

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



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

Por

M.C. LUIS ALEJANDRO PEREZ LOPEZ

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

ABRIL, 2005

TD
QR201
.P7
P4
2005
c.1

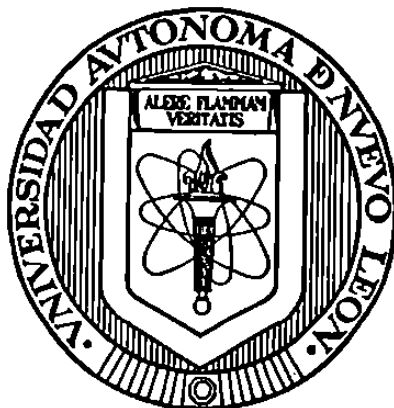
M.C. LUIS ALEJANDRO PEREZ LOPEZ



1080127138

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



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

Por

M.C. LUIS ALEJANDRO PÉREZ LÓPEZ

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

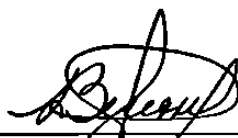
Abril, 2005

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

Aprobación de Tesis:



DRA. NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES
Directora de Tesis



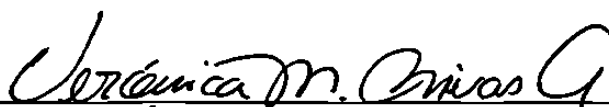
M.C. POLA BECERRIL MONTES
Co-Directora de Tesis



DRA. AZUCENA ORANDAY CÁRDENAS
Co-Directora de Tesis



DR. SALVADOR SAID FERNÁNDEZ
Comisión de Tesis



DRA. VERÓNICA MAYELA RIVAS GALINDO
Comisión de Tesis



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

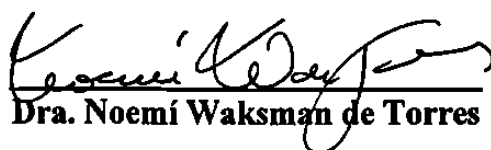
**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS DE PLANTAS
 DEL NORESTE DE MÉXICO CON ACTIVIDAD CONTRA CEPAS DE
 Streptococcus pneumoniae, *Staphylococcus aureus*
 y *Haemophilus influenzae***

Presentado por:

M.C. Luis Alejandro Pérez López

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

DIRECTORA


Dra. Noemí Waksman de Torres

Co-DIRECTORA


M.C. Pola Becerril Montes

Co-DIRECTORA


Dra. Azucena Oranday Cárdenas

DEDICATORIA

Dedico esta tesis con cariño

A mis Padres

Pedro Pérez Gutiérrez y Ma. Alicia López Costilla

y

A mis hermanos

AGRADACEMIENTOS

A Dios

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

En medio de la calle de la ciudad,
y a uno y otro lado del río,
estaba el árbol de la vida,
que produce doce frutos,
dando cada mes su fruto;
y las hojas del árbol
eran para la sanidad de las naciones.

Apocalipsis
22:2

Historia de la medicina

- 2000 A.C. Come un trozo de esta raíz.
- Año 1000 Comer esas raíces es una costumbre pagana. Repite esta plegaria.
- 1850 Esa plegaria es una nueva superstición. Bebe esta poción.
- 1920 Esa poción está preparada con aceite de serpiente. Toma esta pastilla.
- 1945 Esa pastilla es ineficaz. Toma penicilina.
- 1955 ¡Oh! ... los microorganismos han mutado. Toma tetracilina.
- 1960-1999 Otras 39 ¡oh!...Toma este antibiótico más potente.
- 2000 ¡Los microorganismos nos han vencido! Como un trozo de esta raíz.

Anónimo

RESUMEN

M.C. Luis Alejandro Pérez López

Fecha de graduación: Abril, 2005

Universidad Autónoma de Nuevo León
Faculta de Medicina

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

Número de páginas: 150

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

Área de estudio: Química Analítica

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

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

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS


Dra. Noemí Waksman de Torres

ÍNDICE

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

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

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

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

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

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

ÍNDICE DE TABLAS

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

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

139

ÍNDICE DE FIGURAS

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

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

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

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

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

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

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

μmol	Micromolar
%	Por ciento
$^{13}\text{CRMN}$	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
$^1\text{HRMN}$	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
$^{\circ}\text{C}$	Grados Centígrados

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de Enfermedades Infecciosas

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

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

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

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

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

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

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

1.2 Descripción de los Principales Microorganismos Causantes de Enfermedades Respiratorias

Streptococcus pneumoniae

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

Haemophilus influenzae

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

Staphylococcus aureus

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

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

1.3 Historia del Desarrollo de Agentes Antimicrobianos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5 Estrategias Contra Infecciones

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

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

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

1.6 Uso de Medicina Tradicional

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

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

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

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

1.6.1 Uso de Plantas Medicinales

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.7 Actividad Antimicrobiana de Extractos o Compuestos Extraídos de Plantas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.8 Bioensayos

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

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

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

1.8.1 Descripción de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana

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

1.8.1.1 Método de Difusión en Placa

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

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

1.8.1.2 Método de Dilución en Tubo

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

organismo testigo en tubos con caldo de cultivo en condiciones definidas de crecimiento. Cada tubo contiene una cantidad de antibiótico obtenida por dilución a partir de una solución de concentración conocida y se incluye también un control sin antimicrobiano. Los tubos se inoculan con una suspensión calibrada del microorganismo en estudio y se incuban un tiempo determinado. Después de este período, los tubos se examinan visualmente para comprobar la presencia de turbidez que indica que el microorganismo no ha sido inhibido por el antibiótico contenido en los tubos. La CMI será la concentración del tubo con la máxima dilución que inhibe el crecimiento del organismo. La microtécnica de dilución tiene el mismo principio que el método de dilución en caldo ya descrito, excepto que la prueba se realiza en microplaca (Brock y cols., 1987. Koneman y cols., 1991).

1.8.1.3 Métodos de Aseguramiento de Proliferación o Viabilidad Celular

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

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

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

1.8.1.4 Bioautografía

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

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

1.9 Justificación

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

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

1.10 Objetivo General

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

1.11 Objetivos Específicos

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

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material, Equipo y Reactivos

2.1.1 Material

- Puntillas 100 μL , 1000 μL , 200 μL estériles con filtro
- Pipetas automáticas Wilson[®] de 50, 100 y 1000 μL
- Acrodiscos PTFE y GHP 13 mm de diámetro con filtro de 0.22 μm Gelman[®]
- Microplacas estériles de poliestireno de 96 pozos de fondo plano con tapa de baja evaporación, Costar[®]
- Cromatofolios AL TLC de Sílica Gel 60 F₂₅₄ Merck
- Columna Lobar LiChroprep[®] Si 60 (40 – 63 μm), Merck
- Columna Lobar LiChroprep[®] RP-18 (40 – 63 μm), Merck

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

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

2.1.2 Equipo

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

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

2.1.3 Reactivos

2.1.3.1 Solventes

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

- Nitrógeno gas de alta pureza, AGA

2.1.3.2 Reactivos Especiales

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

2.1.3.3 Antimicrobianos

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

La cefalotina y la vancomicina se disolvieron en agua a una concentración de 2.56 mg/mL. Estos estándares se dividieron en alícuotas de 0.5 mL y se almacenaron a -70 °C hasta su uso

2.1.3.4 Medios de Cultivo

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

2.1.4 Material Biológico

2.1.4.1 Microorganismos

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

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

2.1.5 Condiciones Utilizadas para Bioautografía

Cromatofolios: AL TLC de Sílica Gel 60 F₂₅₄ Merck 10 cm X 3 cm

Sistemas eluentes probados con saturación previa:

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

2.1.6 Condiciones de Análisis para CLAR FR-C18

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

Se utilizaron las siguientes condiciones:

A)

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

B)

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

2.2 Colecta de Plantas

Plantas

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

2.3 Obtención de Extractos Metanólicos y Acuosos

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

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

2.4 Determinación de Actividad Antimicrobiana de los Extractos Obtenidos

2.4.1 Preparación de Soluciones de los Extractos

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

soluciones orgánicas se esterilizaron por filtración con acrodiscos PTFE con filtro de 0.22 μm Gelman[®], y las acuosas con acrodiscos GHP de 0.22 μm Gelman[®].

2.4.2 Preparación de Inóculos

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

2.4.3 Preparación de Controles

A) Controles de Antibióticos

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

B) Control de Solvente Utilizado

DMSO: Se esterilizó por filtración con acrodiscos GHP de 0.22 μm Gelman[®].

C) Otros controles

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

2.4.4 Descripción de la Técnica de Microdilución en Placa

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

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

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

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

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

2.5 Extracción Diferencial del o los Extractos con Mayor Actividad

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

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

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

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

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

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

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

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

2.7 Aislamiento Biodirigido de Hojas de *Cordia boissieri*

2.7.1 Primera Extracción Masiva

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

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

2.7.1.1 Columna Flash (CF)

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

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

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

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

Técnica de bioautografía

Las fracciones se analizaron en cromatografía en capa fina (CCF), para lo cual se disolvieron en cloroformo y se sembraron en dos cromatofolios de aluminio de Sílica gel 60 F₂₅₄ de 3 x 10 cm. Se probaron los sistemas de eluentes descritos previamente (2.1.5.1) y finalmente se eligió el sistema F. Uno de los cromatofolios se usó como control para medir el R_f de cada mancha observada a simple vista, por luz ultravioleta a 254 y 365 nm o revelada con vapores de yodo. El otro cromatofolio se esterilizó con luz ultravioleta a 254 nm por 1 hora, posteriormente se le colocó una capa de AMH previamente solidificado y sobre éste se añadieron 100 µL de una suspensión de *Staphylococcus aureus* (IMSS-NL/HE25:01 resistente a oxacilina) con una turbidez igual al estándar 0.5 de Mc Farland, (que se preparó por inoculación de 3 a 5 colonias del microorganismo a 3 ml de CMH e incubación a 37°C por 1-3 horas a 150 rpm hasta obtener la turbidez señalada). El cromatofolio se colocó en una caja Petri, se incubó en ambiente húmedo (colocando un algodón húmedo con agua destilada estéril), a 37 °C por 18-24 horas. Se colocó un control de esterilidad del medio. La zona de inhibición del crecimiento bacteriano se midió y se correlacionó con el R_f previamente registrado. En

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.7.1.4 Columna de Exclusión Molecular (EM)

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

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

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

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

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

2.7.2 Segunda Extracción Masiva

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

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

2.7.2.1 Columna Flash (CF)

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

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

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

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

2.7.2.2 Columna Lobar de Baja Presión en Sílica (CLSG)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.8 Purificación y Determinación de la Estructura Química de Compuestos Activos

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

2.8.1 Análisis de Pureza

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

Se analizó con las condiciones de análisis A

2.8.2 Espectroscopia UV-Vis

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

2.8.3 Espectroscopia IR

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

2.8.4 Espectroscopia de RMN

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

2.8.5 Espectrometría de masas

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

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

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

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Colecta de Plantas a Evaluar

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

Tabla 1. Plantas elegidas siguiendo criterios etnofarmacológicos y quimiotaxonómicos

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

Tabla 1. (continuación)

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

Tabla 1. (continuación)

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

* Plantas elegidas por criterio quimiotaxonómico

3.2 Obtención de Extractos Metanólicos y Acuosos

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

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

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

Tabla 2. (continuación)

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

3.3 Determinación de Actividad Antimicrobiana de los Extractos Obtenidos

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

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

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

Tabla 3. (continuación)

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

Tabla 3. (continuación)

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

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

3.4 Extracción Diferencial del o los Extractos Metanólicos con Mayor Actividad

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

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

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

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

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

3.6 Aislamiento Biodirigido de Hojas de *Cordia boissieri*

3.6.1 Primera Extracción Masiva

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

3.6.1.1 Columna Flash (CF)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fracción obtenida de CF y sometida a columna lobar de baja presión de sílica gel	Fracciones obtenidas	Actividad antimicrobiana por bioautografía
F9CF-190104-14	F1LS-120204-16	(-)
	F2LS-120204-16	(-)
	F3LS-120204-16	(+)
	F4LS-120204-16	(-)
	F5LS-120204-16	(-)
	F6LS-120204-16	(+)
	F7LS-120204-16	(+)
	F8LS-120204-16	(+)
	F9LS-120204-16	(+)
	F10LS-120204-16	(+)
	F11LS-120204-16	(+)
	F12LS-120204-16	(-)
	F13LS1-20204-16	(-)
	F14LS-120204-16	(-)
	F15LS-120204-16	(-)
	F16LS-120204-16	(-)
	F17LS-120204-16	(+)
	F18LS-120204-16	(+)
	F19LS-120204-16	(-)
	F20LS-120204-16	(-)
	F21LS-120204-16	(+)
	F22LS-120204-16	(+)
	F23LS-120204-16	(+)
	F24LS-120204-16	(+)
	F25LS-120204-16	(+)
	F26LS-120204-16	(+)
	F27LS-120204-16	(-)
	F28LS-120204-16	(-)
	F29LS-120204-16	(+)

Tabla 6 (continuación)

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

Tabla 6. (continuación)

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

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

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

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

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

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

Tabla 7. (continuación).

