



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO  
METANOLICO DE *B. FRUTESCENS* CONTRA  
ENTEROBACTERIAS CAUSANTES DE DIARREA Y  
DISENTERIA”

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE;  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A :  
J E N N Y L U N A T O L E D A N O



MEXICO, D.F.



2004

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA



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.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

**JURADO ASIGNADO:**

- Presidente** RACHEL MATA ESSAYAG  
**Vocal** LUCIANO HERNÁNDEZ GOMEZ  
**Secretario** FERNANDO CALZADA BERMEJO  
**1er. Suplente** ROSALBA ESQUIVEL COTE  
**2do. Suplente** ESTRELLA MIRELLA CERVANTES GARCIA

**Sitio en donde se desarrolló el tema:**  
**Unidad de Investigación Médica de Farmacología de Productos Naturales**  
**Hospital de Pediatría**  
**Centro Médico Nacional Siglo XXI**

**Asesor del tema:** Dr. Fernando Calzada Bermejo.

**Supervisor técnico:** M en C. Alma Delia Alanís Ríos.

**Sustentante :** Jenny Luna Toledano.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Jenny Luna Toledano

FECHA: 28-Hayo-04

FIRMA: [Firma]

[Firma]  
Firma

[Firma]  
Firma

[Firma]  
Firma

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación académica que recibí.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado a través del proyecto CONACYT 38030-M.

A la Dr. Mariana Meckes Fisher, jefa de la Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos naturales por las facilidades otorgadas para la realización del siguiente trabajo de investigación.

A la Unidad de investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias por la colaboración brindada en la donación e identificación de las bacterias usadas en este trabajo.

Al Dr. Fernando Calzada Bermejo por su guía y apoyo otorgado para la realización de esta tesis, además, del interés que demostró por este trabajo.

A los miembros del jurado designado por sus valiosas observaciones y comentarios.

Con cariño y respeto todos los profesores y personas que contribuyeron de diferentes maneras para que pudiera concluir una de mis metas.

El futuro tiene muchos nombres.  
Para los débiles es lo inalcanzable.  
Para los temerosos, lo desconocido.  
Para los valientes es la oportunidad.

*Victor Hugo*

\* \* \* \* \*

### **DEDICATORIA**

A ti SEÑOR MIO por darme lo verdaderamente importante en esta vida: una familia.

A mi mamá Alejandra por su amorosa dedicación para sus hijos, a mi papá Luis por su apoyo y cariño.

A Ernesto, por todo lo que juntos hemos compartido y creado.

A mis amigos de siempre por siempre, por la amistad que surge de la convivencia.

## INDICE

Lista de cuadros	iii
Lista de esquemas	iv
Lista de figuras	iv
Lista de abreviaturas	v
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	5
II.1 Generalidades de <i>Bocconia frutescens</i> L	5
II.2 Generalidades sobre la diarrea	9
III. JUSTIFICACIÓN	15
IV. OBJETIVO GENERAL	15
V. META	16
VI. HIPÓTESIS	16
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	17
VII.1 Material vegetal	17
VII.2 Preparación del extracto metanólico de las hojas de <i>B. frutescens</i>	17
VII.3 Ensayo biológico	18
VII.3.1 Enterobacterias	18
VII.4 Análisis cromatográfico	19
VII.5 Fraccionamiento mediante repartos sucesivos del extracto metanólico de las hojas de <i>B. frutescens</i>	20
VII.6 Separación y purificación de la fracción de diclorometano (FD)	21

VII.7 Separación y purificación de la fracción acuosa (FA)	22
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
IX. CONCLUSIONES	32
X. ACTIVIDADES FUTURAS	32
XI. BIBLIOGRAFÍA	33

Lista de cuadros	
Cuadro 1. Agentes cromógenos utilizados en los análisis de cromatografía en capa fina	20
Cuadro 2. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta de la fracción primaria FD	22
Cuadro 3. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta de la fracción primaria FA	23
Cuadro 4. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta de la fracción secundaria FA2	24
Cuadro 5. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta de la fracción terciaria FA2-9	25
Cuadro 6. Resultados de la actividad antibacteriana del extracto y fracciones primarias (FD y FA)	26
Cuadro 7. Resultados de la actividad antibacteriana de las fracciones FD y FD-3 a FD-9	28
Cuadro 8. Resultados de la actividad antibacteriana de la fracción FA y fracciones secundarias de FA	29
Cuadro 9. Resultados de la actividad antibacteriana de la fracción FA, fracción FA2 y fracciones terciarias de FA2	30

## Lista de esquemas

Esquema 1. Obtención del extracto metanólico de las hojas de <i>B. frutescens</i>	17
Esquema 2. Fraccionamiento mediante repartos sucesivos del extracto metanólico de las hojas de <i>B. frutescens</i>	21

## Lista de figuras

Figura 1. Algunos compuestos con actividad biológica importante obtenidos a partir de plantas medicinales en el mundo	2
Figura 2. <i>Bocconia frutescens</i> L	6
Figura 3. Compuestos aislados de <i>Bocconia frutescens</i> L	7
Figura 4. Algunos fármacos utilizados en el tratamiento de la diarrea de origen infeccioso	13

## Lista de abreviaturas

AcOEt	acetato de etilo
<i>B.</i>	<i>Bocconia</i>
° C	grados centígrados
CCA	cromatografía en columna abierta
CCF	cromatografía en capa fina
CCFP	cromatografía en capa fina preparativa
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	diclorometano
CHCl <sub>3</sub>	cloroformo
CMN	Centro Médico Nacional Siglo XXI
DMSO	dimetil sulfóxido
ECET	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
ECEP	<i>E. coli</i> enteropatogénica
ECEA	<i>E. coli</i> enteroagregativa
ECEH	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EMB	agar eosina-azul de metileno
FA	fracción acuosa
FD	fracción de diclorometano
g	gramo
HCl	ácido clorhídrico
HE	agar Hektoen
H <sub>2</sub> O	agua
H <sub>2</sub> S	ácido sulfídrico
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
L	litro
mg	miligramo
µg	microgramo
mL	mililitro
MeOH	metanol
min	minutos

M-H	agar Muller Hinton
n-BuOH	n-butanol
%	porciento
<i>P</i>	<i>Pseudomonas</i>
S	<i>Staphylococcus</i>
SS	salmonella-shigella
<i>Sh. boydii</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Sh. dysenteriae</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Sh. flexneri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Sh. sonnei</i>	<i>Shigella sonnei</i>
TCBS	medio tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa
THA	agar triple-azúcar-hierro
TTGA	medio telurito-taurocolato-gelosa-agar
UFC	unidades formadoras de colonias
U.V	ultravioleta
UIM	Unidad de Investigación Médica
<i>V</i>	<i>Vibrio</i>

## RESUMEN

Se realizó la determinación de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de las hojas de *Bocconia frutescens* L (Papaveraceae), especie conocida como “gordolobo de campo” y que es apreciada por sus propiedades medicinales, para aliviar molestias respiratorias, gastrointestinales y problemas de la piel.

Las hojas de la planta se recolectaron en el estado de Hidalgo, y después de ser sometidas a las operaciones de secado y molienda se extrajeron vía maceración con metanol. El extracto metanólico resultante fue fraccionado mediante repartos sucesivos entre metanol acuoso al 10% y diclorometano. Las fracciones resultantes se separaron y purificaron mediante métodos cromatográficos de columna abierta. A todos los productos fitoquímicos derivados de las hojas de *B. frutescens* se les determinó su actividad antibacteriana contra seis cepas de bacterias: *E. coli*, *Salmonella sp*, *Shigella flexneri*, *Sh. sonnei*, *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Se encontró que el extracto metanólico (8mg/mL), fracciones FD (8 mg/mL), FA (8 mg/mL), FD-5 (0.4 mg/mL), FD-6 (0.4 mg/mL), FA2 (0.4 mg/mL), FA2-4 (0.4 mg/mL) y el compuesto BF-1 (0.2 mg/mL) presentaron la mejor actividad con porcentajes de inhibición mayor al 50%. La actividad de las fracciones FD-5 (0.4 mg/mL), FD-6 (0.4 mg/mL), FA2 (0.4 mg/mL), FA2-4 (0.4 mg/mL) y el compuesto BF-1(0.2 mg/mL) fue superior a la actividad del cloranfenicol (8mg/mL) y trimetoprim (8 mg/mL), empleados como controles positivos.

## I. INTRODUCCIÓN

En México aún cuando la medicina alópata se ocupa del 40% de todos los servicios de salud, la medicina tradicional juega un papel muy importante. Se considera que cerca del 25% de nuestra población, alrededor de 25 millones de personas, dependen del uso de las plantas medicinales como uno de los recursos más importantes para prevenir, tratar o curar sus enfermedades. Por lo que es importante el estudio multidisciplinario de nuestra flora medicinal y de esta forma sustentar las propiedades medicinales que se les atribuyen y adicionalmente con ello tener una fuente potencial de fitofármacos útiles en la terapéutica de nuestras enfermedades (Hernández *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 1999).

En este sentido la medicina tradicional mexicana usa una gran variedad de plantas medicinales para el tratamiento de trastornos gastrointestinales, como la disentería (*B. frutescens*, *Stenocereus stellatus* y *Bunchosia biocellata*) y la diarrea (*B. frutescens*, *Lippia graveolens* y *Psidium guajava*). Esta última es una de las causas más importantes de decesos en la población infantil de las áreas rurales (Ross, 1999; Pascual *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2003; INEGI, 1999).

A pesar de que la medicina tradicional es la primera alternativa para prevenir y curar una variedad de desordenes como son la disentería y la diarrea, en México son pocos los conocimientos químicos y farmacológicos acerca de este recurso. Además, de que algunos fármacos indicados en la terapia antimicrobiana son de uso limitado por sus efectos secundarios, la resistencia de algunos enteropatógenos y/o no son disponibles localmente (Hernández *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2003; Longanga *et al.*, 2000).

En la actualidad se tiene un gran interés por los agentes antibacterianos de origen vegetal, en este contexto el estudio químico y farmacológico de las plantas medicinales es parte de las estrategias

importantes en la búsqueda de fuentes potenciales de agentes antibacterianos (Contreras y Mier, 1986; Mitscher *et al.*, 1987; Ríos *et al.*, 1988; Vanden y Vlietinck, 1991).

Es de hacer mención que el estudio científico de las plantas medicinales en el mundo, ha experimentado avances importantes, que han conducido a la obtención de compuestos de origen vegetal farmacéuticamente importantes (SS, 1993). Así por ejemplo: la ergonovina **1** obtenida de *Claviceps purpurea* se utiliza en el tratamiento de la hemorragia post-parto; la lobelina **2** aislada de *Lobelia inflata* se usa para el tratamiento del asma, bronquitis crónica y como expectorante; la nicotina **3** obtenida de *Nicotiana tabacum* se emplea como bloqueador ganglionar; la reserpina **4** de *Rauwolfia serpentina* es un agente antihipertensivo y un tranquilizante mayor; la elipticina **5** aislada de *Ochrosia elliptica* es un agente antitumoral; la arecolina **6** obtenida de *Areca catechu* se utiliza como antihelmíntico de uso veterinario; la novobiocina **7** aislada de *Streptomyces niveus* se usa como antibiótico; la rutina **8** aislada de *Fagopyrum esculentum* se usa para disminuir la fragilidad capilar; la partenólida **9** obtenida de *Tanacetum parthenium* es un agente antagonista de la serotonina **10** que se utiliza en la profilaxis de la migraña (Mitscher *et al.*, 1987; Mata, 2000) (Figura 1).

