentra reportada como el mejor solvente para la obtención de extractos con actividad antimicrobiana; hecho que sin duda causó confusión en diversos grupos de investigadores, ya que este solvente tiende a catalizar reacciones de degradación. Debido a este hecho, la acetona fue elegida como uno de los solventes de prueba en el presente estudio.

El etanol y el metanol se eligieron debido a que son los solventes mayormente usados en el monitoreo de plantas con actividad antimicrobiana, por su excelente capacidad para extraer sustancias tanto lipídicas como hidrosolubles.

Por su parte, las soluciones hidroalcohólicas se incluyeron con el fin de evaluar el efecto del agua al aumentar la polaridad y conocer si su adición mejora o no el proceso de extracción.

La razón de haber seleccionado al agua como uno de los solventes extractantes, se debió principalmente, a que es en forma de té como la gente hace uso de la mayoría de las plantas con fines terapéuticos.

Con el fin de que al obtener los resultados de actividad antimicrobiana, las variables entre los extractos fuera únicamente el solvente usado para extraer los principios activos y la planta sujeta a la extracción, las extracciones realizadas con acetona, metanol, etanol, metanol:agua (80:20) y etanol:agua (90:10), se llevaron a cabo de forma idéntica.

Una vez que los extractos se encontraban secos, después de permanecer en la pistola de desecación, y antes de ser almacenados para su posterior evaluación de la actividad biológica, fueron pesados en tubos eppendorf previamente tarados, para conocer el porcentaje de recuperación obtenido en cada una de las extracciones realizadas.

Como puede observarse en la tabla VII, se obtuvieron porcentajes de recuperación muy variables, aún tratándose de la misma planta; así en el caso de las extracciones a partir de las hojas de *L. frutescens*, se encontraron porcentajes de recuperación que van de un 11.5 % hasta valores por debajo del 1 %, demostrándose de esta forma que cada solvente presenta diferente rendimiento en el proceso de extracción; esto es de gran importancia en el trabajo con productos naturales, ya que normalmente, las cantidades extraídas son muy pequeñas.

También es notorio a partir de la tabla VII que con los extractos acetónicos se obtuvieron los menores porcentajes de recuperación. Por otro lado, los solventes que mostraron mayor eficiencia en el proceso de extracción, con respecto a los porcentajes de recuperación obtenidos, fueron las dos soluciones hidroalcohólicas y el agua a ebullición.



### 5.3. Evaluación de la Actividad Biológica

El propósito de este estudio fue la realización de un monitoreo general de las condiciones de trabajo para extraer metabolitos secundarios de plantas que presenten actividad antimicrobiana. Se seleccionó la cepa resistente de *S. aureus* debido a que este microorganismo ha resultado de fácil monitoreo, de crecimiento rápido y principalmente debido a que en los estudios previos realizados, se comprobó que los extractos metanólicos de las partes de las plantas elegidas presentaron actividad antimicrobiana contra esta cepa resistente, siendo ésta la actividad biológica que se evaluó en el presente estudio.

La técnica de Microdilución en placa es una prueba de inspección visual la cual es de utilidad para indicar el crecimiento bacteriano.

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se define como la concentración mínima a la cual no se observan señales de crecimiento de las bacterias. Para determinar el valor de CMI se hizo uso del indicador de Alamar Azul el cual al momento de revelar las placas fue indicativo de la viabilidad o la no viabilidad de las bacterias. Si el colorante permanecía azul, es decir en su estado oxidado, fue indicativo de que el crecimiento de las bacterias se encontraba inhibido. Si el colorante era reducido se presentaba viraje a un color rosa intenso lo cual indicó que las bacterias permanecían vivas.

No se encontraron referencias bibliográficas en cuanto al punto de corte adecuado para considerar si un extracto es activo o no es activo para este tipo de microorganismo; por lo que se tomaron como base los estudios previos realizados en

nuestro laboratorio; se estableció el punto de corte usado para estas pruebas de actividad biológica, el cual fue de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , de forma que los extractos que a esa concentración presentaron viraje del indicador, se consideraron no activos (NA).

En la figura 5 se ejemplifica una de las placas de los bioensayos realizados correspondiente a los extractos de *S. molle*. Es notorio como cuatro de los seis extractos, los numerados como 7, 8, 10 y 11 mostraron actividad antimicrobiana, todos con un valor de CMI de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Al mismo tiempo en los carriles correspondientes a los extractos 9 y 12 se observó un color rosa intenso, por lo que de acuerdo con el criterio general usado en nuestro laboratorio, estos extractos fueron considerados sin actividad antimicrobiana.

En la tabla VIII se observa que para el caso de los extractos de *C. boissieri* con los distintos solventes de extracción, los valores de CMI obtenidos varían entre 31.25 y 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Esto demuestra que el solvente de extracción influye en la actividad antimicrobiana del extracto obtenido.