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

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

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

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

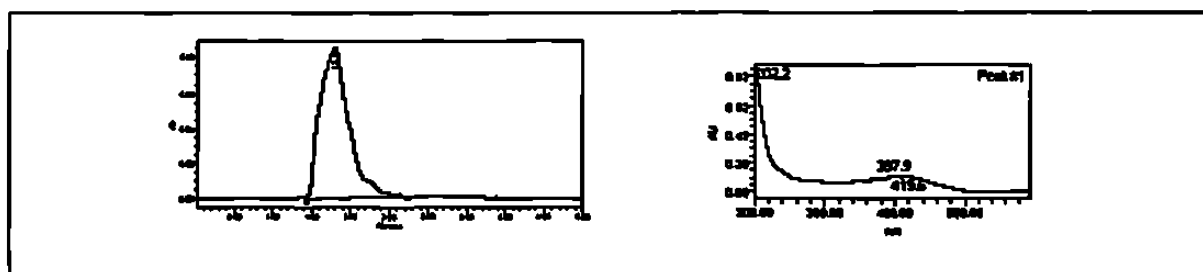


Fig. 1. Cromatograma CLAR FR-C18 (λ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F3LFR-300504-29

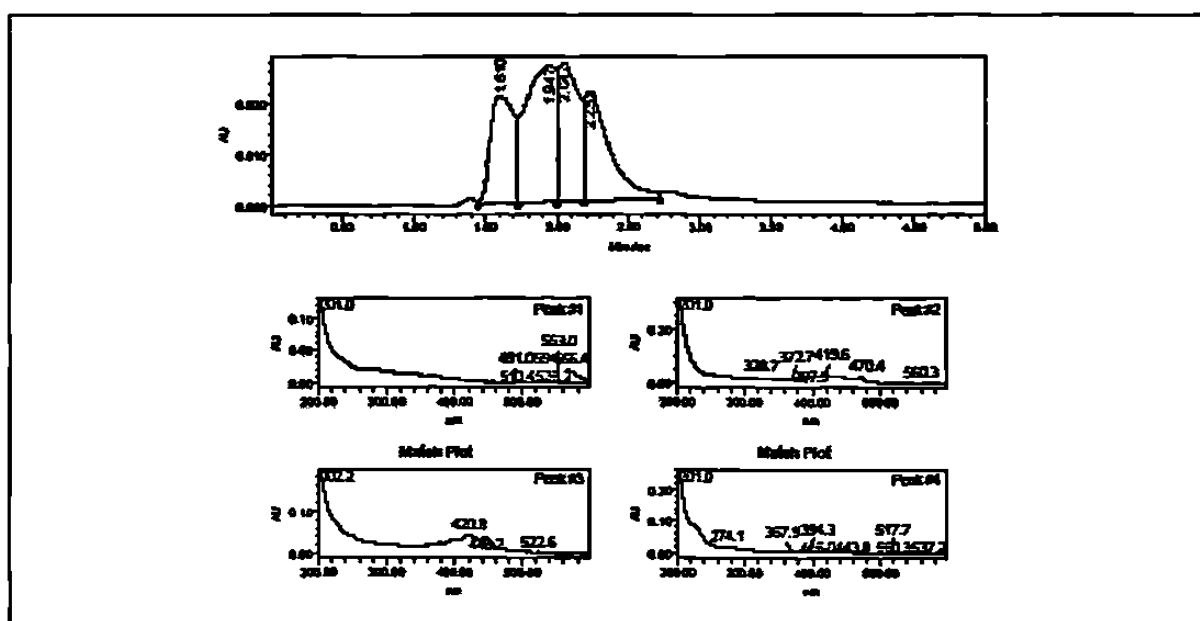


Fig. 2. Cromatograma CLAR FR-C18 (λ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F4LFR-300504-29

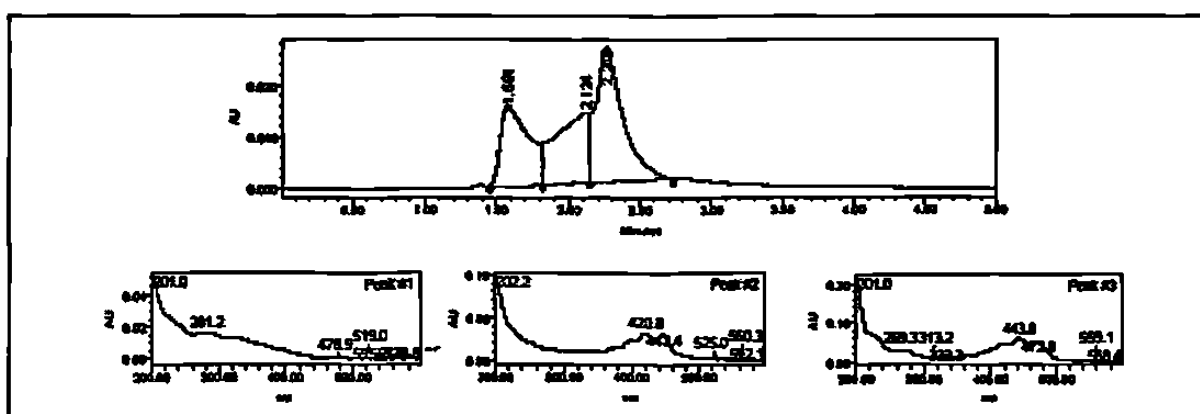


Fig. 3. Cromatograma CLAR FR-C18 (λ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F5LFR-300504-29

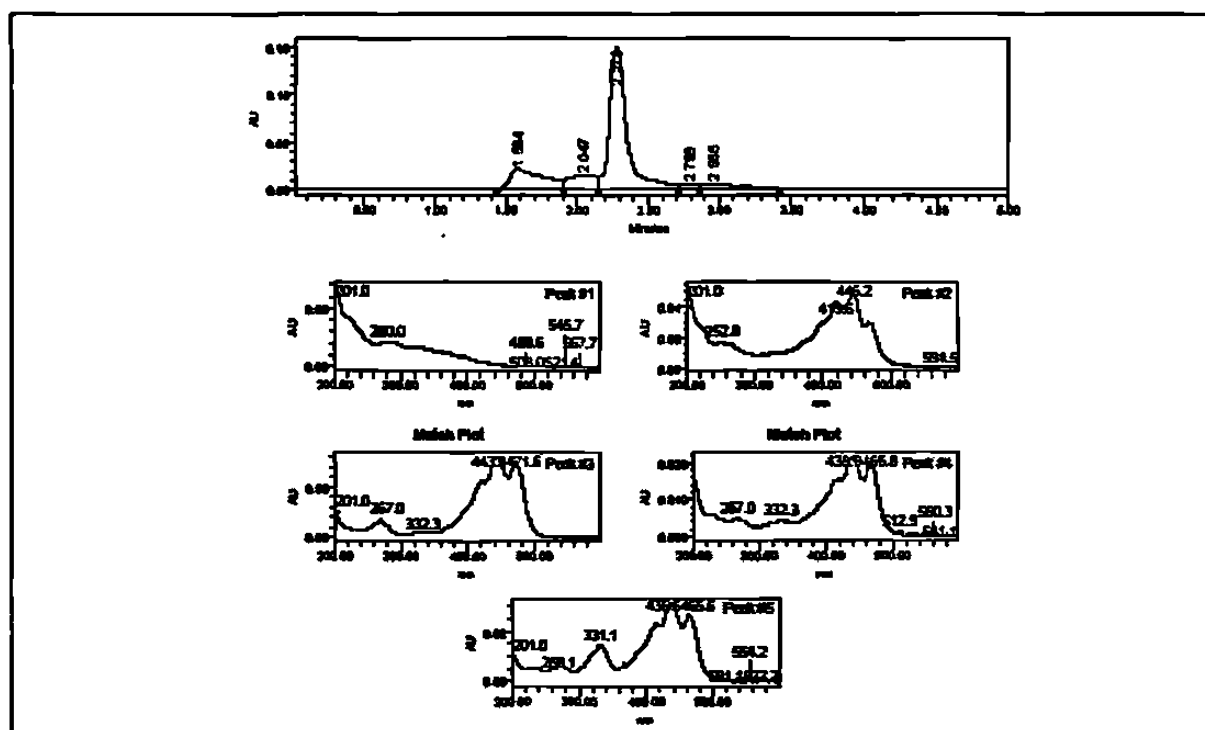


Fig. 4. Cromatograma CLAR FR-C18 (λ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F6LFR-300504-29

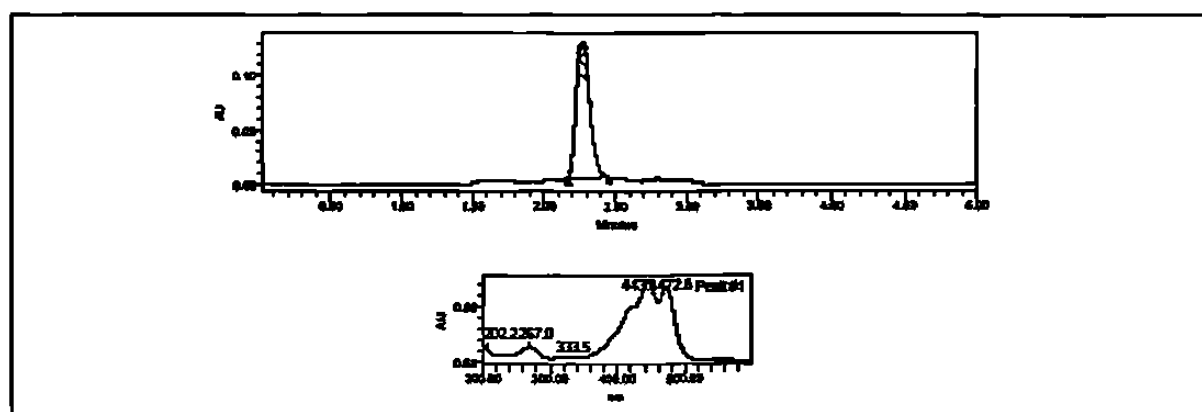


Fig. 5. Cromatograma CLAR FR-C18 (λ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F7LFR-300504-29

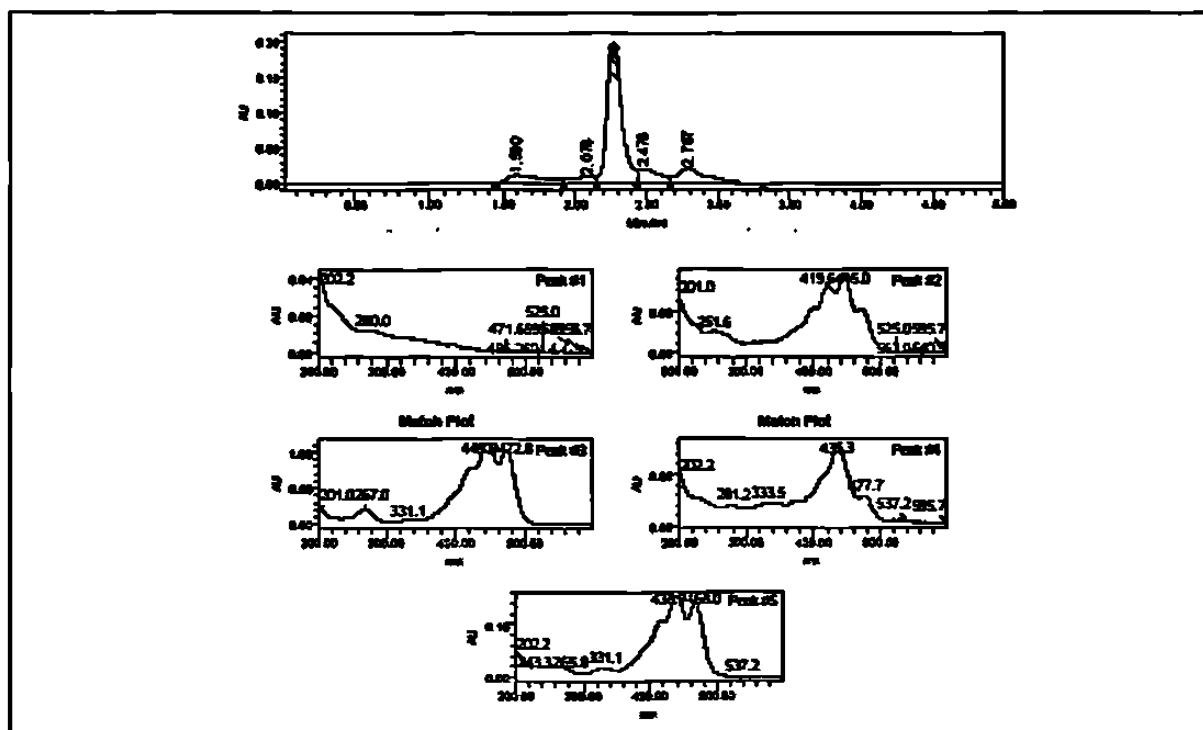


Fig. 6. Cromatograma CLAR FR-C18 (λ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F8LFR-300504-29