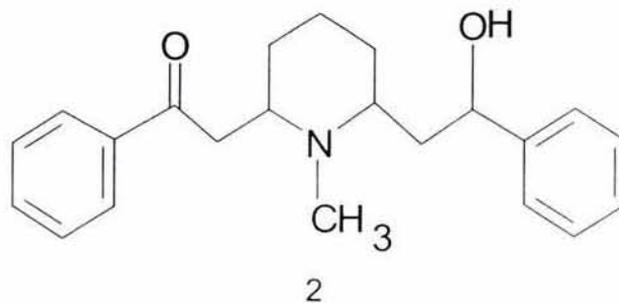


Figura 1. Algunos compuestos con actividad biológica importante obtenidos a partir de plantas medicinales en el mundo.

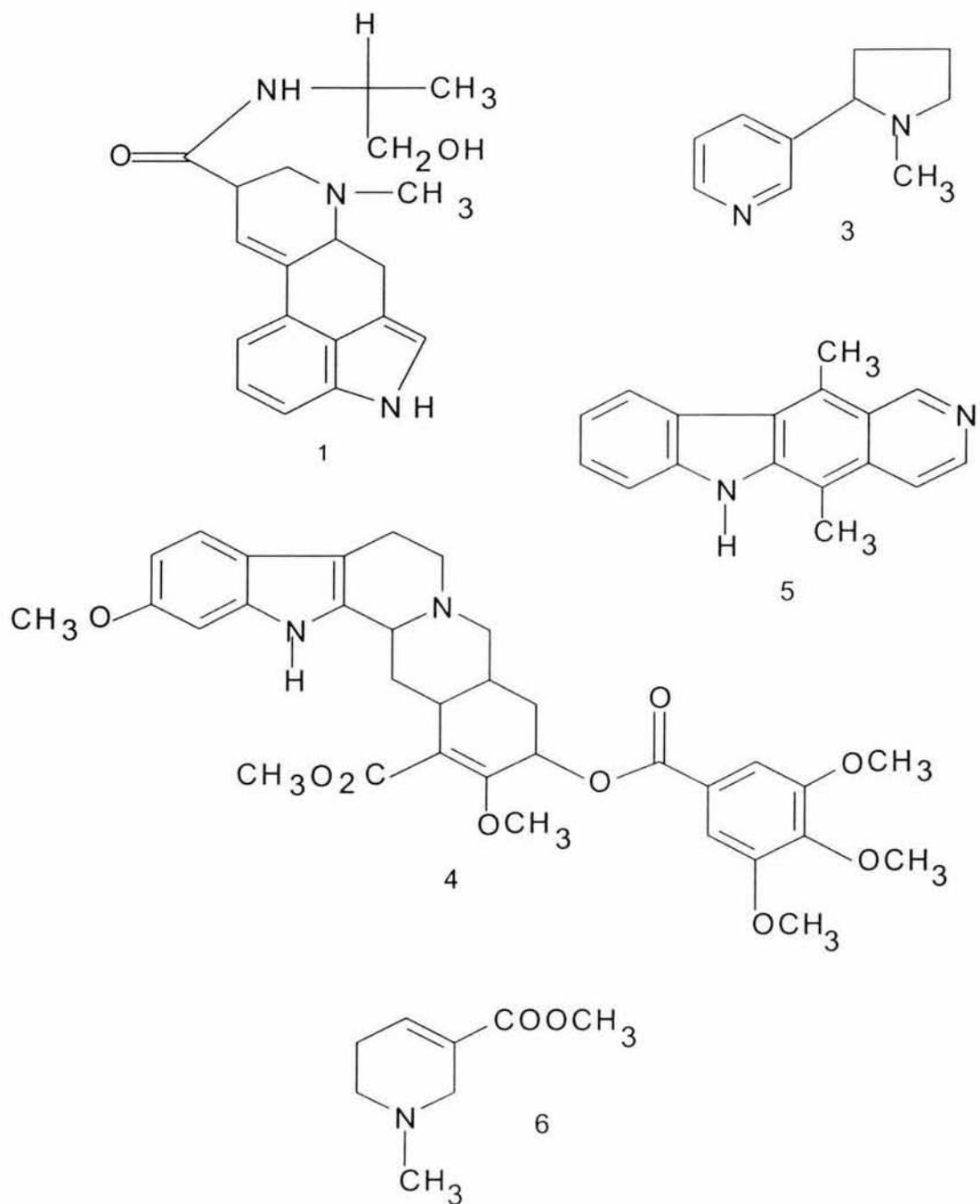


Figura 1. Algunos compuestos con actividad biológica importante obtenidos a partir de plantas medicinales en el mundo (continuación).

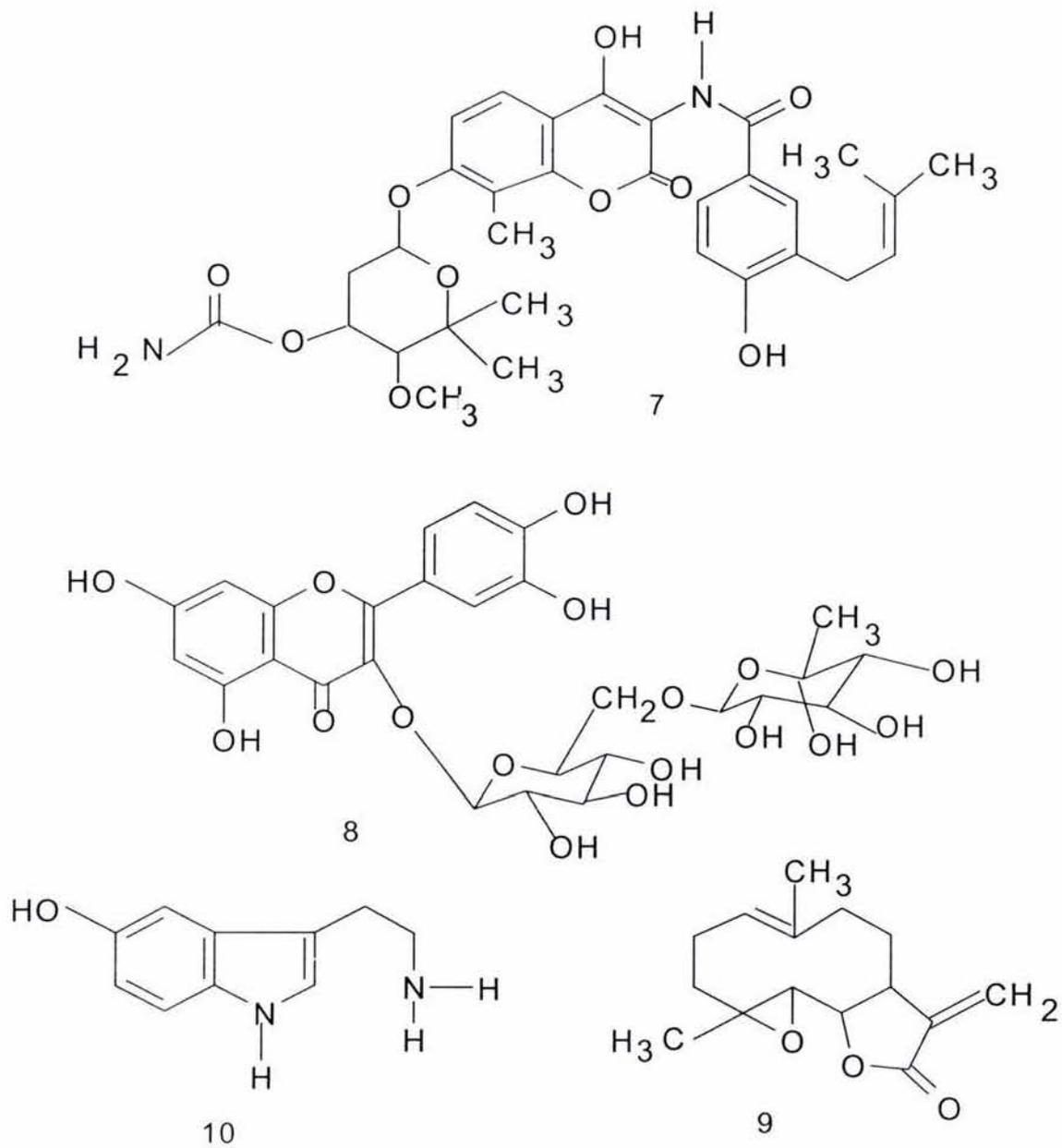


Figura 1. Algunos compuestos con actividad biológica importante obtenidos a partir de plantas medicinales en el mundo (continuación).

## II. ANTECEDENTES

### II.1 GENERALIDADES DE *BOCCONIA FRUTESCENS* L.

*Bocconia frutescens* L. (sinónimias: *B. glauca* Salisb., *B. pearcei* Hutch., *B. quercifolia* Moench , *B. sinuatifolia* Stokes y *B. subtomentosa* L 'Herit. ex Stahl), es una planta perteneciente a la familia Papaveraceae, y es conocida popularmente con los nombres de “gordolobo de campo, gordolobo cimarrón, cuatlataya, llora sangre, mano de león y palo santo” (SEMARNAT, 2003; 2003a; FEUM, 2001).

La planta (Figura 2) es un arbusto de hasta 3 m de altura, tiene las hojas muy grandes y divididas, con o sin vellos al reverso; las flores son purpurinas y están en racimos, sus frutos son pequeños de color verde azulosos, carnosos y puntiagudos, de tallo quebradizo que cuando alguna de sus partes es cortada escurre un látex de color amarillento-anaranjado o rojizo (Argueta *et al.*, 1994).

El gordolobo de campo es originario de Centro y Sur América, crece en climas cálidos, semicálidos y templados; en la República Mexicana se localiza en: Hidalgo, Puebla, Michoacán, Oaxaca, Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz y Chiapas (Argueta *et al.*, 1994; SEMARNAT, 2003; 2003a)

En las prácticas médicas alternativas de México se usa la decocción de las hojas del gordolobo administradas por vía oral o asadas y colocadas a manera de cataplasma para tratar afecciones respiratorias (resfriado, tos-ferina, bronquitis, fatiga en el pecho, tuberculosis y la tos); se aplica el látex directamente en la zona afectada para tratar problemas de la piel (tiña, jiotos, escarlatina, manchas en la piel, granos, verrugas y callos); se emplea la decocción de la planta administrada por vía oral para tratar trastornos del aparato digestivo (disentería, diarrea, dolor de estómago y

úlceras gástricas); se aconseja la infusión de la mezcla de gordolobo, mirto (*Salvia elegans*) y hierba de perro (*Solanum schlechtendaliaum*) para tratar la hemorragia vaginal y en baños posparto; otros usos medicinales la indican en golpes, reumas, desnutrición, delgadez, anemia, dolor de espalda, calentura, hemorroides, infecciones en el pene, como antiinflamatorio, diaforético y antihipertensivo (Argueta *et al.*, 1994; SEMARNAT, 2003; Caballero *et al.*, 2002; SBM, 2001).



