

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

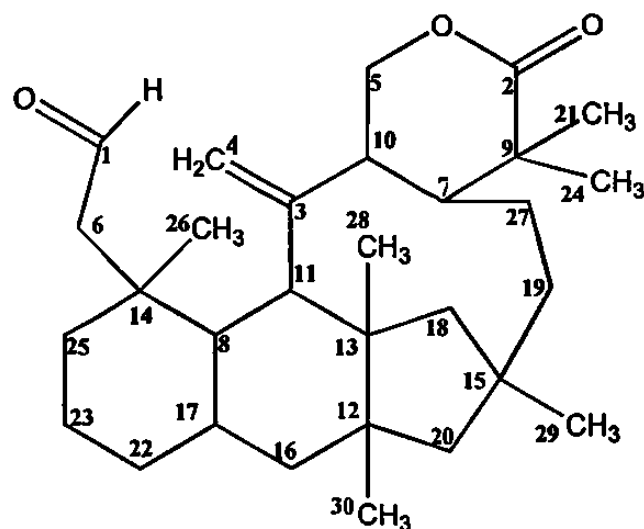


Fig. 34. Estructura del compuesto F3LFR-261204-75 aislado de hojas de *Cordia boissieri* (La numeración no sigue la nomenclatura IUPAC)

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

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

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

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

Tabla14. CMI del compuesto puro y dos fracciones sobre microorganismos causantes de infecciones respiratorios.

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

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

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

$\mu\text{g/mL}$ que se consideró en este trabajo como punto de corte para catalogar cualquier extracto como activo.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



Fig. 35. Planta de *Cordia boissieri*.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIONES

- Las plantas que resultaron con mejor actividad (*Cordia boissieri*, *Schinus molle*, *Ceanothus coeruleus*, *Chrysactinia mexicana*, *Cyperus alternifolius*), fueron seleccionadas por su uso en la medicina tradicional. De esta manera nuestros resultados corroboran el uso popular de dichas plantas.
- El uso del método de bioautografía resultó de gran utilidad para el fraccionamiento biodirigido de extractos con actividad antimicrobiana.
- El fraccionamiento biodirigido de extractos de hojas de *Cordia boissieri* permitió identificar varias fracciones activas y el aislamiento de un compuesto activo puro.
- La CMI del compuesto puro obtenido de hojas de *Cordia boissieri* es de 62.5 µg/mL para la cepa resistente de *Staphylococcus aureus* y 31.25 µg/mL para las dos cepas

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

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

5.2 PERSPECTIVAS

- Completar la identificación del compuesto aislado.
- Aislar y caracterizar los componentes de las otras fracciones activas de *Cordia boissieri* identificadas en este trabajo.
- Realizar el fraccionamiento biodirigido de los extractos de las otras plantas activas por ejemplo: raíz de *Chrysactinia mexicana*, fruto de *Schinus molle*, raíz de *Ceanothus coeruleus*, raíz de *Cyperus alternifolius* y hojas de *Eupatorium cardiofolium* y *Eupatorium odoratum*.
- Aplicar el método de bioautografía para el fraccionamiento biodirigido de extractos activos contra otros microorganismos.

BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

BioSource International, Inc. USA. www.biosource.com

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

Brundtland, H. *Contengamos la resistencia microbiana*. OMS

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

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

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

- Chandrasekaran, M., Venkatesalu, V. Antimicrobial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* J. Ethnopharmacol. 91: 105-108. (2004).
- Chen, X., Ding, J., Ye, Y-M., Zhang, J-S. Bioactive abietane and seco-abietane diterpenoids from *Salvia prionitis*. J. Nat. Prod. 65: 1016-1020. (2002).
- Coelho de Souza, G., Haas, A. P. S., von Poser, G. L., Schapoval, E. E. S., Elisabetsky, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. J. Ethnopharmacol. 90: 135-143. (2004).
- Cordell, G. A. Biodiversity and drug discovery – a symbiotic relationship. Phytochemistry. 55: 463-480. (2000).
- Cos, P., Hermans, N., De Bruyne, T., Apers, S., Sindambiwe, J. B., Vanden Berghe, D., Pieters, L., Vlietinck, A. J. Further evaluation of Rwandan medicinal plant extracts for their antimicrobial and antiviral activities. J Ethnopharmacol. 79: 155-163. (2002).
- Cremin, P. A., Zeng, L. High-throughput analysis of natural product compound libraries by parallel LC-MS evaporative light scattering detection. Anal. Chem. 74 (21): 5492-5500. Nov. (2002).
- Díaz, J. L. Uso de las plantas medicinales de México. Monografías científicas II. Instituto mexicano para el estudio de las plantas medicinales. A. C. (1976).
- Dimayuga, R. E., Virgen, M., Ochoa, N., Antimicrobial activity of medicinal plants from Baja California Sur. (México). Pharmaceutical Biology. 36 (1): 33-43. (1998).
- Elgorashi, E.E., Staden, J. V. Pharmacological screening of six Amaryllidaceae species. J. Ethnopharmacol. 90: 27-32. (2004).
- Eloff, J. N. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? J Ethnopharmacol. 60: 1-8. (1998).
- El-Sayed, N. H., Aboutabl, F. A. K., Abdel-Allim, M. A., Mabry, T. J. Phenolics and flavonoids of *Cordia macleodii*. Rev. Latinoamer. Quím. 26 (1):30-35. (1998).

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

- Feresin, G. E., Tapia, A., Gimenez, A., Gutierrez Ravelo, A., Zacchino, S., Sortino, M., Schmeda-Hirschmann, G. Constituents of the Argentinian medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* 89: 73-80. (2003).
- Feresin, G. E., Tapia, A., Sortino, M., Zacchino, S., Rojas de Arias, A., Inchausti, A., Yaluff, G., Rodríguez, J., Theoduloz, C., Schmeda-Hirschmann, G. Bioactive alkyl phenols and embelin from *Oxalis erythrorhiza*. *J. Ethnopharmacol.* 88: 241-247. (2003).
- Franzblau, S. G., Witzig, R. S., McLaughlin, J. C., Torres, P., Madico, G., Henández, A., Degnan, M. T., Cook, M. B., Quenzer, V. K., Ferguson, R. M., Gilman, Rapid, low-technology MIC with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate alamar blue assay. *J. Clin. Microbiol.* 362-366. Feb. (1998).
- Gülcin, I., Küfreviöglu, O. I., Oktay, M., Büyükokuröglu, M. E. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.) *J. Ethnopharmacol.* 90: 205-215. (2004).
- Gundiza, M. Antimicrobial activity of essential oil from *Schinus molle* Linn. *Cent. Af. J. Med.* 39 (11): 231-4. Nov. (1993).
- Habibi, Z.; Eftekhar, F.; Samiee, K.; Rustaiyan, A. Structure and Antimicrobial Activity of a New Labdane Diterpenoid from *Salvia leriaefolia*. *J. Nat. Prod.* 63(2): 270-1. (2000).
- Hawser S. P., Jessup, C., Vitullo, J., Ghannoum, M. A. Utility of 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenyl-amino)carbonyl)-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) and minimum effective concentration assays in the determination of antifungal susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to the lipopeptide class of compounds. *J. Clin. Microbiol.* 2738-2741. Jul. (2001).
- Haznedaröglu, M. Z., Karabay, N. U., Zeybek, U. Antibacterial activity of *Salvia tomentosa* essential oil. *Fitoterapia.* 72: 829-831. (2001).

