

30377  
1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

ESTUDIO FITOQUÍMICO Y ANTIBACTERIANO DE  
*Prosopis laevigata* (H.B. ex Wild), MEZQUITE  
DE ZAPOTITLÁN SALINAS, PUEBLA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
(**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**)

P R E S E N T A

**BIOL. ANA MARÍA GARCÍA BORES**

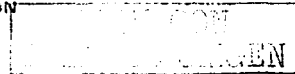
DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA DOLORES DÁVILA ARANDA

MÉXICO, D.F.



FEBRERO, 2003

COORDINACIÓN



A



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**PAGINACION**

**DISCONTINUA**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN


Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 18 de noviembre de 2002, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **García Bores Ana María**, con número de cuenta 93635297, y número de expediente 3991056, con la tesis titulada: "Estudio fitoquímico y antibacteriano de *Prosopis laevigata* (H.B. ex Wild), mezquite, de Zapotitlán Salinas, Puebla.", bajo la dirección de la **Dra. Patricia Dolores Dávila Aranda**.

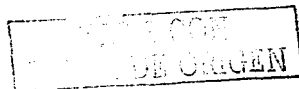
Presidente:	Dra. María Cristina Pérez-Amador y Barrón
Vocal:	Dr. Manuel Jiménez Estrada
Secretario:	Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo
Suplente:	Dra. Patricia Dolores Dávila Aranda
Suplente:	M. en C. José Guillermo Avila Acevedo

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 3 de diciembre de 2002

  
Dra. Tila María Pérez Ortiz  
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado



El desarrollo experimental de este trabajo se llevó a cabo en el Instituto de Química y en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Patricia Dávila Aranda y con la asesoría del Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo y la Dra. Cristina Pérez-Amador y Barrón como miembros del Comité Tutoral.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca-crédito otorgada durante la realización de mis estudios de posgrado.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

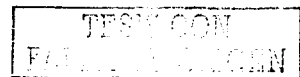
## **DEDICATORIAS**

**A mi hijo, Juan Antonio Reyes García**

**A mis padres, Carmen Bores y Juan Manuel García**

**A mis hermanas, Rocío, Mari Carmen y Ana bel**

**A mi sobrina, Montserrat del Carmen**

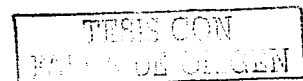


## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo por su invaluable ayuda en la realización del presente trabajo.

Al Dr. Manuel Jiménez Estrada y al Dr. José Guillermo Avila Acevedo por el apoyo que me brindaron en durante el desarrollo de la tesis

A las maestras M en C Amira Arciniegas, M en C Ana Lidia Pérez y M en C Ema Maldonado por sus valiosas enseñanzas así como su paciencia

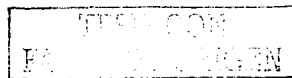


# Índice

	Página
Índice de tablas .....	IV
Índice de figuras .....	VI
Índice de gráficas .....	VII
Índice de espectros .....	VII
Lista de abreviaturas .....	VIII
Resumen .....	XI
1. Introducción .....	1
2. Antecedentes .....	4
2.1. Género <i>Prosopis</i> .....	4
2.1.1. Utilización del mezquite como alimento .....	6
2.1.2. Uso forrajero del mezquite .....	8
2.1.3. Uso forestal del mezquite .....	9
2.1.4. Importancia ecológica del mezquite .....	10
2.1.5. Usos del mezquite en la medicina tradicional .....	11
2.1.6. Antecedentes fitoquímicos y actividad biológica del género <i>Prosopis</i> .....	11
2.2. <i>Prosopis laevigata</i> (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M.C. Johnston .....	14
2.2.1. Zapotitlán Salinas .....	14
2.2.2. Descripción morfológica de la especie .....	16
2.2.3. Distribución .....	17
2.2.4. Antecedentes fitoquímicos de <i>P. laevigata</i> .....	19
2.3. Zonas áridas y defensas de las plantas .....	20
2.3.1. Osmólitos en el estrés hídrico .....	20
2.3.2. Metabolitos secundarios .....	23
2.3.3. Antimicrobianos de origen vegetal .....	27
3. Hipótesis .....	29
4. Objetivos .....	29
4.1. Objetivos Generales .....	29
4.2. Objetivos Particulares .....	30
5. Metodología .....	31
5.1. Trabajo de campo .....	31
5.1.1. Descripción de Zapotitlán Salinas, Puebla .....	31
5.1.2. Colecta del material vegetal .....	32



5.2. Evaluación preliminar de la actividad antibacteriana .....	34
5.2.1. Elaboración de extractos .....	34
5.2.2. Determinación del rendimiento .....	34
5.2.3. Bioensayos preliminares de raíz, tallo y hoja .....	35
5.3. Extractos de hoja .....	35
5.3.1. Actividad antibacteriana de los extractos de hoja .....	37
5.3.1.1. Determinación de la actividad antibacteriana de manera cualitativa .....	37
5.3.1.2. Determinación de la actividad antibacteriana de manera cuantitativa .....	37
5.4. Estudio fitoquímico .....	38
5.4.1. Métodos cromatográficos .....	38
5.4.2. Equipo usado para la determinación de las constantes físicas espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos aislados .....	39
5.4.3. Bioensayos para el fraccionamiento del extracto metanólico .....	40
5.4.4. Fraccionamiento del extracto metanólico de las hojas de <i>P. laevigata</i> .....	41
5.4.4.1. Separación de la fracción P.I.(1) .....	42
5.4.4.2. Separación de la fracción P.I.(2) .....	43
5.4.4.3. Separación de la fracción P.I.(4) .....	44
5.4.4.4. Extracto metanólico de hojas (segundo proceso) .....	45
5.4.5. Fraccionamiento del extracto de acetato de etilo de las hojas de <i>P. laevigata</i> .....	48
6. Resultados .....	50
6.1. Datos de herbario de la planta <i>P. laevigata</i> .....	50
6.2. Evaluación preliminar de la actividad antibacteriana de raíz, tallo y hoja .....	50
6.2.1. Rendimiento de los extractos .....	50
6.2.2. Bioensayos preliminares .....	51
6.3. Extractos de hoja .....	53
6.3.1. Rendimiento .....	53
6.3.2. Actividad antibacteriana de los extractos de hoja .....	53
6.3.2.1. Determinación de la actividad antibacteriana de manera cualitativa .....	53
6.3.2.2. Determinación de la actividad antibacteriana de manera cuantitativa .....	57
6.4. Estudio fitoquímico .....	58
6.4.1. Bioensayos para el fraccionamiento del extracto metanólico .....	58



6.4.1.1. Separación de la fracción P.I. (1) .....	59
6.4.1.2. Separación de la fracción P.I. (2) .....	60
6.4.1.3. Separación de la fracción P.I. (4) .....	61
6.4.1.4. Extracto metanólico segundo proceso .....	61
6.4.2. Principales metabolitos secundarios aislados de las hojas de <i>P. laevigata</i> .....	62
6.4.2.1. Extracto metanólico .....	62
6.4.2.2. Extracto de acetato de etilo .....	69
7. Discusión .....	70
8. Conclusiones .....	74
9. Bibliografía .....	75
Apéndice 1. Determinación del rendimiento .....	83
Apéndice 2. Método de difusión en agar o de Kirby-Bauer .....	84
Apéndice 3. Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) y de concentración bactericida mínima (CBM) .....	88
Apéndice 4. Técnica de microdilución en caldo para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM).....	90
Apéndice 5. Técnica de Bioautografía para el revelado de placas cromatográficas.....	92
Apéndice 6. Espectros .....	94

TESIS COM  
TALLER DE ORIGEN

## Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Prosopis laevigata</i> .....	17
Tabla 2. Respuestas bioquímicas de las plantas a diferentes condiciones de estrés ambiental .....	21
Tabla 3. Concentraciones de las diferentes fracciones obtenidas del extracto metanólico .....	40
Tabla 4. Fraccionamiento del extracto metanólico de las hojas de <i>P. laevigata</i> .....	41
Tabla 5. Fraccionamiento de la fracción P.I.(1) .....	43
Tabla 6. Fraccionamiento de la fracción P.I.(2) .....	44
Tabla 7. Separación por sephadex de la fracción P.I.(3 II) .....	45
Tabla 8. Fraccionamiento del extracto de acetato de etilo de las hojas de <i>P.laevigata</i> .....	48
Tabla 9. Datos de herbario de <i>P. laevigata</i> .....	50
Tabla 10. Rendimiento de los extractos de raíz, tallo y hoja .....	50
Tabla 11. Bioensayos preliminares de los extractos de raíz, tallo y hoja de <i>P. laevigata</i> .....	51
Tabla 12. Rendimiento de los extractos de hoja .....	53
Tabla 13. Bioensayo de difusión en agar (Kirby-Bauer) de los extractos de hoja .....	54
Tabla 14. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) del extracto acuoso y metanólico .....	57
Tabla 15. Evaluación cualitativa (Kirby-Bauer) de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del extracto metanólico .....	59

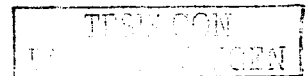


Tabla 16. Evaluación cualitativa (Kirby-Bauer) de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna de la fracción P.I.(1) .....	60
Tabla 17. Evaluación cualitativa (Kirby-Bauer) de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna de la fracción P.I.(2) .....	61
Tabla 18. Desplazamientos químicos en RMN <sup>1</sup> H del pinitol .....	63
Tabla 19. Desplazamientos químicos en RMN <sup>1</sup> H del ácido 4-hidroxi-pipecólico .....	65
Tabla 20. Desplazamientos químicos en RMN <sup>13</sup> C y DEPT del ácido 4-hidroxi-pipecólico .....	66
Tabla 21. Desplazamientos químicos en RMN <sup>1</sup> H de la sacarosa .....	68
Tabla 22. Desplazamientos químicos en RMN <sup>13</sup> C de la sacarosa .....	68

## Índice de figuras

	Página
Figura 1. Distribución geográfica de <i>Prosopis</i> en América (Rzedowski, 1988) .....	5
Figura 2. Vainas del mezquite <i>Prosopis laevigata</i> .....	7
Figura 3. Vainas y hojas de <i>Prosopis juliflora</i> var <i>glandulosa</i> .....	9
Figura 4. Ejemplar de herbario de <i>P. laevigata</i> .....	16
Figura 5. Distribución de <i>P. laevigata</i> y <i>P. juliflora</i> (Rzedowski, 1988) .....	18
Figura 6. Funciones de los metabolitos secundarios de plantas (Modificada de Wink, 1999) .....	24
Figura 7. Ejemplos de la defensa química inducida en plantas .....	25
Figura 8. Aplicación de los metabolitos secundarios en la biotecnología .....	26
Figura 9. Ubicación geográfica de la cuenca hidrográfica de Zapotitlán y el valle del mismo nombre (Barrera, 2001) .....	33
Figura 10. Procedimiento para la extracción de las hojas de <i>P. laevigata</i> .....	36
Figura 11. Procedimiento para la extracción de las hojas de <i>P. laevigata</i> (Segundo proceso).....	47
Figura 12. Patrón de fragmentación del ácido 4-hidroxi-pipecólico .....	67

## Índice de gráficas

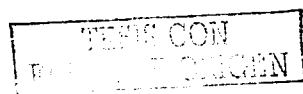
	Página
Gráfica 1. Sensibilidad de <i>B. subtilis</i> y <i>E. coli</i> con los extractos acuoso y metanólico de hojas de <i>P. laevigata</i> .....	52
Gráfica 2. Sensibilidad de las cepas bacterianas con los extractos acuoso y metanólico de hojas de <i>P. laevigata</i> .....	55
Gráfica 3. Sensibilidad de la cepa <i>S. lutea</i> con el extracto metanólico de hojas de <i>P. laevigata</i> .....	56

## Índice de espectros

	Página
Espectro 1. Espectro de IR del pinitol .....	95
Espectro 2. Espectro de RMN <sup>1</sup> H del pinitol .....	96
Espectro 3. Espectro de masas por IE del pinitol .....	97
Espectro 4. Espectro de IR del ácido 4-hidroxi-L-pipecólico .....	98
Espectro 5. Espectro de RMN <sup>1</sup> H del ácido 4-hidroxi-L-pipecólico .....	99
Espectro 6. Espectro de RMN <sup>13</sup> C del ácido 4-hidroxi-L-pipecólico .....	100
Espectro 7. Espectro DEPT del ácido 4-hidroxi-L-pipecólico .....	101
Espectro 8. Espectro COSY del ácido 4-hidroxi-L-pipecólico .....	102
Espectro 9. Espectro HETCOR del ácido 4-hidroxi-L-pipecólico .....	103
Espectro 10. Espectro de masas del ácido 4-hidroxi-L-pipecólico .....	104
Espectro 11. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la sacarosa .....	105
Espectro 12. Espectro de RMN <sup>13</sup> H de la sacarosa .....	106
Espectro 13. Espectro de IR de la cera .....	107

## Lista de abreviaturas

AcOEt	Acetato de Etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Agua- <i>d</i>	Agua deuterada
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
Bac/ml	Bacterias por mililitro
C+	Control positivo
C-	Control negativo
°C	Grados centígrados
C <sub>4</sub>	Fotosíntesis tipo C <sub>4</sub>
CBM	Concentración Bactericida Mínima
ccf	Cromatografía en capa fina
CDC	Centro para el control de enfermedades (Center for Disease Control)
cm	Centímetros
CMi	Concentración Mínima Inhibitoria
COSY	Espectroscopia de correlación homonuclear <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H bidimensional
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doble de doble
DEPT	Distortion less enhancement by polarization transfer
DMSO- <i>d</i>	Dimetil sulfóxido deuterado
dt	Doblete tripleteado
eV	Electrón-volts
FAB-MS	Espectrometría de Masas mediante Bombardeo Rápido de Átomos
h y/o hs	Hora y/o horas
HETCOR	Espectroscopia bidimensional de correlación heteronuclear ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta presión
INDRE	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica
IR	Espectro infrarrojo



<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KeV	Kilo electrón volts
<i>m</i>	Múltiplete
MeOH	Metanol
Metanol- <i>d</i>	Metanol deuterado
mg/disco	Miligramos por disco
MHz	Mega Hertz
[M+H] <sup>+</sup>	Ion positivo derivado del ion molecular más el PM del hidrógeno
msnm	Metros sobre el nivel del mar
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
<i>m/z</i> +1	Relación masa-carga más uno
<i>N</i>	Normalidad
nm	Nanometros
pH	Potencial de Hidrógeno
pf	Punto de fusión
PM	Peso molecular
ppm	Partes por millón
P.R.	Presión reducida
<i>rf</i>	Factor de referencia
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de Protones
RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
rpm	Revoluciones por minuto
<i>s</i>	Singulete
SEMARNAP	Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca
TTC	Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio
TMS	Tetrametilsilano
<i>v/v</i>	Relación Volumen-Volumen
<i>V/V/V</i>	Relación Volumen-Volumen-Volumen
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
UFC/ml	Unidades Formadoras de Colonia por mililitro



UV	Luz Ultravioleta
$\mu\text{g}$	Microgramos
$\mu\text{g/ml}$	Microgramos por mililitro
$\mu\text{g/disco}$	Microgramos por disco
$\mu\text{l}$	Microlitros
$\mu\text{m}$	Micrómetro
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
$[\alpha]_D^{+22^\circ\text{C}}$	Rotación específica con respecto a la línea D del sodio a 22 °C
$\epsilon$	Coefficiente de extinción
$\lambda_{\text{max}}$	Longitud de onda máxima

## Resumen

En el Valle de Tehuacán, Puebla la especie *P. laevigata* es uno de los componentes principales de la vegetación, ésta al igual que otras especies del género, son de gran importancia ecológica ya que participan en la regeneración de suelos, la retención de agua y en relaciones de nodrizaje. Además, algunas especies del género son utilizadas para el tratamiento de enfermedades de probable origen infeccioso. Estas actividades biológicas no han sido reportadas.

Los estudios químicos del género *Prosopis* son escasos, los cuales se han enfocado principalmente a los alcaloides que contienen las hojas y las vainas. También se ha determinado el patrón de flavonoides con fines quimiotaxonómicos, sin embargo, no hay estudios fitoquímicos en *Prosopis laevigata*, por lo que los objetivos de este trabajo fueron: aislar e identificar los principales metabolitos secundarios y evaluar la probable actividad antibacteriana de esta especie.

Los metabolitos secundarios se aislaron mediante técnicas cromatográficas. Posteriormente se realizaron los estudios espectroscópicos (IR, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C y espectrometría de masas) necesarios para elucidar las estructuras. Paralelamente, a los extractos se les evaluó cualitativamente la actividad antibacteriana, mediante la técnica de difusión en agar. Además, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) de cada extracto activo, mediante la técnica de dilución en caldo.

Los análisis efectuados mostraron que las hojas de *P. laevigata* contienen pinitol, sales de potasio, sacarosa, ácido (-) trans-4-hidroxipípecólico, ceras y glucósido de sitosterol. La actividad antibacteriana se detectó en las hojas, y los extractos activos fueron los polares. La CMI en bacterias Gram positivas se encuentra entre el intervalo de 10-40 µg/ml y la CBM entre 20-80 µg/ml. En las bacterias Gram negativas, la CMI se encuentra entre 1-200 µg/ml y la CBM entre 1-500 µg/ml. Los compuestos activos no se pudieron identificar debido a su baja concentración (sólo se obtuvieron trazas), son lábiles y es probable que existan fenómenos de sinergia que provoquen la actividad antibacteriana de los extractos polares.



## 1. Introducción

El Valle de Zapotitlán se encuentra al sureste del estado de Puebla y zonas adyacentes al noreste de Oaxaca, perteneciendo a la Provincia Fitogeográfica de Tehuacán-Cuicatlán. El Valle de Zapotitlán se considera como una región semiárida. El clima seco que prevalece en la zona está determinado, en gran parte, por la influencia de la Sierra Zongolica que detiene los vientos húmedos provenientes del Golfo de México, formando una sombra de lluvia sobre el Valle (Rzedowski, 1979).

La vegetación del Valle de Zapotitlán es característica de las zonas semiáridas representada principalmente por matorrales y selva baja caducifolia. Una de las especies dominantes en la región es la especie *Prosopis laevigata*, la cual comúnmente es conocida como mezquite.

Los mezquites constituyen parte importante de la flora nacional, alcanzando el carácter predominante en ciertas regiones. Tienen una amplia distribución en México, pues se les puede encontrar cerca del nivel del mar, hasta altitudes superiores a los 2000 msnm. (Villanueva, 1993).

El mezquite ha sido un recurso biótico útil para los habitantes de las zonas áridas y semiáridas de México. Sin embargo, no ha recibido la importancia que merece como alternativa de desarrollo económico y de su papel ecológico (Galindo y García, 1986).

El mezquite es el género más ampliamente usado para preparar una variedad de alimentos no convencionales en las zonas áridas de México. Con base en él, se elaboran diversos productos como la miel, piloncillo, pinole y harina (Villanueva, 1993).



El fruto y las flores del mezquite son de gran importancia como forraje. Igualmente lo es su vaina (fruto), la cual es muy apreciada por la gente para alimentar a todo tipo de ganado (Thomson, 1980; Ramírez, 1995). En lo referente al aprovechamiento forestal, la madera del mezquite se considera de buena calidad y de alto valor comercial. Esta leña se recolecta para el autoconsumo, para la elaboración de carbón, muebles, artesanías, etc. (Galindo y García, 1986).

Se ha reportado el uso medicinal del mezquite en el altiplano potosino en las décadas de 1960 y 1970, donde los extractos acuosos y alcohólicos mostraron una marcada actividad antimicrobiana (Langford, 1969). En los estados de Sinaloa y Zacatecas la especie *Prosopis juliflora* se emplea en el combate de la disentería, inflamación de ojos y dolor de estómago (Aguilar *et al.*, 1994). En Puebla, el mezquite se utiliza para combatir la inflamación de la garganta, las infecciones de las vías respiratorias, la inflamación de ojos, la disentería y como purgante. (Espejel, 1980). También se emplea la goma excretada por el mezquite para combatir enfermedades de la faringe y afianzar los dientes (Gómez Lorence *et al.*, 1970).

Los estudios fitoquímicos del mezquite son muy pocos, dentro de los cuales encontramos el realizado por Mears y Mabry en 1971, en donde hacen una revisión de alcaloides en leguminosas y reportan la presencia de triptamina en *P. juliflora* y N-metil tiramina y prosopina en *P. glandulosa*.

Bragg en 1978, realizó un estudio del patrón de flavonoides en el complejo *P. juliflora*, el cual comprende a las especies: *P. glandulosa* var. *glandulosa*, *P. glandulosa* var. *glandulosa* x *P. laevigata*, *P. glandulosa* var. *torreyana*, *P. laevigata*, *P. velutina*, *P. articulata* y *P. juliflora*. Este autor encontró 21 flavonoides, algunos de los cuales se encontraban glucosilados. Estos compuestos presentan similitud en todas las especies estudiadas.

Los alcaloides julifloricina (Aqeel *et al.*, 1989) y juliforina (Khurseed *et al.*, 1986), aislados de *Prosopis juliflora* mostraron actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram positivas y sobre hongos dermatófitos. Además, estos fueron sometidos a la prueba de Ames donde se encontró que no son compuestos mutagénicos.

El ácido oleanólico aislado de hojas y ramas de *Prosopis glandulosa* fue identificado como agente anti-VIH-1, en cultivos celulares (Kashiwada *et al.*, 1998).

El patrón de flavonoides de la especie *P. laevigata* es el único estudio químico que se le ha realizado, solo con fines taxonómicos, por lo que el propósito de este trabajo fue aislar e identificar los principales metabolitos secundarios y comprobar las propiedades medicinales que se le atribuyen, evaluando la actividad antibacteriana de la planta.



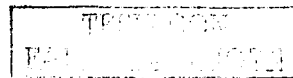
## 2. Antecedentes

### 2.1. Género *Prosopis*

El género *Prosopis* pertenece a la familia Leguminosae y comprende 44 especies distribuidas en el norte, centro y sur de América, Asia y África. Se puede encontrar en países con climas que van desde los secos hasta los tropicales. En América, el principal centro de diversidad del género es Argentina, donde se encuentran 27 especies, de las cuales 14 son endémicas. El género se encuentra desde Sudamérica hasta el suroeste de Estados Unidos (Figura1) (Rzedowski, 1988; Lamarque, 1998; Vázquez-Yañez *et al.*, 1999). A las especies de mezquite, se les puede encontrar desde cerca del nivel del mar hasta altitudes de 2000 msnm, aunque generalmente habitan regiones semiáridas y áridas (Espejel, 1980; Villanueva, 1993).

En México, el género *Prosopis* se distribuye desde el estado de Sonora hasta el de Oaxaca, pasando por todos los estados del centro, este y oeste (Red Latinoamericana de Cooperación Técnica en Sistemas Agroforestales, 1997). A las especies de *Prosopis* se les conoce con el nombre común de mezquite, el cual se deriva del náhuatl "mizquitl", que significa corteza utilizada para curtir (Vázquez-Yañez *et al.*, 1999).

Los mezquites constituyen parte importante de la flora nacional, cubriendo una superficie aproximada de 4,092,178 hectáreas, en diecisiete estados de la República. En ciertas regiones (donde existen suelos profundos), los mezquites son el elemento predominante de la vegetación (Cavazos. [www.inifap.conacyt.mx/progs\\_a/forestal/prog\\_mezquite.html](http://www.inifap.conacyt.mx/progs_a/forestal/prog_mezquite.html)).



En México, el complejo mezquite comprende las siguientes especies autóctonas: *P. palmeri*, *P. reptans* var. *cineroscens*, *P. pubescens*, *P. articulata*, *P. laevigata*, *P. tamaulipana*, *P. velutina*, *P. juliflora*, *P. glandulosa* var. *tipica*, y *P. glandulosa* var. *torreyana* (Rzedowski, 1988).

*P. laevigata*, es el mezquite típico del centro de México. Se distribuye desde el estado de Sonora hasta el de Oaxaca, se puede encontrar principalmente entre los 1800 y 1900 msnm. Se presenta en forma de árboles con alturas de 6 a 7 m, así como en forma arbustiva de 2 a 3 m. De su madera se fabrican puertas, muebles y carretas, se emplea también como combustible y sus frutos se usan como forraje para ganado (Espejel, 1980; Cantú, 1991).

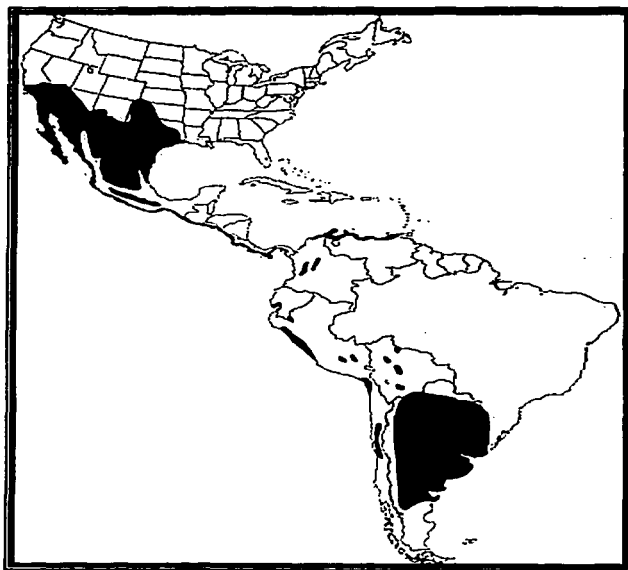


Figura 1. Distribución geográfica de *Prosopis* en América (Rzedowski, 1988).

### **2.1.1. Utilización del mezquite como alimento**

El mezquite se emplea para el consumo humano como fruta fresca y se elaboran diversos productos como la miel, piloncillo, pinole y harina para dulces, galletas y panes (Villanueva, 1993)

En el estado de Guanajuato se preparan bebidas a base de un cocimiento de las vainas de mezquite, las cuales una vez cocidas se les exprime la savia y se les agrega agua. Esta bebida puede tomarse fría y se le denomina agua de mezquite, o también se puede combinar con atole de masa llamándose mezquiatole (Gómez Lorence *et al.*, 1970; Vázquez-Yáñez *et al.*, 1999).

