

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DE *Ceanothus coeruleus* PARA LA
OBTENCIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA

Por
Q.F.B. DAVID ARTURO SILVA MARES

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

AGOSTO, 2007

**FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DE *Ceanothus coeruleus* PARA LA
OBTENCIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

Aprobación de Tesis:

DRA. NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES
Directora de Tesis

DR. LUIS ALEJANDRO PÉREZ LÓPEZ
Co-Director de Tesis

DRA. VERÓNICA MAYELA RIVAS GALINDO
Co-Director de Tesis

DR. DIONICIO GALARZA DELGADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

**FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DE *Ceanothus coeruleus* PARA LA
OBTENCIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

Presentado por:

Q.F.B. DAVID ARTURO SILVA MARES

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Noemí Waksman de Torres y la Co-dirección del Dr. Luis Alejandro Pérez López y la Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo.

DIRECTORA

Dra. Noemí Waksman de Torres

Co-Directores

Dr. Luis Alejandro Pérez López

Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo

RESUMEN

Q.F.B. David Arturo Silva Mares

Fecha de graduación: Agosto, 2007

Universidad Autónoma de Nuevo León
Faculta de Medicina

Título de estudio: FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DE *Ceanothus coeruleus*
PARA LA OBTENCIÓN DE UN COMPUESTO CON ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA

Número de páginas: 73

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

Área de estudio: Química Analítica

Propósito y Método del Estudio: Los antibióticos representan uno de los más grandes avances en la historia del hombre, desafortunadamente la aparición de microorganismos drogoresistentes se ha convertido en un problema para el tratamiento de enfermedades infecciosas, entre las cuales se encuentran las que atacan el sistema respiratorio. Algunos de los principales microorganismos causantes de enfermedades respiratorias son: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *pnuemoniae* y *Staphylococcus aureus* entre otros. Los microorganismos antes mencionados han presentado en los últimos años, señales importantes de continua drogoresistencia, por lo que es importante la investigación de nuevos recursos para el tratamiento de dichas enfermedades infecciosas. Entre los esfuerzos para combatir dicho problema se encuentra el desarrollo de nuevos antimicrobianos a partir de compuestos activos de plantas usadas en la medicina popular. El propósito de esta investigación consistió en aislar un compuesto con actividad antimicrobiana, en contra de una cepa drogoresistente de *Staphylococcus aureus* a partir de métodos cromatográficos biodirigidos mediante bioensayos.

Contribuciones y Conclusiones: Los extractos diferenciales de *C. coeruleus* resultaron con actividad contra una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a penicilina. El fraccionamiento biodirigido *C. coeruleus* monitoreado por la técnica de bioautografía permitió aislar un compuesto puro identificado como epigalocatequina, que si bien no demostró actividad en el método de microdilución en placa fue activo en bioautografía.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS

Dra. Noemí Waksman de Torres

El individuo ha luchado siempre para no ser absorbido por la tribu. Si lo intentas, a menudo estarás solo, y a veces asustado. Pero ningún precio es demasiado alto por el privilegio de ser uno mismo.

Friedrich Nietzsche

La vida es una carrera de resistencia, no de velocidad.

Mi Tonali entre sueños

DEDICATORIA

Cuando era niño mi jefa me dijo: “quiero sentirme orgullosa de mijo...”

Con mucho amor primeramente para las dos personas que me jugaron la pequeña broma de la vida, jamás pero de verdad jamás me sentiré lo suficientemente satisfecho de pagarles todas las enseñanzas que ustedes me han regalado, papá gracias por heredarme el valor de hacer las cosas aunque tengas miedo y siempre aguantar pase lo que pase, mamá gracias por insistirme siempre en buscar el punto medio de las cosas... y si no te preocupes ya comí. En segundo lugar a mis compañeros de broma Alex, Juan y Tere a ustedes también les debo mucho de las ideas que traigo aquí en mi cabeza, es un honor compartir la misma sangre con ustedes, a todos los traigo cargando conmigo todos los días de mi vida, aquí adentro ya saben donde.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora la Dra. Noemí Waksman, por compartir conmigo sus conocimientos, brindarme la confianza y el gran apoyo que me ofreció para llegar a cumplir mi objetivo.

A mi co-asesor y amigo el Dr. Alejandro Pérez por estar conmigo en las buenas, en las malas y aun peores, ayudarme inclusive en cosas que no le correspondían.

A mi co-asesora la Dra. Verónica Rivas por toda su ayuda, principalmente cuando más la necesitaba además de esa buena vibra que transmite.

A la Tec. Ivonne Carrera que me aguantó durante dos años en el laboratorio de extracción y que me ayudó tanto durante toda la parte experimental.

A las secretarias Martha, Vero, Maribel y Gloria por facilitarme material tanto didácticas como de laboratorio.

A los maestros, doctores y en general a toda la familia de química analítica que me ayudaron en mi formación académica Dra. Ma. De la Luz, Dra. Roció Castro, Dr. Ricardo Salazar, Dra. Norma Cabazos, Dra. Roció Álvarez, Dra. Yareli de Caballero, Dr. Adolfo Caballero, Dra. Rosalía Ramírez M.C. Lidia Natcha, M.C. Idalia Carmona, M.C. Blanca Alicia, M.C. Ricardo Lucio, M.C. Anabel Torres, M.C. Lucia Ceniceros y Q.C.B. Estela Pozos gracias muchas gracias por su respectivo granito de arena.

Por supuesto agradecer a todas las becarias Caty, Idalia, Isis, Perla, Luz María, María de la Luz, Adriana, Jessica, Lupita y Samantha que en algún momento me apoyaron con la realización de la parte practica en el laboratorio.

Quiero agradecer de todo corazón también a mis compañeros y amigos de posgrado que compartimos el cubículo, por que además de ser muy buenos compañeros llegamos a formar casi casi un grupo de apoyo para estudiantes de posgrado, con necesidad de consuelo en los momentos difíciles sinceramente sin ustedes Grace, Perikita, Alice, Brend, Lili, recientemente Magdis, y por supuesto mi entena Jhon me hubiera vuelto más amargado de lo que estoy.

A mis amigos no químicos el Hassanas, Cintya, Marilia, Victor, Boer, Cris-tales, Uryu, los Chio, Abuelo y Marlen que siempre me preguntaban como iba con mi proyecto aunque nunca supieron o entendieron que era lo que hacia realmente.

Quiero agradecer también a Yael C. de la Torre por regalarme un poco de paz, ternura y las ganas de dejar ese, mi vicio maldito de andar correteando soles que no derriten hielo.

Por último pero no menos importante quiero agradecer al CONACYT por el apoyo brindado a través de su proyecto 40236.

ÍNDICE

	Página
TABLA DE CONTENIDO	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	XVII
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Problemática Actual con los Antimicrobianos	1
1.2 Papel Clave de los Productos Naturales en el Cuidado de la Salud	3
1.3 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana en Plantas	5
1.4 Características Generales del Genero <i>Ceanothus</i>	9
1.5 Justificación	10
1.6 Objetivo general	11
1.7 Objetivos Específicos	11
2 MATERIAL Y MÉTODOS	12
2.1 Material	12
2.2 Equipo	14
2.3 Reactivos	15
2.3.1 Solventes	15
2.3.2 Reactivos Especiales	16
2.3.3 Antimicrobianos	16
2.3.4 Medios de Cultivo	16
2.4 Material Biológico	17
2.4.1 Microorganismos	17
2.5 Condiciones Utilizadas para la Bioautografía	17

	Página
2.6 Condiciones de Análisis para CLAR FR- C18	17
2.7 Colecta de la Planta	19
2.8 Obtención de los Extractos Metanólicos	19
2.9 Determinación de Actividad Antimicrobiana de los Extractos Obtenidos	20
2.9.1 Preparación de las Soluciones del Extracto	20
2.9.2 Preparación del Microorganismo	20
2.9.3 Preparación de Controles	21
2.9.3.1 Preparación de Antibióticos	21
2.9.3.2 Control de Solvente	21
2.9.3.3 Control de Turbidez y Oxido Reducción	21
2.9.3.4 Control de Medio de Cultivo y Crecimiento	21
2.9.4 Descripción de la Técnica de Microdilución en Placa	21
2.10 Extracción Diferencial del Extracto Metanólico de la Corteza de Raíz.	23
2.11 Evaluación de la Actividad Antibacteriana Mediante Técnica de Microdilución en Placa de las Fracciones Obtenidas de la Corteza de Raíz.	23
2.12. Evaluación Mediante Bioautografía de la Actividad Antimicrobiana de la Fracción Butanólica Obtenida de la Corteza de Raíz.	24
2.13 Aislamiento Biodirigido de la Corteza de Raíz de <i>C. coeruleus</i>	25
2.13.1 Extracto Butanólico	25
2.13.1.1 Columna Lobar de Baja Presión en Fase Reversa C18 CLFR5	25
2.13.1.2 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de las Fracciones Obtenidas de la Columna CLFR5	25
2.13.1.3 Análisis por CLAR FR C-18 de las Fracciones Obtenidas de la Columna CLFR5	26

	Página
2.13.2 Extracto de Acetato de Etilo	26
2.13.2.1 Columna Flash Silicagelgel CFSG3	27
2.13.2.2 Evaluación Mediante Bioautografía de la Actividad Antimicrobiana de las Fracciones Obtenidas de la columna CFSG3	28
2.13.2.3 Análisis por CLAR FR C-18 de las Fracciones Obtenidas de la Columna CFSG3	28
2.13.3.1 Columna Lobar de Baja Presión en Fase Reversa C18 CLFR15	29
2.13.3.2 Evaluación Mediante Bioautografía de la Actividad Antimicrobiana de Fracciones Obtenidas de la Columna CLFR15	29
2.13.3.3 Análisis por CLAR FR C-18 de las Fracciones Obtenidas de la Columna CLFR15	30
2.13.4.1 Columna Lobar de Baja Presión en Fase Reversa C18 CLFR28	30
2.13.4.2 Análisis por CLAR FR C-18 de las Fracciones Obtenidas de la columna CLFR28	31
2.13.5.1 Columna CE6 con Sephadex Lipofílico LH-20	31
2.13.5.2 Análisis de las Fracciones Obtenidas de la Columna de Exclusión Molecular CE6 por CLAR FR C-18	31
2.13.6.1 CLAR FR C-18 Preparativa de CSP12, CSP13, CSP14, CSP15 y CSP16	31
2.13.6.2 Análisis de las Fracciones Obtenidas de las Columnas Preparativas de CSP12 a CSP16 por CLAR FR C-18	32
2.14. Elucidación estructural del Compuesto Activo Aislado.	33
2.14.1 Análisis de Pureza	33
2.14.2 Espectroscopia de Masas	33
2.14.3 Espectrofotometría de UV-Vis	33
2.14.4 Espectroscopia de RMN	34

	Página
2.15 Determinación de la CMI del Compuesto Aislado.	34
3 RESULTADOS	35
3.1 Obtención de los Extractos Metanólicos.	35
3.2 Determinación de la Actividad Antimicrobiana de los Extractos Obtenidos.	36
3.3 Extracción Diferencial del Extracto Metanólico de la Corteza de Raíz	36
3.4 Evaluación de la Actividad Antibacteriana Mediante Microdilución en Placa de las Fracciones Obtenidas de la Corteza de Raíz	37
3.5. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana Mediante Bioautografía de la Fracción Butanólica Obtenida de la Corteza de Raíz.	38
3.6 Aislamiento Biodirigido de la Corteza de Raíz de <i>C. coeruleus</i> .	39
3.6.1 Extracto Butanólico	39
3.6.1.1 Columna Lobar de Baja Presión en Fase Reversa C18 CLFR5	39
3.6.1.2 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de las Fracciones Obtenidas de la Columna CLFR5.	39
3.6.1.3 Análisis por CLAR FR C-18 de las Fracciones Obtenidas de la Columna CLFR5	40
3.6.2 Extracto de Acetato de Etilo	41
3.6.2.1 Columna Flash Silicagel CFSG3	41
3.6.2.2 Evaluación Mediante Bioautografía de la Actividad Antimicrobiana de las Fracciones Obtenidas de la columna CFSG3	42
3.6.2.3 Análisis por CLAR FR C-18 de las Fracciones Obtenidas de la Columna CFSG3	43
3.6.3.1 Columna Lobar de Baja Presión en Fase Reversa C-18 CLFR15	44
3.6.3.2 Evaluación Mediante Bioautografía de la Actividad Antimicrobiana de las Fracciones Obtenidas de la Columna CLFR15	45

	Página
3.6.3.3 Análisis por CLAR FR C-18 de las Fracciones Obtenidas de la Columna CLFR15	46
3.6.4.1 Columna Lobar de Baja Presión en Fase Reversa C18 CLFR28	47
3.6.4.2 Análisis por CLAR FR C-18 de las fracciones Obtenidas de la Columna CLFR28	47
3.6.5.1 Columna CE6 con Sephadex Lipofílico LH-20	49
3.6.5.2 Análisis por CLAR FR C-18 de las Fracciones Obtenidas de la Columna de Exclusión Molecular CE6.	49
3.6.6.1 CLAR FR C-18 preparativa de CSP12, CSP13, CSP14, CSP15 y CSP16	49
3.6.6.2 Análisis de las Fracciones Obtenidas de la Columnas Preparativas de CSP12 a CSP16 por CLAR FR C-18	50
3.7. Elucidación Estructural del Compuesto Activo.	53
3.7.1 Análisis de Pureza	53
3.7.2 Espectrometría de Masas	55
3.7.3 Espectrofotometría UV-Vis	56
3.7.4 Espectroscopia de RMN	57
3.8 Determinación de la CMI del Compuesto Aislado.	60
4 DISCUSIÓN	61
5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	70
5.1 Conclusiones	70
5.2 Perspectivas	71
BIBLIOGRAFÍA	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Actividad Antimicrobiana de <i>C. coeruleus</i> en contra de Microorganismos que afectan el tracto respiratorio.	5
2	Sistema de eluentes A	18
3	Sistema de eluentes de columna CLFR5	25
4	Sistema de eluentes de columna CLFSG3	28
5	Sistema de eluentes de columna CLFR15	29
6	Sistema de eluentes de columna CLFR28	30
7	Sistema de eluentes de CLAR preparativo	32
8	Porcentajes de recuperación de extractos de corteza, pulpa y raíz entera de <i>C. coeruleus</i>	35
9	Resultados de la microdilución en placa de los extractos de corteza, pulpa y raíz entera de <i>C. coeruleus</i>	36
10	Porcentajes de recuperación del extracto masivo de la corteza de <i>C. coeruleus</i>	36
11	Porcentajes de recuperación de los extractos diferenciales de la corteza de <i>C. coeruleus</i>	37
12	Resultados de la microdilución en placa de los extractos diferenciales de la corteza de <i>C. coeruleus</i>	37
13	Porcentaje de recuperación y R_f de inhibición de las fracciones obtenidas de la columna CLFR5	39
14	Porcentaje de recuperación y R_f de inhibición de las fracciones obtenidas de la columna CFSG3	42
15	Porcentaje de recuperación y R_f de inhibición de las fracciones obtenidas de la columna CLFR15	45
16	Fracciones colectadas de las corridas CSP12, CSP13, CSP14, CSP15 y CSP16	50
17	Fracciones que conforman la fracción CSPU1 bajo condiciones de análisis del inciso 2.13.6.1	53

18	Máximos y absortividad del compuesto CSPU1	57
19	CMI y R_f de inhibición del compuesto CSPU1	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diagrama de Flujo para el Aislamiento de Compuestos con Actividad Biológica	6
2	Diagrama de flujo para el aislamiento de un compuesto a partir del extracto de acetato de etilo	27
3	Bioautografía de la fracción butanólica sistema A inciso 2.5	38
4	Bioautografías de las fracciones activas de la columna CLFR5 sistema B inciso 2.5	40
5	Cromatograma de CLFR5 – F5 y del extracto Butanólico bajo condiciones de análisis A inciso 2.6	41
6	Bioautografías de las fracciones activas CFSG3 – F1 y acetato de etilo sistema B inciso 2.5	43
7	Cromatograma de la fracción activa CFSG – F1 bajo condiciones de análisis A inciso 2.6	44
8	Bioautografías de las fracciones activas de la columna CLFR15 y acetato de etilo sistema B inciso 2.5	46
9	Cromatogramas de las fracciones activas de columna CLFR15 bajo condiciones de análisis A inciso 2.6.	47
10	Cromatogramas de las fracciones de la columna CLFR28 bajo condiciones de análisis A inciso 2.6	48
11	Cromatograma de la fracción CE6 – F3 bajo condiciones de análisis B inciso 2.6	49
12	Cromatogramas de las fracciones de CSP12 a CSP16 bajo condiciones de análisis A inciso 2.6	51
13	Cromatograma y espectro de absorbancia del compuesto puro CSPU1 bajo condiciones de análisis A inciso 2.6	54
14	Cromatograma y espectro de masas de CSPU1	55
15	Espectro de absorbancia de CSPU1 a concentraciones de 0.1 y 0.01 g/mL	56
16	Espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, DEPT, HMQC y HMBC	57

17	Efectos nOe de CSPU1	59
18	Bioautografía de CSPU1 y extracto de acetato de etilo mediante sistema C inciso 2.5	60
19	Estructura del compuesto aislado CSPU1	68

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AL TLC	Aluminium Thin Layer Chromatography
AMH	Agar Mueller Hinton
ATCC	American Type Culture Collection
CF	Columna Flash
CLAR FR C-18	Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Fase Reversa de Octadecilsilano
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
g	Gramos
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
IMSS-NL/HE25	Instituto Mexicano del Seguro Social-Nuevo León/Hospital de especialidades 25
IR	Infrarrojo
Kg	Kilogramos
L	Litro
M.C.	Maestro en Ciencias
MDR	Multidrogoresistente
mg	Miligramos
MHZ	Mega Hertz
min	Minuto
mL	Mililitro
Mm	Milímetros
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
N.L.	Nuevo León

NCCLS	The National Committee for Clinical Laboratory Standards
nm	Nanometros
nOe	Nuclear Overhauser Effect
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAHO	Pan American Health Organization
Ppm	Partes por millón
R_f	Cociente de frentes
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RP-18	Reverse Phase de Octadecilsilano
rpm	Revoluciones por Minuto
Si-60	Sílica gel 60
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
WHO	World Health Organization
μL	Microlitro
μm	Micrómetros
%	Por ciento
%V/V	Por ciento Volumen Volumen

¹³CRMN Resonancia Magnética Nuclear de Carbono

¹HRMN Resonancia Magnética Nuclear de Protón

°C Grados Centígrados

CAPITULO 1

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Problemática Actual con los Antimicrobianos

Uno de los sucesos centrales en la historia terapéutica de la humanidad ha sido el descubrimiento y desarrollo de agentes antibióticos para el tratamiento de infecciones; la introducción de antibióticos ha ayudado a disminuir los índices de muertes causadas por enfermedades infecciosas (Walsh y col. 2005). Sin embargo, en nuestro mundo actual, las infecciones causadas por bacterias drogorresistentes representan una nueva y creciente amenaza para la sociedad, así como un real desafío para los médicos en la selección del antibiótico correcto a partir del arsenal terapéutico ya existente (Hu y col. 2004).

