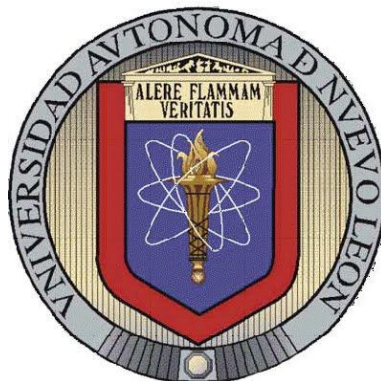


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



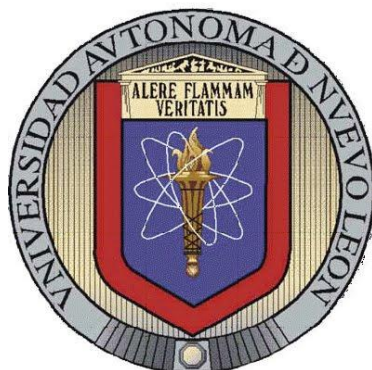
COMPONENTES QUÍMICOS CON ACTIVIDAD BACTERICIDA, FUNGICIDA Y
CITOTÓXICA DE PLANTAS DE LA FAMILIA
MYRTACEAE Y LAURACEAE

Por

BEATRÍZ PADRÓN MÁRQUEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS
con Acentuación en Química de Productos Naturales

Diciembre, 2010



COMPONENTES QUÍMICOS CON ACTIVIDAD BACTERICIDA, FUNGICIDA
Y CITOTÓXICA DE PLANTAS DE LA FAMILIA
MYRTACEAE Y LAURACEAE

TESIS


Presentada como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS

Acentuación en Química de Productos Naturales

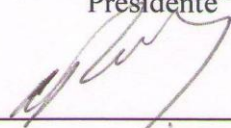
Por

BEATRÍZ PADRÓN MÁRQUEZ

COMISIÓN DE TESIS

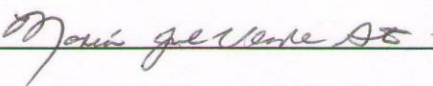


Dra Azucena Oranday Cárdenas
Presidente

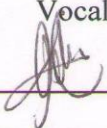


Dra. Catalina Rivas Morales
Secretario

Dra. Pilar Carranza Rosales
Vocal



Dra María Julia Verde Star
Vocal



Dra. Delia Elva Cruz Vega
Vocal

Diciembre 2010




COMPONENTES QUÍMICOS CON ACTIVIDAD BACTERICIDA, FUNGICIDA
Y CITOTÓXICA DE PLANTAS DE LA FAMILIA
MYRTACEAE Y LAURACEAE

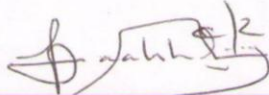
Por

BEATRÍZ PADRÓN MÁRQUEZ

Este trabajo fue realizado en el departamento de Química de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección de la Dra. Azucena Oranday Cárdenas y en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Médica del Noreste del IMSS asesorada por la Dra. Pilar Carranza Rosales.



Dra. Azucena Oranday Cárdenas
Director Interno



Dra. Pilar Carranza Rosales
Director Externo

Diciembre 2010

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral no hubiera sido posible sin la cooperación desinteresada de personas e instituciones que han facilitado las cosas para que llegue a un feliz término. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para expresar mis agradecimientos a mi comité de tesis por las sugerencias metodológicas y brindarme el acceso a información específica para lograr dar estructura a este trabajo.

Gracias a la Dra. Azucena por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección y por su capacidad para guiar mis ideas por el camino correcto.

Quiero agradecer de manera especial y sincera a las Dras. Pilar y Delia por dedicar horas de su tiempo a enseñarme a trabajar en un laboratorio de cultivos celulares y a la resolución de problemas que se presentaron a lo largo de el desarrollo de esa parte de mi trabajo.

A la Dra. Catalina y a la Dra. Julia por su apoyo no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigadora e inculcando en mí la espinita de ver que hay después de un trabajo de investigación.

También me gustaría agradecer a las personas que conocí durante el desarrollo de este trabajo y que de una u otra forma estuvieron conmigo a lo largo de estos años apoyándome en todos los sentidos.

Mil gracias a todos

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a CONACYT por haber financiado mis estudios al otorgarme la beca No. 154057.

Por otra parte, debo agradecer a la Facultad de Ciencias Biológicas y muy en especial al departamento de Bioquímica por facilitar sus instalaciones y equipo para la realización de la parte química de este trabajo y a la Dra. Marcela González Álvarez del Departamento de Botánica por la orientación brindada para la clasificación de las plantas utilizadas.

Finalmente, me gustaría reconocer el apoyo del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, en especial a la División de Biología Celular y Molecular por haberme aceptado en sus instalaciones para alcanzar los objetivos planteados en el área de cultivos celulares.

DEDICATORIA

*A Dios por haber puesto en mi camino a todas
las personas que han sido mi soporte en
todos los ámbitos.*

*A mi Familia por el apoyo y la compañía que me
brindan y porque sé que cuento con ellos en
todo momento, gracias por enriquecer mi
vida con su cariño y alegría*

*A mis amigos por su confianza y con quienes he
compartido tantos momentos especiales por
lo que siempre los llevaré en mi corazón.*

*A mis maestros por su disposición y ayuda
brindadas en mi formación
profesional*

ÍNDICE

| Sección | | Página |
|---------|--|--------|
| | Índice de Tablas | I |
| | Índice de Figuras | II |
| | Abreviaturas | III |
| 1 | RESUMEN | 1 |
| 1 | ABSTRACT | 3 |
| 2 | INTRODUCCIÓN | 5 |
| 3 | ANTECEDENTES | 7 |
| 3.1. | Las plantas como fuente de compuestos medicinales | 7 |
| 3.2. | Familia Lauraceae y Myrtaceae | 8 |
| 3.2.1. | <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Brey | 8 |
| 3.2.2. | Componentes químicos del aceite esencial de la corteza de canela | 8 |
| 3.2.3. | Clavo <i>Syzygium aromaticum</i> (L) | 9 |
| 3.2.4. | Componentes químicos del aceite esencial del clavo | 10 |
| 3.2.5. | <i>Guayaba Psidium guajava</i> (L) | 10 |
| 3.2.6. | Componentes químicos de las hojas del guayabo | 11 |
| 3.2.7. | Eucalipto rojo <i>Eucalyptus camaldulensis</i> (Dehnh) | 11 |
| 3.2.8. | Componentes químicos de las hojas del eucalipto | 11 |
| 3.3 | Problemática de la resistencia a los antimicrobianos | 12 |
| 3.3.1. | Familia de las Enterobacterias | 13 |
| 3.3.2. | Familia Micrococcaceae | 16 |

| | | | |
|-----|--------|---|----|
| | 3.3.3. | Micosis Superficiales | 17 |
| 3.4 | | Cultivos celulares | 19 |
| | 3.4.1. | Características principales de las líneas celulares utilizadas | 20 |
| 4 | | HIPÓTESIS | 23 |
| 5 | | JUSTIFICACIÓN | 24 |
| 6 | | OBJETIVO GENERAL | 25 |
| | 6.1. | Objetivos específicos | 25 |
| 7 | | MATERIAL Y MÉTODOS | 26 |
| | 7.1. | Material biológico | 26 |
| | | 7.1.1. Descripción de las plantas utilizadas | 26 |
| | | 7.1.2. Cepas bacetrianas | 31 |
| | | 7.1.3. Cepas fúngicas | 31 |
| | | 7.1.4. Células | 31 |
| | 7.2. | Preparación y extracción del material vegetal | 32 |
| | | 7.2.1. Recolección e identificación de las plantas | 32 |
| | | 7.2.2. Obtención de extractos | 32 |
| | 7.3. | Evaluación de la actividad antimicrobiana | 33 |
| | | 7.3.1. Medios de cultivo | 33 |
| | | 7.3.2. Activación de las cepas | 33 |
| | | 7.3.3. Preparación del inóculo | 34 |
| | 7.4. | Prueba de sensibilidad a los extractos por el método de difusión con discos | 35 |
| | 7.5. | Aislamiento de los compuestos activos | 35 |
| | | 7.5.1. Cromatografía en capa fina | 35 |
| | 7.6. | Localización de los compuestos activos | 37 |
| | | 7.6.1. Bioautografía | 37 |
| | 7.7. | Purificación de los componentes de los extractos activos por bioautografía | 37 |

| | | |
|-------|--|----|
| 7.8. | Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) | 38 |
| 7.9. | Evaluación de la actividad citotóxica | 39 |
| | 7.9.1. Criopreservación de las líneas celulares | 39 |
| | 7.9.2. Cambio de medio, resiembra y almacenamiento de las líneas celulares | 40 |
| 7.10. | Ensayo de citotoxicidad en microplacas | 41 |
| 7.11. | Identificación de los grupos funcionales de los compuestos aislados | 43 |
| | 7.11.1. Pruebas químicas | 43 |
| | 7.11.2. Métodos espectroscópicos | 43 |
| 8 | RESULTADOS | 44 |
| 9 | DISCUSIÓN | 58 |
| 10 | CONCLUSIONES | 64 |
| 11 | PERSPECTIVAS | 65 |
| 12 | LITERATURA CITADA | 66 |
| 13 | APÉNDICES | 76 |
| | 13.1. Preparación de reactivos y soluciones de trabajo | 76 |
| | 13.2. Resumen curricular | 80 |
| | 13.3. Artículo | 81 |

II. ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla | Página |
|--|---------------|
| 1. Plantas estudiadas y parte de la planta utilizada. | 26 |
| 2. Numeración de los extractos obtenidos | 44 |
| 3. Actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos | 45 |
| 4. Características cromatográficas de todos los compuestos activos | 49 |
| 5. CMI (mg/mL) de los extractos del clavo vs. las bacterias más sensibles | 50 |
| 6. Características cromatográficas de los compuestos más activos | 50 |
| 7. Rendimiento de las fracciones purificadas | 51 |
| 8. CMI de la fracción Df ($\mu\text{g/mL}$) sobre algunas de las cepas más sensibles | 51 |
| 9. Pruebas químicas realizadas a las fracciones Df, J e I | 51 |

II. ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1 | Clavo (capullos). | 26 |
| 2 | Canela (corteza). | 28 |
| 3 | Eucalipto (hojas). | 29 |
| 4 | Guayabo (hojas). | 30 |
| 5 | Imágenes representativas de células CHANG, células OK y células LLCPK1. | 31 |
| 6 | Efecto del extracto de canela soxhlet hexano (13) sobre <i>Escherichia Coli</i> y de clavo shaker hexano (4) <i>Escherichia. coli</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>C. parapsilosis</i> | 46 |
| 7 | Viabilidad de las células OK, LLC-PK1 y CHANG frente a las fracciones Df, I y J | 47 |
| 8 | Toxicidad de las fracciones Df (Clavo agitación hexano), I (canela soxhlet hexano) y J (eucalipto agitación hexano) sobre células MCF-7 | 48 |
| 9 | Cromatografía de gases de la muestra I (fracción de canela soxhlet hexano) | 52 |
| 10 | Espectro de Masas de la fracción I (cinamaldehído) obtenida del extracto de canela- soxhlet hexano. Estructura química del | 53 |
| 11 | cinamaldehído | 54 |
| 12 | Cromatografía de gases de la muestra Df (fracción de clavo agitación hexano) Espectro de Masas de la fracción Df obtenida de Clavo agitación hexano | 55 |
| 13 | (Eugenol) | 56 |
| 14 | Estructura química del Eugenol | 57 |

III. ABREVIATURAS

| | |
|-------|---|
| Abs | Absorbancia |
| CG-EM | Cromatografía de gases acoplada a masas |
| CMI | Concentración mínima inhibitoria |
| g | Gramo |
| h | Hora |
| Kg | Kilogramo |
| L | Litro |
| M | Molar |
| mg | Miligramo (10 ⁻³ Gramo) |
| min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| nm | Nanómetro |
| °C | Grados Celsius |
| pH | Potencial de Hidrógeno |
| Rf | Retention factor |
| µg | Microgramos |
| µL | Microlitro |
| µM | Micromolar |

RESUMEN

El hecho de que el hombre tenga a su disposición una gran diversidad de plantas medicinales y por otro lado cada vez con más frecuencia los microorganismos drogo-resistentes, propician la necesidad de desarrollar nuevas drogas e impulsa proyectos como el presente, en el que a partir de plantas utilizadas empíricamente, se busca probar científicamente sus actividades biológicas y propiedades fisicoquímicas. Por estas razones, en este trabajo se estudiaron 4 plantas pertenecientes a la familia Lauraceae y Myrtaceae que se utilizan con frecuencia en México. Se obtuvieron extractos a partir de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Syzygium aromaticum* (clavo), *Eucalyptus camaldulensis* (eucalipto) y *Psidium guajava* (guayabo); los extractos se prepararon con solventes de diferente polaridad con agitación a temperatura ambiente y mediante soxhlet. Posteriormente, se evaluó su acción antimicrobiana por el método de difusión en placa. Se separaron las fracciones de los extractos con mayor actividad por medio de cromatografía en capa fina, se localizó la fracción responsable de dicha actividad por ensayos de bioautografía, se identificaron sus grupos funcionales y estructura química utilizando pruebas químicas y espectroscopía de masas. Adicionalmente se analizó su actividad citotóxica sobre células OK, LLCPK-1 y MCF-7. En cuanto a la actividad antimicrobiana se obtuvieron 24 extractos, de éstos, tres extractos hexánicos presentaron mayor actividad: el extracto 4 correspondiente a clavo fue activo contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *Trichophyton tonsurans* y *Sporothrix schenckii*; el extracto 10 de eucalipto fue activo contra *T. tonsurans* y el extracto 13 de canela presentó una gran actividad contra *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *C. neoformans*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *T. tonsurans* y *S. Schenckii*. Por medio de cromatografía en capa fina se separaron las fracciones de estos extractos y mediante bioautografía se identificaron las siguientes fracciones activas: del clavo se obtuvo la fracción Df (Rf 0.68), del eucalipto, la J (Rf 0.80) y de la canela se separó la fracción I (Rf 0.78). La fracción Df resultó positiva para insaturaciones y oxhidrilos fenólicos, después de purificarla se identificó como eugenol mediante cromatografía de gases y

espectrometría de masas (CG-EM). La fracción J resultó positiva para la presencia de insaturaciones, alcaloides y cumarinas, mientras en la fracción I se determinaron insaturaciones y alcaloides. Cuando se analizaron por CG/EM esta fracción presentó un pico de mayor intensidad que fue identificado como cinamaldehído. Las fracciones (Df, I, J) no fueron citotóxicas contra las líneas celulares LLCPK-1, OK y CHANG sin embargo la fracción Df resultó citotóxica contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7 a una concentración de 100 µg/mL. De acuerdo a los resultados obtenidos todos los extractos evaluados presentan actividad, al menos sobre uno de los microorganismos probados. los extractos más activos fueron los no polares del clavo; mediante ensayos biodirigidos de estos se obtuvo la fracción Df (eugenol), la cual tuvo actividad sobre bacterias Gram (+), Gram (-) y relevante actividad sobre *C. albicans* (CMI 12.5 µg/ml) y *C neoformans* (3.1µg/ml) en comparación con el control positivo que presentó una CMI de 125.0 y 15.6 µg/ml respectivamente, además de presentar toxicidad selectiva sobre las células tumorales MCF-7 y no sobre las normales. Con este trabajo se pretende contribuir en la investigación para el desarrollo de compuestos antimicrobianos y antitumorales derivados de productos naturales que sean tanto eficaces como seguros.

ABSTRACT

The fact that man possess a variety of medicinal plants, and on the other hand, resistant microorganisms are increasing, lead to the need to develop new drugs and promotes projects like this, which seeks to scientifically test biological activities and physicochemical properties from plants used empirically. For these reasons, in this work we studied 4 plants belonging to the Lauraceae and Myrtaceae families, which are frequently used in Mexico. Plant extracts were obtained from *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon), *Syzygium aromaticum* (clove), *Eucalyptus camaldulensis* (Eucalyptus) and *Psidium guajava* (guava). The extracts were prepared using solvents of different polarity with stirring at room temperature and by using Soxhlet apparatus. Subsequently, we evaluated their antimicrobial activity by the disk diffusion method. Fractions were separated from the most active extracts by thin layer chromatography, the fraction responsible for such activity was identified by bioautography test; functional groups and chemical structures were determined by chemical tests and mass spectroscopy. Additionally, cytotoxic activity was analyzed on OK, LLCPK-1 and MCF-7 cells. In terms of antimicrobial activity, 24 extracts were obtained, from these, three hexane extracts showed the higher activity: extract 4 corresponding to clove was active against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *Sporothrix schenckii*, and *Trichophyton tonsurans*, extract 10 from eucalyptus was active against *T. tonsurans*, and extract 13 from cinnamon showed a high activity against *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *C. neoformans*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *T. tonsurans* and *S. Schenckii*. Fractions were separated by thin layer chromatography, and purified by bioautography, we identified 3 active fractions: fraction Df (Rf 0.68) from clove, fraction J (Rf 0.80) from eucalyptus and fraction I (Rf 0.78), from cinnamon. Df fraction was positive for phenolic hydroxyl acids and, after purifying was identified as eugenol by gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS). The J fraction was positive for the presence of unsaturation, alkaloids and coumarins, while in fraction I were determined unsaturation and alkaloids. When analyzed by GC-MS, this fraction showed a higher intensity peak was identified as

cinnamaldehyde. This three fractions (Df, I and J) showed no cytotoxicity against normal cell lines LLCPK-1, CHANG and OK however Df fraction was cytotoxic against the breast cancer cell line MCF-7 at a concentration of 100 μ g / mL. According to our results, all extracts were active, at least on one of the tested microorganisms. The most active extracts non-polar from clove, Fraction Df (eugenol), had antimicrobial effect against Gram (+), Gram (-) and significant activity against *C. albicans* (CMI 12.5 μ g / ml) and *C. neoformans* (3.1 μ g / ml) compared with the positive control (MIC 125.0 and 15.6 μ g / ml respectively), Besides of this, Df fraction showed selective toxicity on tumor cells MCF- 7, and was not citotoxicic against normal cell lines. This work aims to contribute to research for the development of effective and safe antimicrobial and antitumor compounds derived from natural products.

1. INTRODUCCIÓN

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempo inmemorial. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso de que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar sus experiencias en el empleo de los productos que de ellas se extraen (Hill, A. F. 1965).

A principios de 1900, la industria farmacéutica puso en marcha la producción de nuevos medicamentos. Para la fabricación de muchos de ellos se utilizaron los principios activos de determinadas plantas medicinales, creyendo que las acciones atribuidas a dichas sustancias, se verían incrementadas, y permitir así realizar terapias donde la cantidad de principio activo es superior al que posee la planta. Pero se comprobó que las propiedades de dichas sustancias, eran menos eficaces y existía peligro de producir intoxicaciones e intolerancias, cosa que no ocurría con la utilización de la planta entera

La OMS hizo un llamado para que los países incrementen sus esfuerzos para controlar la resistencia antimicrobiana; promover las políticas nacionales de desarrollo sustentable para el uso racional de antimicrobianos; desarrollar sistemas de comunicación para recabar y compartir datos sobre resistencia en patógenos específicos y el uso de antimicrobianos y promover la investigación y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos (WHO, 2002).

Los remedios a base de plantas medicinales presentan una inmensa ventaja con respecto a los tratamientos químicos. En las plantas los principios activos se hallan siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse entre sí, de forma que en general no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados. Sin embargo, a pesar de que han aumentado las investigaciones y estudios científicos de las plantas medicinales, todavía no se conocen muchos de los principios activos a los que deben las plantas sus cualidades (Hernández *et al.*, 2003).

Dichas cualidades terapéuticas o tóxicas han propiciado el estudio de su composición química, análisis estructural de sus componentes y posteriormente su síntesis para aplicaciones en la industria farmacéutica. De lo anterior se deduce que la importancia de los productos naturales en medicina, se basa no solamente en los efectos farmacológicos o quimioterapéuticos que los extractos vegetales pudieran poseer, sino también en la posibilidad que representan para el desarrollo de nuevas drogas a partir de las estructuras químicas que se lleguen a elucidar a partir de estos. Para evaluar su eficiencia y garantizar su inocuidad se necesita realizar un tamizaje extensivo mediante pruebas químico-biológicas y citotóxicas de este tipo de compuestos (Alanís, 1994).

Tomando como base lo anterior, en este trabajo se estudiaron plantas que se utilizan comúnmente y de manera empírica, tales como *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Syzygium aromaticum* (clavo), *Eucalyptus camaldulensis* (eucalipto) y *Psidium guajava* (guayaba), con la finalidad de estudiar su posible actividad antibacteriana y antifúngica, así como su actividad citotóxica sobre líneas celulares normales y tumorales.

3. ANTECEDENTES

3.1 Las plantas como fuente de compuestos medicinales

El reino vegetal posee muchas especies de plantas que contienen principios activos con potencial medicinal aún por descubrir. En la naturaleza existen entre 250 000 a 500 000 especies vegetales, de las cuales se estima que menos del 10% han sido estudiadas en sus aspectos químicos o farmacológicos.

Un grupo importante son las llamadas plantas medicinales, el uso de éstas como fuentes de nuevos fármacos puede ser más económico y rentable de lo que comúnmente se cree. Actualmente son alrededor de 120 compuestos químicos derivados de plantas que se utilizan como agentes terapéuticos. Menos de una docena de ellos se producen comercialmente por síntesis o modificación química del compuesto natural, los restantes se extraen y purifican directamente de plantas pertenecientes a unas 90 especies. (Abreu y Cuéllar, 2008)

Por otro lado, la herbolaria en México ha estado presente desde la época prehispánica como lo muestra una de las fuentes bibliográficas históricas más importantes de México conocido con el nombre de Códice Badiano; donde se puede encontrar una descripción del uso medicinal de más de 150 plantas Mexicanas utilizadas en esa época.

Cerca del 57 % de los fármacos vendidos en Estados Unidos son derivados sintéticos o análogos de productos naturales. De 1983 a 1995, más del 60 % de las drogas aprobadas para el tratamiento del cáncer e infecciones se basaron en productos naturales. (Setzer *et al.*, 2003).

3.2 Familia Lauraceae y Myrtaceae

3.2.1 Canela *Cinnamomum zeylanicum* Brey

La canela en rama es originaria de Sri Lanka, pero también se cultiva en Brasil, Birmania, India, Indonesia, Indias occidentales e islas del océano Pacífico. El mayor productor sigue siendo Sri Lanka seguido de las islas Seychelles. Uno de los principales importadores de canela de Sri Lanka es México.

De la corteza del tallo se han preparado diversos tipos de extractos (cloroformo, éter de petróleo, etanólico, acuoso, tintura y aceite esencial) y se han evaluado para conocer su acción antibiótica frente a varias especies bacterianas, entre otras, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella brobchiseptica*, *Sarcina lutea* y *Mycobacterium tuberculosis*. Con excepción de la tintura, todos los extractos dieron resultados positivos de actividad antibacteriana (Pahlow, 1981) También se ha demostrado buena actividad antifúngica contra los siguientes dermatofitos: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* y *T. rubrum* por parte de fenilpropanoides aislados de la canela (Zacchino *et al.*, 1999).

Contiene taninos que explican su acción astringente y anti diarreica ya que precipitan las proteínas superficiales de las células, disminuyendo su permeabilidad y originando una capa proteica insoluble sobre la mucosa inflamada, que protege de las sustancias irritantes e impide las exudaciones y secreción mucosa, así como la absorción de toxinas bacterianas dando como resultado una acción antidiarreica (Alonso, 2004).