Así mismo, se destaca que la actividad biológica de los extractos acetónicos de las cuatro plantas estudiadas fue la más baja.

#### **5.4. Análisis de los Extractos Activos por Cromatografía en Capa Fina**

Se llevó a cabo el análisis de los extractos activos por Cromatografía en Capa Fina por ser éste el tercer criterio establecido para la selección del solvente de extracción más adecuado. Los resultados son mostrados en las tablas IX, X, XI y XII. El

primer sistema de elución utilizado fue el éter de petróleo con el cual no se observó separación en ninguno de los extractos, por lo que este sistema de elución no fue adecuado para este tipo de extractos; esto sugiere además, la ausencia de compuestos no polares en los extractos evaluados. Con la mezcla de éter de petróleo + acetato de etilo (10:1) se observó separación pero solo con cuatro del total de extractos evaluados. Esto sirvió para saber que se debía disminuir la proporción de éter de petróleo en la mezcla, por lo que se utilizó el tercer sistema de elución que fue éter de petróleo + acetato de etilo (3:1) con el cual se observó separación en los 14 extractos activos probados. Este hecho permitió considerar que al disminuir la proporción de éter de petróleo en la mezcla, y por lo tanto aumentar la polaridad de la misma, hay una mejor separación de los compuestos presentes en los extractos evaluados. Éstos datos se muestran en la tabla X. El último sistema de elución usado fue el acetato de etilo con el cual se observó separación de los 14 extractos evaluados.

### **5.5. Selección del Solvente de Extracción más Adecuado**

El criterio para seleccionar el solvente más adecuado fue en primer lugar la actividad antimicrobiana (menor valor de CMI), por ser ésta la actividad biológica en evaluación.

En caso de contar con extractos que presentaran el mismo valor de CMI, se procedería a considerar el segundo criterio de selección, el cual fue el porcentaje de recuperación de esos extractos.

Postulamos, además, un tercer criterio de selección, el cual sólo llegaría a usarse en el caso de contar con extractos que presentaran el mismo valor de CMI y el

mismo o muy parecido porcentaje de recuperación. En este tercer criterio consideraríamos el número de manchas obtenidas por medio de la técnica de CCF: cuantas menos manchas fueran observables a partir de un extracto biológicamente activo, existe mayor probabilidad de que se encuentre concentrado en ese extracto el o los compuestos responsables de la actividad buscada.

Tomando en cuenta el primer criterio de selección, los extractos obtenidos a partir de las hojas de *C. boissieri* con metanol, etanol y etanol:agua (90:10) presentaron el menor valor de CMI, que fue de 31.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . De esta manera recurrimos al segundo criterio de selección y de acuerdo a los resultados mostrados en la tabla VII, de estos tres solventes, la solución hidroalcohólica de etanol:agua (90:10) fue el que registró el mayor porcentaje de recuperación con un valor de 8.07 %. Con estos dos criterios, fue posible tomar la decisión del solvente a utilizar para la fase del Diseño de Experimentos, que fue la solución hidroalcohólica de etanol:agua en proporción 90:10.

Según lo planeado inicialmente, el DOE se realizaría únicamente con una de las plantas utilizadas en la fase previa al DOE, así como con un solo solvente de extracción. Sin embargo, consideramos que el contar con un DOE realizado con dos plantas daría mayor relevancia a los resultados de éste, por lo que se seleccionó también el fruto de *S. molle* para el DOE. El solvente de extracción usado para esta planta fue el metanol, el cual se eligió utilizando los mismos criterios de selección antes mencionados, mismos que se aprecian en la tabla XIV.

En la tablas VIII y XIV se observa que los cuatro extractos de *S. molle* que mostraron actividad antimicrobiana contra la cepa de *S. aureus* presentaron el mismo valor de CMI el cual fue de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , de forma que se procedió a considerar el

segundo criterio de selección, correspondiente al porcentaje de recuperación (tablas VII y XIV). Como puede observarse, la solución hidroalcohólica de etanol:agua (90:10) presentó el mayor porcentaje de recuperación; sin embargo, consideramos importante que en el DOE se incluyeran dos solventes diferentes y debido a que este solvente ya había sido seleccionado para las hojas de *C. boissieri*, se eligió al metanol para extraer al fruto de *S. molle* por presentar un porcentaje de recuperación muy similar al obtenido con etanol:agua (90:10).

## **PARTE II: Diseño de Experimentos**

### **5.6. Diseño de Experimentos**

El Diseño de Experimentos se llevó a cabo por medio del software STATGRAPHICS Plus versión 5.0.

Un “experimento diseñado” se compone básicamente de 4 partes:

- **Diseño:** Con el cual se definen cuáles son las condiciones para cada ensayo. En este caso se seleccionó un diseño de dos niveles (+1 y -1) para cada uno de los factores.
- **Desarrollo del trabajo experimental:** Que consiste en correr los ensayos bajo las condiciones diseñadas.