El mesocarpo de las semillas contiene 13.36% de azúcares, principalmente sacarosa (Galindo y García, 1986). El interior de la semilla contiene de 2.5 a 6.6% de lípidos con una alta proporción de ácido linoleico. En lo referente a proteínas se reporta un rango de 29.2 a 69.8% y de cenizas de 3.1 a 4.6% (Lamarque y Guzmán, 1997).

La vaina se consume como fruta fresca (Figura 2), o en su propio almíbar. Si se muele el mesocarpo de la vaina se obtiene pinole o harina, con el que se elaboran queso, piloncillo y atole. Este último también se puede preparar a partir de los frutos secos hervidos con agua. La harina es considerada un buen componente alimenticio por su valor nutritivo y su sabor dulce, aunque es deficiente en metionina y cisteína, (Galindo y García, 1986; Villanueva, 1993). Además, del néctar de las flores se produce miel de muy buena calidad.

El tronco del mezquite secreta dos tipos de gomas. Una que exuda del centro, la cual es líquida de color negro o pardo y sale espontáneamente, dando a la corteza un aspecto de madera carbonizada (Espejel, 1980). La otra es una



goma ambarina de consistencia suave y sabor dulce, cuyas propiedades físicas y químicas son parecidas a las de la goma arábica, que se obtiene de *Acacia senegal* (Churms *et al.*, 1981; Barajas-Aceves y Dendooven, 2001).



Figura 2. Vainas del mezquite *Prosopis laevigata*.

Las diferencias entre la goma del mezquite y la goma arábica radican en la composición de carbohidratos. La goma de *P. juliflora* es una sal neutra de un polisacárido ácido altamente ramificado, constituido por L-arabinosa, D-galactosa, ácido 4-O-metil-D-glucorónico y L-ramnosa, en relación molar 2:4:1. En contraste, en la goma arábica el ácido D-glucorónico no está metilado y la relación molar es 4:2:1:1 (Monroy, 1988). También se ha determinado que la goma de *Prosopis* tiene otros azúcares, dentro de los cuales se encuentra principalmente el arabinogalactano, ramnosa, xilosa, fucosa y ácidos galacturónicos (Espejel, 1980; Harborne y Baxter, 1993).

La composición de aminoácidos se determinó en la goma secretada por las siguientes especies: *Prosopis alba*, *Prosopis torreyana*, *Prosopis chilensis*, *Prosopis glandulosa*, *Prosopis laevigata* y *Prosopis velutina*. Encontrando proporciones altas de hidroxiprolina, prolina y serina (62.5%) en todas las especies (Anderson *et al.*, 1985).

La goma del mezquite puede sustituir de forma exitosa el uso de la goma arábica en la elaboración de emulsiones, ya que son más estables que las elaboradas con la goma arábica. También se pueden elaborar microcápsulas de aceite por el método de conservación compleja. Estas microcápsulas se emplean en la producción de alimentos, puesto que evitan la oxidación de aceites comestibles. Otra ventaja del uso de la goma del mezquite es que en la elaboración de emulsiones concentradas, la cantidad de goma de mezquite necesaria es menor a la empleada con la goma arábica. Además, se considera que en el mezquite existe la capacidad potencial para satisfacer los requerimientos del mercado nacional (Goycoolea, 1997).

### **2.1.2. Uso forrajero del mezquite**

El fruto y las flores del mezquite (Figura 3) son de gran importancia como forraje al igual que la vaina (fruto) que es muy apreciada por la gente para alimentar todo tipo de ganado (Thomson, 1980; Ramírez, 1995). Esta vaina se almacena para usarla durante los períodos de sequía, sin embargo, la ingesta de las vainas enteras conduce a un subaprovechamiento del contenido proteínico de la semilla, puesto que la mayor parte de estas pasan por el tracto digestivo de los animales sin ser aprovechadas. Por tanto es recomendable molerlas para formar harina y de esta forma pueda ser aprovechada más eficazmente por el ganado (Gómez Lorence *et al.*, 1970; Galindo y García, 1986; Villanueva, 1993).

Otro factor que puede conllevar al subaprovechamiento de los nutrientes de las hojas del mezquite son los taninos que se encontraron presentes en las hojas de *Prosopis cineraria*. Este tipo de compuestos tienen un efecto inhibitorio sobre la celulasa de rumiantes (Kumar *et al.*, 1992). Debido a lo anterior, la digestión de las hojas de mezquite no puede realizarse de forma adecuada.



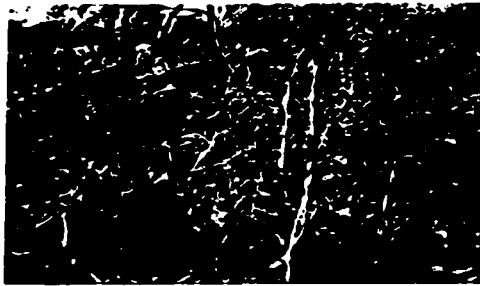


Figura 3. Vainas y hojas de *Prosopis juliflora* var *glandulosa*.

### 2.1.3. Uso forestal del mezquite

Las formas de aprovechamiento forestal del mezquite son muchas, sin embargo, han sido continuas e irracionales por lo que las zonas de los mezquiales han disminuido considerablemente. Además, en algunas zonas se consideran a los mezquiales como malezas, debido a que compiten con las especies forrajeras, lo que ha causado su tala inmoderada.

La disminución de las zonas de mezquiales es notable. La SEMARNAP realizó un estudio para determinar la tasa de deforestación estimada para los diferentes tipos de vegetación. Se consideraron los cambios en la cobertura de la vegetación durante el período de 1973 a 1996. Se encontró que los mezquiales tienen una tasa de deforestación del 1.1%. Lo anterior implica que se ha perdido el 1.1% de este tipo de vegetación de forma anual. Esto coloca a los mezquiales entre los seis tipos de vegetación que se encuentran en mayor riesgo en el país (Arriaga, SEMARNAP).

La leña del mezquite es muy apreciada por su calidad y valor comercial. Esta leña se recolecta para el autoconsumo, para la elaboración de carbón, muebles,

puertas y ventanas, además se emplea para elaborar postes y durmientes (Galindo y García, 1986; Cavazos, [www.inifap.conacyt.mx/progs\\_a/forestal/prog\\_mezquite.html](http://www.inifap.conacyt.mx/progs_a/forestal/prog_mezquite.html)).

#### **2.1.4. Importancia ecológica del mezquite**

El mezquite es un elemento dominante en muchas zonas áridas y semiáridas de México y se localiza principalmente en suelos de aluvi3n (suelos profundos). Los mezquiales sirven como h3bitat y alimento para una amplia gama de mamíferos, aves e insectos. Adem3s, por su capacidad de retenci3n de suelos, las especies de mezquites se recomiendan para regenerar suelos degradados ya que incrementan la mineralizaci3n de carbono y nitr3geno (Barajas-Aceves y Dendooven, 2001). Tambi3n se ha encontrado que el suelo que se encuentra debajo de la copa del mezquite, acumula materia org3nica, la cual favorece el establecimiento de microorganismos y los nutrientes necesarios para la vegetaci3n pionera (Reyes-Reyes *et al.*, 2001). Tambi3n se sabe que los mezquiales previenen la erosi3n de los suelos, protegen las cuencas hidrogr3ficas y son elementos susceptibles al manejo integral de las regiones 3ridas (G3mez Lorence *et al.*, 1970).

Los mezquites son resistentes a la sequía y pueden crecer en suelos pobres, ya que soportan suelos salinos (3.2% de NaCl) y suelos alcalinos. En lugares que tienen suelos alcalinos los mezquites se han empleado para reforestarlos, ya que disminuyen el pH. Los mezquites tambi3n son tolerantes al estr3s hídrico y a temperaturas altas. En contraste, algunas especies de mezquites son susceptibles a las heladas (V3zquez-Yañez *et al.*, 1999).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **2.1.5. Usos del mezquite en la medicina tradicional**

Los extractos acuosos y alcohólicos fueron usados por los habitantes del altiplano Potosino en las décadas de 1960 y 1970 como elementos antimicrobianos. Sin embargo, no mencionan la parte de la planta empleada, ni la forma de uso. (Langford, 1969). En Sinaloa y Zacatecas la resina en cocimiento de *Prosopis juliflora* se emplea para el combate a la disentería, la inflamación de ojos y el dolor

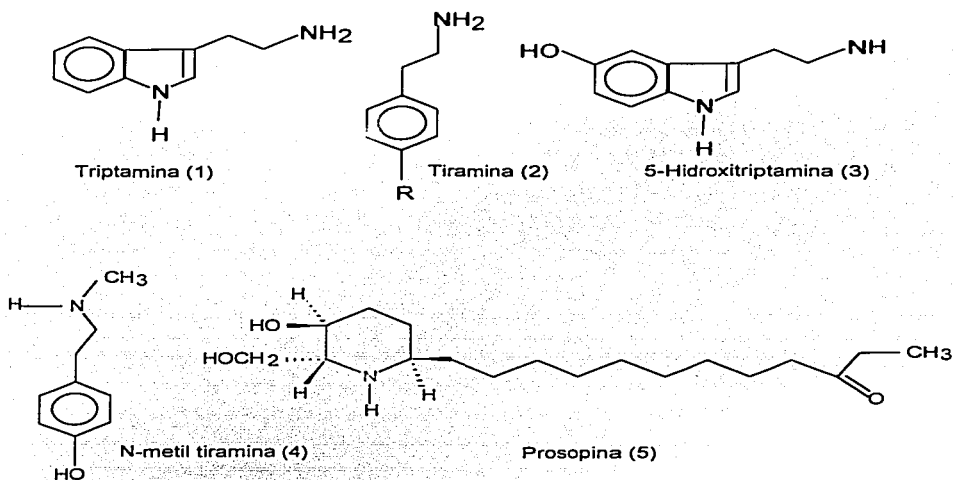
de estómago (Aguilar *et al.*, 1994). También se reporta útil para curar las enfermedades de la garganta y las infecciones de los ojos. Las flores en cocción y la corteza de la raíz se utilizan como vomitivo y purgante (Vazquez-Yáñez *et al.*, 1999)

En el Valle del Mezquital la goma excretada por el mezquite es colectada y utilizada para combatir enfermedades de la faringe y para afianzar los dientes (Gómez Lorence *et al.*, 1970). Además, se emplea para combatir la inflamación de la garganta, las infecciones de las vías respiratorias, la inflamación de ojos, contra la disentería y como purgante (Espejel, 1980).

### **2.1.6. Antecedentes fitoquímicos y actividad biológica del género *Prosopis***

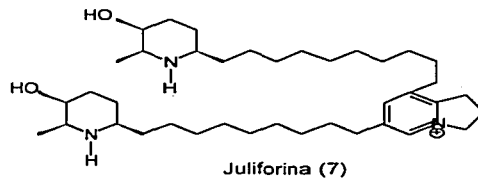
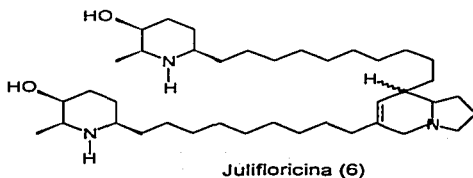
En un estudio sobre la distribución de alcanos en el aceite de las semillas de leguminosas y dentro de las cuales se encontraban siete especies de *Prosopis* de diferentes localidades (*P. alba*, *P. nigra*, *P. ferox*, *P. caldenia*, *P. kuntzei*, *P. flexuosa* y *P. argentina*), se encontró que la mayoría de las especies tienen el 33% de n-hexadecano y 26% de n-octadecano. No se encontró variación con respecto al patrón de alcanos entre las diferentes especies de *Prosopis* (Lamarque, 1998).

En 1971 Mears y Mabry, hacen una revisión de alcaloides de leguminosas y reportan la presencia de triptamina (1), tiramina (2), 5-hidroxitriptamina (3), en *P. juliflora* y N-metil tiramina (4) y prosopina (5) en *P. glandulosa*. En *P. nigra* (Moro y Coussio, 1975) encontraron eleagenina. En general las hojas jóvenes tienen aproximadamente 1.8% de alcaloides los cuales disminuyen con la maduración de las hojas.



Los alcaloides julifloricina (6) (Aqeel *et al.*, 1989) y juliflorina (7) (Khurseed *et al.*, 1986), aislados de *Prosopis juliflora* mostraron actividad antimicrobiana, siendo la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1 µg/ml, en las cepas *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. citreus*, *Streptococcus pyogenes* y *Sarcina lutea*. En contraste en las cepas *S. fecalis*, *S. pneumoniaes*, *S. lactis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *C. hofmanni* y *Bacillus subtilis*, la CMI fue de 5 µg/ml. Estos alcaloides no mostraron actividad contra las cepas *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus*,

*Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Candida* y contra los virus Herpes simplex 1 y Newcastle. En lo referente a la actividad sobre hongos dermatofitos, (Harbone y Baxter, 1993) determinaron que la CMI fue de 1.5 µg/ml en varias cepas de *Trichophyton*, *Microsporium* y *Epidermophyton*. Además estos alcaloides fueron sometidos a la prueba Ames, cuyos resultados mostraron que no son compuestos mutagénicos.

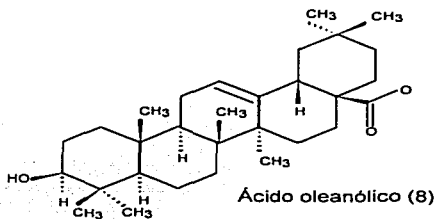


En las especies estudiadas de *Prosopis* los alcaloides constituyen un pequeño subgrupo de tipo lipídico, los cuales tienen el esqueleto 2,6-disustituidos-3-piperidínol. Estos compuestos han sido aislados de las hojas y de las vainas de varias especies de *Prosopis* y se ha determinado que poseen propiedades antibióticas y anestésicas (Koulocheri y Haroutonians, 1999). También se han realizado ensayos de unión de los alcaloides al ADN mediante técnicas de HPLC, los cuales mostraron una buena capacidad de retención en la elución del DNA, por lo que se les podría considerar como buenos antitumorales (Tapia *et al.*, 2000).

El ácido oleanólico (8) aislado de hojas y ramas de *Prosopis glandulosa* fue identificado en cultivos celulares como agente anti-VIH-1 (Kashiwada *et al.*, 1998).

Bragg *et al.*, en 1978, realizó un estudio sistemático de los patrones de flavonoides en el complejo *Prosopis juliflora*, el cual comprende a las especies *Prosopis glandulosa* var. *glandulosa*, *P. glandulosa* var. *glandulosa* x *P. laevigata*, *Prosopis glandulosa* var. *torreyana*, *P. laevigata*, *P. velutina*, *P. articulata* y *P.*

*juliflora*. En este estudio encontró que no hay diferencias en la química de flavonoides dentro de las especies que forman el complejo *P. juliflora*.



En las vainas de *P. juliflora* se han aislado glucósidos del ácido elálgico, los cuales contienen ramnosa en el C1 y glucosa en el C4 (Malhotra y Misra, 1981a, 1981b). De la corteza se aisló el glucósido del 3-metiléter kaempferol, y retusina (Vajpeyinee y Misra, 1981).

El principal constituyente de la goma de *Prosopis flexuosa* es la catequina (73%), la cual posee un efecto protector contra la lipidoperoxidación de las membranas celulares. Además, la goma de esta especie también contiene ácido gálico y ácido elálgico (Tapia *et al.*, 2000).

## 2.2. *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M.C. Johnston

### 2.2.1. Zapotitlán Salinas

El Valle de Zapotitlán se encuentra al sureste del estado de Puebla y zonas adyacentes al noroeste de Oaxaca. Es considerado como una región semiárida y la condición de sequía que prevalece en la región es consecuencia del efecto de sombra de lluvia, ya que la Sierra Madre Oriental forma una barrera que dificulta el



paso de los vientos húmedos provenientes del Golfo de México. Además, por su ubicación dentro del trópico seco mexicano, el Valle presenta un clima seco, con lluvias en verano donde la precipitación es más estacional y predecible a diferencia de los desiertos del norte de México. La fórmula climática reportada para la estación meteorológica Zapotitlán-Salinas es Bshw(e) gw", de acuerdo con la clasificación de Köpen modificada por García (Barrera, 2001).

Los suelos del Valle son someros, pedregosos, halomórficos, con diferentes estados de alcalinidad y salinidad, entre los que destacan por su importancia los litosoles, cambiosoles cálcicos y xerosoles cálcicos. Además, en los sitios donde se acumula el aluvión, predominan las rendzinas y en segundo plano el vertisol pélico y el regosol calcárico. Hacia el oeste del Valle predominan el regosol eútrico (Barrera, 2001).

Las zonas de suelos aluviales profundos, localizados a lo largo del Río Salado mantienen un tipo de bosque espinoso perennifolio (también llamado mezquital), el cual está dominado por árboles de *P. laevigata* (García, 2001).

La zona del Valle de Zapotitlán Salinas fue decretada Área Natural Protegida sujeta a conservación ecológica de acuerdo a la publicación del Diario Oficial de la Federación de diciembre de 1995. Asimismo en septiembre de 1998 el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, donde queda incluido el Valle de Zapotitlán Salinas fue decretado reserva de la biósfera. Estos decretos evidencian la importancia de estudios que permitan tanto la conservación de la diversidad biológica, así como el aprovechamiento integral de los recursos de la zona.

En Zapotitlán, *Prosopis laevigata* se emplea principalmente como forraje y combustible (Paredes, 2001). También se utiliza contra el malestar producido por la ingesta excesiva del alcohol, para ello se hierve un trozo de corteza, junto con una o dos plantas de paztle (*Tillandsia recurvata*) (Ramírez, 1995).

### 2.2.2. Descripción morfológica de la especie

*P. laevigata* (Tabla 1), es un árbol hasta de 13 m de altura. Su tronco por lo general mide de 30 a 60 cm de diámetro. Su corteza es gruesa, de color café negruzco, algo fisurada. La copa es más ancha que alta, las ramas son glabras o pilosas, armadas de espinas estipulares de 1 a 4 cm de largo (Figura 4). Las hojas son pecioladas, con uno a tres pares de pinnas, cada una con 10 a 20 pares de folíolos sésiles, oblongos o linear oblongos, de 5 a 15 mm de largo y 1 a 2 mm de ancho. El ápice es obtuso, de margen entero y con base obtusa.



Figura 4. Ejemplar de herbario de *P. laevigata*

Las flores son hermafroditas, dispuestas en espigas densas de 5 a 10 cm de largo, blanco-amarillentas, sésiles o casi sésiles; cáliz de 1 mm, glabro o puberulento, la corola es de 2.5-3 mm de largo; pétalos agudos, estambres de 4 a 5 mm de largo. El fruto es linear de 7 a 20 cm, de color café amarillento, a veces rojizo, algo constreñido entre las semillas. Semillas oblongas, comprimidas de 8 a 10 mm de largo y color blanco-amarillento (Rzedowski, 1979; Villanueva, 1993).

División	Spermatophyta
Clase	Angiospermae
Subclase	Dicotyledoneae
Serie	Apetaleae
Familia	Leguminosae
Subfamilia	Mimosoidae
Género	<i>Prosopis</i>
Especie	<i>P. laevigata</i>

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Prosopis laevigata*.

### 2.2.3. Distribución

El mezquite típico del centro y sur de México se encuentra en tres zonas: la altiplanicie, la depresión del Balsas y la planicie costera nororiental, las cuales se encuentran separadas por cadenas montañosas. Esta distribución indica la antigüedad de la especie, que debe remontarse a épocas en que las montañas no obstaculizaron su dispersión (Figura 5) (Rzedowski, 1988).

Esta especie se desarrolla en suelos profundos en las orillas de los ríos y arroyos, así como en los valles, en donde alcanza un mayor porte. Al presentarse en terrenos más delgados en las laderas, el tamaño de los individuos de esta especie es más reducido, lo que indica que para su desarrollo requiere de cantidades considerables de agua y suelo profundo. La floración se presenta en los meses de extrema sequía, es decir de marzo a mayo. La producción de las vainas (frutos), se presenta en los meses de octubre a diciembre, aunque se presentan variaciones dependiendo de la ubicación geográfica y de las condiciones climáticas (Cantú, 1991; Red Latinoamericana de Técnica en Sistemas, 1997).

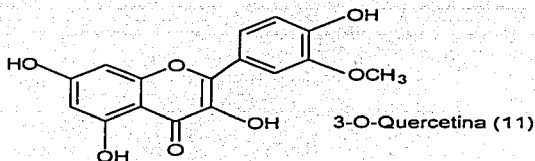
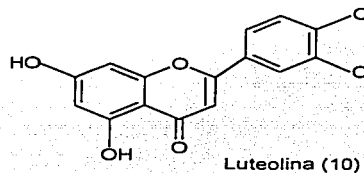
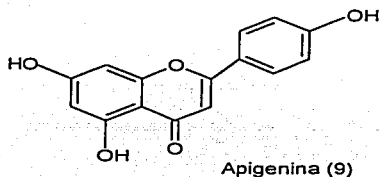


Figura 5. Distribución de *P. laevigata* (●) y *P. juliflora* (▲), no se incluyen localidades en las cuales *P. juliflora* es introducida (Rzedowski, 1988).

## 2.2.4 Antecedentes fitoquímicos de *P. laevigata*

La especie *P. laevigata* secreta dos tipos de goma, una es empleada como sustituto de la goma arábica y otra goma de color negro o pardo. Esta última goma contiene el 22.12% de taninos y se emplea tanto para teñir el pelo como para elaborar pinturas o tintas (Espejel 1980).

El único estudio químico de *Prosopis laevigata* fue realizado en 1978 por Bragg *et al.*, en el cual se aislaron de las hojas los siguientes flavonoides: apigenina (9), luteolina (10), el glucósido 6,8-di-O-apigenina, glucósido 7-O-chrisoeriol, glucósido 7-O-luteolina, metil éter 3-O-kaempferol, metil éter 3-O-quercetina (11), glucósido 3-O-isorhamnetina, rutinósido 3-O-isorhamnetina, rutinósido 3-O-quercetina, diglucósido 3-O-quercetina.



No hay estudios sobre la actividad biológica de los flavonoides y de otros metabolitos secundarios presentes en la especie *P. laevigata*.

### **2.3. Zonas áridas y defensas de las plantas**

Las plantas en las zonas áridas y semiáridas frecuentemente se encuentran en condiciones de estrés, debido a condiciones ambientales, que pueden ser factores abióticos o bióticos. Dichos factores afectan el desarrollo de las plantas alterando su desarrollo, crecimiento y productividad.

El estrés por factores abióticos es causado por un déficit o exceso de un factor ambiental físico o químico, por ejemplo: altas o bajas temperaturas, falta de agua, o el exceso de sal, contaminantes, etc.; y a factores bióticos, los cuales son producidos por el ataque o la influencia de otros organismos, como pueden ser virus, bacterias, hongos, invertebrados, herbívoros e incluso de otras plantas (Bray, 1997).

Las respuestas bioquímicas de las plantas al estrés abiótico se mencionan en la Tabla 2. Cada respuesta involucra uno o más cambios en la bioquímica de la planta, que generalmente radican en utilizar una vía metabólica alterna (Harborne, 1997).

#### **2.3.1. Osmolitos en el estrés hídrico**

Las plantas de las zonas áridas y semiáridas están sometidas a estrés hídrico por lo que tienen diferentes mecanismos de adaptación, los cuales se pueden agrupar en tres grandes categorías: a) la protección de membranas celulares y proteínas mediante el aumento en la síntesis de osmolitos o solutos compatibles, b) la reparación del daño celular por proteínas chaperonas, c) la actividad de canales y el secuestro de iones; aunado a lo anterior, también tienen que reparar el daño celular mediante la degradación de proteínas y toxinas; además, las plantas

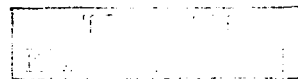


necesitan sintetizar metabolitos para la protección de otro tipo de estrés debido al ataque de diversos patógenos (Muñoz-Clares, 1994; Bray, 1997; McManus *et al.*, 2000).

Tipo de estrés	Respuesta Bioquímica
Altas temperaturas Trópicos y subtropicos	Metabolismo C <sub>4</sub> . Respuesta rápida: Proteínas de choque térmico.
Deseccación (estrés hídrico) Desiertos	Metabolismo ácido de <i>Crassulaceas</i> . Incremento en la producción de ácido abscísico. Incremento en los niveles de prolina o pinitol.
Bajas temperaturas	Acumulación de azúcares o polioles. Síntesis de proteínas anticongelantes. Incremento en la proporción de ácidos grasos insaturados.
Salinidad	Ajustes del potencial osmótico por acumulación de solutos.
Metales pesados	Modificación de enzimas en la superficie de las raíces. Acumulación /detoxificación de quelatos.

Tabla 2. Respuestas bioquímicas de las plantas a diferentes condiciones de estrés ambiental (Harborne, 1997).

Los osmolitos son solutos que se pueden acumular en el interior de la célula y de esta forma protegen la turgencia celular que mantiene el potencial osmótico, sin alterar las funciones celulares (Bray, 1997; McManus *et al.*, 2000). Estos osmolitos elevan la temperatura de desnaturalización de las proteínas globulares, favorecen la interacción entre las subunidades de las proteínas, evitan la inhibición de actividades enzimáticas causadas por sales inorgánicas y protegen los efectos nocivos de las bajas temperaturas (Muñoz-Clares, 1994).



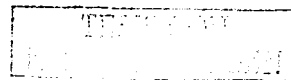
Los compuestos de amonio cuaternario (glicina-betaína), los aminoácidos (prolina) y los azúcares alcohol o ciclitoles (mioinositol y pinitol) son los osmolitos más comunes (Ford, 1984; Fougere *et al.*, 1991; Adams *et al.*, 1992; Clares, 1995; Bray, 1997; Changxin, 1997; Loewus y Pushpalatha, 2000; McManus *et al.*, 2000).

Los aminoácidos y otros compuestos nitrogenados solubles, participan como precursores de enzimas y ácidos nucleicos en el metabolismo de las plantas como productos primarios en la asimilación de nitrógeno inorgánico. También participan en la respuesta metabólica a diferentes tipos de estrés tales como alta salinidad, deficiencia de minerales y estrés hídrico (Stewart y Larher, 1980).