3.2.2 Componentes químicos del aceite esencial de la corteza de canela

El aceite contiene de 55 a 85% de componentes carbonílicos, siendo el aldehído cinámico el principal compuesto. En menor cantidad: o-metoxialdehído cinámico, eugenol (5 a 11%) hidrocarbonatos (α -pineno, ρ - cimeno, α -felandreno) aldehídos (bencílico, cumínico,

nonílico, furfural) cetonas (metil amil cetona) y también trazas de alcohol (linalol), timol y carvacol. En la corteza fresca se presenta el cinamil-acetato, que durante el secado se transforma en aldehído cinámico. En la corteza de las raíces el aceite esencial se compone principalmente de cânfora además de otros monoterpenos, taninos (2%), azúcares: almidón e indicios de mucílago, contiene el azúcar invertido manitol, cumarinas, diterpenos y sesquiterpenos, cinnzeilanina y cinzeilanol, cariofileno. minerales: oxalato de calcio de 2.5 a 6%, Otros: bencilisoquinolina, berberina, metileugenol, miristicina, elamicina, ac. mirístico, ac. láurico, aldehído cumínico, fenantroquinolicidina, fenantroindolicionina. (Friedman et al., 2000; Shu-Wei, 2009)

3.2.3 Clavo *Syzygium aromaticum* (L)

El clavo muestra actividad antiséptica, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiespasmódica y anestésica local. Durante la Edad Media, el clavo se empleó para contrarrestar la peste y los olores fétidos, así durante el siglo XIII, sobre todo la aristocracia, usaba las llamadas manzanas de ámbar que contenían clavo, también se empleaba el aceite de clavo (eugenol), conseguido mediante destilación, que conservaba muchas de las propiedades de la planta.

El aceite esencial ha mostrado actividad antibacteriana sobre microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos, que se ha atribuido a la estructura fenólica del eugenol. Este compuesto es capaz de inhibir también el crecimiento de levaduras como *Candida albicans* y *C. neoformans* y de hongos filamentosos. Por otro lado, el extracto metanólico ha sido efectivo contra a patógenos anaerobios orales Gram-negativos, siendo los principales responsables de esta acción los flavonoles kempferol y miricetina. El extracto acuoso es un potente inhibidor del crecimiento de *Helicobacter pilori* (Arteche, 1998).

3.2.4 Componentes químicos del aceite esencial del clavo

El aceite volátil obtenido de esta planta está constituido por un fenilpropanoide, otros componentes son acetato de eugenilo, el eugenol con acetileugenol, α -cariofileno, β -cariofileno, metilsalicilato, benzaldehído y los sesquiterpenos α -copeno, γ -cadieno, δ -cadieno y α -cubeno, también se han identificado c-glucosilcromonas tales como bioflorina e isobiflorina. Taninos, entre los que destaca el elagitanino eugeniina, además se encuentran la casuarictina, telimagrandina I y 1,3-di-O-galoil-4,6(S)-hexahidroxiifenil-beta-D-glucopiranososa. Otros compuestos que se han encontrado son flavonoides (kempferol y mamnetina), esteroides (sitosterol, campesterol y estigmasterol) así como sustancias diversas (éster metílico de ácido cratególico y lípidos) (Wren, 1994).

3.2.5 Guayaba *Psidium guajava* (L)

La referencia más antigua se encuentra en la obra de Martín de la Cruz del siglo XVI donde se menciona como antidisentérica y antitérmica. El Códice Florentino, relata su uso para curar las diarreas, así como para curar un gran número de enfermedades, especialmente de los ojos (Pahlow, 1981)

Las partes de la planta que se usan medicinalmente son los frutos, hojas, corteza y raíces, las principales propiedades medicinales que se le atribuyen son acción antibiótica, antidiarreica, antiespasmolítica, astringente, desinflamante, expectorante, sedante y sudorífica en el tratamiento de problemas digestivos, catarro y tos.

Lin *et al* encontraron que los extractos acuoso y metanólico de hojas de *P. guajava* mostraron efecto antidiarreico en ratas además presentaron actividad antimicrobiana *in vitro* contra patógenos que causan diarrea como *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* (*S. flexneri*, *S. virchow* y *S. dysenteriae*) y *Escherichia coli* enteropatógena. (Lin *et al* 2002). Además, el extracto hidroalcohólico al 40 % de las hojas tuvo efecto significativo contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Martínez, 1997).

3.2.6 Componentes químicos de las hojas del guayabo

Las hojas contienen un aceite esencial rico en cariofileno, nerolidiol, 3-bisaboleno, aromandreno y para-selíneno. También se han detectado el beta-sitosterol, los triterpenoides; ácidos oleanólico, ursólico, catagólico y guayavólico; 10 % de taninos derivados del ácido elógico y los flavonoides quercetina y quercitín-3-arabinósido. En la raíz se han detectado leucocianidinas, esteroides y ácido gálico (Fu, 2009; del Monte 1998).

3.2.7 Eucalipto rojo *Eucalyptus camaldulensis* (Dehnh)

Los eucaliptos son ricos en diversos principios, sobre todo en eucaliptol, un polialcohol de propiedades antisépticas, sedativas y anticatarrales que se usa en forma de esencia o por obtención de vapores a partir de sus hojas, para curar los procesos infecciosos de las vías respiratorias.

En la medicina tradicional se ha reportado su uso como anestésico, antiséptico, astringente, como remedio para los resfriados, cólicos, tos, diarrea, disentería, hemorragias, laringalgia, laringitis, faringitis, espasmos y traquealgia (Duke and Wain, 1981).

3.2.8 Componentes químicos de las hojas del eucalipto

El aceite esencial contiene hasta un 80% de eucaliptol, aldehídos, hidrocarburos, pineno, canfeno, azuleno, tanino y resina. otros componentes son el alfa-tujeno 4.25%, alfa-pineno 1.36%, sabineno 1.43%, beta-pineno 0.10%, myrceno 0.87%, alfa-fellandreno 0.32%, alfa-terpineno 0.20%, para-cimeno 34.99%, beta-phellandreno 5.94%, 1,8-cineol 2.71%,

gamma-terpineno 0.47%, trans-sabineno hidrato 0.35%, oxido cis-linalool 0.13%, terpinoleno 0.13%, alfa-o-dimetilestireno 0.10%, hidrato de cis-Sabineno 0.43%, linalool 3.39%, beta-tujon 0.25%, trans-p-ment-2-en-1-ol 1.11%, terpinen-4-ol 5.72%, cripton 13.70%, p-cimen-8-ol 0.50%, alfa-terpineol 1.21%, cuminaldehído 3.65%, linalil acetato 2.33%, cuminil alcohol 0.95%, carvacrol 0.47%, alfa-terpinil acetato 0.19%, geranil acetato 0.16%, allo-aromadendreno 0.35%, (E)-beta-farneseno 0.28%, espatulenol 4.30% y óxido de cariofileno 0.43% (Pappas, 2000).

3.3 Problemática de la resistencia a los antimicrobianos

La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno biológico natural que puede ser acelerado por una variedad de factores, incluyendo las prácticas humanas. El uso de un antimicrobiano para cualquier infección, real o temida, en cualquier dosis y durante cualquier período de tiempo, fuerza a los microbios a adaptarse o morir en un fenómeno conocido como "presión selectiva". Los microbios que se adaptan y sobreviven son portadores de genes para la resistencia, que pueden ser transmitidos.

Las bacterias son particularmente eficientes en la mejora de los efectos de la resistencia, no sólo por su capacidad para multiplicarse muy rápidamente, sino también porque pueden transferir sus genes de resistencia cuando se replican.

Existe evidencia que apoya la opinión de que el alto consumo de antibióticos es el factor crítico en la selección de resistencia. Paradójicamente, la falta de uso por problemas de acceso, la dosificación inadecuada, la falta de adherencia a los antimicrobianos puede desempeñar un papel tan importante como el uso excesivo. Por estas razones, la mejora en el uso de antimicrobianos es una prioridad y la aparición y propagación de la resistencia deben controlarse de manera eficiente.

En septiembre de 2001, la OMS lanzó la primera estrategia mundial para la lucha contra los graves problemas causados por la emergencia y propagación de la resistencia a los

antimicrobianos conocida como la Estrategia Mundial OMS de contención de la resistencia a los antimicrobianos. Las malas prácticas de prescripción en cualquier país ahora amenazan con minar la potencia de los antimicrobianos en todas partes (WHO 2002).

Se estima que más del 60% de los resfriados comunes son tratados con antibióticos, contribuyendo al desarrollo de la resistencia bacteriana a estos fármacos. Algunas de las bacterias resistentes podría pertenecer a la flora normal del individuo y dicha resistencia podría ser transferida a otras bacterias oportunistas o patógenas poniendo en riesgo al hospedero. Así, al intentar combatir con antibióticos a la segunda bacteria, ésta ya es resistente y la enfermedad permanece en el individuo.

Es de particular importancia la adquisición de microorganismos patógenos u oportunistas de la flora normal que predispone a los individuos comprometidos a una posterior invasión por sus propios microorganismos nativos, principalmente en los pacientes postoperatorios y en los sujetos tratados con antibióticos, fármacos inmunosupresores o agentes antineoplásicos. Éstos microorganismos incluyen patógenos comunes como *S. aureus* y cepas invasoras de *E. coli*, así como también otras enterobacterias, *Pseudomonas*, hongos oportunistas y virus.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), aunque difíciles de cuantificar, se estiman relevantes en la salud de los mexicanos. Entre las bacterias que pueden sobrevivir en los alimentos y que conservan una patogenicidad elevada está especialmente la familia *Enterobacteriaceas* (Beiiio, 1990)

3.3.1 Familia Enterobacteriaceae

Las Enterobacterias son bacilos Gram-negativos pequeños (0.5 por 0.3 μm) que no forman esporas. Pueden ser móviles o inmóviles.

Para los niños muy pequeños, los ancianos, los desnutridos y las personas que viven en condiciones marginales, la diarrea representa una entidad grave que constituye una amenaza para la vida. Hasta una tercera parte de las muertes pediátricas que ocurren en los países en

desarrollo son atribuibles a la diarrea y a la deshidratación que ésta provoca. Se estima que cada año se producen entre 3000 y 5000 millones de casos de diarrea, con 5 a 10 millones de muertes, en África, Asia y América Latina.

Históricamente las *Enterobacteriaceae* han sido divididas en patógenos oportunistas y patógenos intestinales. Los patógenos intestinales tradicionalmente han incluido a los miembros de los géneros *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*, y los patógenos oportunistas a todos los demás géneros.

La familia de las *Enterobacteriaceae* contiene los géneros, *Salmonella*, *Shigella*, que se encuentran entre las causas principales de la diarrea bacteriana. Las especies de, *Shigella* constituyen las causas más importantes de la disentería bacilar, una enfermedad que se caracteriza por cólicos abdominales y la deposición frecuente y dolorosa de un exceso volumen de heces que contienen sangre y moco (Padilla, 2006)

En México, la incidencia es de 10 por cada 100,000 habitantes. De hecho, de 1989 a 1993, la incidencia disminuyó a la mitad, coincidiendo con las campañas del Sector Salud para la prevención del cólera. El grupo más afectado es el de adultos jóvenes, de 19 a 44 años de edad. (Calva, 2007; Brock.*et al.*,1998).

Por otra parte, en un estudio de 5 años en unidades de cuidado intensivo en Cuba en el 2002 Cordero Ruíz y cols observaron que los Gram-negativos eran los principales agentes causales de bacteriemia en sentido general, pero porcentualmente hubo cifra significativa de cepas aisladas de estafilococos coagulasa positivos (66,6 % de *Enterobacter aerogenes*) (Cordero *et al.*, 2002).

Dentro de las bacterias causantes de enfermedades gástricas importantes, también se encuentra *Escherichia coli*, la cual puede ser responsable de diarreas y de enfermedades que llegan a ser muy graves, como la colitis hemorrágica y síndrome urémico (Donnenberg y Kaper,1992). Sin embargo, existen varias maneras de interaccionar con el epitelio intestinal y de causar diarrea por *E. coli*.

El género *Escherichia* contiene una sola bacteria, *E. coli*, la cual es el principal habitante facultativo del intestino grueso y es el patógeno humano aislado con mayor frecuencia como agente causal de infecciones de las vías urinarias y de heridas, de neumonía, de meningitis y de septicemia. Ciertas cepas de *E. coli* también son patógenos intestinales

importantes que causan una amplia variedad de enfermedades gastrointestinales (Caron *et al.*, 1989).

En 1993 se presentaron un número inusual de niños con fallas renales en los hospitales cercanos a Seattle, Washington (EUA). Los niños habían tenido una fuerte y dolorosa diarrea con sangre antes de presentar daños al riñón (Nataro y Kaper, 1998).

Las cepas de *E. coli* enteroagregativas (EAEC) causan diarrea persistente en niños. Al igual que las cepas ETEC, estas células producen toxinas ST y hemolisinas y se adhieren al intestino delgado y no son invasivas (Cravioto *et al.*, 1991).

La versatilidad bioquímica de *E. coli* le permite no sólo invadir el tracto digestivo, sino también el sistema urogenital, causando infecciones. Las cepas uropatogénicas (UTI) son dispersadas en las comunidades (colegios, internados, centros de trabajo y recreación), siendo el grupo más susceptible las niñas menores de 10 años y las mujeres de 20 a 40 años. Infecciones causadas por UTI son muy raras en hombres. Las infecciones causadas por estas bacterias causan normalmente cistitis, aunque en ocasiones pueden llegar a causar pielonefritis al invadir el riñón (Salyers y Whitt 1994).

Los estafilococos son microorganismos ubicuos responsables de más del 80% de las enfermedades supurativas que se observan en la práctica médica y ocupan el segundo lugar después de *E. coli* como causa de las infecciones adquiridas en el hospital.

Los microorganismos del género *Bacillus* son bacilos gram-positivos, aerobios, grandes, se agrupan formando cadenas. *Bacillus cereus* puede crecer en los alimentos y producir una enterotoxina y producir envenenamiento, también puede acompañar a varias infecciones sintomáticas oportunistas (Jawetz. 1990)

La intoxicación alimentaria por *B. cereus*, origina el llamado síndrome emético, que surge después de un breve lapso de incubación y se caracteriza por náuseas, vómitos, cólicos abdominales y diarrea en el 33 % en promedio de los pacientes. También causa un síndrome diarreico con un periodo de incubación más largo y se caracteriza por cólicos abdominales moderados a intensos y diarrea acuosa y en el 25 % de los pacientes surgen vómitos (Kasper *et al.*, 2006).

3.3.2 Familia Micrococcaceae

El *Staphylococcus* es el único género de importancia médica en la familia *Micrococcaceae*. Los estafilococos son gérmenes Gram-positivos y algunas de sus cepas producen una enterotoxina termoestable. Las principales fuentes de infección son fomites contaminados, el aparato respiratorio y lesiones en la piel (Jawetz et al., 1983). Los estafilococos habitan normalmente en la piel de los mamíferos pero si se rompe la barrera de la superficie a causa de un traumatismo o por cirugía y los microorganismos ganan acceso a los tejidos subyacentes pueden producir endocarditis aguda y lesiones metastáticas diseminadas. Un factor importante en la persistencia del microorganismo es su capacidad para desarrollar resistencia a los antibióticos antiestafilocócicos (Jokik et al., 1997).

Aunque normalmente están presentes en la nariz y en la piel del 20 al 30 por ciento de los adultos sanos (y menos frecuentemente en la boca, las glándulas mamarias y los aparatos genitourinario, intestinal y las vías respiratorias altas), los estafilococos no suelen ser perjudiciales. Los individuos propensos a las infecciones estafilocócicas son los recién nacidos, las mujeres en período de lactancia, las personas con enfermedades crónicas (especialmente afecciones pulmonares, diabetes y cáncer), las que presentan afecciones cutáneas e incisiones quirúrgicas y aquellas cuyos sistemas inmunológicos están inhibidos por el uso de corticosteroides, radioterapia, fármacos inmunodepresores o medicamentos anticancerosos.

Una infección estafilocócica del intestino suele provocar fiebre, así como hinchazón y distensión abdominal, debido a una suspensión temporal de los movimientos contráctiles normales del intestino (íleo) y diarrea. La infección es más frecuente entre los pacientes hospitalizados, en especial los que han sido sometidos a cirugía abdominal o han recibido un tratamiento con antibióticos (MSD, 2005).

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la rama γ de las proteobacterias, misma a la que pertenecen las enterobacterias. *P. aeruginosa* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza se puede aislar de muestras de suelo, aguas y contaminadas, así como de plantas y animales. Todas las cepas son potencialmente patógenas

para el hombre. Esta bacteria es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrientes que otros organismos pueden asimilar. Se obtienen aislamientos de esta bacteria a partir de entre el 2 y el 8% de las heces de personas sanas lo que nos muestra que nuestro contacto con esta bacteria es cotidiano y sólo representa una amenaza para nuestra salud en condiciones especiales. *P. aeruginosa* representa un problema importante de salud en centros hospitalarios, especialmente cuando se trata de pacientes con cáncer o con quemaduras. Una vez que se establece la infección, *P. aeruginosa* produce una serie de compuestos tóxicos que causan no sólo daño tisular extenso, sino adicionalmente interfieren con el funcionamiento del sistema inmune. *P. aeruginosa*, presenta una muy alta resistencia natural a distintos antibióticos y a desinfectantes.

Por otra parte, en ambientes acuosos esta bacteria se adhiere a superficies, produciendo una especie de agregado llamado biopelícula. La formación de estos cúmulos de bacterias y material extracelular representa un problema de salud pues contamina dispositivos que se implantan dentro del cuerpo, como por ejemplo dispositivos intrauterinos, catéteres o válvulas cardíacas (Soberón-Chávez, Palmeros 1994).

3.3.3 Micosis Superficiales

Emmons, en 1934, clasificó los dermatofitos en tres géneros anamórficos (asexuales): *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*, clasificación que sigue aceptándose en la actualidad. Los teleomorfos de los dermatofitos se clasifican en un género, *Arthroderma*. Por otra parte, según la adaptación de cada una de las especies o variedades de estos hongos a diferentes animales u otros reservorios ecológicos se dividen, clásicamente, en especies geofílicas, zoofílicas y antropofílicas.

Los dermatofitos antropofílicos causan micosis sólo en el hombre, entre ellos: *Microsporum audouinii*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton schoenleinii*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton violaceum*, *Epidermophyton floccosum* etc. Entre los dermatofitos zoófilos, que originan micosis en los

animales, a partir de los cuales se infecta el hombre, se puede citar a *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, var. *mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton equinum*, *Microsporum gallinae*, etc. Por último, los geófilos, especies que se encuentran en el suelo como saprófitos, nutriéndose de la queratina existente en él (pelos, escamas, plumas) y con quienes tanto el hombre como los animales se infectan directamente: *Microsporum gypseum*, *Microsporum fulvum*, *Microsporum nanum*, *Microsporum cookei*.

Los hongos saprófitos son difíciles de controlar debido a que se asocian con mecanismos de defensa dañados del hospedero, y los agentes terapéuticos utilizados para su tratamiento con frecuencia son, por sí mismos citotóxicos (Conner y Beuchat, 1984).

Los hongos, tanto filamentosos como las levaduras son células eucarióticas. Esto hace que sus diferencias con las células del organismo sean menores comparadas, por ejemplo, con las que presenta una bacteria. La única estructura diferente es la pared celular; pero hasta el momento no hay antimicrobianos que inhiban sin perjudicar en alguna forma al huésped (Becker *et al.*, 1983).

Entre 1807 y 1828, se presentaron en París 25 000 casos de tiña de la cabeza. En 1845, Malmstein creó el género *Trichophyton* e identificó a *Trichophyton tonsurans*; que es un hongo que frecuentemente causa micosis superficiales; en México está presente en un 15 a 28% de los casos. En Alemania, en 1894, Busse, y en 1895, Buschke, describieron el primer caso de criptococosis en seres humanos con lesiones cutáneas y óseas. En 1901 Vuillemin clasificó a la levadura en el género *Cryptococcus* y llamó *C. neoformans* a este hongo. En 1898, Benjamin Schenck, definió a la esporotricosis y su microorganismo causal y en 1900, Hektoen y Perkins informaron el segundo caso y llamaron al hongo aislado *Sporothrix schenckii*. En 1947, Simson informó una epidemia de alrededor de 3 000 casos en minas de oro de sudafrica. Gayón reportó en la Academia Nacional de Medicina el primer caso en México en 1913 y lo publicó en 1914 en la Gaceta Médica de México (Arenas, 1993).

De las distintas especies antes citadas, *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* y *E. floccosum* son de distribución universal, siendo las que se aíslan con más frecuencia en nuestro medio (Koneman y Roberts 1984)

Candida albicans: La candidiasis es ocasionada por el hongo *C. albicans* o cepas relacionadas. Las cepas *Candida* son patógenos comunes, que un sistema inmunológico saludable generalmente puede mantener bajo control. En la mayoría de los casos, la

candidiasis es la primera señal de deterioro inmunológico. La candidiasis puede afectar a la piel, las uñas, o las membranas mucosas, pero es más común en la boca (afta oral), la garganta (candidiasis del esófago) y la vagina. La candidiasis no suele diseminarse por el cuerpo. La candidiasis leve oral y vaginal pueden ser tratadas con medicamentos tópicos administrados en el área afectada; el tratamiento tópico tiene preferencia siempre que sea posible, a fin de evitar el desarrollo de la *Candida* farmacológicamente resistente.

Cryptococcus neoformans : La criptococosis es causada por un hongo parecido a la levadura, llamado *C. neoformans*, el cual se encuentra en la tierra y en el excremento de las aves. Se transmite a través de la inhalación de polvo contaminado. La criptococosis usualmente afecta a personas con menos de 50 linfocitos CD4/mm³. La afección más común de la enfermedad es la meningitis criptococal, una inflamación de las membranas que rodean el cerebro y la columna vertebral; si no es tratada, la enfermedad puede derivar en coma y muerte. La criptococosis también puede afectar a otras áreas del cuerpo incluyendo la piel, los pulmones (neumonía criptococal) y el cerebro (encefalitis). Después del tratamiento primario, se requiere una profilaxis secundaria de por vida para prevenir la reaparición (Highleyman, 1999).

3.4 Cultivos celulares

Los ensayos de citotoxicidad son técnicas de cultivo celular que, en cierto modo, han sido diseñadas para sustituir a la metodología *in vivo* (Cohen, 1995). El cultivo celular es muy adecuado como modelo para el estudio del desarrollo y la diferenciación, por lo que las líneas celulares que conservan la capacidad de diferenciarse *in vitro* son objeto de un intenso estudio. Las dos principales ventajas cuando se utilizan los cultivos celulares son: el control del medio fisicoquímico, a saber, pH, temperatura, presión osmótica, tensión de oxígeno (O₂) y gas carbónico (CO₂) de las células cultivadas y, las condiciones fisiológicas que deben ser constantes. La mayoría de las líneas celulares requieren para su buen desarrollo la adición de suplementos en el medio en que se cultivan, ejemplo de esto es el suero, el cual provee hormonas y otras sustancias reguladoras (Borg, *et al.*, 1985). El control del medio fisicoquímico y de las condiciones fisiológicas permite el cultivo de células específicas.

Los cultivos de células permiten someter a las mismas a una baja y definida concentración de reactivos asegurando un acceso directo en ellas, lo que ahorra en un 90% lo requerido para la inyección del reactivo *in vivo*, su excreción y su posterior distribución a los tejidos en estudio. Aunque los estudios *in vivo* resulten más económicos que los *in vitro* son descartados porque el uso de la experimentación en animales resulta cuestionado en aspectos legales, morales y éticos (Paniagua et al., 2003)

Existen tres tipos de cultivos celulares: cultivo celular primario, originado de un tejido u órgano recién obtenido, cultivos celulares continuos, que son líneas celulares derivadas de tumores cultivadas indefinidamente y cepas celulares derivadas de tejidos normales con número de subcultivos limitados (Zapata, 1982) Las técnicas para el cultivo de células incluyen el método para células animales en superficie sólida, utilizando un medio líquido, que fue originada y desarrollada por Earle y cols en 1947 (García, 1981).