- **Análisis:** Por medio del cual se identifican los factores que tienen efecto sobre la variable de respuesta (en este caso CMI) y se descartan todas aquellas variables que no tuvieran efecto significativo.
- **Optimización:** Una vez que se conocen los factores que tienen efecto sobre la variable de respuesta, se encuentran las condiciones (valores) ideales, para obtener la respuesta deseada.

Debido a que la variable de respuesta es la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), se entiende que a menor valor de CMI, se trata de un extracto con mayor actividad antimicrobiana y viceversa.

Un análisis factorial  $2^4$  completo está compuesto de 16 combinaciones diferentes, es decir, de 16 extracciones realizadas combinando todos los factores a ambos niveles. Al seleccionar solamente la mitad de las combinaciones posibles (media fracción), lo que ocurre es que el análisis no arroja directamente el efecto de las interacciones, sino de combinaciones de ellas<sup>1</sup>. A diferencia de las interacciones (AB, AC, AD, BC, BD, CD), el efecto de los factores individuales (A, B, C, D) se obtiene directamente del análisis<sup>2</sup>, garantizando la robustez del diseño y una sencilla interpretación de los resultados.

---

<sup>1</sup> Véase la figura 8 y la tabla 19: la interacción de "A y B" se *suma* con la interacción de "C y D" para mostrarse en una misma barra y renglón, lo mismo ocurre con los otros pares de interacciones.

<sup>2</sup> Véase la figura 8 y la tabla 19: los efectos de A, B, C y D, se presentan en barras y renglones separados.

Como se comentó en la sección 3.2.6, fue incluida una combinación en la que se trabajó con los niveles medios de cada uno de los factores, esto es conocido como un punto central y valioso para el diseño porque involucra las condiciones originales de trabajo y por lo tanto, de partida.

La importancia de haber realizado adecuadamente las extracciones en la fase previa del DOE radicó en que nos permitió evaluar lo que químicamente iba a ser factible realizar en el laboratorio para el DOE; de esta manera se eligieron valores de cada nivel (alto y bajo) congruentes para cada uno de los cuatro factores. La selección de los niveles bajo y alto, se realizó considerando que la distancia que debe existir entre el nivel medio (de partida) y el nivel bajo, debe ser la misma que la que exista entre el nivel medio (de partida) y el nivel alto; es decir, la diferencia de unidades entre uno y otro nivel debe ser equidistante con respecto al nivel medio.

#### **5.6.1. Trabajo Experimental: Extracciones del Material Seco.**

De la misma forma que en la fase previa del DOE, cada una de las combinaciones fue realizada con tres extracciones seriadas; se filtró entre cada una de ellas y el volumen final obtenido se juntó para proceder a la evaporación del solvente.

Como fue mencionado anteriormente, el volumen total de solvente en la fase previa al DOE correspondió a 20 mL, la primera extracción se realizó con 10 mL (el cual equivale a la mitad del volumen total) y las otras dos extracciones con 5 mL de solvente cada una.

Para la extracción correspondiente al volumen de solvente a un nivel bajo (13 mL), la primera de las tres extracciones se realizó usando un volumen de 6.5 mL, el cual equivale a la mitad del volumen total, mientras que para las dos extracciones subsecuentes el volumen usado fue de 3.25 mL respectivamente. De la misma forma, para el caso de las extracciones realizadas con un volumen de solvente a un nivel alto (27 mL), la primera de las extracciones se llevó a cabo con 13.5 mL que también equivale a la mitad del volumen total, mientras que las otras dos extracciones se hicieron con un volumen de 6.75 mL cada una.

Con respecto al tiempo de extracción, también fue necesario dividir el tiempo total en tres, correspondiendo al tiempo que duró cada una de las tres extracciones. De esta forma, para un tiempo total a nivel bajo (9 min), cada una de las extracciones se realizó en 3 minutos. En el caso del tiempo total a nivel alto (21 min), el tiempo que duró cada una de las tres extracciones, fue de 7 minutos; esto con el objetivo de conservar el procedimiento realizado en la fase previa del DOE, en el cual, para un tiempo total de 15 minutos, se realizaron tres extracciones de 5 minutos cada una. Los tiempos fueron medidos con cronómetro.

Las velocidades de extracción así como los tiempos de almacenamiento, correspondieron a los previamente descritos en la tabla IV, según la combinación específica.

Como se aprecia en la tabla XVII hay coincidencia en la combinación de factores que dan el mayor y el menor porcentaje de recuperación para ambas plantas.



