



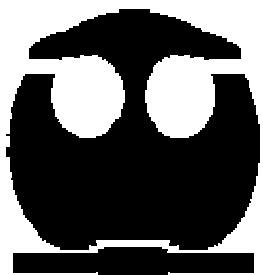
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO QUÍMICO Y ANTIMICROBIANO DE LAS HOJAS
DE LA PLANTA MEDICINAL *Alnus acuminata* sbsp. *arguta*
(Schlecht.) Furlow

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
RAQUEL MARTÍNEZ PALACIOS



MÉXICO, D.F.

2008



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.

Jurado asignado:

Presidente	<i>Prof. MARIA ISABEL AGUILAR LAURENTS</i>
Vocal	<i>Prof. RACHEL MATA ESSAYAG</i>
Secretario	<i>Prof. JOSE FAUSTO RIVERO CRUZ</i>
Primer Suplente	<i>Prof. ISABEL DEL CARMEN RIVERO CRUZ</i>
Segundo Suplente	<i>Prof. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDIVAR</i>

Sitio de realización de la tesis:

LABORATORIO 125, DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO "E",
DIVISIÓN DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA,
UNAM, CD. UNIVERSITARIA

ASESOR:

DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS

SUSTENTANTE:

RAQUEL MARTÍNEZ PALACIOS

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por formarme como profesionista y otorgarme las herramientas necesarias para superarme.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), por el apoyo económico otorgado a través del proyecto IN211807.

A los miembros del jurado, especialmente a la Dra. Rachel Mata Essayag y al Dr. Fausto Rivero Cruz por la revisión del manuscrito de tesis y por sus valiosos comentarios y observaciones al mismo.

Al personal académico de la USAI, Facultad de Química, particularmente a la Q. Georgina Duarte Lisci, la Q. F. B. Marisela Gutiérrez, a la M. en C. Rosa Isela del Villar y a la Q. Alejandrina Acosta Huerta, por el registro de los espectros en el infrarrojo y RMN; así como a la Q. F. B. Margarita Guzmán Villanueva por la realización de los análisis de CG-EM y la búsqueda realizada en la base de datos para determinar la composición de algunas mezclas de compuestos.

Al M. en C. Víctor Navarro del Centro de Investigación Biomédica Sur, IMSS por la realización de parte de las pruebas antimicrobianas.

A la Q. F. B. Ma. Guadalupe Tsuzuki Reyes del Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química por su asesoría y apoyo técnico para la realización de las pruebas antimicrobianas.

Y especialmente a la Dra. Isabel Aguilar Laurents por todo el apoyo que me brindó durante la elaboración de este trabajo, por su infinita paciencia y por brindarme siempre su amistad.

Este trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Andrés Navarrete Castro.

ÍNDICE

Índice de figuras _____	IV
Índice de tablas _____	V
Índice de espectros _____	VI
Lista de abreviaturas _____	VIII
1. ANTECEDENTES _____	1
1.1. FAMILIA BETULACEAE _____	1
1.2. GÉNERO <i>ALNUS</i> _____	2
1.2.1. Composición química del género <i>Alnus</i> _____	2
1.2.2. Propiedades medicinales dentro del género <i>Alnus</i> _____	5
1.2.3. <i>Alnus acuminata</i> sbsp. <i>arguta</i> _____	6
1.2.3.1. Clasificación botánica _____	6
1.2.3.2. Nombres Comunes _____	7
1.2.3.3. Sinónimos _____	7
1.2.3.4. Descripción de la planta _____	8
1.2.3.5. Distribución y Ecología _____	8
1.2.3.6. Usos _____	9
1.3. EXTRACCIÓN DE UN MATERIAL VEGETAL _____	10
1.4. AGENTES ANTIMICROBIANOS _____	10
1.5. BIOENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA _____	12
1.5.1. Determinación de actividad antimicrobiana por el método de difusión _____	12
1.5.2. Determinación de actividad antimicrobiana por el método de dilución _____	13
1.6. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS _____	14
1.7. MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS Y ESPECTROSCÓPICOS _____	14
1.8. LÍPIDOS Y COMPUESTOS NATURALES RELACIONADOS _____	15
2. OBJETIVOS _____	17
2.1. OBJETIVO GENERAL _____	17
2.2. OBJETIVOS PARTICULARES _____	17