3.4.1 Características principales de las líneas celulares utilizadas

Células OK

Número de la ATCC: CRL-1840

Propiedades de crecimiento: adherente

La línea celular OK (*Opossum Kidney*) fue desarrollada originalmente para usarla como fuente de cromosomas X en un estudio de la inactivación de X, y posteriormente se encontró que eran un excelente modelo de cultivos celulares para el epitelio del túbulo proximal del riñón. En cultivo estas células exhiben una variedad de receptores, y se han utilizado extensamente como modelo para estudiar esos receptores; fue establecida a partir del riñón de la zarigüeya americana, hembra adulta de *Didelphis marsupialis virginiana* (opossum) Koyama *et al*, 1978, sirve como un sistema modelo de túbulos proximales debido a la considerable similitud de sus procesos de transporte de solutos, como ocurre *in vivo* (Malström *et al*, 1987). Estas células poseen propiedades altamente diferenciadas tales como una cadena hormonal completa de señales de transducción para la inhibición de la toma de fosfato por la hormona paratiroidea (Malström *et al*, 1988). Los cultivos de células de epitelio renal desarrollan una organización polarizada, crecen formando monocapas confluentes y

forman domos sobre soportes permeables. La última característica indica transporte transepitelial de solutos (Handler, 1986). Otras características que presenta son el transporte de hexosas, aminoácidos, fosfato inorgánico y receptores para la hormona paratiroidea (Tertelbaum y Strewler, 1984). También permiten un intercambio reducido de iones Na^+ e H^+ y transporte de fosfato acoplado a sodio (Malström y Murrer, 1986). Las monocapas que forman muestran una resistencia transepitelial de 63 ± 15 omms/cm² (Hori *et al*, 1993), aunque Schwegler la encuentra de 41 omms/cm² (Schwegler *et al*, 1989). En cultivo el lado apical queda expuesto al medio de cultivo y es equivalente al lado luminal del epitelio tubular *in vivo*, y al mismo tiempo queda accesible a sustratos marcados, mientras que la membrana basolateral se orienta hacia el material de soporte (Carranza 1997).

Células MCF7

Número de la ATCC: HTB-22

Propiedades de crecimiento: adherente

Este tipo de células de morfología epitelial fue obtenida de la glándula mamaria con adenocarcinoma pleural de la efusión (receptor estrogénico positivo) de una hembra humana (*Homo sapiens*) caucásica de 69 años de edad. Se han visto productos celulares como proteínas de unión al factor del crecimiento como la insulina (IGFBP) BP-2; BP-4; BP-5. La secreción de IGFBP se puede modular por el tratamiento con anti-estrógenos.

La línea MCF7 conserva varias características del epitelio mamario diferenciado incluyendo capacidad de procesar estradiol vía receptores citoplásmicos del estrógeno y la capacidad de formar bóvedas o domos. Contiene el oncogen Tx-4.

El crecimiento de las células MCF7 es inhibido por el factor de necrosis tumoral alfa (alfa TNF).

Presenta el oncogen *wnt7h* + y el antígeno de sangre tipo O, Rh +.

El cariotipo muestra que el número de cromosomas de la línea madre está en un rango de hipertriploide a hipotetraploide, con el componente 2S ocurriendo en un 1%. Había de 29 a 34 marcadores cromosomas por metafase S; de 24 a 28 marcadores ocurrieron en por lo menos el 30% de células, y generalmente eran reconocibles un marcador submetacéntrico (M1) y 3 grandes grandes subtelocéntricos (M2, M3, y M4) en cerca del 80% de las metafases. No se detectaron ningunos DM. El cromosoma 20 era nullisómico y X era disómico. Se pueden encontrar las isoenzimas AK-1, 1; ES-D, 1-2; G6PD, B; GLO-I, 1-2; PGM1, 1-2; PGM3, 1

Células CHANG

Número de la ATCC: CCL-13

Organismo: *Homo sapiens* (humano)

Morfología: Epitelial

Esta línea fue pensada originalmente para ser obtenida de tejido normal del hígado, pero posteriormente fue encontrada, basado en análisis de isoenzimas, marcadores cromosomales, y huella dactilar del DNA de células HeLa, entonces se estableció como contaminación de las células HeLa. Las células son positivas para la queratina por la tinción de la inmunoperoxidasa. Es transcriptasa reversa negativa y presenta las isoenzimas G5PD y A.

Es susceptible a los virus poliovirus 1, 2, 3; adenovirus 3; estomatitis vesicular (Indiana). Es tumorigénico en los hámsteres de Siria.

LLC-PK₁

Número de la ATCC: CL-101

La línea celular LLC-PK₁ fue obtenida en 1958 por Hull *et al.* A partir del riñón de un cerdo (*Sus scrofa*) macho normal Hampshire de 3 a cuatro semanas. Las células son epitelioides y no tumorigénicas, forman domos y producen cantidades considerables de activadores de plasminógeno. Las células LLC-PK₁ retienen algunas características del túbulo proximal y expresan alta actividad de enzimas marcadoras de membrana y de transporte apical dependiente de Na⁺, de glucosa, aminoácidos y fosfato. Morfológicamente, el dominio de la membrana apical se caracteriza por la presencia de microvellosidades, las cuales incrementan en número y tamaño con la edad del cultivo. Existe un contacto bien desarrollado entre célula y célula. Las células LLC-PK₁ no responden a la hormona paratiroidea, pero expresa ambos subtipos de receptores para los receptores de vasopresina V₁ y V₂ y tienen una baja respuesta a la calcitonina y a la oxitocina. Metabólicamente las células LLC-PK₁ no son capaces de realizar la gluconeogénesis. Se puede hacer el restablecimiento de esta ruta por una adaptación más selectiva de las condiciones de cultivo, cambiando la glucosa por piruvato o manteniendo las células en un medio bajo en glucosa (Ronald, 1992).

4. HIPÓTESIS

Los extractos vegetales de plantas de las familias Myrtaceae y Lauraceae presentan compuestos con actividad bactericida, fungicida y/o citotóxica.

5. JUSTIFICACIÓN

La creciente resistencia bacteriana desarrollada por los patógenos a distintas infecciones comunitarias e intrahospitalarias así como a micosis representan un importante problema de salud en México y se les ha relacionado con una alta incidencia de mortalidad. El 70% de las bacterias responsables de las infecciones nosocomiales son resistentes al menos a uno de los antibióticos más utilizados para tratarlas. La severidad de las micosis oportunistas se incrementa en individuos inmunocomprometidos y se ve afectada por los factores de virulencia del hongo y las condiciones en que se lleva a cabo la interacción hospedero-parásito. Además en México, el cáncer de mama es la segunda causa de muerte entre las mujeres mexicanas adultas de 30 a 54 años de edad y resultan muy preocupantes las predicciones que indican que 1 de cada 8 mujeres desarrollará cáncer de mama a lo largo de su vida. Por otra parte alrededor del 57% de medicamentos que se venden en los Estados Unidos se basan en productos naturales, lo son por sí mismos, derivados sintéticos o análogos de éstos; de tal forma que de 1983 a 1995, más del 60% de los nuevos medicamentos aprobados para el tratamiento del cáncer y las infecciones fueron diseñados a base de productos naturales, la OMS ha estimado que el 80% de los habitantes de los países en vías de desarrollo dependen de las plantas para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud. Nuestro país posee una gran diversidad de plantas con uso medicinal con un escaso conocimiento científico, lo que nos da la pauta para realizar la investigación de los compuestos activos en plantas utilizadas en México y validar sus propiedades farmacológicas y efectos tóxicos ya que en el mercado existen innumerables productos que se comercializan promoviendo acciones terapéuticas sin bases científicas que propician la automedicación y ante la falta de eficacia, una atención médica tardía de sus males. Por lo tanto en este estudio se seleccionaron plantas que pertenecen a las familias Myrtaceae y Lauraceae debido a que son especies ampliamente utilizadas en nuestro país en la medicina tradicional para curar diferentes enfermedades y así contribuirá su conocimiento etnobotánico y si es posible, en el desarrollo de fármacos antimicrobianos o antineoplásicos que sean tanto eficaces como seguros.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad bactericida, fungicida y citotóxica de extractos de *Syzygium aromaticum* y *Cinnamomum zeylanicum*, *Eucalyptus camaldulensis*, y *Psidium guajava* e identificar la estructura química de sus principios activos.

6.1 Objetivos específicos

1. Obtener los extractos de las plantas con solventes de distinta polaridad por dos métodos soxhlet y agitación continua a temperatura ambiente.

2. Evaluar el efecto inhibitorio de los extractos obtenidos en *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus cereus*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Sporothrix schenckii*.

3. Separar por métodos cromatográficos las fracciones de los extractos activos.

4. Localizar el o los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana por el método bioautográfico.

5. Determinar la CMI de las fracciones activas.

6. Evaluar su efecto citotóxico sobre las líneas celulares OK (riñón de zarigüeya), LLCPK-1 (riñón de cerdo), CHANG (hígado humano) y MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano).

7. Aislar y purificar los compuestos activos y dilucidar su estructura por métodos químicos y espectroscópicos.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Material biológico

Tabla 1. Plantas estudiadas y parte de la planta utilizada.

| Nombre Científico | Familia |
|---|-----------|
| <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (corteza) | Lauraceae |
| <i>Syzygium aromaticum</i> (capullos) | Myrtaceae |
| <i>Eucalyptus camaldulensis</i> (hojas) | Myrtaceae |
| <i>Psidium guajava</i> (hojas) | Myrtaceae |

7.1.1 Descripción de las plantas utilizadas

Syzygium aromaticum (clavo); Fam. Myrtaceae

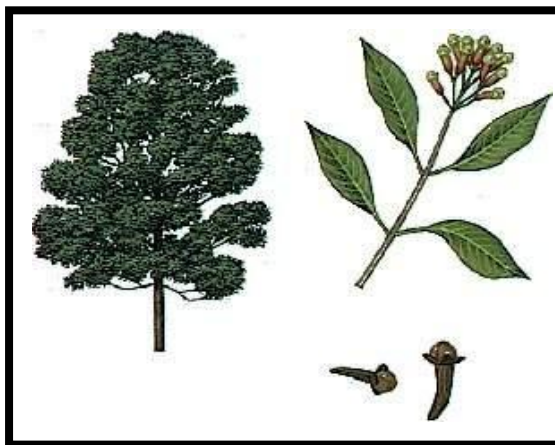


Figura 1. Clavo (capullos).

Reino: vegetal
Clase: angiospermae
Subclase: dicotiledoneae
Orden: myrtiflorae
Suborden: myrtineae
Familia: Myrtaceae
Género: *Syzygium*
Especie: *aromaticum* (Wren, 1994).

El clavo (*Eugenia caryophyllus/Syzygium aromaticum*) es un árbol de la familia de las mirtáceas que tarda unos veinte años en desarrollarse, con una altura entre doce y quince metros, y que puede seguir produciendo fruto hasta cincuenta años. Sus hojas se parecen bastante a las del laurel, las flores tienen pétalos amarillos y la corteza es de color aceitunado. Su ambiente ideal es el clima de carácter marítimo y tropical. El clavo posee un aroma fuerte, caliente y rico, al probarlo es picante ácido, fuerte y amargo y deja una última sensación de frío en la boca. Al cocinarlo su efecto se suaviza. Los clavos nacen en la punta de las ramitas en grupos de diez a veinte y según la estación, da más fruto en un lado que en otro. Los clavos son blancos al principio, rojizos al madurar y al secarse, negros.

Los pétalos plegados con los estambres dentro forman la cabeza del clavo. Si se deja que los capullos se desarrollen, florece y da un fruto rectangular colgante conocido como madre del clavo.

Es de origen desconocido. Género con especies nativas de Asia, Malasia y Australia; introducida en América y naturalizada en varias regiones tropicales. Asociada a bosque tropical caducifolio En México se encuentra distribuido en Veracruz, Yucatán y Oaxaca. (Pahlow, 1981).

Cinnamomum zeylanicum (canela); Fam. Lauraceae



Figura 2. Canela (corteza).

Reino: vegetal

Clase: *magnoliopsida*

Subclase: *dicotiledoneae*

Orden: *laurales*

Suborden: *magnoliineae*

Familia: *Lauraceae*

Género: *Cinnamomum*

Especie: *zeylanicum* (Sánchez O. S. 1980).

Esta planta pertenece a la familia de las lauráceas. Sus ramas crecen erguidas y recubiertas de numerosas hojas de color verde brillante, siendo rojizos los nervios que las recorren. Tienen forma ovalada, son bastante fuertes y resistentes y nacen enfrentadas de dos en dos. Es originaria de Ceilán, desde donde se exportó a los países europeos, incluida España.

El árbol de la canela (*Cinnamomum verum/Cinnmomum zeylanicum*) es de hoja perenne y puede alcanzar los diez metros de altura en su estado silvestre, pero se poda en árboles más pequeños y densos para facilitar su cultivo. La especia es la corteza interna que se extrae pelando y frotando las ramas y que una vez desprendida, es a su vez separada y vuelta a pelar.

Esta planta es originaria de Ceilán y suroeste de la India. Está presente en climas cálidos, semicálidos, semisecos y templados, entre los 100 y 200 m snm. Cultivado en huertos familiares, solares o presente en terrenos de cultivo abandonados, asociada a vegetación

secundaria derivada de bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio, subperennifolio y perennifolio, además del bosque mesófilo de montaña y bosque de pino (Pahlow M. 1981). En México esta planta es cultivada a corta escala en algunos lugares de Veracruz y Chiapas. (Martínez M. 1979).

Eucalyptus camaldulensis (eucalipto); Fam. Myrtaceae



Figura 3. Eucalipto (hojas).

Reino: Vegetal

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Myrtales

Familia: Myrtaceae

Género: *Eucalyptus*

Especie: *camaldulensis* (USDA, 2010).

El eucalipto es un árbol robusto y elevado que puede alcanzar con facilidad 15 ó 20 m. de altura, llegando en ocasiones hasta los 40 m. o aún más. Posee un sistema radicular muy desarrollado que penetra profundamente en busca de agua. El tronco que puede hacerse muy grueso, presente una corteza lisa de color pardo-castaño a pardo-rojiza que se renueva anualmente desprendiéndose en placas irregulares que dejan al descubierto la nueva corteza blanquecina. Las hojas son curvadas y se disponen en ramillas angulosas, de forma que al quedar las hojas verticales el árbol da poca sombra. Las hojas adultas tienen 12-22 cm. Los frutos 7-8 cm. Esta es una especie de origen austral que habita en áreas de climas cálido, semicálido, semiseco y templado entre los 500 y los 2500 m snm. Planta cultivada en huertos familiares, ornamental, asociada a pastizal, matorral xerófilo y bosque mixto de pino-encino (Pahlow M. 1981).

Psidium guajava (guayabo); Fam. Myrtaceae



Figura 4. Guayabo (hojas)

Reino: Vegetal

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Myrtales

Familia: Myrtaceae

Género: *Psidium*

Especie: *guajava* (USDA 2010).

Psidium guajava es un arbusto o árbol pequeño de hasta 5 m de alto. La corteza es lisa, rojiza y caediza. Las hojas son ovadas-elípticas, suaves de 6-15 cm de largo. *P. guajava* presenta 12-20 nervaduras laterales. Las flores son de color blanco-rosado pálido, con numerosos estambres, de 1-2 cm de ancho. El fruto es una baya carnosa, de color amarillo o rosado, de 2-6 cm de largo. *P. guajava* se conoce principalmente como planta cultivada con frutos muy dulces. Se distribuye en varias partes de México y América Central, Cuernavaca, Morelos y otros lugares cálidos (Standley, 1961).

7.1.2. Cepas bacterianas

Se utilizaron los siguientes cultivos bacterianos provenientes del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL:

Pseudomonas aeruginosa, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*.

7.1.3 Cepas fúngicas

Las cepas de hongos tenían el mismo origen que los cultivos bacterianos. *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Sporothrix schenckii*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*.

7.1.4. Células

Se emplearon cultivos de células OK (**riñón de zarigüeya**), CHANG (**hígado humano**), LLCPK-1 (**riñón de cerdo**) y MCF-7 (**adenocarcinoma humano**) que originalmente fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) y preservados en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS.

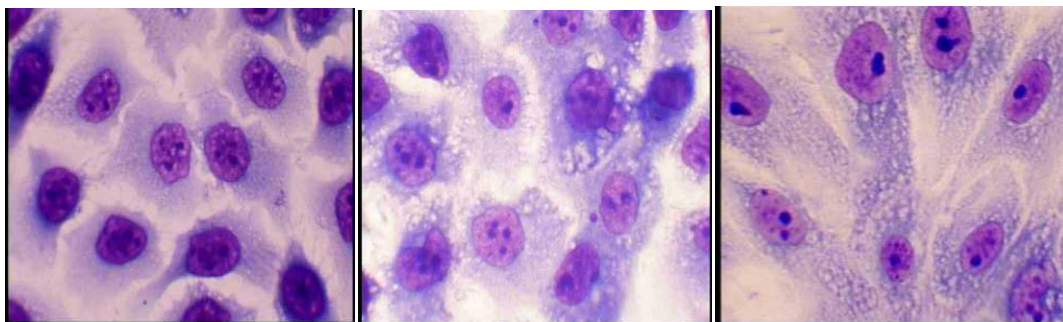


Figura 5. Imágenes representativas de células CHANG, células OK y células LLCPK1.

7.2. Preparación y extracción del material vegetal

7.2.1. Recolección e identificación de las plantas

El clavo se compró en el mercado Juárez de Toluca, Estado de México. Número de herbario 023493.

La corteza de canela se compró en el mercado Juárez de Toluca, Estado. de México. Número de herbario 023494.

Las hojas de eucalipto se colectaron en Santa Catarina N.L. Número de herbario 023503.

Las hojas de guayabo se colectaron en San Nicolás de los Garza, N.L. Número de herbario 024884.

7.2.2. Obtención de extractos

Una vez colectadas las especies *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Eucalyptus camaldulensis* y *Psidium guajava* se tomó un espécimen de cada una para depositarlo en el herbario para su identificación y se dejaron secar a la sombra durante 8 días. Después, se trituraron cada una por separado en una licuadora, para extraerse después mediante dos técnicas: maceración a temperatura ambiente y extracción continua tipo soxhlet. (Domínguez, 1973)

Para la técnica de maceración a temperatura ambiente se utilizaron 30 g del material vegetal con 150 mL de hexano, colocándolos en un matraz bien sellado para ser agitado a temperatura ambiente en un agitador Dual Action Lab Line; luego de 7 días se separó el solvente del extracto por medio de un rotavapor tipo Büchi y se siguió la extracción del residuo vegetal con acetona y luego con metanol.

Para el caso de la extracción continua se utilizó un aparato de extracción tipo soxhlet, con 30 g de la planta y 500 mL de los mismos solventes anteriormente mencionados, los extractos obtenidos fueron diluidos en etanol hasta obtener una solución de trabajo a 25 mg/mL para ser utilizados en las pruebas microbiológicas.

7.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana

7.3.1. Medios de cultivo

El medio de cultivo utilizado para las bacterias y hongos fue el medio C. Rivas (patente No. 9810892) ya sea líquido o con 0.5 % de agar agar marca Difco. El volumen de medio por placa debe ser el adecuado para obtener una capa de 4 mm de espesor, aproximadamente de 25 a 30 ml de agar fundido y enfriado a 45-50° C. Para eliminar la humedad de la superficie del medio, las placas se secaron incubándolas a 37° C durante 30-60 minutos.

7.3.2. Activación de las cepas

Para la activación de las cepas bacterianas se utilizó el medio líquido C. Rivas a pH 7, incubándolas por 18 - 24 h a 37°C; los hongos se activaron en caldo Saboraud modificado pH 6.5 dándoles un tiempo de incubación de 2 días para las levaduras y de 7-15 días para los hongos filamentosos. Para los hongos filamentosos se utilizó la técnica de Heatley que consiste en tomar una suspensión homogénea que contenga 2'000,000 de esporas, levaduras o fragmentos de filamentos por milímetro y distribuirlos uniformemente en una caja de Petri que contenga agar Saboraud modificado (Arenas, 1993).

7.3.3. Preparación del inóculo:

Se preparó un testigo de turbidez 0.5 de la escala de Mc Farland añadiendo 0.5 mL de 0.048 M de cloruro de bario a 99.5 mL de ácido sulfúrico 0.36 N. Se distribuyen alícuotas de 4-6 mL del estándar de turbidez de sulfato de bario en tubos con tapa de rosca del mismo tamaño, cerrados herméticamente y conservados en la oscuridad a temperatura ambiente. (Koneman *et al.*, 2001). Para bacterias y levaduras se tomaron de 3 a 5 colonias del cultivo original con un asa de nicromel estéril y se introdujeron en 5 mL de caldo. Si la suspensión obtenida tenía una turbidez superior o similar a la del testigo no era necesaria la incubación posterior. De lo contrario, los tubos se incubaban a 37° C hasta lograr la turbidez requerida (absorbancia 0.05 a 530 nm usando como blanco el caldo de cultivo), si era necesario diluir para igualar la turbidez de la suspensión con la del testigo 0.5, se utilizaba el mismo caldo ó solución salina estéril y se volvía a leer la absorbancia a 530 nm hasta obtener una lectura de 0.05, todo bajo condiciones de esterilidad (cubetas estériles con tapón de algodón y bajo el mechero).

El inóculo para los hongos filamentosos se preparó adicionando 10 mL de solución salina estéril a un tubo con 7 días de crecimiento del hongo sobre agar Saboraud modificado inclinado, se rasparon las colonias con un asa de platino, se succionó el líquido con las conidias y se colocó en un tubo estéril. Después de esto se ajustó la densidad óptica de 0.9 - 0.11 (80 - 82 %T) a 530 nm en un espectrofotómetro (Espectrophotometer SP-870 TURNER) y se diluyó en el medio para obtener una concentración al doble de la necesaria para la prueba (de 0.4×10^4 a 5×10^4 UFC/mL). La cuantificación del inóculo se hizo tomando 0.01mL de la dilución del inóculo y plaqueando el agar Saboraud dextrosa modificado para determinar el número de UFC viables por mL. Las placas se incubaron a 28 °C.

7.4. Prueba de sensibilidad a los extractos por el método de difusión con discos

Para el sembrado de placas, la suspensión bacteriana era absorbida en un hisopo de algodón, el exceso de líquido se descartaba oprimiendo el algodón contra la pared del tubo, para inocular las placas, se sembraba en césped sobre el agar, se dejaba secar las placas durante 5 minutos antes de proceder a aplicar los discos o se colocaban 100µl de la cepa recién activada con una micropipeta Eppendorf (estandarizado al tubo 0.5 por el método turbidimétrico de Mc Farland) y se difundía homogéneamente con un asa Driblasky. Para aplicar los discos se colocaban sobre la superficie seca del agar por medio de una pinza estérily se aplicaban 10 µL de la dilución del extracto, un control positivo (ketoconazol 25 mg/mL para las cepas fúngicas y cloranfenicol 25 mg/mL para las bacterianas) y un control negativo con etanol. Se debe tener cuidado que los discos hagan buen contacto con la superficie del agar, ejerciendo para ello ligera presión sobre los mismos, debido a que parte del fármaco se difunde casi de inmediato. Transcurridos 15 minutos de la colocación de los discos, las placas se incubaban invertidas en la estufa de aire atmosférico a 37° C por 18-24 h para las bacterias, 2 días para las levaduras y de 7-15 días para los hongos filamentosos. Al término del período de incubación con el empleo de una regla se medían cuidadosamente los halos de inhibición completa alrededor de cada disco incluyendo el diámetro del disco en esta medición (Koneman *et al.*, 2001).