### 5.6.2. Evaluación de la Actividad Biológica

En la tabla XVIII se presentan los valores de CMI de cada uno de los extractos obtenidos aplicando el DOE tanto para *C. boissieri* como para *S. molle*. En primer lugar se puede observar que los valores de CMI de *C. boissieri* son muy buenos en términos de actividad antimicrobiana; además de que existe gran variabilidad con los extractos obtenidos en diferentes condiciones: se presentan valores desde 7.8 hasta 62.5 µg/mL. Para esta misma planta, se observa que los extractos con mayor actividad antimicrobiana se obtuvieron cuando se estableció el factor de tiempo de almacenamiento en su nivel bajo (-1): 10 días. Esta misma tendencia se observa en los resultados obtenidos para *S. molle*. Sin embargo, es notorio como esta planta no presentó actividad antimicrobiana a 500 µg/mL en la mayor parte de los experimentos realizados y debido a los pocos datos que se pudieron recavar para tales extractos, el análisis estadístico no fue factible.

En las figuras 6 y 7 se ejemplifican dos de las placas de los bioensayos realizados a los extractos de *C. boissieri* después de 10 y 70 días de almacenamiento. Es notorio como a menor tiempo de almacenamiento, los extractos presentaron mayor actividad antimicrobiana.

### 5.6.3. Análisis Estadístico

Debido a lo señalado en la sección anterior (5.6.2.), esta parte estará referida en su totalidad solo a los resultados obtenidos para las hojas de *Cordia boissieri*.

Todos los gráficos mostrados se encuentran identificados con el nombre común de la planta para efectos de simplicidad.

#### **5.6.3.1. Efecto de cada uno de los Factores y sus Interacciones**

Para conocer cuáles factores e interacciones entre ellos influyeron en el proceso de extracción para la obtención de una mayor actividad antimicrobiana, fue necesario realizar un gráfico de pareto tal y como se muestra en la figura 8. En este gráfico se observa cuáles de los factores evaluados presentaron efecto estadísticamente significativo en función de la CMI obtenida en cada una de las combinaciones realizadas. Cada una de las barras horizontales, representa a cada uno de los cuatro factores evaluados y a la combinación de éstos. El factor volumen de solvente (Vol\_Solv) está identificado con la letra A; el factor velocidad de extracción (Vel\_Ext) con la letra B; el factor tiempo de extracción (Tiempo\_Ext) con la letra C y el factor tiempo de almacenamiento (Tiempo\_Alma) con la letra D. Las interacciones de los factores se indican como AB, AC, AD, BC, BD, CD.

Uno de los puntos más importantes a considerar en este gráfico es el tamaño que tiene cada una de las barras, ya que éste indica la magnitud del efecto. A mayor tamaño de la barra, mayor es el efecto de ese factor sobre la variable en estudio (en este caso CMI). Las barras se encuentran ordenadas de mayor a menor tamaño, es decir, en orden de importancia. Para considerar si alguno de los factores es estadísticamente significativo, se observó la línea transversal color naranja, de modo que las barras que sobrepasan esta línea, representan los factores cuyo efecto resulta ser estadísticamente significativo, con un 95% de confianza. De esta forma, se observa que los factores que

mostraron efecto sobre la actividad antimicrobiana son el tiempo de almacenamiento (D) y el tiempo de extracción (C), así como la interacción de ambos factores (CD). Cabe señalar que a pesar de que la interacción indicada como "AB + CD" involucra a los otros dos factores: volumen de solvente (A) y velocidad de extracción (B), fue descartado el efecto que la interacción AB pudiera tener, ya que de forma individual no mostraron efecto estadísticamente significativo.

Otro aspecto que se observa en la figura 8 es acerca de los efectos positivo y negativo de cada uno de los factores evaluados. Las barras en color azul representan a los factores con efecto positivo. Esto significa que al aumentar ese factor en particular, por ejemplo el tiempo de almacenamiento (que aparece en color azul), se aumenta directamente la variable de respuesta medible, es decir la CMI y por lo tanto se disminuye la actividad antimicrobiana. De esta forma se sabe que si el objetivo es disminuir la CMI de algún extracto, se deberá trabajar con los tiempos de almacenamiento a niveles bajos. Este mismo caso se aplica al factor de tiempo de extracción y a la interacción de ambos.

Por otro lado, el color amarillo indica efecto negativo de los factores, como es el caso del volumen de solvente. En este ejemplo, el efecto negativo se interpreta de la siguiente forma: al disminuir el volumen de solvente, se disminuye la CMI y por lo tanto se aumenta la actividad antimicrobiana, siendo éste el objetivo buscado. Sin embargo, para este caso en particular no se pudo aplicar esta afirmación ya que el factor volumen de solvente no tiene efecto significativo, como se mencionó anteriormente. De esta manera, un análisis

detallado de este gráfico de pareto, permite conocer no solo cuáles factores están involucrados en la obtención de una mayor actividad antimicrobiana, sino también decidir si es conveniente trabajar con niveles bajos o altos de los factores que hayan tenido efecto estadísticamente significativo.