3. HIPÓTESIS	18
4. JUSTIFICACIÓN	18
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	19
5.1. DIAGRAMA GENERAL	19
5.2. MATERIAL Y EQUIPO UTILIZADO	20
5.3. MATERIAL VEGETAL	20
5.3.1. Preparación de los extractos orgánicos vegetales	21
5.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TÓXICA DE LOS EXTRACTOS EN EL CRUSTÁCEO <i>Artemia salina</i>	21
5.4.1. Preparación de los organismos	21
5.4.2. Preparación de las muestras	21
5.4.3. Bioensayo	21
5.5. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN	22
5.5.1. Crecimiento de las cepas	22
5.5.2. Preparación de placas de agar	23
5.5.3. Preparación del agar con el inóculo	23
5.5.4. Preparación de discos	23
5.5.5. Inoculación de placas	23
5.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN	24
5.6.1. Preparación de las muestras	24
5.6.2. Preparación del inóculo	24
5.6.3. Bioensayo	25
5.7. FRACCIONAMIENTO PRIMARIO	25
5.8. REACCIÓN GENERAL DE METILACIÓN	25
5.9. PURIFICACIÓN DE FRACCIONES CON CLOROFILA	26
5.10. SEPARACIÓN DE COMPUESTOS	26
5.10.1. Aislamiento e identificación de 14-taraxeren-3-ona	30
5.10.2. Aislamiento e identificación del 3-oxo-lup-20(29)-eno	30
5.10.3. Aislamiento e identificación de β -sitosterol	31

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
6.1. Preparación de los extractos orgánicos vegetales	32
6.2. Determinación de la actividad tóxica de los extractos en el crustáceo <i>Artemia salina</i>	33
6.3. Determinación de actividad antimicrobiana por el método de difusión	34
6.4. Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de dilución	37
6.5. Fraccionamiento primario	38
6.6. Aislamiento e identificación de compuestos	42
7. CONCLUSIONES	44
8. BIBLIOGRAFÍA	45
ANEXOS	50

Índice de Figuras

Figura 1. Ejemplos de los géneros que pertenecen a la familia Betulaceae _____	1
Figura 2. <i>Alnus acuminata</i> _____	7
Figura 3. Descripción de <i>Alnus acuminata</i> sbsp. <i>arguta</i> _____	8
Figura 4. Distribución de <i>Alnus acuminata</i> en México _____	9
Figura 5. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria _____	13
Figura 6. Características físicas de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico _____	33
Figura 7. Inocuidad de los extractos en la prueba de actividad antimicrobiana por difusión _____	34
Figura 8. Actividad antimicrobiana de los 3 extractos obtenida para <i>E. coli</i> por el método de difusión en agar _____	37
Figura 9. Actividad antimicrobiana de los 3 extractos obtenida para <i>S. aureus</i> por el método de difusión en agar _____	37

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de los métodos cromatográficos _____	14
Tabla 2. Métodos utilizados para determinar la estructura molecular de componentes orgánicos _____	14
Tabla 3. Ejemplos de ácidos grasos y sus fuentes _____	16
Tabla 4. Microorganismos de referencia utilizados en la determinación de la actividad antimicrobiana por el método de dilución _____	24
Tabla 5. Rendimiento de los extractos derivados del material vegetal ____	32
Tabla 6. CL ₅₀ de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico ____	34
Tabla 7. Halos de inhibición en el extracto hexánico _____	35
Tabla 8. Halos de inhibición en el extracto clorofórmico _____	35
Tabla 9. Halos de inhibición en el extracto metanólico _____	36
Tabla 10. CMI's de los tres extractos con respecto a diferentes microorganismos _____	38
Tabla 11. Fracciones obtenidas del fraccionamiento primario del extracto clorofórmico _____	39
Tabla 12. Fracciones secundarias F1 a F6 _____	40
Tabla 13. Compuestos encontrados en las fracciones secundarias F1 a F6 _____	41