En el caso del estrés por alta salinidad se ha determinado la acumulación de aminoácidos, iminoácidos y otras aminas en las plantas. Se han realizado estudios comparando la producción de compuestos nitrogenados en plantas crecidas en condiciones normales y posteriormente sometidas al estrés salino. Los resultados muestran que las plantas crecidas en condiciones normales de cloruro de sodio presentan niveles bajos de prolina, pero al aumentar experimentalmente la concentración de la sal se observa la acumulación de prolina, ácido piperólico, ácido 5-hidroxipiperólico, glicina betaína y  $\beta$ -alanina-betaína (Stewart y Larher, 1980; Fougere *et al.*, 1991).

Las deficiencias de minerales en las plantas, tienen como respuesta el aumento de compuestos nitrogenados de forma específica. Por ejemplo, cuando hay bajos niveles de molibdeno, se aumenta la concentración de glutamina y asparagina. En contraste, cuando la deficiencia es por magnesio y por cloro, se acumula putrescina, diamina, prolina y ácido piperólico (Stewart y Larher, 1980).

Cuando baja el potencial hídrico en las hojas, se presentan cambios en la concentración y composición de la fracción soluble de los compuestos nitrogenados, sobretodo en el contenido de prolina, la cual puede llegar a acumularse hasta 200 veces más que en las plantas no sometidas a estrés





hídrico. Otros aminoácidos aumentan en menor proporción y estos cambios se han relacionado con la inhibición de la síntesis de proteínas y el aumento de la proteólisis (Stewart y Larher, 1980; Fougere *et al.*, 1991).

Los ciclitoles tienen diversas funciones en el metabolismo de las plantas, dentro de las cuales podemos destacar el transporte y almacenamiento de los azúcares que son producto de la fotosíntesis. También estos tienen una función como osmolitos, en este punto destaca la función del pinitol (Ford, 1984; Fougere *et al.*, 1991; Adams *et al.*, 1992; Bray, 1997; Changxin, 1997; Loewus y Pushpalatha, 2000; McManus *et al.*, 2000). Se ha determinado que las plantas que crecen en medios salinos, presentan altos niveles de pinitol en las hojas, de igual manera que en las plantas sometidas a estrés hídrico. Además, se ha observado que el aumento de la salinidad induce la expresión de genes involucrados en la síntesis de pinitol (Bielecki, 1994; Loewus y Pushpalatha, 2000).

### **2.3.2. Metabolitos Secundarios**

En las plantas existen dos tipos de metabolismo el primario y el secundario. El primero se caracteriza por la síntesis en grandes cantidades de proteínas, lípidos, glúcidos, ácidos nucleicos, clorofilas, citocromos e intermediarios metabólicos de vías anabólicas y catabólicas, las cuales son comunes en todas las plantas. Estas biomoléculas están encargadas del crecimiento, desarrollo y mantenimiento de la planta (Heldt, 1997). En contraste, existen una gran variedad de sustancias denominadas metabolitos secundarios que se producen en pequeñas cantidades y que aparentemente no tienen una función metabólica pero son indispensables para las plantas ya que realizan diversas funciones ecológicas (Heldt, 1997; Wink, 1999).

Entre estas funciones (Figura 6) destacan la atracción de insectos polinizadores o animales que consumen los frutos y distribuyen las semillas, además tienen un efecto alelopático, puesto que sirven para la defensa de la planta contra el ataque de bacterias, virus, hongos, herbívoros, e incluso sirven para inhibir la germinación de otras plantas competidoras (Harborne, 1997; Heldt, 1997; Wink, 1999; Hammond-Kosak, 2000). En muchos casos cumplen las dos funciones, por ejemplo los antocianos que pueden atraer insectos a las flores, pero además, en las hojas, tienen actividad antimicrobiana y ofrecen también protección contra la luz ultravioleta (Wink, 1999).

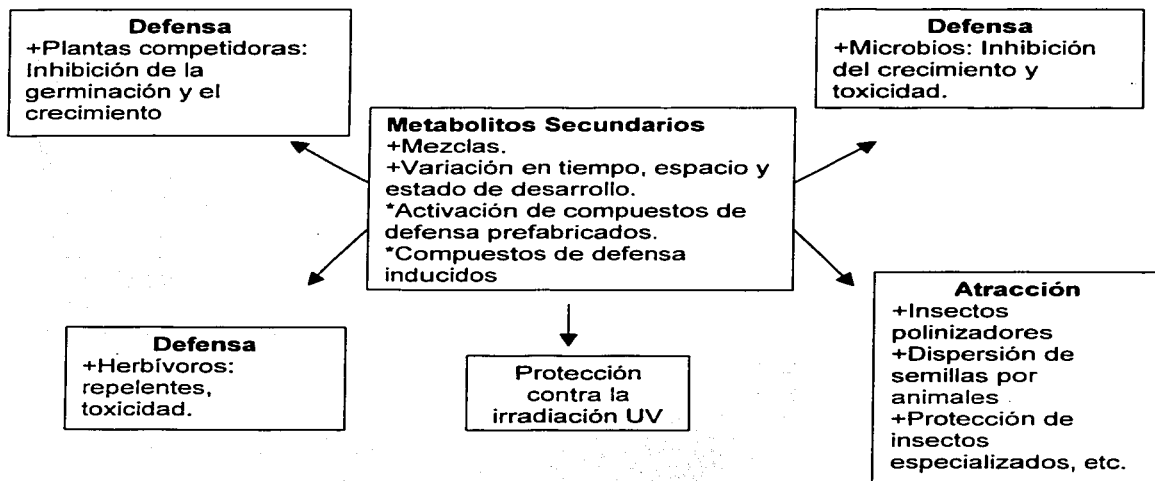


Figura 6. Funciones de los metabolitos secundarios de plantas (Modificada de Wink, 1999).

Las plantas son resistentes a muchos patógenos diferentes. Al ser sésiles, estas han desarrollado estrategias que les confieren cierta tolerancia a microbios y herbívoros. Muchas emplean la protección morfológica y mecánica tales como los pelos y las espinas. Otras desarrollan también la protección química por lo que producen una gran variedad de metabolitos secundarios (Harborne, 1997).

Los metabolitos secundarios los podemos agrupar por su composición química en compuestos libres de nitrógeno (terpenos, policétidos, saponinas y poliacetilenos) y compuestos que contienen nitrógeno (alcaloides, aminoácidos no proteínicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos) (Harborne, 1997; Wink, 1999).

En la mayoría de las plantas, la síntesis y la acumulación de metabolitos secundarios son reguladas en espacio y tiempo (Figura 7), lo cual significa que se acumulan los compuestos en los sitios específicos para defender a la planta. También se ha demostrado que después de una herida o una infección se desarrollan varios eventos que conllevan a la liberación de metabolitos prefabricados que son modificados por enzimas, para dar origen a nuevos compuestos con actividad alelopática (Kinghorn, 1992; Wink, 1999).

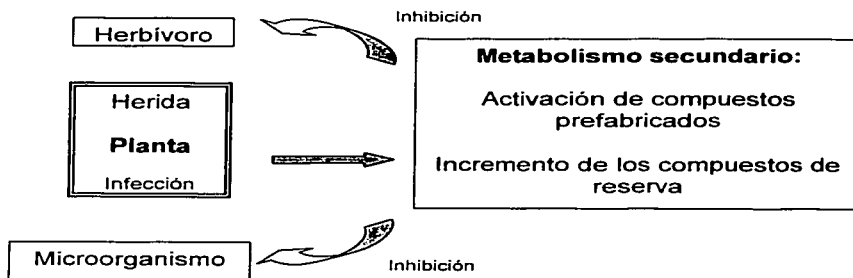


Figura 7. Ejemplos de la defensa química inducida en plantas.

La aplicación biotecnológica de los metabolitos secundarios es amplia. Por ejemplo, se emplean en la obtención de biopesticidas, fragancias, especias y compuestos con una actividad farmacológica determinada como antiinflamatorios, analgésicos, antibacterianos, antifúngicos, etc. Estas aplicaciones explican, al menos en parte, la efectividad de muchas plantas medicinales (Figura 8).

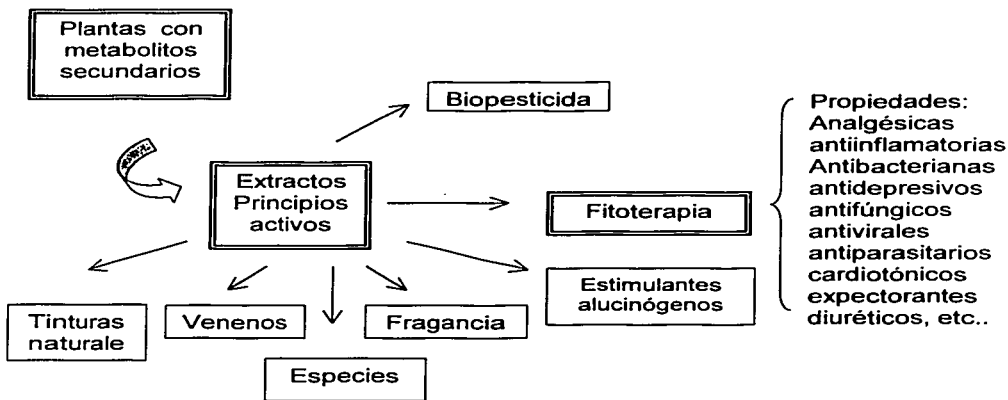


Figura 8. Aplicación de los metabolitos secundarios en la biotecnología.

Las plantas medicinales son empleadas básicamente en dos formas: 1) como mezclas complejas que contienen un amplio número de constituyentes (infusiones, tés, aceites esenciales, tinturas, extractos, etc.) y 2) como compuestos químicos definidos como principios activos (Avila, 1996), que en muchos casos, son los constituyentes principales de los fármacos empleados en la medicina alópata. Además, estos sirven como base en la investigación y síntesis de nuevos fármacos (Cordell, 2000).



### 2.3.3. Antimicrobianos de origen vegetal

Actualmente se han realizado numerosas investigaciones sobre antimicrobianos de origen vegetal, por lo que se conocen una gran cantidad de compuestos químicos de casi toda la escala filogenética vegetal, desde briofitas (Asakawa, 1990) y líquenes (Trace y Evans, 1993), hasta monocotiledóneas y dicotiledóneas. Sin embargo, existen muy pocos estudios que inciden en el conocimiento de los mecanismos de acción de los compuestos activos (Bruneton, 1991). Entre los pocos compuestos, cuyo mecanismo de acción ha sido documentado, se encuentran los siguientes:

#### A) Flavonoides.

Los flavonoides inhiben, la síntesis de ADN o ARN bacteriano por su intercalación entre las bases de la doble hélice, ya que estos compuestos tienen una estructura similar a las bases púricas y pirimídicas. Los flavonoides además poseen la capacidad de formar puentes de hidrógeno con las bases nitrogenadas (Mori *et al.*, 1987).

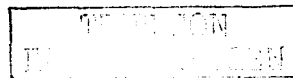
#### B) Taninos.

La actividad antimicrobiana de estos compuestos se debe a que interactúan con la membrana celular, se acoplan a metales y por su acción astringente. Los taninos inhiben el transporte electrónico en las membranas bacterianas, causando un efecto letal en los microorganismos (Konishy, 1987). Por otro lado, también este tipo de compuestos pueden causar la muerte bacteriana al formar complejos metal-tanino, que hace inaccesibles los metales en la célula e impiden el adecuado funcionamiento celular. La astringencia se debe a que los taninos se

unen a las enzimas bacterianas, formando así, complejos insolubles, impidiendo el adecuado crecimiento bacteriano (Scalbert, 1991).

#### B) Lactonas sesquiterpénicas.

Las lactonas que poseen actividad antibacteriana son las que presentan grupos  $\alpha$ -metileno,  $\gamma$ -lactona y carbonilo  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado. Estos grupos representan sitios reactivos para nucleófilos, en particular grupos tiol y amino, los cuales son esenciales para algunas funciones enzimáticas, puesto que en muchos casos, estos grupos, conforman el sitio activo de la enzima, o ayudan a mantener la conformación de las enzimas (Fisher, 1991).



### **3. Hipótesis**

Las especies del género *Prosopis* son empleadas por la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades infecciosas, de la garganta y de los ojos, entonces los extractos de las diferentes partes de la planta deben tener actividad antibacteriana, puesto que contienen metabolitos con dicha actividad biológica.

### **4. Objetivos**

#### **4.1. Objetivos Generales**

- ❖ Aislar e identificar los principales metabolitos secundarios de *Prosopis laevigata*.
- ❖ Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de *Prosopis laevigata*.



## 4.2. Objetivos Particulares

- ❖ Obtener extractos de diferente polaridad a partir de las hojas, raíz y tallo de *P. laevigata*.
- ❖ Determinar cualitativa y cuantitativamente la actividad antimicrobiana de cada extracto.
- ❖ Aislar y purificar los principales componentes de cada extracto.
- ❖ Elucidar la estructura de los principales metabolitos secundarios aislados de *P. laevigata* mediante los estudios espectroscópicos y químicos necesarios.
- ❖ Determinar de la actividad antimicrobiana de forma cualitativa y cuantitativa de los compuestos aislados.



## 5. Metodología

### 5.1 Trabajo de campo

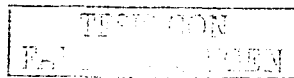
#### 5.1.1 Descripción de Zapotitlán Salinas, Puebla

Los individuos de la especie *Prosopis laevigata* se colectaron en Zapotitlán Salinas en el Valle de Tehuacán. Esta localidad se ubica en la región meridional del sureste del estado de Puebla, entre los 17°30' y 19° de latitud norte y entre los 97° y 98° de longitud oeste.

El Valle de Zapotitlán se encuentra dentro de los paralelos 18°07'18" y 18°26'00" de latitud norte, los meridianos 97°19'24" y 97°39'06" de longitud oeste. Tiene una superficie de 86.74 Km<sup>2</sup>. Se encuentra limitado por las más altas prominencias de la Sierra de Zapotitlán como son las Sierras de Miahuatepec y Atzingo al este, los Cerros Pajarito y Chacateca al norte, Cerro Corral de Piedra al sur y el Cerro la Mesa al Oeste.

La orientación del Valle de Tehuacán es en general nor-noreste y sur-sureste. Tiene una extensión aproximada de 170 Km de largo, por 40 Km de ancho. Al noroeste colinda con el Cerro de Tlacotepec y al sur con la Mesa Central. Al suroeste está limitado por la Sierra de Zapotitlán (Zavala, 1980).

La vegetación del Valle de Tehuacán esta relacionada con la altitud y sus consecuentes características ambientales. Por arriba de los 1800 msnm, se establece un bosque de pino-encino, mientras que por debajo de esta cota altitudinal se encuentra el matorral espinoso con cactáceas columnares. Este último tipo de vegetación, presenta variación en sus asociaciones vegetales, de acuerdo a la combinación de varios factores abióticos como altitud, precipitación, tipo de suelo y drenaje (Zavala, 1980).



La aridez del Valle de Tehuacán está determinado en gran parte por la Sierra Zongolica que detiene los vientos húmedos provenientes del Golfo de México, al formar con sus crestas de hasta 2600 msnm una sombra de lluvia sobre el valle. Aunque parte de la humedad del Golfo atraviesa la cima de la Sierra, la precipitación decrece progresivamente, siendo la zona más seca la de los alrededores de Tehuacán y la Sierra de Zapotitlán (Zavala, 1980).

El clima del Valle de Zapotitlán corresponde de acuerdo a la clasificación de Köpen modificado por García (1973) a Bshw(e) gw", que es un clima seco árido con régimen de lluvias en verano con un cociente P/T menor de 22.9 (el más seco de los BS). Es semicálido (h) con una temperatura media anual entre 18°C y 29°C, y oscilaciones estacionales de 4° a 18°C. La precipitación media anual varía de 350 a 1200 mm<sup>3</sup>, con 5 a 9 meses de sequía (Espejel, 1980; Rzedowzki, 1979).

En la zona de estudio se encuentran principalmente dos tipos de vegetación; bosque espinoso y matorral xerófilo. Las especies que caracterizan este tipo de vegetación son *Castela tortuosa*, *Cercidium praecox*, *Eysenhardtia polystachya*, *Zexmenia lantanifolia*, *Selloa glutinosa*, *Prosopis laevigata*, *Lantana sp.*, *Agave marmorata*, *Opuntia tunicata* y *Myrtillocactus geometrizans* (Zavala, 1980).

### **5.1.2. Colecta del material vegetal**

Las colectas se realizaron a 500 m del pueblo de Zapotitlán Salinas, que está localizado sobre la carretera Tehuacán-Huajuapán de León, a una altitud de 1430 msnm. La vegetación de la zona es matorral espinoso con vegetación crasicaule. *P. laevigata* se encuentra asociada a *Cercidium praecox*. El suelo es café calizo.

La primera colecta se realizó en septiembre de 1998, colectando las diferentes partes de la planta (raíz, tallo y hoja). Posteriormente se secaron a la sombra en hojas de papel, para después procesarlas en un molino manual y almacenarlas en



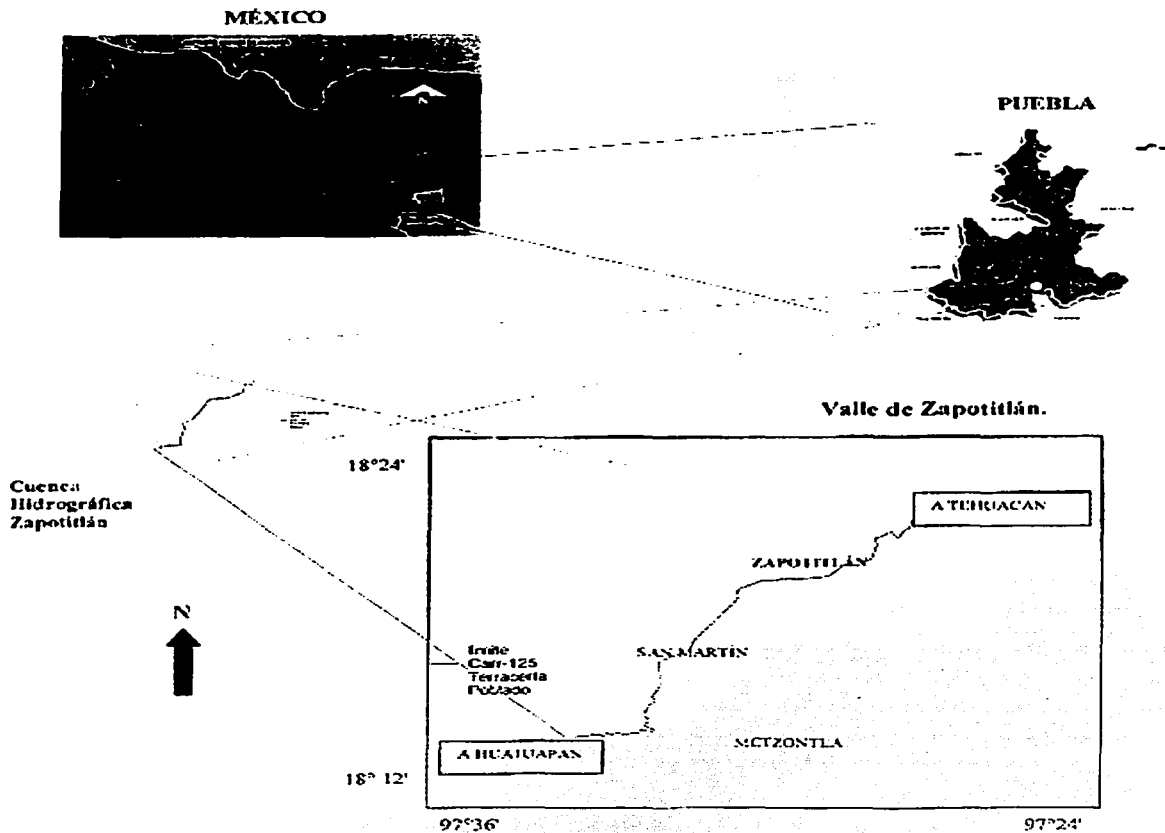


Figura 9. Ubicación geográfica de la cuenca hidrográfica de Zapotitlán y el valle del mismo nombre (Barrera, 2001).

costales. La segunda colecta se realizó en julio del 2000. En esa ocasión solo se colectaron hojas, con las cuales se elaboraron los diferentes extractos para realizar el estudio fitoquímico y evaluar la actividad antibacteriana de la planta. También se colectaron y prensaron algunos ejemplares herborizados para su depósito e identificación en el herbario IZTA de la FES- Izacala de la UNAM.

## **5.2 Evaluación preliminar de la actividad antibacteriana**

### **5.2.1. Elaboración de extractos**

El primer paso de este trabajo fue obtener extractos de las diferentes partes de la planta (raíz, tallo y hoja) para determinar donde se encontraba la actividad antibacteriana. Se tomó esta decisión, debido a que en los reportes bibliográficos se menciona que varias especies del género *Prosopis* son empleadas en la medicina tradicional para combatir diversos procesos infecciosos. Sin embargo, no se reporta que parte de la planta tiene dicha actividad.

Estos primeros extractos se obtuvieron por maceración en frío. Para la elaboración de cada extracto se colocaron 50 g de la planta (hoja, tallo, raíz), en 250 ml del solvente (hexanos, acetato de etilo, metanol y agua). Los extractos se dejaron reposar por tres días y posteriormente se destilaron a presión reducida, hasta llevarlos a sequedad.

### **5.2.2. Determinación del rendimiento**

El rendimiento de cada extracto se realizó de acuerdo al método propuesto por González-Peñalosa, 1981, (Apéndice 1).

### **5.2.3. Bioensayos preliminares de raíz, tallo y hoja**

El método que se utilizó para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos preliminares de las diferentes partes de *P. laevigata*, fue el de difusión en medio sólido (Kirby-Bauer) mediante la técnica de Barry and Thornsberry, 1987; Vanden Berghe and Vlietnick, 1991, modificada por Avila, 1996 (Apéndice 2).

Los microorganismos que se emplearon fueron *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* (cepa de campo). La concentración de los extractos en los sensibilizadores fue de 1 mg de extracto/disco. Los bioensayos se realizaron por triplicado.

El análisis estadístico que se empleó para analizar los resultados de los bioensayos fue un análisis de varianza de dos factores. Posteriormente se aplicó la prueba de Tukey con el objeto de establecer entre que tratamientos había diferencias estadísticamente significativas.

### **5.3 Extractos de hoja**

La parte activa de la planta fue la hoja, por lo que se extrajo con solventes de diferente polaridad, basándose en la metodología propuesta por Lin en 1990.

Los extractos se obtuvieron por percolación y se concentraron a presión reducida, para posteriormente determinar el rendimiento de cada uno, siguiendo la metodología descrita anteriormente. La preparación de los extractos se muestra en la figura 10.

Cabe mencionar, que por la dificultad del proceso y el alto contenido en carbohidratos, se decidió que el extracto acuoso en el segundo proceso no se llevaría a sequedad y no se trabajaría para el estudio fitoquímico.

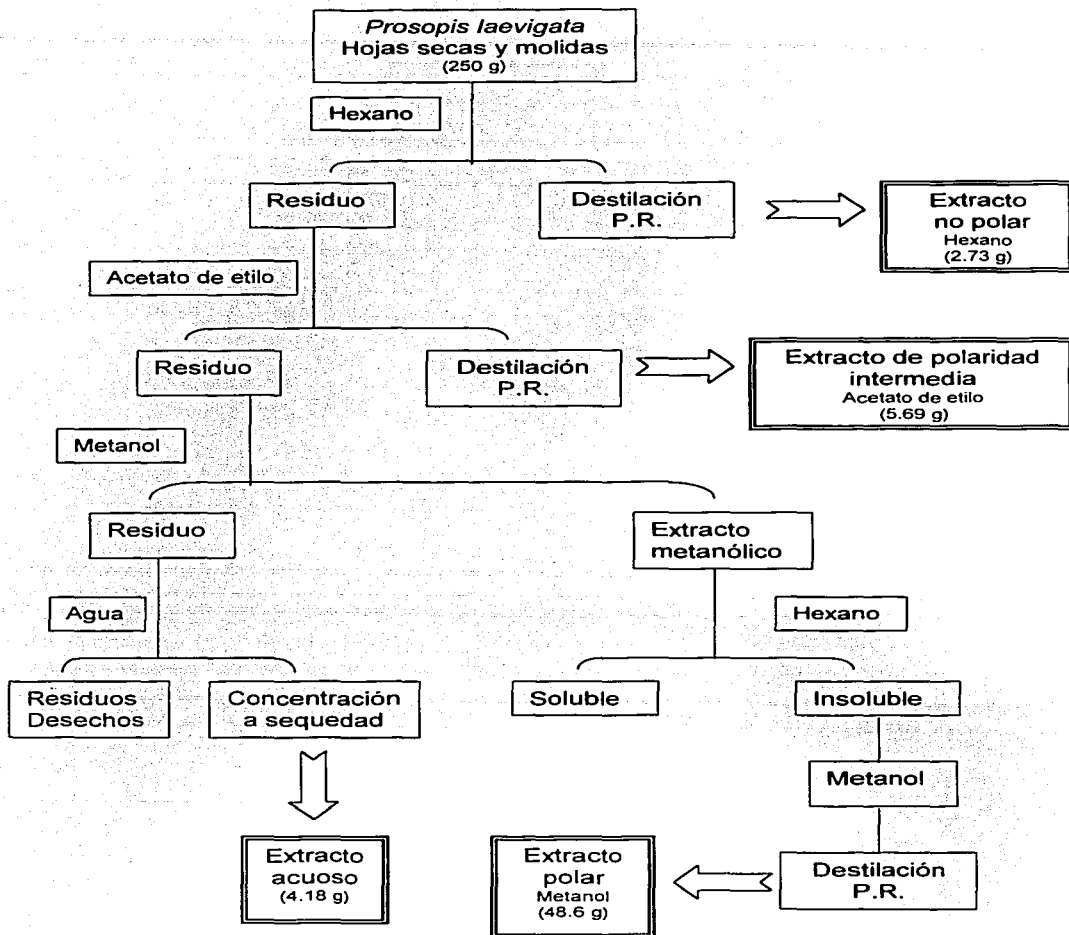


Figura 10. Procedimiento para la extracción de las hojas de *P. laevigata*. Presión reducida (P.R.).