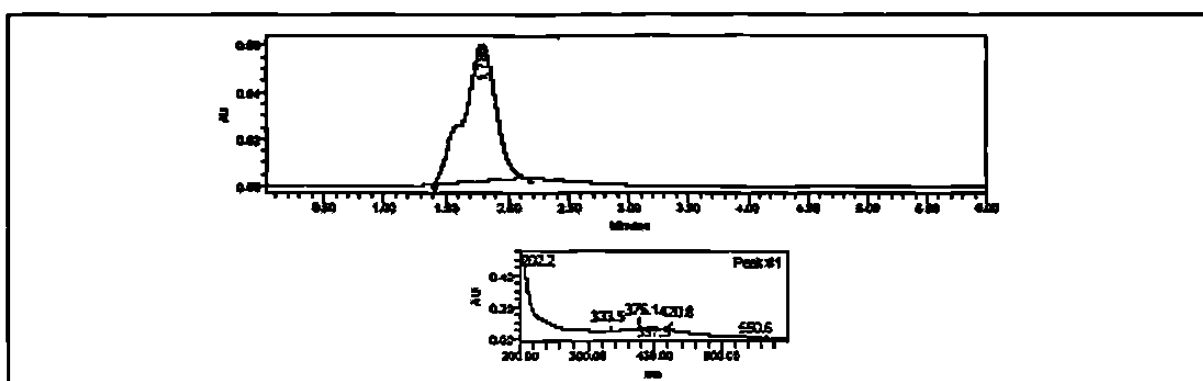


Fig. 7. Cromatograma CLAR FR-C18 (λ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F7LFR-300604-30

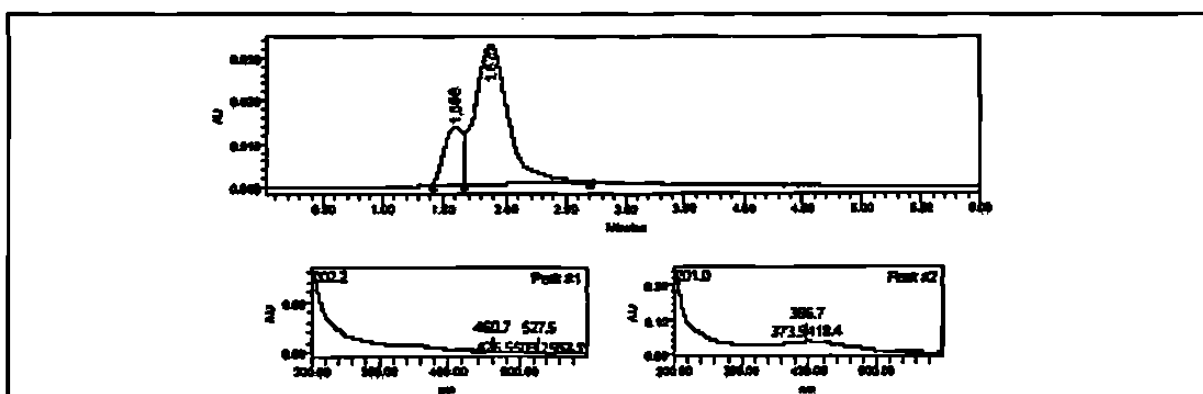


Fig. 8. Cromatograma CLAR FR-C18 (λ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F8LFR-300604-30

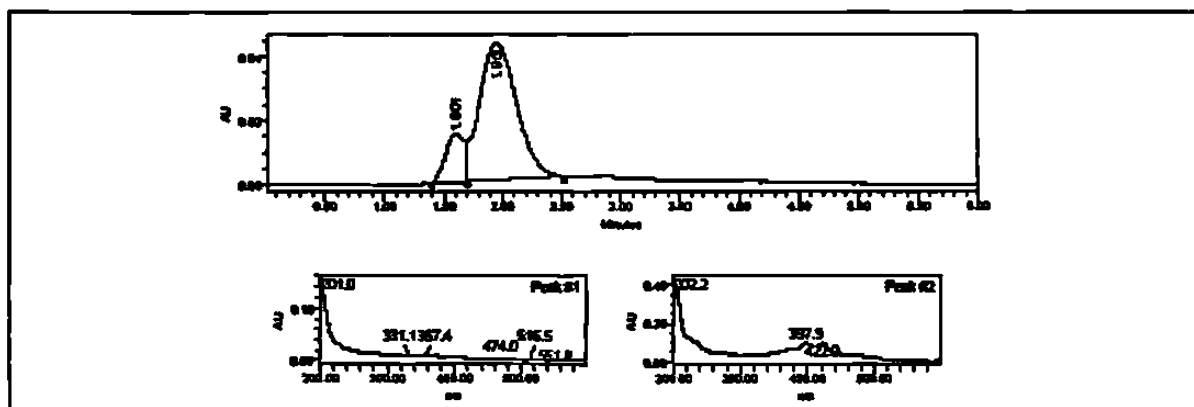


Fig. 9. Cromatograma CLAR FR-C18 (λ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F9LFR-300604-30

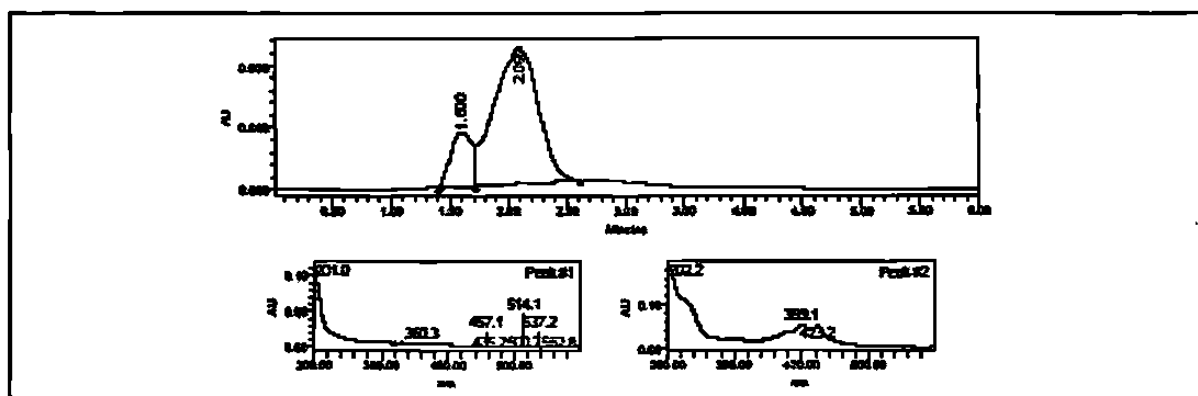


Fig. 10. Cromatograma CLAR FR-C18 (λ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F10LFR-300604-30

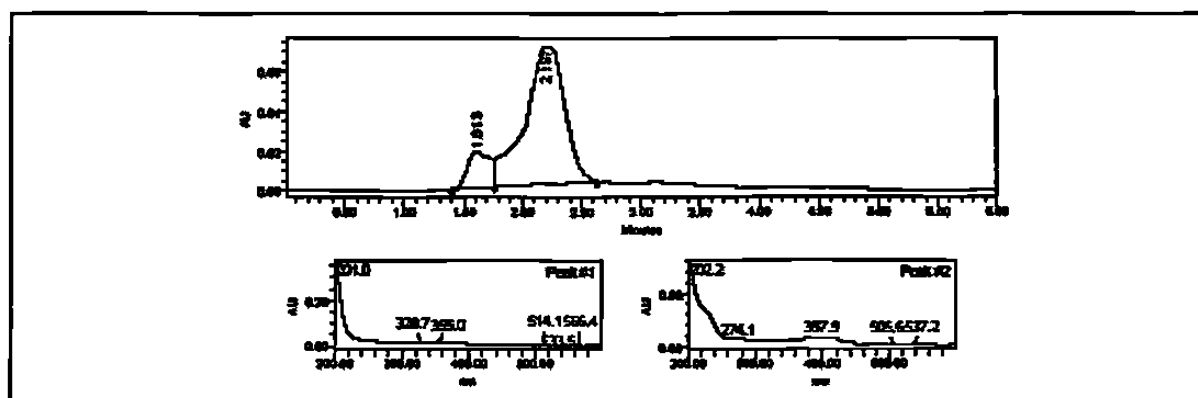


Fig. 11. Cromatograma CLAR FR-C18 (λ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F11LFR-300604-30

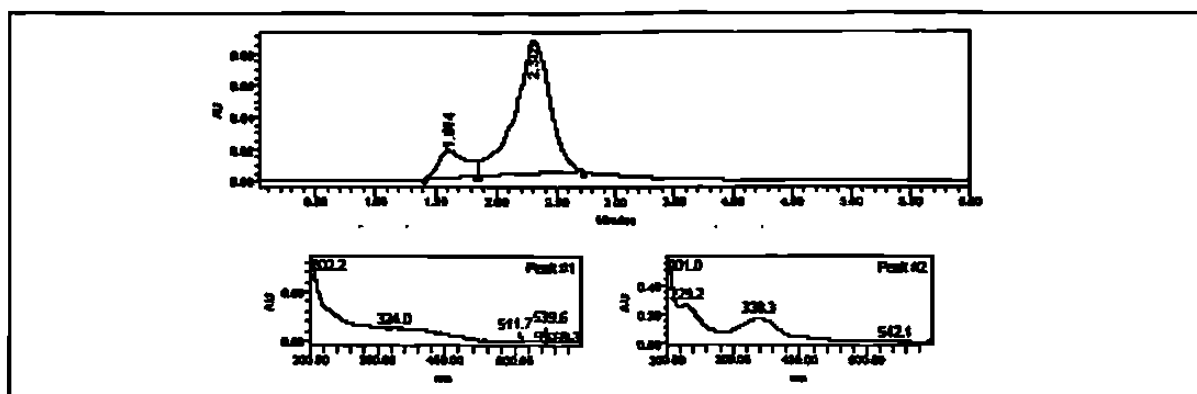


Fig. 12. Cromatograma CLAR FR-C18 (λ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F12LFR-300604-30

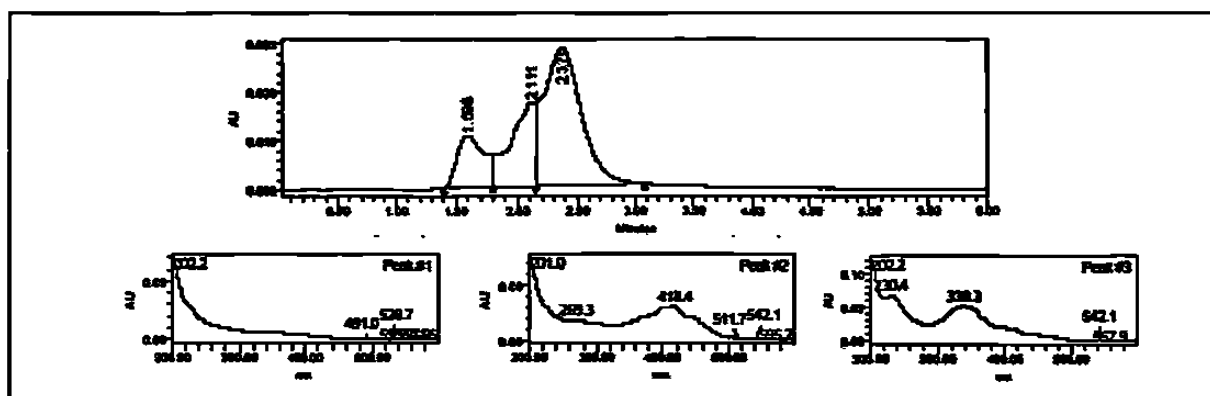


Fig. 13. Cromatograma CLAR FR-C18 (λ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F13LFR-300604-30