7.5. Aislamiento de los compuestos activos

7.5.1. Cromatografía en capa fina

En general la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil que puede ser un líquido o

un gas y son retenidos selectivamente por la fase estacionaria que también puede ser un líquido, o un sólido. La idea básica es la separación de los componentes de una mezcla, haciéndola pasar a través de un sistema que consta de una fase estacionaria y una fase móvil. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son retenidos con fuerza por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas discriminadas que pueden analizarse cualitativa o cuantitativamente.

La cromatografía en capa fina es una técnica de partición sólido-líquido parecida a la de columna en que los materiales son prácticamente idénticos. Estos son la alúmina (óxido de aluminio, Al_2O_3) y la sílica gel (ácido silícico, SiO_2), como fase estacionaria y como fase móvil los solventes usuales. La diferencia de la cromatografía en columna y la de capa delgada es que mientras la fase móvil desciende en la cromatografía en columna, en la de capa delgada asciende.

Se realizaron cromatografías ascendentes usando como adsorbente sílica Gel 7 G en una proporción de 10 g de sílica en 40 mL de agua, la mezcla anterior se vertió sobre placas de vidrio previamente desengrasadas de 7.5 X 2.5 cm, se les dejó secar al aire y enseguida se activaron en una estufa durante 1h a 115 °C. Luego mediante un capilar con la punta estirada se distribuyó una porción del extracto, se dejó evaporar el solvente y se aplicó el extracto en repetidas ocasiones en el mismo sitio para después efectuar el corrimiento dentro de una cámara de vidrio con la mezcla de solventes elegida. Los compuestos se separan basándose en las diferencias de adsorción con la sílica gel y en la diferente interacción que tiene cada uno con el solvente. Para localizar los componentes que no son apreciables a simple vista se usó luz ultravioleta (254 nm), luego se marcaron y se determinó el Rf a cada uno. (Muños, 1981) La fase móvil varió dependiendo del tipo de extracto que se deseaba separar.

7.6. Localización de los compuestos activos

7.6.1. Bioautografía

De acuerdo a Betina (1973) la bioautografía es el método más importante de detección para compuestos nuevos o no identificados; esta se basa en los efectos biológicos de las sustancias bajo estudio. La autografiografía típica está basada en la técnica de difusión en agar donde el compuesto antibacterial es transferido de la capa cromatográfica a una de agar inoculado. Las zonas de inhibición pueden ser visualizadas después del periodo de incubación por detección con reactivos detectores de la actividad dehidrogenasa.

En el presente trabajo se utilizó una técnica de bioautografía modificada por Verástegui M; 1998 (Verástegui M. 1998) la cual puede detectar concentraciones muy pequeñas del compuesto responsable de la actividad biológica y la zona de inhibición se observa a simple vista(Verástegui M. 1998). Para esto se utilizaron cromatogramas en capa fina desarrolladas en las placas de vidrio de 2.5 x 7.5 cm con las manchas ya localizadas; esta placa se coloca en una caja petri y se esteriliza con L.U.V. por dos horas; después de esto se le coloca un trozo largo, angosto y de unos 3 mm de espesor de medio sólido C. Rivas y un algodón húmedo a un lado del cromatograma para evitar la sequedad del medio. Se inoculó por medio de un hisopo de algodón impregnado del microorganismo o con una micropipeta 100 µl de la cepa se colocaban sobre el agar y se distribuían uniformemente con una asa bacteriológica. Se incubó durante el tiempo necesario para cada microorganismo y se observó el área sin crecimiento microbiano.

7.7. Purificación de los componentes de los extractos activos por bioautografía

El método se utilizó para la separación y purificación de los componentes de los extractos que presentaron actividad antimicrobiana por el método de bioautografía fue la cromatografía preparativa en capa fina. Para ello se emplearon placas de cromatografía de

capa delgada de 20 cm X 20 cm y 5 mm de espesor. La mezcla se aplicó en forma de línea continua a todo lo ancho de la placa y se eluyó en la mezcla de solventes que efectuó mejor la separación de los componentes de la muestra. Después de eluida se dejó secar perfectamente, se localizaron la o las bandas deseadas por medio de luz ultravioleta, se rasparon las bandas del gel de sílice que contenían los compuestos deseados y se extrajeron con etanol (Villareal, 1987)., se centrifugó la muestra y se decantó el solvente lavando varias veces hasta haber obtenido la mayor cantidad de la fracción, ésta se dejó secar y se utilizó para su identificación, para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y para las pruebas de citotoxicidad.

7.8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

A las fracciones que mostraron mayor actividad en la bioautografía se les determinó la MIC, para ello, se prepararon diluciones seriadas de las fracciones (desde 100 µg/mL) después de lo cual se agregaron 100 µL de medio a todos los pozos. El pozo número 1 (desde A hasta H) no tenía fracción, antibiótico ni etanol y sirvió de control de crecimiento. Se colocaron 100 µL de la dilución mayor (extracto o fracción, etanol y antibiótico) en los siguientes pozos A y se diluían a la mitad hasta el pozo H y se inoculaban con 100 µL de la suspensión bacteriana estandarizada y se incubaban a 37°C durante 18-24h (bacterias) y 2 días (levaduras). Al término de esta incubación, los pozos eran examinados a simple vista a fin de observar la turbidez (ésta indica que el crecimiento bacteriano ha sido inhibido por la solución); para confirmar se les aplicaban 50 µL de una solución de MTT (2.5 mg/mL) y se incubaban de 30 min a 1 h bajo las mismas condiciones (Koneman *et al.*, 2001) la MIC se tomó como la menor concentración de la fracción en µg / mL que inhibió el desarrollo in vitro de los microorganismos (Koneman *et al.*, 1992).El método se utilizó para la separación y purificación de los componentes de los extractos que presentaron actividad antimicrobiana por el método de bioautografía fue la cromatografía preparativa en capa fina. Para ello se emplearon placas de cromatografía de capa delgada de 20 cm X 20 cm y 5 mm de espesor. La mezcla se aplicó en forma de línea continua a todo lo ancho de la placa y se eluyó en la mezcla de solventes que efectuó mejor la separación de los componentes de la muestra. Después de

eluida se dejó secar perfectamente, se localizaron la o las bandas deseadas por medio de luz ultravioleta, se rasparon las bandas del gel de sílice que contenían los compuestos deseados y se extrajeron con etanol (Villareal, 1987), se centrifugó la muestra y se decantó el solvente lavando varias veces hasta haber obtenido la mayor cantidad de la fracción, ésta se dejó secar y se utilizó para su identificación, la determinación de la MIC y para las pruebas de citotoxicidad.

7.9. Evaluación de la actividad citotóxica

7.9.1. Criopreservación de las líneas celulares

Antes de comenzar a trabajar se debe limpiar perfectamente el área de trabajo con SDS 1 % y todo el procedimiento se realiza bajo condiciones asépticas.

Para la eliminación del medio de la botella de cultivo se utiliza vacío y el cultivo se lava suavemente dos veces con PBS (5 mL cada vez) y se agrega 1.8 mL o 2.5 mL de tripsina (para botellas de 25 o 50 cm respectivamente) para despegar las células, se incuba a 37 °C hasta que se despeguen las células (5-10 min.), se agregan 5 mL o 10 mL de medio de cultivo (según la botella utilizada) y pasar a un tubo para centrifuga de 15 o 50 mL (según sea el caso). Si es necesario, se lava suavemente con otros 2-5 mL de medio y recupera este volumen para evitar la pérdida de células. Se centrifuga a 1000 rpm, 25 °C, por 10 min y se retira el exceso de medio con vacío dejando 3 mL, se disgregan suavemente las células con una micropipeta. Esta solución se coloca en un hemocitómetro para determinar el número de células, la viabilidad de las mismas se observa colocando una gota de la suspensión en un porta objetos adicionando una gota de azul de tripano. Contar los 8 cuadrantes y sacar el promedio, al resultado multiplicar por 10,000 y el resultado será el número de células/mL que tenemos (el total de células será este valor multiplicado por el volumen aproximado que tenemos).

La densidad celular se ajusta a las necesidades de trabajo con medio completo o para preservar las células en congelación se adiciona con 10% de DMSO estéril, para tener un

rango de 1 a 2×10^6 cel/mL, tomando en cuenta el total de células que se tiene. Cada vial debe ser marcado con lápiz o marcador con los siguientes datos: nombre de la línea celular, fecha, medio de cultivo utilizado, número de pase, iniciales de la persona que las congeló y si queda espacio, anotar el número de células por vial.

Las células pueden preservarse durante años a bajas temperaturas y así conservan su viabilidad (García, 1981). La congelación se debe hacer de forma gradual para producir la mejor supervivencia celular dejando primero a temperatura ambiente por 20 min y después dejar en refrigeración por 1h antes de comenzar con la congelación a -20°C por 2h para poder pasar al Revco (-80°C) por 4 h o toda la noche y proceder a su almacenamiento en nitrógeno líquido (-180°C), hasta su utilización.

7.9.2. Cambio de medio, resiembra y almacenamiento de las líneas celulares

El cambio de medio de las líneas celulares se recomienda cada 3 o 4 días, bajo condiciones de asepsia, las soluciones de trabajo se deben de ajustar a una temperatura de 37°C antes de comenzar a trabajar. La eliminación del medio se hace con la ayuda de vacío y después se lava dos veces con 10 mL de PBS estéril se rellena con 5 mL de medio completo a las botellas de 25 cm^2 o 15 mL a cada botella de 50 cm^2 , es muy importante anotar en la botella la fecha del cambio de medio.

Se recomienda una resiembra cuando las células están al 85-95 % de confluencia para lo cual se les elimina el medio y se les agregan 1.8 mL de tripsina o 2.5 mL (botellas de 25 o 50 cm^2) y se incuban a 37°C por 10 min para que se despeguen las células, luego se les agregan 2 mL de medio (RPMI para las MCF-7, MEM para las LLCPK-1, OK y CHANG) y homogenizar suavemente subiendo y bajando el medio y se transfieren 1.5 mL a botellas nuevas y completar a 5 mL con medio de cultivo con los datos del las células, el nuevo número de pase, fecha, medio de cultivo utilizado, iniciales del nombre de quien hizo la resiembra y se incuban con la tapa floja.

Al igual que los procedimientos anteriormente descritos, el descongelamiento de las células se debe realizar en condiciones de esterilidad; cuando el criotubo se descongele pasar

inmediatamente con una pipeta pasteur el contenido de éste a un tubo cónico estéril, añadir aproximadamente 5 mL del medio suplementado con 10 % de SFB y antibiótico al 1 % (penicilina- estreptomycin), el cuál previamente se calentó a 37°C. Se resuspende gentilmente para disgregar las células que estén aglomeradas y se centrifuga a 1000 rpm durante 5 min a 25°C para quitar el medio de conservación con DMSO en el que se encontraban congeladas las células, luego de esto se decanta el sobrenadante y se resuspende el botón celular en 2-3 mL de medio y es necesario determinar la viabilidad (con azul tripano) del paquete celular en un portaobjetos una vez verificada la viabilidad, pasar a una botella de cultivo complementado según sea el caso, anotando todos los datos pertinentes y se incuba a 37°C con 5% de CO₂ sin apretar el tapón permitiendo aireación. Permitir que se adhieran las células a la superficie de la caja de cultivo celular, observar en el microscopio invertido la formación de la monocapa confluyente, retirar el medio con células en suspensión y agregar medio nuevo (Cruz, 1996).

7.10. Ensayo de citotoxicidad en microplacas

Los ensayos de citotoxicidad, básicamente se pueden dividir en 3 etapas, la siembra en microplaca de las células a probar, la adición de los compuestos a probar y por último los ensayos colorimétricos que nos ayudarán a verificar la viabilidad celular por medio de la lectura de su absorbancia.

Para la primera etapa se lavan las células dos veces, suavemente con PBS a 37°C y se les adiciona tripsina al 0.25%, e incuban a 37°C 5-15 min, para inactivar la tripsina se les agregan 5 mL de medio con suero a las cajas grandes y 3 mL a las cajas chicas, luego se colectan las células despegadas y se pasan a un tubo cónico estéril, se lavan con medio con suero y transfieren a un mismo tubo para centrifugar a 1000 rpm (10 min), se elimina el sobrenadante con la ayuda de vacío y el botón restante se resuspende suavemente en 5-10 mL de medio con suero y se toma una alícuota para contar en el hemocitómetro. A partir de aquí, preparar una suspensión celular para adicionar 25,000 células OK, 20,000 células LLC-PK1, 15,000 células CHANG y 10,000 células MCF-7 por pozo en 200 µl de medio con suero. Esta

siembra se incuba a 37°C durante 24 h, con éste inóculo y en microplacas de 96 pozos, debe haber una monocapa confluyente al día siguiente para proceder con la etapa 2 del ensayo.

Antes de iniciar con la etapa 2 habrá que preparar las diluciones de trabajo en medio de cultivo sin suero y bajo condiciones de esterilidad, después diseñar la colocación de las muestras en la microplaca, tomando en cuenta que cada muestra deberá ponerse por quintuplicado, incluyendo control negativo (medio de cultivo) y de solventes utilizados. Ya listo el orden de cada muestra retirar el medio de cultivo utilizando vacío y teniendo cuidado de no dañar la monocapa, lavar suavemente dos veces con 100 o 200 µl de PBS a 37 ° C, agregar 200 µl de cada dilución en los pozos correspondientes e incubar a 37 ° C con atmósfera húmeda (por 24 h para las células OK, LLCPK-1 y CHANG Y 48 h para las células MCF-7).

El ensayo colorimétrico se realizó con MTT para las células OK, LLCPK-1 y CHANG y con WST para las células MCF-7, para ambos casos se retira el medio con los extractos usando vacío y se lavan suavemente los pozos dos veces con 200 µl de PBS y se les agrega el reactivo; para las células OK, LLCPK-1 y CHANG se agregan a cada pozo 200 µl de una solución recién preparada de MTT + PMS 5:1, se incuban las microplacas a 36° C por 75 min, se decantan los reactivos y se lavan los pozos con 200 µl de PBS, se agregan 100 µl de alcohol isopropílico acidificado, se dejan reposar las placas por 15 min y se resuspende vigorosamente el alcohol con una pipeta de repetición, se pasa el sobrenadante a una placa nueva y se lee la absorbancia en un lector de microplacas (EIA Multiwell Reader, Sigma Diagnostics) a 570 nm. Para las células MCF-7 después de lavar con PBS se agregan 20 µl de WST a cada pozo, se incuban las microplacas a 36° C por 75 min y se lee la absorbancia en un lector de microplacas (EIA Multiwell Reader, Sigma Diagnostics) a 450 nm.

7.11. Identificación de los grupos funcionales de los compuestos aislados

7.11.1 Pruebas químicas

Para la identificación de los grupos funcionales de los compuestos aislados se utilizaron las siguientes pruebas químicas coloridas: para insaturaciones prueba del Br/CCl₄ y la prueba del KMnO₄, para oxhidrilos fenólicos la prueba del FeCl₃, la prueba de Liebermann-Buchard se usó para identificar la presencia de esteroides y triterpenos, las sesquiterpenlactonas por la prueba de Baljet, los flavonoides por medio de la prueba de Shinoda, los alcaloides con la de Dragendorff y las cumarinas con una solución de NaOH al 10%.

7.11.2. Métodos espectroscópicos

Los espectros de masas (EM) proporcionan el peso molecular, la fórmula molecular y señalan los fragmentos iónicos más estables en que se rompe la molécula al chocar con electrones muy acelerados (Domínguez, 1982). Por lo tanto se utilizó espectrometría de masas para deducir la estructura de los compuestos activos que se purificaron. El análisis se efectuó en un equipo HP6890 con detector selectivo de masas. Se utilizó una columna capilar modelo HP 1909IJ-433, HP-5 fenil-metil-siloxano 5%. Las condiciones de operación fueron: temperatura del horno 325°C, temperatura del inyector 280°C, modo Split, flujo de la columna 1mL/min, volumen de inyección 1.0 µl. los parámetros de masas se usaron en un modo de escaneo con un rango desde 50.00 hasta 550. La identificación de los componentes se hizo con la ayuda del programa DATABASE/WILEY275.L.

8. RESULTADOS

Se prepararon 24 extractos, los cuales se enumeran en la tabla 2 de acuerdo al método de obtención. Del 1 al 12 se obtuvieron con agitación a temperatura ambiente: los extractos del 13 a 24 se obtuvieron mediante calentamiento de los solventes en un equipo soxhlet. Se eligieron solventes de distinta polaridad para tratar de obtener la mayor diversidad de compuestos.

| | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| 1. canela agitación hexano | 2. canela agitación acetona |
| 3. canela agitación metanol | 4. clavo agitación hexano |
| 5. clavo agitación acetona | 6. clavo agitación metanol |
| 7. guayabo agitación hexano | 8. guayabo agitación acetona |
| 9. guayabo agitación metanol | 10. eucalipto agitación hexano |
| 11. eucalipto agitación acetona | 12. eucalipto agitación metanol |
| 13. canela soxhlet hexano | 14. canela soxhlet acetona |
| 15. canela soxhlet metanol | 16. clavo soxhlet hexano |
| 17. clavo soxhlet acetona | 18. clavo soxhlet metanol |
| 19. guayabo soxhlet hexano | 20. guayabo soxhlet acetona |
| 21. guayabo soxhlet metanol | 22. eucalipto soxhlet hexano |
| 23. eucalipto soxhlet acetona | 24. eucalipto soxhlet metanol |

Tabla 2. Numeración de los extractos obtenidos

En la tabla 3 se muestran las medidas los halos de inhibición en mm (promedios de tres repeticiones) obtenidas mediante la técnica de difusión en placa de Bauer Kirby, comparadas contra un control positivo que fue ketoconazol 25 mg/mL para las cepas fúngicas y cloranfenicol 25 mg/mL para las bacterianas y control negativo que fue etanol para todos los microorganismos.

| Microorganismo | Control | | Número de extracto | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|---------|----|--------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
| | + | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | 35 | 11 | 19 | 13 | 13 | 34 | 27 | 16 | 11 | 12 | 16 | 13 | 11 | 12 | 20 | 14 | 13 | 19 | 24 | 13 | 11 | 11 | 11 | 12 | 11 | 12 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 22 | 11 | 31 | 25 | 11 | 38 | 23 | 16 | 12 | 13 | 16 | 13 | 11 | 13 | 36 | 18 | 11 | 22 | 28 | 17 | 11 | 17 | 11 | 11 | 12 | 12 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 21 | 9 | 11 | 14 | 14 | 33 | 21 | 14 | 14 | 16 | 9 | 9 | 18 | 9 | 46 | 14 | 12 | 19 | 24 | 13 | 12 | 15 | 14 | 14 | 13 | 16 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 35 | 9 | 14 | 12 | 0 | 8 | 0 | 0 | 11 | 0 | 0 | 11 | 16 | 18 | 11 | 12 | 0 | 18 | 0 | 10 | 9 | 13 | 11 | 0 | 0 | 12 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | 30 | 12 | 13 | 0 | 0 | 16 | 13 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 11 | 0 | 13 | 11 | 15 | 17 | 11 | 13 | 12 | 13 | 0 | 12 |
| <i>Salmonella typhi</i> | 33 | 9 | 11 | 11 | 9 | 12 | 12 | 9 | 10 | 9 | 9 | 10 | 9 | 13 | 15 | 9 | 12 | 13 | 9 | 14 | 9 | 13 | 13 | 15 | 9 | 13 |
| <i>Sigella flexneri</i> | 37 | 10 | 22 | 11 | 10 | 19 | 10 | 16 | 12 | 10 | 10 | 11 | 10 | 13 | 19 | 16 | 11 | 15 | 17 | 17 | 10 | 12 | 13 | 12 | 10 | 10 |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 16 | 11 | 28 | 27 | 18 | 40 | 14 | 11 | 15 | 18 | 14 | 11 | 14 | 15 | 50 | 13 | 15 | 18 | 37 | 11 | 11 | 12 | 12 | 11 | 11 | 11 |
| <i>Candida albicans</i> | 70 | 11 | 15 | 14 | 11 | 32 | 10 | 16 | 14 | 17 | 11 | 12 | 11 | 11 | 31 | 12 | 13 | 40 | 27 | 14 | 11 | 12 | 14 | 11 | 11 | 12 |
| <i>Candida parapsilosis</i> | 25 | 10 | 13 | 12 | 11 | 33 | 11 | 17 | 10 | 10 | 17 | 11 | 12 | 11 | 32 | 12 | 15 | 20 | 25 | 15 | 11 | 12 | 14 | 13 | 12 | 13 |
| <i>Microsporium canis</i> | 30 | 7 | 25 | 19 | 9 | 20 | 32 | 18 | 16 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 26 | 18 | 7 | 29 | 25 | 7 | 12 | 21 | 12 | 12 | 12 | 16 |
| <i>Microsporium gypseum</i> | 43 | 7 | 13 | 18 | 7 | 11 | 21 | 21 | 10 | 7 | 7 | 10 | 7 | 10 | 14 | 12 | 9 | 44 | 23 | 16 | 0 | 13 | 11 | 7 | 7 | 10 |
| <i>Trichophyton tonsurans</i> | 44 | 0 | 35 | 24 | 0 | 60 | 43 | 21 | 16 | 0 | 19 | 27 | 20 | 9 | 30 | 12 | 0 | 60 | 40 | 16 | 0 | 10 | 9 | 10 | 0 | 0 |
| <i>Trichophyton rubrum</i> | 50 | 8 | 18 | 18 | 11 | 11 | 15 | 21 | 16 | 13 | 10 | 12 | 11 | 14 | 14 | 20 | 10 | 37 | 13 | 16 | 8 | 11 | 10 | 9 | 12 | 11 |
| <i>Sporotrix schenckii</i> | 47 | 0 | 13 | 11 | 0 | 43 | 23 | 0 | 10 | 11 | 0 | 0 | 11 | 11 | 14 | 0 | 0 | 28 | 40 | 13 | 10 | 10 | 16 | 11 | 0 | 12 |

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos

En la figura 6 se muestra el el halo de inhibición formado por los extractos no polares de canela y clavo sobre bacterias y hongos levaduriformes.



Figura 6. Efecto del extracto de canela soxhlet hexano (**13**) sobre *Escherichia. Coli* y de clavo agitación hexano (**4**) *Escherichia. coli*, *Candida albicans* y *C. parapsilosis*.

En las gráficas 1 se muestra el efecto de las fracciones (diluidas a 1000, 100 y 10 µg/mL) obtenida del clavo por agitación con hexano (Df); 2 de la fracción purificada de la corteza de canela por calentamiento del hexano en soxhlet (I) y 3 de la fracción del eucalipto por agitación con hexano (J); sobre las células OK (a), LLC-PK1 (b) y CHANG (c) tomando como referencia el crecimiento de las células en medio MEM. En todas las concentraciones probadas se encontró un alto porcentaje de viabilidad de las células normales siendo arriba del 60 % para Df, mayor al 75% para I y del 85 en adelante con J.