En la tabla XIX se muestra la prueba de significancia estadística de los factores por medio de un Análisis de Varianza (ANOVA), esto es complementario a la figura 8; se presentan todos los factores evaluados y sus efectos con respecto a la CMI de las hojas de *C. boissieri* (Anacahuita).

La significancia estadística de cada factor se obtiene al comparar el Cuadrado Medio (*Mean Square*) contra un Estimado del Error Experimental. Matemáticamente, la suma de cuadrados de cada factor indica cuanta variabilidad introduce la “variación de ese factor específico” en la variable de respuesta que es la CMI. La figura 8 se graficó con la suma de cuadrados de forma estandarizada, representada por cada una de las barras horizontales. En este caso, 3 efectos presentaron valores-P (*P-values*) menores del 0.05, indicando que afectan significativamente la actividad antimicrobiana con un nivel de confianza del 95.0%. Como fue explicado para la figura 8, estos efectos fueron:

El tiempo de almacenamiento (D)

El tiempo de extracción (C)

La interacción entre ellos (CD)

El resto de los factores presentaron valores-P (*P-values*) mayores que 0.05, por lo que se infiere que no tienen efecto significativo sobre la variable de respuesta. Con el estadístico R-cuadrada se indicó que el 97.6% de la variabilidad de la CMI de Anacahuita se explica con los factores: tiempo de extracción y el tiempo de almacenamiento. El estadístico R-Cuadrada Ajustado, el cual es aún más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, fue de 96%. El Error Estándar del Estimado muestra la desviación estándar de los residuales el cual fue de 4.6. El Error Absoluto de la Media (*Mean Absolute Error –MAE-*) con un valor de 2.9, indicó el valor promedio de los residuales.

#### **5.6.3.2. Efecto de los Factores Estadísticamente Significativos en la Actividad Antimicrobiana**

Al remover los factores volumen de solvente y velocidad de extracción (los cuales no resultaron estadísticamente significativos en el primer ANOVA realizado), se obtuvo un gráfico como el mostrado en la figura 9, en el cual solamente se muestra el efecto que presenta cada factor estadísticamente significativo en los resultados de actividad antimicrobiana. De esta forma sólo se aprecian las tres barras correspondientes al factor tiempo de extracción (representado por la letra C), el factor tiempo de almacenamiento (representado con la letra D) y la interacción entre ambos factores (CD). Al igual que en la figura 8, en la figura 9 también se hace evidente que las barras se encuentran localizadas de mayor a menor tamaño y por lo tanto, de mayor a menor importancia es su efecto sobre la variable de respuesta. Por lo que sin duda, el factor más importante para la obtención de una menor CMI fue el tiempo de

almacenamiento. En esta figura se observa también el efecto positivo sobre la CMI (barras de color azul).

Es importante mencionar que el efecto que presentó el factor tiempo de almacenamiento fue comprobado también al comparar los resultados obtenidos en los estudios previos realizados durante la tesis doctoral de Pérez L. Alejandro con los resultados obtenidos en nuestro trabajo: en el caso de los estudios previamente realizados, el valor de CMI de los extractos metanólicos de *C. boissieri* fue de 250  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que en nuestro trabajo se obtuvo un valor de 31.25  $\mu\text{g/mL}$  (tabla VIII). Esta diferencia se atribuye a que Pérez L. Alejandro probó la actividad antimicrobiana un año después de haber realizado el extracto, mientras que en nuestro caso, el tiempo de almacenamiento fue de tres meses en la fase previa al DOE (Pérez L. Alejandro, 2003).

La tabla XX proporciona información complementaria a la obtenida por medio del gráfico de Pareto de la figura 9. Al igual que la tabla XIX, la tabla XX muestra el ANOVA realizado para conocer el efecto de los factores que resultaron ser estadísticamente significativos con respecto a la variable de respuesta. Por medio de este ANOVA se comprobó la significancia estadística de cada uno de los factores al comparar el Cuadrado Medio (*Mean Square*) contra un Estimado del Error Experimental. Es notorio como los dos factores y su interacción (CD) presentaron valores-P (*P-values*) menores al 0.05, con lo cual se comprobó que estos factores afectan significativamente la actividad antimicrobiana con un nivel de confianza del 95.0%. Con el estadístico R-cuadrada se indicó que el 96.86% de la variabilidad de la CMI de Anacahuita se explica con el tiempo de extracción y el tiempo de almacenamiento. El

estadístico R-Cuadrada Ajustado, el cual es aún más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, fue de 96.2%. El Error Estándar del Estimado muestra la desviación estándar de los residuales el cual fue de 4.4. El Error Absoluto de la Media (*Mean Absolute Error –MAE-*) con un valor de 3.02, indicó el valor promedio de los residuales.