El continuo crecimiento de la resistencia a los antibióticos presentado por bacterias de las especies comúnmente involucradas en infecciones del tracto respiratorio, como son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, se ha convertido con el tiempo ya en un serio problema en lo concerniente al área clínica (Castiglione y col. 2007, Ma y col. 2001, Barsby y col. 2001). El *Streptococcus pneumoniae* es uno de los microorganismos más comunes causante de las enfermedades respiratorias, tales como neumonía y otitis media aguda, siendo esta bacteria patógena la causa del 40 % de otitis media aguda en el mundo (WHO y col. 2006), además *Streptococcus pneumoniae* puede presentar resistencia a varios tipos de antimicrobianos (Bay y col. 2004). De acuerdo con un estudio realizado en los Estados Unidos de Norteamérica, el 25% del total de las cepas aisladas de *Streptococcus pneumoniae*, resultaron ser resistentes a penicilina, lo cual representó un amplio incremento desde el año de 1980, ya que solo el 4% del total de estas especies aisladas había sido encontradas resistentes a penicilina en ese año (Castiglione y col. 2007, Ma y col. 2001). Un caso semejante es el de *Haemophilus influenzae*, que es un importante microorganismo causante de enfermedades humanas a lo largo del mundo, entre las cuales figuran infecciones crónicas del tracto respiratorio; éste es el microorganismo más frecuente de enfermedades tales como neumonía, meningitis y otitis media (WHO y col. 2003); además un estudio reciente reveló que algunas cepas de este microorganismo presentan resistencia a antimicrobianos tales como la ampicilina (Yildirim y col. 2005, Phan y col. 2003). Otro ejemplo es el *Staphylococcus aureus*, el cual es el responsable de casi la mitad de bacteremias que presenta MDR (Jarvest y col. 2002), así mismo presenta resistencia a la meticilina, siendo una de las bacterias más resistentes a tratamientos convencionales (Bagley y col. 2005); además se ha

encontrado que *S. aureus* es un patógeno nosocomial de alta incidencia, y que de las infecciones drogoresistentes adquiridas en los hospitales en el 2002, el 60% de éstas fueron provocadas por microorganismos resistentes a meticilina y el 20% provocado por microorganismos resistentes a vancomicina (Thomas y col. 2005).

Diversos estudios demuestran que las especies resistentes a la penicilina tienden a ser también resistentes a otros antibióticos, lo cual se ha tornado en un serio problema de multidrogorresistencia (MDR); si esta tendencia sigue como hasta ahora aquellos antibióticos que son comúnmente usados llegarán pronto a perder su efectividad (Xu, y col. 2005, Ma, y col. 2001).

1.2 Papel Clave de los Productos Naturales en el Cuidado de la Salud

El desarrollo y amplio uso de antibióticos, ha presentado ventajas y desventajas a través de los últimos años, motivos por los cuales se ha tenido que volver a buscar recursos indispensables a partir de los productos naturales (Iscan y col. 2002). Una reciente investigación estadística de productos naturales y sintéticos, ha revelado que el potencial para descubrir nuevos compuestos a partir de productos naturales no ha sido agotado, y representan un importante recursos para encontrar nuevas moléculas con interesantes potenciales terapéuticos, debido a que solo un pequeño porcentaje de las 350, 000 especies de plantas conocidas han sido estudiadas desde el punto de vista fitoquímico y farmacológico (Wolfender y col. 2003).

Investigadores en farmacognosia han demostrado que se pueden obtener productos de gran potencial bioactivo a partir de plantas en todo el mundo (Wolfender y col. 2003); estos productos bioactivos pueden tener una enorme importancia económica, particularmente química: pueden ser usados como patrones para sintetizar nuevos medicamentos, como herramientas biológicas o farmacológicas, materia prima para la producción de antibióticos, y excipientes, solo por mencionar algunas; otro dato importante, es que las poblaciones rurales de los países en vías de desarrollo, están más dispuestas a los sanadores tradicionales y sus tratamientos, debido a que estos son más accesibles, y de un costo económico menor (Shale, y col. 1999, Eloff y col. 2001); un claro ejemplo de esta situación en México, es observado en el caso de *Tagetes lucida*, la cual es una planta que ha sido empleada ampliamente desde tiempos prehispánicos hasta la actualidad, en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y disminución de los efectos de la resaca, entre otras (Céspedes y col. 2006).

Cuando comparamos la información que se puede obtener de los productos naturales contra las librerías de sustancias sintéticas, los productos naturales ofrecen mayores perspectivas en cuanto al número de antibióticos por descubrir (Pieters y col. 2005). Es por tal razón, que la comunidad científica considera importante continuar con la investigación en el área de productos naturales, especialmente de extractos de plantas (Zhu y col. 2004).

Concientes de dicha problemática, dentro de las líneas de investigación desarrolladas en el Departamento de Química Analítica en la Facultad de Medicina, se investigó la actividad antibacteriana de plantas del noreste de México, encontrando entre otros, que

el extracto crudo de la raíz de *Ceanothus coeruleus* mostró actividad antibacteriana en contra de cepas resistentes de *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae* (G.M. Molina-Salinas y col. 2007).

Tabla 1- Actividad antimicrobiana de *C. coeruleus* en contra de microorganismos que afectan el tracto respiratorio.

PARTE DE LA PLANTA	SOLVENTE	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA, CMI (µg/mL) DE <i>Ceanothus coeruleus</i>					
		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
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

1.3 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de las Plantas

Para poder obtener los constituyentes explotables de una planta, es necesario involucrar un trabajo interdisciplinario en botánica, farmacognosia, farmacología, química, toxicología y puede ser formulada como sigue:

- Selección, colección, identificación botánica y preparación del material de la planta.
- Extracción con solventes apropiados y análisis preliminares.

- Depuración biológica, farmacológica y química (LC/UV/MS) de extractos crudos.
- Separación cromatográfica de constituyentes puros bioactivos guiados por bioensayos.
- Determinación estructural.
- Análisis y perfiles farmacológicos de compuestos puros y test toxicológicos.
- Síntesis parcial o total y preparación de derivados relacionados con estructura y actividad.

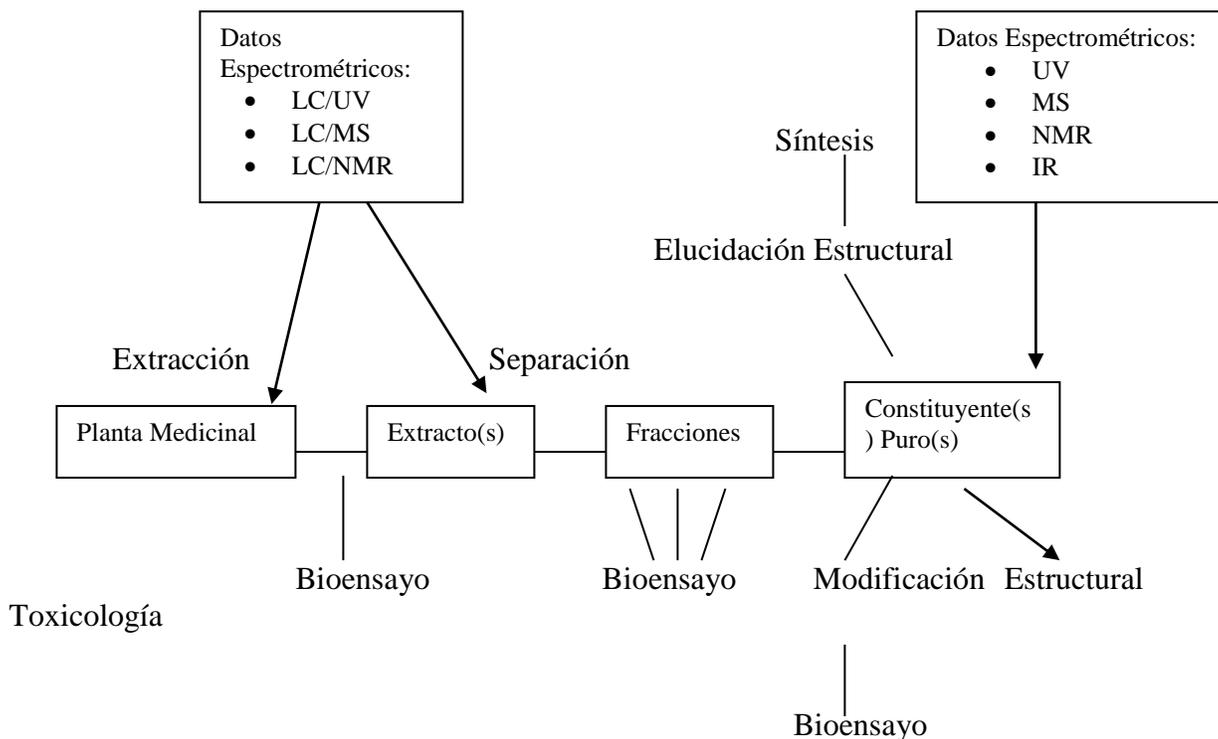


FIGURA 1. Diagrama de flujo para el aislamiento de compuestos con actividad biológica.

Para la depuración de la actividad biológica de plantas es crucial la facilidad y viabilidad del bioensayo para su monitoreo. El sistema de prueba debe ser idealmente simple, rápido, reproducible y económico para su detección. Cuando se está decidiendo qué bioensayo utilizar en la investigación de los constituyentes de una planta, el primer paso es elegir un organismo blanco apropiado; estos pueden ser microorganismos, insectos, crustáceos, moluscos, extractos de sistemas subcelulares (enzimas, organelos), cultivos celulares de humanos o de origen animal, extracciones de órganos de vertebrados o animales completos (Hostettmann y col. 1996).

La complejidad del bioensayo debe ser elegido en función de las facilidades, recursos y personal disponible; innumerables investigadores han empleado distintos métodos de tamizaje para detectar la actividad antimicrobiana en plantas. Sin ser la excepción el departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina, ha utilizado dichos métodos para este mismo fin; un claro ejemplo de esto es el trabajo realizado por G.M. Molina-Salinas y col, que en el 2005 empleó diversos métodos para el desarrollo de su tesis doctoral, la cual consistió en el aislamiento y caracterización de compuestos de plantas del noreste de México con actividad contra cepas de *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae*; dentro de estos métodos se encuentra la bioautografía que es rápida y barata; esta técnica se apoya en la difusión y cromatografía y permite la localización de la actividad antimicrobiana de un extracto. 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 y por ello es muy usada en la actualidad; sin embargo, la bioutografía se ve limitada en gran medida a su uso

cualitativo; por este motivo es necesario hacer uso de otras técnicas que aunque son más complejas aportan mayores y mejores resultados cuantitativos.

Una técnica que presenta tales características conocida como microdilución en placa, es ampliamente utilizada para determinar la CMI de compuestos antimicrobianos; cabe mencionar, que el resultado final de la técnica, es altamente dependiente de la metodología, la cual debe controlarse perfectamente para poder lograr resultados adecuados y reproducibles (PAHO y col. 2005).

Así mismo, una de las herramientas utilizadas para facilitar la lectura de los bioensayos, es el uso de colorantes vitales que permiten una mejor observación de la proliferación celular in vitro, entre los que se encuentran el bromuro de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), el cual presenta un color púrpura, si se encuentra en su estado reducido, o un color amarillo si se encuentra en estado oxidado; dicha coloración dependerá del grado de proliferación en el que se encuentran los agentes microbianos sometidos al estudio; así, la cantidad de bacterias en estado de proliferación, se puede determinar con una mayor facilidad (Lawrence y col. 2001).

Otro colorante eficiente para el monitoreo de proliferación celular y viabilidad habitualmente utilizado, es el alamar azul, el cual cambia de color azul a rosa en un ambiente reductor ocasionado por la proliferación bacteriana, dando como resultado, un color azul en el medio cuando hay inhibición microbiana, y rosa cuando hay un crecimiento microbiano. Este método es muy utilizado para el monitoreo de

micobacterias en microplacas, sin embargo, también se puede aplicar en otros tipos de microorganismos (Biosource 2005, Rojas cols. 2006).

1.4 Características Generales del Género *Ceanothus*

El resultado del estudio de G.M. Molina-Salinas y col, incrementó el interés acerca de las características del género *Ceanothus*, enfocándose aun más, en la especie *coeruleus*. El genero *Ceanothus* consta de 50 a 60 especies, las cuales están confinadas principalmente, en el Norte de América, con su centro de distribución ubicado en California, sin embargo, algunas especies como *C. coeruleus* pueden observarse extendiéndose tan lejos como Guatemala. Este género, comprende arbustos de 0.5 a 3 m de altura, la mayoría de las especies son de un color verde, las hojas de este género son opuestas o alternantes y pequeñas según la especie, típicamente miden entre 1 a 5 cm de largo, son simples y casi todas con márgenes dentados. Las flores pueden ser blancas, azules, púrpuras o rosas, y la semilla es una cápsula de tres lóbulos (Botany y col. 2005).

La especie *C. coeruleus* es conocida en el estado de Nuevo León como cochinchilla o chaquira, su hábitat es terrestre en asociación con bosques de pino-encino y otras litifoliadas, crece entre los 2000 y 2500 metros sobre el nivel del mar. Su distribución en los Estados Unidos Mexicanos es en los estados de Durango, Coahuila, Jalisco, Nuevo León y Michoacán. Su uso es de tipo forrajero, pues las hojas sirven como alimento al ganado pastoril, así como medicinal ya que las flores se usan en infusiones como antidiarreico y la raíz se usa para tratar la fiebre (SEMARNAT 2005). En la literatura se

ha encontrado que la especie *C. americanus* tiene propiedades astringentes y las extracciones acuosas presentan un color rojizo, el análisis químico de los extractos presenta un 6.49% de taninos y un 0.52% de un alcaloide, al cual se le conoce con el nombre de ceanotina; es importante mencionar también que se conoce información etnobotánica acerca de *C. americanus* ya que es de utilidad en el tratamiento para la sífilis y disminución de la fiebre (Herbal Homepage 2005).

Cong Li, en 1997, reportó que los extractos metanólicos de la corteza de la raíz de *C. americanus* presentaban una considerable inhibición de cultivos bacterianos, entre los cuales se encontraban cepas bacterianas de *S. aureus*; dichos extractos mostraban Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) que oscilaban entre 42 y 625 µg/mL; sin embargo, hasta el momento no se ha encontrado reportado en la literatura, algún artículo que hable sobre las propiedades antimicrobianas de la especie *C. coeruleus*, excepto el trabajo de G.M. Molina-Salinas y col.

1.5 Justificación

Debido al continuo aumento de la resistencia microbiana en la medicina, es urgente encontrar nuevos compuestos antimicrobianos. Es por eso que al conocer sobre la actividad no caracterizada de *C. coeruleus* en contra de patógenos resistentes, es necesario ahondar más en este punto para conocer con mayor detalle, las características y ventajas que puede ofrecer esta especie al respecto.

1.6 Objetivo general

Caracterizar los componentes activos aislados de la raíz de *C. coeruleus*.

1.7 Objetivos Específicos

1. Evaluar la parte de la raíz de *C. coeruleus*, que presente mayor actividad antibacteriana.
2. Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos diferenciales obtenidos de la parte de la raíz seleccionada en el objetivo uno.
3. Realizar el fraccionamiento biodirigido del extracto seleccionado en el objetivo dos.
4. Llevar a cabo la elucidación estructural del (los) compuesto(s) aislado(s) con mayor actividad obtenido en el objetivo tres.
5. Realizar pruebas de actividad y toxicidad con el (los) compuesto(s) aislado(s) en el objetivo tres.

CAPITULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material

- Puntillas 100 μ L, 1000 μ L, 200 μ L estériles con filtro
- Pipetas automáticas Transferpette[®] y Eppendorf[®] de 50, 100 y 1000 μ L
- Acrodiscos PTFE y PVDF 13 mm de diámetro con filtro de 0.22 μ m Millipore[®]
- Microplacas estériles de poliestireno de 96 pozos de fondo plano Costar[®]
- Cromatofolios AL TLC de Silicagel 60 F₂₅₄ Merck
- Columna Lobar LiChroprep[®] RP-18 (240 – 10 mm), Merck
- Columna Chromolith performance RP-18 (100 – 4.6 mm), Merck
- Columna Millipore Waters RCM (100 X 8 mm)
- Columna Luna Fenomenex C-18 (50 X 2 mm)
- Sephadex Lipofílico LH-20 SIGMA[®]

- Cartucho Extracción Fase Sólida C-18 Alltech
- Matraces Erlenmeyer Pyrex de 250, 500 y 1000 mL
- Matraces bola de 250, 500 y 1000 mL
- Vasos de precipitado
- Probetas de 10, 50, 250 y 500 mL
- Embudos de separación de 250 y 1000 mL
- Embudo de separación rápida
- Pipetas lineales de 5 y 10 mL
- Pipetas Pasteur
- Pomaderas de vidrio oscuras
- Viales de vidrio oscuros de 2 y 5 mL
- Tubos de ensaye 13 X 100, 18 X 150 mm
- Tubos con tapón de rosca 13 X 100 mm
- Tubos eppendorf de 2 mL
- Cubas CAMAG para desarrollar cromatografías TLC 21 X 5 X 10 cm
- Cubas CAMAG para desarrollar cromatografías TLC 13 X 8 X 10 cm
- Incubadora de huevos de *Artemia salina* rectangular 13.5 X 7.8 X 3.7 cm
- Capilares de 2, 5 y 10 μ L
- Cajas Petri desechables de plástico Medegen 15 X 100 mm
- Jeringas 1 y 5 mL Becton –Dickinson
- Papel filtro Whatman No 40
- Frascos con rosca de vidrio de 100 mL
- Jeringa de Vidrio Lucer- LOH 5 mL Yale®

2.2 Equipo

- Licuadora OSTERIZER® de 2 L
- Balanza granataria Scout Ohaus®
- Balanza analítica AND® modelo GR-120
- Rotavapor BÜCHI® modelo 461 con baño de agua BÜCHI RE 121
- Enfriador y Resirculador Hakke® Modelo K20
- Bomba de vacío Emerson® S55N H.P. 1/3
- Bomba peristaltica Bio Rad EP 1 Econo Pump
- Colector Automatico de Muestras Bio Rad 2128
- Centrifuga IEC® Micro MB
- Desecador con Adaptador para Vacío Pyrex®
- Autoclave Market Forge® Sterilmatic
- Campana de Flujo laminar Esco® Smari Control
- Campana de Extracción Lumistell® CEE 120
- Placa de Calentamiento digital Cimarel®
- Incubadora Shel Lab® Shaking Incubator
- Estufa Shel Lab® 1305U
- Refrigerador Daewoo® DFR N141D
- Agitador Heidolph Instruments® Unimax 1010
- Agitador de tubos eppendorf Ika MS1
- Congelador Vertical Magic Chef
- Lámpara de LUV Spectroline® ENF 260C

- Espectrómetro Sequoia Tuner 390
- Espectrómetro Beckman 7500
- Cromatógrafo de Líquidos Preparativo Waters LC 2000
- Cromatógrafo de Líquidos Waters con bomba 600, detector arreglo de diodos 2996, automuestreador Waters 717 plus
- Cromatógrafo de Líquidos Agilent Technology 1100, acoplado a Espectrómetro de Masas LCMSD SL Agilent Technology 6-1956B
- 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 con temperatura controlada por la unidad Eurotherm Bruker, equipado con una sonda de detección directa de 5 mm

2.3 Reactivos

2.3.1 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

- Metanol-d 99.98 % deuterado, Aldrich
- Nitrógeno gas de alta pureza, Praxair

2.3.2 Reactivos Especiales

- Alamar Blue de Biosource
- Silicagel 60 de tamaño de partícula 0.2 – 0.5mm, Merck®
- Bromuro de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio, Research Organics® (MTT)
- Sal de mar “instant Ocean”

2.3.3 Antimicrobianos

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

La oxacilina 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 en congelador hasta su uso.