Figura 2. *Bocconia frutescens* L.

Desde el punto de vista farmacológico, se han demostrado las propiedades antibacterianas *in vitro* de los extractos clorofórmico y metanólico de *B. frutescens* sobre *Serratia lutea*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *V. cholerae* (Pérez, 2000).

Desde el punto de vista fitoquímico, la planta ha sido objeto de dos estudios: el primer estudio se realizó con las hojas de *B. frutescens* y permitió el aislamiento de los alcaloides columbamina **11**, coptisina **12**, isocoripalmina **13**, alocriptopina **14**, protopina **15**, sanguinarina **16** y queleritrina **17** (Argueta *et al.*, 1994) (Figura 3). El segundo estudio fue conducido de manera biodirigida sobre el extracto etánolico de la raíz de la planta; esta investigación permitió la identificación de, quelirubina **18**, marcapina **19** y sanguinarina **16**, este último compuesto fue el responsable de la actividad inhibitoria al receptor angiotensina AT<sub>1</sub> (Caballero *et al.*, 2002; Caballero *et al.*, 2003) (Figura 3).

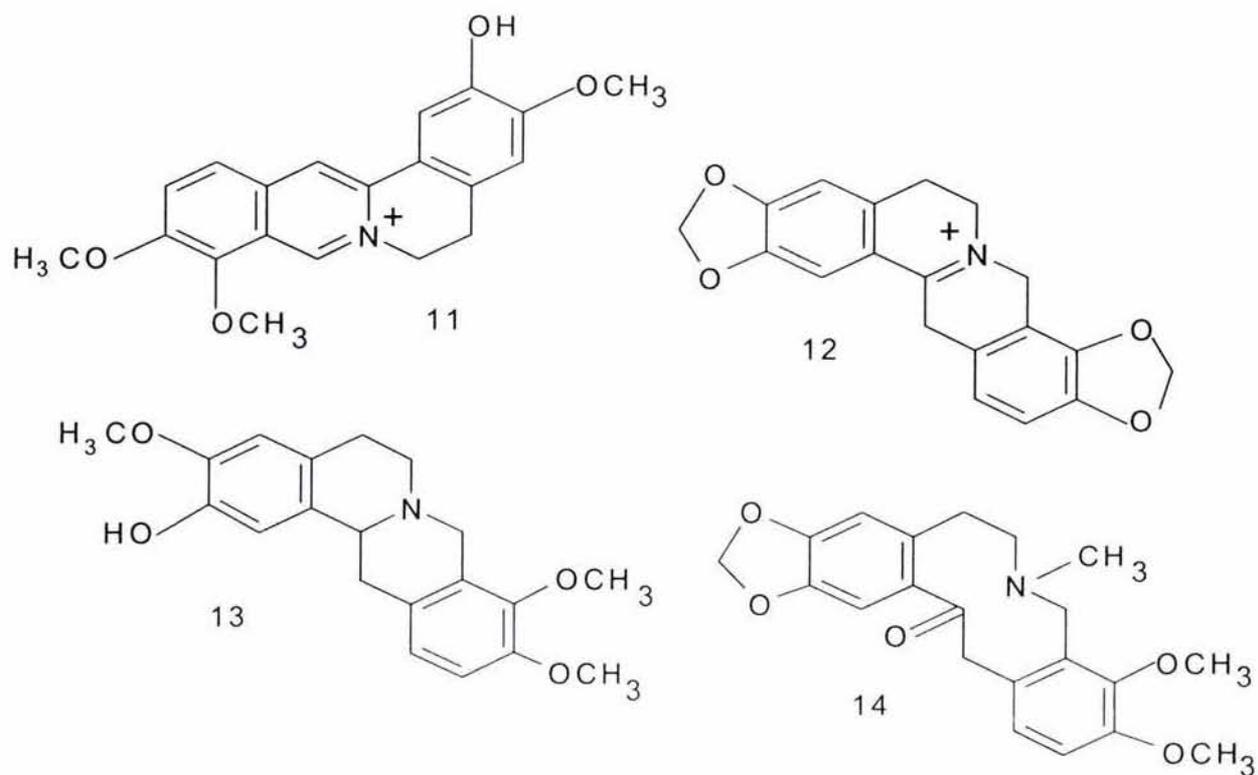


Figura 3. Compuestos aislados de *Bocconia frutescens* L.

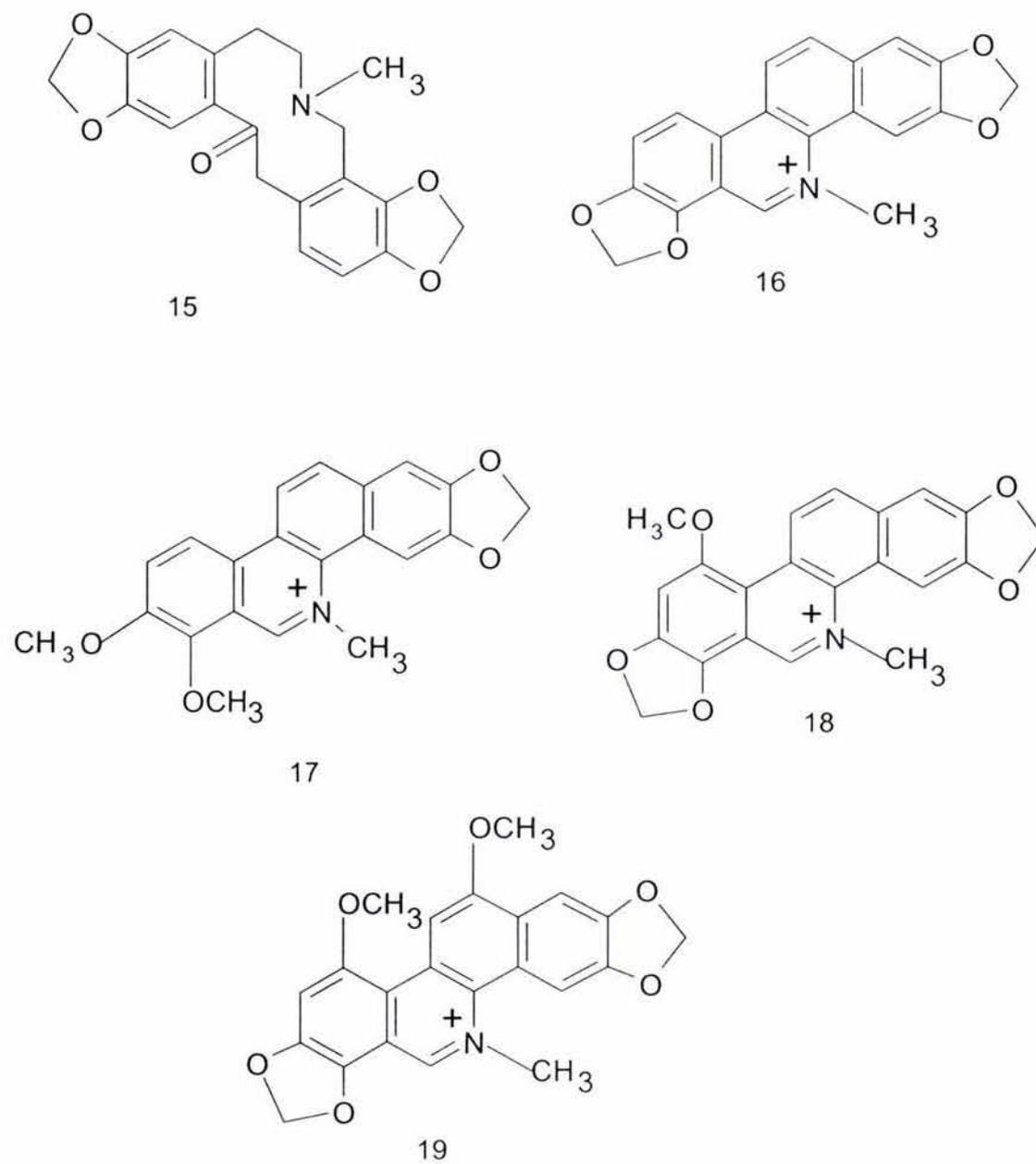


Figura 3. Compuestos aislados de *Bocconia frutescens* L (continuación).

## II.2 GENERALIDADES SOBRE LA DIARREA

La diarrea es un síndrome clínico de etiología diversa, que consiste en el aumento de la proporción de agua, electrolitos en las heces y el número de las evacuaciones. En la diarrea hay un desequilibrio entre la secreción-absorción de líquidos y electrolitos en el intestino, así como aumento del tránsito intestinal (Wyngaarden *et al.*, 1992; Isselbacher *et al.*, 1994).

La diarrea puede ser originada por causas infecciosas [virus (*Rotavirus* y *virus Norwalk*), bacterias (enterobacterias como *Salmonella sp*, *Shigella sp* y *Escherichia sp*), parásitos (*Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*)], farmacológicas (por fármacos diuréticos o antimicrobianos), alimentarias (por la ingestión de grandes cantidades de sorbitol o manitol) y psicósomáticas (estrés) (Merck, 1999; Wyngaarden *et al.*, 1992).

A nivel mundial las diarreas constituyen la mayor causa de morbilidad y mortalidad, superando en áreas rurales a enfermedades del corazón, cáncer y enfermedades vasculares cerebrales. La mayor morbilidad de enfermedades diarreicas e infecciosas entéricas ocurre en lactantes y preescolares (Higuera *et al.*, 1996).

En México las enfermedades infecciosas intestinales ocuparon hasta el año 2000, el decimocuarto lugar de mortalidad general con 5,208 defunciones anuales y una tasa del 5.18% por cada 100,000 habitantes, y el primer lugar de causas de mortalidad en edad preescolar con 689 defunciones anuales y una tasa de 7.96% por cada 100,000 habitantes (SS, 2000).

Considerando que esta tesis esta enfocada al estudio de las propiedades antibacterianas de *Boconnia frutescens* contra bacterias causantes de diarrea y/o disentería a continuación mencionare algunos aspectos generales de estos microorganismos.

La familia de las Enterobacteriáceas comprende los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* estos son lactosa negativa y *Serratia*, *Proteus*, *Yersinia*. *Salmonella* y *Shigella* son lactosa negativa. Estos microorganismos son bacilos, gram negativos, sin agrupación, no esporulados, móviles (excepto *Shigella*, *Klebsiella* y *Yersinia*), y algunos géneros presentan cápsula como *Enterobacter*, *Klebsiella* y algunas cepas de *Escherichia*. Se caracterizan bioquímicamente por su capacidad de reducir nitratos a nitritos y por utilizar glucosa y la producción de ácido y/o gas. Las enterobacterias y pseudomonas crecen adecuadamente en agar nutritivo, agar triple azúcar-hierro (THA), agar sangre y agar chocolate. Sin embargo, los medios más empleados para su identificación son: Mac Conkey, agar entérico de Hektoen (HE), en agar eosina-azul de metileno (EMB), agar Salmonela-Shigella (S-S), por mencionar algunos (Jawetz, *et al.*, 1999; Zinsser, 1994; Salyers y Dixie, 1994).