La figura 10 proporciona información complementaria a la obtenida en la figura 9. Ambas pendientes son positivas, indicando una relación directamente proporcional entre la CMI y el tiempo de extracción; igualmente entre la CMI y el tiempo de almacenamiento. Como puede observarse, la pendiente que mostró inclinación ligeramente mayor, fue la correspondiente al factor del tiempo de almacenamiento, indicando una vez más que este factor tiene mayor efecto en el proceso de extracción para la obtención de CMI más bajas.

La línea C se construyó a partir de los siguientes puntos:

- Punto C1: valor promedio de CMI para los ensayos en que el tiempo de extracción fue bajo (9 minutos): ensayos # 1, 21, 23, 3, 2, 22, 24, 4.
- Punto C2: valor promedio de CMI para los ensayos en que el tiempo de extracción fue alto (21 minutos): ensayos # 25, 5, 7, 27, 26, 6, 8, 28

La línea D se construyó a partir de los siguientes puntos:

- Punto D1: valor promedio de CMI para los ensayos en que el tiempo de almacenamiento fue bajo (10 días): ensayos # 1, 3, 5, 7, 2, 4, 6, 8.
- Punto D2: valor promedio de CMI para los ensayos en que el tiempo de almacenamiento fue alto (70 días): ensayos # 21, 23, 25, 27, 22, 24, 26, 28.

En la tabla XXI se muestran los coeficientes de regresión para la CMI de *C. boissieri*, donde los valores de los factores se encuentran especificados en sus unidades originales.

### 5.6.3.3. Optimización

A menor tiempo de almacenamiento, menor CMI; igualmente, a menor tiempo de extracción, menor CMI. Sin embargo, ya que la interacción "CD" tiene efecto sobre la variable de respuesta, para disminuir el valor de CMI no se requiere disminuir ambos factores, sino encontrar el nivel adecuado para ellos. Conforme al análisis llevado a cabo durante este trabajo, se sabe que el factor clave en este proceso es el tiempo de almacenamiento; además en el laboratorio sería más sencillo aumentar unos minutos el tiempo de extracción, que disminuir los tiempos de almacenamiento.

En la figura 11 se presenta la superficie de respuesta estimada, que involucra a los ejes "x", "y" y "z". Este gráfico, junto con el análisis matemático, nos permitió decidir los niveles a los cuáles trabajar a fin de obtener valores más pequeños de CMI, ya que se pudo observar el efecto que tienen los dos factores estadísticamente significativos actuando simultáneamente sobre la variable de respuesta. Cuando se realiza un DOE y se obtienen resultados interesantes en algún proceso en particular, el objetivo final es normalmente mejorar ese proceso. Para nuestro caso, el proceso evaluado fue la extracción de metabolitos secundarios a partir de plantas en función de la actividad antimicrobiana como variable de respuesta. De esta forma, se pretende llegar a



la obtención de extractos con mayor actividad antimicrobiana o sea menores valores de CMI.

Es importante observar la "forma" que adquiere el gráfico de superficie (se observa que el reflejo en la pared izquierda del cubo está mucho menos inclinado que el reflejo en la pared derecha del cubo y que el reflejo en la pared trasera el cubo está más inclinado que el reflejo en la pared frontal del cubo) y tomar decisiones sobre la optimización a partir de esa "forma" en particular. Si la interacción entre los factores no afectara a la variable de respuesta CMI, se hubiera obtenido una superficie "plana", distinta a la apreciada en la figura 11. El efecto de la interacción se expresa matemáticamente por medio del último término de la ecuación de regresión (tabla XXI).

En este gráfico de superficie se observa que para disminuir los valores de CMI, es necesario acercarse lo más posible al plano amarillo, correspondiente a  $CMI = 0$ . Es notorio que el segmento del gráfico en el cual se presenta la pendiente más pronunciada para aproximarse al plano amarillo (minimizar la CMI), corresponde al reflejo de la superficie de respuesta en la pared derecha del cubo.

Con ayuda del software (tabla XXII), se seleccionó un nivel "alto" para el tiempo de extracción y "bajo" para el tiempo de almacenamiento. Este punto (tiempo de extracción = 21 minutos, tiempo de almacenamiento = 1 día,  $CMI = 3.87 \mu\text{g/mL}$ ), corresponde a la esquina inferior derecha de la superficie de respuesta. Este valor "óptimo" es el valor mínimo posible para CMI dentro de las

condiciones factibles para C y D, y se localiza en la esquina inferior derecha de la superficie (figura 11).

## **CAPÍTULO 6**

### **CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES y PERSPECTIVAS**

#### **6.1. Conclusiones**

1. El solvente de extracción utilizado influye tanto en los porcentajes de recuperación como en la actividad antimicrobiana de los extractos.
2. Tanto el tiempo de extracción como el tiempo de almacenamiento influyen significativamente en la actividad antimicrobiana medida sobre una cepa resistente de *Staphylococcus aureus*.
3. El volumen de solvente y la velocidad de extracción no resultaron ser factores significativos en la obtención de extractos con actividad antimicrobiana.