2.3.4 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

2. 4 Material Biológico

2.4.1 Microorganismos

- *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
- Huevos de *Artemia salina*

2.5. Condiciones Utilizadas para la Bioautografía

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

Sistemas eluentes probados con tres minutos de saturación previa:

- A) Acetato de etilo:acetona:agua 25:8:2
- B) Acetato de etilo:metanol 1:7 + 1gota de ácido acético
- C) Acetato de etilo:metanol 2:7 + 1gota de ácido acético

2.6. Condiciones de Análisis para CLAR FR C-18

Las condiciones utilizadas en el equipo Waters bomba 600, detector arreglo de diodos 2996 fueron las siguientes:

A)

Columna	Chromolith FR-18 Merck
Flujo	1.0 mL/min.
Volumen de inyección	10 µL
Tiempo de corrida	30 minutos
Longitud de onda	230 nm
Gradiente	

TABLA 2. Sistema de eluentes A.

MINUTOS	% METANOL	% AGUA
---	6	94
1	6	94
2	12	88
11	15	85
12	30	70
15	30	70
16	100	0
19	100	0
20	6	94
30	6	94

Las condiciones utilizadas en el equipo Agilent Technology 6 – 1956B acoplado a Espectrómetro de Masas Agilent Technology 1100 fueron las siguientes:

B)

Columna	Luna Phenomenex C -18
Flujo	0.4 mL/min.
Volumen de inyección	10 µL
Tiempo de corrida	10 minutos
Ionización	Electrospray (-)
Eluente (Isocratico)	Metanol:agua (80:20) formiato de amonio 10 mM

2.7 Colecta de la Planta

La colecta de la raíz de *C. coeruleus*, se llevó a cabo en la localidad de Los Lirios, Arteaga, Coahuila, el 5 Julio del 2005. La identificación de la planta se realizó en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, donde se encuentra un espécimen con el número UNL - 024099.

2.8 Obtención de los Extractos Metanólicos

Después de colectadas las raíces, se les realizó un enjuague con agua a presión, se retiraron excesos de tierra, después se dejó secar a temperatura ambiente. Se molió por separado la corteza, pulpa y raíz entera de la planta en una licuadora. La extracción de la corteza, pulpa y raíz entera, anteriormente molidas, se llevó a cabo depositando las diferentes moliendas en matraces erlenmeyer de 1000 mL; por cada 100g de molienda a cada matraz se le adicionó 500 mL de metanol, se agitó durante 60 min a 150 rpm; al término de este tiempo, el macerado se filtró y se obtuvo el extracto metanólico; este

procedimiento se realizó en cinco ocasiones con la misma muestra, usando 250 mL de metanol y 30 minutos de agitación a 150 rpm. El extracto metanólico se evaporó a presión reducida en un rotavapor a 37°C , por último los concentrados se guardaron en frascos oscuros en un ambiente de nitrógeno bajo refrigeración, para su uso posterior en bioensayos.

2.9 Determinación de la Actividad Antimicrobiana de los Extractos Obtenidos

2.9.1 Preparación de las Soluciones del Extracto

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los tres diferentes extractos metanólicos, en contra de *S. aureus* resistente a penicilina con el método de microdilución en placa.

Se pesaron 2 mg de cada uno de los extractos, se disolvieron en 200 µL de DMSO, se agregaron 800 µL de CMH, estas soluciones se esterilizan por filtración con acrodiscos PTFE de 0.22 µm Millipore®.

2.9.2 Preparación del Microorganismo

Se sembraron colonias de *S. aureus* en AMH, se llevaron a incubación durante 24 horas a 37°C, una vez que transcurrió este tiempo se tomaron de tres a cuatro colonias, se depositaron en CMH para que fueran incubadas durante 24 horas a 37°C, posteriormente se tomó 50 µL de este caldo, y se inoculó en 3 mL de CMH, se dejó incubando durante 2 horas a 37°C, con agitación a una velocidad de 150 rpm, esto se llevó a cabo para alcanzar una turbidez de 0.5 del estándar Mc Farland; este último cultivo se diluyó 1:50 con CMH para obtener la solución de inoculación.

2.9.3 Preparación de Controles

2.9.3.1 Control de Antibióticos

Se prepararon soluciones acuosas de Oxacilina, y Vancomicina a una concentración de 256 µg/mL que se usaron como control negativo y positivo respectivamente, estas soluciones se esterilizaron por filtración con acrodiscos PVDF de 0.22 µm Millipore®.

2.9.3.2 Control de Solvente

Se tomaron 200 µL de DMSO, se diluyeron con 800 µL de CMH, esta solución se filtró con acrodisco PTFE de 0.22 µm Millipore® para esterilizar.

2.9.3.3 Control de Turbidez y Oxido Reducción

Para cada extracto se colocaron 100 µL de CMH y 100 µL de la solución de extracto correspondiente para obtener una concentración de 500 µg/mL .

2.9.3.4 Control de Medio de Cultivo y Control de Crecimiento

El control de medio de cultivo consistió en depositar 200 µL de CMH, dentro de dos pocillos de la microplaca. Para el control de crecimiento se usaron dos pocillos, en cada uno se depositaron 100 µL de inóculo bacteriano más 100 µL de CMH.

2.9.4 Descripción de la Técnica de Microdilución en Placa

Se tomó una microplaca de 96 pocillos, a todos los pocillos del perímetro se les agregaron 200 µL de agua bidestilada estéril, se depositaron 100 µL de CMH al resto de los pocillos, posteriormente se depositaron 100 µL de los extractos, de controles de

antibiótico y de solvente en los primeros pocillos de cada fila de la microplaca, se realizaron diluciones seriadas al doble, descartando los 100 μL de los últimos pocillos de cada carril, se adicionaron 100 μL del inóculo bacteriano previamente preparado a los pocillos que contenían los extractos, controles de antibiótico y controles de solvente, de modo que las concentraciones finales de cada extracto fueron de 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las concentraciones de Vancomicina y Oxacilina fueron de 64, 32, 16, 8, y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y por último las concentraciones de control de solvente (DMSO) fueron de 5, 2.5, 1.25 y 0.625, 0.312 % v/v.

Se prepararon los controles de turbidez, oxido reducción, medio de cultivo y crecimiento bacteriano como se describió previamente (2.9.3)

La microplaca se introdujo en una bolsa de plástico, con un algodón humedecido con agua bidestilada estéril, se incubó durante 24 horas a 37°C , se revisó el crecimiento bacteriano visualmente. La presencia de turbidez indicó crecimiento bacteriano, 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.

2.10 Extracción Diferencial del Extracto Metanólico de la Corteza de Raíz

Se procedió a realizar particiones líquido-líquido del extracto metanólico de corteza de raíz, con solventes de diferente polaridad; para ello se pesaron 60 g del extracto metanólico, se disolvieron con 450 mL de una solución metanol: agua destilada 1:4, se realizó la partición con hexano 8 X 115 mL, acetato de etilo 16 X 115 mL, y butanol 11 X 115 mL y finalmente se recuperó el residuo acuoso.

Los extractos de hexano, acetato de etilo, butanol y residuo, se evaporaron a sequedad a presión reducida a 37°C, se mantuvieron en frascos oscuros de vidrio bajo congelación hasta su uso.

2.11 Evaluación de la Actividad Antibacteriana Mediante Técnica de Microdilución en Placa de las Fracciones Obtenidas de la Corteza de Raíz

Se determinó la CMI de los extractos diferenciales de hexano, acetato de etilo, butanol y residuo acuoso, obtenidos en 2.10 mediante la técnica de microdilución en placa como se describió en el punto anterior 2.9. El residuo acuoso fue esterilizado, usando los acrodiscos PVDF 13 mm de diámetro con filtro de 0.22 µm Millipore®.

2.12. Evaluación Mediante Bioautografía de la Actividad Antimicrobiana de la Fracción Butanólica Obtenida de la Corteza de Raíz

La fracción butanólica fue disuelta con metanol y sembrada por duplicado, en cromatofolios de aluminio con silicagel 60 F₂₅₄ de 3 x 10 cm. La fase móvil usada se describió en 2.5 en el inciso A. Uno de los cromatofolios se usó como control para medir el R_f de cada mancha observada a simple vista y a través de la luz ultravioleta a 254 y 365 nm. El otro cromatofolio fue esterilizado con luz ultravioleta a 254 nm durante 15 minutos. Concluido este tiempo, se colocó una capa de AMH, sobre el cual se depositó 100 µL de un inóculo de *S. aureus* resistente a oxacilina, con una turbidez equivalente al estándar de 0.5 de Mc Farland; dicho estándar se preparó por inoculación de 3 a 5 colonias de *S. aureus* en 3 mL de CMH, se incubó a 37°C a 150 rpm hasta obtener la turbidez señalada. El cromatofolio se colocó en una caja Petri; además, se colocó un algodón húmedo, con agua destilada estéril, y un pequeño pedazo de AMH como control de esterilidad del medio y se incubó a 37°C por 18-24 horas. Se usó una solución acuosa de MTT a una concentración de 2.5 mg/mL para revelar el crecimiento bacteriano; una inhibición negativa, da como resultado una coloración altamente púrpura, y en caso de una inhibición negativa, una coloración amarilla.

2.13 Aislamiento Biodirigido de la Corteza de Raíz de *C. coeruleus*

2.13.1 Extracto Butanólico

2.13.1.1 Columna Lobar de Baja Presión en Fase Reversa C-18 CLFR5

Se tomó 0.5 g de extracto butanólico, se disolvió con 5 mL de metanol : agua 80:20, se filtró la muestra, el filtrado se sembró en una columna de baja presión Lobar RP – 18, de 310 x 20 mm, bajo las siguientes condiciones de elución.

TABLA 3. Sistema de eluentes de columna CLFR5.

NOMBRE DE LA FRACCIÓN	PROPORCIÓN DEL ELUENTE METANOL:AGUA	VOLUMEN DEL ELUENTE
CLFR5 – F1	0 : 100	50 mL
CLFR5 – F2	10 : 90	50 mL
CLFR5 – F3	20 : 80	50 mL
CLFR5 – F4	30 : 70	50 mL
CLFR5 – F5	40 : 60	50 mL
CLFR5 – F6	50 : 50	50 mL
CLFR5 – F7	100 : 0	50 mL

Se utilizó un flujo aproximado de 3 mL/min, las fracciones se evaporaron a sequedad a presión reducida a 37 °C, se mantuvieron en frascos oscuros de vidrio bajo congelación hasta su uso.

2.13.1.2 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de las Fracciones Obtenidas de la Columna CLFR5

Se evaluó la actividad antimicrobiana de todas las fracciones obtenidas de la columna CLFR5, contra la cepa de *Staphylococcus aureus* (IMSS-NL/HE25:01 resistente a oxacilina), por medio de la Bioautografía como se describió previamente (2.12), la fase móvil usada se describe en 2.5 en el inciso B.

2.13.1.3 Análisis por CLAR FR C-18 de las Fracciones Obtenidas de la Columna CLFR5

Las fracciones activas obtenidas de la columna, se sometieron a cromatografía analítica por CLAR FR C-18 para revisar pureza. Se utilizaron las condiciones de análisis A.

2.13.2 Extracto de Acetato de Etilo

A partir del extracto de acetato de etilo, se siguieron dos rutas para el aislamiento de un mismo compuesto:

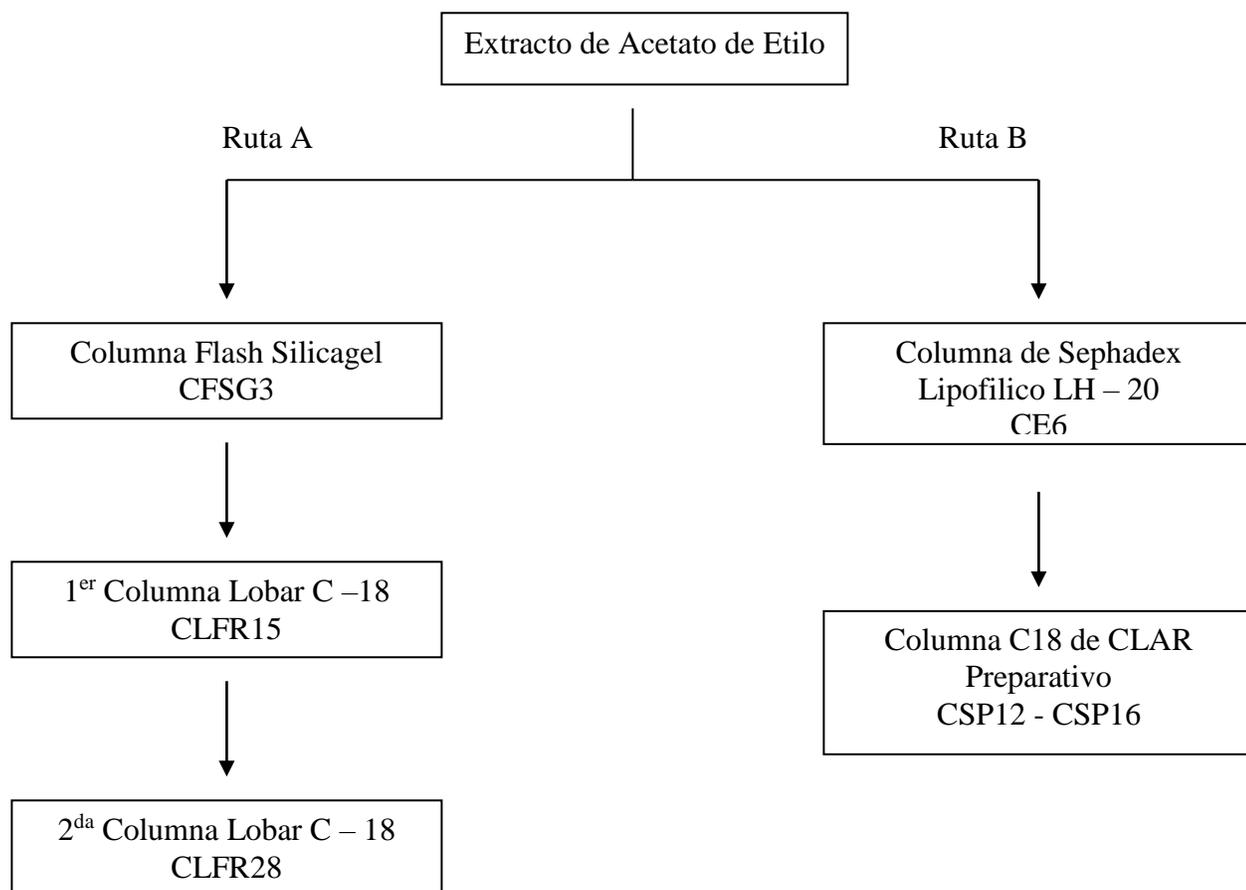


FIGURA 2. Diagrama de flujo para el aislamiento de un compuesto a partir del extracto de acetato de etilo.

2.13.2.1 Columna Flash Silicagelgel CFSG3

Se utilizó 100 g de silicagel 60, tamaño de partícula de 0.2 a 0.5 mm, se pesaron 2 g de la fracción de acetato de etilo; se utilizó el siguiente sistema de elución:

TABLA 4. Sistema de eluentes de columna CLFSG3.

NOMBRE DE LA FRACCIÓN	ELUENTE	VOLUMEN UTILIZADO
CFSG3 – F1	Acetato de Etilo	650 mL
CFSG3 – F2	Acetato de etilo: Metanol 1 : 1	600 mL
CFSG3 – F3	Acetato de etilo: Metanol 1 : 3	300 mL
CFSG3 – F4	Acetato de etilo: Metanol 1 : 5	300 mL
CFSG3 – F5	Acetato de etilo: Metanol 1 : 7	300 mL
CFSG3 – F6	Metanol	300 mL

Las fracciones obtenidas se evaporaron a sequedad a presión reducida en rotavapor a 37 °C, se mantuvieron en frascos ámbar de vidrio en congelación hasta su uso.

2.13.2.2 Evaluación Mediante Bioautografía de la Actividad Antimicrobiana de las Fracciones Obtenidas de la columna CFSG3

Se examinó la actividad contra la cepa de *S. aureus* resistente a oxacilina, (IMSS-NL/HE25:01), por medio de Bioautografía como se describió previamente (2.12), la fase móvil usada se describe en 2.5 en el inciso C.

2.13.2.3 Análisis por CLAR FR C-18 de las Fracciones Obtenidas de la Columna CFSG3

Las fracciones activas obtenidas de la columna CFSG3, se sometieron a cromatografía analítica por CLAR FR C-18 para revisar pureza. Se utilizaron las condiciones de análisis A.

2.13.3.1 Columna Lobar de Baja Presión en Fase Reversa C18 CLFR15

Se tomó 0.36 g de la fracción CFSG3 – F1 obtenida de la columna flash de Silicagel, se sometió a una columna de baja presión Lobar 240 x 10 mm de fase reversa C18 bajo las siguientes condiciones de elución.

TABLA 5. Sistema de eluentes de columna CLFR15.

NOMBRE DE LA FRACCIÓN	PROPORCIÓN DEL ELUENTE METANOL:AGUA	VOLUMEN DEL ELUENTE
CLFR15 – F1	10 : 90	20mL
CLFR15 – F2	20 : 80	40mL
CLFR15 – F3	30 : 70	40mL
CLFR15 – F4	40 : 60	40mL
CLFR15 – F5	50 : 50	50mL
CLFR15 – F6	60 : 40	30mL

La muestra se disolvió con 1 mL del primer eluyente. Se utilizó un flujo de 3 mL/min. Las fracciones se evaporaron a sequedad a presión reducida a 37 °C y se mantuvieron en frascos oscuros de vidrio bajo congelación hasta su uso.

2.13.3.2 Evaluación Mediante Bioautografía de la Actividad Antimicrobiana de Fracciones Obtenidas de la Columna CLFR15

Se evaluó la actividad antimicrobiana de todas las fracciones obtenidas de la columna de baja presión en fase reversa C18 con la cepa de *S. aureus* (IMSS-NL/HE25:01 resistente a oxacilina) por medio de bioautografía como se describió previamente (2.12), la fase móvil usada se describió en 2.5 en el inciso C.

2.13.3.3 Análisis por CLAR FR C-18 de las Fracciones Obtenidas de la Columna CLFR15

Las fracciones activas obtenidas de la columna CLFR15, se sometieron a cromatografía analítica por CLAR FR C-18 para revisar pureza. Se utilizaron las condiciones de análisis A.

2.13.4.1 Columna Lobar de Baja Presión en Fase Reversa C18 CLFR28

Se tomó 0.07 g de la fracción CLFR15-F3, se sometió a una columna de baja presión Lobar 240 x 10 mm de fase reversa C18 bajo las siguientes condiciones de elución.

TABLA 6. Sistema de eluentes de columna CLFR28.