Los organismos del género *Salmonella* producen generalmente H<sub>2</sub>S. Son microorganismos facultativos intracelulares, viven principalmente en macrófagos del hígado y bazo, que según Ewin se clasifican en tres especies: *S. typhi*, *S. choleraesuis* y *S. enteritidis*, los principales agentes etiológicos de diarrea son los dos últimos. *S. choleraesuis* también produce septicemia y *S. typhi* causa fiebre entérica a la cual se le conoce como tifoidea, generalmente va acompañada de diarrea leve con fiebre moderada (Zinsser, 1994; Jawetz *et al.*, 1999; Salyers y Dixie, 1994; Greenwood y Peutherer, 1997; Granados y Villaverde, 1997; Farmer *et al.*, 1991; Murray *et al.*, 1995).

El género *Shigella* es H<sub>2</sub>S negativo, son microorganismos intracelulares que se reproduce en el citoplasma, hay cuatro especies según la clasificación basada en el antígeno "O": *Sh. dysenteriae*, *Sh. flexneri*, *Sh. boydii* y *Sh. sonnei* las cuales ocasionan disentería bacilar o shigelosis que presentan diarrea acompañada de vómito y fiebre y con frecuencia se encuentra pus y sangre en

las heces (Zinsser; 1994; Jawetz *et al.*, 1999; Salyers y Dixie, 1994; Greenwood y Peutherer, 1997; Granados y Villaverde, 1997; Farmer *et al.*, 1991; Murray *et al.*, 1995).

El género *Escherichia* es anaerobio facultativo, indol positivo, citrato negativo y ureasa negativo, en el medio EMB sus colonias son verdes metálicas, lisas, circulares y convexas y en agar ENDO algunas cepas producen colonias muciosas. En el medio Mac Conkey las colonias son rosas. Diferentes cepas de *E. coli* tienen la capacidad de producir gran variedad de enfermedades; como *E. coli* enterotoxigénica (ECET) causante de diarrea acuosa muy abundante, sin sangre ni moco en niños y turistas; *E. coli* enteropatógena (ECEP) causante de diarreas persistentes en niños; *E. coli* enteroinvasiva (ECEI) que produce diarrea mucosanguinolenta en niños; *E. coli* enteroagregativa (ECEA) que causa diarrea mucopurulenta en niños y adultos; *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) que produce diarrea con sangre que antecede a colitis hemorrágica, falla renal aguda y púrpura trombocitopénica, cuyo principal serotipo es el O157:H7 (Zinsser, 1994; Jawetz *et al.*, 1999; Salyers y Dixie, 1994; Greenwood y Peutherer, 1997; Granados y Villaverde, 1997; Farmer *et al.*, 1991; Murray *et al.*, 1995).

El género *Vibrionaceae* incluye más de 30 especies, la más común es *Vibrio cholerae* esta es un bacilo anaerobio facultativo, causante del cólera, altamente móvil con un flagelo polar, oxidasa positivo, reduce nitratos a nitritos. Para incrementar y favorecer su aislamiento se recomienda el empleo de caldos de enriquecimiento, los más utilizados son el agua peptonada alcalina a pH 8.5 y el caldo triptisoya. Sin embargo, debido a la posibilidad de que la flora fecal saprófita dificulte la detección de estos microorganismos y en especial para el aislamiento de *V. cholerae*, se recomienda el empleo de medios selectivos como el medio tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS) en este medio *V. cholerae* forma colonias amarillas, en el medio telurito-taurocolato-gelosa-agar (TTGA) crece formando colonias pequeñas con un centro negro

(Zinsser, 1994; Jawetz *et al.*, 1999; Salyers y Dixie, 1994; Greenwood y Peutherer, 1997; Granados y Villaverde, 1997; Farmer *et al.*, 1991; Murray *et al.*, 1995).

El cólera es una infección intestinal aguda, grave, que se caracteriza por la presencia de diarrea acuosa abundante, vómitos, deshidratación severa, acidosis y puede llevar a colapso circulatorio; en los casos no tratados se produce la muerte en las primeras 24 horas (Higuera *et al.*, 1996).

Las especies de *Pseudomonas* son bacilos, gram negativos semejantes a las enterobacterias pero difieren de éstas ya que son aerobias estrictas. En el caso particular de *P. aeruginosa* es una especie oportunista, se encuentra con regularidad en el medio hospitalario, tiene movilidad, es oxidasa positiva, no fermenta carbohidratos, produce pigmentos que se difunden al medio como piocianina o pioverdina que ayudan para la identificación de esta especie, crece bien en todos los medios de cultivo comunes, pero lo hacen mejor a temperaturas entre 30 y 37 °C, en el medio agar sangre crece formando colonias convexas, planas con superficie rugosa, un medio selectivo para esta especie es el bromuro de hexadecilmetilamonio (agar cetrimida), además presenta un olor característico como a “tortilla húmeda”, esta especie en casos aislados a llegado a causar diarrea severa en niños que han sido objeto de transplantes de médula ósea, junto con otras complicaciones en pacientes quemados o inmunodeprimidos (Zinsser, 1994; Jawetz *et al.*, 1999; Freeman, 1985; Lennete, 1982; Braude, 1984).

Aunque el tratamiento de la diarrea suele ser inespecífico, esta orientado en general a reducir el malestar, las molestias de las evacuaciones frecuentes y el restablecimiento del equilibrio hídrico y electrolítico, acompañada o no de algunos fármacos como: mezcla de trimetoprim (19)-sulfametoxazol (20), amoxicilina (21), cefotaxima (22) o ceftriaxona (23). La duración del tratamiento dependerá de la localización de la infección y las condiciones generales del paciente. En el caso particular de *P. aeruginosa* se recomienda administrar una penicilina junto con un

aminoglicósido como la gentamicina (24) (Figura 4) (Goodman *et al.*, 1996; Higuera *et al.*, 1996; Zinsser, 1994; Jawetz *et al.*, 1999).

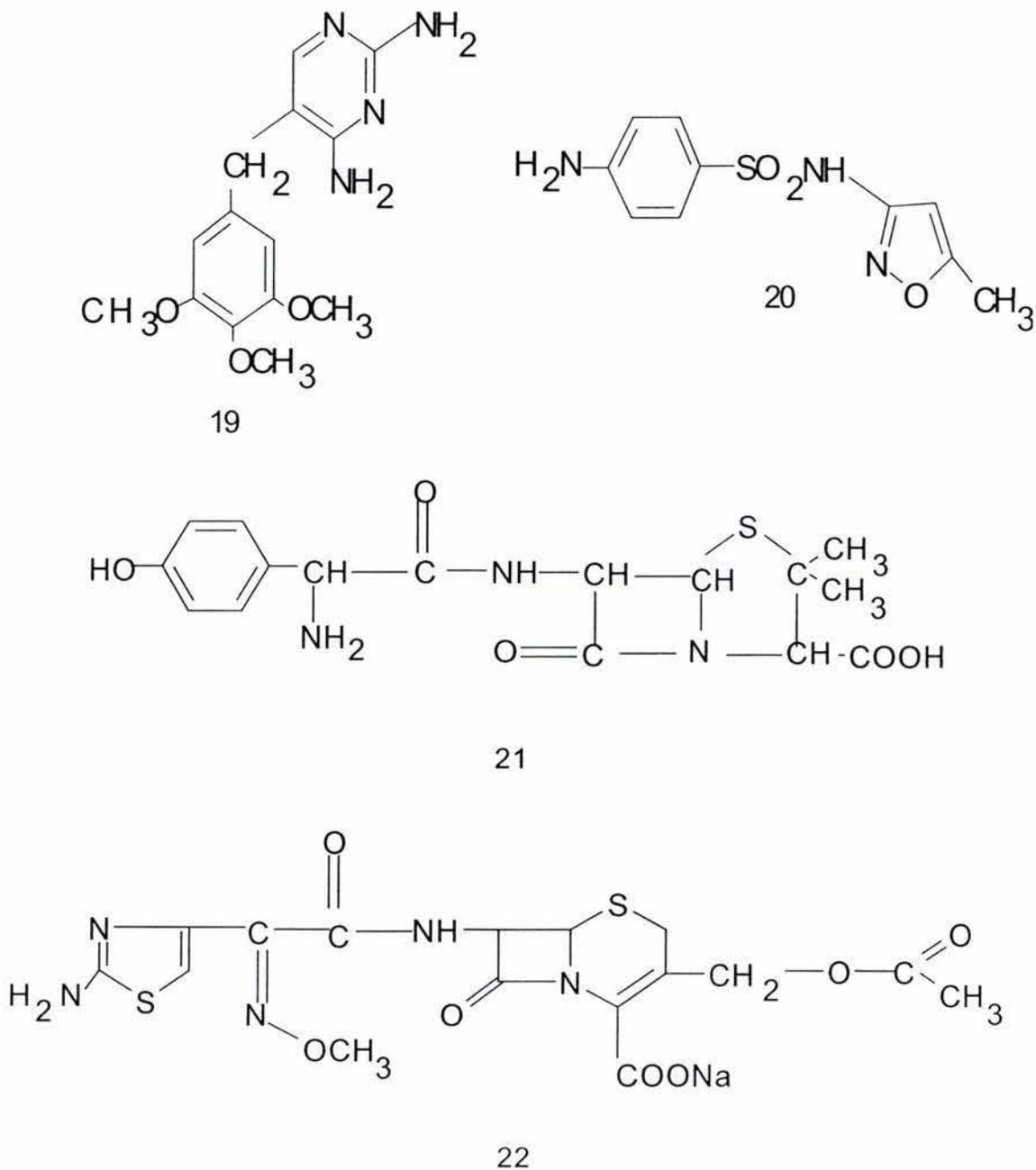


Figura 4. Algunos fármacos utilizados en el tratamiento de la diarrea de origen infeccioso.