## 6.2. Recomendaciones

Ya que por lo común el químico espera juntar cierto número de extractos para realizar las pruebas de actividad biológica sin tomar muchas veces en cuenta el tiempo que transcurre entre una extracción y la siguiente, se sugiere como primer punto que se lleve un control adecuado de las fechas de extracción y las pruebas de actividad y por otro lado, que el tiempo de almacenamiento sea lo más corto posible, siendo lo ideal realizar dichas pruebas el mismo día que se realicen las extracciones (o que se obtenga el extracto seco) para evitar que se lleven a cabo reacciones de degradación que sin duda afectarían directamente en los resultados de actividad buscada.

### **6.3. Perspectivas**

1. **Afinar el Diseño de Experimentos realizado para obtener valores menores de CMI según lo propuesto por el programa.**
2. **Trabajar el mismo Diseño de Experimentos con otras plantas y otros microorganismos para aumentar el número de datos obtenidos.**
3. **Realizar un Diseño de Experimentos evaluando las mismas condiciones pero para distintas actividades biológicas.**
4. **Sería de gran utilidad realizar el mismo Diseño de Experimentos pero a escala real, es decir con la cantidad de material vegetal que se utiliza en un estudio fitoquímico, ya que permitiría determinar los tiempos de extracción y de almacenamiento ideales para la extracción de metabolitos secundarios en casos específicos.**

## BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal Shrutidevi, Sunil Narisetty, Babu Anand, Lal Chaman, Panchagnula Ramesh. Antituberculosis Drugs and New Drug Development. Current Opinion in Pulmonary Medicine. 7. 2001. 142-147.
- Aguilar-Contreras Abigail, Camacho-Pulido Juan Raúl, Chino-Vargas Soledad, Jacques-Ríos Patricia. Las Plantas Medicinales del Herbario del IMSS. Su distribución por Enfermedad. IMSS-Roche. 1ª Ed. 1998. 11-12.
- Antoun M., Ramos Z., Vazques J., Oquendo I., Proctor G., Gerena L., Franzblau S. Evaluation of the Flora of Puerto Rico for *in vitro* Antiplasmodial and Antimycobacterial Activities. Phytotherapy Research. 15. 2001. 638-642.
- Box George; Hunter William; Hunter, Stuart. Estadística para investigadores. España. Primera Edición. Editorial Reverté, S.A. 2001. 385-409.
- Bruneton J. Farmacognosia. España. Segunda Edición. Editorial ACRIBIA, S.A. 2001. 201, 227, 634-637.
- Cantrell C., Fischer N., Urbatsch L., McGuire M., Franzblau S. Antimycobacterial Crude Plant Extracts from South, Central, and North America. Phytomedicine. 5. N° 2. 1998. 137-145.
- Dawson-Saunders B., Trapp R. Biestadística Médica. México. Segunda Edición. Editorial El Manual Moderno. 1999. 103, 122, 383.
- Dimayuga Encarnación, Virgen M., Ochoa N. Antimicrobial Activity of Medicinal Plants from Baja California Sur (México). Pharmaceutical Biology. 36. N° 1. 1998. 33-43.

- Eloff J. N. Which Extractant Should be use for the Screening and Isolation of Antimicrobial Components from Plants?. *Journal of Ethnopharmacology*. 60. 1998. 1-8.
- Frame Anne, Ríos-Olivares Eddy, Ortiz Damaris, Pagán Juan, Méndez Sandro. Plants from Puerto Rico with Anti-*Mycobacterium tuberculosis* Properties. *PRHSJ*. 17. N° 3. 1998. 243-252.
- Harvey Alan. Strategies for Discovering Drugs from Previously Unexplored Natural Products. *Drugs Discovery Today*. 5. N° 7. 2000. 294-299.
- Hasso Helmut. Herbalism. Medical Marriage. Inglaterra. Findhorn Press. 1997. 1-14.
- Hosler Denise, Mikita Michael. Ethnobotany: The Chemist's Source for the Identification of Useful Natural Products. *Journal of Chemical Education*. 64. 4. 1987. 328-331.
- Huie Carmen. A Review of Modern Sample-Preparation Techniques for the Extraction and Analysis of Medicinal Plants. *Anal Bioanal Chem*. 373. 2002. 23-30.
- Jorgensen J., Turnidge J., Washington J. Antibacterial Susceptibility Tests: Dilution and Disk Diffusion Methods. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology. 118. 1999. 1527-1529.
- Lall N, Meyer J. In vitro Inhibition of Drug-Resistant and Drug-Sensitive Strains of *Mycobacterium tuberculosis* by Ethnobotanically Selected South African Plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 66. 1999. 347-354.
- Matthews Hazel, Lucier George, Fisher Kenneth. Medicinal Herbs in the United States: Research Needs. *Enviromental Health Perspectives*. 107. N° 10. 1999. 1-6.