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

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

- Matsuse, I. T., Lim, Y. A., Hattori, M., Correa, M., Gupta, M. P. A search for anti-viral properties in panamanian medicinal plants. The effects on HIV and its essential enzymes. *J. Ethnopharmacol.* 64: 15-22. (1999).
- Mendieta, R. M., Del Amo, R. S. *Plantas .medicinales del estado de Yucatán.* (1981).
- Mitscher, L. A., Pillai, S. P., Gentry, E. J., Shankel, D. M. *Multiple Drug Resistance.* John Willey & Sons, Inc. (1999).
- Molina Salinas, G. M. Aislamiento y caracterización de compuestos con actividad bactericida y/o bacteriostática de plantas del noreste de México sobre cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensibles y multidrogorresistentes. Tesis doctoral. Facultad de Medicina. U.A.N.L. Dic. (2004)
- Morel, A. F., Araujo, C. A., Da Silva, U. F., Hoelzel, S. C.S.M., Záchia, R., Bastos, N. R. Antibacterial cylopeptide alkaloids from the bark of *Condalia buxifolia*. *Phytochemistry.* 61: 561-566. (2002).
- Murphy, M. C. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Reviews.* 564-582. Oct. (1999).
- Navarro, V., Rojas, G., Delgado, G. and Lozaya, X. Antimicrobial compounds detected in *Bocconia arborea* Extracts by a direct bioautographic method. *Arch. Med. Research.* (29)2: 191-194. (1998).
- NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twelfth informational supplement. NCCLS document M100-S12 [ISBN 1-56238-454-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002
- Newman, D. J., Cragg, G. M. and Snader, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 66: 1022-1037. (2003).
- Nicolaou, K. C., Sorensen, E. J. and Winssinger, N. The art and science of organic and natural products synthesis. *J. Chem. Educ.* 75. (10): 1225-1258. Oct. (1998).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Salvat, A., Antonnacci, L., Fortunato, R. H., Suarez, E.Y., Godoy, H.M. Screening of some plants from northern Argentina for their antimicrobial activity. *Lett. Appl. Microbiol.* 32: 293-297. (2001).
- Sato, Y., Suzaki, S., Nishikawa, T., Kihara, M., Shibata, H., Higuti, T. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* 72: 483-488. (2000).
- SINAIS (Sistema nacional de información en salud), México.(20002).
- Singh, B., Sahu, P. M., Singh, S. Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids from *Helliotropium subulatum*. *Fitoterapia.* 73: 153-155. (2002).
- Springfield, E. P., Amabeoku, G., Weitz, F., Mabusela, W., Johnson, G. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. *Phytomedicine.* 10 (5): 434-439. Jun. (2003).
- Tada, Y., Shikishima, Y., Takaishi, Y., Shibata, H., Higuti, T., Honda, G., Ito, M., Takeda, Y., Kodzhimatov, O. K., Ashurmetov, O., Ohmoto, Y. Coumarins and γ -pyrane derivatives from *Prangos pabularia*: antibacterial activity and inhibition of cytokine release. *Phytochemistry.*59:649-654. (2002).
- The world health report 2004, WHO.
- Tsao, Sm., Yin Mc. In vitro activity of garlic oil and four diallyl sulphides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 47(8): 565-73. May. (2001).
- Tyler, V. E. Phytomedicines: Back to the future. *J. Nat. Prod.* 62: 1589-1592. (1999).
- Ulubelen, A., Öksüz, S., Topcu, G., Goren, A. C., Voelter, W. Antibacterial diterpenes from the Roots of *Salvia blepharochlaena*. *J. Nat. Prod.* 64 (4): 549-551. April. (2001).
- Verastegui, M. M. A. Evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos de agaves y su acción sobre tigmotropismo y dimorfismo de *Candida albicans*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biologicas. U.A.N.L. Jun. (2000).

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

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

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

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

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

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Luis Alejandro Pérez López

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Química Analítica

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

Área de Estudio: Química Analítica

Biografía:

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

Escolaridad: Egresado de:

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

Grado obtenido: Químico Bacteriólogo Parasitólogo.

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

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

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