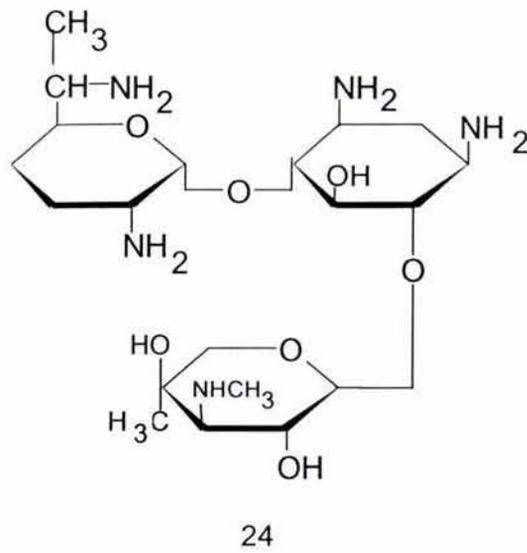
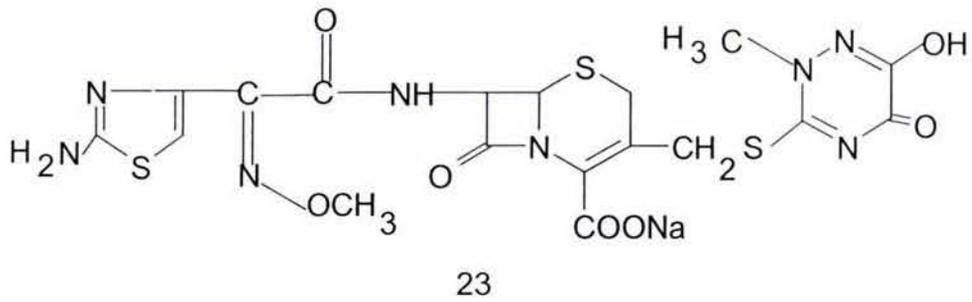


Figura 4. Algunos fármacos utilizados en el tratamiento de la diarrea de origen infeccioso (continuación).

### **III. JUSTIFICACION**

En México hay un gran número de especies vegetales usadas en las prácticas médicas alternativas las cuales carecen de estudios químico y farmacológico que permitan sustentar sus propiedades medicinales por lo que se propuso:

### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Realizar la determinación de la actividad antibacteriana del extracto metanólico, fracciones y compuestos puros obtenidos de las hojas de *Bocconia frutescens* L.

#### **IV.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Obtener el extracto metanólico de las hojas de *B. frutescens* .
2. Fraccionar, separar y purificar el extracto metanólico de las hojas de *B. frutescens*.
3. Determinar la actividad antibacteriana del extracto, fracciones y compuestos obtenidos de las hojas de *B. frutescens*.

## **V. META**

Contribuir al conocimiento de las propiedades farmacológicas y químicas de las plantas medicinales de México, en especial de *B. frutescens*.

## **VI. HIPÓTESIS**

Si las hojas de *B. frutescens* son utilizadas en las prácticas médicas alternativas para tratar trastornos del aparato digestivo que incluyen diarrea y disentería, entonces su extracto y productos derivados poseen propiedades antibacterianas contra agentes etiológicos causantes de estos síntomas tales como: *E.coli*, *Salmonella sp*, *Shigella sonnei*, *Sh. flexneri* y *V.cholerae*.

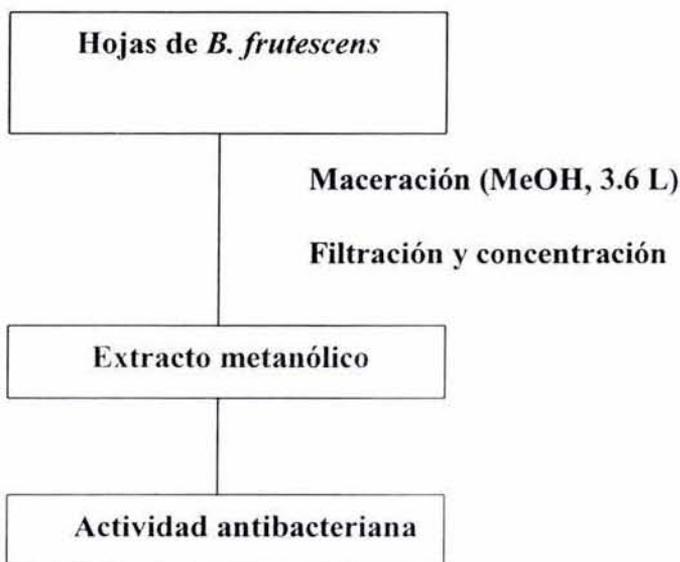
## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### VII.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal (hojas) utilizado fue recolectado en la sierra de Tehuetlán, Hidalgo en el mes de noviembre de 1998. La identificación botánica fue realizada por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras y un ejemplar de referencia (Voucher 12618; Colección de Fernando Calzada) se depositó en el Herbario IMSSM del Instituto Mexicano del Seguro Social.

### VII.2 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *B.FRUTESCENS*

Las hojas (843 g) de *B. frutescens*, se secaron a temperatura ambiente y se molieron en un molino Tor-Rey, posteriormente se extrajeron vía maceración (3 veces por periodos de una semana) utilizando metanol (3.6 L) como disolvente. A los extractos obtenidos se les eliminó el disolvente por destilación a presión reducida para obtener 23 g de un residuo de color verde oscuro al cual se le determinó su actividad antibacteriana (Cuadro 6) (Esquema 1).



Esquema 1. Obtención del extracto metanólico de las hojas de *B. frutescens*.

### VII.3 ENSAYO BIOLÓGICO

El ensayo biológico usado para la determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto, fracciones y compuestos puros se realizó siguiendo el bioensayo descrito por Gavan y Barry (Lennette, 1985).

#### VII.3.1 ENTEROBACTERIAS

Las cepas de bacterias empleadas fueron: *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella sonnei* (2 cepas), *Sh. flexneri* (2 cepas), *Salmonella sp* (2 cepas), *Vibrio cholerae* y dos cepas control *E.coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Las cepas se mantuvieron en refrigeración en medio agar Muller-Hinton (M-H) hasta su utilización. Las cepas son aislamientos clínicos de pacientes pediátricos con diarrea y fueron proporcionadas por la UIM de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, CMN SXXI, IMSS (Torres *et al.*, 1995).

El inóculo de cada una de las cepas se sembró en tubos de vidrio con agitación constante que contenían 10 mL de medio líquido Muller-Hinton a 37 °C por 4 horas, al término de este tiempo las suspensiones bacterianas se ajustan con medio M-H a una transmitancia de 0.5 Mc Farland que es equivalente a un inóculo de  $10^8$  UFC/mL. Alícuotas de 50µL de cada suspensión se transfirieron a los pozos de un replicador de Steers.

Las muestras (extracto, fracciones y compuestos puros) se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO, 100%), de la solución resultante se transfirieron 200, 400, 800, 1600 µL a cuatro matraces erlenmeyer de manera independiente y se ajustaron a un volumen de 20 mL con agar M-H para obtener una concentración final de 1, 2, 4, 8 mg/mL, respectivamente. Inmediatamente las muestras se adicionan a cajas petri. En caso de ser necesario se realizan diluciones para

obtener concentraciones de 0.4, 0.3, 0.2 y 0.1 mg/mL. Cada concentración se ensayó por duplicado y se repitió un mínimo de tres veces.

Una vez que las muestras se solidificaron se inocularon con las suspensiones bacterianas contenidas en el replicador Steers calibrado para sembrar  $10^4$  UFC. Las muestras se incubaron a 37 °C por 24 horas. Cada prueba incluyó cloranfenicol (Sigma) y trimetoprim (Sigma) como controles positivos, un control (medio agar M-H, DMSO y bacterias) y un blanco (medio agar M-H y bacterias). El % de inhibición se determinó midiendo directamente con una regla el halo de crecimiento de las muestras problema comparando con el control.

#### **VII.4 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO**

La cromatografía en columna abierta se realizó sobre gel de sílice, Kieselgel 60 Merck, (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM). La cromatografía de filtración por gel en columna abierta se realizó sobre sephadex LH-20 (Pharmacia). Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) tanto analíticos como preparativos se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de aluminio o vidrio recubiertas con gel de sílice (cromatofolios Merck, Alugram sil F250 6/UV), las placas preparativas se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de vidrio recubiertas con gel de sílice (20 X 20 cm, Sílica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck), varios eluyentes y los agentes cromógenos que se indican en el Cuadro 1.

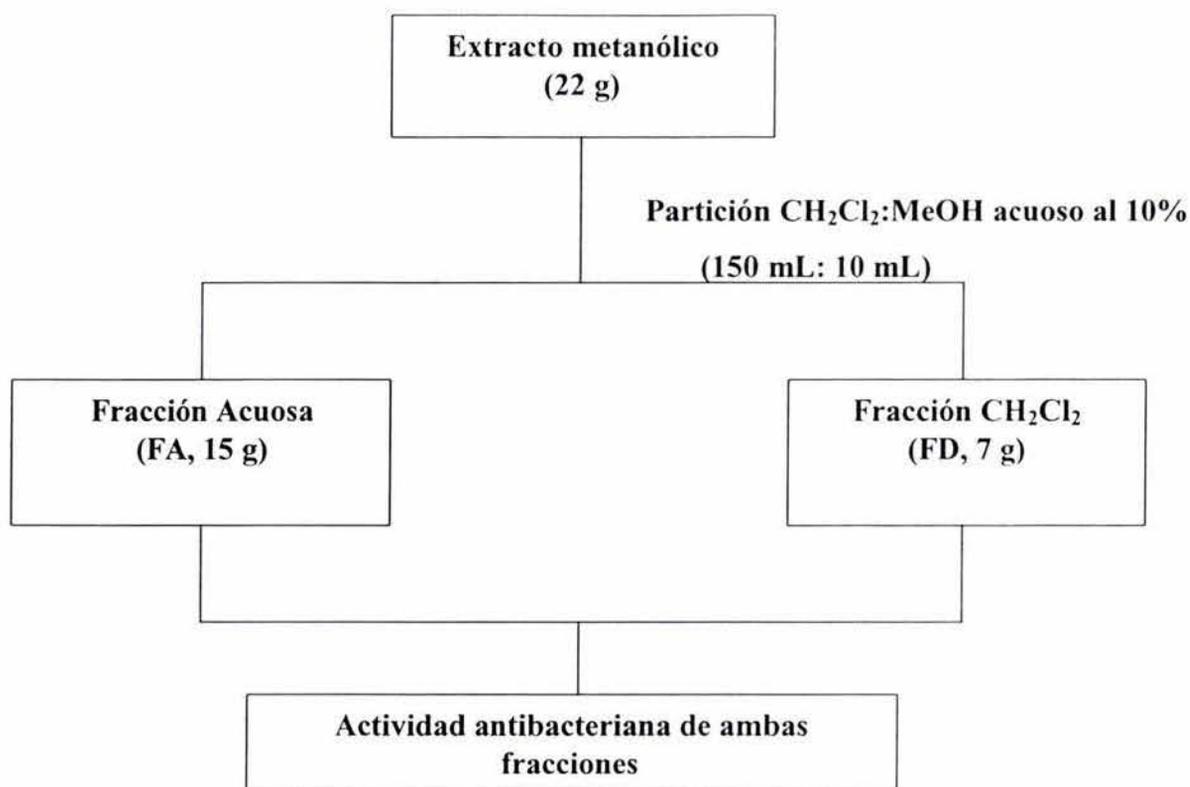
Cuadro 1. Agentes cromógenos utilizados en los análisis de cromatografía en capa fina.