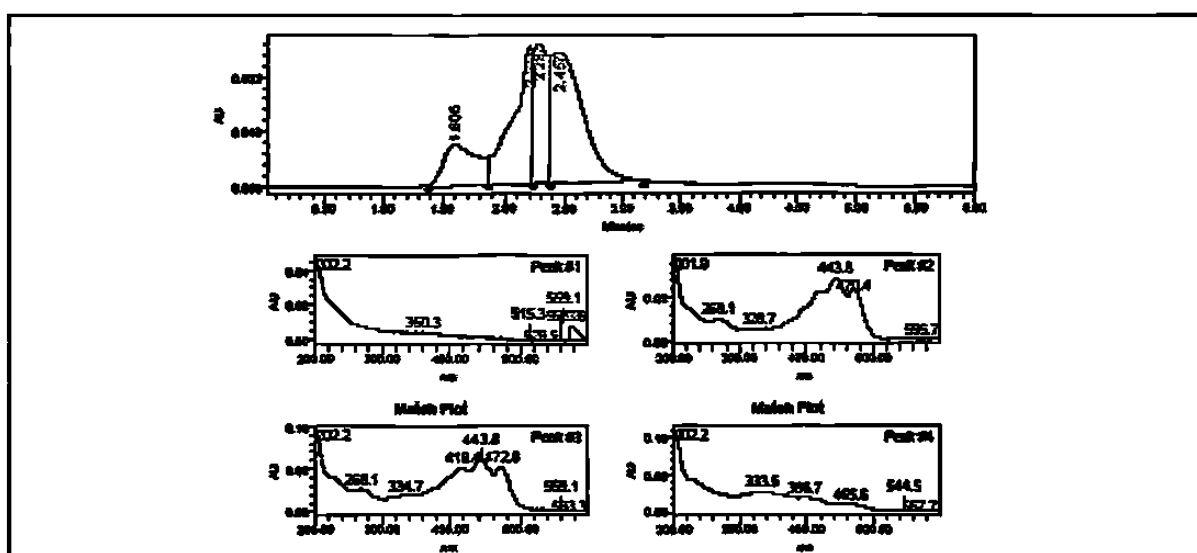


Fig. 14. Cromatograma CLAR FR-C18 (λ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F14LFR-300604-30

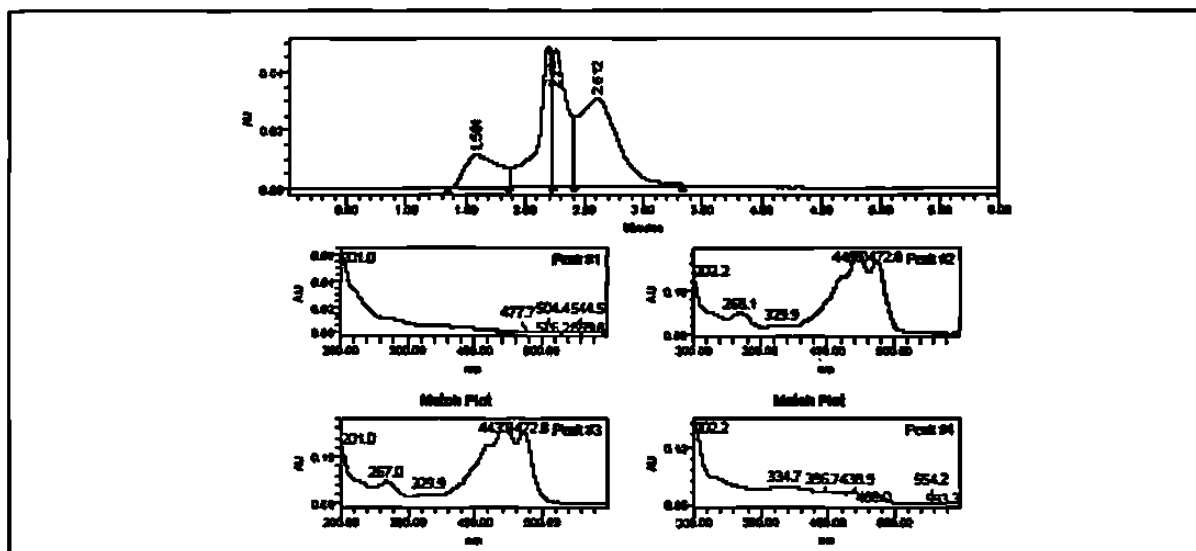


Fig. 15. Cromatograma CLAR FR-C18 (λ 270 nm) y espectro UV-Vis de la fracción F15LFR-300604-30

3.6.1.4 Columna de Exclusión Molecular (EM)

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

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

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

Tabla 9. (continuación)

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

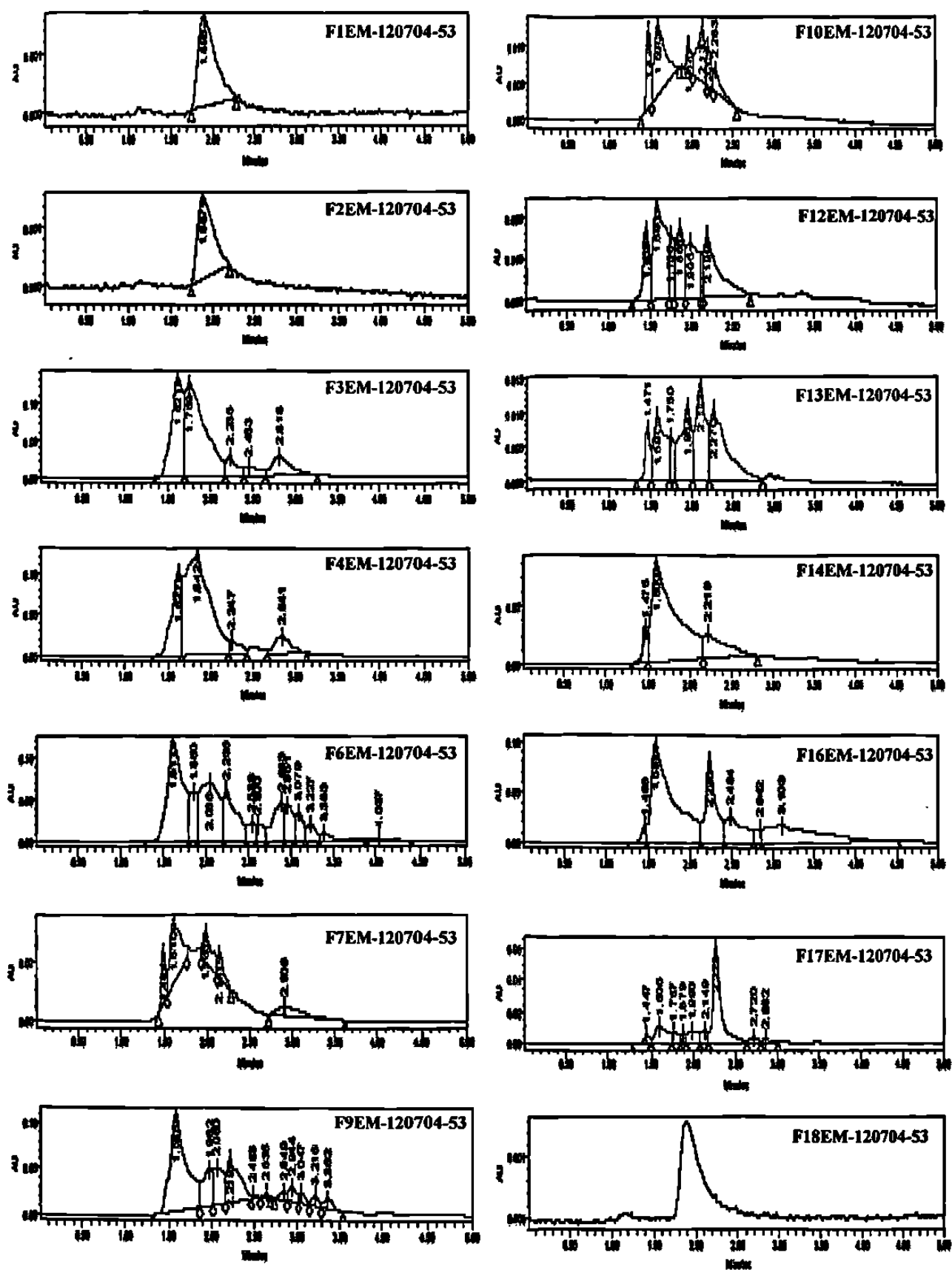


Fig. 16. Cromatogramas (λ 270 nm) de las fracciones obtenidas de las columnas de exclusión molecular provenientes de F3LFR-300504-29, F4LFR-300504-29, F5LFR-300504-29, F6LFR-300504-29, F7LFR-300504-29, F8LFR-300504-29

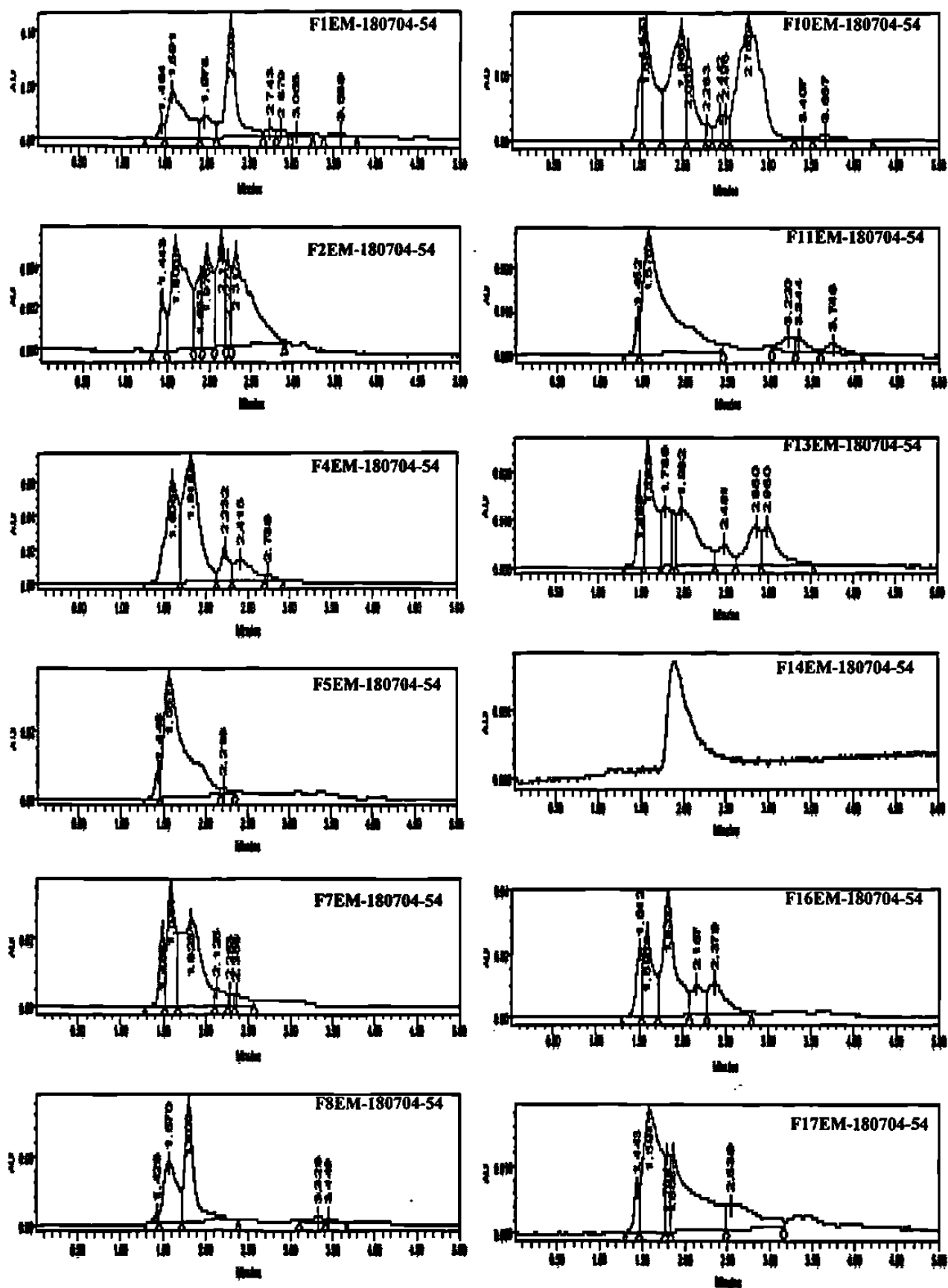


Fig. 17. Cromatogramas (λ 270 nm) de las fracciones obtenidas de las columnas de exclusión molecular provenientes de F7LFR-010604-30, F8LFR-010604-30, F9LFR-010604-30, F10LFR-010604-30, F14LFR-010604-30, F15LFR-010604-30