### **5.3.1. Actividad antibacteriana de los extractos de hojas**

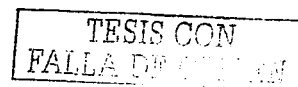
#### **5.3.1.1. Determinación de la actividad antibacteriana de manera cualitativa**

Los extractos obtenidos a partir de las hojas que resultaron activos, fueron el acuoso y metanólico. A estos extractos se les evaluó la actividad antibacteriana de la forma descrita anteriormente. Se utilizaron las siguientes cepas: *Vibrio cholerae* CDC V12 (El Tor), *Vibrio cholerae* INDRE 206 aislada de agua contaminada (agua), *Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico (cc) (estas cepas corresponden al grupo 01, productor de enterotoxina, serotipo Inaba, biotipo El Tor), *Vibrio cholerae* No-01, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155, *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Staphylococcus aureus* ATCC 12398, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sarcinia lutea* y *Bacillus subtilis*.

Los resultados de los bioensayos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de dos factores. Posteriormente se aplicó la prueba de Tukey con el objeto de establecer entre que tratamientos había diferencias estadísticamente significativas.

#### **5.3.1.2. Determinación de la actividad antibacteriana de manera cuantitativa Concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida mínima (CBM)**

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos acuoso y metanólico, se utilizó el método de dilución en caldo reportado por Jones *et al.*, 1987, modificado por Avila, 1996 (Apéndice 3).



Las concentraciones empleadas para los bioensayos cuantitativos fueron las siguientes: 1 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 800 µg/ml y 1000 µg/ml. Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

## **5.4. Estudio fitoquímico**

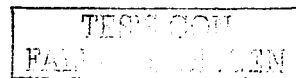
### **5.4.1. Métodos cromatográficos**

Las cromatografías de adsorción en columna abierta se realizaron sobre gel de sílice 60 F<sub>254</sub> Merck (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, malla 70-230 ASTM).

Para las cromatografías en capa fina (ccf) se emplearon cromatofolios de aluminio cubiertos con gel de sílice 60 F<sub>254</sub> Merck (0.2 mm de espesor, para análisis). La ccf permitió verificar el desarrollo de las cromatografías en columna abierta y comprobar la pureza de los compuestos obtenidos. Como agentes cromogénicos se emplearon: a) Una solución de sulfato cérico en ácido sulfúrico concentrado, y para el desarrollo del color fue necesario calentar las placas cromatográficas durante dos minutos a 110 °C. b). El revelado con luz UV a 254 y 366 nm (Ultraviolet Fluorescence Analysis Cabinet. Spectroline Mod CX-20).

Las cromatografías en ccf preparativas, se realizaron en cromatofolios de vidrio cubiertos con gel de sílice 60 F<sub>254</sub> Macherey-Nagel, (2.0 mm de espesor, 20 x 20 cm).

La separación por filtración en gel se llevó a cabo en Sephadex™ LH-20 Amersham Pharmacia Biotech. AB.





#### **5.4.2. Equipo usado para la determinación de las constantes físicas espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos aislados**

Los puntos de fusión (p.f.) se determinaron con un aparato Fisher-Johns. Estos datos se describen sin corregir. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un aparato de rejilla Perkin-Elmer modelo 599B y en un aparato Nicolet FT-5X, en pastilla de KBr y/o nujol.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN- $^1\text{H}$ ) y de carbono-13 (RMN- $^{13}\text{C}$ ) fueron obtenidos en un equipo Varian Unity VXR-200s, el cual se operó a una frecuencia de 200 y 75.44 MHz respectivamente. Los espectros se obtuvieron en agua-*d*, metanol-*d* o dimetilsulfóxido-*d*, dependiendo de la solubilidad de los compuestos. Los desplazamientos químicos se expresan en unidades de ppm ( $\delta$ ) con respecto al tetrametilsilano (TMS) que se usó como referencia interna. Los experimentos DEPT, COSY y HETCOR, se realizaron en un aparato FT-NMR Varian PIOS 200. Se emplearon los programas de secuencias de pulsos estándares Varian para el registro de los espectros bidimensionales homonucleares ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY).

Los espectros de masas se determinaron en un aparato Jeol JMS-SX102A mediante la técnica de bombardeo rápido de átomos (FAB-MS). Se empleó como matriz, alcohol m-nitrobencílico. El átomo acelerado para la generación de iones a partir de la muestra fue xenón utilizando un voltaje de 6 KeV.



### 5.4.3. Bioensayos para el fraccionamiento del extracto metanólico de *P. laevigata*

A todas las fracciones que se obtuvieron en el proceso de separación del extracto metanólico, se les determinó si presentaban actividad antibacteriana. Lo anterior, con el objeto de seleccionar y posteriormente fraccionar, solo a las fracciones que presentaban dicha actividad, para poder así, aislar el o los metabolitos responsables de la actividad antibacteriana.

Se empleó la metodología descrita anteriormente, en la sección 5.2.3. Los microorganismos que se emplearon para el fraccionamiento biodirigido, fueron: la cepa de *S. lutea*, por ser la cepa Gram positiva más sensible a los extractos polares de las hojas de *P. laevigata* y la cepa de *E. coli* como cepa Gram negativa. Cabe hacer notar, que en el caso de las bacterias Gram negativas no se seleccionó la cepa más sensible (*P. aeruginosa*), debido a que esta cepa no se pudo mantener durante la huelga estudiantil de 1999-2000 en la UNAM.

Los bioensayos se realizaron por triplicado. Las concentraciones de las fracciones que se aplicaron a cada sensidisco se muestran en la Tabla 3.

No. de la fracción	Clave de la fracción	Concentración por sensidisco ( $\mu\text{g}$ )
Extracto	Extracto	1000
167-232	P.I.(1)	500
50-59	P.I.(2)	250
46-53	P.I.(3)	250
50-61	P.I.(4)	250
	IS	250

Tabla 3. Concentraciones de las diferentes fracciones obtenidas del extracto metanólico

#### 5.4.4. Fraccionamiento del extracto metanólico de las hojas de *P. laevigata*

El extracto metanólico (48.64 g.) se preabsorbió en celita para fraccionarlo en una cromatografía en columna abierta con 700 g de gel de sílice 60 F<sub>254</sub>. La columna se eluyó con mezclas de Acetona-MeOH y polaridad ascendente de. Se recolectaron 244 fracciones de 250 ml, las cuales se destilaron a presión reducida y se analizaron por ccf. Se obtuvieron tres grupos de fracciones primarias de acuerdo con la similitud de su composición. En la tabla 4 se resumen los sistemas de elusión empleados y las fracciones resultantes.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones Recolectadas	Fracciones Combinadas	Clave de la Fracción	Peso (g)
Acetona	100	1-80	10-16 19-21	Pinitol	0.45
Acetona-MeOH	95:5	81-96			
Acetona-MeOH	9:1	97-190	167-190	Sales de potasio	0.68
Acetona-MeOH	8:2	191-212	167-232	P.I. (1)	15.10
Acetona-MeOH	7:3	213-225			
Acetona-MeOH	6:4	226-233			
Acetona-MeOH	5:5	234-243	234-243	Ácido hidroxipípecólico	0.189
MeOH	100	244			

Tabla 4. Fraccionamiento del extracto metanólico de las hojas de *P. laevigata*

A partir de la fracción 10 hasta la 21, se obtuvo un sólido cristalino blanco en forma de agujas, con p.f. de 186–188 °C, cuyos espectros de IR, RMN <sup>1</sup>H y masas, coinciden con los reportados para el pinitol (Espectros 1, 2 y 3).

De las fracciones 168-190, se aisló un sólido cristalino blanco, con p. f. superior a los 500°C.

Al evaluar la actividad antibacteriana de todas las fracciones, se encontró que la fracción P.I. (1) fue la que presentó los mayores halos de inhibición en ambas cepas bacterianas, por lo que se seleccionó para continuar con el estudio fitoquímico.

De las fracciones 234–243 se obtuvieron cristales blancos con forma de agujas. Su punto de fusión fue de 307 °C. A estos cristales se les realizaron los estudios de IR. MS, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, DEPT, COSY, y HETCOR, con los cuales se identificó como el ácido 4-hidroxi-L-pipecólico (Espectros 4,5,6,7,8,9 y 10).

#### **5.4.4.1. Separación de la fracción P.I. (1)**

La fracción P.I. (1) (15.10 g) se separó en una columna abierta empacada con 225 g de gel de sílice 60 F<sub>254</sub>, empleando como sistemas de elución mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH con polaridad ascendente (Tabla 5). Se recolectaron 109 fracciones de 200 ml cada una, las cuales se concentraron a presión reducida. Mediante ccf se reunieron las fracciones cuyos componentes eran parecidos y se evaluó la actividad antibacteriana. La fracción P.I. (2) presentaba el mejor rendimiento y además era una fracción activa por lo que se seleccionó para su separación.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones Recolectadas	Fracciones Combinadas	Clave de la Fracción	Peso (g)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	95:5	1-7	3-9		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	93:7	8-9			
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	9:1	10-76	13-15 35-49		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	8:2	77-81	50-89	P.I. (2)	4.2
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	7:3	82-92	90-100		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	6:4	93-104			
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	5:5	105-108			
MeOH	100	109			

Tabla 5. Fraccionamiento de la fracción P.I. (1).

#### 5.4.4.2. Separación de la fracción P.I. (2)

La fracción P.I. (2) (4.2 g) se analizó en una columna abierta empacada con 60 g de gel de sílice 60 F<sub>254</sub>. Se empleó como sistema de elución, mezclas con polaridad ascendente de CHCl<sub>3</sub>-MeOH (Tabla 6). Se recolectaron 68 fracciones de 100 ml cada una, las cuales se concentraron a presión reducida. Se reunieron las fracciones cuyos componentes eran parecidos y se evaluó la actividad antibacteriana de cada una.

De las fracciones 46-53 P.I. (3) se aislaron cristales cúbicos cuyo punto de fusión es de 190-192 °C. Los cristales se identificaron como sacarosa por medio de estudios de RMN<sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C (Espectro 11 y 12). Las aguas madres de los cristales aislados, si presentaron actividad antibacteriana.



Las fracciones 50-61 denominadas P.I. (4). presentaban el mejor rendimiento y además era una fracción activa, por lo que se seleccionó para su separación.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones Recolectadas	Fracciones Combinadas	Clave de la Fracción	Peso (g)
CHCl <sub>3</sub> -MeOH	9:1	1-6			
CHCl <sub>3</sub> -MeOH	85:15	7-10			
CHCl <sub>3</sub> -MeOH	8:2	10-32	24-30		
CHCl <sub>3</sub> -MeOH	7:3	33-49	46-53	P.I.(3) Sacarosa	1.50
CHCl <sub>3</sub> -MeOH	6:4	50-61	50-61	P.I (4)	2.02
CHCl <sub>3</sub> -MeOH	5:5	62-68			

Tabla 6. Fraccionamiento de la fracción P.I. (2).

#### 5.4.4.3. Separación de la fracción P.I. (4)

La fracción P.I. (4) (2.02 g) mediante ccf, mostró que estaba formada por dos componentes principales. Estos se observaban en la luz UV a 254 nm. La separación de la fracción, se llevó a cabo en una cromatografía en columna, empacada con 25 g de gel de sílice 60 F<sub>254</sub>. Se emplearon como sistemas de elución, las mezclas de CHCl<sub>3</sub>-MeOH. Se recolectaron 50 fracciones de 50 ml.

Las fracciones 24 a la 30, de la columna anterior (P.I. (5) 140 mg), mostraron actividad antibacteriana. Debido al rendimiento de la fracción, se separaron sus componentes en placas preparativas. El sistema de elución que se utilizó fue como fase móvil, la mezcla de butanol-ácido acético-agua, en proporción 4:1:1. Se obtuvieron 3 mg de cada uno de los componentes. Sin embargo, estos no mostraron actividad antibacteriana. No se realizaron estudios espectroscópicos, debido a la poca cantidad de los compuestos aislados.

#### 5.4.4.4 Extracto metanólico de hojas (segundo proceso)

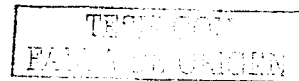
Se decidió coleccionar una mayor cantidad de hojas de *P. laevigata* en julio del 2000, con la intención de repetir el fraccionamiento del extracto metanólico y así poder aislar los metabolitos responsables de la actividad antibacteriana.

El segundo proceso de extracción (Figura 11), se llevó a cabo con 2 Kg de hojas de *P. laevigata*. Se obtuvieron 358 g de extracto metanólico. Este se fraccionó siguiendo las mismas condiciones de separación hasta obtener 8 g de la fracción P.I. (3), y por ser esta parte de un segundo proceso, se le agregó la denominación II.

De la a fracción P.I. (3 II) (8 g), se obtuvieron 4.2 g de cristales cúbicos cuyo punto de fusión (190-192 °C) correspondía con el compuesto aislado e identificado anteriormente como sacarosa. Las aguas madres presentaron actividad antibacteriana. Con la intención de retirar la mayor parte de sacarosa de las aguas madres, estas se separaron por medio de una columna de sephadex LH-20 eluida con. Se obtuvieron cuatro grupos de fracciones (Tabla 7), de las cuales sólo la fracción IS presentó actividad, por lo que se procedió a separar sus componentes.

Clave de la fracción	Peso (g)
IS	0.308
IIS	0.013
IIIS	Compuesto (1.2g)
IVS	0.125

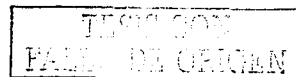
Tabla 7. Separación por sephadex de la fracción P.I. (3 II).



La fracción IS que mostró dos bandas en ccf, se analizó por medio de una cromatografía en columna con 8 g de gel de sílice 60 F<sub>254</sub>. La fase móvil empleada fueron mezclas de AcOEt-MeOH. Se colectaron 60 fracciones de 15 ml.

Las únicas fracciones activas fueron de la 43 a la 59 (64 mg). Al monitorearlas por ccf se observaron dos bandas, las cuales se evaluaron por la técnica de autobiografía (Apéndice 5). Así se determinó que la parte activa se encontraba en el punto de aplicación. Este componente absorbía la luz UV a 366 nm y reaccionaba con el cloruro férrico, lo cual indicó que se trataba de algún glucósido de flavonoides o algún compuesto aromático muy polar, por lo que se buscaron mezclas para separar este tipo de compuestos. Esta fracción se purificó por medio de placas preparativas con la fase móvil AcOEt-MeOH-Agua 63:12:9, reportada por Harborne en 1973 para la purificación de glucósidos de flavonoides.

Se recuperó una fracción (35 mg) impura. Esta fracción se descompuso al tratar de purificarla en una placa preparativa con la fase móvil anterior, puesto que al verificar la pureza de la fracción por ccf, se observó una cantidad mayor de manchas. Debido a lo anterior, no se logró aislar el compuesto puro.





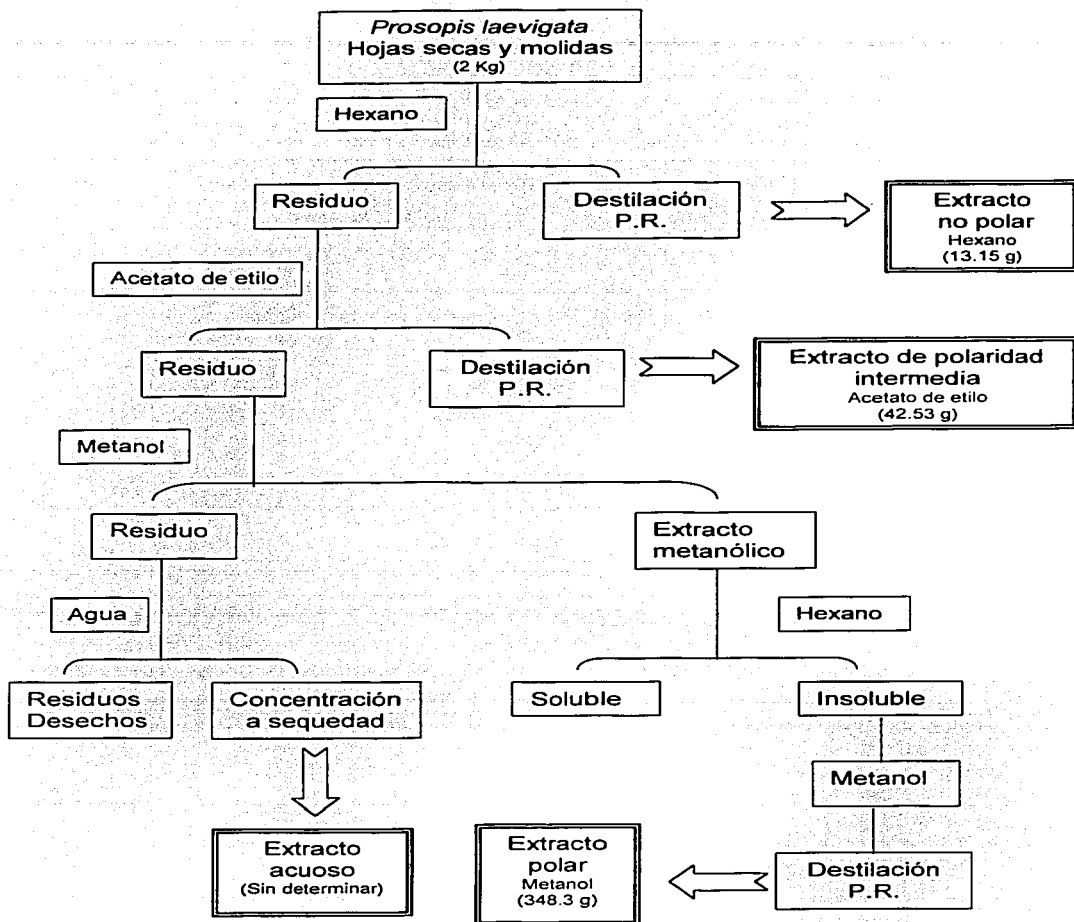


Figura 11. Procedimiento para la extracción de las hojas de *P. laevigata*. Presión reducida (P.R.).

Segundo proceso

#### 5.4.5. Fraccionamiento del extracto de acetato de etilo de las hojas de *P. laevigata*

El extracto de acetato de etilo (42.53 g), se fraccionó en una cromatografía en columna empacada con 650 g de gel de sílice 60 F<sub>254</sub>. Se utilizaron como sistemas de elución las mezclas de Hexano-AcOEt y AcOEt-MeOH aumentando gradualmente la polaridad. Se recolectaron 135 fracciones de 500 ml cada una (Tabla 8). El fraccionamiento fue verificado mediante ccf.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones Recolectadas	Fracciones Combinadas	Clave de la Fracción	Peso (g)
Hexano	100	1-5			
Hexano-AcOEt	9:1	6-14	4-11	Cera	0.830
Hexano-AcOEt	8:2	15-35			
Hexano-AcOEt	7:3	36-52			
Hexano-AcOEt	6:4	53-64			
Hexano-AcOEt	5:5	65-80			
AcOEt	100	81-90			
AcOEt-MeOH	9:1	91-98			
AcOEt-MeOH	8:2	99-115	99-105	Glucósido de sitosterol	0.658
AcOEt-MeOH	7:3	116-121			
AcOEt-MeOH	6:4	122-127			
AcOEt-MeOH	5:5	128-134			
MeOH	100	135			

Tabla 8. Fraccionamiento del extracto de acetato de etilo de las hojas de *P. laevigata*.

De la fracción 4-11 se aisló un sólido blanco cuyo punto de fusión es de 78-80 °C (compuesto 5). A este compuesto sólo se le realizó el estudio de IR (Espectro 13).

A partir de la fracción 99-105 se aisló un sólido amorfo blanco, que descompone a 284 °C. El  $r_f$  de este compuesto se comparó con una muestra auténtica del glucósido de sitosterol, en varios sistemas cromatográficos, por lo que se concluyó que se trataba del mismo compuesto.

## 6. Resultados

### 6.1 Datos de herbario de la planta *P. laevigata*

La planta *P. laevigata* fue colectada en la localidad de Zapotitlán Salinas, Puebla. La determinación de la especie fue realizada por el técnico de campo Ismael Calzada y la Biol. Ma. Edith López Villafranco, Jefa del Herbario IZTA de la FES-Iztacala.

Los datos de herbario se encuentran en la siguiente tabla:

Nombre común	Mezquite
Especie	<i>Prosopis laevigata</i> (Humb. & Bonpl. Ex Willd) M.C. Johnston.
Familia	Leguminosae
Número de registro	24984

Tabla 9. Datos de herbario de *P. laevigata*.

### 6.2. Evaluación preliminar de la actividad antibacteriana de la raíz, tallo y hoja

#### 6.2.1 Rendimiento de los extractos

El rendimiento de cada extracto se determinó como se describe en el apéndice 1. Los resultados se observan en la siguiente tabla:

Parte empleada	Rendimiento							
	Agua		MeOH		AcOEt		Hexano	
	(g)	%	(g)	%	(g)	%	(g)	%
Raíz	0.35	0.70	0.90	1.80	0.43	0.85	0.19	0.37
Tallo	0.45	0.90	2.65	5.30	0.76	1.52	0.28	0.56
Hoja	0.50	1.08	7.82	15.65	0.65	1.29	0.93	1.84

Tabla 10. Rendimiento de los extractos de raíz, tallo y hoja de *P. laevigata*.



En la tabla 10 se observa que en la mayoría de los casos, los extractos de hoja tienen el mayor rendimiento. Por tanto la hoja es la parte de la planta que contiene la mayor cantidad de metabolitos. Además, por el rendimiento del extracto metanólico de hoja, podemos decir que la planta sintetiza principalmente compuestos polares que son extraídos con dicho solvente.

### 6.2.2. Bioensayos preliminares de raíz, tallo y hoja

Los reportes bibliográficos mencionan que varias especies del género *Prosopis* son empleadas en la medicina tradicional para combatir diversos procesos infecciosos (Langford, 1969; Aguilar *et al.*, 1994; Vázquez-Yañez, 1999). Sin embargo, no especifican la parte de la planta que tiene dicha actividad. Por lo tanto, el primer objetivo del presente trabajo, consistió en determinar la parte activa de la planta. Esto se hizo por medio de la evaluación de la actividad antibacteriana de las diferentes partes de la planta (raíz, tallo y hoja), utilizando solventes de diferentes polaridades (hexanos, acetato de etilo, metanol), para obtener los extractos.

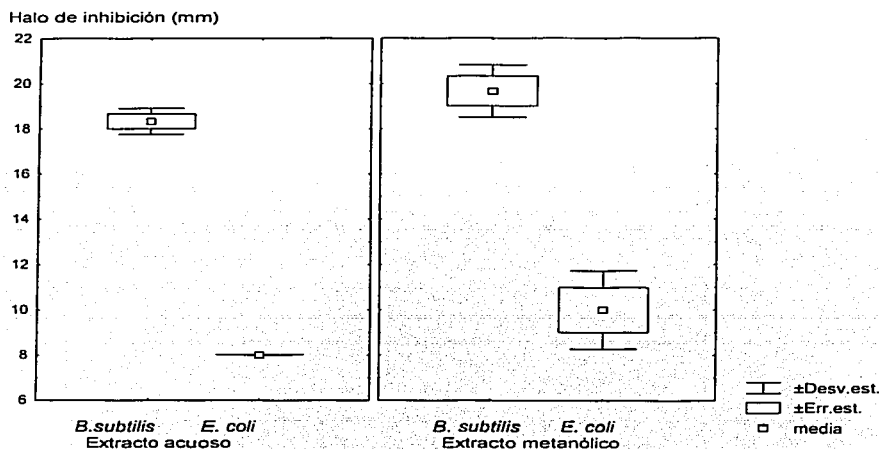
La actividad antimicrobiana de los extractos se determinó cualitativamente mediante la técnica de Kirby-Bauer (Apéndice 2). El promedio de los resultados se muestran en la tabla 11.

Parte empleada	Solventes							
	Agua		MeOH		AcOEt		Hexano	
	<i>B.subtilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>E.coli</i>
Raíz	-	-	-	-	-	-	-	-
Tallo	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoja	18 ± 0.5	8 ± 0.5	19 ± 0.5	10 ± 0.5	-	-	-	-
C +	28 ± 0.5	17 ± 0.5	28 ± 0.5	17 ± 0.5	28 ± 0.5	17 ± 0.5	28 ± 0.5	17 ± 0.5
C -	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 11. Bioensayos preliminares empleando la técnica de Kirby-Bauer de los extractos de *P. laevigata*. Se muestra el promedio de tres experimentos. Control positivo cloramfenicol 30 µg/disco (C+), Control negativo cada uno de los solventes empleados (C-). No hubo inhibición del crecimiento (-).

Los resultados obtenidos en esta prueba, muestran que solamente los extractos polares de las hojas (acuoso y metanólico) poseen actividad antibacteriana en las cepas bacterianas con las que se realizó el bioensayo.

El análisis de varianza de dos factores en el que se compara la actividad antibacteriana del extracto metanólico y el acuoso, muestra que la actividad de los extractos varía dependiendo de la cepa empleada, puesto que existen diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) en la sensibilidad de las bacterias. Se observa claramente que la cepa *B. subtilis* es más sensible a los dos extractos en comparación a la cepa *E. coli* (Gráfica 1). Además, no hay diferencias estadísticas significativas en la actividad antibacteriana entre los extractos acuoso y metanólico.



Gráfica 1. Sensibilidad de *B. subtilis* y *E. coli* a los extractos acuoso y metanólico de hojas de *P. laevigata*.