NOMBRE DE LA FRACCIÓN	PROPORCIÓN DEL ELUENTE METANOL:AGUA	VOLUMEN DEL ELUENTE
CLFR28 – F1	10 : 90	65mL
CLFR28 – F2	20 : 80	40mL
CLFR28 – F3	25 : 75	40mL
CLFR28 – F4	30 : 70	38mL
CLFR28 – F5	35 : 75	28mL
CLFR28 – F6	100 : 0	40mL

La muestra se disolvió con 1 mL del primer eluyente 10:90. Se utilizó un flujo de 3.6 mL/min. Todas las fracciones fueron colectadas completas en matraces, a excepción de la fracción obtenida con la proporción metanol:agua (25:75) que se colectó cada dos mL en tubos de ensayo. El contenido de los tubos se evaporó a sequedad a presión reducida a 37 °C y se mantuvieron en frascos oscuros de vidrio bajo congelación hasta su uso.

2.13.4.2 Análisis por CLAR FR C-18 de las Fracciones Obtenidas de la Columna CLFR28

Las fracciones de la columna CLFR28 contenidas en los tubos de ensayo, se sometieron a cromatografía analítica por CLAR FR C-18 para revisar pureza. Se utilizaron las condiciones de análisis A.

2.13.5.1 Columna CE6 con Sephadex Lipofílico LH-20

Se tomaron 0.4 g de extracto de acetato de etilo, se disolvieron en 1.5 mL de metanol, se sembraron en una columna de Sephadex Lipofílico LH-20 de un volumen aproximado de 62.8 mL; se utilizó metanol 100% como eluente, se colectaron 20 fracciones de 25 mL cada una.

2.13.5.2 Análisis de las Fracciones Obtenidas de la Columna de Exclusión Molecular CE6 por CLAR FR C-18

Las fracciones de la columna CE6 fueron analizadas por cromatografía de alta resolución fase reversa, mediante el sistema analítico A.

2.13.6.1 CLAR FR C-18 preparativo de CSP12, CSP13, CSP14, CSP15 y CSP16

Se tomaron aproximadamente 0.06 g de la fracción tres de la columna CE6, se adicionaron 1.3 mL de una mezcla de metanol: agua 10:90, se filtró la solución; se hicieron 5 corridas en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución, con una columna Millipore Waters RCM (100 X 8 mm), con el siguiente sistema de eluentes.

TABLA 7. Sistema de eluentes de CLAR preparativo.

TIEMPO	% METANOL	% AGUA
---	10	90
4	10	90
5	20	80
8	20	80
9	25	75
14	25	75
15	30	70
18	30	70
19	100	0
25	100	0

2.13.6.2 Análisis de las Fracciones Obtenidas de las Columnas Preparativas de CSP12 a CSP16 por CLAR FR C-18

Las fracciones de las corridas CSP12 a CSP16, fueron analizadas por cromatografía de alta resolución fase reversa C18, mediante el sistema analítico A.

Se juntaron las fracciones purificadas de las cromatografías de CSP12 a CSP16, se rotuló como CSPU1; con este producto se realizaron análisis de pureza y estructura.

2.14. Elucidación estructural del Compuesto Activo Aislado

2.14.1 Análisis de Pureza

CSPU1 se disolvió en metanol grado HPLC, al cual se analizó por CLAR C18, mediante las condiciones de análisis A para verificar su pureza.

2.14.2 Espectroscopia de Masas

Se inyectó el Compuesto CSPU1, en el cromatógrafo de líquidos Agilent Technology 6- 1956B, acoplado a Espectrómetro de Masas Agilent Technolgy 1100, se utilizó condiciones de análisis B para obtener su peso molecular.

2.14.3 Espectroscopia UV-Vis

Se analizó CSPU1 a una concentración de 0.1 mg/mL disuelto con metanol, mediante espectrómetro Beckman DU 7500 en un rango de 230 a 600 nm, se determinaron los máximos de absorción y se calculó la absortividad con la formula de Lambert-Beer.

$$\text{Abs} = (\epsilon) (b) (c) \quad \therefore \quad \epsilon = \text{Abs} / (b) (c)$$

Abs = Absorbancia

ϵ = Absortividad molar ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$)

b = Ancho de la celda (cm)

c = Concentración de la solución (M)

2.14.4 Espectroscopia de RMN

Se disolvieron 5 mg de CSPU1 en metanol-*d*, se utilizó una sonda multinuclear de 5mm de detección directa, y un espectrómetro de RMN Bruker DPX400. Se realizaron los experimentos de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT-135, COSY ¹H-¹H, HMQC, HMBC y nOe diferencial.

2.15 Determinación de la CMI del Compuesto Aislado

Se determinó el R_f de la actividad antimicrobiana de CSPU1 con la cepa de *Staphylococcus aureus* (IMSS-NL/HE25:01 resistente a oxacilina) por medio de bioautografía como se describió previamente (2.12), la fase móvil usada se describió en 2.5 en el inciso C. Se determinó la CMI del compuesto aislado (CSPU1) por triplicado, mediante la técnica antes descrita de micro dilución en placa (2.9).

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 Obtención de los Extractos Metanólicos

De la extracción por separado de 20 g corteza, 20 g pulpa y 20 g raíz entera de *C. coeruleus*, se obtuvieron los siguientes resultados.

TABLA 8. Porcentajes de recuperación de los extractos de la corteza, pulpa y raíz entera de *C. coeruleus*.

PARTE DE LA PLANTA EXTRAÍDA	PESO DEL EXTRACTO	% DE RECUPERACIÓN
Corteza de Raíz	0.52 g	2.62 %
Pulpa de Raíz	1.92 g	9.59 %
Raíz Entera	3.27g	16.37%

3.2 Determinación de la Actividad Antimicrobiana de los Extractos Obtenidos

Se realizó la evaluación de la actividad antimicrobiana de corteza, pulpa y raíz entera de la planta *C. coeruleus* mediante la determinación de la CMI, los resultados se observan en la siguiente tabla.

TABLA 9. Resultados de la microdilución en placa de extractos de la corteza, pulpa y raíz entera de *C. coeruleus*.

CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO	RAÍZ ENTERA	CORTEZA	PULPA
500µg/mL	o	o	o
250µg/mL	o	o	o
125µg/mL	•	o	•
62.5µg/mL	•	•	•
31.25µg/mL	•	•	•

o= Inhibición

* = Inhibición Parcial

•=No Inhibición

3.3 Extracción Diferencial del Extracto Metanólico de la Corteza de Raíz

Se realizó una segunda extracción Metanólica de la corteza de raíz de *C. coeruleus*, a la cual se le llamó extracción masiva debido a que se usó 372 g de corteza.

TABLA 10. Porcentajes de recuperación del extracto masivo de la corteza de *C. coeruleus*

PARTE DE LA PLANTA EXTRAÍDA	PESO	% DE RECUPERACIÓN
Corteza de Raíz	60.40 g	16.13 %

Posteriormente se realizaron las extracciones diferenciales de los 60.4 g de extracto metanólico masivo obteniéndose los siguientes resultados.

TABLA 11. Porcentajes de recuperación de los extractos diferenciales de la corteza de *C. coeruleus*

SOLVENTE DE EXTRACCIÓN	PESO	% DE RECUPERACIÓN
Hexano	4.88 g	8.08 %
Acetato de Etilo	7.45 g	12.33 %
Butanol	10.66 g	17.65 %
Residuo Acuoso	18.73 g	31.01 %

3.4 Evaluación de la Actividad Antibacteriana Mediante Microdilución en Placa de las Fracciones Obtenidas de la Corteza de Raíz

Se realizó la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos diferenciales de hexano, acetato de etilo, butanol y residuo acuoso de corteza de *C. coeruleus*, mediante la determinación de la CMI que se observan en la siguiente tabla 13.

TABLA 12. Resultados de la microdilución en placa de los extractos diferenciales de la corteza de *C. coeruleus*.

CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO	HEXANO	ACETATO DE A TILO	BUTANOL	RESIDUO ACUOSO
500µg/mL	o	o	o	o
250µg/mL	●	*	*	*
125µg/mL	●	●	●	●
62.5µg/mL	●	●	●	●
31.25µg/mL	●	●	●	●

o= Inhibición

* = Inhibición Parcial

●=No Inhibición

3.5. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana Mediante Bioautografía de la Fracción Butanólica Obtenida de la Corteza de Raíz

Se realizó bioautografía de la fracción butanólica de la corteza de raíz (página 23), se observó inhibición entre los R_f de 0.0 hasta 0.42.



FIGURA 3. Bioautografía de la fracción butanólica sistema A inciso 2.5.

3.6 Aislamiento Biodirigido de la Corteza de Raíz de *C. coeruleus*

3.6.1 Extracto Butanólico

3.6.1.1 Columna Lobar de Baja Presión en Fase Reversa C18 CLFR5

De la columna CLFR5 se obtuvieron siete fracciones, los porcentajes de recuperación se pueden observar en la tabla 13.

3.6.1.2 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de las Fracciones Obtenidas de la Columna CLFR5

Se evaluó la actividad antimicrobiana de todas las fracciones obtenidas de la columna CLFR5, se presentan las inhibiciones en la tabla 13 y en la figura 4.

TABLA 13. Porcentaje de recuperación y R_f de inhibición de las fracciones obtenidas de la columna CLFR5.

NOMBRES DE LAS FRACCIONES	PESO	PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN	R_f DE INHIBICIÓN
CLFR5 – F1	0.00 g	0.0 %	No presenta Inhibición
CLFR5 – F2	0.02 g	4.5 %	De 0.17 a 0.43
CLFR5 – F3	0.00 g	0.0 %	No presenta Inhibición
CLFR5 – F4	0.01 g	1.5 %	De 0.0 a 0.24
CLFR5 – F5	0.07 g	13.4 %	De 0.18 a 0.25
CLFR5 – F6	0.11 g	21.4 %	No presenta Inhibición
CLFR5 – F7	0.26 g	51.7 %	No presenta Inhibición
Control de Butanol	-----	-----	De 0.08 a 0.23 y De 0.65 a 0.8

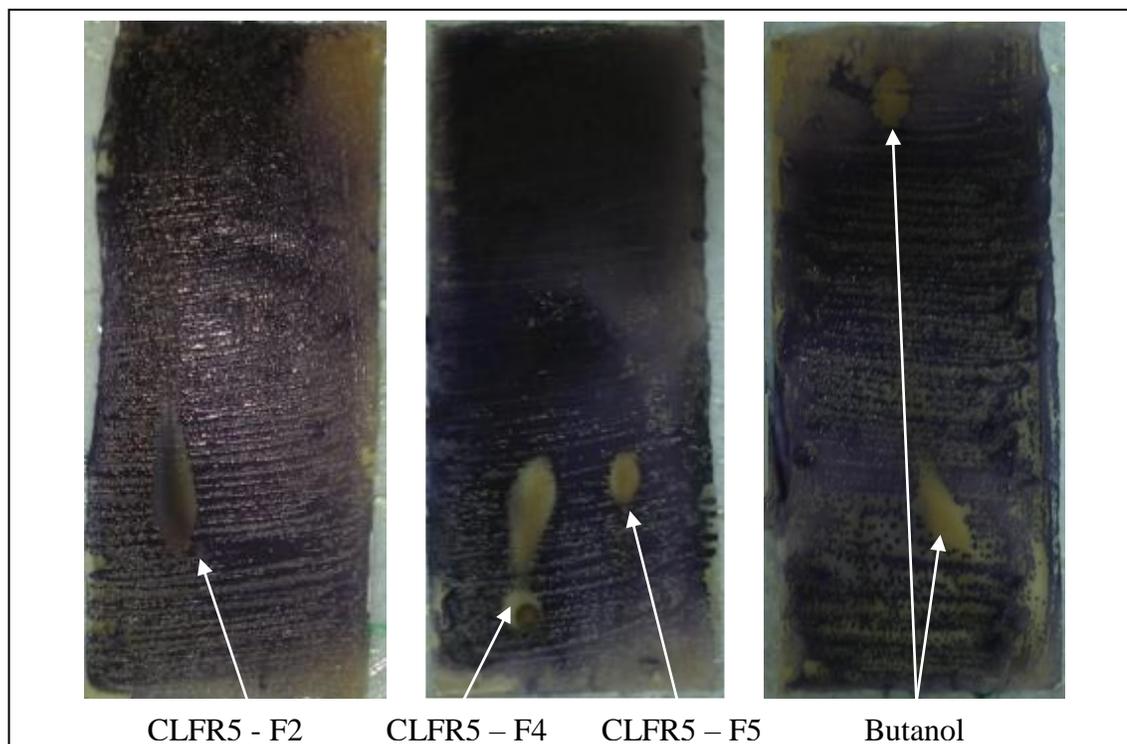


FIGURA 4. Bioautografías de las fracciones activas de la columna CLFR5 sistema B inciso 2.5.

3.6.1.3 Análisis por CLAR FR C-18 de las Fracciones Obtenidas de la Columna CLFR5

En la figura 5 se muestran los cromatogramas del extracto butanólico y de la fracción activa más interesante CLRF5 – F5, analizadas por CLAR FR C-18.

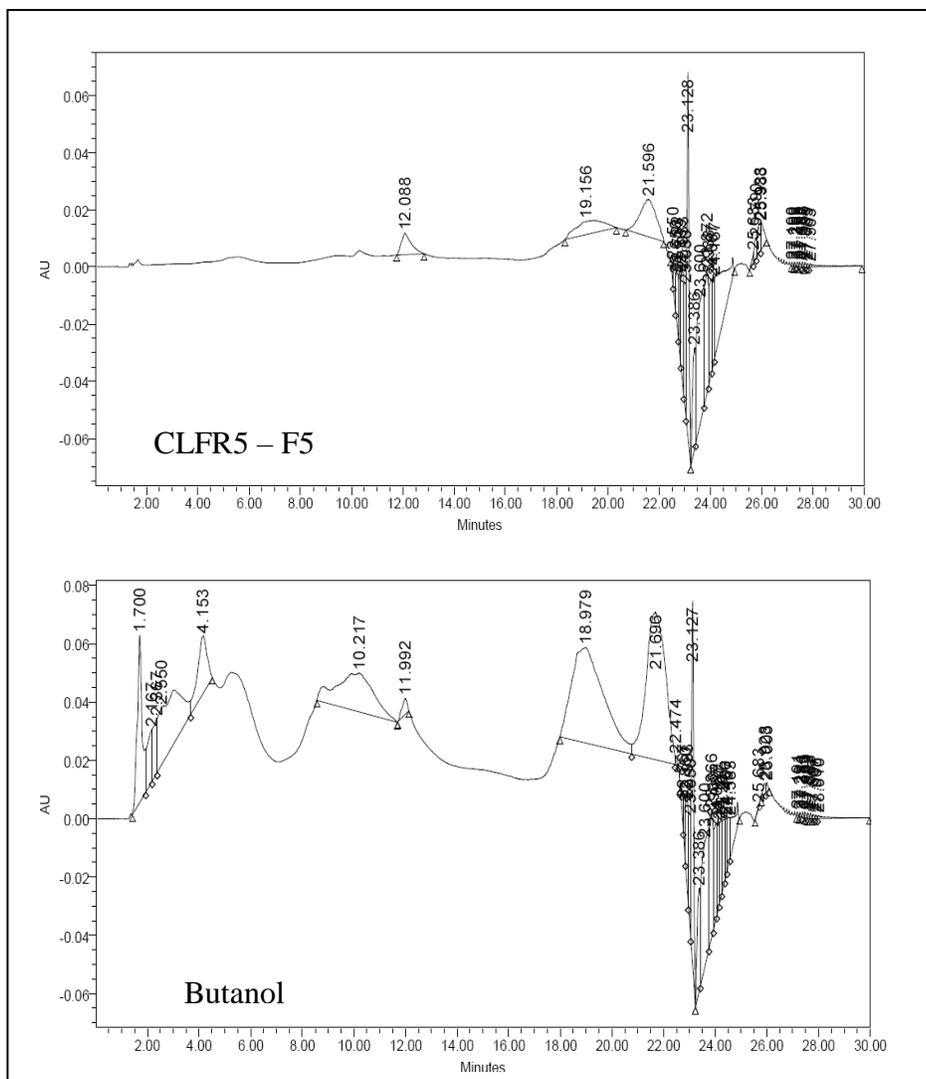


FIGURA 5. Cromatograma de CLFR5 – F5 y del extracto butanólico bajo condiciones de análisis A inciso 2.6.

3.6.2 Extracto de Acetato de Etilo

3.6.2.1 Columna Flash Silicagel CFSG3

Se obtuvieron seis fracciones de la columna CFSG3 y se muestran los porcentajes de recuperación en la tabla 14.

3.6.2.2 Evaluación Mediante Bioautografía de la Actividad Antimicrobiana de las Fracciones Obtenidas de la columna CFSG3

Se examinó la actividad por medio de bioautografía y los resultados se muestran en la tabla 14 y en la figura 6.

TABLA 14. Porcentaje de recuperación y R_f de inhibición de las fracciones obtenidas de la columna CFSG3.

NOMBRES DE LAS FRACCIONES	PESO	PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN	R_f DE INHIBICIÓN
CFSG3 – F1	1.07 g	53.3 %	De 0.28 a 0.55
CFSG3 – F2	0.76 g	38.2 %	No presenta Inhibición
CFSG3 – F3	0.05 g	2.7 %	No presenta Inhibición
CFSG3 – F4	0.01 g	0.1 %	No presenta Inhibición
CFSG3 – F5	0.10 g	4.8 %	No presenta Inhibición
CFSG3 – F6	0.00 g	0.0 %	No presenta Inhibición
Control de Acetato de Etilo	-----	-----	De 0.40 a 0.66

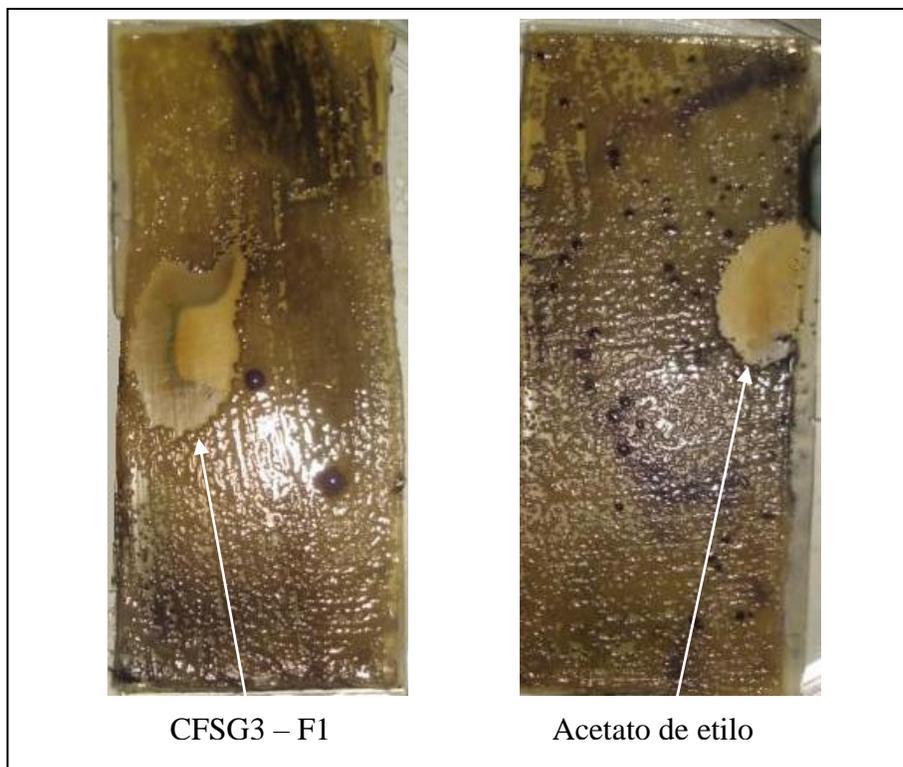


FIGURA 6. Bioautografías de las fracciones activas CFSG3 – F1 y acetato de etilo sistema B inciso 2.5.