3.6.2 Segunda Extracción Masiva

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

3.6.2.1 Columna Flash (CF)

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

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

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

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

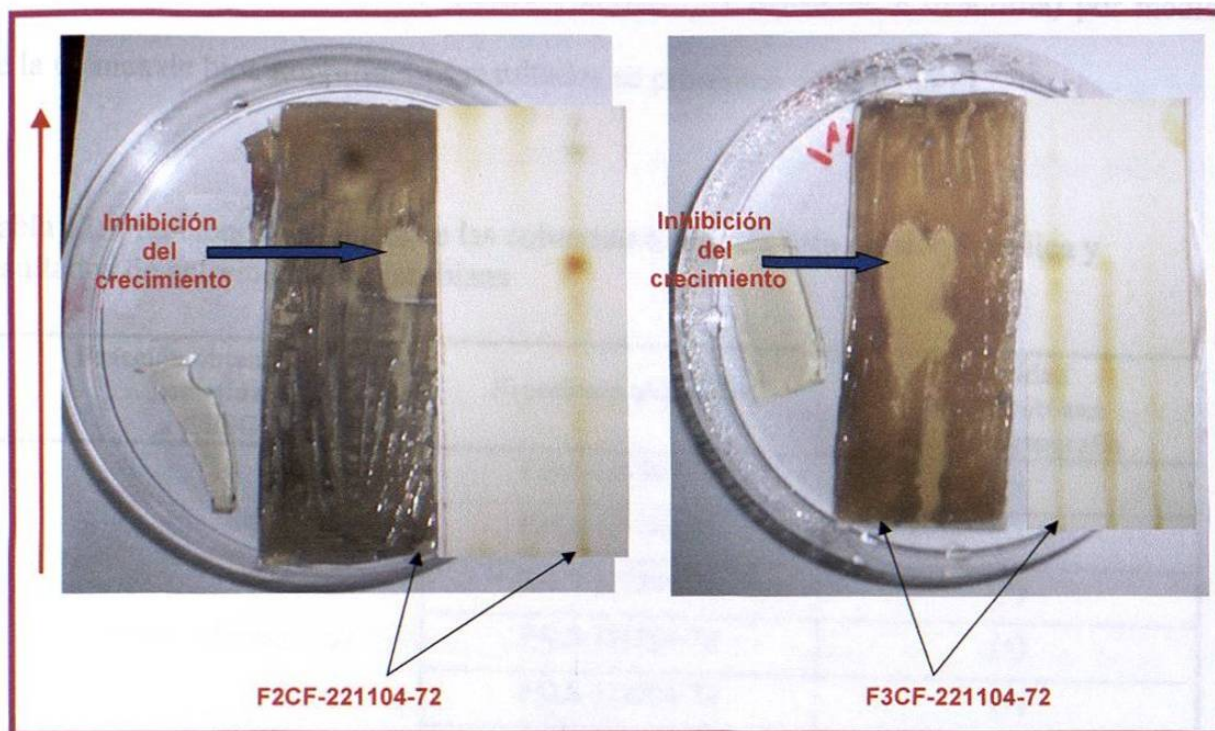


Fig. 18. Bioautografía de fracciones obtenidas de la columna flash. A la izquierda se presenta una bioautografía donde se observa un área clara de la inhibición del crecimiento causado por la fracción F2CF-221104-72, el área oscura es crecimiento microbiano revelado con MTT, también se presenta la cromatoplaaca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

3.6.2.2 Columna Lobar de Baja Presión en Sílica (CLSG)

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

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

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

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

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

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

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

Las fracciones elegidas están registradas en la tabla 12.

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

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

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

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

Tabla 12. (continuación)

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

Tabla 12. (continuación)

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

ND, No determinada

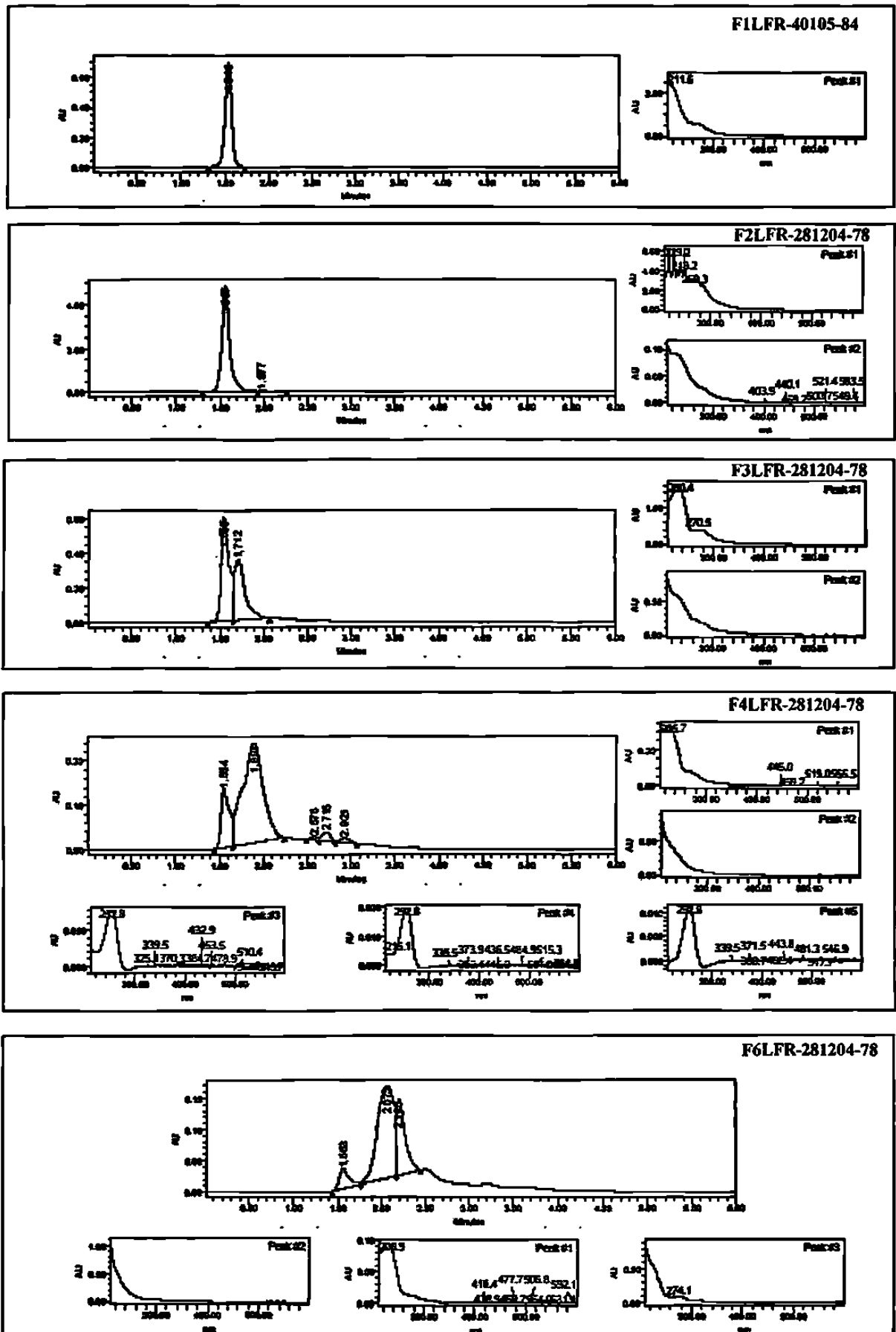


Fig. 19. Cromatogramas (λ 250nm) de fracciones activas obtenidas de CLFR C18 de F3LS-151204-73

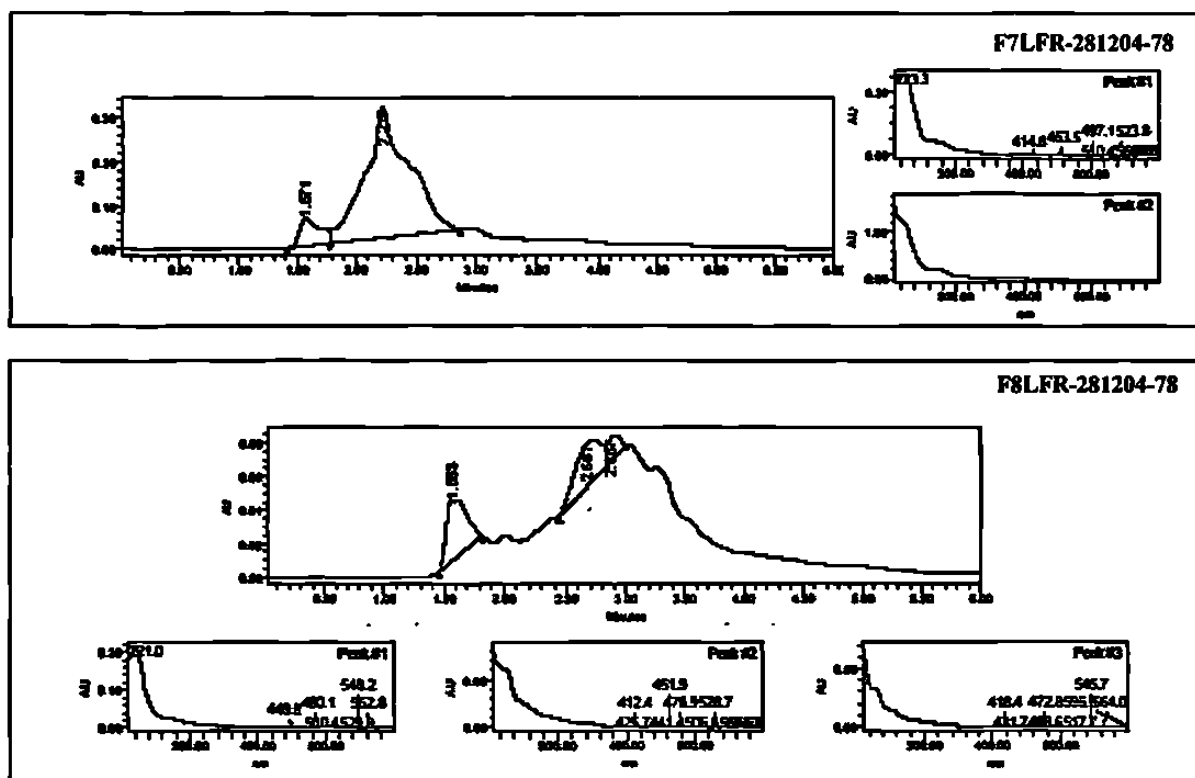


Fig. 19. Cromatogramas (λ 250nm) de fracciones activas obtenidas de la CLFR C18 de F3LS-151204-73 (continuación)