### 6.3. Extractos de hoja

#### 6.3.1. Rendimiento

Se prepararon los extractos de diferentes polaridades a partir de hojas secas, según la metodología descrita (Figuras 10 y 11). El rendimiento de los dos procesos de extracción se muestra en la tabla 12, en donde se puede observar que de igual forma que en los extractos preparados para la evaluación preliminar de la actividad antibacteriana, el extracto metanólico obtuvo, en promedio, el mayor rendimiento (18.45%). Cabe hacer notar que el rendimiento de estos extractos, fue mayor que en los extractos anteriores, lo cual puede deberse a que la técnica empleada es más eficiente.

Solvente	Rendimiento				
	Primera extracción		Segunda extracción		Promedio
	(g)	%	(g)	%	%
Agua	4.18	1.68	S.D.	S.D.	SD.
MeOH	48.60	19.5	348.30	17.4	18.45
AcOEt	5.69	2.29	42.53	2.12	2.20
Hexanos	2.73	1.1	13.15	0.68	0.88

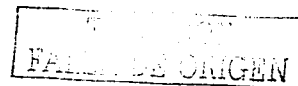
Tabla 12. Rendimiento de los extractos de hojas. Sin determinar (SD)

#### 6.3.2. Actividad antibacteriana de los extractos de hoja

##### 6.3.2.1. Determinación de la actividad antibacteriana de manera cualitativa

La actividad antibacteriana de todos los extractos de hoja se evaluó cualitativamente en doce cepas de bacterias, como se indica en la sección 5.3.1.1. de la metodología.

Los resultados obtenidos con los extractos de hoja se observan en la tabla 13. Estos concuerdan con los datos obtenidos en la evaluación preliminar. En ambos casos, la actividad está presente solo en los extractos polares (acuoso y metanólico).



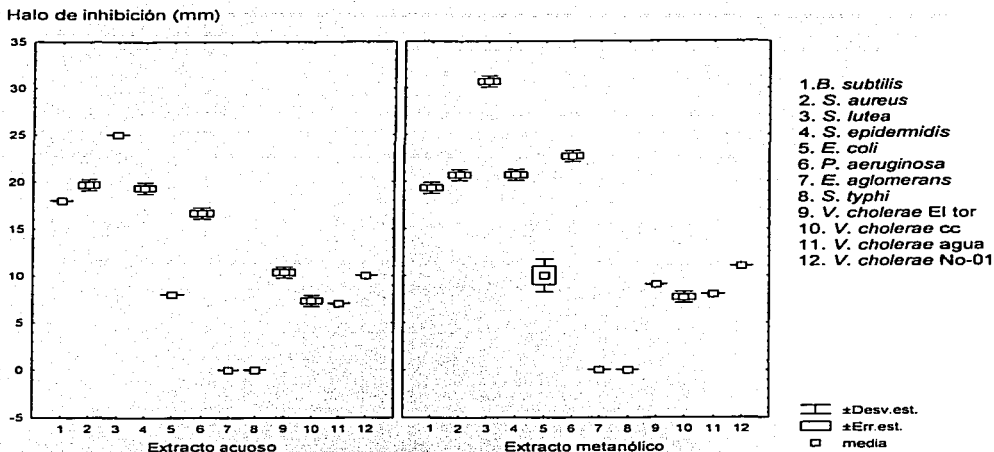
Bacterias	Halos de inhibición $\pm$ 0.5 mm (1 mg/disco)					
	Acuoso	MeOH	AcOET	Hexano	C +	C -
<i>B. subtilis</i>	18.5	20.5	-	-	28	-
<i>S. aureus</i>	20.5	21.5	-	-	25	-
<i>S. epidermidis</i>	20.5	21.5	-	-	21	-
<i>S. lutea</i>	31.5	25.5	-	-	30	-
<i>E. coli</i>	8.0	9.5	-	-	25	-
<i>S. typhi</i>	-	-	-	-	25	-
<i>P. aeruginosa</i>	17.5	23.5	-	-	30	-
<i>E. aglomerans</i>	-	-	-	-	24	-
<i>V. cholerae</i> El Tor	10.0	9.0	-	-	30	-
<i>V. cholerae</i> cc	7.5	8.5	-	-	30	-
<i>V. cholerae</i> agua	7.0	8.0	-	-	34	-
<i>V. cholerae</i> No-O1	10.5	11.0	-	-	35	-

Tabla 13. Bioensayo de difusión en agar (Kirby-Bauer) de los extractos de hoja. Se muestra el promedio de tres experimentos. Control positivo cloramfenicol 30  $\mu$ g/disco (C+). Control negativo cada uno de los solventes empleados (C-). No hubo inhibición del crecimiento (-).

Los extractos acuoso y metanólico presentaron actividad antibacteriana en las mismas cepas bacterianas. En ocho de las doce cepas, el extracto metanólico tiene mayor actividad que el acuoso, lo cual puede deberse a que este último, por su naturaleza, presenta un mayor contenido de carbohidratos que promueven el crecimiento bacteriano (Gráfica 2). Ambos extractos, muestran actividad antimicrobiana sobre las cuatro cepas de bacterias Gram positivas: *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. lutea*. En contraste, solo presentaron actividad antibacteriana, en seis de las ocho bacterias Gram negativas: *E. coli*, *P. aeruginosa*, y las cuatro cepas de *V. cholerae*.





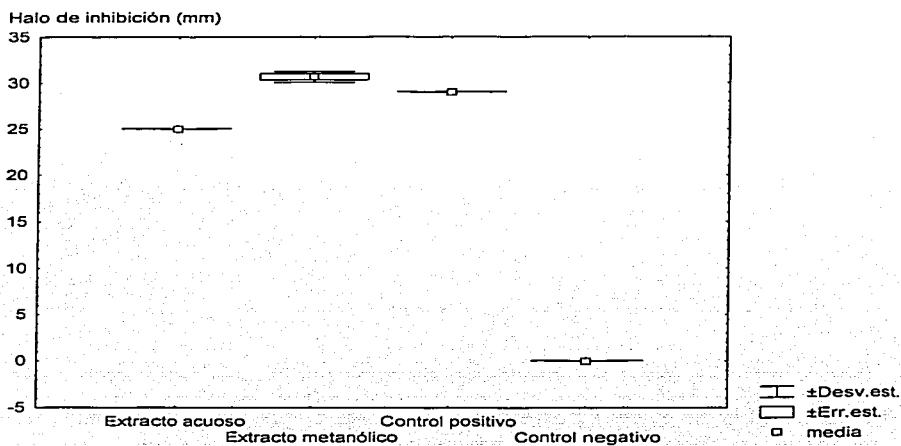


Gráfica 2. Sensibilidad de las cepas bacterianas con los extractos acuoso y metanólico de hojas de *P. laevigata*.

El análisis de varianza de dos factores en el que se compara la actividad antibacteriana del extracto metanólico y el acuoso en las 12 cepas bacterianas, muestra otra vez, que la actividad de los extractos varía dependiendo de la cepa empleada, puesto que existen diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) con respecto a la sensibilidad de las bacterias

Para el caso de *S. aureus*, *E. coli*, *E. agglomerans*, *S. typhi*, *V. cholerae* cc, y *V. cholerae* agua, no existen diferencias significativas, en la actividad de los extractos. En contraste, para *B. subtilis*, *S. lutea*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *V. cholerae* El tor y *V. cholerae* No-01, si se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos extractos ( $p < 0.001$ ). Por tanto, el extracto metanólico presenta mayor actividad antibacteriana que el extracto acuoso.

En el caso de la cepa de *S. lutea* (Gráfica 3), el extracto metanólico presenta mayor actividad con respecto al cloramfenicol. Este hecho es único en el trabajo y muestra que esta cepa, es la más sensible, por tal motivo, esta se seleccionó para evaluar la actividad antibacteriana en la siguiente parte del estudio.



Gráfica 3. Sensibilidad de la cepa *S. lutea* con el extracto metanólico de hojas de *P. laevigata*.

**6.3.2.2. Determinación de la actividad antibacteriana de manera cuantitativa. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida mínima (CBM)**

La evaluación cuantitativa de los extractos acuoso y metanólico se describe en la sección 5.3.1.2. de la metodología. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Bacterias	Acuoso		MeOH	
	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CBM ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CBM ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>B. subtilis</i>	10	20	20	40
<i>S. aureus</i>	40	80	20	40
<i>S. epidermidis</i>	20	40	20	40
<i>S. lutea</i>	10	20	20	40
<i>E. coli</i>	100	200	40	80
<i>P. aeruginosa</i>	100	200	40	80
<i>V. cholerae</i> El tor	200	500	> 1	1
<i>V. cholerae</i> cc	100	200	20	40
<i>V. cholerae</i> agua	80	100	> 1	1
<i>V. cholerae</i> No-O1	100	200	80	100

Tabla 14. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) del extracto acuoso y metanólico.

Estos resultados muestran uniformidad en la actividad antibacteriana del extracto metanólico, sobre cepas Gram positivas, ya que en todos los casos ambos parámetros evaluados son iguales. Esto refleja que probablemente el o los principios activos afectan la función de la pared celular de este tipo de bacterias.



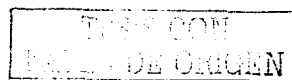
El extracto acuoso, en la mayoría de las bacterias, presentó menor actividad que el extracto metanólico, ya que fue necesario el doble de extracto para alcanzar los parámetros evaluados (CMI y CBM). Esto podría ser un reflejo de que el extracto metanólico contiene más compuestos activos y posiblemente en mayor cantidad. Por tanto, este último extracto fue seleccionado para hacer el estudio fitoquímico, buscando el o los principios activos.

#### **6.4. Estudio fitoquímico**

##### **6.4.1. Bioensayos para el fraccionamiento del extracto metanólico**

Los resultados que se presentan en la tabla 15 muestran que todas las fracciones que se obtuvieron a partir del extracto metanólico, fueron activas para la cepa *S. lutea*. Sin embargo, el grupo de fracciones que tuvo actividad tanto en Gram positivas como negativas, fueron las alícuotas de la 167 a la 232, a este grupo se les denominó fracción P.I. (1) y se seleccionó para aislar sus componentes. En las otras fracciones activas no se separaron sus componentes ya que al monitorear el desarrollo de la columna por ccf, mostraban gran diversidad de componentes y con poca concentración de cada uno de ellos.

El fraccionamiento del extracto metanólico provocó un incremento en la actividad, ya que hubo un aumento en el diámetro de los halos de inhibición, aun cuando la cantidad aplicada en los sensibilizadores, fue la mitad que la empleada con el extracto. Lo anterior se debe a que al separar mediante la cromatografía, el o los compuestos activos, se aumenta la concentración de estos en una fracción.



Fracción	Halos de inhibición ± 0.5 mm (500 µg/disco)	
	<i>S. lutea</i>	<i>E. coli</i>
C-	-	-
C+	30	26
1-9	8	-
10-16	9	-
19-21	9	9
22-80	10	9
81-96	9	-
97-106	20	-
107-166	23	11
167-232 P.I (1)	34	19
234-243	20	13

Tabla 15. Evaluación cualitativa (Kirby-Bauer) de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del extracto metanólico. Control positivo Cloramfenicol 30 µg/disco (C+), control negativo metanol (C-). No hubo inhibición del crecimiento (-).

#### 6.4.1.1. Separación de la fracción P.I. (1)

La fracción denominada P.I. (1) (167–234, 15 g) se separó y a cada grupo de fracciones obtenidas, se les evaluó la actividad antibacteriana de la misma forma que en la cromatografía anterior, solo que en este caso se cambió la concentración de los sensibilizadores a 250 µg/disco.

Los resultados del bioensayo se muestran en la tabla 16 donde se observa que la fracción 50–89 denominada P.I. (2) tuvo mayor actividad antibacteriana, y el mejor rendimiento (4.2 g). Por tanto, esta fracción fue seleccionada para su posterior separación.



Fracción	Halos de inhibición $\pm$ 0.5 mm (250 $\mu$ g/disco)	
	<i>S. lutea</i>	<i>E. coli</i>
C-	-	-
C+	30	26
1-2	-	-
3-9	-	-
10-12	10	9
13-15	13	11
16-34	15	10
35-49	23	10
50-89 P.I (2)	30	15
90-100	-	-

Tabla 16. Evaluación cualitativa (Kirby-Bauer) de las fracciones obtenidas  $\pm$  0.5 mm en columna de la fracción P.I. (1). Control positivo Cloramfenicol 30  $\mu$ g (C+), Control negativo metanol (C-). No hubo inhibición del crecimiento (-).

#### 6.4.1.2. Separación de la fracción P.I. (2)

La separación de la fracción P.I.(2) originó cinco grupos de fracciones con actividad antibacteriana, los resultados del bioensayo se muestran en la tabla 17. Cabe resaltar la actividad de los grupos de fracciones 46-59, denominada P.I.(3) y 50-61, denominada P.I.(4), debido a que presentaron mayor actividad.

El principal componente de la fracción P.I (3) fue sacarosa (1.5 g), lo cual indica que el o los compuestos activos se encontraban en mínimas cantidades en dicha fracción. Debido a ello, esta fracción no se continuó analizando. La fracción P.I.(4), fue la que presentó mayor actividad antibacteriana y rendimiento. Por tanto, en el proceso de purificación se continuó con esta fracción.

Fracción	Halos de inhibición ± 0.5 mm (250 µg/disco)	
	<i>S. lutea</i>	<i>E. coli</i>
C-	-	-
C+	30	26
1-6	-	-
7-10	-	-
11-23	-	-
24-30	22	10
31-45	23	12
46-49 P.I (3)	25	12
50-61 P.I (4)	30	15
62-68	11	9

Tabla 17. Evaluación cualitativa (Kirby-Bauer) de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna de la fracción P.I. (2). Control positivo Cloramfenicol 30 µg (C+), Control negativo metanol (C-). No hubo inhibición del crecimiento(-).

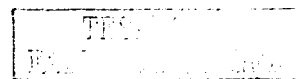
#### 6.4.1.3. Separación de la fracción P.I. (4)

La fracción P.I (4) presentaba al menos dos componentes principales. Por lo que se procedió a su separación. En el proceso de purificación, solo se obtuvo un grupo de fracciones activas 24-30, denominada P.I (5) (150 mg). Esta fracción en ccf mostraba dos componentes, al separarlos, solo se logró obtener 3 mg de cada uno. Sin embargo, estos compuestos no fueron activos.

#### 6.4.1.4 Extracto metanólico de hojas (segundo proceso)

Con la intención de aislar el compuesto responsable de la actividad antibacteriana, que se encuentra presente en el extracto metanólico de las hojas de *P. laevigata* se realizó un segundo proceso de extracción, el cual es descrito en la metodología.

En el proceso de separación, se obtuvieron 8 g de la fracción denominada P.I. (3 II), de la cual se cristalizaron 4.2 g de sacarosa. Los componentes de las aguas madres se separaron por medio de una columna de sephadex LH-20.



De las cuatro fracciones denominadas IS; IIS; IIIS y IVS. Obtenidas de la columna de sephadex sólo la fracción IS (208 mg) presentó actividad antibacteriana. Esta fracción mostraba dos componentes los cuales fueron separados en una cromatografía en columna. Se obtuvo una fracción activa, de naturaleza polar, absorbía la luz UV a 366 nm y reaccionaba con el cloruro férrico, así que se dedujo que se trataba de un flavonoide glucosilado. Esta fracción se descompuso al tratar de purificarla, mediante una cromatografía en placa preparativa. Por lo que se propone para estudios posteriores emplear otros sistemas cromatográficos para realizar la purificación de estos metabolitos.

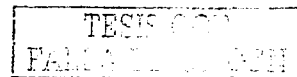
#### **6.4.2. Principales metabolitos secundarios aislados de las hojas de *P. laevigata***

##### **6.4.2.1. Extracto metanólico**

###### **A) Pinitol**

De las fracciones 10-15, obtenidas de la separación del extracto metanólico, se aisló un sólido cristalino blanco, con p. f. de 186–188 °C, al cual se le realizaron los estudios de IR, RMN <sup>1</sup>H y masas.

El espectro de infrarrojo en nujol muestra dos bandas anchas en la región de 3400.184 y 3316.602 cm<sup>-1</sup>, las cuales corresponden al grupo hidroxilo. En la región de 2953.810, 2923.396 y 2853.903 cm<sup>-1</sup> se observan las señales características de la unión carbono-hidrógeno. La banda de confirmación del grupo hidroxilo de azúcares se observa en la zona de 1072.214 cm<sup>-1</sup> (Pretsch *et al.*, 1980). Estos datos sugieren que en el metabolito aislado es un compuesto orgánico que únicamente presentaba grupos hidroxilos de azúcares (Espectro 1).



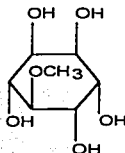


El espectro de RMN<sup>1</sup>H (Espectro 2) muestra en  $\delta$  3.4265 una señal característica de los protones de metoxilo y entre  $\delta$  2.9387 a 3.0295 varias señales del protón base del grupo hidroxilo de ciclitoles (Tabla 18).

Desplazamiento ( $\delta$ )	Multiplicidad	Integración	Interpretación
3.4265	s	3 H	Metoxilo
2.9387 a 3.3992	m		Base deOH

Tabla 18. Desplazamientos químicos en RMN<sup>1</sup>H del pinitol.

Por los resultados espectroscópicos y el punto de fusión se supuso que el metabolito aislado era pinitol, un derivado metoxilado del inositol. Para confirmar lo anterior el espectro de RMN<sup>1</sup>H fue comparado con el espectro número 7531 del catálogo Sadtler y por la similitud entre ambos espectros se concluyó que realmente se trataba del pinitol (12) (Sadtler, 1988)



Pinitol (12)

El espectro de masas obtenido mediante la técnica de FAB-MS (Espectro 3) presenta la señal del ion molecular 195, el cual coincide con la fórmula molecular C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub> M+1, que coincide con el peso molecular del pinitol. También se observa el ion 180 que coincide con la pérdida del grupo metoxilo.

## **B) Sales de Potasio**

De la fracción 168-190 se aisló un sólido cristalino blanco cuyo p. f. es superior a los 500 °C. Al realizar el ensayo a la flama se produce el color característico de las sales de potasio.

## **C) Ácido 4-hidroxi-pipecólico**

De la fracción 234-243 (eluida con metanol) se obtuvieron cristales blancos con forma de aguja. Su punto de fusión fue de 307 °C, a los cuales se les realizaron los estudios de IR, MS, RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C.

El espectro de infrarrojo tanto en pastilla como en nujol mostró varias bandas en la región de 3267.77 a 2496.34 cm<sup>-1</sup>, que corresponden al grupo amida, además de una banda en 1610.6 cm<sup>-1</sup> reportada para N-H; esto junto al punto de fusión tan alto sugiere que se trata de un aminoácido (Silverstein, 1991) (Espectro 4).

El espectro de RMN <sup>1</sup>H (Espectro 5) presenta una señal en multiplete con integración para un protón en el intervalo  $\delta$  4.068 a 4.115, característica del protón base de un grupo OH. En la región entre  $\delta$  3.747 a 3.799 la señal es de un doble de dobles (*J* 3.6, 3.3) la cual corresponde a un protón del carbono  $\alpha$ . La zona entre  $\delta$  3.141 a 3.185 muestra un multiplete, con integración que corresponde a dos protones de un metileno vecino a un grupo amino. En el intervalo  $\delta$  2.115 a 2.038 y 1.735 a 1.871 se observan multipletes que por su desplazamiento químico y su integración se atribuyen a dos grupos metileno (Tabla 19).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Desplazamiento ( $\delta$ )	Multiplicidad	Integración	Interpretación
4.068-4.115	m	H	Base de OH
3.747-3.799	dd ( $J$ 3.6, 3.3)	H	Vecino a COOH y NH
3.141-3.185	m	2H	CH <sub>2</sub> vecino NH
2.115-2.036	m	2H	CH <sub>2</sub>
1.735-1.871	m	2H	CH <sub>2</sub>

Tabla 19. Desplazamientos químicos en RMN<sup>1</sup>H del ácido 4-hidroxi-pipecólico.

El espectro de RMN<sup>13</sup>C mostró los siguientes desplazamientos químicos (Espectro 6): en  $\delta$  175.01 una señal que corresponde un carbonilo, dos señales de metinos, una a  $\delta$  62.631 característica de un C unido a OH y otra que aparece en  $\delta$  54.752 (esta señal es típica del carbono  $\alpha$ ), el cual soporta al nitrógeno y al grupo carboxilo, además se observan tres desplazamientos para metilenos, en  $\delta$  39.351,  $\delta$  33.601 y  $\delta$  28.734 (Castells, 1980) (Tabla 20).

Número de Carbono	Desplazamiento ( $\delta$ )	Asignación por DEPT ( $\delta$ )
Carbonilo	175.01	
2	54.752	CH
3	33.601	CH <sub>2</sub>
4	62.631	CH
5	28.734	CH <sub>2</sub>
6	39.351	CH <sub>2</sub>

Tabla 20. Desplazamientos químicos en RMN<sup>13</sup>C y DEPT del ácido 4-hidroxi-pipecólico.

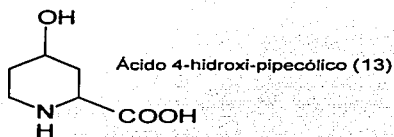
El espectro DEPT corresponde con las señales del espectro de RMN<sup>13</sup>C, confirmando que en la molécula hay tres metilenos CH<sub>2</sub> en 39.339, 33.613 y 28.733; dos metinos CH en 62.633 y en 54.737; y un carbono cuaternario en 175.01 (Espectro 7).

El espectro COSY (Espectro 8) muestra correlación del protón unido al carbono  $\alpha$  (C2  $\delta$  3.47 a 3.79) con dos protones de metileno, presentes en  $\delta$  2.145 a 2.038 y  $\delta$  1.735 a 1.871 (C3); por otro lado tenemos correlación entre los protones

metilénicos vecinos al grupo amino (C6  $\delta$  3.141 a 3.185 ) con dos protones de un grupo metileno (C5  $\delta$  1.735 a 1.871). De acuerdo a estas correlaciones podemos asignarle al protón base del OH el número C4.

Las correlaciones heteronucleares se observan en el espectro HETCOR, así podemos ver la correlación de la señal del C4 ( $\delta$  62.533) con su protón ( $\delta$  4.068–4.115). La señal del C2 ( $\delta$  54.737) con el protón en  $\delta$  3.74–3.799. El C6 ( $\delta$  39.339) se correlaciona con los protones  $\delta$  3.141–1.185, el C3 ( $\delta$  33.613) con los protones  $\delta$  2.238–1.715 y la correlación del C5 ( $\delta$  28.733) con los protones en  $\delta$  1.735–1.571 (Espectro 9).

La estructura propuesta corresponde al ácido (-) trans 4-hidroxi-L-pipecólico (13) un aminoácido no proteínico derivado de la lisina.



El espectro de masas por impacto electrónico (Espectro 10) presenta un ion molecular de  $m/z$  145, congruente con la fórmula molecular  $C_6H_{11}O_3N$ , y concuerda con la estructura propuesta. El patrón de fragmentación propuesto a partir del espectro de masas se observa en la figura 12.

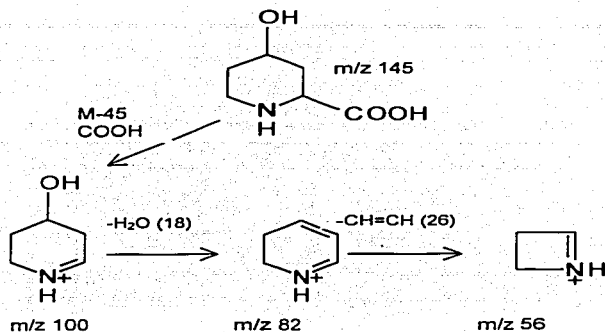


Figura 12. Patrón de fragmentación del ácido 4-hidroxi-piperidínico.

#### D) Sacarosa

En el proceso de fragmentación del extracto metanólico se aisló un sólido cristalino con forma cúbica, con p.f. de 190 °C. A estos cristales se les realizaron los estudios de RMN<sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C.

El espectro de RMN<sup>1</sup>H (Espectro 11) muestra en la región  $\delta$  5.3877 a 5.3686 un doblete ( $J$  3.78) característico del protón anomérico de la glucosa. En la región entre  $\delta$  4.2 a 4.0 se observa un multiplete que se atribuye a los grupos metinos de azúcares. La zona de  $\delta$  3.9 a 3.5 muestra un multiplete que se atribuyen a tres grupos metilenos de azúcares (Tabla 21).

Desplazamiento ( $\delta$ )	Multiplicidad	Interpretación
5.4	d ( $J$ 3.78)	Anomérico de la glucosa
4.2-4.0	m	Metinos de azúcares
3.9-3.5	m	Metilenos de azúcares

Tabla 21. Desplazamientos químicos en RMN<sup>1</sup>H de la sacarosa

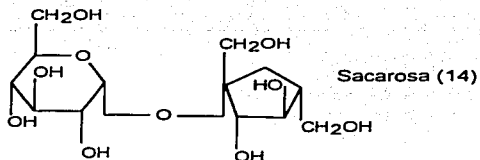
El espectro de RMN<sup>13</sup>C (Espectro 12) muestra una señal en la zona  $\delta$  105 correspondiente al carbono anomérico de la glucosa, en  $\delta$  94 la señal corresponde al carbono anomérico de la fructosa. También se observan siete desplazamientos en la región entre  $\delta$  84 a 70, típicas de los grupos metinos de azúcares y por último se observa la presencia de tres señales de metilenos en la zona de  $\delta$  65 a 62 (Tabla 22).

Asignación por <sup>13</sup> C ( $\delta$ )	Número de señales	Interpretación
105	1	Anomérico de la glucosa
94	1	Anomérico de la fructosa
84-70	7	Metinos de azúcares
65-62	3	Metilenos de azúcares

Tabla 22. Desplazamientos químicos en RMN<sup>13</sup>C de la sacarosa.

Los resultados de los espectros de RMN<sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C, además del p.f., indicaban que se trataba de sacarosa. Para confirmar lo anterior el espectro de RMN<sup>1</sup>H se comparó con los espectros de la sacarosa (6242) y del acetato de la sacarosa (12573) del catálogo Sadtler y por la similitud de espectros se concluyó que el compuesto aislado era sacarosa (Sadtler, 1969 y 1972).