- Molina-Salinas G., Becerril P., Said-Fernández S., Waksman N. Antimycobacterial Screening of Crude Extracts Obtained from Medical Plants Growing in Northeast México Using a Native Resistant Strain. 50<sup>th</sup> Annual Congress of Society for Medicinal Plant Research. Barcelona, España. 2002.
- Navarro Víctor, Rojas Gabriela, Delgado Guillermo, Lozoya Xavier. Antimicrobial Compounds Detected in *Boconia arborea* Extracts by a Direct Bioautographic Method. Archives of Medical Research. 29. N° 2. 1998. 191-194.
- Navarro Víctor, Villarreal María, Rojas Gabriela, Lozoya Xavier. Antimicrobial Evaluation of Some Plants Used in Mexican Traditional Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. Journal of Ethnopharmacology. 53. 1996. 143-147.
- Newton Sandra, Lau Clara, Gurcha Sudagar, Besra Gurdyal, Wright Colin. The Evaluation of Forty-three Plant Species for in vitro Antimycobacterial Activities; Isolation of Active Constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria canadensis*. Journal of Ethnopharmacology. 79. 2002. 57-67.
- Orioll Valls, Del Castillo Benito. Técnicas Instrumentales en Farmacia y Ciencias de la Salud. Edición Mexicana. Universidad Autónoma Metropolitana. 2002. 572.
- Pérez L. Alejandro. Actividad Antimicrobiana de Extractos de Plantas del Noreste de México contra *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*. Revista de la Sociedad Química de México. XXXVIII Congreso Mexicano de Química. 47. 2003. 152.
- Phillipson David. Phytochemistry and Medicinal Plants. Phytochemistry. 56. 2001. 237-243.
- Rates S. Plants as a Source of Drugs. Toxicon. 39. 2001. 603-613.



Rojas Gabriela, Lévaro Juan, Tortoriello Jaime, Navarro Víctor. Antimicrobial Evaluation of Certain Plants Used in Mexican Traditional Medicine for the Treatment of Respiratory Diseases. Journal of Ethnopharmacology. 74. 2001. 97-101.

Salvat A., Antonnacci L., Fortunato R., Suárez E., Godoy H. Screening of some Plants from Northern Argentina for their Antimicrobial Activity. Letters in Applied Microbiology. 32. 2001. 293-297.

Tona L., Kambu K., Cimanga K., Vlietinck A. Antiamoebic and Phytochemical Screening of some Congolese Medicinal Plants. Journal of Ethnopharmacology. 61. 1998. 57-65.

Tshibangu Jeannette, Chifundera Kusamba, Kaminsky Ronald, Wright Anthony, König Gabriele. Screening of African Medicinal Plants for Antimicrobial and Enzyme Inhibitory Activity. Journal of Ethnopharmacology. 80. 2002. 25-35.

WHO, 1998. WHO: Global Tuberculosis Programme. Global tuberculosis control. WHO report. <http://www.who.int/gtb/publications>.

WHO, 1999: <http://www.who.int/infectious-disease-report>.

Williamson Elizabeth, Okpako David, Evans Fred. Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material. Inglaterra. John Wiley and Sons. Volúmen 1: Pharmacological Methods in Phytotherapy Research. 1996.1-22.

<http://personal.redestb.es/martin/pfito.htm>

## **RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO**

**Marcela del Carmen Orozco Hayek**

**Candidato para el Grado de**

**Maestro en Ciencias con Orientación Terminal en Química Biomédica**

**Tesis: ELECCIÓN DE LAS CONDICIONES MÁS ADECUADAS PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PLANTAS SUPERIORES CON ACTIVIDAD SOBRE UNA CEPA DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE**

**Área de Estudio:** Química Analítica

### **Biografía:**

**Datos Personales:** Nacida en Coatzacoalcos, Veracruz, el 17 de Mayo de 1975, hija de Juan José Orozco Márquez y Ma. del Carmen Hayek Domínguez.

**Educación:** Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, grado obtenido de Químico Farmacéutico Biólogo en 1997.

**Experiencia Profesional:** Practicante en el departamento de Aseguramiento de Calidad en el área de Química Analítica de Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma, S.A. de Febrero de 1997 a Febrero de 1998. Químico en Validación en el departamento de Validación y Desarrollo de Representaciones e Investigaciones Médicas, S.A. de C.V. en la ciudad de Guadalajara, Jal., de Mayo de 1998 a Junio de 1999. Personal profesional no docente del 2002 al 2003 en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León; con participación en el curso de prácticas de Física.

**Reconocimientos:** Mención Honorífica como segundo lugar de los egresados de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A.N.L. en 1997. Reconocimiento público a la Excelencia Académica, otorgado por la Federación de Colegios Profesionales del Estado de Nuevo León, A.C. en 1997. Mejor alumno de Maestría en la orientación terminal de Química Biomédica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. en el 2002.