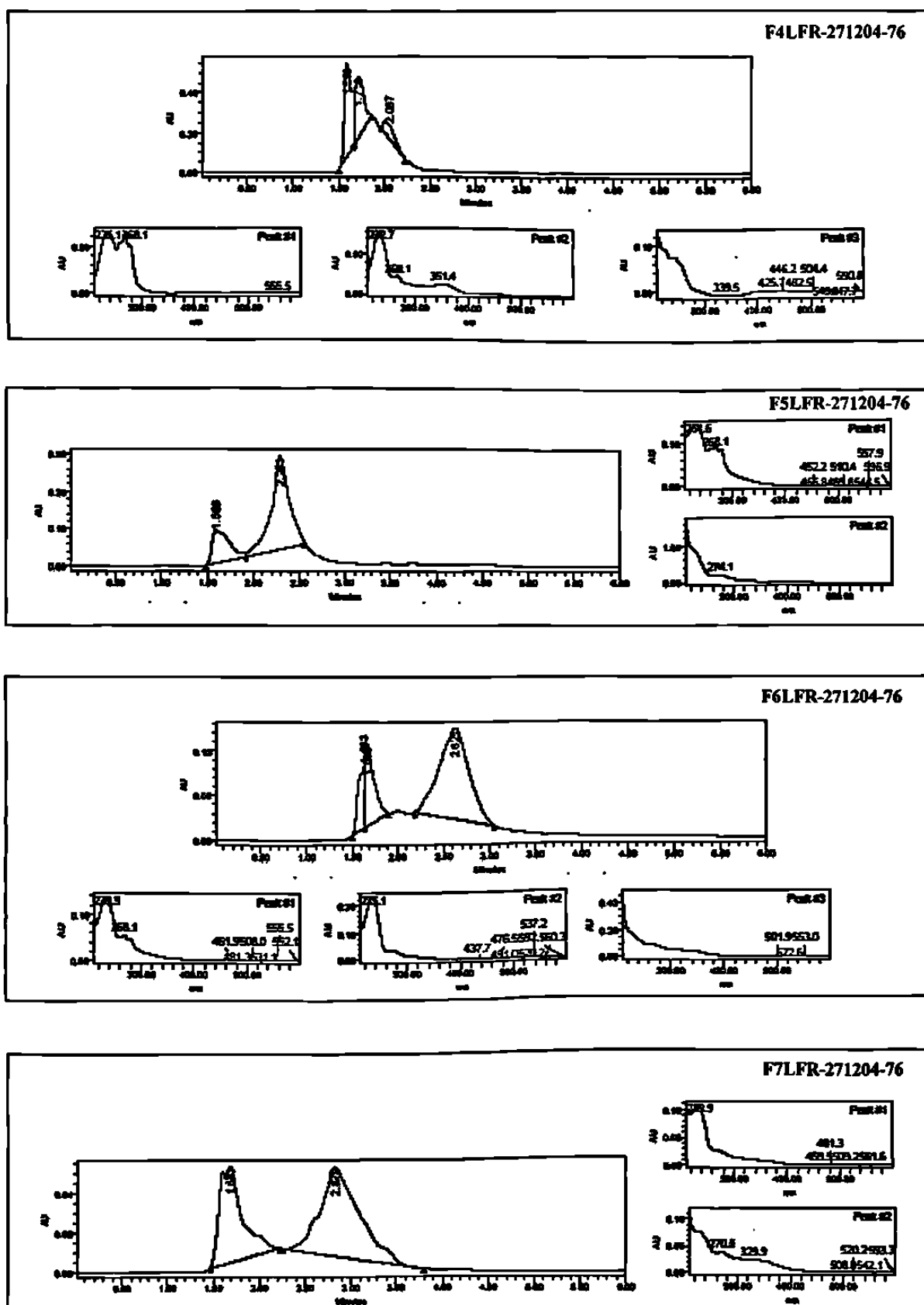


Fig. 20. Cromatogramas (λ 250nm) de fracciones activas obtenidas de la CLFR C18 de F4LS-151204-73

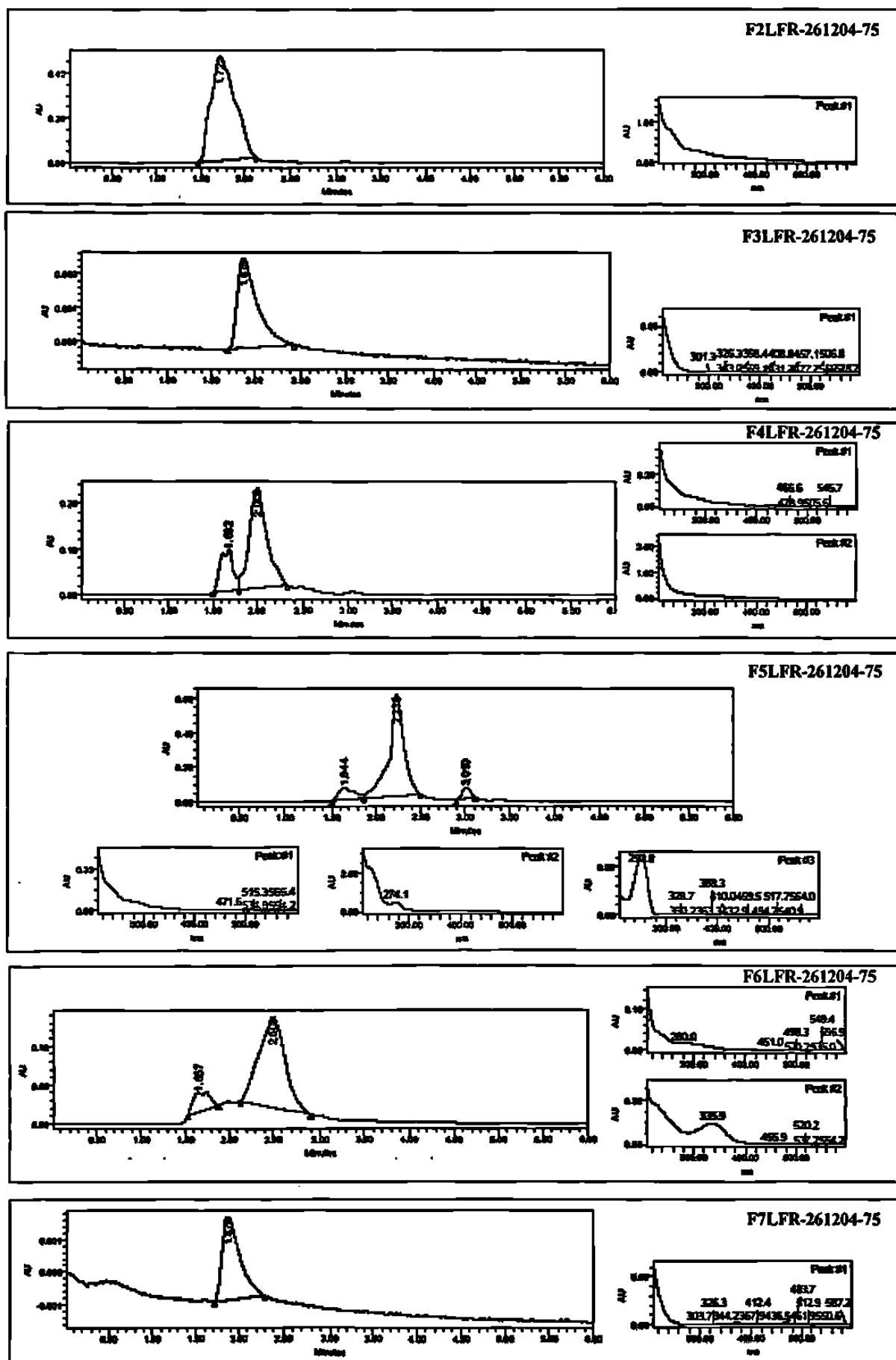


Fig. 21. Cromatogramas de (λ 250nm) fracciones activas obtenidas de la CLFR C18 de F5LS-151204-73

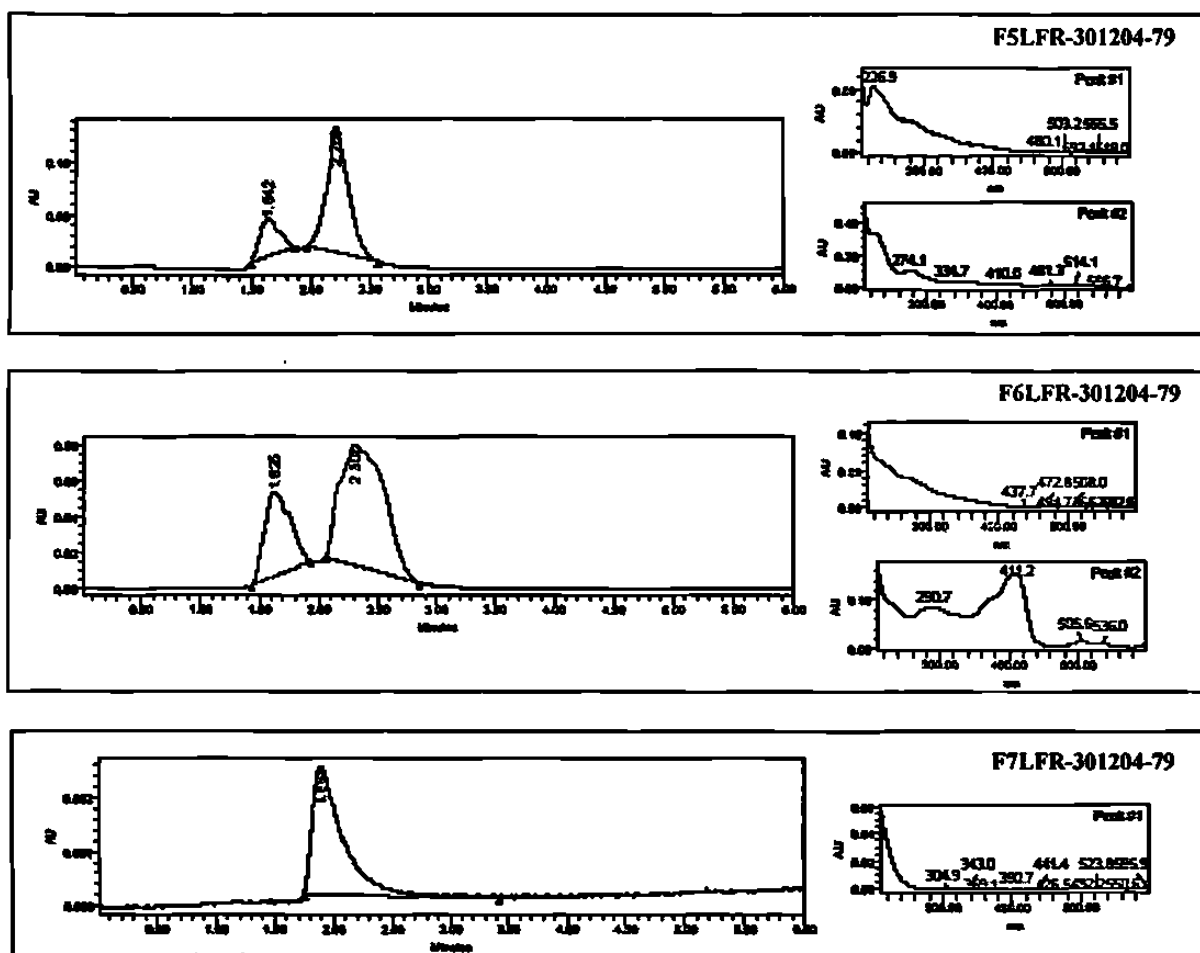


Fig. 22. Cromatogramas de (λ 250nm) fracciones activas obtenidas de la CLFR C18 de F6LS-151204-73