TRISIS CON  
FALSA DE ORIGEN



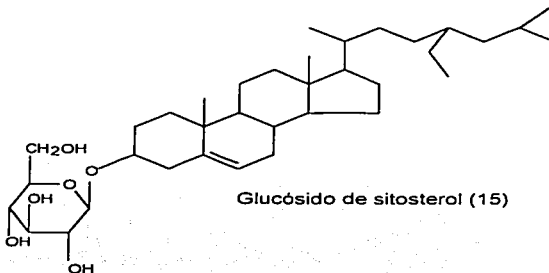
### 6.5.2. Extracto de acetato de etilo

#### A) Cera

El fraccionamiento del extracto de acetato de etilo se llevó acabo mediante cromatografía en columna. De la fracción 4-11 se aisló un sólido blanco cuyo punto de fusión es de 78-80 °C. Se obtuvo el espectro de IR y sólo se observan las bandas características de una cera, las cuales corresponden a un grupo carbonilo ( $1725.69\text{ cm}^{-1}$ ) y de carbono-hidrógeno ( $2855.29\text{ cm}^{-1}$ ,  $2927.33\text{ cm}^{-1}$  y  $2956.38\text{ cm}^{-1}$ ) (Espectro 13).

#### B) Glucósido de sitosterol

A partir de la fracción 99-105 se aisló un sólido amorfo blanco, que descompone a 284 °C. El  $r_f$  de este compuesto coincide con el de una muestra auténtica del glucósido de sitosterol (evaluado en varios sistemas cromatográficos).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 7. Discusión

El rendimiento (% de sólidos) de los extractos preparados a partir de la raíz, el tallo y las hojas de *P. laevigata*, indica que la mayor parte de los compuestos presentes, en las diferentes partes de la planta son polares. Puesto que en la mayoría de los casos, el rendimiento de los extractos metanólicos fue mayor, destacando el extracto de hoja, en el que se obtuvo el 15.65% de rendimiento. Por tanto, las hojas de *P. laevigata* son ricas en metabolitos de naturaleza polar.

Los reportes de la medicina tradicional indican, que el mezquite es empleado para el tratamiento de enfermedades infecciosas producidas por bacterias, como infecciones de la garganta y de los ojos, así como dolor de estómago y disentería. Sin embargo, no se especifica, que parte de la planta se utiliza para el tratamiento de dichas infecciones.

Las enfermedades de la garganta y de los ojos, pueden ser causadas por diversos agentes patógenos, como pueden ser virus y bacterias. En esta investigación se utilizó a *B. subtilis*, debido a que generalmente, esta bacteria, produce infecciones de ojos, de oídos, del tracto urinario y del tracto respiratorio (Turnbull, 1996). También se utilizó una cepa de *S. aureus*, especie que se relaciona típicamente con infecciones del tracto respiratorio. Además, esta bacteria se puede encontrar en cuadros de osteomielitis, endocarditis, flebitis, meningitis e infecciones de la piel (Foster, 1996).

*S. epidermidis*, es un comensal de la piel. Sin embargo, esta especie junto con *S. aureus* y *P. aeruginosa*, en pacientes inmunocomprometidos, son las principales causas de infecciones hospitalarias (Foster, 1996; Iglecki, 1996). Estas especies, han desarrollado resistencia a múltiples antibióticos, antisépticos y desinfectantes.



Las infecciones gastrointestinales son producidas por bacterias coliformes Gram negativas, entre las cuales podemos mencionar a *E. coli*, *E. agglomerans*, y *S. typhi*. Las infecciones de este tipo, son uno de los problemas de salud en países subdesarrollados, afectando principalmente a la población infantil.

En el presente trabajo, se evidenció, que solo los extractos polares (acuoso y metanólico), obtenidos de las hojas de *P. laevigata*, tienen actividad antibacteriana en las cuatro cepas Gram positivas con las que se realizaron los bioensayos (*S. lutea*, *B. subtilis*, *S. aureus* y *S. epidermidis*). En contraste, dichos extractos, sólo fueron activos en seis de las ocho cepas Gram negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, y cuatro cepas de *V. cholerae*). Estos resultados muestran que el uso del mezquite en la medicina tradicional, puede ser eficaz para combatir las infecciones de los ojos y de las vías respiratorias altas.

Los parámetros antimicrobianos que se determinaron (CMI y CBM), muestran en la mayoría de los casos, que el extracto metanólico fue más activo que el extracto acuoso. Esto probablemente se deba, a que los extractos acuosos generalmente presentan compuestos que promueven el crecimiento bacteriano, como carbohidratos y aminoácidos.

El fraccionamiento del extracto metanólico fue biodirigido, con el propósito de aislar el o los metabolito (s) responsable (s) de la actividad antibacteriana. Sin embargo, no se logró aislar y caracterizar, debido a que probablemente existan fenómenos de sinergia entre los compuestos. Por otro lado, al menos uno de los compuestos activos es lábil, puesto que al seguir el proceso de separación mediante ccf se observó su descomposición. Además, en las hojas de *P. laevigata*, están presentes varios metabolitos que tienen dicha actividad, pero son componentes traza, por lo que no se pudieron aislar. Por tanto, se recomienda que en estudios posteriores se utilicen otros métodos de separación.



Las hojas de *P. laevigata*, contienen pinitol. Este, es uno de los principales osmolitos presentes en las familias Pinaceae y Leguminosae. Se ha observado la acumulación de este compuesto en plantas tolerantes a altas concentraciones de sal y en plantas tolerantes al estrés hídrico (Nguyen y Lamant, 1988; Smirnoff, 1988; Bray *et al.*, 2000; Noiraud, 2000;). El suelo de Zapotitlán Salinas, es considerado salino. Ahora bien, tomando en cuenta que la zona es árida y que la planta es una de las especies vegetales dominantes en la región, se puede pensar que la misma, ha desarrollado adaptaciones que le permiten establecerse en tales condiciones de estrés.

Las plantas que crecen en suelos salinos, incrementan el transporte de iones como el potasio y el calcio para disminuir los efectos tóxicos del sodio (Niu, 1995). Lo anterior, puede explicar en parte la presencia de sales de potasio en las hojas de *P. laevigata*.

A partir del extracto metanólico se aisló el ácido 4-hidroxipipecólico. Este, se ha aislado también de las semillas y las hojas de varias leguminosas, como *Acacia*, *Calliandra* y *Phaseolus*. (Zacharius *et al.*, 1954; Virtanen y Sigridkari, 1955 ; Clark y Mortimer, 1961; Romeo, 1983). El ácido pipecólico tiene actividad antifúngica (Brenner y Romeo, 1986) y fitotóxica (Rosenthal, 1987). Dichas actividades han sido relacionadas con la probable resistencia a patógenos.

Las plantas al estar sometidas a un déficit de agua, como es el caso de los mezquites que crecen en Zapotitlán Salinas, presentan mecanismos de adaptación, como el cierre de los estomas y el ajuste en el potencial osmótico del citoplasma, para lo cual incrementan la cantidad de solutos. Estos, son moléculas sin carga o zwitteriónicas, como la sacarosa aislada de las hojas del mezquite. Los solutos elevan la temperatura de desnaturalización de las proteínas globulares, evitan la inhibición de la actividad enzimática causada por sales inorgánicas y estabilizan a las proteínas unidas a la membrana celular (Geiger y Servaites,

1991; Muñoz-Clares, 1994). Además, la sacarosa es el principal producto de la fotosíntesis, y se considera regulador metabólico (Porchia *et al.*, 1999).

El extracto de acetato de etilo presentó ceras, las cuales son comunes en la superficie aérea de las especies vegetales. Las ceras son ésteres de ácidos grasos con alcoholes de cadena larga (Pine, 1988), que forman la cutícula vegetal, debido a lo cual son llamadas ceras epicuticulares. Estas, evitan la evaporación o pérdida excesiva de humedad. También, protegen a la planta de la pérdida de solutos, la radiación UV y contra la invasión de hongos, bacterias e insectos.

El glucósido de sitosterol se aisló del extracto de acetato de etilo. Este compuesto forma parte de las membranas celulares de vegetales. Participa en la síntesis de celulosa (Peng *et al.*, 2002). También se ha reportado que tiene un efecto inhibitor en la reproducción de trofozoitos de *Giardia gamblii* y *Entamoeba histolytica*, esta última es el agente infeccioso en algunos casos de disentería (Arrieta *et al.*, 2001).

## 8. Conclusiones

La parte de la planta *P. laevigata* donde se encontró actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas son las hojas.

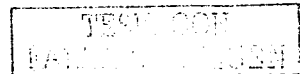
Los extractos acuosos y metanólicos de las hojas son los activos en las cepas: *S. lutea*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, y cuatro cepas de *V. cholerae*.

Los parámetros antimicrobianos evaluados (CMI y CBM), indican que el extracto metanólico es más activo que el acuoso. La CMI en bacterias Gram positivas se encuentra entre el rango de 10 a 40  $\mu\text{g/ml}$  y la CBM entre 20 a 80  $\mu\text{g/ml}$ . En el caso de las bacterias Gram negativas, la CMI oscila entre 1 a 200  $\mu\text{g/ml}$  y la CBM entre 1 a 500  $\mu\text{g/ml}$ .

El uso etnobotánico del mezquite esta justificado puesto que en este trabajo se comprueba que las hojas de *P. laevigata* tiene actividad antibacteriana. Además puede ser efectivo contra la disentería causada por *Entamoeba histolytica*. Debido a que las hojas contienen glucósido del sitosterol que ha sido reportado con dicha actividad.

El extracto metanólico de las hojas de *P. laevigata* contienen varios metabolitos con actividad antibacteriana, sin embargo, no se pudieron aislar ya que son varios compuestos que están en trazas, son lábiles y es posible que exista entre ellos el fenómeno de sinergia.

El estudio fitoquímico de la especie *P. laevigata* permitió aislar los principales metabolitos de las hojas: pinitol, sales de potasio, sacarosa, ácido (-) trans-4-hidroxipecólico, ceras, y el glucósido de sitosterol.



## 9. Bibliografía

- Adams, P., Thomas, J.C., Vernon, D.M., Bohnert, H.J., and Jensen, R.G. 1992. Distinct cellular and organismic responses to salt stress. *Plant Cell Physiology*. 33(8): 1215-1223.
- Aguilar, A., Camacho, J.R., Chino, S., Jáquez, P. y López, M.E. 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información etnobotánica. Instituto Mexicano del Seguro Social. México. pp.122.
- Anderson, D.M. W., Howlett, J. K. and McNab, C.G. A. 1985. The amino-acid composition of gum exudates from *Prosopis* spp. *Phytochemistry*. 24(11): 2718-2720.
- Aqeel, A., Khursheed, A., Viqaruddin, A. and Sabiha, Q. 1989. Antimicrobial activity of julifloricine isolated from *Prosopis juliflora*. *Arzneimittelforschung*. Jun. 39 (6): 652-655.
- Arrieta, J., Reyes, B., Calzada, F., Cedillo-Rivera, R. and Navarrete, A. 2001. Amoebicidal and giardicidal compounds from the leaves of *Zanthoxylum liebmannianum*. *Fitoterapia*. 72 (3): 295-7.
- Asakawa, Y. 1990. Terpenoids and aromatic compounds with pharmacological activity from bryophytes. In: Bryophytes. Their chemistry and chemical taxonomy. Edited by Zinmeister, H.D. Clarendon Press. Oxford England. pp. 394-397.
- Avila A., J.G. 1996. Actividad anti-*Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha. Tesis de Maestría en Microbiología. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.
- Barajas-Aceves, M. and Dendooven, L. 2001. Nitrogen, carbon and phosphorus mineralization in soils from semi-arid highlands of central Mexico amended with tannery sludge. *Bioresource Technology*. 77(2): 121-130.
- Barrera, C.C. 2001. Descripción y regionalización fisiográfica del Valle de Zapotitlán, Puebla. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México.
- Barry, A.L. y Thornsberry, C. 1987. Pruebas de susceptibilidad: Técnicas para pruebas de difusión. En: Lennette, E.H. Manual de microbiología clínica. 4ª ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. pp. 561-574.
- Bell, E. A. 1971. Comparative Biochemistry of non-protein aminoacids. In: Harborne, J.B., Boulter, D. and Turner, B.C. 1971. Chemotaxonomy of the leguminosae. Academic Press. London NY. pp. 179 -203



- Bragg, H.L., Bacon, D.J., McMillan, C. and Mabry, J.T. 1978. Flavonoid patterns in the *Prosopis juliflora* Complex. *Biochemical Systematics and Ecology*. 6: 113–116.
- Bray, E.A. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in plant science*. Reviews. 2(2): 48-54.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J. and Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B. B., Gruissem, W. and Jones, R.L. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Biologist. pp. 1158-1203.
- Brenner, S.A., and Romeo, J.T. 1986. Fungitoxic effects of nonprotein imino acids on growth of saprophytic fungi isolated from the leaf surface of *Calliandra haematocephala*. *Applied and Environmental Microbiology*. 51(4): 690-693.
- Bruneton, J. 1991. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Editorial Acribia. España. p. 594.
- Cavazos, D. R. [www.inifap.conacyt.mx/progs\\_a/forestal/prog\\_mezquite.html](http://www.inifap.conacyt.mx/progs_a/forestal/prog_mezquite.html). Programa Nacional de Investigación de Mezquite.
- Cantú, A.C.M. 1991. Zur biologie, okologie und schadwirkung der bluten- und fruchtschadlinge an der mesquitepflanze *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M. C. Johnst. in Nuevo Leon, Mexiko, unter besonderer berucksichtigung der samenkaf er (bruchidae). Gottingen : E. Goltze. p12.
- Churms, S.C., Merrfield, E.H. and Stephen, A.M. 1981. Smith degradation of gum exudates from some *Prosopis* species. *Carbohydrate Research*. 90: 261-267.
- Clark, L. and Mortimer, P.I. 1961. The 4–hydroxypiperic acid from *Acacia* species, and its stereoisomers. *J. Chem. Soc.* 189.
- Cordell, G.A. 2000. Biodiversity and drug discovery – a symbiotic relationship. *Phytochemistry*. 55:463–480.
- Espejel, C. M. I. 1980. *Prosopis laevigata* (H.B.W.) Johnston (Leguminosae), Distribución en el Estado de Puebla, usos y producción de goma. Tesis de Licenciatura. Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Finegold, S.M. y Jo Baron, E. 1989. Métodos para evaluar la efectividad antimicrobiana. En: Diagnóstico microbiológico. 7ª edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 191-210.
- Fisher, N.H. 1991. Sesquiterpenoid lactones. In: *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 7 "Terpenoids". Edited by Charlwood B. and Banthorpe. D.V. Academic Press. San Diego, Ca. USA. pp. 187-210.



- Ford, C. W. 1984. Accumulation of low molecular weight solutes in water stressed tropical legumes. *Phytochemistry*. 23 (5): 1007-1015.
- Fougere, F., Le Redulier, D. and Streeter, J.G. 1991. Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol*. 96: 1228-1236.
- Galindo, A. y García, M. 1986. Usos del mezquite (*Prosopis* l.) en el altiplano potosino. Sobretiro de Agrociencia. Centro de Botánica. Núm. 63. México. pp. 7-15.
- García, M.M.G. 2001. Mapeo y caracterización de las terrazas aluviales del Valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México.
- Geiger, D.R. and Servaites, J. 1991. Carbon allocation and response to stress. In: Mooney, H. A., Winner, W.E., Pell, E. and Chu, E. Response of plants to multiple stresses. Academic Press Inc. London N.Y. pp. 103 -124.
- Gillard, J., Abraham, A., Anderson, P.C., Beaulieu, P.L., Bogri, T.M. Bousquet, Y., Grenier, L., Guse, I. and Lavallée, P. 1996. Preparation of (2S, 4R)-4-hydroxyisopicolinic acid and derivatives. *J. Org. Chem.* 61, 2226 - 2231.
- Gómez Lorence, F., Signoret, P.J., y Abuin, M.M. C.1970. Mezquites y huizaches. Algunos aspectos de la economía. Ecología y taxonomía de los géneros *Prosopis* y *Acacia* en México. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables. pp. 54-147.
- González, M.S. y Peñalosa, C.I. 2000. Manual de Biomoléculas. ENEP Iztacala. UNAM. México.
- Goycoolea, F.M., Calderon de la Barca, A.M., Valderrama, J.R. and Valenzuela, J. R. 1997. Immunological and functional properties of the exudate gum from northwestern mexican mezquite (*Prosopis* spp.) in comparison with gum arabic. *Int. J. Biol. Macromol.* 21(1-2): 24-36.
- Hamburger, M. and Cordell, G.A. 1987. A direct bioautographic assay for compounds possessing antibacterial activity. *Journal of Natural Products*. 50 (1): 19-22.
- Hammond-Kosack, K. and Jones, J.D.G. 2000. Responses to plant pathogens. In: Buchanan, B.B., Gruissem, W. and Jones, R.L. Biochemistry and Molecular Biology of plants. American Society of Plant Biologist. pp. 1102-1156.
- Harborne, J. B. 1973. Phytochemical Methods. Editorial. Chapman and Hall. USA.
- Harborne, J. B. and Baxter, H. 1993. Phytochemical dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants. Taylor & Francis Ltd. London.

- Harborne, J. B. 1997. Biochemical Plant Ecology. In: Dey, P.M and Harborne, J.B. Plant Biochemistry. Academic Press.
- Hartmann, M.A. 1998. Plants sterols and the membrane environment. *Trends in plant science. Reviews.* 3 (5):170-175
- Heldt, H.W. 1997. Plant Biochemistry and Molecular Biology. Oxford University Press. pp. 352-359.
- Hendrickson, D.A. 1987. Reactivos y colorants. En: Lennette, E.H. (ed). Manual de microbiología clínica. 4ª edición. Edit. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. p. 1356
- Jones, R.N., Barry, A.L. Gavan, T.L. and Wasington, J. A. 1987. Pruebas de susceptibilidad: técnicas de microdilución y macrodilución en caldo. En: Lennette, E.H. Manual de microbiología clínica. 4ª ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp.1206-1212.
- Kashiwada Y, Wang, H.K., Nagao, T., Kitanaka, S., Yasuda, I., Fujioka, T., Yamagishi, T., Cosentino, L.M., Kozuka, M., Okabe, K., Ikeshiro, Y., Hu, C.Q., Ye, E. and Lee, K.H. 1998. Anti-AIDS agents-30-anti-HIV activity of aleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. *Journal of Natural Products.* 61 (9):1090-1095.
- Khan, R.A., Singh, A.K. and Agrawal, P.K. 1997. Sitosterol sucroside from the suckers of *Mentha arvensis*. *Phytochemistry.* 45(6):1295-1296.
- Khurseed, A.K., Arshad, H.F., Viqaruddin, A., Sabiha, Q., Sheikh, A.R. and Tahir, S.H. 1986. Antimicrobial activity of juliforina isolated from *Prosopis juliflora* *Arzneimittelforschung.* 3 (1):17-9.
- Kinghorn, D.A. 1992. Plants as sources of medicinally and pharmaceutically important compounds. In: Nigg, H.N. and Seigler, D. Phytochemical Resources for Medicine and Agriculture. Plenum Press. pp. 75-95.
- Koneman, W.E. 1985. Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
- Konishy, K., Ito, C. and Kanabra, H. 1987. Tannic acid in membranes. *Chem and Pharm Bull.* 35:1169.
- Koulocheri, S.D. and Haroutonians, S.A.1999. Asymmetric total synthesis of (-)-prosophyline. *Tetrahedron Letters.* Vol. 40: 6869-6870.

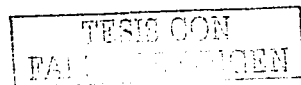
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



- Kubo, I. 1993. Antimicrobial activity of green tea flavor components. In: Bioactive volatile compounds from plants. Edited by Teranishi, R. and Buttery, R.G. American Chemical Society, Washington, D.C. USA. pp. 57-70.
- Kumar, R. 1992. *Prosopis cereaia* leaf tannins their inhibitory effect upon ruminal cellulase and the recovery of inhibition by polyethylene glycol-4000. *Basic life Sci.* 59: 699-704.
- Lamarque, A.L. and Guzman, C.A. 1997. Seed chemical variation in *Prosopis chilensis* from Argentina. *Genetic Resources & Crop Evolution.* 44 (6): 495-498.
- Lamarque, A.L., Fortunato, E.H. and Guzman, C.A. 1998. Seed oil alkanes from leguminosae especies: even carbon number preference. *Phytochemistry.* 49 (3): 731-736.
- Langford, A. 1969. Uses of mesquite. Texas Tech. University Lubbock. USA.
- Loewus, F.A. and Pushpalatha, M.P.N. 2000. *myo*-Inositol metabolism in plants. *Plants Science.* 150: 1-19.
- Malhotra, S. and Misra, K. 1981a. An ellagic acid glycoside from the pods of *Prosopis juliflora*. *Phytochemistry.* 20 (4): 860-861.
- Malhotra, S. and Misra, K. 1981b. Ellagic acid 4-*O*-rutinoside from the pods of *Prosopis juliflora*. *Phytochemistry.* 20 (10):2439-2440.
- Martínez. O.E., Saldivar, M.C. y Del Amo, S.R. 1976. El mezquite. Comunicado No. 6 sobre recursos bióticos potenciales del país. Instituto de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. A.C.
- McManus, M.T., Bielecki, R.L., Caradus, J.R., and Barker, D.J. 2000. Pinitol accumulation in mature leaves of white clover in response to a water deficit. *Environmental and Experimental Botany.* 43: 11-18.
- Mears, J.A. and Mabry, J.T. 1971. Alkaloids in the leguminosae. In: Harborne, J.B., Boulter, D. and Turner, B.L. Chemotaxonomy of the Leguminosae. Academic Press. London NY.
- Mori, A., Nishino, C., Enoki, N. and Tawata, S. 1987. Antibacterial Activity and Mode of Action of Plant Flavonoids Against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry.* 26 (8): 2231-2234.
- Moro, G.A., Graziano, N. and Coussio, J.D. 1975. Alkaloids of *Prosopis nigra*. *Phytochemistry.* 14:827.

- Muñoz Clares, R.A. 1994. Respuestas enzimáticas en hojas de plantas sometidas a déficit de agua. En: Vázquez Ramos. Bioquímica vegetal. Cuadernos de Posgrado. Facultad de Química. UNAM. pp. 93 –105.
- Nguyen, A. and Lamant, A. 1988. Pinitol and myo-inositol accumulation in water-stressed seedlings of *Maritime pine*. *Phytochemistry*. 27 (11): 3423-3427.
- Noiraud, N., Maurousset, L and Lemoine, R. 2001. Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiology Biochemistry*. 39: 717-728.
- Paredes, F.M. 2002. Contribución al estudio etnobotánico de la flora útil de Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México. p.111.
- Peng, L., Kawagoe, Y., Hogan, P. and Delmer, D. 2002. Sitosterol-beta-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants. *Science*. 4, 295 (5552): 59-60.
- Porchia, A.C., Fiol, D.F., and Salerno, G.L. 1999. Differential synthesis of sucrose and trehalose in *Euglena gracilis* cells during growth and salt stress. *Plant Science*. 149: 43-49.
- Pretsch, E., Clerc, T., Seibl, J. and Simon, W. 1980. Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos. Alhambra. España.
- Ramírez, H. 1995. Contribución al conocimiento de la flora medicinal de Zapotitlán de las Salinas Puebla. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. pp 23-34.
- Red Latinoamericana de Cooperación Técnica en Sistemas Agroforestales. 1997. Especies Arbóreas y Arbustivas para las Zonas Áridas y Semiáridas de América Latina. Serie: Zonas áridas y semiáridas. 12. Oficina regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Chile
- Reyes-Reyes, G., Baron-Ocampo, L., Cualí-Valcárcel, I., Frias-Hernández, J.T., Olalde-Portugal, V., Varela-Fregoso, L., and Dendooven, L. 2002. C and N dynamics in soil from the central highlands of México as affected by mesquite (*Prosopis* spp.) and huizache (*Acacia tortuosa*): a laboratory investigation. *Applied Soil Ecology*. 19: 27-34.
- Romo de Vivar, A. 1985. Productos Naturales de la Flora Mexicana. Editorial Limusa. México.
- Rosenthal, G.A. 1987. Plant nonprotein amino and imino acids. Biological, Biochemical and Toxicological Properties. Academic Press. N.Y. pp 141 –191.

- Rzedowski, G.C. 1979. La Flora Fanerogámica del Valle de México. Editado por Rzedowski J. Vol I. Compañía Editora Continental. México. pp. 144-147.
- Rzedowski, J. 1988. Análisis de la distribución geográfica del complejo *Prosopis* (Leguminosae, Mimosoideae) en Norteamérica. *Acta Botánica Mexicana*. 3: 7-19.
- Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 30 (12): 3875-3883.
- Silverstein, R.M., Bassier, G.C. and Morrill, T.C. 1991. Spectrometric identification of organic compounds. 5 ed. N.Y. E.U.A
- Smirnoff, N. 1998. Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology*. 9 (2): 214-219.
- Stewart, G.R. and Larher, F. 1980. Accumulation of amino acids and related compounds in relation to environmental stress. In: The biochemistry of plants. Amino acids and derivatives. Edited by Mitlin, B.J. Academic Press. N.Y. pp. 609-635.
- Tapia, A., Feresin, E.G., Bustos, D., Astudillo, T.C. and Schmeda-Hirschmann, G. 2000. Biologically active alkaloids and free radical scavenger form *Prosopis* species. *Journal of Ethnopharmacology*. 71: 241-246.
- Thomson, D. M. 1980. Guía Práctica Ilustrada de las Plantas Medicinales. Editorial. Blume. España. p 220.
- Trace, G.E. y Evans, W.C. 1993. Tratado de Farmacognosia. 15ª ed. Ed. Interamericana. México. Pp. 730-845.
- Vajpeyinne, R.S. and Misra, K. 1981. Two flavonoid glycosides from the bark of *Prosopis juliflora*. *Phytochemistry*. 30: 339-340.
- Vanderhaeghe, H., Janssaen, G. and Compennolle, F. 1971. The structure of minor components of *Virginiamycin s. Tetrahedron Lett.* 12 (28): 2687-2688.
- Vázquez-Yanes, C. A., Batis Muñoz, I., Alcocer, M.I., Gual Díaz, M., y Sánchez Dirzo, C. 1999. Árboles y arbustos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación. Reporte técnico del proyecto J084-CONABIO. Instituto de Ecología UNAM. pp. 178-182.
- Villanueva, D. 1993. Distribución actual y características ecológicas del mezquite *Prosopis laevigata* en el estado de San Luis Potosí. Boletín Divulgativo No. 4. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. México.