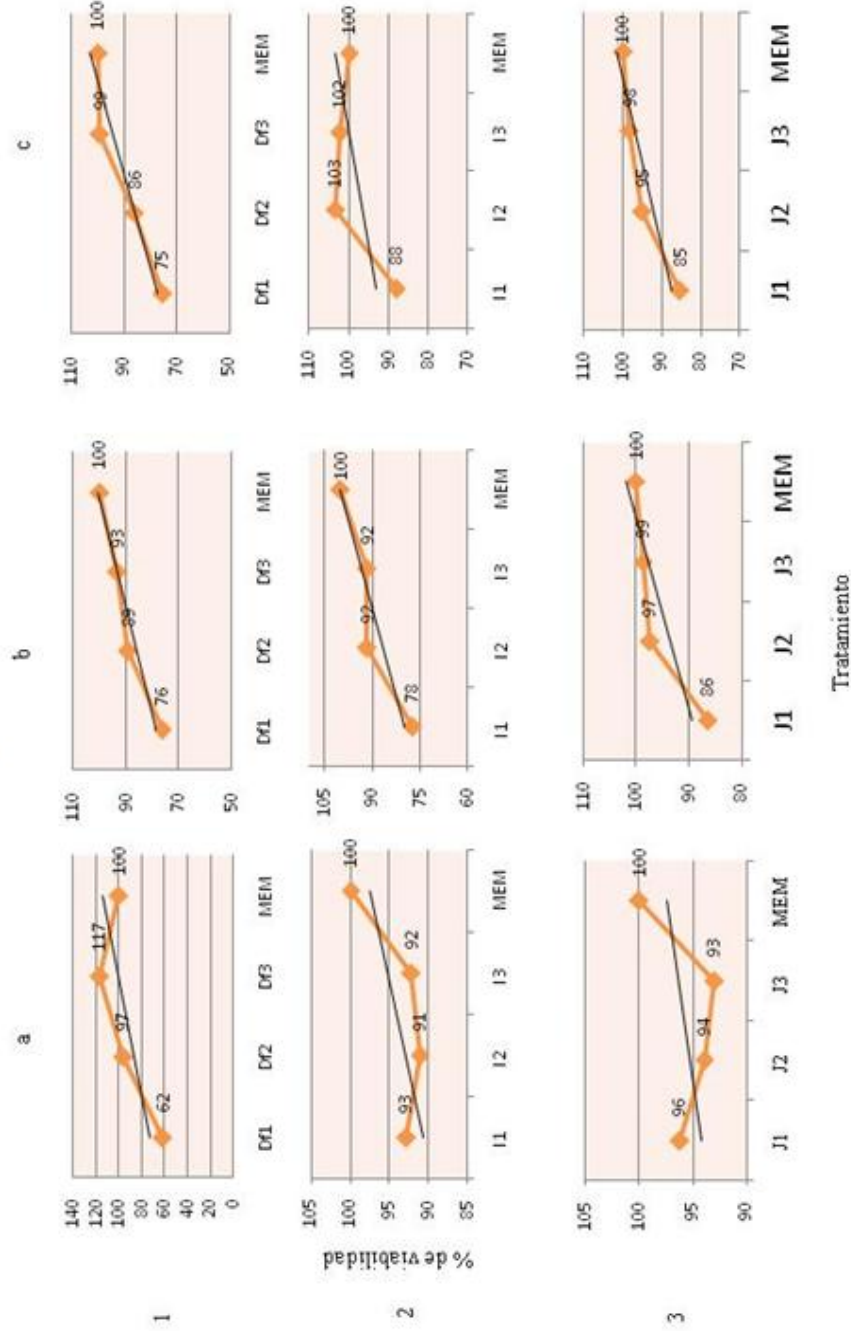


Figura 7. Viabilidad de las células OK, LLC-PK1 y CHANG frente a las fracciones Df, I y J.

En la figura 8 se muestra la toxicidad de las fracciones de los extractos con mayor actividad antimicrobiana comparada con la de un estándar positivo (taxol 0.9 mg/mL) y el medio de crecimiento (RPMI suplementado con suero) donde se puede observar que las fracciones Df e I tienen un potente efecto antineoplásico sobre las células MCF-7 a una concentración de 100 mg/mL con un porcentaje de inhibición del 81.5 y 72.9 % respectivamente, en cambio la fracción J aun con esta concentración presenta menos del 50 % de inhibición de éstas células (37.6 mg/mL)

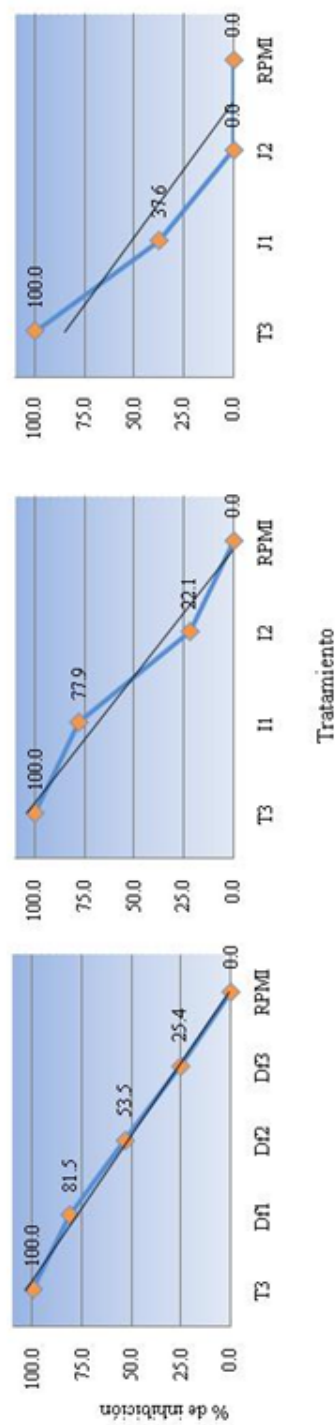


Figura 8. Efecto de las fracciones Df (Clavo agitación hexano), I (canela soxhlet hexano) y J (eucalipto agitación hexano) sobre células de adenocarcinoma humano (MCF-7).

En la tabla 4 se puede observar que todas las plantas utilizadas en este estudio presentan actividad antimicrobiana sobre al menos uno de los microorganismos probados, siendo en algunos casos posiblemente por la sinergia de 2 o más fracciones detectadas por medio de bioautografías realizadas a los extractos en los que se observó actividad sobre alguno de los microorganismos estudiados.

| | # DE FRACC. | Rf | Color en U.V. | Mostró actividad sobre |
|----|-------------|----------------------------|------------------------------------|--|
| 1 | 3 | 0.57 | Roja | <i>E. aerogenes</i> , <i>T. tonsurans</i> , <i>S. schenckii</i> |
| 2 | 1, 2 | 0.96, 0.9 | Naranja, rojo | <i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>T. tonsurans</i> , <i>S. schenckii</i> |
| 4 | 1, 2, 3, 4 | 0.96, 0.95, 0.86, 0.57 | Azul, azul, amarilla, verde | <i>S. aureus</i> , <i>S. schenckii</i> |
| 5 | 1, 2 | 0.96, 0.9 | Naranja, rojo | <i>B. cereus</i> , <i>T. tonsurans</i> , <i>S. schenckii</i> |
| 6 | 1, 2, 3 | 0.93, 0.81, 0.69 | Gris, gris, azul | <i>T. tonsurans</i> , <i>S. schenckii</i> |
| 7 | 3,4,5 | 0.76,0.66, 0.53 | Roja, amarilla, amarilla | <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> . |
| 8 | 5 | 0.60 | amarilla | <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> . |
| 9 | 2 | 0.65 | Verde fosforescente | <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> . |
| 10 | 5 | 0.83 | roja | <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> . |
| 11 | 2,3,4,5,6 | 0.91,0.83, 0.75,0.67, 0.60 | Rosa, rosa, naranja, fucsia, negra | <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> . |
| 12 | 6 | 0.60 | Café grisáceo | <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> . |
| 13 | 2, 4, 5, 6 | 0.82, 0.64, 0.59, 0.52 | Verde, azul, naranja, rojo | <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>B. cereus</i> , <i>T. tonsurans</i> , <i>S. schenckii</i> |
| 16 | 2, 3 | 0.77, 0.56 | Verde, rosa | <i>E. aerogenes</i> , <i>T. tonsurans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>S. schenckii</i> |
| 17 | 1, 2 | 0.87, 0.76 | Rojo, azul | <i>T. tonsurans</i> , <i>S. schenckii</i> |
| 18 | 1, 2, 3 | 0.96, 0.86, 0.75 | Gris, azul, azul | <i>T. tonsurans</i> , <i>C. neoformans</i> |

Tabla 4. Bioautografías de todos los extractos que presentaron actividad antimicrobiana

Para la determinación de la CMI se eligieron los extractos del clavo ya que fueron los que presentaron mayor actividad antimicrobiana frente a la mayoría de las cepas probadas, siendo más eficaces los obtenidos a temperatura ambiente, como puede verse en la tabla 5.

| Extracto | Microorganismo | | |
|-----------------------------|------------------|------------------|---------------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>B. cereus</i> | <i>E. aerogenes</i> |
| (4) Clavo Agitación hexano | 12.5 | 12.5 | 25 |
| (5) Clavo Agitación acetona | 12.5 | 3.12 | 25 |
| (6) Clavo Agitación metanol | 6.25 | 6.25 | 50 |
| (16) Clavo soxhlet hexano | 12.5 | 12.5 | 12.5 |
| (17) Clavo soxhlet acetona | 25 | 12.5 | 25 |
| (18) Clavo soxhlet metanol | 50 | 25 | 100 |

Tabla 5. CMI (mg/mL) de los extractos del clavo vs. las bacterias más sensibles

De los 24 extractos obtenidos se logró la separación de las tres fracciones responsables de la actividad antimicrobiana; los eluentes utilizados para la separación cromatográfica de los extractos activos, los Rf's de las fracciones responsables de dicha actividad y sus características bajo luz UV se muestran en la tabla 6.

| Extracto | Clavo agitación hexano (4) | Eucalipto agitación hexano (10) | Canela soxhlet hexano (13) |
|-------------|----------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| Eluente | Hex-EtOH 5:1 | Ep. -Benc-acet 3:2:1 | Ep - acetona 4:1 |
| Rf | 0.68 Df | 0.8 J | 0.78 I |
| Color al UV | morado | rojo | Azul fosforescente |

Tabla 6. Características cromatográficas de los compuestos con mayor actividad antimicrobiana

De las fracciones separadas por cromatografía en capa fina se logró separar una mayor cantidad de la fracción Df (clavo agitación hexano) (Tabla 7), lo cual permitió la determinación de la CMI de ésta con algunas de las cepas más sensibles y compararla contra

los controles positivos, cloranfenicol para el caso de las bacterias y Fluconazol para las levaduras, siendo en estas últimas menor la CMI de la fracción como se muestra en la tabla 8.

| Planta (30 g) | Fracción | % de la fracción |
|-----------------------|----------|------------------|
| Clavo (4) | Df | 0.34 |
| Eucalipto (10) | J | 0.22 |
| Canela (13) | I | 0.16 |

Tabla 7. Rendimiento de las fracciones purificadas

| Microorganismo | Df | c (+) |
|----------------------|-------|-------|
| <i>E. coli</i> | 50 | 1.95 |
| <i>S. aureus</i> | 100 | 1.95 |
| <i>C. albicans</i> | 12.5 | 125 |
| <i>C. neoformans</i> | 3.125 | 15.62 |

Tabla 8. CMI de la fracción Df ($\mu\text{g/mL}$) sobre algunas de las cepas más sensibles

Como parte del proceso para establecer la estructura química de los compuestos de mayor actividad biológica se realizaron las pruebas químicas que se muestran en la tabla 9. Como puede observarse, se encontraron insaturaciones en las tres fracciones y oxhidrilos fenólicos en la fracción Df (clavo-agitación hexano), alcaloides en las fracciones I (canela-soxhlet hexano) y en la J (eucalipto-agitación hexano) además de insaturaciones y alcaloides también se encontraron cumarinas.

| Prueba | Df | J | I |
|-----------------------------|-----|-----|-----|
| Insaturaciones | (+) | (+) | (+) |
| Oxidrilos fenólicos | (+) | (-) | (-) |
| Cumarinas | (-) | (+) | (-) |
| Sesquiterpenlactonas | (-) | (-) | (-) |
| Flavonoides | (-) | (+) | (-) |
| Alcaloides | (-) | (+) | (+) |

Tabla 9. Pruebas químicas realizadas a las fracciones Df, J e I

En la Figura 9 se observa el patrón de elución de los compuestos que conforman la fracción I, donde se encontró mayoritariamente cinamaldehído (tiempo de retención de 11.90), pero también eugenol (TR 12.70) y ácido 1,2-bencendicarboxílico (TR 20.73)

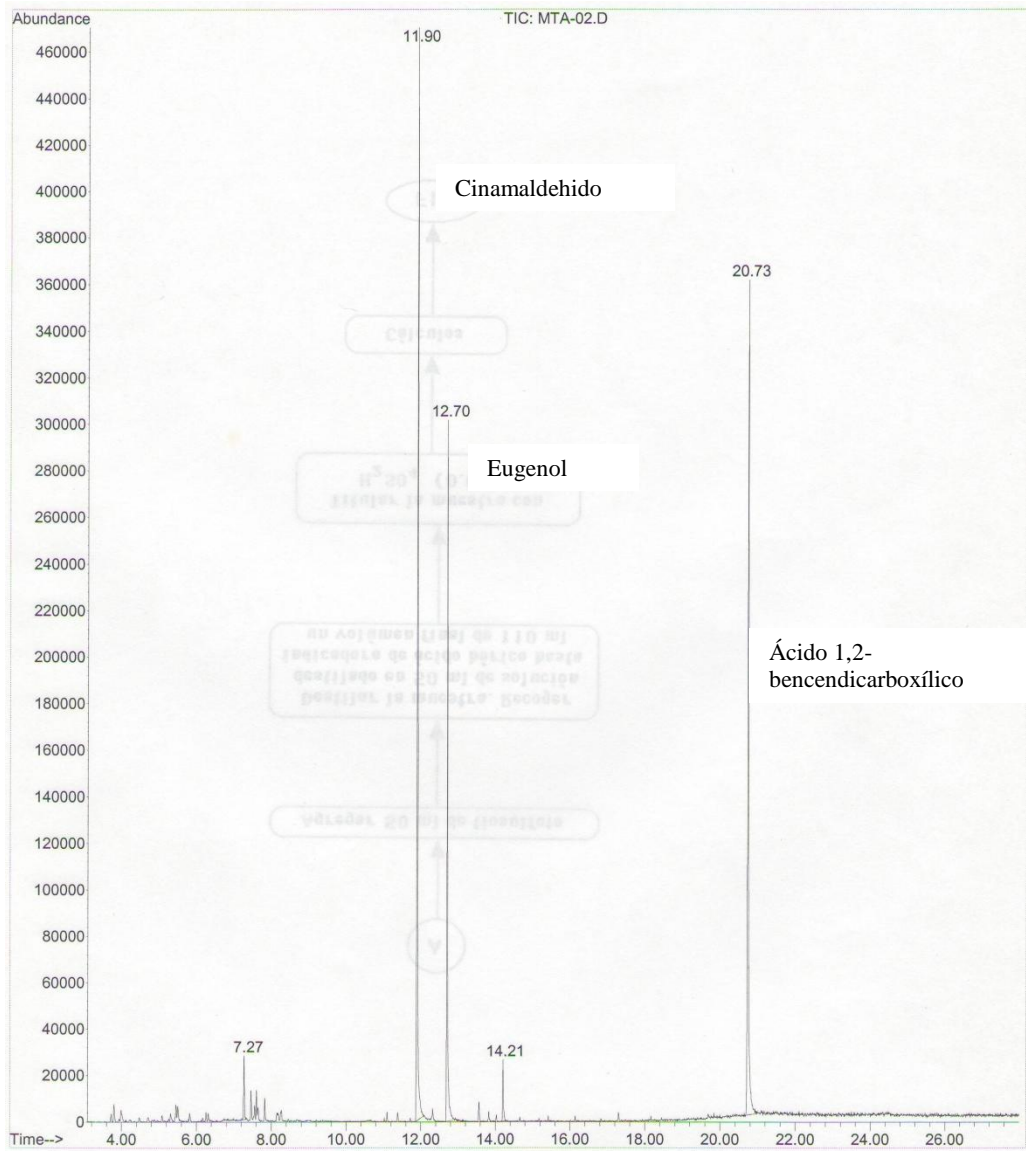


Figura 9 Cromatografía de gases de la muestra I (fracción de canela soxhlet hexano)

La muestra I fue comparada con un estándar de la base de datos Wiley275.L encontrando que el componente mayoritario eluido de la cromatografía de gases es el cinamaldehído (figura 10).

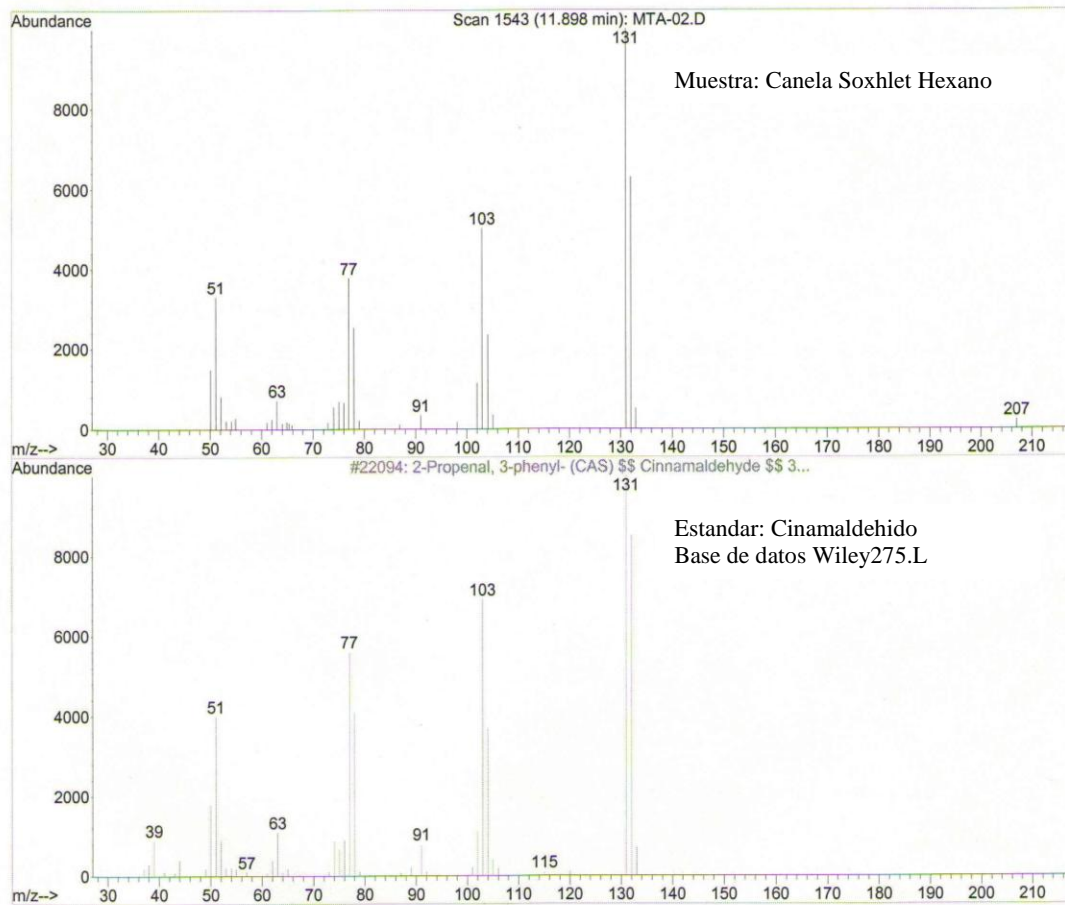


Figura 10. Espectro de Masas de la fracción I (cinamaldehído) obtenida del extracto de canela-soxhlet hexano.

La figura 11 muestra la estructura química del compuesto principal de la fracción I (canela- soxhlet hexano) determinada con los datos obtenidos de la espectroscopía masas-gases.

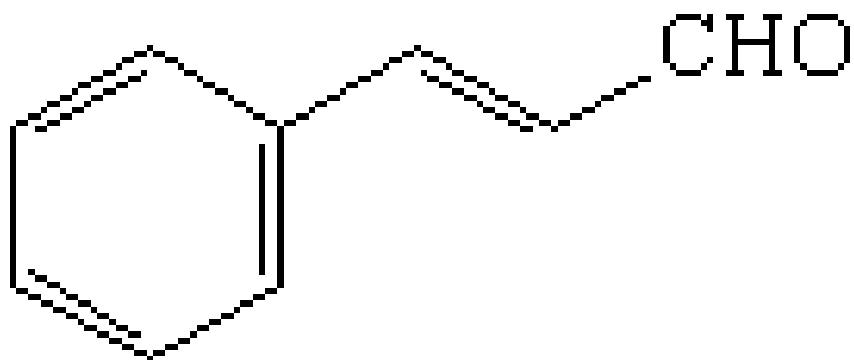


Figura 11. Estructura química del cinamaldehído

En el cromatograma de gases de la muestra Df se eluyó principalmente Eugenol con la aparición de una señal con un tiempo de retención de 12.70 y componentes menores que indican un alto grado de pureza del compuesto obtenido (Figura 12).

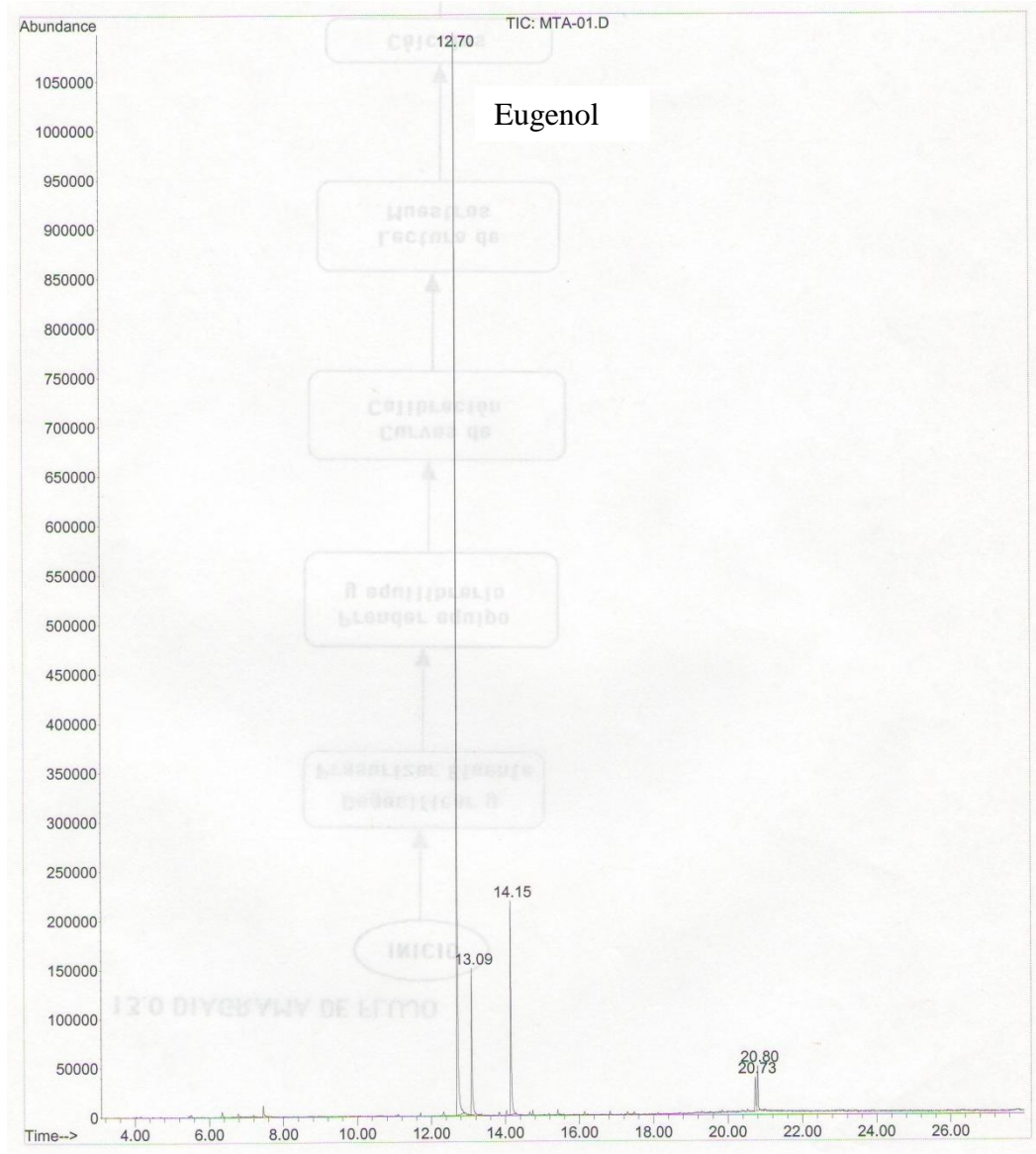


Figura 12. Cromatografía de gases de la muestra Df (fracción de clavo agitación hexano)

En la comparación de la muestra Df y el estándar de la librería electrónica Wiley275.L se determinó que la muestra contenía principalmente eugenol (Figura 13).