Agente cromógeno	Composición	Referencia
Sulfato cérico	12 g de sulfato cérico 22.2 mL de ácido sulfúrico 350 g de hielo	Stahl, 1969
Dragendorff	Sol A. 3 g de nitrato básico 1 mL (23% HCl) 5 mL de H <sub>2</sub> O Sol B. 3 g de yoduro de potasio 5 mL de H <sub>2</sub> O 5 mL de A + 5 mL de B 5 mL (de HCl al 12.5 %) 100 mL de H <sub>2</sub> O recién preparado	Wagner <i>et al.</i> , 1984
Vainillina-Ac. sulfúrico	5% ác. sulfúrico etanólico (sol. I) 1% vainillina etanólica (sol. II) 10 mL I + 5-10 mL II, calentar a 110°C de 5-10 min.	Wagner <i>et al.</i> , 1984
Ninhidrina	30 mg de ninhidrina + 10 mL n-BuOH + 0.3 mL ác. acético al 98% recién preparada	Stahl, 1969

NOTA. En todos los casos antes de revelar con el agente cromógeno se procedió a visualizar las placas con luz U.V. con ayuda de una lámpara modelo UV gL-58 a longitudes de 254 y 365 nm.

## VII.5 FRACCIONAMIENTO MEDIANTE REPARTOS SUCESIVOS DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *B. FRUTESCENS*

Una parte del extracto metanólico (22 g) se suspendió en metanol acuoso al 10% (10 mL) y posteriormente se sometió a un fraccionamiento primario mediante repartos sucesivos con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 mL X 3). Como resultado de este proceso se obtuvieron dos fracciones primarias: la fracción de diclorometano (FD, 15 g) y la fracción acuosa (FA, 7 g) a las cuales se les determinó su actividad antibacteriana (Cuadro 6) (Esquema 2).



Esquema 2. Fraccionamiento mediante repartos sucesivos del extracto metanólico de las hojas de *B. frutescens*.

## VII.6 SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN DE DICLOROMETANO (FD)

La separación de los compuestos de la fracción de diclorometano (FD, 5g) se realizó por cromatografía en columna abierta, empleando como fase estacionaria gel de sílice (1146 g). Los eluyentes empleados consistieron en mezclas de  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt y MeOH en diferentes proporciones (Cuadro 2). Se obtuvieron un total de 111 fracciones de 200 mL c/u, reuniéndose aquellas que mostraron similitudes cromatográficas y así obtener nueve fracciones secundarias [FD-1 (33.5 mg), FD-2 (26.9 mg), FD-3 (121.1 mg), FD-4 (112.9 mg), FD-5 (575.5 mg), FD-6

(251.8 mg), FD-7 (2.073 g), FD-8 (312.5 mg) y FD-9 (6.357 g)] a las cuales se les determinó su actividad antibacteriana (Cuadro 7).

Cuadro 2. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta de la fracción primaria FD.

Sistema	Proporción	Fracciones	Fracciones secundarias
CHCl <sub>3</sub>	100	1-40	FD-1/FD-4
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	95:5	41-81	FD-5/FD-7
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	90:10	82-90	FD-8
AcOEt:MeOH	80:20	91-111	FD-9

La purificación de los compuestos de las fracciones secundarias FD-5 y FD-6 se realizó mediante cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) (30 mg por placa), utilizando como fase estacionaria gel de sílice sobre placas de vidrio y como fase móvil la mezcla de disolventes Hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50:50) para FD-5 y Hexano:CHCl<sub>3</sub> (20:80) para FD-6. Estas mismas fases móviles se utilizaron para determinar los rfs. De la fracción FD-5 se obtuvo un aceite (54.4 mg) de color amarillo, al cual se le dio la clave BF-1. De la fracción FD-6 se obtuvo un aceite (44 mg) de color amarillo, al cual se le dio la clave BF-2.

## VII.7 SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN ACUOSA (FA)

La separación de los compuestos de la fracción acuosa (FA 7 g) se realizó por cromatografía en columna abierta, empleando como fase estacionaria sephadex LH-20 (5 cm X 20 cm). Los eluyentes empleados consistieron en mezclas de disolventes MeOH:H<sub>2</sub>O en diferentes proporciones (Cuadro 3). Se obtuvieron un total de 203 fracciones de 25 mL c/u. reuniéndose aquellas que mostraron similitud cromatográfica y así obtener seis fracciones secundarias

[FA1 (1mg), FA2 (5.046 g), FA3 (169.6 mg), FA4 (836.6 mg), FA5 (292 mg) y FA6 (557 mg)] a las cuales se les determinó su actividad antibacteriana (Cuadro 8).

Cuadro 3. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta de la fracción primaria FA.

Sistema	Proporción	Fracciones	Fracciones secundarias
MeOH	100	1-46	FA1/FA3
MeOH:H <sub>2</sub> O	90:10	47-87	FA4
MeOH:H <sub>2</sub> O	80:20	88-111	FA4
MeOH:H <sub>2</sub> O	60:40	112-122	FA4
MeOH:H <sub>2</sub> O	50:50	123-132	FA5
MeOH:HCOOH al 1% en agua	70:30	133-203	FA6

La separación de la fracción secundaria FA2 (5 g) se realizó por cromatografía en columna abierta, empleando como fase estacionaria gel de sílice (125 g). Los eluyentes empleados consistieron en mezclas de AcOEt, MeOH y H<sub>2</sub>O en diferentes proporciones (Cuadro 4). Se obtuvieron un total de 528 fracciones de 20 mL c/u, reuniéndose aquellas que mostraron similitudes cromatográficas y así obtener diez fracciones terciarias [FA2-1 (8 mg), FA2-2 (18 mg), FA2-3 (742.4 mg), FA2-4 (824.1 mg), FA2-5 (371.7 mg), FA2-6 (781.9 mg), FA2-7 (437.2mg), FA2-8 (158.1 mg), FA2-9 (521.3 mg) y FA2-10 (135.5 mg)] a las cuales se les determinó su actividad antibacteriana (Cuadro 9).

Cuadro 4. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta de la fracción secundaria FA2.

Sistema	Proporción	Fracciones	Fracciones terciarias
AcOEt	100	1-45	FA2-1 y FA2-2
AcOEt:MeOH	90 :10	46-87	FA2-3
AcOEt:MeOH	80 :20	88-201	FA2-4
AcOEt:MeOH	70 :30	202-256	FA2-5
AcOEt:MeOH	50 :40	257-313	FA2-6
AcOEt:MeOH :H <sub>2</sub> O	50:40:5	314-374	FA2-7
AcOEt:MeOH :H <sub>2</sub> O	50:40:10	375-443	FA2-8
AcOEt:MeOH :H <sub>2</sub> O	50:40:20	444-485	FA2-9
AcOEt:MeOH:H <sub>2</sub> O	50:40:30	486-528	FA2-10

La purificación de los compuestos de la fracción terciaria FA2-9 (450 mg) se realizó mediante cromatografía en columna abierta, empleando como fase estacionaria gel de sílice (50 g). Los eluyentes utilizados consistieron en mezclas de AcOEt, MeOH y H<sub>2</sub>O en diferentes proporciones (Cuadro 5). Se obtuvieron un total de 182 fracciones de 10 mL c/u, reuniéndose aquellas que mostraron similitudes cromatográficas y así obtener nueve fracciones cuaternarias [FA2-9-1 (2.5 mg), FA2-9-2 (39.6 mg), FA2-9-3 (13.2 mg), FA2-9-4 (22.4 mg), FA2-9-5 (40 mg), FA2-9-6 (12 mg), FA2-9-7 (87.2 mg), FA2-9-8 (9.8 mg) y FA2-9-9 (25.4 mg)]. De la fracción FA2-9-5 se obtuvo un residuo (40 mg) de color amarillo, al cual se le dio la clave BF-3. De la fracción FA2-9-7 se obtuvo un residuo (87.2 mg) de color rojo, al cual se le dio la clave BF-4. El sistema de la fase móvil de ambos compuestos usado para determinar los r<sub>f</sub>s fue AcOEt:MeOH:H<sub>2</sub>O (50:40:30).

Cuadro 5. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta de la fracción terciaria FA2-9.

Sistema	Proporción	Fracciones	Fracciones cuaternarias
AcOEt:MeOH :H <sub>2</sub> O	50:40:5	1-33	FA2-9-1 y FA2-9-2
AcOEt:MeOH :H <sub>2</sub> O	50:40:10	34-96	FA2-9-3/FA2-9-5
AcOEt:MeOH :H <sub>2</sub> O	50:40:20	97-116	FA2-9-6
AcOEt:MeOH:H <sub>2</sub> O	40:40:30	117-157	FA2-9-7 y FA2-9-8
AcOEt:MeOH: HCOOH 1% en agua	50:40:30	158-182	FA2-9-9

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La selección de *B. frutescens* como una fuente de productos antibacterianos, deriva de los resultados obtenidos de la línea de investigación permanente que se lleva a cabo en la Unidad de Investigación Médica de Farmacología de Productos Naturales del IMSS, que tiene el propósito de sustentar algunas de las propiedades medicinales que se le atribuye a nuestra flora medicinal mexicana (Alanis *et al.*, 2002).

A partir de las hojas secas, se preparó el extracto orgánico empleando como disolvente de extracción metanol. El extracto resultante se sometió a ensayo de actividad antibacteriana a la concentración de 8 mg/mL encontrándose porcentajes de inhibición de 58.8, 100 y 52.6% contra las bacterias *Sh. flexneri*-1, *V. cholerae* y *P. aeruginosa*, respectivamente. Contra las cepas restantes su efecto fue menor o igual al 30.2% (Cuadro 6). Considerando que en algunos casos la actividad antibacteriana mostrada por el extracto fue superior a la cloranfenicol, se procedió a su fraccionamiento mediante repartos sucesivos entre metanol acuoso al 10% y diclorometano.

Cuadro 6. Resultados de la actividad antibacteriana del extracto y fracciones primarias (FD y FA).

Muestra	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Extracto MeOH 8 mg/mL	0.0	6.1	4.3	58.8	--	30.2	11.1	100	24.3	52.6
FD 8 mg/mL	25.9	48.4	37.0	--	--	25.6	28.6	37.5	60.0	55.0
FA 8 mg/mL	51.8	55.5	44.4	--	--	39.5	38.0	18.7	48.0	45.0
Cloranfenicol 8mg/mL(H <sub>2</sub> O)	10.0	11.9	25.5	12.9	8.8	5.4	0.0	28.1	14.6	16.3
Trimetoprim 8mg/mL(H <sub>2</sub> O)	100	51.7	29.2	100	100	100	100	100	100	100

A= *E.coli* O157:H7, B= *Shigella sonnei*-1, C= *Shigella sonnei*-2, D= *Shigella flexneri*-1, E= *Shigella flexneri*-2, F= *Salmonella sp.*-1, G= *Salmonella sp.*-2, H= *Vibrio cholerae*, I= *E.coli* ATCC 25922 y J= *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.  
-- No se determino.

De la partición se obtuvieron las fracciones primarias FD y FA a las cuales se les determino su efecto antibacteriano a la misma concentración del extracto de origen encontrándose que la actividad de ambas fracciones fue mayor contra todas las cepas usadas excepto en el caso de la cepa *V.cholerae* donde el porcentaje de inhibición disminuyo a 37.5 y 18.7%, respectivamente.