- Virtanen, A. and Sigridkari, J. 1955. 4-hydroxy-piperidine-2-carboxylic acid in green plants. *Acta Chemica Scandinavica*. 170-171.
- Wink, M. 1999. Functions of plants secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. *Annual Plant Reviews*. Vol 3. CRC Press. pp.1-15.
- Zacharius, R.M., Thompson, F.J. and Steward, F.C. 1954. The detection, isolation and identification of L(-) pipercolic acid in the non-protein fraction of beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Amer. Chem. Soc.* 76. 2908-2915.
- Zavala, H.J.A. 1980. Estudios ecológicos en el Valle semiárido de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Clasificación de la Vegetación. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Biología. UNAM. México.

## **Apéndice 1**

### **Determinación del rendimiento**

**(Modificado de González y Peñalosa, 2000).**

Los extractos vegetales generalmente son obtenidos macerando el material vegetal con disolventes orgánicos de diversas polaridades (éter de petróleo, acetato de etilo, acetona, cloroformo, metanol, etc). Se tiene que tomar en cuenta la cantidad de planta que se va a utilizar, para posteriormente, determinar el rendimiento, o la cantidad de sólidos totales en el extracto.

La determinación de sólidos totales para determinar el rendimiento se lleva a cabo quitando el exceso de disolvente mediante la destilación simple o la destilación a presión reducida. Los sólidos resultantes, se colocan en un recipiente (el cual con anticipación se encuentra a peso constante) y se secan por evaporación, hasta alcanzar peso constante, los cuales se determinan en una balanza analítica o semianalítica.

Los cálculos se realizan por diferencia de peso:

**Rendimiento = Sólidos totales x 100 / Cantidad de material vegetal utilizada**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Apéndice 2

### Método de difusión en agar o de Kirby-Bauer

(Barry y Thornsberry, 1987; Vanden Berghe y Vlietnick, 1991).

Este método se utilizará para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los compuestos puros y de las fracciones producto de las separaciones cromatográficas, la metodología será la siguiente:

#### Medio.

Se utilizará como medio de cultivo estándar el agar Müller-Hinton (Bioxon 110-1), ya que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los antibióticos tienden a difundir más en dirección lateral, aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor difusión del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

#### Inóculo.

Con un hisopo estéril de poliéster se tocarán las superficies convexas de 4 o 5 colonias de apariencia semejante al de los microorganismos a ensayar (*Escherichia coli*, *Salmonella thypi*, etc.). Se sumerge el hisopo en 3 ml de caldo tripteína soya (Bioxon III), se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retira el hisopo. Incubar el tubo de cultivo a 37°C durante aproximadamente 2 a 3 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar N° 0.5 de MacFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  bacterias/ml.

El estándar 0.5 de McFarland se prepara añadiendo 0.5 ml de sulfato de bario a 99.5 ml de  $H_2SO_4$  0.36 N. (Hendrickson, 1987). La comparación de la turbidez entre el estándar y el caldo con el organismo en estudio se puede efectuar



observándolos contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales, o en su defecto en un espectrofotómetro (Spectronic 21 Milton Roy) a 660 nm.

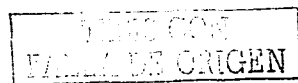
Si la suspensión de organismos es más turbia que el estándar, se añade solución salina hasta igualarlas. Una vez logrado lo anterior, se sumerge un segundo hisopo de poliéster, estéril y seco en la suspensión bacteriana, y antes de retirarlo se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inocula la superficie de una placa de agar de Müeller-Hinton. Previamente, se deja que la placa alcance temperatura ambiente; es aconsejable mantener la tapa entreabierta para permitir la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie del agar. Finalmente, se siembra mediante estría en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría.

Una vez seco el inóculo, la placa de Müeller-Hinton está lista para la aplicación de las muestras a las que se les evaluará su actividad antibacteriana.

#### Aplicación de sustancias.

Para este caso, se utilizaron sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel whatman del N° 5. En todos los casos se harán las diluciones necesarias para que los sensidiscos tengan la concentración deseada de producto.

Al llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocan en la superficie del agar manualmente, utilizando una pinza estéril y deben colocarse por lo menos a 22 mm uno de otro y a 14 mm del borde de la placa para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen de la placa. Los sensidiscos se deben presionar suavemente con una punta de la pinza, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar. Sobre cada sensidisco se coloca la concentración de cada extracto a evaluar.



#### Preparación de muestras.

En cuanto a la evaluación de las fracciones, los sensidiscos se impregnaron con soluciones valoradas de las muestras hasta llegar a la concentración deseada de sustancia por disco; en este caso, se utilizarán diferentes solventes para solubilizar los compuestos, y posteriormente impregnar los discos dejando evaporar el solvente durante 12 horas.

#### Controles negativos.

Discos a los que se les agregará el solvente empleado para disolver el problema, dejándolos evaporar durante 12 horas (al igual que los experimentales).

#### Control positivo.

Se evaluará la sensibilidad de las cepas experimentales a sensidiscos con 30  $\mu\text{g}$  de cloramfenicol (Barry y Thornsberry, 1987).

#### Incubación.

Una vez preparadas convenientemente las placas para la prueba de susceptibilidad, se les colocará en una incubadora (aparatos de laboratorio E-51 con termostato) a 35 °C, sin mayor tensión de CO<sub>2</sub>. Es preciso evitar presión de CO<sub>2</sub> debido a que se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida del agar, provocando un descenso del pH. El desarrollo de algunos microorganismos es inhibido a pH ácido, lo cual tiende a estrechar falsamente la zona de inhibición. Asimismo, la actividad de diversos antibióticos puede aumentar o disminuir con la caída del pH, produciéndose diferencias en las velocidades de difusión y alteraciones de las zonas de inhibición. Se incuban siempre placas con discos sin sustancia a evaluar como control (control negativo).



### Interpretación de resultados.

Las zonas de inhibición se medirán con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos, esta prueba se hará por triplicado y se reportarán los valores promedio.

### **Apéndice 3**

#### **Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) y de concentración bactericida mínima (CBM)**

**Método de macrodilución en caldo (Jones *et al.*, 1987 modificado por Avila, 1996).**

Preparación de reactivos y diluciones.

La solución antimicrobiana de trabajo se prepara diluyendo la droga en el caldo de Müeller-Hinton a la mayor concentración final deseada. La prueba se realiza en tubos de ensayo de 13 por 100 mm con tapa de rosca o con tapones de algodón. Para un pequeño número de pruebas se preparan diluciones al doble directamente en los tubos, del modo siguiente: Se colocan 2 ml de solución de trabajo de la droga en el primer tubo de la serie de diluciones. En cada uno de los tubos restantes es añadido 1 ml de caldo de Müeller-Hinton. Con una pipeta esterilizada se transfiere 1 ml del primer tubo al segundo. Después de mezclar bien el contenido del segundo tubo, se transfiere 1 ml con una pipeta diferente (en esta transferencia y en todas las sucesivas) al tercer tubo. El proceso continúa hasta el penúltimo tubo, al que se le quita 1 ml que se descarta. El último tubo no recibe agente antimicrobiano y sirve de control de crecimiento. Las concentraciones finales de antimicrobianos en esta prueba son iguales a la mitad a la serie inicial de dilución, debido al agregado de una concentración igual de inóculo en caldo.

Inoculación e incubación de los tubos.

Se prepara un inóculo que contenga  $10^6$  a  $10^7$  UFC/ml (unidades formadoras de colonia/ml) ajustando la turbidez de un caldo de cultivo al estándar de turbidez (se utiliza el estándar 0.5 de McFarland y diluyendo luego 1:200 en caldo). Añadir a cada tubo, 1 ml del inóculo ajustado. Incubar los tubos a 35 °C durante 16 a 20 horas. No se recomienda la incubación en atmósfera de CO<sub>2</sub> a menos que sea esencial para el desarrollo del microorganismo.



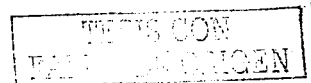
#### Interpretación de resultados.

La menor concentración de antimicrobiano que produce una inhibición completa del desarrollo visible representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM). Una turbidez muy ligera o un pequeño botón de desarrollo o turbidez definida se considera evidencia de que la droga ha sido incapaz de inhibir por completo el desarrollo a esa concentración.

Determinación de la concentración bactericida mínima (Finegold y Jo Baron, 1989).

Para medir la capacidad de un antimicrobiano para matar a un organismo se realiza la prueba de actividad bactericida que emplea el mismo sistema de dilución en caldo. Cuando la suspensión inicial del microorganismo es inoculada en los tubos de caldo, se toma una alícuota del tubo de control de crecimiento inmediatamente después de ser sembrado, la cual se inocula en una placa de agar de Müeller-Hinton para determinar el número real de unidades formadoras de colonia (UFC) del inóculo. Este número se obtiene al contar las colonias presentes luego de la inoculación de la placa de agar hasta el día siguiente y por multiplicación del factor de dilución.

Luego que se ha determinado la CIM, se siembra una cantidad conocida del inóculo (usualmente 0.1 ml) tomado de cada uno de los tubos de caldo que no presentaban turbidez luego de la incubación, en placas de agar Müeller-Hinton. El número de colonias que se desarrolla en estos subcultivos luego de incubar durante 18 horas se compara con el número de UFC/ml del cultivo original. En aquellos tubos que no presentaban turbidez, los microorganismos permanecían viables o bien, habían sido destruidos por el agente microbiano. Debido a que incluso las drogas bactericidas no siempre esterilizan totalmente una población bacteriana, la mínima concentración del agente antibacteriano que permite sobrevivir a menos de 0.1% del inóculo original, se denomina Concentración Bactericida Mínima (CBM).



## Apéndice 4

### **Técnica de microdilución en caldo para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM)**

**(Koneman, 1985).**

La técnica de microdilución tiene el mismo principio que el método de dilución en caldo, anteriormente descrita. La diferencia radica, en que la susceptibilidad de los microorganismos a los agentes antibacterianos se determina en microplacas de ELISA con 96 pozos o concavidades estériles.

La microplaca se prepara colocando 50  $\mu$ l de caldo Müeller – Hinton (Bioxon 260), adicionado con un volumen fijo que contenga las diferentes concentraciones del extracto, la fracción o el compuesto a probar. Se tapa la placa y se deja reposar 24 hs, para que se evapore el solvente en el cual se disolvió la sustancia a evaluar.

El inóculo se prepara para que contenga  $10^5$  UFC/ml (unidades formadoras de colonia/ml) ajustando la turbidez de un caldo de cultivo al estándar de turbidez (se utiliza el estándar 0.5 de McFarland y diluyendo luego 1:200 en caldo). En cada uno de los pozos de la placa de ELISA, ya preparada con las diferentes concentraciones de la sustancia a evaluar, se colocan 50  $\mu$ l de la suspensión bacteriana.

Una vez preparada la placa, se incuba a 35 °C durante 18 horas.

Después del tiempo de incubación se añade a cada concavidad 50  $\mu$ l de una solución al 0.8% de TTC. Se deja incubar 30 minutos a 35 °C. El crecimiento bacteriano se observa en los pozos que desarrollan una coloración morada, puesto que el colorante es reducido a formazán, produciendo un botón de color rojo – púrpura visible en el fondo del pozo. En contraste, donde no hay desarrollo bacteriano, la solución permanece clara.

## Apéndice 5

### **Técnica de bioautografía para el revelado de placas cromatográficas.**

**(Hamburger y Cordell, 1987).**

El método bioautográfico sirve para localizar la actividad antibacteriana de los diversos componentes de una placa cromatográfica. Para realizar el bioensayo una suspensión de microorganismos es rociada en un cromatograma y posteriormente se incuba en una atmósfera húmeda para permitir el crecimiento bacteriano.

Las zonas de inhibición son visualizadas por el cambio de color de diversos reactivos sensibles a la actividad de la deshidrogenasa, como diversas sales de tetrazolio. Las bacterias metabólicamente activas convierten dicho compuesto en formazan, el cual presenta una intensa coloración (rojo - púrpura) haciendo contraste con los compuestos antibacterianos presentes en la placa cromatográfica que se observan como zonas incoloras.

#### Preparación de cromatogramas.

Los cromatogramas se desarrollan en la fase móvil apropiada para cada caso. Se dejan secar para que al realizar el bioensayo no contengan residuos de solventes que den falsos positivos. Generalmente se revelan en luz UV para marcar con lápiz los diversos componentes de la ccf.

#### Inoculo bacteriano.

Se prepara un inóculo que contenga  $10^6$  a  $10^7$  UFC/ml (unidades formadoras de colonia/ml) ajustando la turbidez de un caldo de cultivo al estándar de turbidez (se utiliza el estándar 0.5 de McFarland y diluyendo luego 1:200 en caldo).



**Realización del bioensayo.**

El cromatograma se coloca en una caja de petrí vacía y estéril y se rocía con el inóculo bacteriano y se deja incubar por 24 hs a 37°C. Posteriormente la placa se rocía con una solución acusa (20 mg/ml) del cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) y se incuba 4 horas a 37°C, para permitir el desarrollo de la coloración.

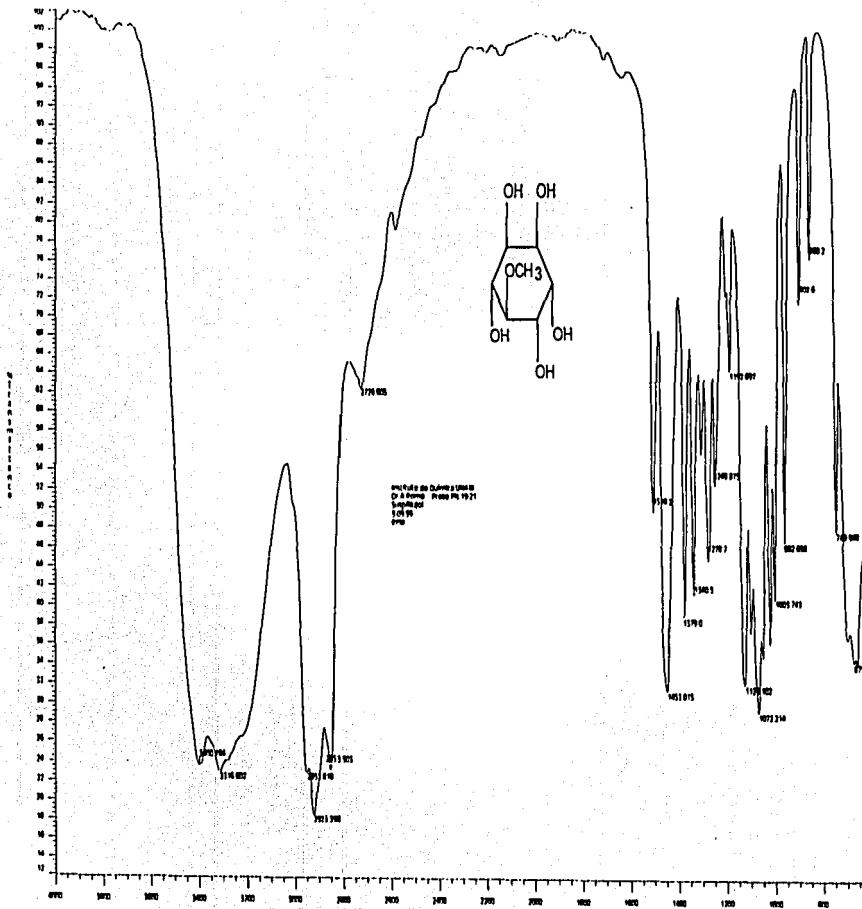
Las zonas de inhibición se observan claras en contraste con el fondo que desarrolla una coloración rojo-púrpura, permitiendo la fácil localización de los compuestos con actividad antibacteriana.

## Apéndice 6. Espectros

TESIS CON  
FACULTAD DE INGENIERIA



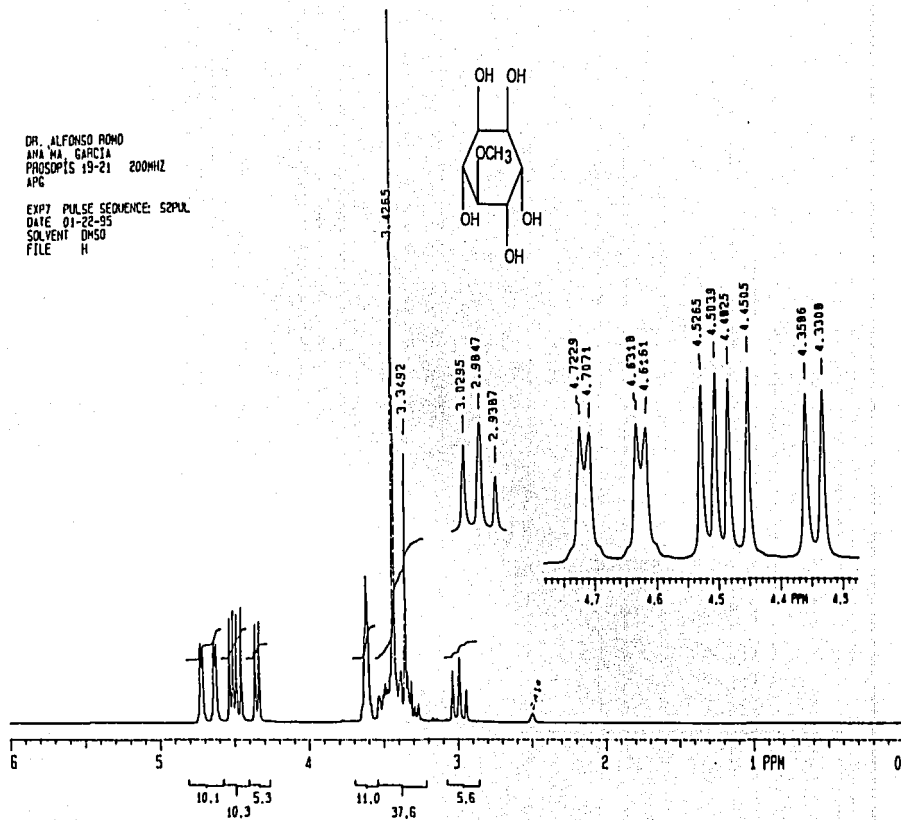
71115 COM  
FALLA DE ORIGEN



Espectro 1. Espectro de IR del pinitol.

DR. ALFONSO ROMO  
ANA MA. GARCIA  
PROSOPIS 19-21 200MHZ  
APC

EXP7 PULSE SEQUENCE: SPCAL  
DATE 01-22-85  
SOLVENT DMSO  
FILE H



Espectro 2. Espectro de RMN<sup>1</sup>H del pinitol.

[ Mass Spectrum ]

Date : 23-Nov-98 07:49

Sample: Prosopis-19-21

Site : -Fra-María

Inlet : Direct

Ion Mode : FID+

Spectrum Type : Normal Ion (M-Linear)

RI : 0.82 min

Scan# : (1,7)

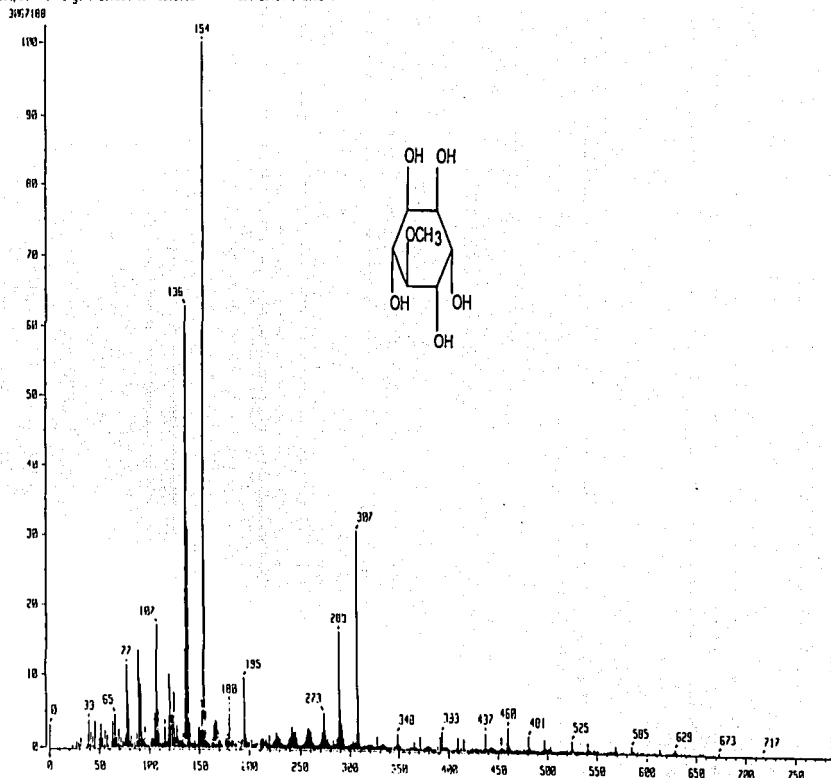
Temp : 148.5 deg.C

SP : m/z 154.0000

Int. : 285.00

Output m/z range : 0.0000 to 789.9110

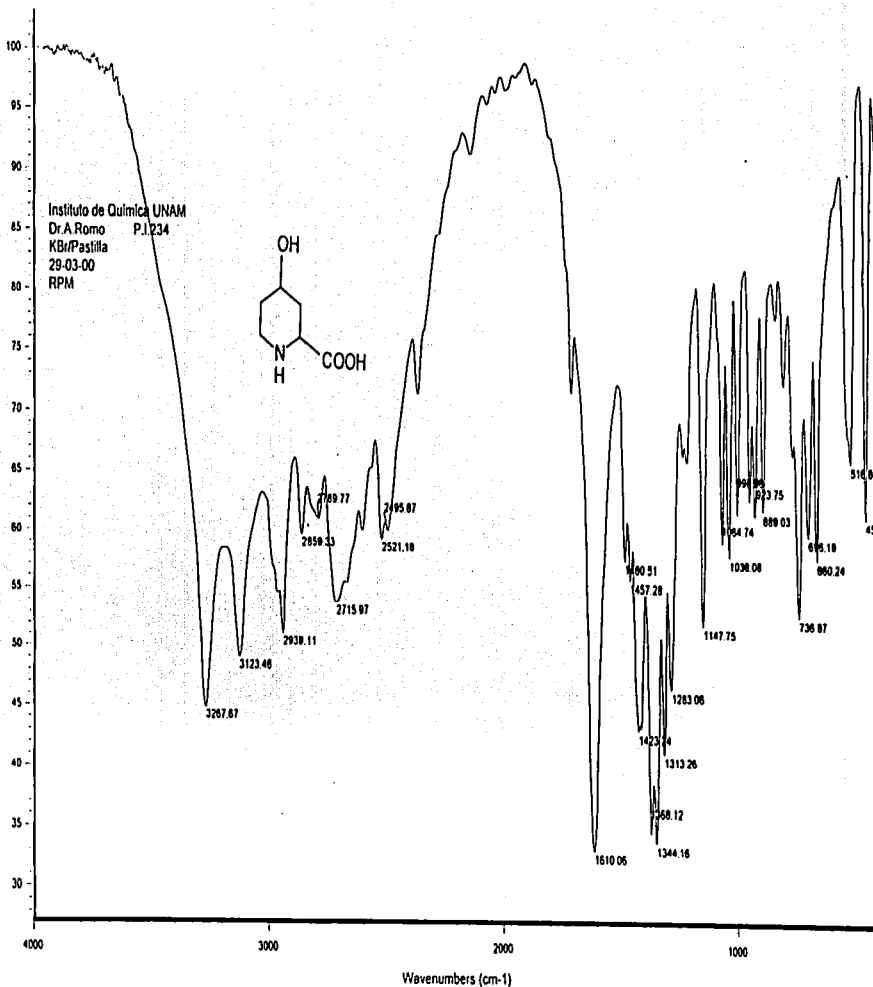
Cut Level : 0.00 %



Espectro 3. Espectro de masas del pinol.

97

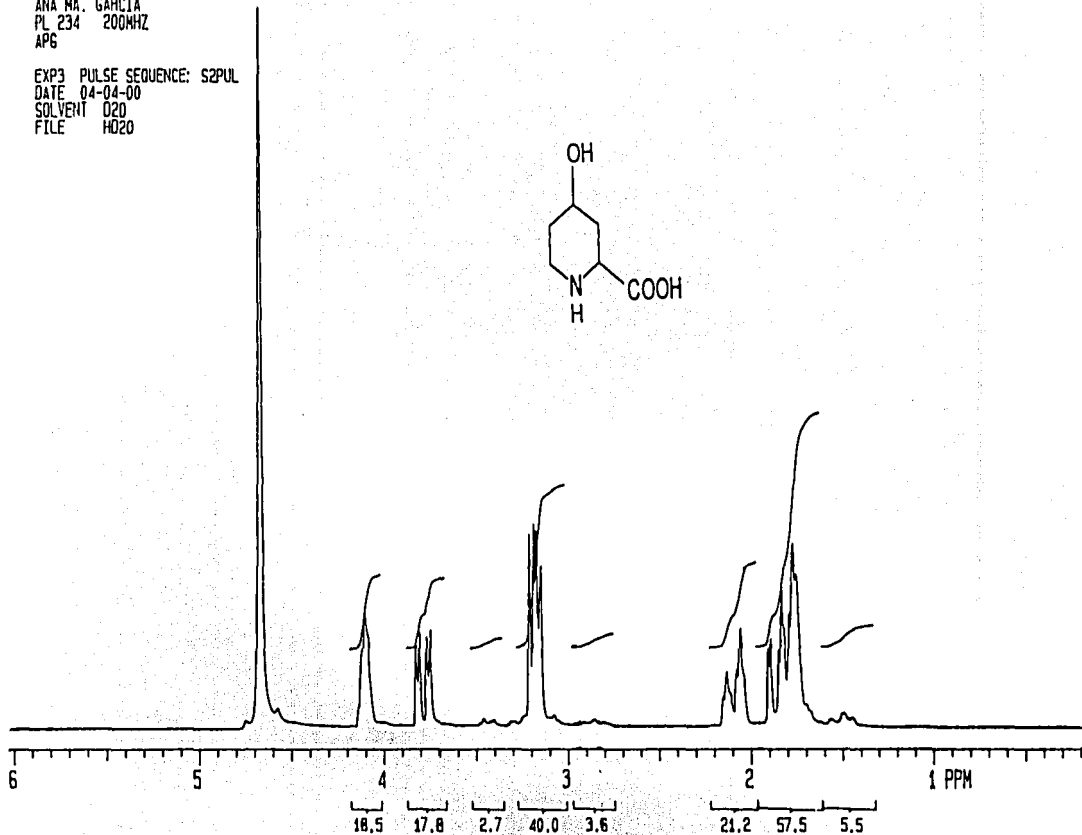
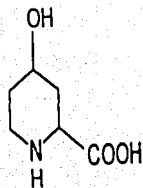
TESTES COM  
PALA MONTEN  
NEO



Espectro 4. Espectro de IR del ácido 4-hidroxi-L-pipecólico.