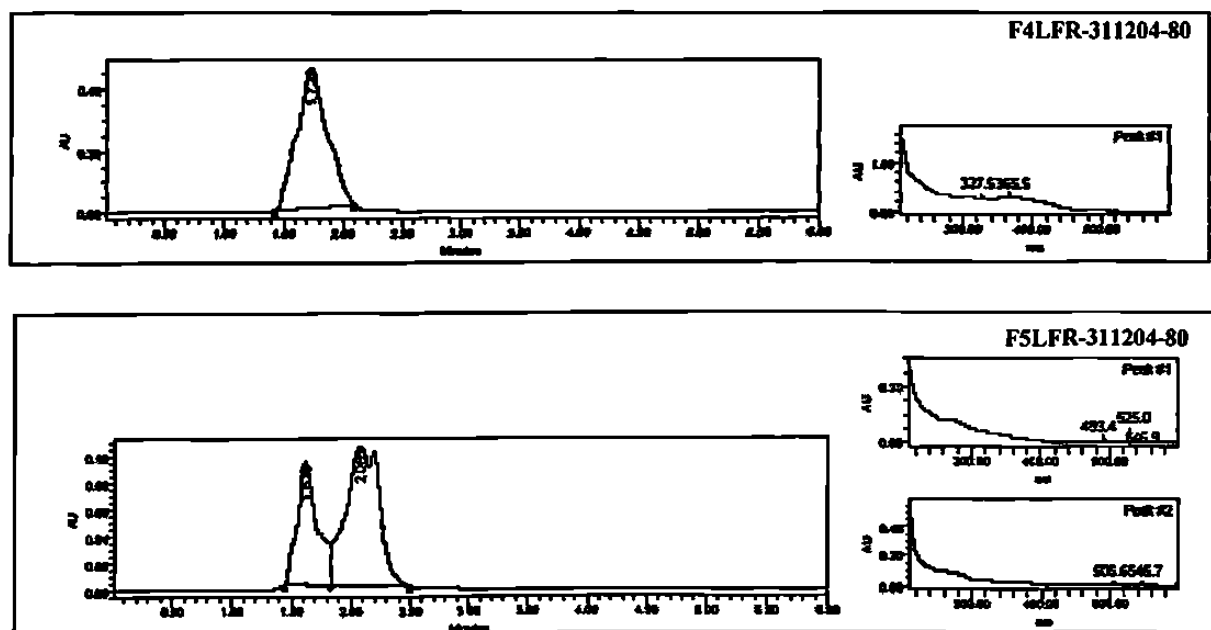


Fig. 23. Cromatogramas de (λ 250nm) fracciones activas obtenidas de la CLFR C18 de F7LS-151204-73

3.7 Purificación y Determinación de la Estructura Química de Compuestos Activos

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

3.7.1 Análisis de Pureza

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

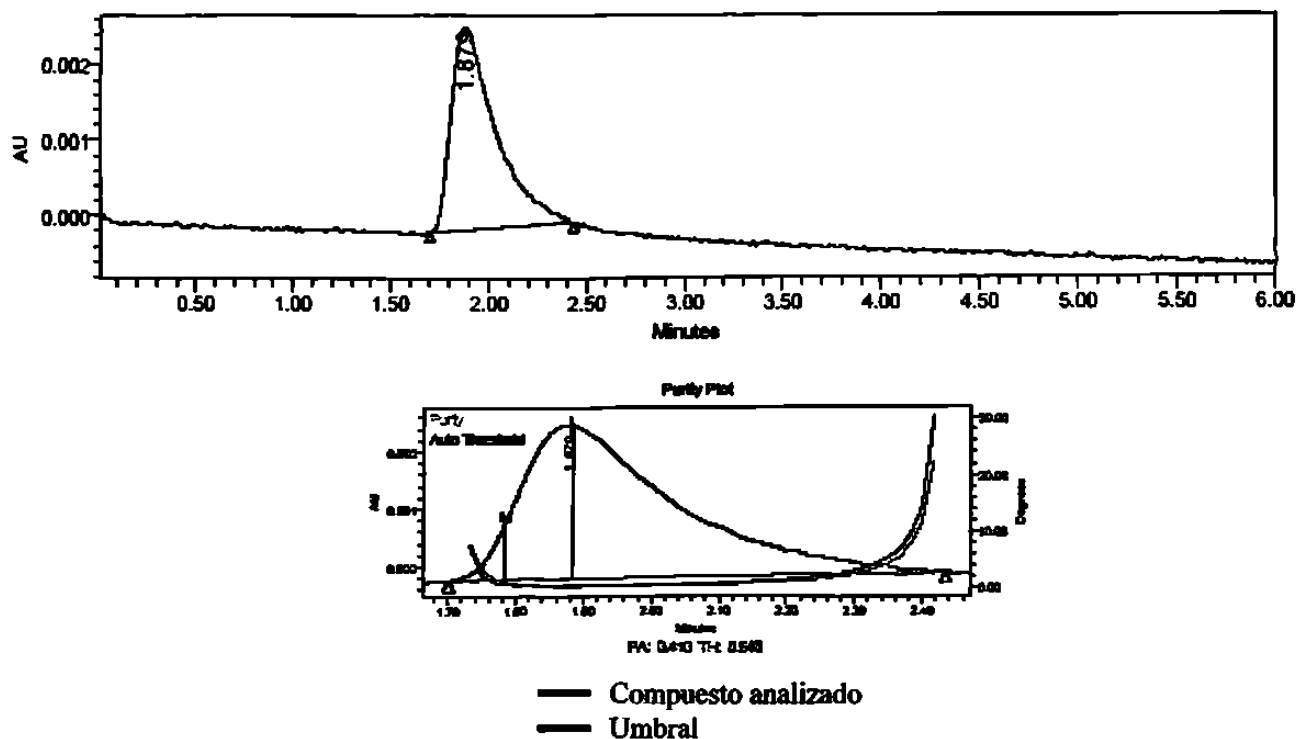


Fig. 24. Cromatograma (λ 250nm) de la fracción F3LFR-261204-75 y análisis de pureza