3.6.2.3 Análisis por CLAR FR C-18 de las Fracciones Obtenidas de la Columna CFSG3

En la figura 7 se muestran los cromatogramas del extracto de acetato de etilo y la fracción activa de la columna CFSG3 analizadas por CLAR FR C-18.

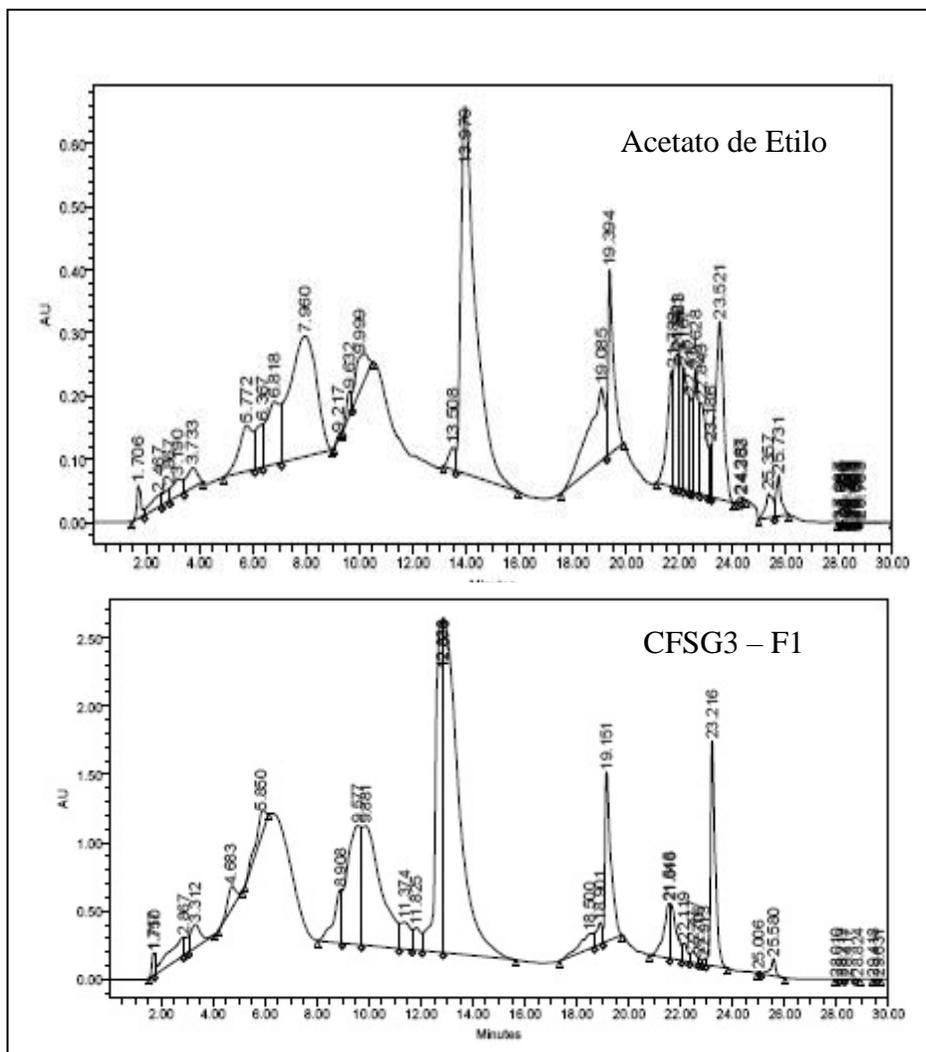


Figura 7. Cromatograma de la fracción activa CFSG – F1 bajo condiciones de análisis A inciso 2.6.

3.6.3.1 Columna Lobar de Baja Presión en Fase Reversa C18 CLFR15

Se obtuvieron seis fracciones y sus porcentajes de recuperación se muestran en la tabla 15.

3.6.3.2 Evaluación Mediante Bioautografía de la Actividad Antimicrobiana de las Fracciones Obtenidas de la Columna CLFR15

Se examinó la actividad por medio de la técnica de bioautografía y los resultados se muestran en la tabla 15 y en la figura 8.

TABLA 15. Porcentaje de recuperación y R_f de inhibición de las fracciones obtenidas de la columna CLFR15.

NOMBRES DE LAS FRACCIONES	PESO	PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN	R_f DE INHIBICIÓN
CLFR15 – F1	0.01 g	1.9 %	No presenta Inhibición
CLFR15 – F2	0.02 g	5.0 %	De 0.04 a 0.26 y de 0.58 a 0.69
CLFR15 – F3	0.15 g	40.8 %	De 0.46 a 0.64
CLFR15 – F4	0.04 g	10.8 %	No presenta Inhibición
CLFR15 – F5	0.00 g	0.0 %	No presenta Inhibición
CLFR15 – F6	0.05 g	1.36 %	No presenta Inhibición
Acetato DE Etilo	-----	-----	De 0.50 a 0.58

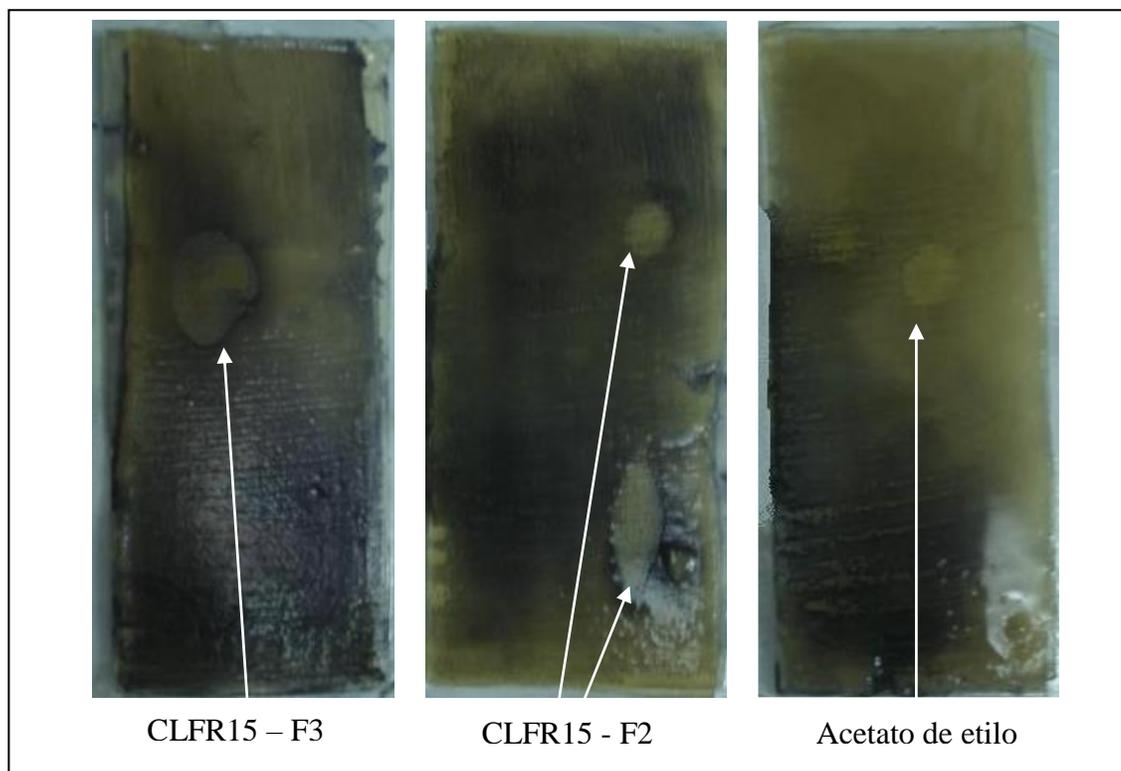


FIGURA 8. Bioautografías de las fracciones activas de la columna CLFR15 y acetato de etilo sistema B inciso 2.5.

3.6.3.3 Análisis por CLAR FR C-18 de las Fracciones Obtenidas de la Columna CLFR15

En la figura 9 se muestran los cromatogramas de las fracciones de la columna CLFR15, analizadas por CLAR FR C-18.

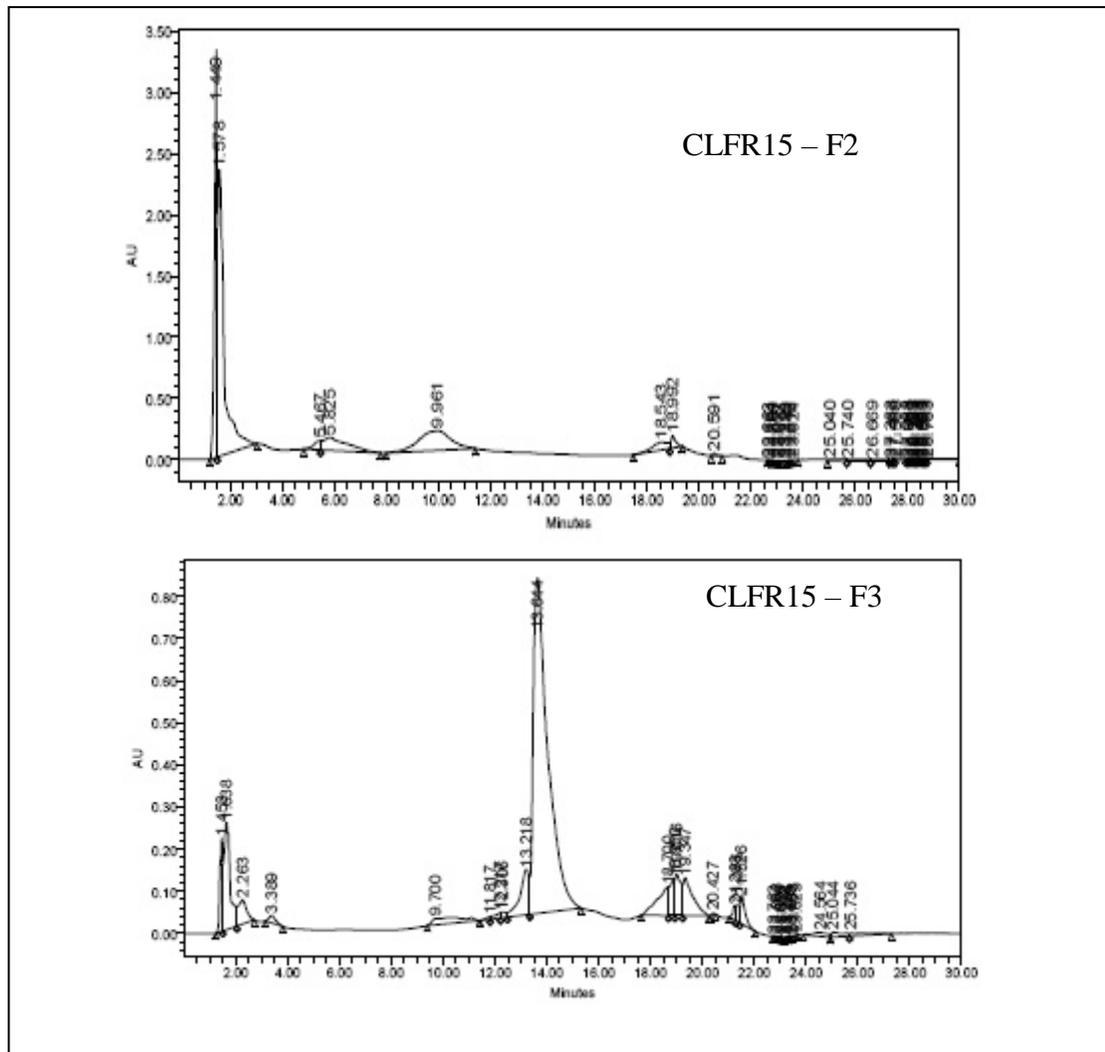


FIGURA 9. Cromatogramas de las fracciones activas de columna CLFR15 bajo condiciones de análisis A inciso 2.6.

3.6.4.1 Columna Lobar de Baja Presión en Fase Reversa C18 CLFR28

De la columna CLFR28 se obtuvieron 20 fracciones.

3.6.4.2 Análisis por CLAR FR C-18 de las Fracciones Obtenidas de la Columna CLFR28

En la figura 10 se muestran los cromatogramas que presentaron mayor interés, de las 20 fracciones obtenidas de la columna CLFR28, analizadas por CLAR FR C-18.

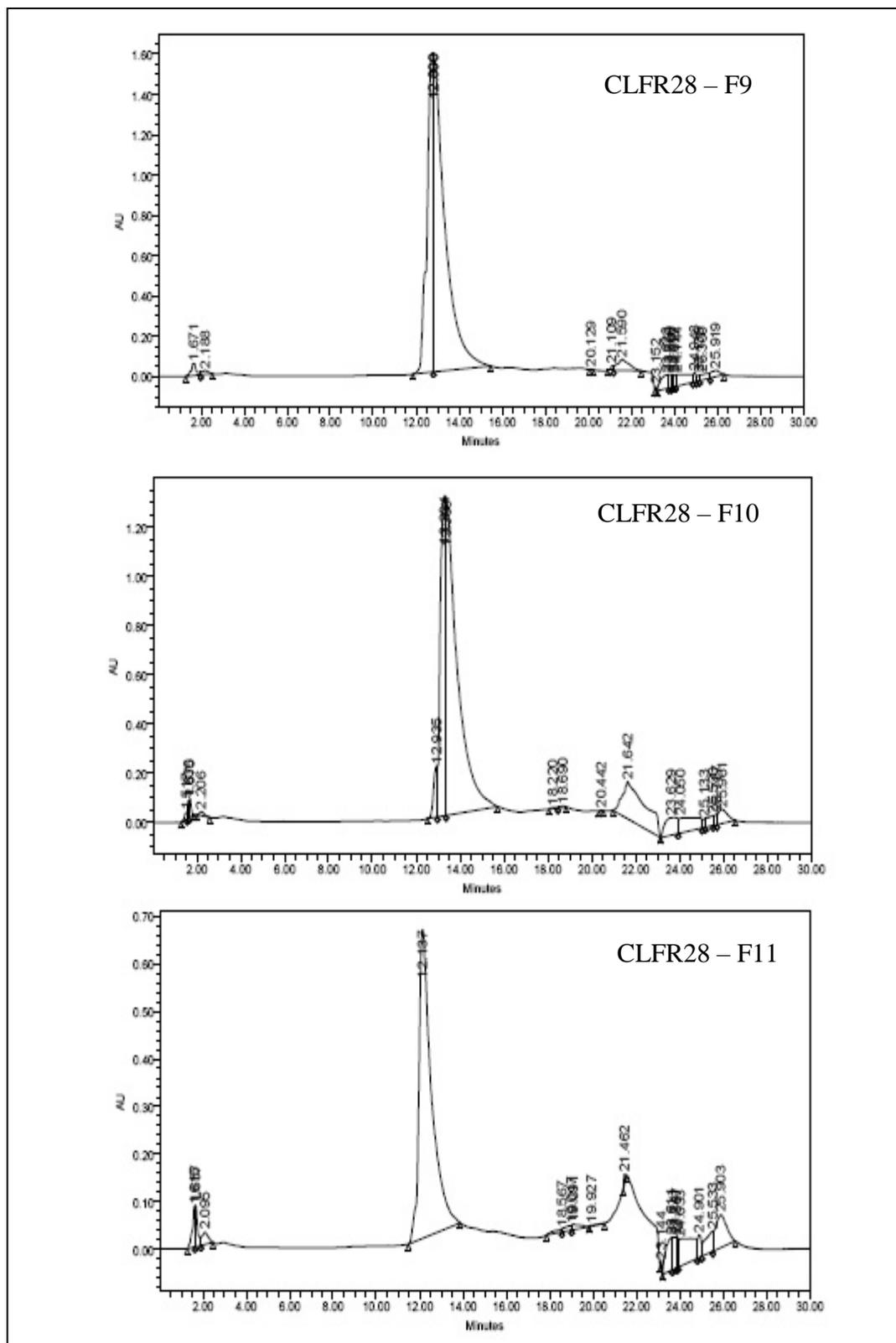


FIGURA 10. Cromatogramas de las fracciones de la columna CLFR28 bajo condiciones de análisis A inciso 2.6.

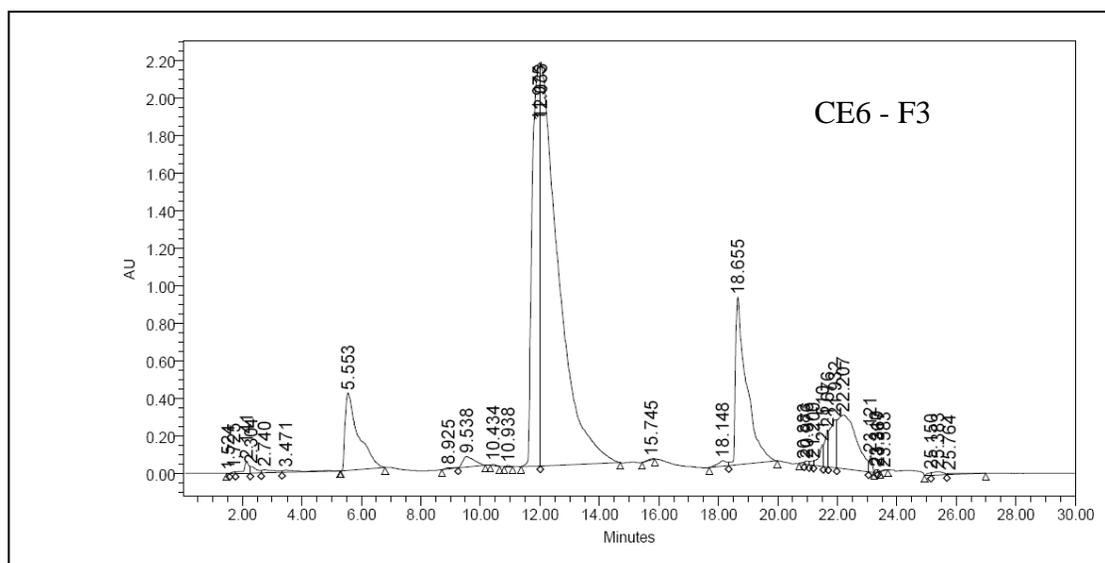
3.6.5.1 Columna CE6 con Sephadex Lipofílico LH-20

De la columna CE6 se obtuvieron 20 fracciones, se pesó la fracción tres (CE6-F3) se obtuvieron 0.06 g, se calculó un porcentaje de recuperación de 15%.

3.6.5.2 Análisis por CLAR FR C-18 de las Fracciones Obtenidas de la Columna de Exclusión Molecular CE6.

En la figura 11 se muestra el cromatograma de la fracción más interesante, de acuerdo al grado de purificación de la columna CE6 analizada por CLAR FR C-18.

FIGURA 11. Cromatograma de la fracción CE6 – F3 bajo condiciones de análisis B inciso 2.6.



3.6.6.1 CLAR FR C18 Preparativa de C18 CSP12, CSP13, CSP14, CSP15 y CSP16

En la tabla 16 se observa la cantidad de fracciones colectadas por cada corrida.