Tomando en consideración que ambas fracciones primarias (FD y FA) resultaron activas se decidió separar sus constituyentes individuales.

La fracción primaria FD, se separo mediante CCA obteniéndose un total de nueve fracciones secundarias (FD-1 a FD-9), las cuales fueron evaluadas a una concentración de 400  $\mu$ g/mL, de las fracciones ensayadas, las fracciones secundarias FD-5 y FD-6 fueron las que tuvieron mayor porcentaje de inhibición contra todas las cepas de prueba, excepto en el caso de *Sh. flexneri-2* donde las fracciones secundarias FD-3 y FD-9 fueron más activas con un 63 y 100% de inhibición, respectivamente. Al comparar la actividad de las fracciones secundarias FD-5 y FD-6 contra la fracción de origen (FD), estas resultaron ser más activas contra todas las cepas. Estos mismos resultados se observan con los fármacos antimicrobianos (Cuadro 7).

La purificación de las fracciones secundarias FD-5 y FD-6 se realizó mediante CCFP y condujo al aislamiento de dos compuestos BF-1 y BF-2, respectivamente. Los compuestos resultaron solubles en cloroformo y diclorometano, inmiscibles en agua y al ser visualizados a la luz U.V a la longitud de onda larga se observaron como manchas de color verde fluorescente, ambos reaccionaron negativamente a los reactivos de Dragendorff y Ninhidrina. Para BF-1 el  $r_f$  fue de 0.57 [Hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50:50)] y para BF-2 de 0.20 [Hexano:CHCl<sub>3</sub> (20:80)]. Las características mencionadas para los compuestos BF-1 y BF-2 permiten proponer que se tratan de hidrocarburos aromáticos. Su evaluación a 200  $\mu$ g/mL (Cuadro 7) mostró que ambos compuestos tienen mayor

o igual actividad que sus fracciones de origen (FD-5 y FD-6) y que el cloranfenicol, contra todas las cepas probadas.

Cuadro 7. Resultados de la actividad antibacteriana de las fracciones FD y FD-3 a FD-9.

Muestra	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
<b>FD</b> 8 mg/mL	<b>25.9</b>	<b>48.4</b>	<b>37.0</b>	--	--	<b>25.6</b>	<b>28.6</b>	<b>37.5</b>	<b>60.0</b>	<b>55.0</b>
FD-3 400 µg/mL	42.1	36.7	40.0	37.9	<b>63.0</b>	33.3	21.4	22.6	42.1	42.9
FD-4 400 µg/mL	36.8	33.3	30.0	17.2	11.1	20.0	14.3	22.6	47.4	42.9
<b>FD-5</b> 400 µg/mL	<b>47.4</b>	<b>40.0</b>	<b>50.0</b>	<b>37.9</b>	<b>40.7</b>	<b>33.3</b>	<b>28.6</b>	<b>35.5</b>	<b>47.4</b>	<b>42.9</b>
<b>FD-6</b> 400 µg/mL	<b>47.8</b>	<b>40.3</b>	<b>45.0</b>	<b>40.2</b>	<b>43.3</b>	<b>31.8</b>	<b>26.7</b>	<b>33.8</b>	<b>46.1</b>	<b>42.9</b>
FD-7 400 µg/mL	42.1	23.3	45.0	37.9	33.3	40.0	35.7	29.0	42.1	37.1
FD-8 400 µg/mL	42.1	23.3	40.0	24.5	18.5	20.0	14.3	22.6	47.4	31.4
FD-9 400 µg/mL	42.1	46.7	30.0	24.1	<b>100</b>	13.3	28.6	35.5	36.8	42.9
<b>BF-1</b> 200 µg/mL	<b>45.2</b>	<b>49.4</b>	<b>31.5</b>	<b>33.3</b>	--	<b>33.3</b>	<b>33.3</b>	<b>38.5</b>	<b>33.3</b>	<b>38.5</b>
<b>BF-2</b> 200 µg/mL	<b>17.8</b>	<b>24.1</b>	<b>31.5</b>	<b>8.3</b>	--	<b>16.7</b>	<b>16.7</b>	<b>23.1</b>	<b>16.7</b>	<b>38.5</b>
Cloranfenicol 8mg/mL(H <sub>2</sub> O)	10.0	11.9	25.5	12.9	8.8	5.4	0.0	28.1	14.6	16.3
Trimetoprim 8mg/mL(H <sub>2</sub> O)	100	51.7	29.2	100	100	100	100	100	100	100

A= *E.coli* O157:H7, B= *Shigella sonnei*-1, C= *Shigella sonnei*-2, D= *Shigella flexneri*-1, E= *Shigella flexneri*-2, F= *Salmonella sp.*-1, G= *Salmonella sp.*-2, H= *Vibrio cholerae*, I= *E.coli* ATCC 25922 y J= *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

- No se determino.

FD-1 y FD-2 no pudieron ser evaluadas por ser poca cantidad.

La fracción primaria FA fue separada mediante CCA en sephadex LH-20 y obteniéndose seis fracciones secundarias (FA1 a FA6) que fueron evaluadas a una concentración de 400 µg/mL (Cuadro 8).

Cuadro 8. Resultados de la actividad antibacteriana de la fracción FA y fracciones secundarias de FA.

Muestra	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
<b>FA</b> 8 mg/mL	<b>51.8</b>	<b>55.5</b>	<b>44.4</b>	--	--	<b>39.5</b>	<b>38.0</b>	<b>18.7</b>	<b>48.0</b>	<b>45.0</b>
<b>FA2</b> 400 µg/mL	<b>33.3</b>	<b>30.8</b>	<b>28.6</b>	<b>32.0</b>	<b>35.2</b>	<b>23.8</b>	<b>46.9</b>	<b>27.8</b>	<b>33.6</b>	<b>45.5</b>
FA4 400 µg/mL	20.4	0.0	1.8	27.2	35.2	23.8	29.2	12.4	20.3	31.8
FA5 400 µg/mL	--	3.8	1.8	41.7	21.3	14.3	29.2	12.4	29.2	18.2
<b>FA6</b> 400 µg/mL	<b>33.3</b>	<b>30.8</b>	<b>24.1</b>	<b>44.4</b>	<b>44.4</b>	<b>23.8</b>	<b>46.9</b>	<b>27.8</b>	<b>33.6</b>	<b>27.3</b>
Cloranfenicol 8mg/mL(H <sub>2</sub> O)	10.0	11.9	25.5	12.9	8.8	5.4	0.0	28.1	14.6	16.3
Trimetoprim 8mg/mL(H <sub>2</sub> O)	100	51.7	29.2	100	100	100	100	100	100	100

A= *E.coli* O157:H7, B= *Shigella sonnei*-1, C= *Shigella sonnei*-2, D= *Shigella flexneri*-1, E= *Shigella flexneri*-2, F= *Salmonella sp.*-1, G= *Salmonella sp.*-2, H= *Vibrio cholerae*, I= *E.coli* ATCC 25922 y J= *Pseudomonas aeuoginosa* ATCC 27853.  
 -- No se determino. FA1 y FA3 no pudieron ser evaluadas por ser poca cantidad.

De esta evaluación las fracciones secundarias más activas contra todas las cepas en estudio fueron FA2 y FA6. Considerando que la actividad mostrada por ambas fracciones fue superior al cloranfenicol y, que se disponía de cantidad suficiente de FA2 se procedió a la separación de sus constituyentes. Esta fue separada por CCA obteniéndose un total de diez fracciones terciarias (FA2-1 a FA2-10), las cuales fueron evaluadas a una concentración de 400 µg/mL (Cuadro 9).

Cuadro 9. Resultados de la actividad antibacteriana de la fracción FA, fracción FA2 y fracciones terciarias de FA2.

Muestra	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
<b>F A</b> 8 mg/mL	<b>51.8</b>	<b>55.5</b>	<b>44.4</b>	--	--	<b>39.5</b>	<b>38.0</b>	<b>18.7</b>	<b>48.0</b>	<b>45.0</b>
<b>F A2</b> 400 µg/mL	<b>33.3</b>	<b>30.8</b>	<b>28.6</b>	<b>32.0</b>	<b>35.2</b>	<b>23.8</b>	<b>46.9</b>	<b>27.8</b>	<b>33.6</b>	<b>45.5</b>
F A2-3 400 µg/mL	10.9	11.4	31.5	8.3	--	16.7	16.7	23.1	0.0	23.1
<b>F A2-4</b> 400 µg/mL	<b>38.4</b>	<b>36.7</b>	<b>72.6</b>	<b>58.3</b>	--	<b>33.3</b>	<b>33.3</b>	<b>23.1</b>	<b>16.7</b>	<b>38.5</b>
F A2-5 400 µg/mL	10.9	5.1	17.8	8.3	--	0.0	0.0	7.7	0.0	30.8
F A2-6 400 µg/mL	17.8	5.1	24.7	25.0	--	16.7	16.7	23.1	16.7	30.8
F A2-7 400 µg/mL	17.8	11.4	11.0	16.7	--	0.0	0.0	7.7	0.0	38.8
F A2-8 400 µg/mL	10.9	24.1	17.8	11.7	--	16.7	8.3	7.7	8.3	23.1
F A2-9 400 µg/mL	41.6	0.0	4.1	0.0	--	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
F A2-10 400 µg/mL	24.7	11.4	17.0	16.7	--	0.0	8.3	15.4	16.7	23.1
<b>BF-3</b> 200 µg/mL	<b>17.8</b>	<b>24.1</b>	<b>17.8</b>	<b>16.7</b>	--	<b>0.0</b>	<b>16.7</b>	<b>7.7</b>	<b>0.0</b>	<b>15.4</b>
<b>BF-4</b> 200 µg/mL	<b>10.9</b>	<b>11.4</b>	<b>4.1</b>	<b>0.0</b>	--	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>7.7</b>	<b>0.0</b>	<b>7.7</b>
Cloranfenicol 8mg/mL(H <sub>2</sub> O)	10.0	11.9	25.5	12.9	8.8	5.4	0.0	28.1	14.6	16.3
Trimetoprim 8mg/mL(H <sub>2</sub> O)	100	51.7	29.2	100	100	100	100	100	100	100

A= *E.coli* O157:H7, B= *Shigella sonnei*-1, C= *Shigella sonnei*-2, D= *Shigella flexneri*-1,

E= *Shigella flexneri*-2, F= *Salmonella sp.*-1, G= *Salmonella sp.*-2, H= *Vibrio cholerae*,

I= *E.coli* ATCC 25922 y J= *Pseudomonas aeuoginosa* ATCC 27853.

-- No se determino. FA2-1 y FA2-2 no pudieron ser evaluadas por ser poca cantidad.

De las ocho fracciones evaluadas la más activa fue la FA2-4 mostrando mayor actividad que su fracción de origen (FA2) contra los aislados patógenos, excepto en el caso de *Salmonella sp*-2 y *V. cholerae* (Cuadro 9).