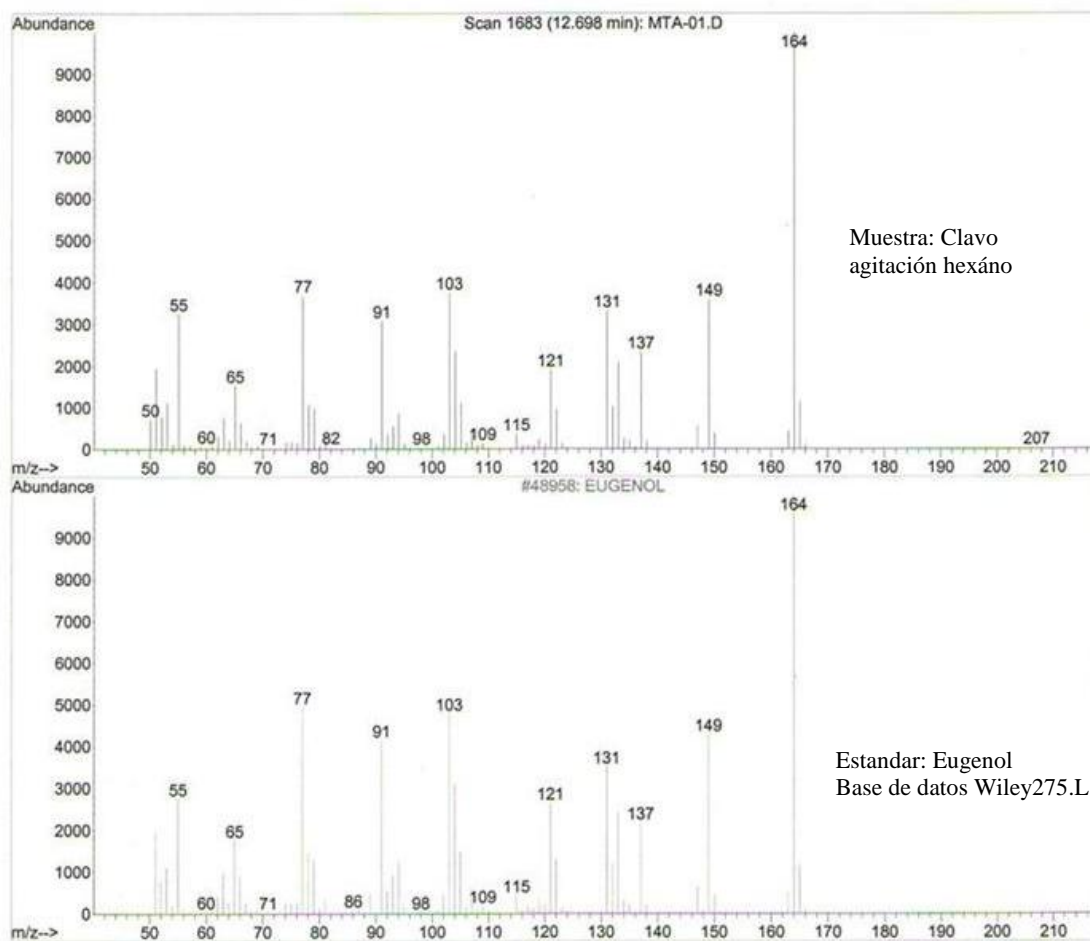


Figura 13. Espectro de Masas de la fracción Df obtenida de Clavo agitación hexano (Eugenol)

Se determinó la estructura química del compuesto principal de la fracción Df quedando de la siguiente manera (Figura 14).

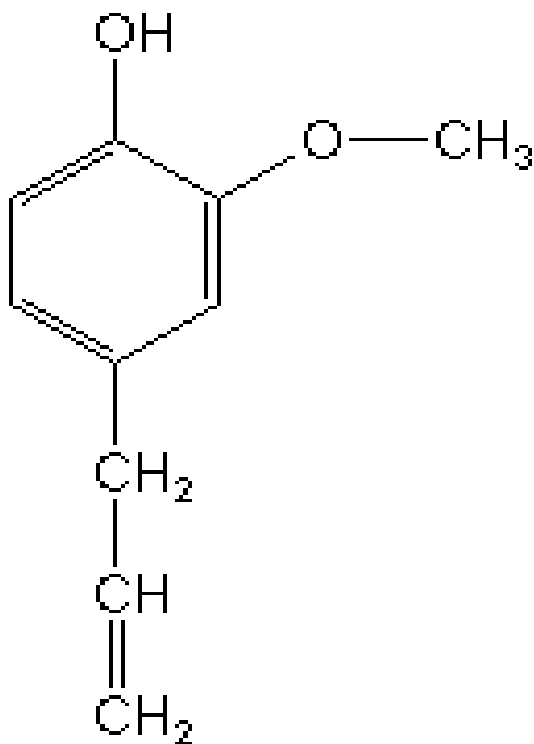


Figura 14. Estructura química del Eugenol

9. DISCUSIÓN

La investigación dirigida hacia la búsqueda de compuestos o principios activos obtenidos a partir de productos naturales ha aumentado considerablemente en los últimos años. Con la finalidad de contribuir al conocimiento etnobotánico de 4 plantas de las familias Myrtaceae y Laureaceae (canela, clavo, eucalipto y guayabo), así como para caracterizar algunas de sus actividades biológicas, en el presente trabajo se estudiaron y establecieron algunas propiedades químicas y biológicas de estas plantas, las cuales son ampliamente utilizadas y consumidas en México. Los resultados obtenidos demuestran diferencias entre el tipo de extracto y la actividad antimicrobiana que mostraron, siendo más eficaces los extractos no polares. Dependiendo del método de extracción se observó una influencia significativa en la obtención de los diferentes principios activos presentes en la planta, dichas diferencias ya habían sido descritas con anterioridad (Lapenna *et al.* 2005). Aunque se tenían antecedentes de actividad antimicrobiana de los extractos polares del género *Psidium* (Neira, 2005; Martínez *et al.* 1997; Jaiarj P. *et al.* 1999), de los no polares (P. Ghosh *et al.* 2010) y de que con ciertos antibióticos se producía un sinergismo que dan lugar a una mayor actividad en éstos sobre *S.aureus* (Betoni *et al.* 2006) en esta investigación no se observó actividad relevante con ninguno de los extractos de *Psidium guajava* sobre ninguno de los microorganismos probados, sólo se observó actividad fungistática sobre *T. tonsurans* y *C. neoformans*. Al igual que lo reportado por otros autores en los extractos de las hojas de guayabo se encontraron compuestos terpenoides (Begum S. *et al.* 2004), carbohidratos (Arima H y Danno G., 2002) y flavonoides (Metwally Am. *et al.* 2010), siendo estos últimos los responsables de la actividad antimicrobiana encontrada en los extractos metanólicos de las hojas del guayabo reportada en trabajos anteriores Hidetoshi (Arima y Gen-ichi Danno; 2002). Aunque en este estudio no se comprobó la actividad antimicrobiana de las hojas del guayabo, no se descarta para futuras investigaciones, ya que posee compuestos con actividad biológica como la quercetina que se ha descrito como un potente agente antidiarreico que inhibe la contracción *in vitro* del íleon de

cobayo, la movilidad peristáltica del intestino delgado del ratón y también reduce la permeabilidad de los capilares abdominales (Zhang et al., 2003) Además, posee propiedades anticancerígenas (Kaneuchi et al., 2003) y no provoca muerte ni signos de eventos adversos en los estudios de toxicidad aguda de las hojas secas y molidas realizados en ratones (Martínez *et al.*, 2001).

En otro trabajo, Seenivasan y cols evaluaron la actividad antimicrobiana de 21 aceites esenciales de plantas entre las que se encontraba la canela, el clavo y el eucalipto contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, encontrando que el microorganismo más susceptible fue del género *Bacillus* y que la canela era una de las plantas con mayor actividad y el eucalipto con menor, similar a lo encontrado en este trabajo (Seenivasan et al., 2006). En cuanto a los extractos obtenidos del eucalipto, se encontró un pobre efecto antimicrobiano, al igual que lo reportado por Lattaoui and Tantaoui-Elaraki, 1994; Cosentino *et al.*, 1999, quienes lo atribuyen a que las hojas de eucalipto son ricas en terpenos los cuales en estudios previos habían sido descritos como los componentes menos bioactivos del aceite esencial de esta planta (Gende et al., 2010). Lo cual contrasta con los hallazgos descritos por Cimanga K. y col's; quienes describen a los aceites esenciales de *Eucalyptus camaldulensis* como potentes inhibidores del crecimiento bacteriano principalmente sobre *Pseudomonas aeruginosa*. (Cimanga Ky *et al.* 202). Además se han encontrado reportes de efectos citotóxicos notables de los aceites esenciales de tallos y hojas de diversas especies eucalipto sobre células MCF-7 pero en este trabajo la especie *camaldulensis* mostró menos del 50% de inhibición de las mismas (37.6 mg/mL) mediante el ensayo con WST. (Hossam M. Ashour; 2002).

Por otra parte Lining Cai y Christine D. Wu. comprobaron el potencial como antimicrobiano de los extractos no polares del clavo contra patógenos orales Gram negativos (Cai and Wu,1996), y sobre otros microorganismos (Dorman y Deans, 2000) sin embargo en un estudio hecho por Burt et al 2003 el clavo resultó ser el menos activo contra *E. coli*. Con respecto al aceite esencial del clavo, un grupo de autores obtuvieron resultados relevantes similares a los encontrados en este trabajo, solo que en bacterias asociadas a caries dental (Branch-Mays et al., 1994).

El trans-Cinamaldehído es un potente compuesto antimicrobiano presente en aceites esenciales como el de canela (Ooi *et al.*, 2006) esto fue corroborado tanto para hongos filamentosos, levaduras y bacterias en las pruebas de difusión en placa de agar como en las

bioautografías. Las discrepancias encontradas en los resultados de esta investigación y los reportes de otros autores pueden deberse a múltiples factores entre los que se encuentran la época y el lugar de recolección, la parte de la planta utilizada y la etapa en la que se encuentre la planta, generalmente los aceites esenciales de plantas que fueron cosechadas durante o inmediatamente después de la floración poseen mayor actividad antimicrobiana. (McGimpsey *et al.*, 1994; Marino *et al.*, 1999). Otro factor importante es el sitio de producción de los compuestos, en algunos casos pueden producirse en toda la planta; en otras especies puede haber producción selectiva de metabolitos antifúngicos en cada órgano de la planta, como ocurre con la canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), que en la corteza del tallo produce altas concentraciones de aldehído cinámico, en las hojas predomina el eugenol y en la corteza de la raíz el camfor (Senanayake *et al.*, 1978).

Al igual que en el trabajo de Lopez P y cols, se encontró que los hongos fueron los microorganismos más susceptibles frente a la fracción con actividad antimicrobiana del extracto hexánico del clavo (Df) con una MIC menor (de 12.5 y 3.125 µg/mL para *C. albicans* y *C. neoformans*) a la requerida por las bacterias (50 y 100 µg/mL para *E.coli* y *S. aureus*) (Lopez *et al.*, 2005). También se observó que los hongos más susceptibles fueron los filamentosos, principalmente *Trichophyton tonsurans* y *Sporotrix schenckii*; estas cualidades antifúngicas del clavo sobre cepas filamentosas también han sido descritas por autores como Amiri A. y col's quienes probaron al eugenol como posible agente activo en formulaciones para evitar el desarrollo de enfermedades posteriores a la cosecha de frutos como la manzana (Amiri A. *et al.*; 2008). De acuerdo a Grayer y Harborne (1994) los antifúngicos constitutivos pertenecen a todas las principales clases de compuestos secundarios: terpenoides, iridoides, sesquiterpenos, saponinas, compuestos azufrados o nitrogenados (alcaloides, aminas, amidas), alifáticos (especialmente alcanos de cadena larga y ácidos grasos) y aromáticos fenoles, flavonoides, estilbenos, bibencilos, xantonas y benzoquinonas).

En general, los aceites esenciales poseen fuertes propiedades antibacterianas debido a que contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos como el eugenol (Farag *et al.*, 1989; Thoroski *et al.*, 1989; Cosentino *et al.*, 1999; Dorman y Deans de 2000; Juliano *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2001). Lo anterior sugiere que su mecanismo de acción, sea similar al de otros compuestos fenólicos, por alteración de la membrana citoplasmática, interrumpiendo la fuerza

motriz de protones (PMF), el flujo de electrones, el transporte activo y la coagulación del contenido celular (Denyer y Hugo, 1991b; Sikkema *et al.*, 1995.; Davidson, 1997). El eugenol es el principal componente del aceite del clavo (Farag *et al.*, 1989). Se ha encontrado que a concentraciones subletales de eugenol se inhibe la producción de amilasa y proteasas de *B. cereus*, deteriorando la pared celular, lo que origina la lisis celular. Esto también fue observado por Thoroski *et al.*, 1989. Se cree que el grupo hidroxilo del eugenol. Al que se unen ciertas proteínas, previene la acción enzimática en *E. aerogenes* (Wendakoon y Sakaguchi, 1995). Aunque se sabe que el cinamaldehído inhibe el crecimiento de *E. coli* O157: H7 y *S. typhimurium* a concentraciones similares a las del carvacrol y el timol, no desintegra la membrana externa o agotan el ATP intracelular (Helander *et al.*, 1998). De manera similar a lo que recién se ha descrito, se piensa que el grupo carbonilo se une a proteínas, impidiendo la acción de la aminoácido descarboxilasa *E. aerogenes* (Wendakoon y Sakaguchi, 1995). Se conoce que compuestos encontrados en el eucalipto como el cineol reducen la división celular y que el limoneno, el α -pineno y el β -pineno inhiben el consumo de oxígeno (Peñuelas *et al.*, 1996); también se sabe que el 1-8 cineol inhibe la respiración mitocondrial, la fosforilación oxidativa y la síntesis de ADN (Koitabashi *et al.*, 1996).

Diversos autores como Shaik Mahaboob Ali y col's han demostrado el potencial medicinal de compuestos como el cinamaldehído y el eugenol en experimentos *in vitro* como en el que probaron su bioactividad sobre 30 cepas de *H. pylori* y pudieron encontrar inhibición del crecimiento en todas a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ en la novena y doceava horas de incubación, además de que no desarrollaron resistencia después resiembras a concentraciones subinhibitorias (Shaik Mahaboob Ali y *et al.* 2005).

En el presente trabajo, por medio de pruebas químicas se determinó la presencia de compuestos fenólicos e insaturaciones en los extractos activos de canela y de clavo; con ayuda del análisis con espectroscopia de masas acoplada a gases se identificaron el eugenol y el cinamaldehído como los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana presentada por los extractos hexánicos de clavo y canela respectivamente, los cuales previamente habían sido estudiados por el método de difusión en placa de Bauer Kirby. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Janssen y cols, quienes reportan que los fenilpropanos presentan una alta actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Tricophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* (Janssen *et al.*, 1989).

La relación entre la actividad antimicótica y la estructura química de los compuestos fue estudiada por Sen-Sung Cheng y col's, las pruebas de acción antifúngica revelaron que el cinamaldehído y el eugenol exhibían una fuerte actividad contra todas las cepas probadas, los resultados obtenidos en el estudio de la relación estructura química- actividad antimicótica de estos dos compuestos sugirieron que la presencia de un grupo carbonilo, un grupo carboxilo, un doble enlace conjugado y una cadena hidrocarbonada larga fuera del anillo, afectan sus propiedades antifúngicas. Además, la presencia de un radical metilo en la posición orto puede tener una influencia considerable en dicha acción (Sen-Sung Cheng y col's; 2008). El espectro de masas de la fracción Df mostró el ion molecular (M^+) en 164, que corresponde a la masa molecular relativa del eugenol. El fragmento de 149 es debido a la pérdida del grupo metilo ($M-CH_3$)⁺ de la cadena lateral, también se observa una fragmentación en 131 correspondiente a la pérdida de agua y un grupo metilo del ion molecular ($M-(CH_3+H_2O)$)⁺, la señal en 91 es típico de la presencia de un grupo bencilo en la molécula ($C_7H_7^+$). El pico con una relación m/z de 65 es debido a la pérdida de un grupo de acetileno; estos datos concuerdan con los encontrados en la librería del espectrómetro de masas y con lo reportado por G. A. Ayoola y cols. (Ayoola et al., 2008).

Para la fracción I el pico mayor correspondiente al ion molecular (M^+) fue de 131 indicando la presencia de cinnamatos en la muestra, confirmado con la señal m/z de 103 (C_8H_7), se detectó la presencia del ion tropilo característico en el arreglo Mc Lafferty de alquilbencenos ($m/z = 91$) y (C_4H_3) derivado de la fragmentación del grupo fenilo en $m/z = 51$.

El potencial anticancerígeno del clavo ya había sido reportado por Guo y cols, quienes probaron diferentes sesquiterpenos, entre ellos el eugenol, para inducir la detoxificación de enzimas que se relacionan con la inhibición de la carcinogénesis química (Guo-Qiangz et al., 1992). En el presente trabajo se encontró que existe selectividad del eugenol al comprobar la acción tóxica sobre células MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano) pero no sobre las líneas celulares normales OK (riñón de zarigüeya), LLCPK-1 (riñón de cerdo), CHANG (hígado humano), esto por medio de la medición del índice de selectividad ($SI = IC_{50}$ de las células normales/ IC_{50} de las células tumorales) que establece que si el valor de SI es >1 indica que la substancia es más tóxica para las células tumorales que para las células normales y viceversa (Zhou et al., 2004). A diferencia de Boonchird C y Flegel TW; que excluyen el uso de eugenol como agente terapéutico en micosis sistémicas al determinar una dosis máxima

tolerada a este compuesto de 62.5 mg/kg por vía peritoneal sobre ratones en un ensayo a corto plazo (Boonchird C y Flegel TW, 1982). Pero la actividad anticandida del eugenol ya ha sido descrita tanto *in vitro* como *in vivo* y los autores concluyen que el eugenol podría ser considerado como un producto prometedor en el tratamiento de la candidiasis vaginal y oral (Chami F. y col's.; 2004 y 2005) ; Silva *et al*, en el 2005 demostraron su actividad antidermatofítica *in vitro* y Sook-Jin Lee *et al*, probaron el efecto del eugenol sobre cepas de *Microsporum gypseum in vivo* utilizando cerdos de guinea, los resultados sugieren que el eugenol podría tener una aplicación como agente antifúngico suplementario (Sook-Jin LEE et al, 2007), se debe continuar con los estudios *in vivo* para determinar la utilidad del eugenol sobre el resto de los hongos dermatofitos de importancia clínica para establecer su uso terapéutico.

10. CONCLUSIONES

- De los 24 extractos obtenidos 15 presentan actividad antimicrobiana
- La mayor actividad antimicrobiana se observó con los extractos no polares de canela y de clavo
- Los hongos fueron más sensibles a los extractos que las bacterias
- Los datos de GC-MS muestran al eugenol y cinamaldehído como los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana del extracto hexánico obtenido del clavo mediante agitación continua (fracción Df) y de la fracción I (canela-soxhlet hexano), respectivamente.
- Los principales componentes bioactivos del clavo (eugenol) y canela (cinamaldehído) tienen un efecto tóxico selectivo sobre las células tumorales MCF-7.
- Los compuestos de los extractos de mayor actividad antimicrobiana no mostraron actividad tóxica sobre las líneas celulares normales probadas.

11. PERSPECTIVAS

Algunas de las perspectivas del presente trabajo son: continuar con la investigación de las plantas medicinales para el aislamiento e identificación de productos naturales bioactivos, con miras a la caracterización de grupos en un género que pueda contribuir a la investigación del valor medicinal de las plantas. Probar potencial antineoplásico de los compuestos aislados en más líneas celulares tumorales. Determinar la eficacia y/o toxicidad de los compuestos en modelos *in vivo*. Trabajar en la reformulación de los compuestos activos tomando como base las estructuras encontradas en el presente trabajo, para la obtención de análogos que brinden un mayor efecto antimicrobiano pero con menos efectos adversos sobre el paciente. Investigar métodos de síntesis (u obtención en masa) de los compuestos con actividad biológica relevante y comprobada.

12. LITERATURA CITADA

- Alanís F. G. 1994. Apuntes de botánica sistemática. Publicación U.A.N.L. pp 35- 46 y 47
- Alonso, J.R. Tratado de Fitofármacos y nutraceuticos, 2a. ed. Ed. Corpus. Buenos Aires, 2004.
- Amiri A, Dugas R, Pichot AL, Bompeix G. In vitro and in vivo activity of eugenol oil (Eugenia caryophyllata) against four important postharvest apple pathogens. Int J Food Microbiol. 2008 Aug 15;126(1-2):13-9. Epub 2008.
- Arenas R. 1993. Micología Médica ilustrada. 1º Edición. Editorial Interamericana McGraw – Hill. Cap. 6, 13 y 16.
- Arima H, Danno G. Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation. Biosci Biotechnol Biochem. 2002 Aug;66(8):1727-30.
- Arima y Gen-ichi Danno. Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L) and their structural elucidation. Biosci. Biotechnol. Biochem., 66(8), 1727-1730, 2002.
- Arteche A, Vanaclocha B, Güenechea JI. Fitoterapia Vademécum de prescripción. Plantas medicinales 3.ª ed. Barcelona: Masson, 1998.
- Base de datos de la USDA disponible en <http://plants.usda.gov/classification/classification.cgi>
- Becker J. M. *Et al.* 1983. Polyoxin D Inhibits Growth of Zoopathogenic Fungi. American Society for Microbiology. Vol 23. No. 6. pp 926-929.
- Begum S, Hassan SI, Ali SN, Siddiqui BS. Chemical constituents from the leaves of *Psidium guajava*. Nat Prod Res. 2004 Apr;18(2):135-40.
- Beiiio-Pbrez LA, Ortlz-Díianes DM, Pbrez-Mernije E, Castro-Domúíguez vs. *Salmonella* en carnes crudas: un estudio en localidades del estado de Guerrero. Salud Publica Mex 1990; 32:74-79.

Betoni JE, Mantovani RP, Barbosa LN, Di Stasi LC, Fernandes Junior A. 2006 Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases Mem Inst Oswaldo Cruz.101(4):387-90

Boonchird C y Flegel TW In vitro antifungal activity of eugenol and vanillin against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. Can J Microbiol. 1982 Nov;28(11):1235-41.

Branch-Mays, G.; Hao, Z.; Laffoon, J. F.; Wu-Yuan, C. D. J. Dent. Res. Special Issue 1994, 73, 208

Brock. M.T. Madigan, J.M. Martinko, y J.Parjer: *Biología de los microorganismos*. 8ª edición, Editorial Prentice-Hall, Madrid, 1998.

Burt SA, Reinders RD 2003 Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. Lett Appl Microbiol. 36(3):162-7.

Caron, J., L. M. Coffield y J. R. Scott. 1989. A plasmid-encoded regulatory gene, rns, required for expression of the CS1 and CS2 adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 86(3):963-967.

Carranza Rosales María del Pilar. 1997. efecto del mercurio sobre el transporte transepitelial de seroalbúmina bovina por epitelios de células OK. Tesis de Maestría; FCB, UANL. Pp 18-19.