3.7.2 Espectroscopia UV-Vis

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

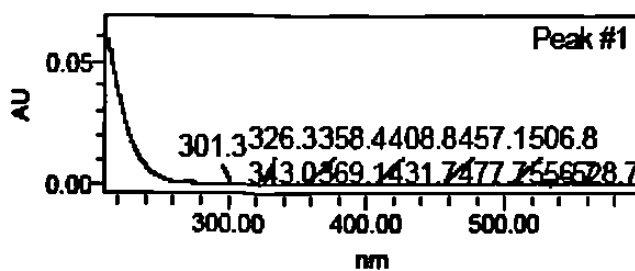


Fig. 25. Espectro ultravioleta-visible del compuesto F3LFR-261204-75

3.7.3 Espectroscopia IR

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

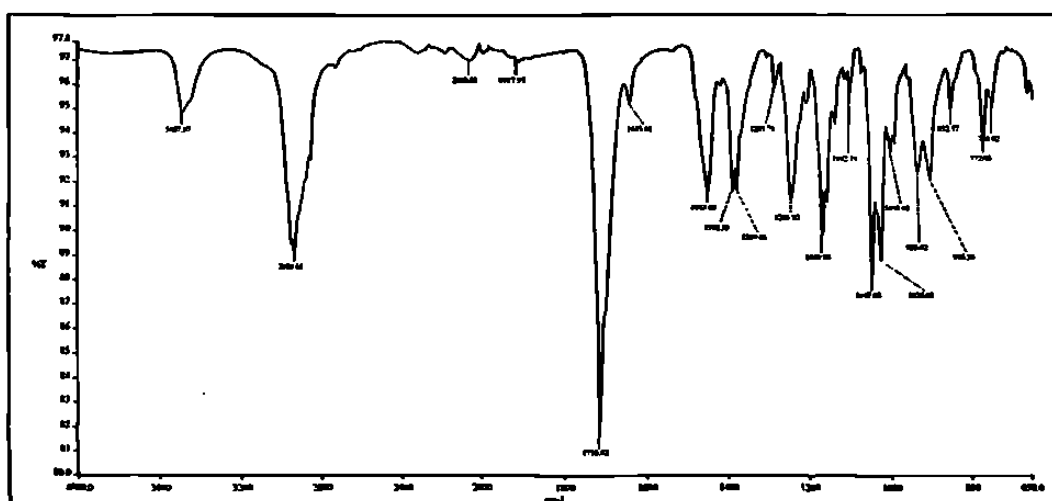


Fig. 26. Espectro infrarrojo del compuesto F3LFR-261204-75

3.7.4 Espectroscopia de RMN

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

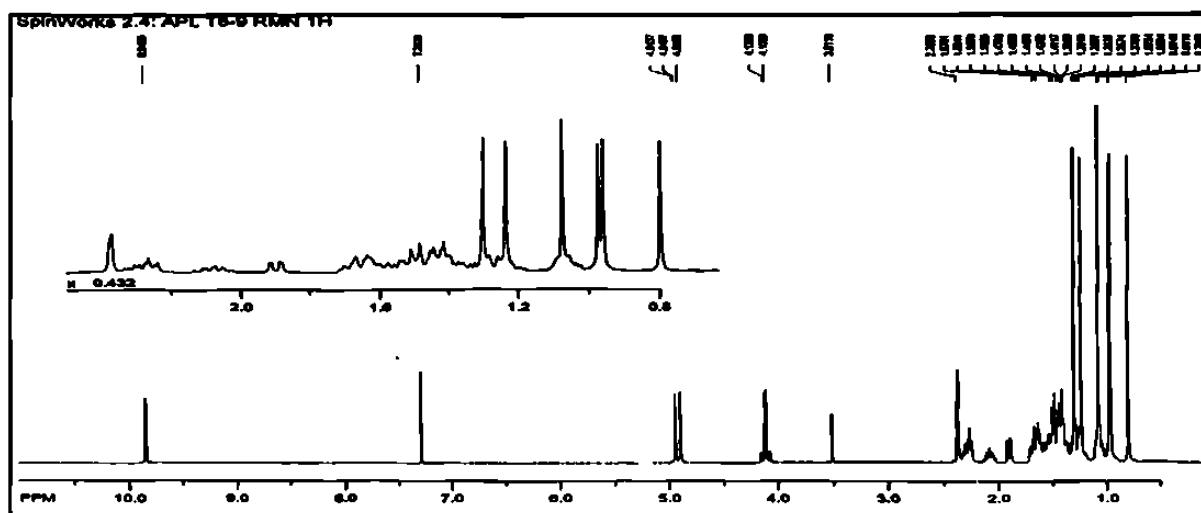


Fig. 27. Espectro de ^1H RMN del compuesto F3LFR-261204-75

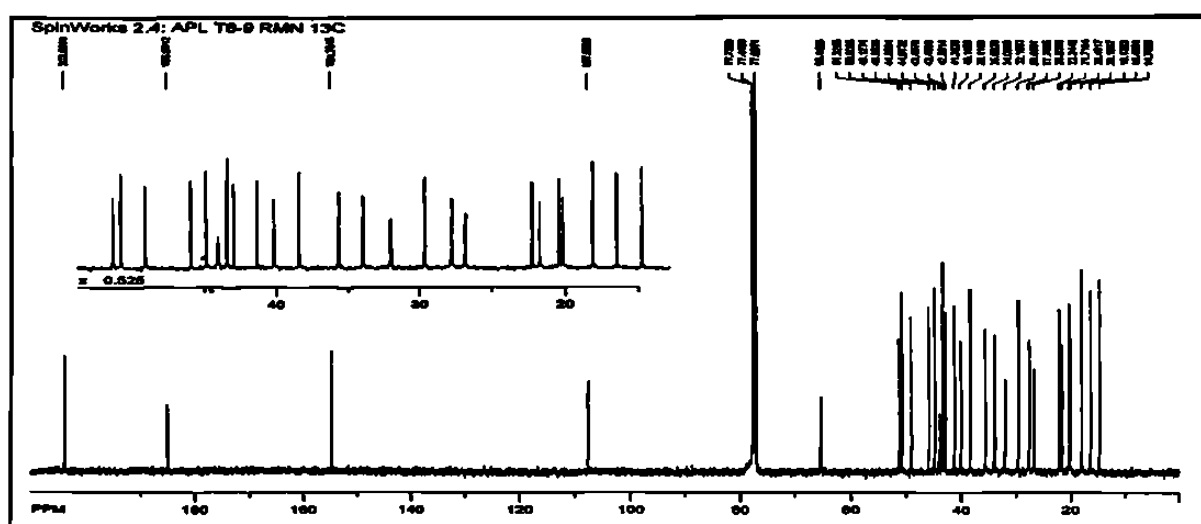


Fig. 28. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto F3LFR-261204-75

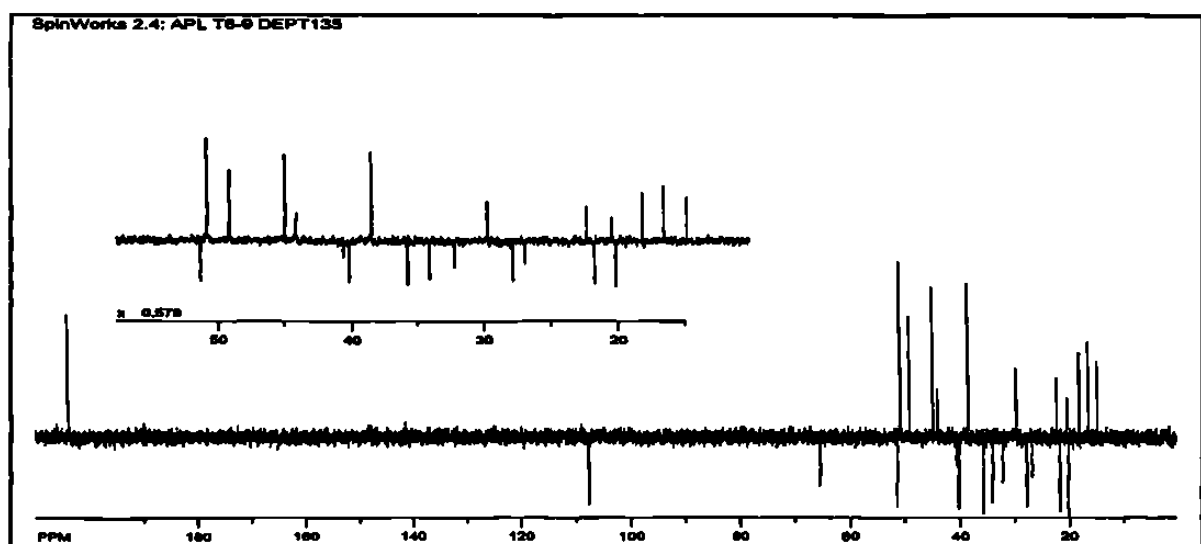


Fig. 29. Espectro DEPT 135 del compuesto F3LFR-261204-75

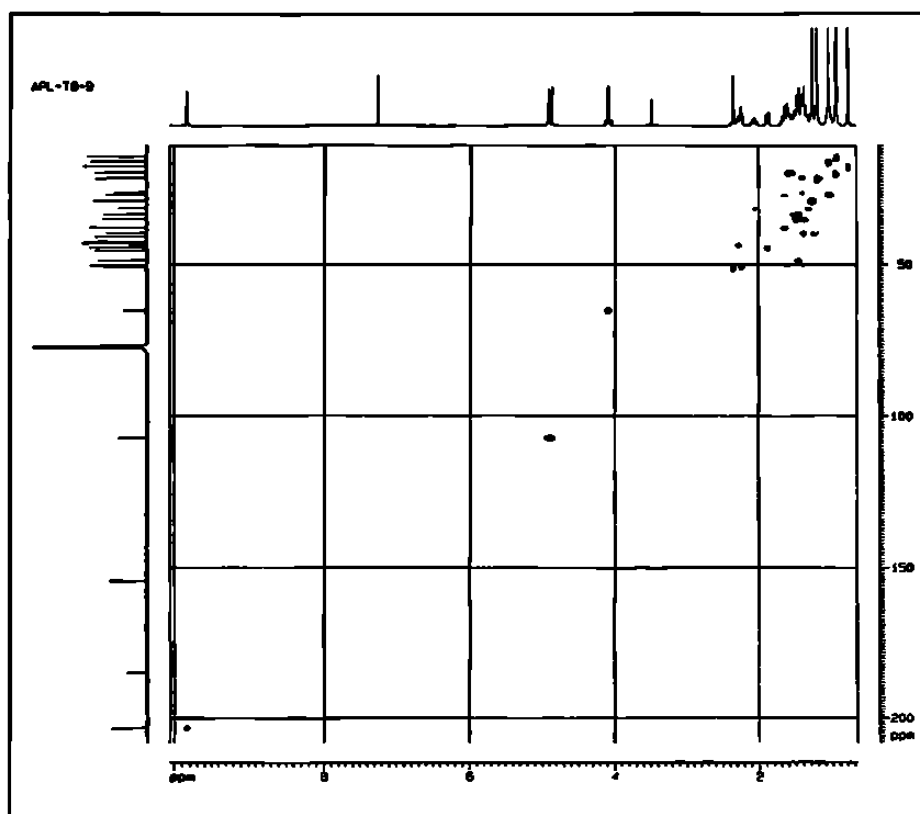


Fig. 30. Espectro HMQC del compuesto F3LFR-261204-75

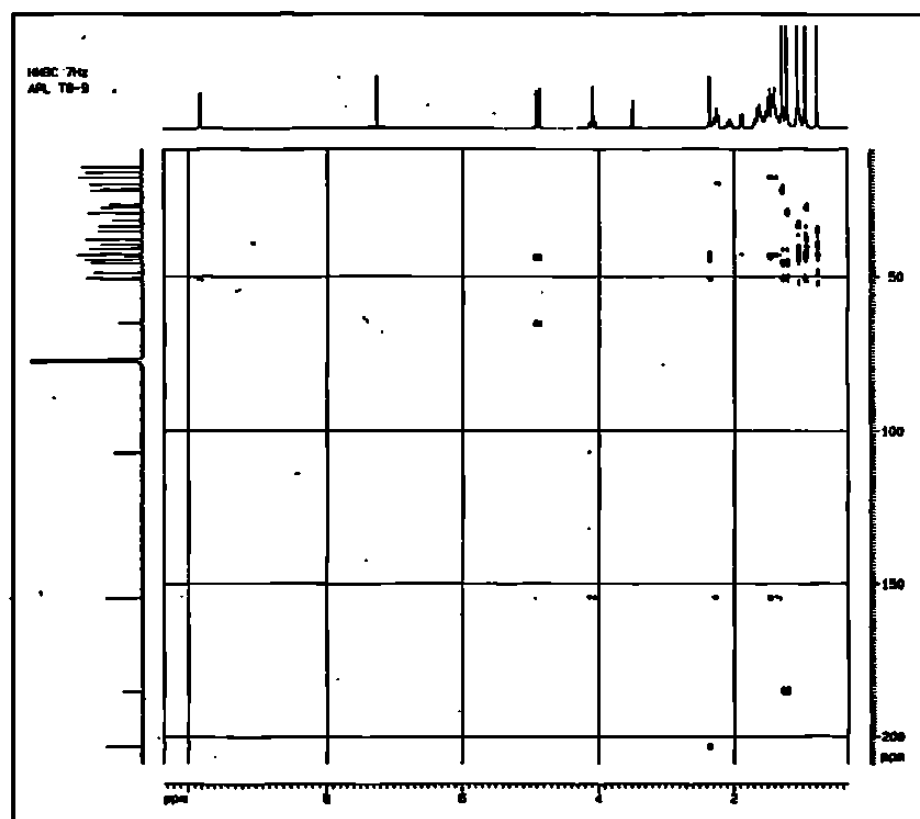


Fig. 31. Espectro HMBC (7 Hz) del compuesto F3LFR-261204-75

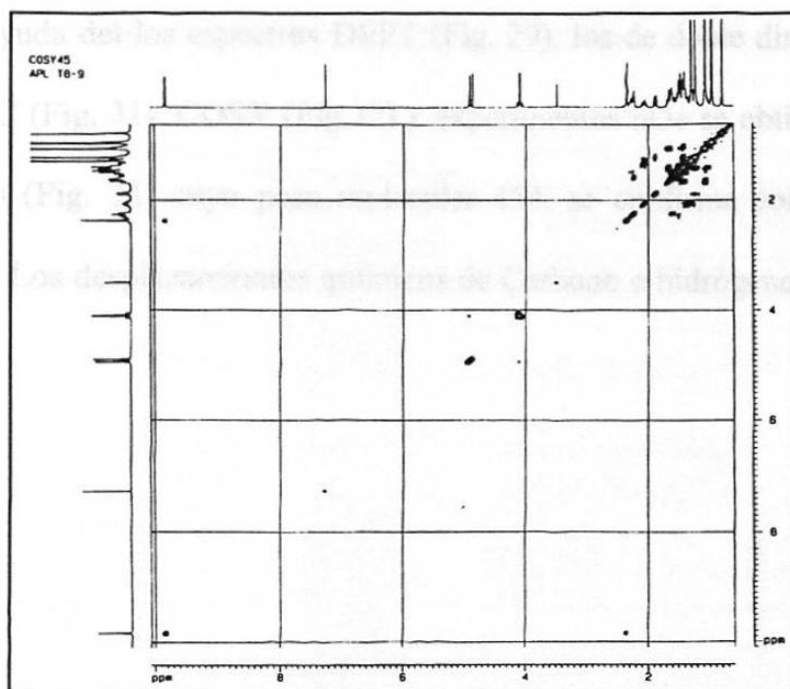


Fig. 32. Espectro COSY del compuesto F3LFR-261204-75

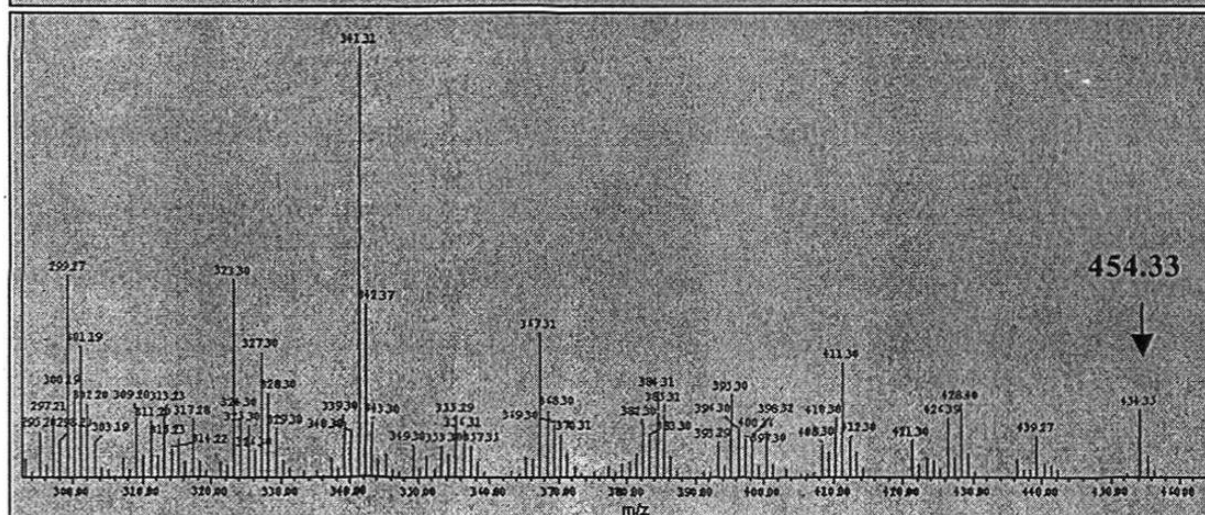
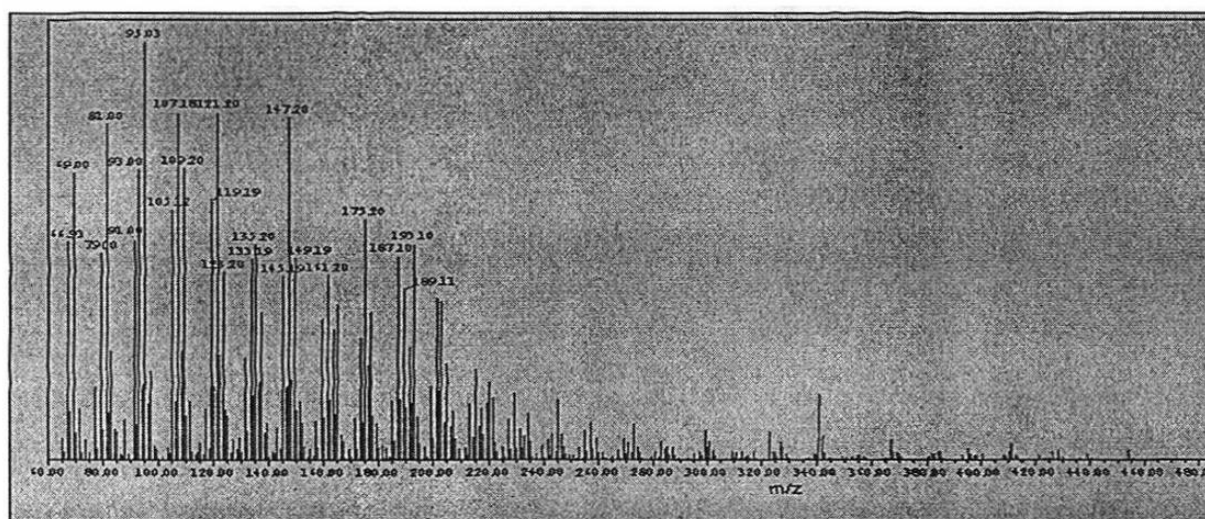


Fig. 33. Espectro de masas del compuesto F3LFR-261204-75