TABLA 16. Fracciones colectadas de las corridas CSP12, CSP13, CSP14, CSP15 y CSP16

NOMBRE DE LA CORRIDA	VOLUMEN INYECTADO	NÚMERO DE FRACCIONES COLECTADAS
CSP12	300 μ L	15
CSP13	300 μ L	15
CSP14	200 μ L	13
CSP15	200 μ L	14
CSP16	300 μ L	12

3.6.6.2 Análisis de las Fracciones Obtenidas de la Columnas Preparativas de CSP12 a CSP16 por CLAR FR C-18

En la figura 12 se muestran los cromatogramas de algunas fracciones que presentan el compuesto de interés, dichas fracciones provienen de las columnas CSP12 a CSP16 analizadas con la técnica de CLAR FR C-18.

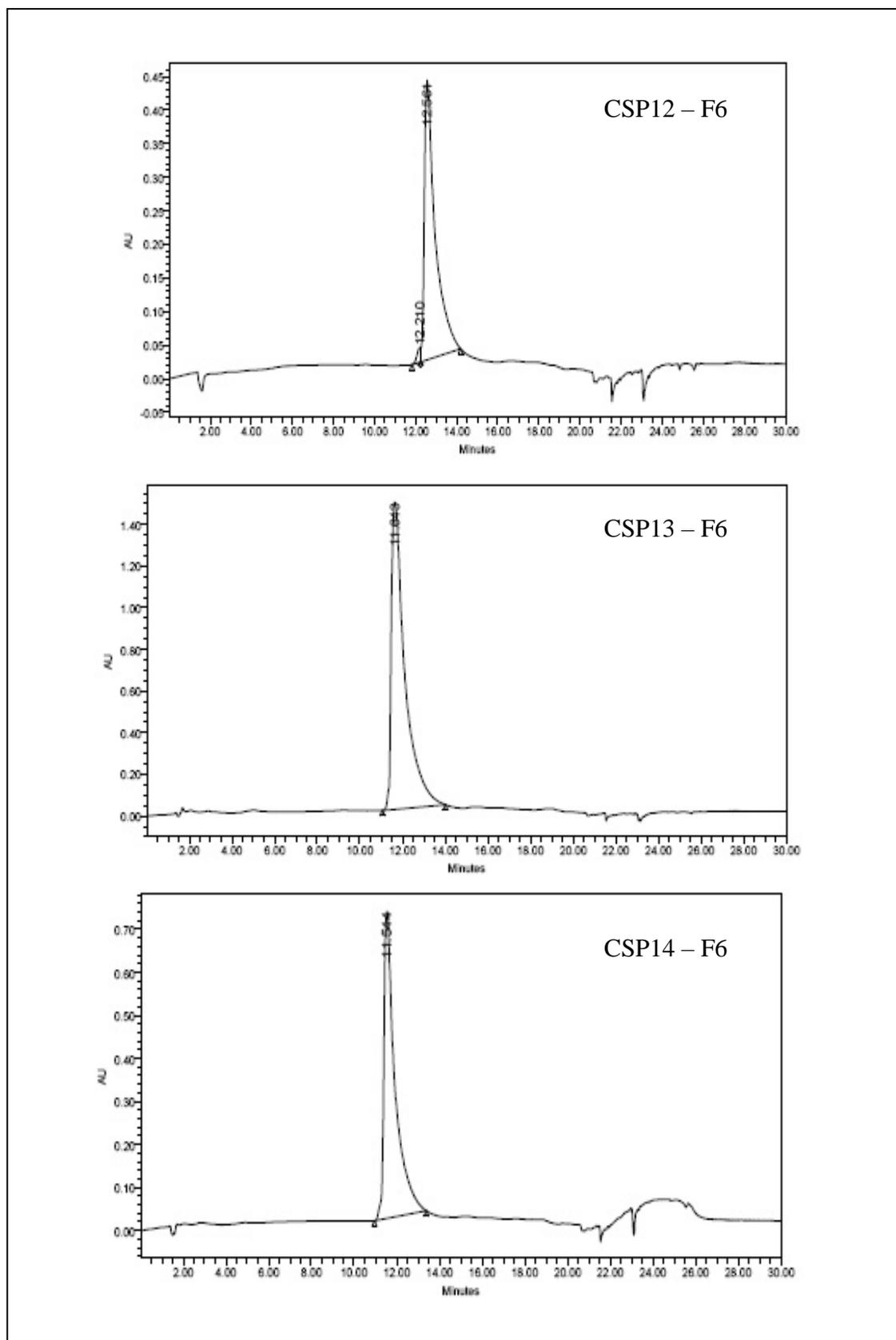


FIGURA 12. Cromatogramas de las fracciones de CSP12 a CSP16 bajo condiciones de análisis A inciso 2.6.

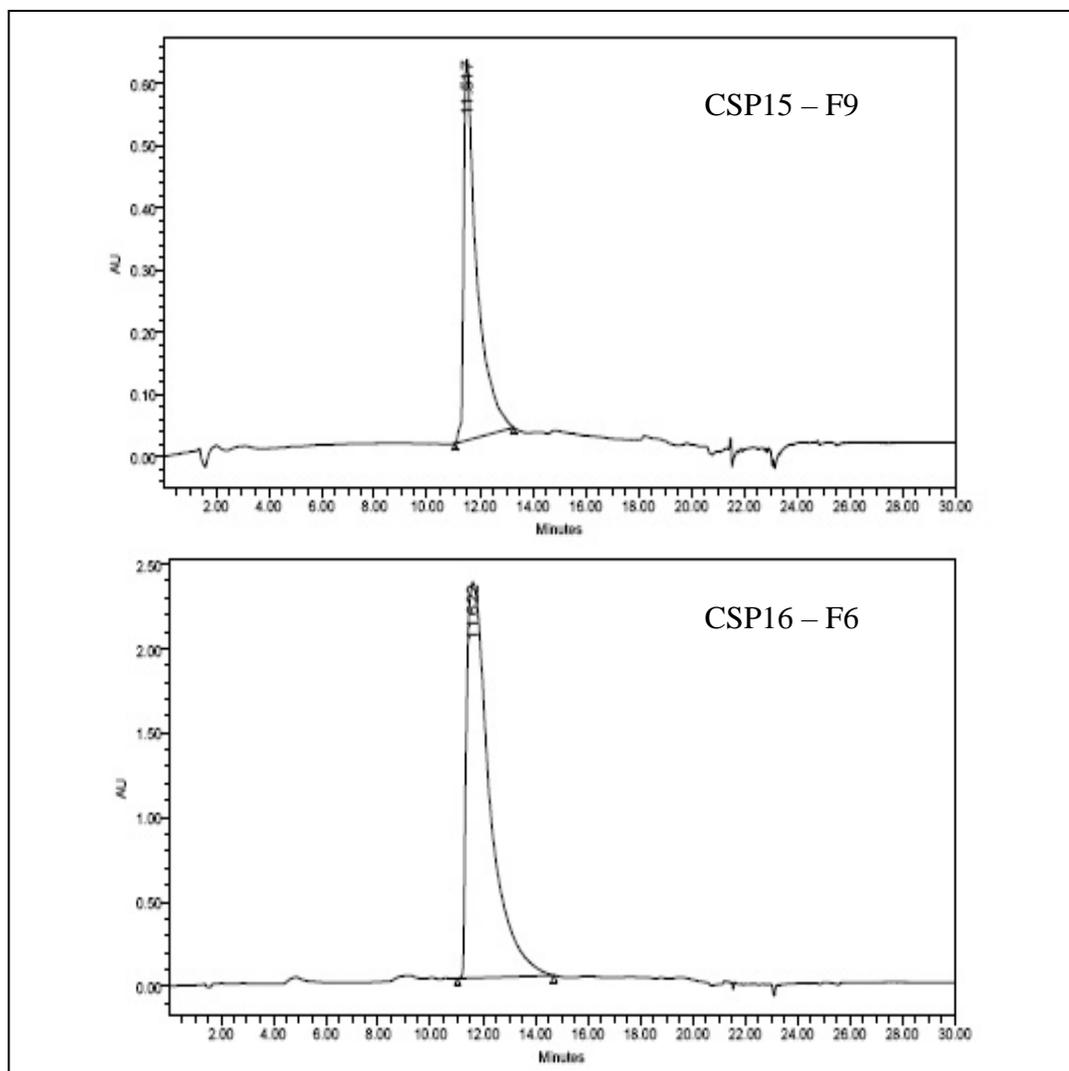


FIGURA 12 (continuación). Cromatogramas de las fracciones de CSP12 a CSP16 bajo condiciones de análisis A inciso 2.6.

En la tabla 17 se observan las fracciones de las distintas corridas que se mezclaron debido a que presentaron el compuesto activo con un alto grado de purificación para formar la fracción CSPU1.

TABLA 17. Fracciones que conforman la fracción CSPU1 bajo condiciones de análisis del inciso 2.13.6.1

NOMBRE DE LA CORRIDA	FRACCIONES CON CSPU1 CROMATOGRÁFICAMENTE PURO
CSP12	7, 8 y 9
CSP13	5, 6, 7 y 8
CSP14	4, 5 y 6
CSP15	4, 5, 6 y 7
CSP16	5 y 6

3.7. Elucidación Estructural del Compuesto Activo

3.7.1 Análisis de Pureza

En la figura 13 se muestra el cromatograma de CSPU1 analizado por CLAR FR C-18.

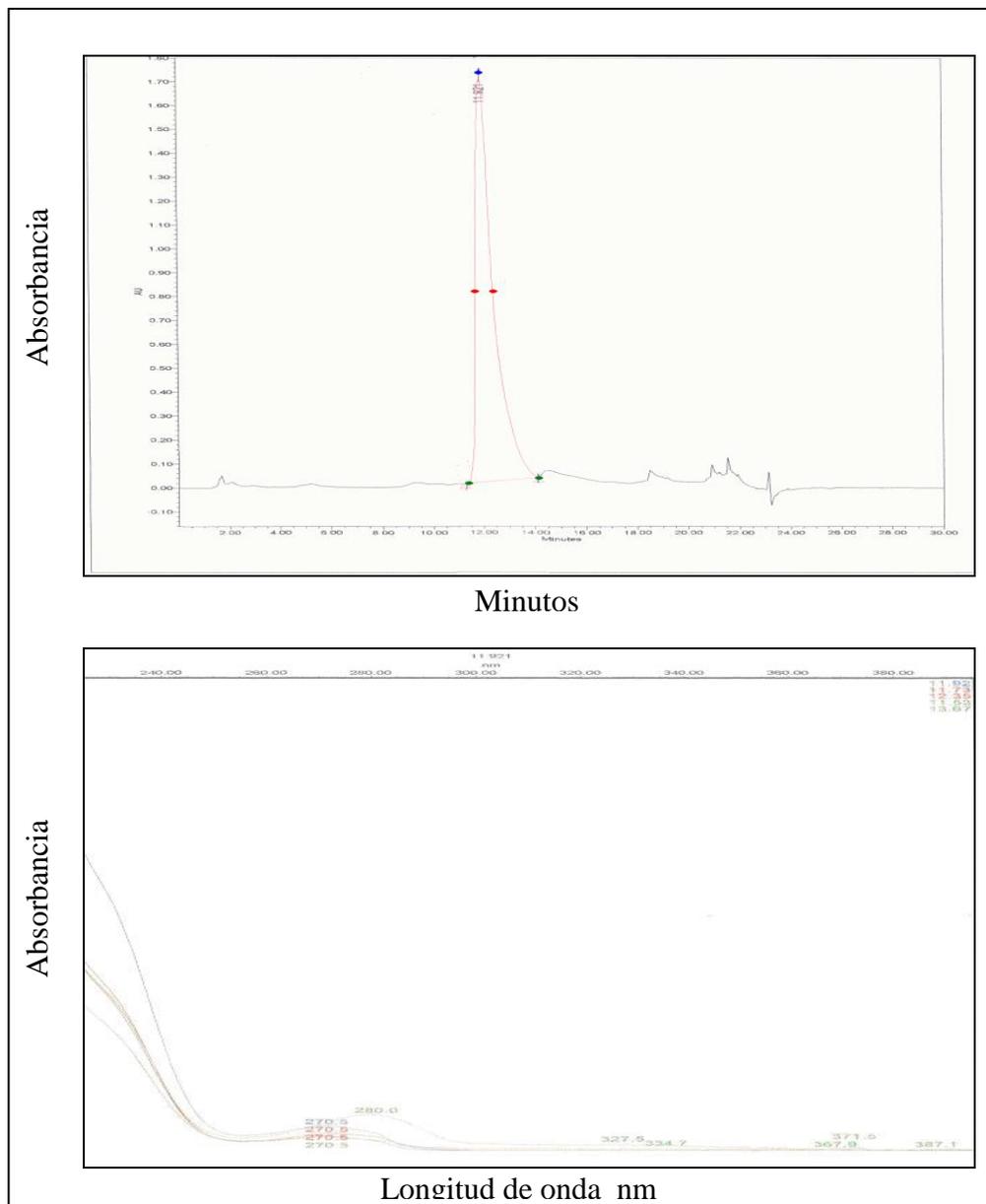


FIGURA 13. Cromatograma y espectro de absorbancia del compuesto puro CSPU1 bajo condiciones de análisis A inciso 2.6.

3.7.2 Espectrometría de Masas

Se observa en la s figura 14 el cromatograma y espectro de masas de CSPU1.

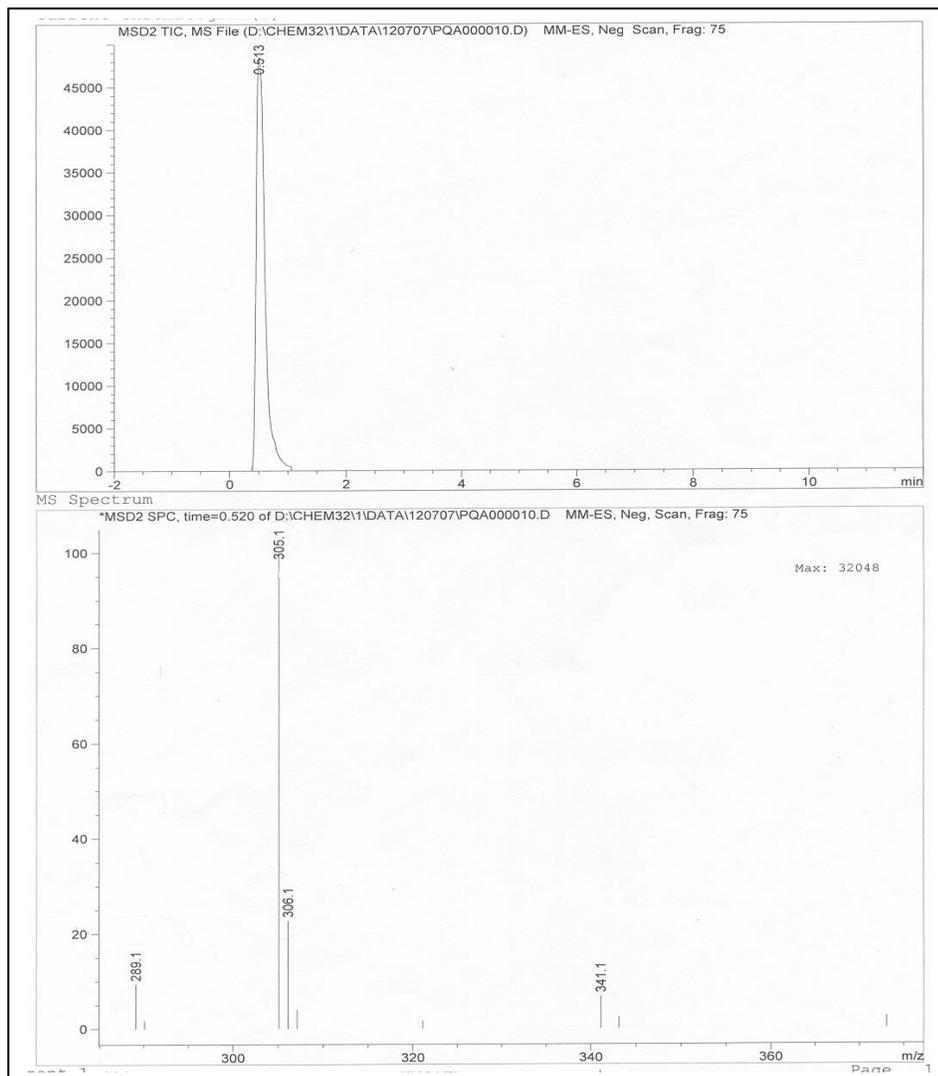


FIGURA 14. Cromatograma y espectro de masas de CSPU1.

3.7.3 Espectrofotometría UV-Vis

En la figura 15 se observó el espectro de absorbancia del compuesto CSPU1, en la tabla 18 se muestran los máximos y la absorptividad de CSPU1 con PM de 306 (inciso 3.7.2).

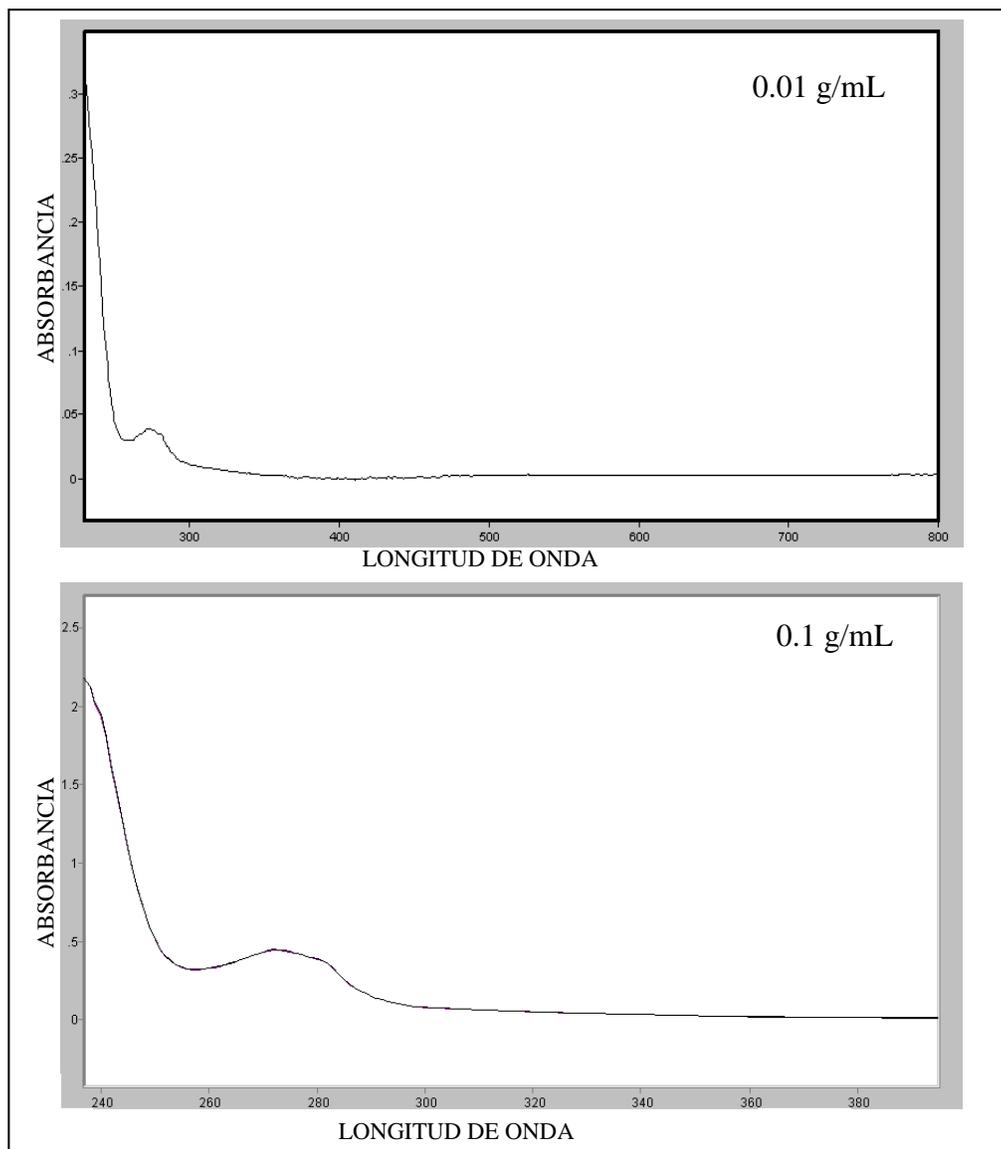


FIGURA 15. Espectro de absorbancia de CSPU1 a concentraciones de 0.1 y 0.01 g/mL.