DR. A. ROMO  
ANA MA. GARCIA  
PL 234 200KHZ  
AP6

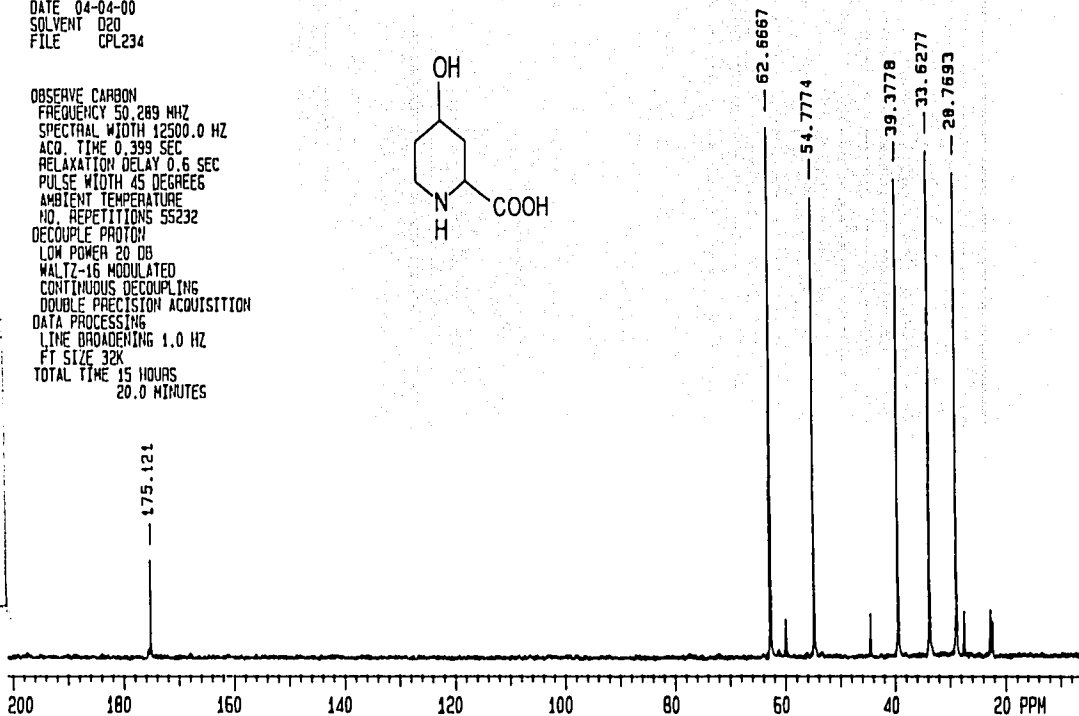
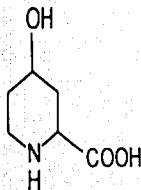
EXP3 PULSE SEQUENCE: S2PUL  
DATE 04-04-00  
SOLVENT D2O  
FILE H020



Espectro 5. Espectro de RMN<sup>1</sup>H del ácido 4-hidroxi-L-pipecólico.

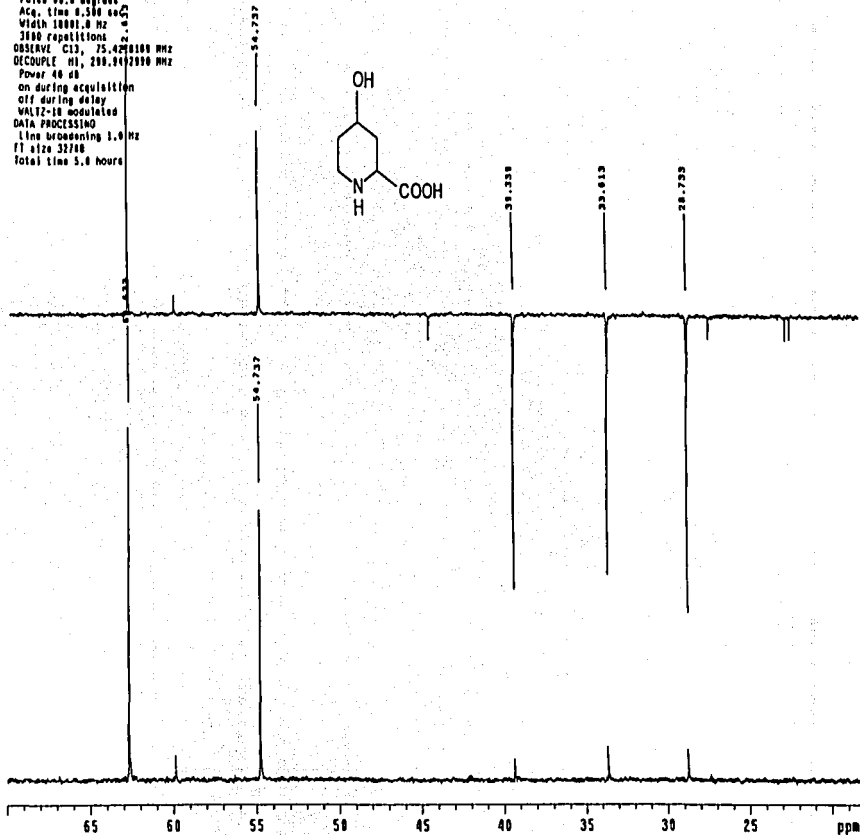
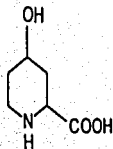
DR. A. ROMO  
ANA MA. GARCIA  
PL 234 200MHZ  
AP6  
EXP4 PULSE SEQUENCE: 52PUL  
DATE 04-04-00  
SOLVENT D2O  
FILE CPL234

OBSERVE CARBON  
FREQUENCY 50.289 MHZ  
SPECTRAL WIDTH 12500.0 HZ  
ACQ. TIME 0.399 SEC  
RELAXATION DELAY 0.6 SEC  
PULSE WIDTH 45 DEGREE6  
AMBIENT TEMPERATURE  
NO. REPETITIONS 55232  
DECOUPLE PROTON  
LOW POWER 20 DB  
WALTZ-16 MODULATED  
CONTINUOUS DECOUPLING  
DOUBLE PRECISION ACQUISITION  
DATA PROCESSING  
LINE BROADENING 1.0 HZ  
FT SIZE 32K  
TOTAL TIME 15 HOURS  
20.0 MINUTES



Espectro 6. Espectro de RMN<sup>13</sup>C del ácido 4-hidroxi-L-pipecólico.

PI-234  
 Dr. A. Pino-A. M. Garcia  
 14-IV-88  
 AM  
 Solvent: d2o  
 Ambient temperature  
 UNITY-500 "rmg"  
 PULSE SEQUENCE: dept  
 Relax. delay: 2.000 sec  
 Pulse: 90.0 degree  
 Acq. time: 8.300 sec  
 Width: 10000.0 Hz  
 3200 repetitions  
 OBSERVE: C13, 75.420000 MHz  
 DECOUPLE: H1, 200.840000 MHz  
 Power: 46 dB  
 on during acquisition  
 off during delay  
 WALTZ-16 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Line broadening: 1.0 Hz  
 FI size: 32768  
 Total time: 5.8 hours



Espectro 7. Espectro DEPT del ácido 4-hidroxi-L-pipecólico.

101

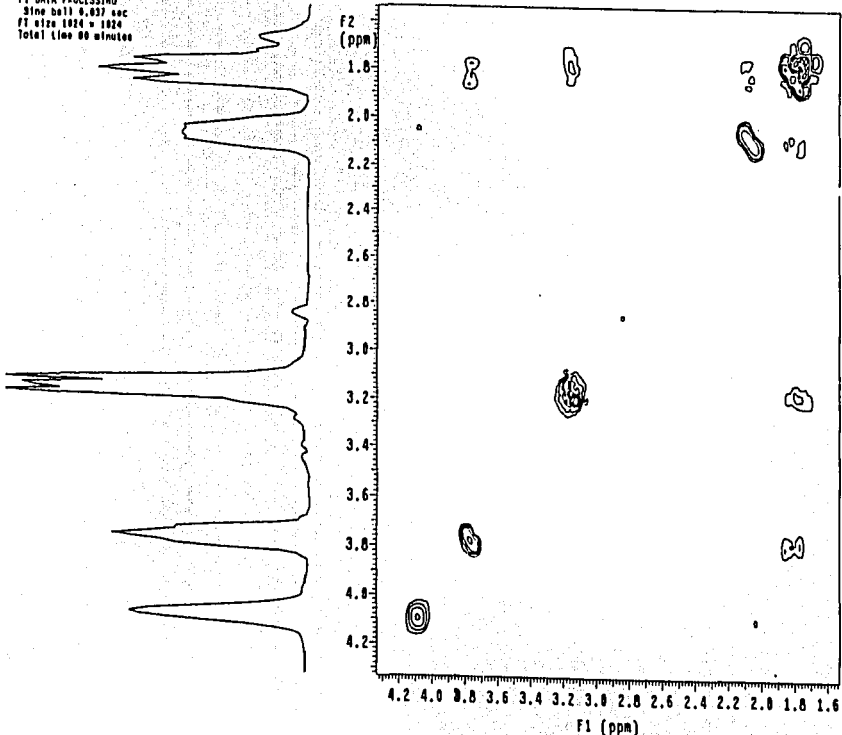
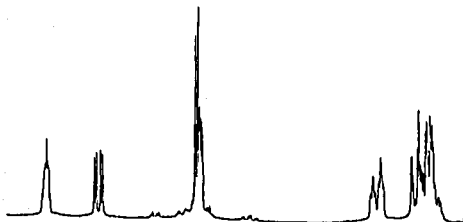
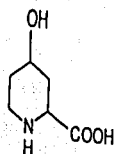
INSTITUTO  
 DE QUÍMICA  
 DE OROQUENA

P1.234  
Dr. A. Romo-A. N. Garcia  
14-IV-88  
AMH

Solvent: d2o  
Ambient temperature  
UM17V-308 "ramp"

PULSE SEQUENCE: relayh  
Puls. delay 1.000 sec  
COSY 16-10  
Acq. time 0.147 sec  
Width 1740.4 Hz  
2D Width 1740.4 Hz  
2D Repetitions  
128 Increments

OBSERVE: H1, 255.8476140 MHz  
DATA PROCESSING  
Sine bell 0.875 sec  
F1 DATA PROCESSING  
Sine bell 0.837 sec  
F1 size 1024 x 1024  
Total time 00 minutos



Espectro 8. Espectro COSY del ácido 4-hidroxi-L-pipecólico.

TESIS COM  
FACULTAD DE QUIMICA



P1.234  
 Dr. A. homo-A. N. Garcia  
 14-IV-88  
 AAN

exp# hctcor

SAMPLE DEC. & VT  
 date Apr 14 2300 dfrs 201.100  
 solvent d7o dn H1  
 file exp dprv 40  
 ACQUISITION acf -144.8  
 cfrs 25.425 de any  
 tn C13 dm ccv  
 nt 0.178 cdf 10296  
 np 2340 deas  
 lw 8831.0 dres 1.0  
 fb 3100 homo n

bs 32  
 te 1 tb PROCESSING  
 lprv 51 sba not used  
 pw 14.5 wflia

prc 1.000 proc fl  
 ct -2027.5 ft 1874  
 nt 256 mth f

ct 90  
 block n verr  
 gain 40 wvs  
 jsh 140.0 wnt  
 jmh 0 wnt

hault n 3D PROCESSING  
 np 18.5 col 0.020  
 pptvl 55 sbid not used  
 prael n wflia

PLMS proc ft  
 n fil 912

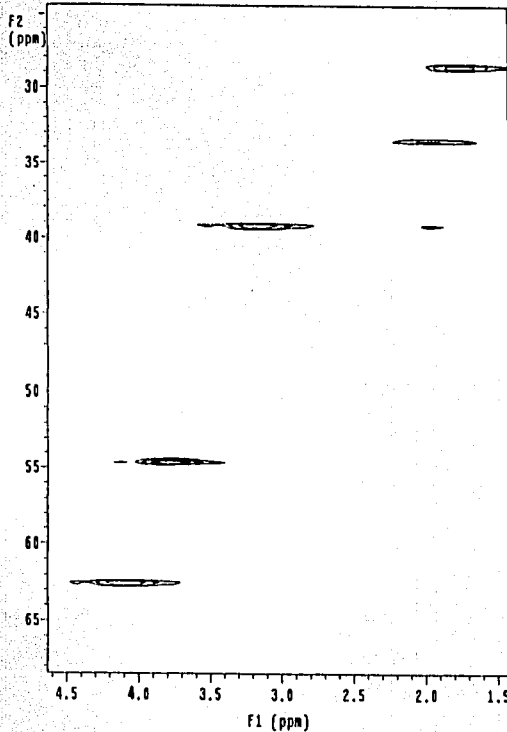
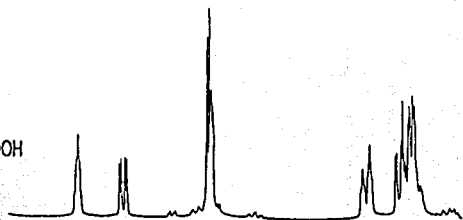
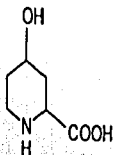
dp y  
 hs nm

3D ACQUISITION  
 wvl 1724.3  
 nt 256  
 phase 0

DISPLAY  
 sp 1801.1  
 sp 5311.7  
 vs 10772  
 cc 0

vc 130  
 hzm 25.54  
 ls 500.00  
 rfd 4424.0  
 rfp 5003.0  
 tn 2  
 lns 0

wt no mv  
 2D DISPLAY  
 ap1 427.1  
 wpl 861.3  
 cc2 0  
 wcl 130  
 rfl 1013.0  
 rfp 1000.0



Espectro 9. Espectro HETCOR del ácido 4-hidroxi-L-pipecólico.

[ Mass Spectrum ]

Data : Dr-Cuevas-Gabriel-057

Date : 14-Dec-97 14:34

Sample : P 1234

Rate : -

Inlet : Direct

Ion Mode : E1+

Spectrum Type : Normal Ion [M<sup>+</sup>-Linear]

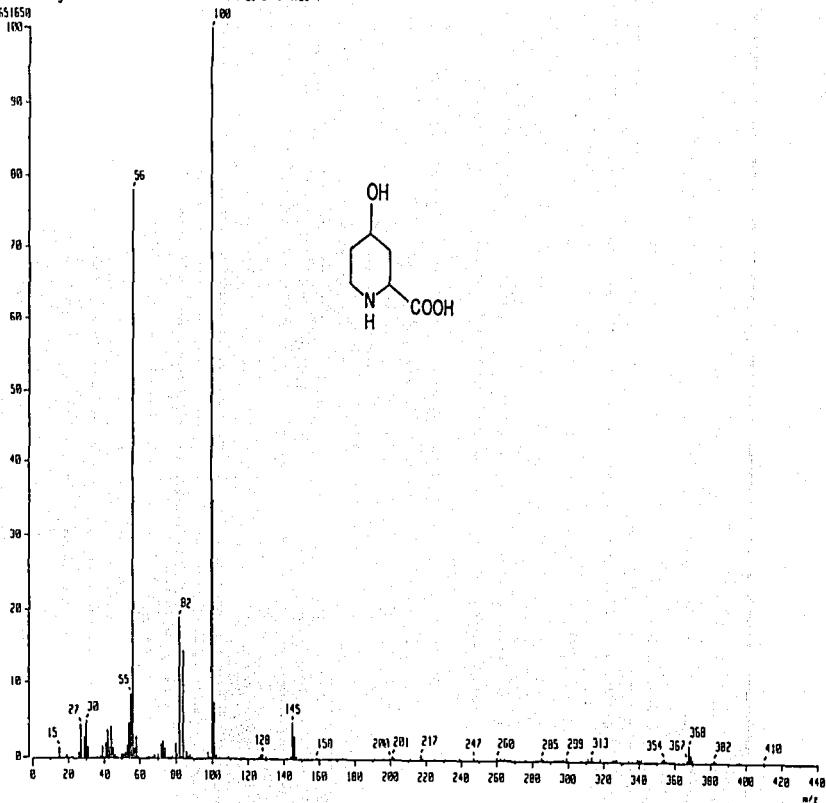
RT : 2.02 min Scan# : (145,351)-(145,54)

Temp : 212.8 deg.C

SP : 100,0000 Int. : 727.62

Output m/z range : 0.0000 to 440.3561

Cal Level : 0.00 %



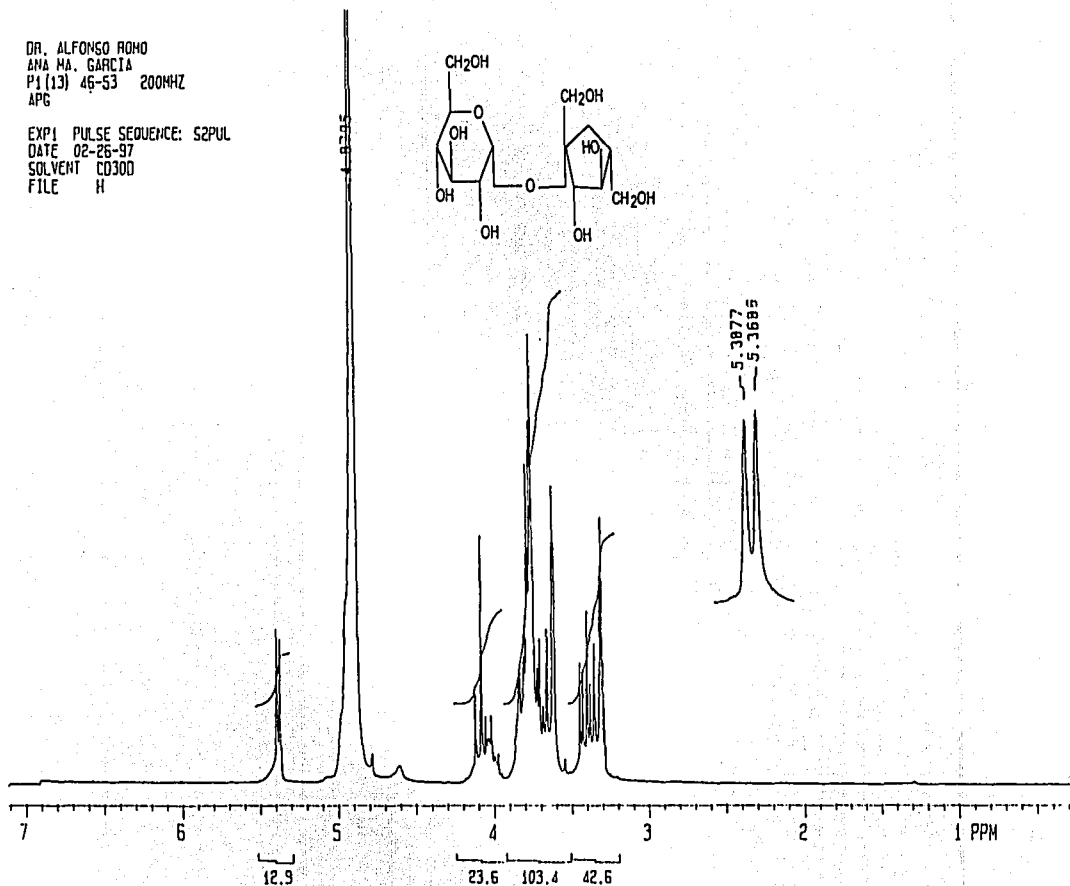
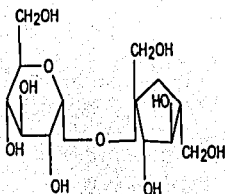
Espectro 10. Espectro de masas del ácido 4-hidroxi-L-pipecólico.

104

TESTIGOS  
FALLA DEL ANALISIS

DR. ALFONSO ROMO  
ANA MA. GARCIA  
P1 (13) 46-53 200MHZ  
APG

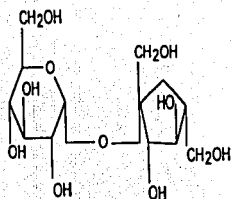
EXP1 PULSE SEQUENCE: S2PUL  
DATE 02-26-97  
SOLVENT CD3OD  
FILE H



Spectro 11. Espectro de RMN'H de la sacarosa

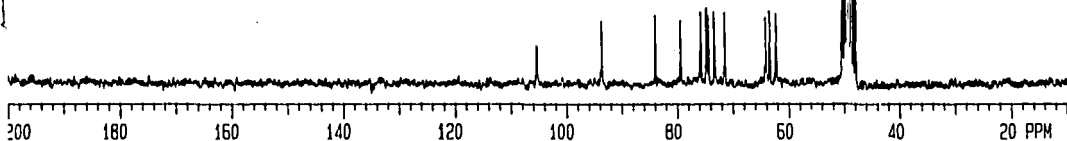
RECIBIDO  
FALLA DE ORIGEN

DR. ALFONSO ROMO  
ANA MA. GARCIA  
P1 (13) 46-53 200MHZ  
APG  
EXP2 PULSE SEQUENCE: S2PUL  
DATE 02-26-97  
SOLVENT CD3OD  
FILE C



OBSERVE CARBON  
FREQUENCY 50.289 MHZ  
SPECTRAL WIDTH 12500.0 HZ  
AQ. TIME 0.399 SEC  
RELAXATION DELAY 0.6 SEC  
PULSE WIDTH 45 DEGREES  
AMBIENT TEMPERATURE  
NO. REPETITIONS 8640  
DECOUPLE PROTON  
LOW POWER 20 DB  
WALTZ-16 MODULATED  
CONTINUOUS DECOUPLING  
DOUBLE PRECISION ACQUISITION  
DATA PROCESSING  
LINE BROADENING 2.0 HZ  
FT SIZE 32K  
TOTAL TIME 2 HOURS  
23.9 MINUTES

49.42518  
48.66583  
48.5752



Espectro 12. Espectro de RMN<sup>13</sup>C de la sacarosa

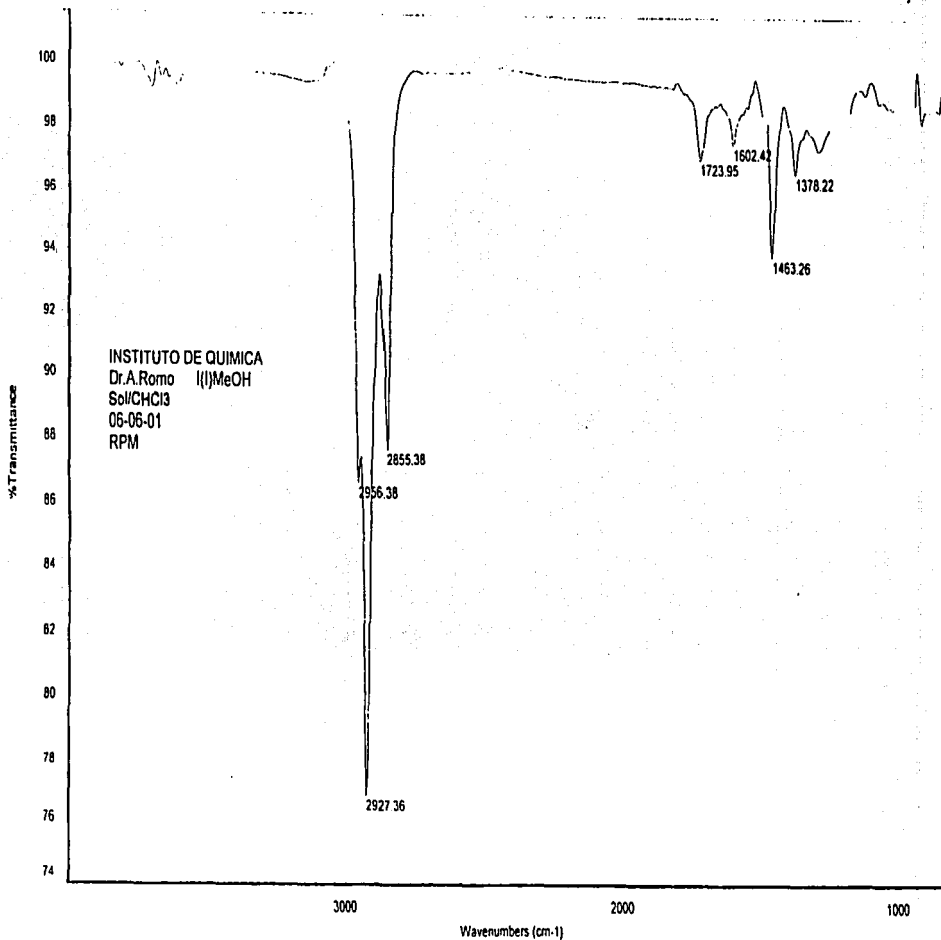
100

CON  
ORIGEN



Instituto de Quimica, UNAM

Laboratorio de Infrarrojo



107

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Espectro 13. Espectro de IR de la cera