Considerando la complejidad cromatográfica de las fracciones terciarias (FA2-3 a FA2-10) se decidió a separar la fracción FA2-9 mediante CCA obteniéndose nueve fracciones cuaternarias (FA2-9-1 a FA2-9-9). De la fracción FA2-9-5 se aisló el compuesto BF-3, el cual fue soluble en metanol, con un  $r_f$  de 0.25 [AcOEt:MeOH:H<sub>2</sub>O (50:40:30)]. El producto generó una coloración roja al revelar la CCF con ninhidrina y una reacción negativa frente al reactivo de Dragendorff. De la fracción FA2-9-7 se aisló el compuesto BF-4, este fue soluble en metanol, con un  $r_f$  de 0.2 [AcOEt:MeOH:H<sub>2</sub>O (50:40:30)]. Este producto generó una coloración roja al revelar la CCF con ninhidrina y una reacción positiva frente al reactivo de Dragendorff. Las características antes mencionadas para los compuestos BF-3 y BF-4 nos permite proponer que se tratan de alcaloides (Wagner *et al.*, 1984). La actividad determinada a 200  $\mu$ g/mL, mostró que el compuesto BF-3 es más activo que el BF-4 contra todas las cepas estudiadas y ambos son más activos que su fracción de origen (FA2-9).

La actividad superior mostrada por las fracciones FD y FA comparada con el extracto metanólico de origen permite destacar la siguiente consideración:

- a) La actividad antibacteriana superior de las fracciones FD y FA comparada con la del cloranfenicol, fármaco que en su oportunidad fue el de elección para tratar las diarreas de origen infeccioso, permite proponer que las fracciones antes mencionadas pueden contener agentes antibacterianos.

## IX. CONCLUSIONES

El estudio fitoquímico biodirigido del extracto metanólico de las hojas de *B. frutescens* condujo al aislamiento de los compuestos BF-1, BF-2, BF-3 y BF-4. Siendo el compuesto BF-1 el que mostró mayor actividad.

La actividad del compuesto BF-1 fue superior a la del cloranfenicol y comparable a la de trimetoprim.

La actividad antibacteriana contra algunos agentes causales de diarrea y disentería que presentaron el extracto, fracciones (FD, FA, FD-5, FD-6, FA2, FA2-4) y los compuestos (BF-1, BF-2, BF-3 y BF-4) obtenidos de las hojas de *B. frutescens* sustenta su uso en las prácticas médicas tradicionales.

Los resultados obtenidos permiten concluir que el estudio de las plantas medicinales mexicanas deben hacerse de manera multidisciplinaria y utilizando la estrategia fitoquímica biodirigida.

## X. ACTIVIDADES FUTURAS

1. Realizar la purificación de la fracción FA2-4.
2. Caracterizar estructuralmente a los compuestos aislados.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Alanis, A. D., Calzada, F y Torres, J., 2002. Screening of some mexican medicinal plants for antibacterial activity. *Revista de Fitoterapia SI*, 311.
- Argueta, A., Cano, L y Rodarte, M., 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista, 1ra edición, Vol 1-3. México. Pp 672-673, 774,1006-1009.
- Braude, A., 1984. Microbiología clínica. Panamericana, 1ra edición. Argentina. Pp 416-424.
- Caballero, G., Vanderheyden, P., Apers, S., Van den, H., Solis, P., Gupta, M., Claeys, M., Pieters, L., Vauquelin, G y Vlietinck, A., 2002. Inhibitory activity on binding of specific ligands to the human angiotensin II AT<sub>1</sub> and endothelin 1 ET<sub>A</sub> receptors: bioactive benzo[c]phenanthridine alkaloids from the root of *Bocconia frutescens*. *Planta Med.* 68:770-775.
- Caballero, G., Vanderheyden, P., Apers, S., Solis, P., Gupta, M., Pieters, L., Vauquelin, G y Vlietinck, A., 2003. In vitro effect of sanguinarine alkaloid on binding of [<sup>3</sup>H]candesartan to the human angiotensin AT<sub>1</sub> receptor. *European Journal of Pharmacology* 458:257-262.
- Contreras, I y Mier, N., 1986. Recolección, selección, clasificación botánica y determinación de la actividad farmacológica de plantas medicinales con propiedad cicatrizante de la región de Coxcatlan, Puebla. UAP. Tesis.
- DPN, 1994. Dictionary of Natural Products. Chapman Hall Chemical Data Base, 1ra edition. London Vol 1-7.
- FEUM, (Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos) 2001. SS. Pág 47.
- Farmer, J., Balows, A., Hausler, W., Herrman, K., Isenberg, H y Sliadomy, H., 1991. Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology. Pp 360-383.

Freeman, B., 1985. Microbiología de Burrows. Interamericana-Mc Graw Hill, 22va edición. México. Pp 617-623.

Granados, R y Villaverde, M., 1997. Microbiología. Thomson editores, 1ra edición. España. Pp 99-114, 120-122.

Greenwood, D y Peutherer J., 1997. Medical Microbiology, A guide to microbial infections: pathogenesis, immunity. Laboratory diagnosis and control. Churchill Livingstone, 15 edition, Hong Kong.

Goodman, A., Gilman, L., Rall, T., Nies, P y Taylor, P., 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Interamericana-Mc Graw Hill, 9na edición. México. Pp 1124,1129,1146.

Hernández, T., Canales, M., Avila, J., Duran, A., Caballero, J., Romo de Vivar, A y Lira, R., 2003. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). Journal of Ethnopharmacology. 88:181-188.

Higuera, R., Hidalgo, L., Sánchez, C., Lagunas, R y Romero, Z., 1996. Infectología. Prado, 1ra edición. México. Pp 12-22, 102-106.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática) 1999. Cuadernos de Información estadística del Sector Salud y Seguridad Social. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México.

Isselbacher, K., Braunwald, E., Wilson, J., Martín, J., Fauci, A y Kasper, D., 1994. Principios de Medicina Interna Harrison. Interamericana-Mc Graw Hill, 13va edición. Madrid. Pp 254, 262, 770-774, 782-788.

Jawetz, E., Melnick, J y Adelberg, E., 1999. Microbiología Médica. El manual moderno, 16va edición. México. Pp 267-281, 291-294.

Lennette, E., 1985. Manual of clinical microbiology. ASM Press, 3ra edition.

- Lenete, E., 1982. Microbiología clínica. Panamericana, 1ra edición. Argentina. Pp 357-375.
- Longanga, A., Foriers, A, Vercruyse, A., Von Zeebroeck, A y Lawers, S., 2000. In vitro antimicrobial activity of six medicinal plants traditionally used for the treatment of dysentery and diarrhoea in Democratic Republic of Congo. *Phytomedicine*.7:167-172.
- Merck, 1999. El Manual Merck, Harcourt, S. A, 10ma edición. España. 3ra sección cap. 27
- Mata, E., 2000. Curso teórico de Farmacognosia, material didáctico. Segunda versión. UNAM, Facultad de Química, Departamento de Farmacia. Pp 76, 87, 93-94,97, 117, 139-140.
- McGaw, L., Jager, K y Van Staden, J., 2000. Antibacterial, anthelmintic and antiamebic activity in South African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 72:247-263.
- Mitscher, L., Drake, S., Sitaraghu, R y Okwute, S., 1987. A modern look at folkloric use of anti-infective agents. *Journal of Natural Products*. 50(6):1025-1040.
- Murray, P., Baror, E., Pfaller, M., Tenover, F y Volken, R., 1995. Manual of Clinical Microbiology, ASM Press, 6ta edición. Washington DC.
- Pascual, E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez, D y Villar, A., 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 76:201-214.
- Park, K., You, J., Lee, H., Baek, N y Hwang, J., 2003. Kuwanon G: an antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*. 84:181-185.
- Pérez, M., 2000. Actividad antibacteriana de *Boconnia frutescens*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 31:16-18.
- Ríos, J., Recio, C y Villar., 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of literature. *Journal of ethnopharmacology*. 23:127-149.
- Ross, A., 1999. Medicinal plants of the world chemical constituents, traditional and modern medicinal uses. Humana Press Inc, 1a edición . New Jersey. Pp 263-272.

Salyers, A y Dixie, W., 1994. Bacterial pathogenesis, A molecular approach. Department of microbiology Illinois University, ASM Press Washington D.C.

SBM (Sociedad Botánica de México), 2001. XV Congreso Mexicano de Botánica Fitoquímica. Farmacognosia y aspectos fitoquímicos de Gordolobo (*Bocconia frutescens* L). [www.socobot.org.mx/resumenes/resumen11.html](http://www.socobot.org.mx/resumenes/resumen11.html)

SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales), 2003. Especies con uso no maderables en bosques de encino, pino y pino-encino en los estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. [www.semarnat.gob.mx/pfnm/BocconiaFrutescens.html](http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/BocconiaFrutescens.html)

SEMARNAT, 2003a. Especies con uso no maderables en bosques tropicales y subtropicales en los estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. [www.semarnat.gob.mx/pfnm2/fichas/bocconia\\_Frutescens.html](http://www.semarnat.gob.mx/pfnm2/fichas/bocconia_Frutescens.html)

Silva, R; Montellano, H., Salazar, G., Vásquez, R y Castro, Ma., 1999. Estudio del efecto antibacteriano y tóxico del extracto crudo de *Parmelia bolliana*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 30: 22-24.

SS (Secretaría de Salud), 1993. Manual de procedimientos, guía para el manejo efectivo de niños con enfermedad diarreica a pacientes con cólera, 7ma edición. México.

SS. Principales causas de mortalidad general, 2000.

[http://www.salud.gob.mx/apps/htdocs/estadisticas/mortalidad/2000/Mortalidad\\_C05\\_2000.xls](http://www.salud.gob.mx/apps/htdocs/estadisticas/mortalidad/2000/Mortalidad_C05_2000.xls)

SS. Principales causas de mortalidad en edad preescolar (de 1 a 4 años), 2000.

[http://www.salud.gob.mx/apps/htdocs/estadisticas/mortalidad/2000/Mortalidad\\_C07\\_2000.xls](http://www.salud.gob.mx/apps/htdocs/estadisticas/mortalidad/2000/Mortalidad_C07_2000.xls)

Stahl, E., 1969. Thin-Layer Chromatography, A laboratory handbook. Springer-Verlag, 2da edition. New York.

- Torres, J., González, A., Pérez, R y Muñoz, O., 1995. Innapropriate treatment in children with bloody diarrhea: clinical and microbiological studies. *Archives Medical Research* 26:23-29.
- Vanden, A y Vlietinck, A., 1991. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Methods in Plant Biochemistry* 6:1314-1343.
- Wagner, H., Blatt, S y Zgainski, M., 1984. *Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. New York Tokio.
- Wyngaarden, J., Smith, LL y Bennett, J., 1992. *Tratado de medicina interna CECIL.* Interamericana-Mc Graw Hill , 19na edición. México. Pp 760-798.
- Zinsser., 1994. *Microbiología.* Panamericana, 20va edición. Argentina. Pp 736-761, 772-778.