TABLA 18. Máximos y absortividad del compuesto CSPU1.

MAXIMOS	ABSORTIVIDAD MOLAR $\epsilon = \text{Abs} / (\text{b}) * (\text{c})$
230 nm a concentración de 0.01 mg/ mL	$\epsilon = 0.228 / (1 \text{ cm}) * (3.268 * 10^{-5} \text{ M}) = 6976 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$
270 nm a concentración de 0.1 mg/ mL	$\epsilon = 0.313 / (1 \text{ cm}) * (3.268 * 10^{-4} \text{ M}) = 957 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$

3.7.4 Espectroscopia de RMN

En la siguiente Figura 16 se muestran en orden los espectros de de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY ^1H - ^1H , DEPT135, HMBC, HMQC y la figura 17 se observan los efectos nOe diferencial.

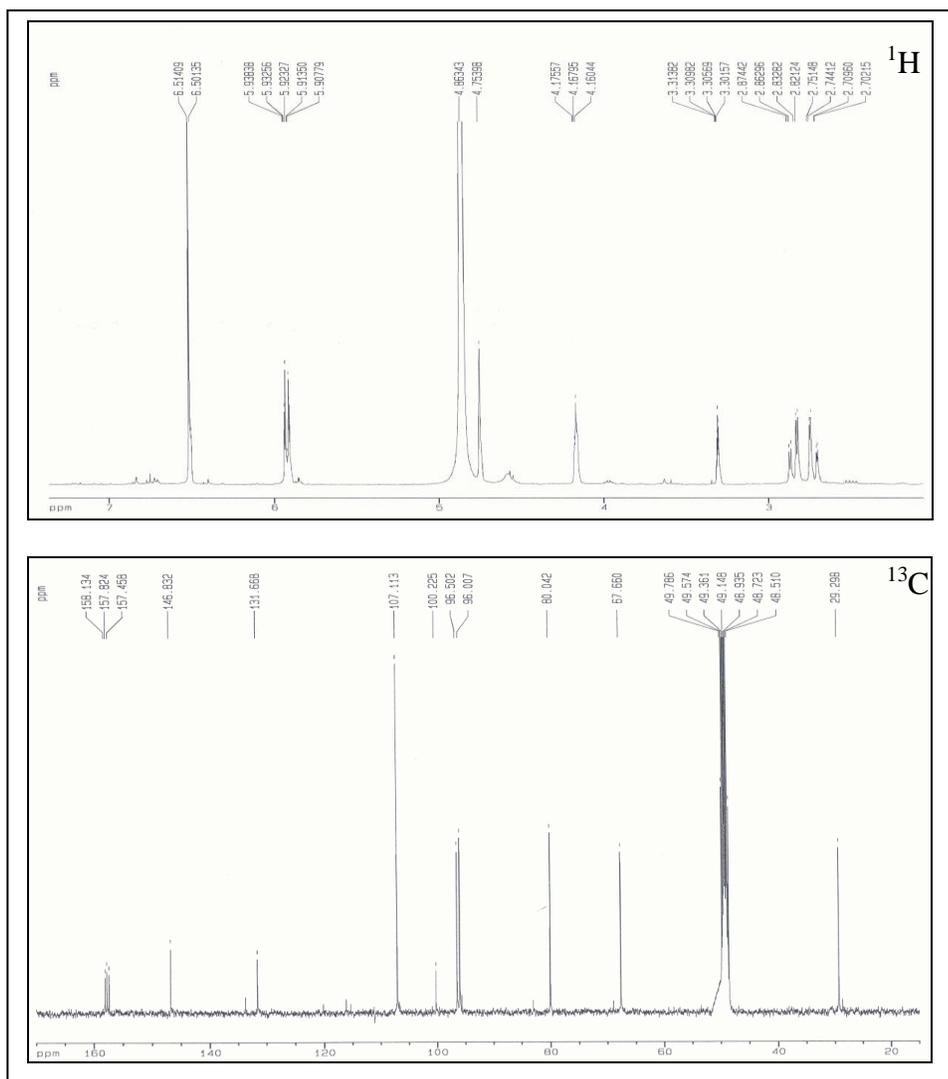


FIGURA 16. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C .

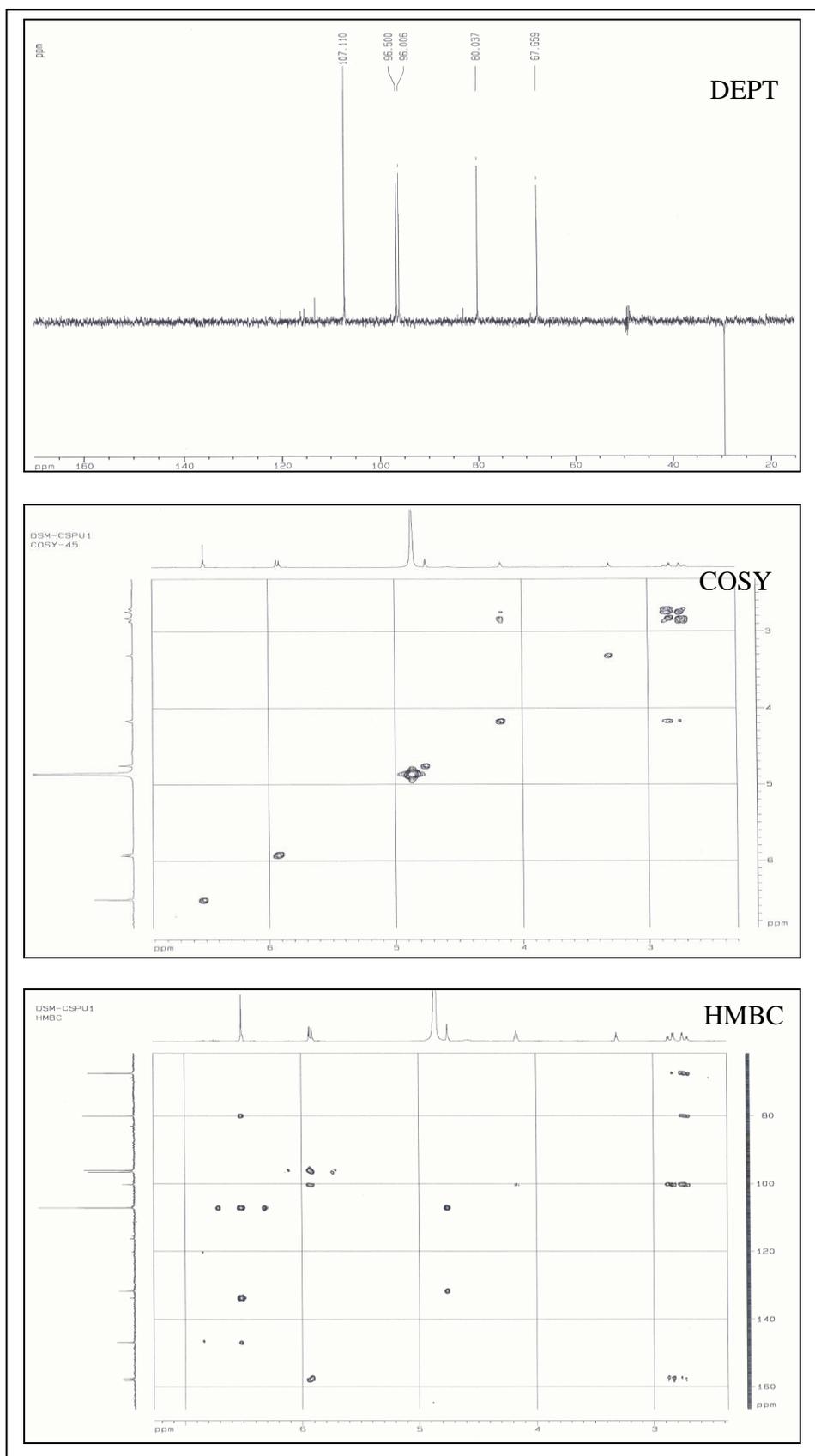


FIGURA 16 (continuación). Espectros de RMN DEPT135 COSY¹H-¹H y HMBC.

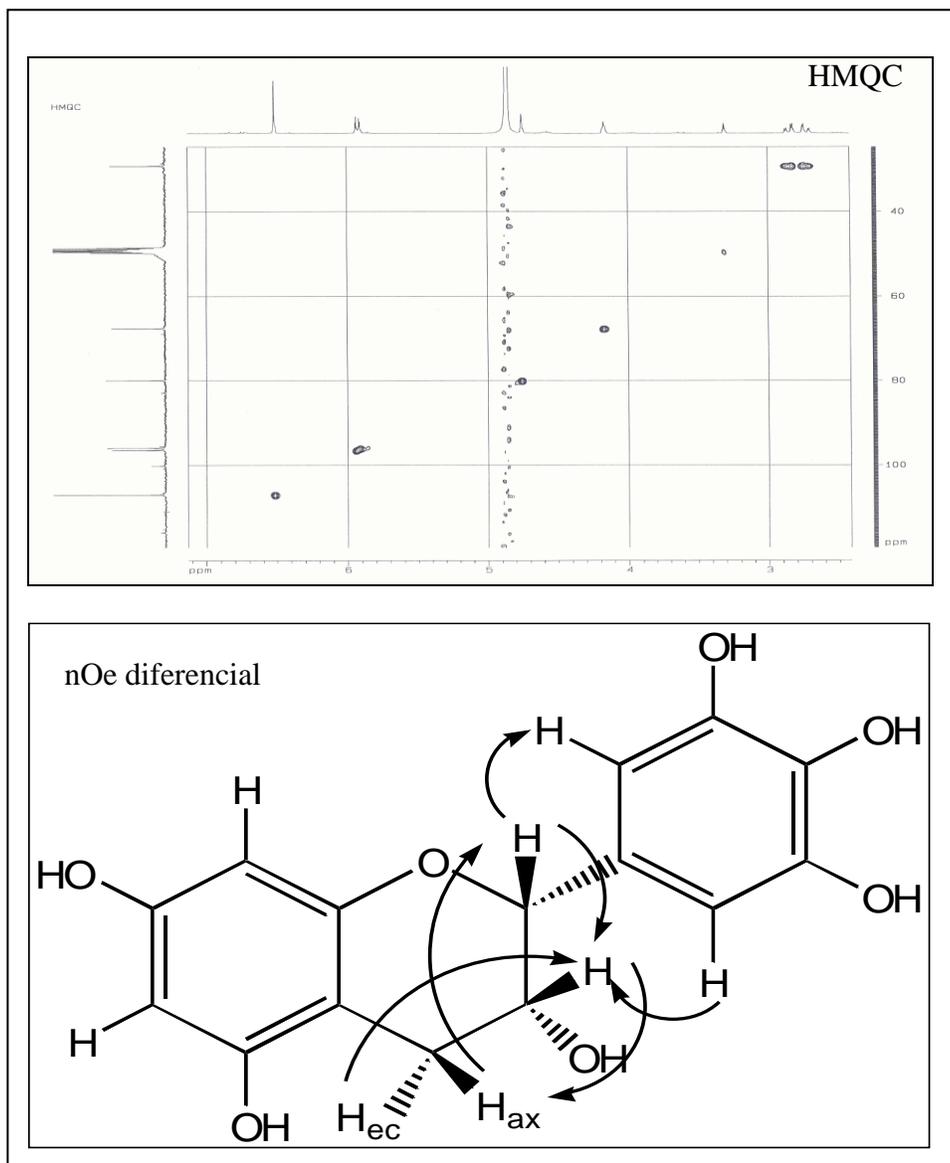


FIGURA 16 (continuación). Espectros de RMN HMQC y noe diferencial.

3.8 Determinación de CMI del Compuesto Aislado

Se determinó la CMI del compuesto CSPU1 mediante microdilución en placa, y se determinó el R_f de la actividad antimicrobiana mediante bioautografía, en la figura 17 se observa la bioautografía y en la tabla 19 se observan el R_f y la CMI de CSPU1.

TABLA 19. CMI y R_f de inhibición del compuesto CSPU1.

	R_f DE INHIBICIÓN	CMI
Extracto de Acetato de etilo	Entre 0.55 - 0.75	500 $\mu\text{g} / \text{mL}$
Compuesto CSPU1	Entre 0.59 - 0.76	No presentó inhibición por debajo de 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$

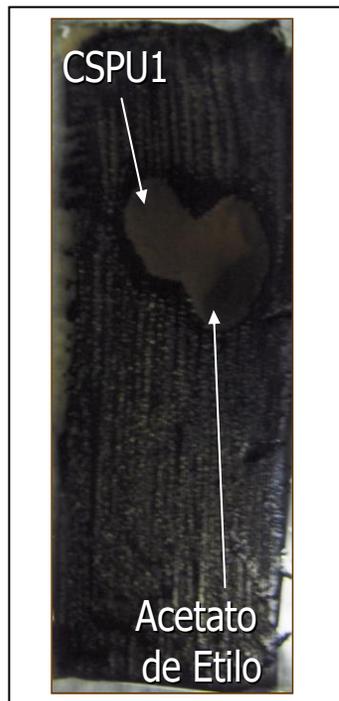


FIGURA 17. Bioautografía de CSPU1 y extracto de acetato de etilo mediante sistema C inciso 2.5.

CAPITULO 4

DISCUSIÓN

Un descubrimiento importante en la historia de la medicina, es la introducción de antibióticos en el tratamiento de enfermedades infecciosas; sin embargo, se observó que con el abuso de los antibióticos descubiertos, los microorganismos patógenos desarrollaron drogoresistencia en su natural esfuerzo por sobrevivir; como consecuencia, y a modo de contrarrestar los efectos negativos de dicha drogoresistencia, el hombre se dió a la tarea de buscar nuevos recursos terapéuticos de utilidad, para brindar una mayor efectividad en el tratamiento de enfermedades causadas por este tipo de microorganismos.

Una fuente rica de información para la producción de nuevos medicamentos antibacterianos, es la investigación y aislamiento de compuestos presentes en plantas con antecedentes etnobotánicos, enfocados en el uso de tratamientos para combatir enfermedades infecciosas causadas por bacterias. Un ejemplo importante de este tipo de

plantas medicinales, es *C. coeruleus*, la cual es ampliamente conocida por su uso para el tratamiento de enfermedades respiratorias, y a pesar de contar con un estudio que demuestra su actividad antimicrobiana en extractos metanólicos de la raíz (G.M. Molina-Salinas et al. 2007), hasta el momento no se ha aislado ningún compuesto con actividad antimicrobiana, que provenga de dicha planta. Es por las razones anteriores, que se decidió realizar un trabajo que se enfocara en el aislamiento biodirigido de compuestos de *C. coeruleus*, que presente actividad antimicrobiana.

Para comenzar con nuestro estudio se realizaron las extracciones metanólicas de la corteza, pulpa y raíz entera de la planta, con el fin de determinar con precisión la ubicación de la mayor actividad antimicrobiana; a pesar de que dividimos la raíz en pulpa y corteza, se decidió incluir la raíz entera en el estudio, con el fin de no dejar en duda la posibilidad de que ambas partes de la raíz fueran necesarias para una mayor actividad antimicrobiana. En la determinación de la actividad antimicrobiana se encontró que la corteza de la raíz presentó la menor CMI (125 µg/mL); es por este dato que se decidió elegir la corteza de raíz para continuar con la extracción diferencial, a pesar de que presentó un porcentaje de recuperación menor que las otras partes evaluadas (2.62%); este dato de porcentaje de recuperación es importante para que, en el caso de obtener un compuesto de interés como antimicrobiano, se pueda obtener la costeabilidad del proceso de obtención.

Los resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos diferenciales (tabla 12) mostraron que el extracto butanólico presentó la menor CMI (250 µg/mL), estos resultados concuerdan con los datos obtenidos por Cong-Li quien en otra especie del

mismo género, reportó actividad en una fracción butanólica de *C. americanus* (Cong-Li et al 1997); por otra parte el porcentaje de recuperación de este extracto fue el segundo mejor después del residuo acuoso (17.62%). Llamó la atención que la CMI del extracto metanólico crudo, es menor que la CMI de todas los extractos diferenciales; el aumento en la CMI por parte de los extractos diferenciales puede deberse a múltiples variables, entre las cuales se encuentran el cambio en la estructura del compuesto activo, la falta de precisión en el experimento, o efecto sinérgico entre dos o más compuestos presentes en el extracto metanólico.

Por los resultados presentados en la determinación de la actividad antimicrobiana de las fracciones diferenciales, se seleccionó en primera instancia la fracción butanólica para realizar el aislamiento.

Se decidió analizar mediante bioautografía la fracción butanólica de la corteza de raíz, con el objetivo de medir el R_f del compuesto con actividad antimicrobiana. Para el desarrollo de la bioautografía fue necesario probar varias fases móviles, con el fin de optimizar la resolución de los compuestos en las cromatografías en silicagel; hasta ese momento del estudio, la mejor fase móvil había resultado ser acetato de etilo:acetona:agua en una proporción 25:8:2; sin embargo, conforme se avanzó en la investigación fue necesario la búsqueda de nuevas fases, fue así como se obtuvieron las fases móviles que se señalan en el apartado 2.5.

Se intentó purificar el extracto butanólico mediante una gran variedad de columnas de sephadex, silicagel, y fase reversa. Se obtuvieron algunas fracciones activas, que

posteriormente fueron analizadas por CLAR FR–C18; sin embargo, no se logró el aislamiento de ningún compuesto puro.

Debido a lo antes mencionado se muestran solamente los resultados de la columna CLFR5, con la cual se obtuvieron los mejores resultados.

Se observó que de la columna CLFR5 se obtuvieron tres fracciones con actividad antimicrobiana (tabla 13); sin embargo la actividad antimicrobiana de dichas fracciones no aparecía en el mismo R_f (entre 0.65-0.8) que la fracción butanólica original; la ausencia de la actividad antimicrobiana en el R_f esperado, se puede deber a que no se recuperó de la columna el compuesto que presentaba dicho R_f , o que simplemente no se sembró una cantidad considerable de las fracciones que contenían dicho compuesto en las cromatoplasmas para la realización de la bioautografía,. El cromatograma de la fracción activa más interesante CLFR5–F5 (figura 5) presentó cinco picos que indicaron la presencia de más de un compuesto. Debido a lo antes mencionado y por las complicaciones experimentales para la purificación del compuesto activo de la fracción butanólica, se decidió trabajar posteriormente con la fracción de acetato de etilo, ya que presentaba también una CMI considerable.