Chami N, Bennis S, Chami F, Aboussekhra A, Remmal A.Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol *in vitro* and *in vivo*. Oral Microbiology and Immunology, Volume 20, Issue 2, pages 106–111, April 2005.

Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, Totté J, Pieters L, Vlietinck AJ. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. J Ethnopharmacol. 2002 Feb;79(2):213-20.

Conner, D.E., Beuchat, L.R., 1984. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. Journal of Food Science 49, 429– 434.

Cordero Ruiz, Dagmara M, Garcia Perez, Ana Lilia, Barreal Gonzalez, Rosa Teresita *et al*. Comportamiento de la infección nosocomial en las unidades de terapia en un período de 5 años. *Rev Cubana Hig Epidemiol*, Mayo-ago. 2002, vol.40, no.2, p.79-88.

- Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas, F., 1999. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29, 130– 135.
- Cravioto, A., A. Tello, A. Navarro, J. Ruiz, H. Villafan, F. Uribe y C. Eslava. 1991. Association of *Escherichia coli* Hep-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet* 337:262-264.
- Cruz V. D.E. 1996. Determinación de la actividad estabilizadora de microtúbulos de fracciones ricas en diterpenoides obtenidas mediante HPLC de extractos de hojas, tallos y corteza de *Taxus globosa*. Tesis de Maestría de la F.C.B. de la U.A.N.L.
- D, Fauci A, Longo D, Braunwald E, Hauser S, Jameson J, editores. Harrison. Principios de Medicina Interna. 16 ed. México: McGraw- Hill Interamericana, 2006.
- Davidson, P.M., 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM, Washington, pp. 520–556.
- Denyer, S.P., Hugo, W.B., 1991b. Mechanisms of antibacterial action—A summary. In: Denyer, S.P., Hugo, W.B. (Eds.), *Mechanisms of Action of Chemical Biocides*. Blackwell, Oxford, pp. 331– 334.
- Domínguez, X. A., 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. Primera edición. Editorial LIMUSA. pp 33.
- Domínguez, X. A., 1982. Química Orgánica Experimental. Primera edición. Editorial LIMUSA. pp 76-86.
- Donnenberg, M. S. y J. B. Kaper. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 60:3953-3961.
- Dorman HJ, Deans SG. 2000 Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.* 88(2):308-16.
- Dorman, H.J.D., Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88, 308– 316.
- Duke, J.A. and Wain, K.K. 1981. Medicinal plants of the world. Computer index with more than 85,000 entries. 3 vols.
- Edmundo Calva, 2007 *Salmonella typhi* y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública. Instituto de Biotecnología, UNAM, disponible en línea en

http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_07/

Edmundo Calva. *Salmonella typhi* y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública. Instituto de Biotecnología, UNAM, disponible en línea en http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_07/

Elmer W. Koneman, Stephen D. Allen, William M. Janda, Paul C. Schreckenber, Washington C. Winn, (h). 2001. Diagnostico Microbiológico texto y atlas en color. Quinta Edición. Editorial médica panamericana. Pp 790.

F. Chami, N. Chami, S. Bennis, J. Trouillas and A. Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model Remmal Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2004) 54, 909–914.

Farag, R.S., Daw, Z.Y., Hewedi, F.M., El-Baroty, G.S.A., 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. Journal of Food Protection 52 (9), 665–667.

Fu H, Luo Y, Zhang D. Studies on chemical constituents of leaves of *Psidium guajava*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2009 Mar;34(5):577-9.

G. A. Ayoola, F. M. Lawore, T. Adelowotan, I. E. Aibinu, E. Adenipekun, H. A. B. Coker and T. O. Odugbemi. Chemical analysis and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzigium aromaticum* (clove) African Journal of Microbiology Research. Vol.(2) pp. 162-166, July, 2008 Disponible en línea en <http://www.academicjournals.org/ajmr>

García M. N. D. 1981. Obtención de una nueva línea celular de fibroblastos de rata (*Rattus rattus*) var long-evans, y algunas características. Tesis de Licenciatura de la F.C.B. de la U.A.N.L. pp. 3-7.

Grayer, R. J., J. B. Harborne, 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. Phytochemistry 37: 19-42.

Guo-Qiangz Heng,P Atrickm . Kenney,A Nd Luke K.T. Lam. Sesquiterpenes from clove (*eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents Journal of Natural Products. VOI. 55. NO. 7.@. 999-1003.

Hill, A. F. 1965. Botánica Económica Plantas útiles y productos vegetales. 1a edición. Ediciones Omega. Pp 571.

- Hossam M. Ashour. Antibacterial, antifungal, and anticancer activities of volatile oils and extracts from stems, leaves, and flowers of *Eucalyptus sideroxylon* and *Eucalyptus torquata* *Cancer Biology & Therapy* 7:3, 399-403; March 2008.
- Jaiarj P, Khoohaswan P, Wongkrajang Y, Peungvicha P, Suriyawong P, Saraya ML, Ruangsomboon O. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. *J Ethnopharmacol.* 1999 Nov 1;67(2):203-12.
- Janssen, A.M., Scheffer, J.J., Ntezurubanza, L., Svendsen, A.B. *Antimicrobial activities of some Ocimum species grown in Rwanda.* 1989. *Journal of Ethnopharmacol.* 26: 57-63.
- Jawetz E, Melnick J. 1983 *Microbiología Médica.* 10ª. Ed. México: El Manual Moderno. Pp 192.
- Jawetz. 1990. *Microbiología Médica.* Editorial. Manual Moderno. 13º Edición.
- Jesús del Monte. 1998. *Plantas Medicinales.* Museo Virtual de la Universidad Michoacana <http://www.ccu.umich.mx/museo/hist-natural/botanica/plantas-medicinal/myrtha.html>.
- Jokik; Willett; Amos; Wilfert. 1997. *Microbiología.* 20a. Edición. Editorial Médica Panamericana. Pp.551, 736-763.
- Juliano, C., Mattana, A., Usai, M., 2000. Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *Journal of Essential Oil Research* 12, 516–522.
- Kaneuchi M, Sasaki M, Tanaka Y, Sakuragi N, Fujimoto S, Dahiya R. Quercetin regulates growth of Ishikawa cells through the suppression of EGF and cyclin D1. *Int J Oncol* 2003;22:159-64.
- Koitaabashi, R., T. Suzuki, T. Kawazu, A. Sakai, H. Kuroiwa, T. Kuroiwa, 1997. 1,8- cineole inhibits root growth and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* L. *Journal of Plant Research* 110: 1-6.
- Koneman EW, Roberts GD. *Clinical and laboratory diagnosis of mycotic disease.* En: Henry JB (ed). *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*, 17ª ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia 1984 .
- Koneman, E. W., Allen, S. D., Dowell, V. R., Sommers, H. M. 1992. *Diagnóstico microbiológico.* Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. Pp

383-388.

L. Gende, M. Maggi, C. van Baren, A. di Leo Lira, A. Bandoni, R. Fritz and M. Eguaras Antimicrobial and miticide activities of *Eucalyptus globules* essential oils obtained from different Argentine regions. Spanish Journal of Agricultural Research 2010 8(3), 642-650.

Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P., Nychas, G.-J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology 91, 453–462.

Lapenna M Elisa A, Medina Ramírez Gerardo E, Díaz Lorena, Aguillón Karen , Marín Hadly. 2005. Actividad bactericida y fungicida de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional venezolana. Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel 34:6-9.

Lin J, Puckree T, Mvelase TP. Anti-diarrhoeal evaluation of some medicinal plants used by Zulu traditional healers. J Ethnopharmacol. 2002;79(1):53-6.

Lining Cai and Christine D. Wu Compounds from *Syzygium aromaticum* Possessing Growth Inhibitory Activity Against Oral Pathogens. J. Nat. Prod. 1996, 59, 987-990.

Liz Highleyman Bulletin of issue Opportunistic Infections: Is it Safe to Stop Prophylaxis? Experimental Treatments for AIDS January 1999.

Lopez P, Sanchez C, Batlle R, Nerin C. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. J Agric Food Chem. 2005 Aug 24;53(17):6939-46.

Manual Merck de información Médica para el Hogar. Infecciones causadas por cocos. Capítulo 178. Sección 17. Copyright ©2005 Merck Sharp & Dohme de España, S.A. Madrid, España. Todos los derechos reservados.

Marino, M., Bersani, C., Comi, G., 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. Journal of Food Protection 62 (9), 1017– 1023.

Martínez M. 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Editorial Fondo de Cultura Económica. Pp 147.

- Martínez María Julia, Molina Nancy, Boucourt Elisa evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (guayaba) Rev Cubana de Plant Med 1997; 2(1): 12-14.
- Martínez MJ, Molina N, Boucourt E, Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (guayaba). Rev Cubana Plant Med. 1997;2(1):12-4.
- Maureen Hernández Ángel, Lourdes García Bacallao, Delia Mercedes Rojo Domínguez, Dania Olivares Padilla. Almendro de la India: Potencial Biológico Valioso. Rev Cubana Invest Biomed 2003;22(1):41-7.
- McGimpsey, J.A., Douglas, M.H., Van Klink, J.L., Beauregard, D.A., Perry, N.B., 1994. Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *Thymus vulgaris* L. in New Zealand. Flavour and Fragrance Journal 9, 347– 352.
- Mendel Friedman, Nobuyuki Kozukue and Leslie A. Harden. Cinnamaldehyde Content in Foods Determined by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem., Vol. 48, No. 11, 2000 48, 5702-5709.
- Metwally Am, Omar Aa, Harraz Fm, El Sohafy Sm. Phytochemical investigation and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaves. Pharmacogn Mag. 2010 Jul;6(23):212-8.
- Muños M. 1981. Prácticas de instrumentación analítica III. Editorial LIMUSA. Primera edición. pp 42-44.
- Nataro, J. P. y J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11:142-201.).
- Neira González, Adriana María. Estudio fitoquímico de la actividad antivascular de *Psidium guinwse* Sw (choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dentales. Revista Cubana Plant Med 2005; 10 (3-4).
- Ooi Ls, Li Y, Kam Sl, Wang H, Wong Ey, Ooi Ve. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the chinese medicinal herb cinnamomum cassia blume. Am j chin med.
- Orlando A. Abreu GuiradoI; Armando Cuéllar CuéllarII. Estrategias en la selección de las plantas medicinales a investigar Rev Cubana Plant Med v.13 n.3. Ciudad de la Habana jul.-sep. 2008.

- P. Ghosh, A. Mandal, P. Chakraborty, M. G. Rasul, Madhumita Chakraborty, and A. Saha Triterpenoids from *Psidium guajava* with Biocidal Activity. *Indian J Pharm Sci.* 2010 Jul–Aug; 72(4): 504–507.
- Padilla C, Lobos O, Brevis P¹, Abarca P y Hubert E. Plasmid-mediated bacteriocin production by *Shigella flexneri* isolated from dysenteric diarrhoea and their transformation into *Escherichia coli* The Society for Applied Microbiology, *Letters in Applied Microbiology* 42 (2006) 300–303.
- Pahlow M. 1981. *El gran libro de las plantas medicinales*. Editorial Everest Mexicana. S. A. pp 709-711.
- Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Alvarez-Uria, M., Fraile, B., Anadón, R. y Sáez, F. 2003. *Biología celular*. Editorial McGraw-Hill – Interamericana S.A.U.. Madrid, España. Pp 381.
- Peñuelas, J., M. Ribas-Carbo, L. Giles, 1996. Effects of allelochemicals on plant respiration and oxygen isotope fractionation by the alternative oxidase. *Journal of Chemical Ecology* 22: 801-805.
- Quintanilla L. G. 1998. Contribución al estudio fitoquímico y efecto fisiológico de *Abutilon malacum*. Tesis U.A.N.L.
- Robert S. Pappas. The Essential Oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. From South Florida: A High Cryptone/Low Cineole Eucalyptus. *J. Essent. Oil Res.*, 12, 383-384 (2000).
- Ronald R. Watson. 1992. *In vitro Methods of Toxicology*. Ed. CRC Press Inc, Boca Raton, Florida.
- Salyers A. A. y D. D. Whitt. 1994. *Bacterial pathogenesis a molecular approach*. ASM press. Washington USA.
- Sánchez O. S. 1980 *Flora del valle de México*. Tomo I. Cuarta edición. Editorial Herrera.
- Seenivasan Prabuseenivasan, Manickkam Jayakumar, Sayarimuthu Ignacimuthu Actividad antibacteriana in vitro de algunos aceites esenciales de plantas. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2006; 6: 39-39.
- Senanayake *et al.*, 1978). Senanayake, U. M., T. H. Lee, R. B. H. Wills, 1978. Volatile constituents of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oils. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 26: 822-824.

Sen-Sung Cheng, Ju-Yun Liu, Ed-Haun Chang and Shang-Tzen Chang. Bioresource Technology. Volume 99, Issue 11, July 2008, Pages 5145-5149. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi

Shaik Mahaboob Ali, Aleem A Khan, Irshad Ahmed, M Musaddiq, Khaja S Ahmed, H Polasa¹, L Venkateswar Rao¹, Chittoor M Habibullah, Leonardo A Sechi and Niyaz Ahmed. Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2005, **4**:20 doi:10.1186/1476-0711-4-20.

Shu-Wei Yang, Tze-Ming Chan, Joseph Terracciano, Eric Boehm, Reena Patel, Guodong Chen, David Loebenberg, Mahesh Patel, Vincent Gullo, Birendra Pramanik, and Min Chu. Caryophyllenes from a Fungal Culture of *Chrysosporium pilosum*. *J. Nat. Prod.* 2009, **72**, 484–487.

Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59 (2), 201– 222.

Soberón-Chávez G. B Palmeros. 1994 *Pseudomonas* lipases: Molecular genetics and potential industrial applications. *Critical Rev. Microbiol.* 20: 95-105.

Sook-Jin Lee, Je-Ik Han, Geun-Shik Lee, Mi-Jin Park, In-Gyu Choi, Ki-Jeong Na, And Eui-Bae Jeung. *Biol. Pharm. Bull.* 30(1) 184—188 (2007).

Susana A. Zacchino, Silvia N. López, Germán D. Pezzenati, Ricardo L. Furlaín, Carina B. Santecchia, Lorena Muñoz, Fernando A. Giannini, Ana M. Rodríguez, and Ricardo D. Enriz. *In Vitro* Evaluation of Antifungal Properties of Phenylpropanoids and Related Compounds Acting Against Dermatophytes. *Journal of Natural Products*, 1999, Vol. 62, No. 10.

Thoroski, J., Blank, G., Biliaderis, C., 1989. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection* 52 (6), 399– 403.

Velázquez G. C. 1997. Estudio fitoquímico y actividad antimicrobiana de *Tiquila canescens*. Tesis U.A.N.L.

Verástegui M. 1998. Bioautografía para detectar la actividad Antimicrobiana de extractos de plantas. *Revista Sociedad Química de México*. Vol. 42.

- Villareal S. D. 1987. Estudio fitoquímico y actividad biológica de *Cassia greggii*. Tesis U.A.N.L.
- Wendakoon, C.N., Sakaguchi, M., 1993. Combined effect of sodium chloride and clove on growth and biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract. *Journal of Food Protection* 56 (5), 410– 413.
- World Health Organization-Antimicrobial resistance. Fact sheet N°194. Revised January 2002. [Consultado 19 agosto 2006]. Disponible en: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/print.html.
- World Health Organization-Antimicrobial resistance. Fact sheet N°194. Revised January 2002. [Consultado 19 agosto 2006]. Disponible en: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/print.html
- Wren R. C. 1994. Enciclopedia de medicina Herbolaria preparados Botánicos. Tomo 1. Editorial Grijalvo.
- Zapata, G. J. S. 1982. Cultivo de tejidos in vitro para el estudio del patrón de crecimiento basado en la microflora celular. Tesis de Licenciatura de la F.C.B. de la U.A.N.L.
- Zhang WJ, Chen BT, Wang CY, Zhu QH, Mo ZX. Mechanism of quercetin as an antidiarrheal agent. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*. 2003;23(10):1029-31.
- Zhou H. Hamazaki A. Fontana JD. Takahashi H. Esumi T. Wandscheer CB. Tsujimoto H. Fukuyama Y. New ring C-seco limonoids from Brazilian *Melia azedarach* and their cytotoxic activity. *J Nat Prod*. 2004 Sep; 67(9):1544-7.

13. APÉNDICES

13.1. Preparación de reactivos y soluciones de trabajo

Rojo de fenol al 1 %

Se disuelve 1.0 g del colorante rojo de fenol en 6 mL de NaOH 1N y se afora la solución a 100 mL con agua desionizada. Se filtra la solución en papel filtro Whatman No. 1. Almacenar a -20°C en un frasco de borosilicato con tapón de rosca.

Amortiguador de pH isotónico de TRIS (TD)

NaCl 8 g, KCl 3.75 g, Na₂HPO₄ 0.1 g, trizma base 3 g. Se disuelven los componentes en 90 mL de agua desionizada, se le añaden 30 mL de HCl 1 N, se afora a un volumen de 1000 mL con agua desionizada, esterilizar en autoclave. Almacenar a temperatura ambiente distribuída en alícuotas de 100 mL en frascos de borosilicato con tapón de rosca (pH 7.4).

Tripsina al 2.5 %

Se disuelven 2.5 g de tripsina 1:250 Difco en 100 mL de agua desionizada estéril y se deja agitando suavemente toda la noche a 4 °C con un agitador magnético. Se filtra la solución en un papel filtro Whatman No. 1 con un embudo Büchner (o se hace pasar a través de varios filtros de poro pequeño), se esteriliza por filtración con filtros de 0.22 µm. Almacenar a - 20 °C en alícuotas de 10 mL.

Tripsina al 0.25 %

Se mezclan 10mL de tripsina al 2.5 % en vasos de presipitados con 0.6 mL de rojo de fenol al 1 % de la solución de antibióticos (100X) y 90n mL de TD. Enseguida se esteriliza la solución por filtración (filtro de 0.22 µm). Almacenar a - 20 °C en alícuotas de 5 mL.

Se incuban un tubo de cada lote elegido al azar por tres días a 36 °C para cerciorarse de su esterilidad. Se toma 1 mL de la tripsina al 0.25 % y se inocula un tubo con PEHPS con suero para la prueba de esterilidad y se deja incubando toda la noche.

PBS

NaCl 8 g, KCl 0.2 g, K₂HPO₄ 1.44 g, KH₂PO₄ 0.24 g. Se disuelven los componentes en 900 mL de agua mili Q, se ajusta el pH a 7.4 con HCl 1 N o con NaOH 1N, se afora a un volumen de 1000 mL con agua mili Q, esterilizar en autoclave. Almacenar a temperatura ambiente distribuída en alícuotas de 100 mL en frascos de borosilicato con tapón de rosca.

Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio MTT a 2mg/mL

Se pesan 0.02 g de MTT de RESEARCH ORGANICS y se disuelven en 10 mL de SSB. Esterilizar por filtración con filtros de 0.22 µm y se coloca en un tubo de vidrio estéril. Almacenar a -20 °C, cubierto con papel de aluminio para protegerlo de la oxidación catalizada por la luz.

Isopropanol ácido

Se mezclan 160 µl de HCl 0.04 M con 49.84 mL de isopropanol. Almacenar a temperatura ambiente.

Metasulfato de fenazina a 3.5 mg /mL (PMS)

Se pesan 0.035 g y se disuelven en 10 mL de agua desionizada. Se esteriliza por filtración con filtros de 0.22 µm y se coloca en un tubo de vidrio estéril. Almacenar a -20 °C, cubierto con papel de aluminio para protegerlo de la oxidación catalizada por la luz.

Pruebas químicas

Insaturaciones

Prueba del Br/ CCl₄: Se disuelven 1-2 mg de la muestra en 1 mL de CCl₄ y se agrega gota a gota una solución al 2% de bromo en CCl₄, si se observa decoloración de la solución, la prueba es positiva.

Prueba del KMnO_4 : se disuelven 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua, acetona o metanol; posteriormente se añade gota a gota una solución de KMnO_4 al 2% en agua; la prueba es positiva si se observa decoloración o formación de un precipitado café, resultado de la formación de bióxido de manganeso.

Oxhidrilos fenólicos

Prueba del FeCl_3 : Se disuelven 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua o etanol después se le añaden unas gotas de cloruro férrico al 12.5% en agua; la aparición de un precipitado rojo, azul violeta o verde se considera positivo. En algunas ocasiones, para hacer más sensible la determinación, es necesario utilizar una solución no acuosa de cloruro férrico a la que se le añade una base débil, como por ejemplo una combinación de piridina - cloroformo.

Esteroides y triterpenos

Prueba de Liebermann-Buchard: Se disuelve una pequeña muestra en cloroformo para añadir el reactivo que se prepara agregando una gota de ácido sulfúrico en una mezcla de anhídrido acético con 1 mL de cloroformo; la aparición de cualquier color en el lapso de 1 hora determina que la prueba es positiva.

Cumarinas

Se disuelven 1-2 mg de la muestra en una solución de NaOH al 10%; si aparece una coloración amarilla que desaparece al acidular, la prueba es positiva.

Sesquiterpenlactonas

Prueba de Baljet: Se utilizan dos soluciones que se mezclan en iguales volúmenes antes de usarse. Solución A: 1g de ácido pícrico en 100 mL de etanol; solución B: 10 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua. Para la prueba se ponen 2-3 mg de compuesto y de 3 a 4 gotas del reactivo, siendo positiva si se forma una coloración naranja o roja oscura.

Flavonoides

Prueba de Shinoda: La muestra disuelta en etanol, se trata con limaduras de magnesio se aplica calor (60°C) y después unas gotas de ácido clorhídrico concentrado, se considera positiva la prueba si se presentan colores naranja, rojo, rosa-azul y violeta.

Alcaloides

Prueba de Dragendorff: El reactivo utilizado consta de dos soluciones: Solución A: 5 mL de subnitrito de bismuto al 1.6% en ácido acético al 20%. Solución B : 5 mL de yoduro de potasio al 40% y 20 mL de ácido acético aforando a 100 mL con agua destilada. Se disuelven 1-2 mg de la muestra en etanol y se colocan unas gotas en una placa de porcelana, luego se le añaden unas gotas del reactivo de Dragendorff; la prueba se considera positiva si aparece un precipitado naranja marrón. (Quintanilla, 1998; Velázquez, 1997; Villareal, 1987)

13.2. Resumen curricular

Beatríz Padrón Márquez

Candidata para el Grado de
Doctora en Ciencias con Acentuación en
Química de Productos Naturales

Tesis: COMPONENTES QUÍMICOS CON ACTIVIDAD BACTERICIDA, FUNGICIDA Y CITOTÓXICA DE PLANTAS DE LA FAMILIA MYRTACEAE Y LAURACEAE

Campo de Estudio: Ciencias Biológicas.

Datos Personales: Nacida Monterrey, Nuevo León el 15 de abril de 1977, hija de Yolanda Márquez Urbina y Francisco Padrón Grimaldo

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 1998.

Maestra de licenciatura en la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL (2000-2004)

Participación como instructora del curso “Introducción a las técnicas de cromatografía en capa fina “con duración de 20 horas del 8-12 de julio de 2002.

Reconocimiento por obtener el 2º lugar en el trabajo de investigación de la categoría básicos orales con el título “Actividad bactericida y citotóxica de compuestos químicos de la familia Myrtaceae y Lauraceae” presentado en el XXI Congreso Nacional de Investigación Biomédica, llevado a cabo del 22 al 24 de octubre de 2003.

Publicación del artículo “Identificación de compuestos de *Melia azedarach*, *Syzygium aromaticum* y *Cinamomum zeylanicum* con efecto inhibitorio sobre bacterias y hongos”. Beatríz Padrón Márquez, Azucena Oranday Cárdenas, Catalina Rivas Morales, María Julia Verde Star.. Revista Ciencia UANL.2003. Vol VI(3):333-338. Este artículo ha sido citado por al menos 5 autores de trabajos relacionados con el tema.

IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DE *MELIA AZEDARACH*, *SYZGIUM AROMATICUM* Y *CINNAMOMUM ZEYLANICUM* CON EFECTO INHIBITORIO SOBRE BACTERIAS Y HONGOS

BEATRIZ PADRÓN MÁRQUEZ, AZUCENA ORANDAY CÁRDENAS, CATALINA RIVAS MORALES, MARÍA JULIA VERDE STAR*

En la actualidad, las enfermedades gastrointestinales son frecuentes en la población. En la literatura internacional aparece información cada vez más inquietante sobre la elevada frecuencia de enfermedades infecciosas por estafilococos penicilinorresistentes y por bacilos Gram-negativos pertenecientes las enterobacterias, muchos de éstos aunque forman parte de la flora intestinal, al igual que hongos que normalmente no son patógenos, pueden serlo de forma oportunista e incluso causar infecciones fatales cuando las defensas normales del huésped son insuficientes.¹

En otro tiempo las plantas eran la base principal para la preparación de medicamentos y, en vista de la gran resistencia de los microorganismos a los fármacos ya existentes, pueden seguir siendo la fuente principal de principios activos.

La importancia de los productos naturales en medicina se basa no solamente en sus efectos farmacológicos o quimioterapéuticos sino en la posibilidad que ofrecen para poder desarrollar a partir de sus estructuras nuevas drogas.² Sin embargo, tantos años de terapéutica antibiótica han producido profundas modificaciones de la microflora patógena, sobre todo en el ambiente hospitalario, donde el uso continuo de fármacos antibacterianos ha favorecido la selección de las cepas menos sensibles o de las cepas portadoras de resistencia contra uno o más antibióticos, y la toxicidad selectiva de los ya existentes se ve limitada por la similitud de las estructuras eucarióticas de los hongos filamentosos y levaduras con células del organismo;^{3,4} por lo cual es necesaria la búsqueda constante de nuevos fár-

macos antibióticos que contrarresten la resistencia de los microorganismos a los ya existentes.

Metodología

Este trabajo fue realizado en los laboratorios de Química Analítica y Química de Productos Naturales del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Material microbiológico

Cepas bacterianas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi* y *Enterobacter aerogenes*.

Cepas fúngicas: *Trichophyton tonsurans*, *Cryptococcus neoformans* y *Sporotrix schenckii*.

Material vegetal:

Familia:

Meliaceae

Myrtaceae

Lauraceae^{5,6}



* Laboratorios de Química Analítica y Productos Naturales del Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. E-mail: beatrizpadron@hotmail.com

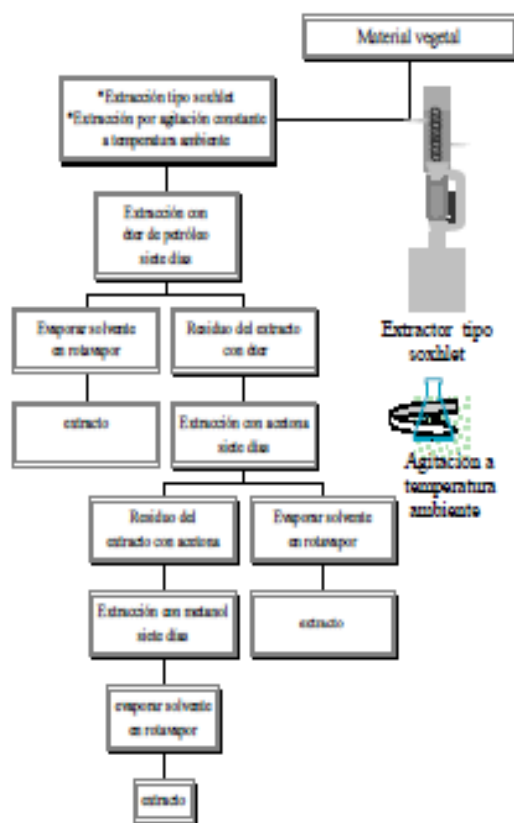


Fig.1 Metodología de obtención de los extractos.

Preparación del material vegetal y obtención de los extractos

Las hojas de *Melia azedarach* (canelo) fueron recolectadas al sur del área metropolitana de Monterrey, N. L., en agosto de 1998, se secaron a la sombra durante ocho días; *Syzygium aromaticum* (clavo) y *Cinnamomum zeylanicum* (canela) se compraron en el mercado Juárez de Toluca en el estado de México en septiembre del mismo año, posteriormente se dejó un espécimen de cada planta en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, donde fueron identificadas y se les otorgaron los números de herbario 023492, 023493 y 023494, respectivamente. Después fueron molidas cada una por separado en un molino, para extraerse después por medio de dos técnicas: maceración a temperatura ambiente y extracción continua tipo soxhlet (Fig. 1).

Pruebas microbiológicas

Se utilizó el medio líquido C. Rivas (patente en trámite No. 9810892) para la activación de las cepas bacterianas, incubándolas por 18-24 h a 37°C; los hongos fueron activados en caldo Saboraud modificado (patente en trámite No. 9810892) con un tiempo de incubación de dos días para *C. neoformans* y de 7-15 días para *T. tonsurans* y *S. schenckii*.

Para evaluar la actividad antimicrobiana de cada uno de los extractos se utilizó el método de difusión en placa de agar y los medios de cultivo antes mencionados; se colocaron 100 µl del inóculo con una micropipeta Eppendorf (estandarizado a 6×10^6 UFC por el método turbidimétrico de Mac Farland) difundiendo homogéneamente con un asa Driblasky, luego se colocaron discos de papel filtro impregnados con 10 ml del extracto (previamente estéril con membranas de nitrocelulosa con un poro de 0.45 µl) y un control negativo con etanol, después se incubaron durante 18-24 h a 37°C (bacterias) y a temperatura ambiente de 2-15 días (hongos). Después de este periodo se midió el halo de inhibición formado.⁷

Separación cromatográfica de los extractos activos

Se realizaron cromatografías en capa fina, usando como adsorbente Sílica Gel 7 G, en una proporción de 10 g de Sílica en 40 ml de agua, la mezcla anterior se vertió sobre placas de vidrio previamente desengrasadas, se les dejó secar al aire y enseguida se activaron en una estufa durante 1 h a 115°C. Luego, mediante un capilar, se distribuyó una porción del extracto y se dejó evaporar el solvente para efectuar el corrimiento dentro de una cámara de vidrio con la mezcla de solventes elegidos, los solventes con los que se logró una mejor separación cromatográfica fueron el éter de petróleo, el benceno y la acetona mezclados en diferentes proporciones entre sí o con otros solventes. Para localizar los componentes que no son apreciables al visible, se usaron luz UV y vapores de yodo, se marcaron y se les tomó el Rf a cada uno.⁸

Evaluación de las fracciones activas

Se utilizó una técnica de bioautografía modificada, la cual puede detectar concentraciones mínimas del

compuesto responsable de la actividad biológica y se observa a simple vista la zona de inhibición.^{9, 10}. Para esto se hicieron cromatogramas en capa fina utilizando placas de vidrio de 2.5 x 7.5 cm con las manchas ya localizadas. Se colocó el cromatograma en una caja petri y se esterilizó con luz UV por dos horas; después de esto bajo el mechero se colocó un trozo largo, angosto y de unos 3 mm de espesor de medio sólido C. Rivas (se colocó un algodón húmedo a un lado del cromatograma para evitar la deshidratación del medio). Luego se sembró el microorganismo con una micropipeta y se distribuyó uniformemente con una asa bacteriológica. Se incubó durante el tiempo necesario para cada microorganismo y se midió el área sin crecimiento microbiano.^{7, 9}

Identificación de grupos funcionales

A los extractos se les realizaron las siguientes pruebas químicas para determinar su naturaleza química: Shinoda (flavonoides), esteroides y terpenoides (Liebermann- Buchard), alcaloides (Dragendorff), Insaturaciones (Br_2/CCl_4), oxhidrilos fenólicos ($FeCl_3$ 5%), cumarinas (NaOH 10%) y sesquiterpenolactonas (Baljet).^{11, 12, 13} Se separó la fracción activa utilizando CCF preparativa con placas de 20 x 20 cm y sílica gel 7 G como soporte, esta fracción se raspó de la sílica, se resuspendió en etanol, se centrifugó, se decantó el líquido con la fracción y se le realizó un análisis espectroscópico (IR) para confirmar la presencia de esteroides.

Resultados

Los resultados obtenidos que se muestran en la tabla I indican que de los extractos del canelo (*Melia azedarach*) el etéreo en soxhlet (1.1) presentó una fuerte actividad antimicrobiana contra *S. typhi*, *B. cereus* y el acetónico en soxhlet (2.1), inhibió fuertemente a *T. tonsurans*; se observó menor actividad de los extractos de mayor polaridad y por el método de maceración, en el metanólico por agitación (3.2) se observa una actividad casi nula.

Se comprobó la efectividad contra todos los microorganismos probados con los extractos de canela (*C. zeylanicum*) excepto los realizados con metanol por los dos métodos; *Bacillus cereus* y *Trichophyton tonsurans* fueron los más sensibles con los extractos etéreo y acetónico por agitación; los

menos sensibles *Salmonella typhi* y *Cryptococcus neoformans* (tabla II).

Tabla I. Actividad biológica de los extractos de *Melia azedarach* (canelo)

| Microorganismos | Número de extracto | | | | | |
|--------------------------------|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1.1 | 1.2 | 2.1 | 2.2 | 3.1 | 3.2 |
| <i>Escherichia coli</i> | - | - | ++ | + | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | + | - | - | + | ++ | - |
| <i>Salmonella typhi</i> | +++ | - | +++ | - | ++ | - |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | - | ++ | - | - | - | - |
| <i>Bacillus cereus</i> | +++ | - | +++ | - | ++ | - |
| <i>Trichophyton tonsurans</i> | - | - | +++ | ++ | + | - |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | ++ | ++ | + | + | - | ++ |
| <i>Sporotrix schenckii</i> | - | - | + | + | - | - |

1.1, 2.1, 3.1= extractos hechos en soxhlet con éter de petróleo, acetona y metanol, respectivamente.

1.2, 2.2, 3.2= extractos hechos en agitación continua a temperatura ambiente con éter de petróleo, acetona y metanol, respectivamente.

N=3 + halo de hasta 20mm, ++ halo de 20-30 mm, +++ halo > 30mm, + fungistático o bacteriostático

Por otra parte, los realizados con clavo (*Syzygium aromaticum*) presentaron inhibición tanto en los extractos no polares como con los polares por los dos métodos excepto contra *E. aerogenes* que sólo fue fuertemente afectado por el etéreo con soxhlet (7.1), como se puede observar en la tabla No. 3 los extractos de éter de petróleo y acetona tuvieron una actividad relevante contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus cereus*, *Trichophyton tonsurans*, *Cryptococcus neoformans* y *Sporotrix schenckii*.

En las pruebas químicas de los extractos más activos se observó que la mayoría de los extractos activos fueron positivos para flavonoides, cumarinas y oxhidrilos fenólicos. El extracto más activo (canela soxhlet -éter de petróleo) fue positivo para las pruebas de Liebermann- Burchard (para esteroides y triterpenoides), de shinoda (para flavonoides) y de dragendorff (para alcaloides).

Los extractos de *C. zeylanicum* con éter de petróleo con soxhlet (4.1) y el *S. aromaticum* con éter de petróleo con agitación (7.2) presentaron el ma-

por número de fracciones con actividad y el extracto 4.1 sobre mayor cantidad de microorganismos tanto bacterias como hongos.

Tabla II. Actividad biológica de los extractos de *Cinnamomum zeylanicum* (canela)

| Microorganismos | Número de extracto | | | | | |
|--------------------------------|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 4.1 | 4.2 | 5.1 | 5.2 | 6.1 | 6.2 |
| <i>Escherichia coli</i> | +++ | + | ++ | ++ | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | +++ | + | - | +++ | - | - |
| <i>Salmonella typhi</i> | - | ++ | + | ++ | - | + |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | +++ | +++ | - | + | - | + |
| <i>Bacillus cereus</i> | +++ | + | + | +++ | - | ++ |
| <i>Trichophyton tonsurans</i> | +++ | +++ | +++ | +++ | - | - |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | + | ++ | ++ | + | ++ | - |
| <i>Sporozyia schenckii</i> | +++ | +++ | ++ | +++ | - | - |

4.1, 5.1, 6.1= extractos hechos en soxhlet con éter de petróleo, acetona y metanol, respectivamente.

4.2, 5.2, 6.2= extractos hechos en agitación continua a temperatura ambiente con éter de petróleo, acetona y metanol, respectivamente.

N=3 + halo de hasta 20mm, ++ halo de 20-30 mm, +++ halo > 30mm, + fungistático o bacteriostático

Tabla III. Actividad biológica de los extractos de *Syzygium aromaticum* (clavo)

| Microorganismos | Número de extracto | | | | | |
|--------------------------------|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 7.1 | 7.2 | 8.1 | 8.2 | 9.1 | 9.2 |
| <i>Escherichia coli</i> | ++ | - | ++ | ++ | - | + |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | + | +++ | + | + | + | + |
| <i>Salmonella typhi</i> | ++ | + | - | ++ | - | ++ |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | +++ | ++ | + | - | + | + |
| <i>Bacillus cereus</i> | ++ | - | ++ | +++ | - | + |
| <i>Trichophyton tonsurans</i> | +++ | - | +++ | +++ | +++ | +++ |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | +++ | + | ++ | + | +++ | ++ |
| <i>Sporozyia schenckii</i> | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ |

7.1, 8.1, 9.1= extractos hechos en soxhlet con éter de petróleo, acetona y metanol, respectivamente.

7.2, 8.2, 9.2= extractos hechos en agitación continua a temperatura ambiente con éter de petróleo, acetona y metanol, respectivamente.

N=3 + halo de hasta 20mm, ++ halo de 20-30 mm, +++ halo > 30mm, + fungistático o bacteriostático

Discusión

Los extractos de las hojas de *M. azedarach*, corteza de *C. zeylanicum* y los capullos de *S. aromaticum* mostraron inhibición del crecimiento al menos uno de los microorganismos probados. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Hamer-Schmidt y cols.(1993)¹⁷ en *C. zeylanicum* y *S. aromaticum*, quienes también observaron mayor inhibición en hongos que en bacterias.¹⁴ En este trabajo se encontró que *B. cereus* fue el más sensible y *E. aerogenes* el menos, los mismos resultados obtuvo Sánchez, (1995).³ *M. azedarach* presenta actividad contra diferentes microorganismos,⁴ en este trabajo el extracto etéreo en soxhlet (1.1) presentó actividad contra *S. typhi* y *B. cereus* al igual que el acetónico que además inhibió a *T. tonsurans* contrario a lo esperado, puesto que el calor es considerado como un agente destructor de algunos principios y sólo se ha reportado actividad bactericida en los extractos acuosos de los frutos.⁶ En *C. zeylanicum* no hubo diferencia significativa entre ambos métodos, pero sí hubo una disminución de la actividad conforme se aumenta la polaridad del solvente; *C. zeylanicum* es igualmente activo sobre hongos y bacterias con los extractos etéreos por agitación y soxhlet (4.1, 4.2) y el acetónico por agitación (5.2). Sánchez, (1995)³ trabajó con extractos etanólicos de *C. zeylanicum* y *S. aromaticum* donde reportó una fuerte inhibición de *B. cereus* y *S. aureus*, resultados similares a los mostrados por los extractos 4.1, 5.2, 7.2 y 8.2. *S. aromaticum* es moderadamente activo sobre bacterias y mayor en hongos, esta actividad también se ha publicado por Hammer-Schmidt, (1993)¹⁷ y por P. Hilli en 1997.¹⁴ Se encontraron flavonoides en *C. zeylanicum* en el extracto etéreo por ambos métodos de extracción, al igual que Aguilar, (1982)⁵ reportó flavonoides en esta misma especie; además dieron positivas las pruebas para alcaloides, triterpenoides y esteroides en el extracto etéreo en soxhlet, este último grupo se confirma con el espectro infrarrojo, la fracción activa presenta absorciones características de OH en 3438 cm⁻¹, en 2920 cm⁻¹ para C-H y en 1098 cm⁻¹ característico de C-O.

En *S. aromaticum* en el extracto etéreo encontramos flavonoides y en el extracto metanólico esteroides, como reportó Wren, (1994);⁶ además encontramos cumarinas y alcaloides en el extracto acetónico con agitación y oxhidrilos fenólicos en

todos sus extractos por ambos métodos, los compuestos fenólicos ya habían sido mencionados por Coleman & Anderson, (1985)¹⁵ como respuesta de las plantas en asociaciones incompatibles entre planta y hongo.

En *Melia azedarach* se ha reportado la presencia de alcaloides Aguilar, (1993)¹⁰ triterpenoides y esteroides Wren, (1994)⁶, los cuales no fueron detectados con las pruebas químicas realizadas. Se encontró presencia de flavonoides y cumarinas en el extracto etéreo por soxhlet.

De los 11 extractos activos que se obtuvieron la mejor separación se llevó a cabo con éter de petróleo, benceno y acetona, en la mayoría de ellos.

El extracto etéreo de *C. zeylanicum* por el método de soxhlet mostró una actividad relevante sobre *E. coli*, *S. aureus*, *E. aerogenes*, *B. cereus*, *T. tonsurans* y *S. schenckii*, en cuatro fracciones separadas por CCD con Rf de 0.52, 0.59, 0.64 y 0.82, lo cual indica que el extracto no polar contiene compuestos con actividad biológica de amplio espectro que en concentraciones muy pequeñas pudieron ser detectadas por el método de bioautografía modificado por Verástegui (1999)¹¹, lo cual concuerda con reportes de Oranday (1998)¹⁶ sobre compuestos no polares extraídos de plantas que tienen esta actividad.

Conclusiones

El método de extracción en soxhlet para *Melia azedarach* fue mejor que el método de agitación, la diferencia no es significativa en las otras dos plantas.

El extracto etéreo en soxhlet de *M. azedarach* presentó actividad relevante sobre *S. typhi* y *B. cereus* y dio positiva para las pruebas de flavonoides y cumarinas; en el acetónico contra *S. typhi*, *B. cereus* y *T. tonsurans*. Por separación cromatográfica del extracto etéreo en soxhlet obtuvimos 11 fracciones con un eluyente de éter de petróleo-benceno-acetona (40:20:5), las cuales por el método de bioautografía mostraron actividad sobre *S. typhi* y *B. cereus*, mientras que en el extracto acetónico en ninguna de las fracciones se observó actividad inhibitoria.

S. aromaticum fue la especie que presentó mayor actividad contra todos los microorganismos estudiados aún con los extractos metanólicos. El extracto etéreo con soxhlet dio pruebas positivas para flavonoides, insaturaciones, oxhidrilos fenólicos y cumarinas.

Al realizar el corrimiento cromatográfico de este extracto con éter de petróleo y metanol (30:5), se obtuvieron cinco fracciones, que evaluadas por el método bioautográfico, dos de ellas presentaron actividad considerable contra el 50 % de los microorganismos probados.

El extracto etéreo de *C. zeylanicum* por soxhlet (4.1) y el extracto acetónico por agitación (5.2) inhibieron a la mayoría de los microorganismos probados. El etéreo dio positivo para las pruebas de flavonoides, alcaloides, esteroides y triterpenoides.

La separación cromatográfica de dicho extracto se llevó a cabo con éter de petróleo-benceno-acetona (40:20:5) y dio 12 fracciones de las cuales cuatro presentaron actividad por el método de bioautografía en los microorganismos probados, excepto contra *S. typhi*.

El extracto etéreo de *C. zeylanicum* fue el que presentó la mayor actividad de todos los extractos probados.

Resumen

Se hicieron preparaciones de extractos, pruebas microbiológicas contra ocho microorganismos y caracterización de los compuestos activos de seis extractos obtenidos por dos métodos de extracción, de *Melia azedarach*, *Syzygium aromaticum* y *Cinnamomum zeylanicum*, teniendo como objetivos comparar la eficacia de las técnicas de extracción, y evaluar la actividad antimicrobiana de estas plantas, partiendo del antecedente de que son utilizadas como remedios caseros. Se observó mayor actividad en el extracto etéreo de *Cinnamomum* con soxhlet; encontrando flavonoides, alcaloides, triterpenos y esteroides. Se localizaron las bandas con actividad y se confirmó la presencia de esteroides por medio del espectro infrarrojo.

Palabras clave: Meliaceae, Myrtaceae, Lauraceae, Patógenos gastrointestinales, Dermatofitos.

Abstract

Six plant extracts of *Melia azedarach*, *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum*, respectively, were made, extracts being obtained through two methods. Microbiological tests against eight microorganisms and active compound characterization were performed. Our aim was to compare the

effectiveness of two extraction methods and to evaluate these plants' activity because of reports of their being used as home remedies. Higher activity was observed in ether extracts of *Cinnamomum* by Soxhlet, which had flavonoids, alkaloids, triterpenes and esters. Active bands were found and esterol presence was confirmed through infrared spectroscopy.

Keywords: Meliaceae, Myrtaceae, Lauraceae, Gastrointestinal and dermatophyte pathogens.

Referencias

- Ríos J. L., Recio M.C. and Villar A. 1988. Screening Methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, No. 23. pp 127-149.
- Becker J. M., Covert N.L., Shebagamurthi., Steinfeld A.S. and Naider F. 1983. Polyoxin D Inhibits Growth of Zoopathogenic Fungi. *American Society for Microbiology*. Vol 23. No. 6. pp 926-929.
- Sánchez G. C. 1995. Efecto de extractos de 33 plantas sobre el crecimiento de 11 especies bacterianas causantes de enfermedades gastrointestinales. Tesis F.C.B., UANL, pp 7-30.
- Watt J. M., Breyer-B. M. G. 1962. *Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa*. Editorial Livingstone. pp 745-751.
- Aguilar C. A., Zolla C. 1982. *Plantas tóxicas de México*. Talleres de La Fuente Impresores. pp 146-147.
- Wren R. C. 1994. *Enciclopedia de medicina Herbolaria preparados Botánicos*. Tomo 1 y 2. Editorial Grijalvo.
- Jawetz. 1990. *Microbiología médica*. Editorial Manual Moderno. 13ª edición. Cap. 3-7
- Muñoz M. 1981. *Prácticas de instrumentación analítica III*. Editorial LIMUSA. Primera edición. pp 42-44.
- Symonds N. 1972. La resistencia bacteriana. *C. M. A. Journal*. pp. 105, 587.
- Verástegui M. 1998. Bioautografía para detectar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas. *Revista Sociedad Química de México*. Vol. 42.
- Villarreal S. D. 1987. Estudio fitoquímico y actividad biológica de *Cassia greggii*. Tesis F.C.B., UANL, pp 12 - 16.
- Quintanilla L. G. 1998. Contribución al estudio fitoquímico y efecto fisiológico de *Abutilon malacum*. Tesis F.C.B., U.A.N.L. pp 7-20
- Velázquez G. C. 1997. Estudio fitoquímico y actividad antimicrobiana de *Tiquila canescens*. Tesis F.C.B., U.A.N.L. pp 12 -14.
- Hilli P., Evans C. S. y Veness R. G. 1997. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *The Society for applied bacteriology*. Vol. 24. pp 269-275.
- Coleman, M.E. y Anderson, A.J. 1985. Plant Responses to *Rizopogon vinicolor* elicitora. *Phytopatol*. Vol. 75. 1283. (Abstract).
- Oranday C. A. 1998. *Compuestos de algas marinas del estado de Tamaulipas y su actividad farmacológica*. Tesis Facultad de Medicina, U.A.N.L. pp 102.
- Hammerschmidt, P.J., Clark, A.M. and Soliman, F.M. 1993. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Jasonia candicans* and *Jasonia montana*. *Planta Medica* Vol. 59. pp 68-78.