El fraccionamiento biodirigido se siguió en primera instancia por la ruta A (página 26). De las seis fracciones obtenidas por la columna flash CFSG3, la fracción CFSG3–F1 es la única que presentó actividad antimicrobiana (tabla 14); además dicha fracción resultó ser la principal con un porcentaje de recuperación de 53.3%. El cromatograma de dicha fracción CFSG3–F1 (figura 7), resultó semejante al del extracto original con

un pico de absorbancia intensa a un tiempo de retención de 12.8 minutos; se sospechó que dicho pico correspondiera al compuesto activo, debido a su ausencia en las fracciones no activas obtenidas de la columna. La diferencia en los tiempos de retención observados entre la fracción de acetato de etilo y la fracción CFSG3 - F1, se debe a problemas experimentados con la presión del CLAR FR-C18 usado, que hacían que se observaran grandes variaciones en los tiempos de retención.

La Fracción CFSG3-F1 se purificó por la columna CLFR15, se obtuvieron 2 fracciones con actividad antimicrobiana (tabla 15) de las cuales, CLFR15-F3 presentó actividad antimicrobiana a un R_f similar al del extracto de acetato de etilo original, con un porcentaje de recuperación de 40.8%. Además, en los cromatogramas de las dos fracciones activas (figura 9), sólo la fracción CLFR15-F3 presentó el compuesto activo de interés a 13.6 minutos, la otra fracción activa CLFR15-F2 presentó un artefacto producido durante el fraccionamiento a 1.4 minutos. Por esta razón, se decidió continuar el procedimiento con la purificación de la fracción CLFR15-F3. Para ello se volvió a realizar una columna lobar (CLFR28) y se recolectaron las fracciones que contenían el compuesto de interés; en la figura 10 se observa que las fracciones CLFR28-F9, F10 y F11 presentaron dicho compuesto, prácticamente puro.

Si bien se había logrado la purificación deseada, se obtuvo muy poca cantidad del compuesto de interés, por lo que se decidió probar otra vía alterna (ruta B, página 26). Debido a resultados positivos de experimentos realizados a micro escala, se decidió realizar una columna con Sephadex LH-20 (CE6) para purificar el extracto de acetato de etilo, se obtuvieron 20 fracciones de las cuales únicamente la fracción CE6-F3 presentó

el compuesto de interés (Figura 11) con un buen grado de purificación comparada con el extracto de acetato de etilo.

La fracción CE6-F3 se sometió a cromatografía de fase reversa preparativa, se hicieron varias corridas y en cada una de ellas se evaluó por CLAR FR – C18 la presencia del compuesto de interés, se juntaron las fracciones con mayor grado de pureza (tabla 17) y se obtuvo un compuesto cromatográficamente puro que se denominó CSPU1.

La pureza de CSPU1 se analizó por CLFR FR C-18; en la figura 13 se muestra el cromatograma del compuesto CSPU1.

Se utilizaron diferentes técnicas espectrométricas: UV Vis, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT-135 COSY ^1H - ^1H , HMBC, HMQC, nOe diferencial y masas para la elucidación estructural del compuesto CSPU1.

En la figura 14 se puede observar el espectro de masas del compuesto CSPU1; el ión molecular aparece a 306. Se obtuvo el espectro de absorción UV-Visible del compuesto CSPU1 (figura 15). En base a dicho espectro se calculó la absorptividad molar del compuesto (tabla 18), se piensa que los máximos presentes en el espectro UV – Visible corresponden a señales de las bandas E y B pertenecientes a anillos aromáticos.

En el espectro de ^{13}C RMN del compuesto CSPU1 (figura 16) se observan 13 señales de carbono, varias de esas señales están entre 96 y 158 ppm lo cual indica posibles carbonos olefinícos y/o aromáticos.

De acuerdo con los resultados del DEPT-135 la señal de 29 ppm es un CH_2 . Se observan dos CH alifáticos a 68 y 80 ppm y tres CH aromáticos (u olefinícos) a 96, 97 y 107 ppm. Las señales a más de 140 ppm son carbonos cuaternarios que por su desplazamiento, deben corresponder a carbonos unidos a oxígeno (OH posiblemente). No se observan carbonos metílicos.

En el espectro de ^1H RMN (figura 16) se observan dos hidrógenos químicamente distintos de un CH_2 que debe formar parte de un ciclo, además de dos CH alifáticos desapantallados. Se observan además tres señales de H olefinícos y/o aromáticos.

En base a los datos de los espectros de doble dimensión se pudo establecer la estructura que se presenta en la figura 18.

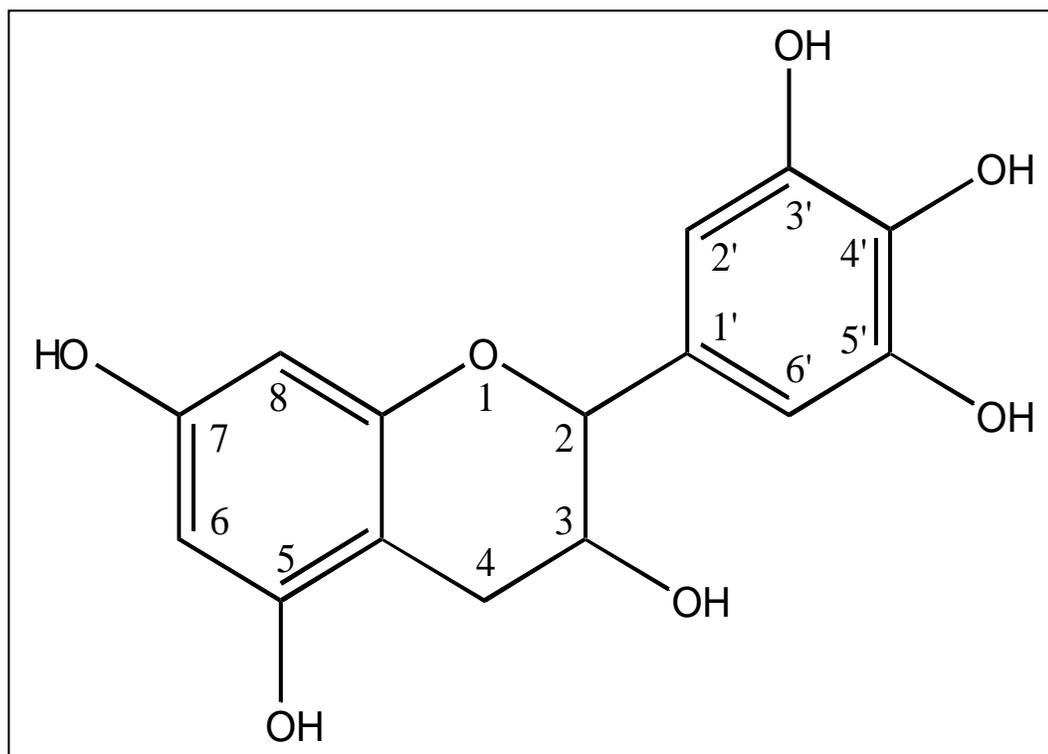


FIGURA 19. Estructura del compuesto aislado CSPU1.

De acuerdo con los nOe's diferenciales observados la estructura (figura 16) los carbonos 2 y 3 son R,R.

Se realizó una bioautografía del compuesto CSPU1 en donde se observó la inhibición de *S. aureus* (inciso 3.8); sin embargo, en la determinación de CMI mediante microdilución no se detectó actividad antimicrobiana entre 500 – 31.25 µg / mL. La explicación para el resultado de bioautografía y microdilución antes mencionados, puede encontrarse en la variación de la relación compuesto CSPU1:microorganismo, ya que la concentración del inóculo es menor en la bioautografía que en la microdilución.

Debido a lo antes mencionado se piensa que el compuesto CSPU1 sí presenta inhibición pero a una concentración mayor de 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$, por esta razón no se creyó necesario realizar la prueba de toxicidad con *A. salina*; ahora bien, si observamos que CSPU1 presenta una CMI mayor que el extracto de corteza metanólico (125 $\mu\text{g} / \text{mL}$) y el extracto diferencial de acetato de etilo (500 $\mu\text{g} / \text{mL}$), estos resultados sugieren también la presencia de dos o más compuestos que presenten sinergismo, o que posiblemente existe otro compuesto con una mayor CMI, en los extractos.

La estructura de este compuesto corresponde con una catequina conocida como epigallocatequina (Weiduo y col. 2006), sustancia presente especialmente junto con otras catequinas en extractos de té verde y té negro y que tiene fundamentalmente propiedades antioxidantes (Amarowcz y col. 2000), también se ha reportado su efecto contra bacterias gram (-)(Chikao y col. 1986). Si bien se ha reportado la actividad antimicrobiana de catequinas en contra de cepas resistentes de *S. aureus*, es especialmente el galato de epigallocatequina (EGCG) la que presenta la menor CMI (Friedman y col 2006). Por esta razón consideraríamos interesante como perspectiva de esta tesis, buscar la presencia del EGCG en los extractos activos de *C. coeruleus*.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones

- El extracto metanólico de la corteza de raíz de *C. coeruleus*, presentó la menor CMI en comparación con los extractos de pulpa y raíz entera en contra *S. aureus*.
- El extracto diferencial de butanol de corteza de raíz presentó la menor CMI, en comparación con los extractos diferenciales de hexano, acetato de etilo y residuo acuoso en contra de *S. aureus*.
- Se aisló un compuesto puro (CSPU1) a partir del extracto diferencial de acetato de etilo.

- El compuesto aislado CSPU1 es un flavonoide de tipo catecol, identificado como epigallocatequina.
- El compuesto aislado CSPU1 no presentó una CMI entre los valores de 500–31.25 µg/mL.

5.2 Perspectivas

- Probar la actividad del compuesto aislado contra otros microorganismos.
- Verificar la presencia de otras catequinas en los extractos de *C. coeruleus*.
- Continuar con el aislamiento de compuestos de la corteza de raíz de *C. coeruleus*, con actividad antimicrobiana en contra de *S. aureus*.

BIBLIOGRAFÍA

- Amarowicz R, Pegg R. B, Bautista D. **Antibacterial activity of green tea polyphenols against *Escherichia coli* K 12.** Institute 01 Animal Reproduction and Food Research, Division 01 Food Science, Polish Academy 01 Sciences, Olsztyn, Pol. *Nahrung*. 44(1), 60-62, (2000).
- Bagley Mark C., Dale James W., Merritt Eleanor A., Xiong Xin. **Thiopeptide Antibiotics.** *Chem. Rev.*, 105, 685 – 714, (2005).
- Barsby Todd, Kelly Michael T., Gagné Stephane M., Andersen Raymond J. **Bogorol A Produced in Culture by a Marine *Bacillus* sp. Reveals a Novel Template for Cationic Peptide Antibiotics.** *Organic Letters*, 3, 3, 437 – 440, (1999).
- Bay Sylvie, Huteau Valérie, Zarantonelli Maria – Leticia, Pires René, Ughetto – Monfrin Joel, Taha Muhamed – Kheir, England Patrick, Lafaye Pierre. **Phosphorylcholine – Carbohydrate – Protein Conjugates Efficiently Induce Hapten – Specific Antibodies Which Recognize Both *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis*. A Potential Multitarget Vaccine against Respiratory Infections.** *J. Med. Chem*, 47, 3916 – 3919, (2004).
- BioSource International, Inc. U.S.A., www.biosource.com, (2005).
- Botany Encyclopedia of Plants and Gardening, www.Botany.com, (2005).
- Castiglione Franca, Cavaletti Linda, Losi Daniele, Lazzarini Ameriga, Carrano Lucia, Feroggio Mariana, Ciciliato Ismaela, Corti Emiliana, Candiani Gianpaolo, Marinelli Flavia, Selva Enrico. **A Novel Lantibiotic Acting on Bacterial Cell Wall Síntesis Produced by the Uncommon Actinomycete *Planomonospora* sp.** *Biochemistry*, 46, 5884-5895, (2007).
- Céspedes Carlos L., Guillermo Avila J., Martínez Andrés, Serrato Blanca, Calderón – Mugica José C., Salgado – Garcigla Rafael. **Antifungal and Abtiacterial Activities of Mexican Tarragon (*Tagetes Lucida*).** *J. Agric. Food Chem.*, 54, 3521 – 3527, (2006).
- Chikao Nishino, Nobuyasu Enoki. **Antimicrobial epigallocatechin from *Elaeagnus glabra*.** Mitsubishi Chemical Industries Co., Ltd., Japan. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, 3 pp, (1986).

Eloff J. N., McGaw L. J., Rabe T., Sparg S. G., Jäger A. K., Van Staden J. **An investigation on the biological activity of *Combretum* species.** Journal of Ethnopharmacology, 75, 45 – 50, (2001).

Friedman Mendel, Henika Philip R, Levin, Carol E, Mendel Robert E, Kozukue Nobuyuki. **Antimicrobial activities of tea catechins and theaflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*.** Journal of Food Protection, 69(2), 354-361, (2006).

Henriette's Herbal homepage, www.henriettesherbal.com, (2005)

Hostettmann K., Wolfender J. – L., Rodriguez S. **Rapid Detection and Subsequent Isolation of Bioactive Constituents of Crude plant Extracts.** Plant Med., 63, 2 – 10, (1997).

Hu Wenhao, Bürli Ronald W., Kaizerman Jacob A., Johnson Kirk W., Gross Matthew I., Iwamoto Mari, Jones Peter, Lofland Denene, Difuntorum Stacey, Chen Hsiu, Bozdogan Bülent, C Peter. Appelbaum, Heinz E. Moser. **DNA Binding Ligands with Improved in Vitro and in Vivo Potency against Drug- Resistant *Staphylococcus aureus*,** J. Med. Chem, 47, 4352 – 4355, (2004).

Iscan Gökalp, Kirimer Nese, Kürkcüoğlu Mine, Can Baser K. Hüsnü, Demirci Fatih. **Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* Essential oils.** J. Agric. and Food Chem., 50, 3943 – 3946 (2002).

Jarvest Richard L., Berge Jhon M., Berry Valerie, Boyd Helen F., Brown Murray J., Elder John S., Forrest Andrew K., Fosberry Andrew P., Gentry Daniel R., Hibbs Martin J., Jaworski Deborah D., O'Hanlon Peter J., Pope Andrew J., Stephen Rittenhouse, Robert J. Sheppard, Courtney Slater – Radosti Angela Worby. **Nanomolar Inhibitors of *Staphylococcus aureus* Methionyl tRNA Synthetase with Potent antibacterial Activity against Gram – Positive Pathogens.** J. Med. Chem. 45, 10, 1959 – 1962, (2002).

Lawrence Nicholas J., Rennison David, McGown Alan T., Ducki Sylvie, Gul Lubna A., Hadfield John A., Nader Khan. **Linked Parallel Synthesis and MTT Bioassay Screening of Substituted Chalcones.** J. Comb. Chem., 3, 421 – 426, (2001).

Li Xing-Cong, Cai Lining, Wu Christine D. **Antimicrobial Compounds from *Ceanothus americanus* Against Oral Pathogens.** Phytochemistry, 46, 1, 97 – 102, (1997).

Ma Zhenkun, Richard F. Clark, Brazzale Antony, Wang Sanyi, Rupp Michael J., Li Leping, Griesgraber George, Zhang Souming, Yong Hong, Phan Ly Tam, Peter A., Daniel T. W. Chu, Jacob J. Plattner, Xiaolin Zhang, Ping Zhong, Nemoto Zhensheng Cao, Nilius Angela M., Shortridge Virginia D., Flamm Mitten Robert, Michael, Jon Meulbroek, Ewing Patty, Alder Jeff, Sun Or Yat. **Novel Erythromycin Derivatives with Aryl Groups Tethered to the C-6 Position Are Potent Protein Synthesis Inhibitors and Active against Multidrug – Resistant Respiratory Pathogens.** J. Med. Chem., 44, 4137 – 4156, (2001).

Molina - Salinas G. M., A. Pérez – López, Becerril – Montes P., Salazar – Aranda R., Said – Fernández S., Waksman de Torres N. **Evaluation of the flora of Northern México for in vitro antimicrobial and antituberculosis activity.** Journal of Ethnopharmacology, 109, 435 – 441, (2007).

Pan American Health Organization, www.paho.org, (2005).

Pérez López Luis Alejandro, **Aislamiento y Caracterización de Compuestos de Plantas del Noreste de México con actividad Contra Cepas de *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae*.** Tesis Doctoral, 20-27, (2005).

Phan Ly T., Jian Tianying, Chen Zhigang, Qiu Yao – Ling, Wang Zhaolin, Theresa Beach, Alex Polemeropoulos, Yat Sun Or. **Synthesis and Antibacterial Activity of a Novel Class of 4'-Substituted 16 – Membered Ring Macrolides Derived from Tylosin.** J. Med. Chem, 47, 2965 – 2968, (2004).

Pieters Luc, Vlietinck Arnold J. **Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds?.** Journal of Ethnopharmacology, 100, 57 – 60, (2005).

Rojas Rosario, Caviedes Luz, Aponte José C., Vaisberg Abraham J, Lewis Walter H., Lamas Fernando, Sarasara César, Gilman Robert H., Hammond Gerald B. **Aegicerin, the First Oleanane Triterpene with Wide – Ranging Antimycobacterial Activity, Isolated from *Clavija procera*.** J. Nat. Prod, 69, 845 – 846, (2006).

Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, www.Semarnat.gob.mx, (2005)

Shale T.L., Stirk W. A., Van Staden J. **Screening of medical plants used in Lesotho for anti – bacterial and anti – inflammatory activity.** J. Nat. Prod., 69, 845 – 846, (2006).

Thomas Jason R., B. Dnap Johna C., Wong Margaret L., Hergenrother Paul J. **The Relationship between Aminoglycosides RNA Binding Proclivity and their Antiplasmid Effect on an IncB Plasmid,** Biochemistry, 44, 6800 – 6808, (2005).

Walsh Chrstoper T., **Antibiotic Resistance,** Chemical Reviews, 105, 2, 391-393, (2005).

Weiduo Si, Joshua Gong, Rong Tsao, Milosh Kalab, Raymond Yang, Yulong Yin. **Bioassayguided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract.** Journal of Chromatography, A. 1125(2), 204-210, (2006).

Wolfender Jean – Luc, Ndjoko Karine, Hostettmann Kurt. **Liquid chromatography with ultraviolet absorbance – mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on – line structural investigation of plant metabolites.** Journal of Chromatography A, 1000, 437 – 455, (2003).

World Health Organization,
http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/who_cds_csr_rmd_2003.6_part1_spa.pdf, (2005).

Xu Dingguo, Zhou Yanzi, Xie Daiqian, Guo Hua. **Antibiotic Binding to Monozinc CphA β – Lactamase from *Aeromonas hydrophila*: Quantum Mechanical/Molecular Mechanical and Density Functional Theory Studies.** J. Med. Chem, 48, 6679 – 6689, (2005).

Yildirim Hakan H., Li Jianjun, Richards James C., Hood Derek W., E. Moxon Richard, H. Schweda Elke K.. **An Alternate Pattern for Globoside Oligosaccharide Expression in *Haemophilus influenzae* Lipopolysaccharide: Structural Diversity in Nontypeable Strain 1124.** Biochemistry, 44, 5207 – 5224, (2005).

Zhu Xiangfeng, Zhang Hongxun, Lo Raymond. **Phenolic Compounds from the Leaf Extract of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their Antimicrobial Activities.** J. Agric. Chem., 52, 7272 – 7278, (2004).