Índice de Espectros

Espectro 1.	Espectro en el IR (película) de la 14-taraxeren-3-ona _____	50
Espectro 2.	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de la 14-taraxeren-3-ona _____	51
Espectro 3.	Espectro de masas de la 14-taraxeren-3-ona _____	52
Espectro 4.	Espectro en el IR (película) de la lup-20(29)-en-3-ona _____	53
Espectro 5.	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de la lup-20(29)-en-3-ona _____	54
Espectro 6.	Espectro de masas de la lup-20(29)-en-3-ona _____	55
Espectro 7.	Espectro en el IR (película) del β-sitosterol en mezcla con ácidos grasos _____	56
Espectro 8.	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del □ β-sitosterol en mezcla con ácidos grasos _____	57
Espectro 9.	Espectro de masas del □ β-sitosterol _____	58
Espectro 10.	Espectro en el IR (película) de una mezcla de ceras y ácidos grasos sin metilar _____	59
Espectro 11.	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de una mezcla de ceras y ácidos grasos sin metilar _____	60
Espectro 12.	Espectro de masas de la 5,7-estigmastadien-3-ona _____	61
Espectro 13.	Espectro de masas del éster metílico del ácido hexadecanoico _____	62
Espectro 14.	Espectro de masas del éster metílico del ácido octadecanoico _____	63
Espectro 15.	Espectro de masas del éster metílico del ácido eicosanoico _____	64
Espectro 16.	Espectro de masas del éster metílico del ácido docoeicosanoico _____	65

Espectro 17.	Espectro de masas del éster metílico del ácido hexaeicosanoico_____	66
Espectro 18.	Espectro de masas del éster metílico del ácido octaeicosanoico _____	67
Espectro 19.	Espectro de masas del ácido hexadecanoico_____	68
Espectro 20.	Espectro de masas del ácido octadecanoico _____	69
Espectro 21.	Espectro de masas del 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona_____	70
Espectro 22.	Espectro de masas del hexaeicoseno_____	71

Lista de abreviaturas

<	Menor que
>	Mayor que
ac.	Ácido
AcOEt	Acetato de etilo
C	Carbono
°C	Grados centígrados
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CG	Cromatografía de gases
CG/EM	Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas
CHCl ₃	Cloroformo
CL ₅₀	Concentración letal media
cm	Centímetros
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Conc.	Concentración
d	Doblete
δ	Desplazamiento químico
dd	Doble de dobles
ddd	Doble de doble de dobles
DMSO	Dimetil sulfóxido
Dr.	Doctor
EM	Espectroscopía de masas
EMIE	Espectroscopía de masas por impacto electrónico
<i>et al</i>	Y otros
g	Gramos
G+	Gram positivos
G-	Gram negativos
H	Hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
Hex	Hexano
H ₂ O	Agua
Hz	Hertz

IDH	Índice de deficiencia de hidrógeno
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Kg	Kilogramo
KOH	Hidróxido de potasio
L	Litros
m	Multiplete
M+	Ión molecular
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
min	Minutos
μL	Microlitros
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MHz	Megahertz
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
N	Normal
(NH ₄) ₄ Ce(SO ₄) ₄ ·2H ₂ O	Sulfato cérico amoniacal
nm	Nanómetros
No.	Número
OH	Alcohol
p/p	por ciento en peso
ppm	Partes por millón
Rf	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Singulete
SSI	Solución salina isotónica
sbsp.	Subespecie
T. ret.	Tiempo de retención
UFC	Unidades formadoras de colonias
UK.	Unidades Klett
UV	Ultravioleta
var.	Variable
v _{máx}	Frecuencia máxima

1. ANTECEDENTES

1.1. FAMILIA BETULACEAE

Es una familia de árboles o arbustos dicotiledóneos caducifolios y monoicos que poseen hojas simples y alternadas. Sus flores masculinas se presentan con forma de péndulos, y las femeninas se presentan en agregados de dos o tres flores, se encuentran comúnmente en regiones templadas y zonas de montaña en los trópicos.

Esta familia esta formada por alrededor de 70 a 157 especies repartidas en seis géneros [*Alnus*, *Betula* (37 especies), *Carpinus*, *Corylus*, *Ostrya* y *Ostryopsis*] la mayor parte de ellas, naturales de los países templados del hemisferio norte. (Font Quer, 1962)

En el pasado, esta familia estaba dividida en dos, Betulaceae (*Alnus* y *Betula*) y Corylaceae (resto de especies); sin embargo, estudios recientes por el “Grupo de filogenistas de Angiospermas” (*Angiosperms Phylogeny Group*), han llevado a incluir la antigua familia Corylaceae dentro de la Betulaceae.

Algunos ejemplos de los géneros que pertenecen a la familia Betulaceae se aprecian en la **Figura 1**.

1.2. GÉNERO *ALNUS*

Este género esta constituido por algunas de las siguientes especies: *Alnus hirsuta* var. *sibirica*, *Alnus rubra*, *A. glutinosa*, *A. hirsuta*, *A. incana*, *A. oregona* y *A. acuminata* sbsp. *arguta*.

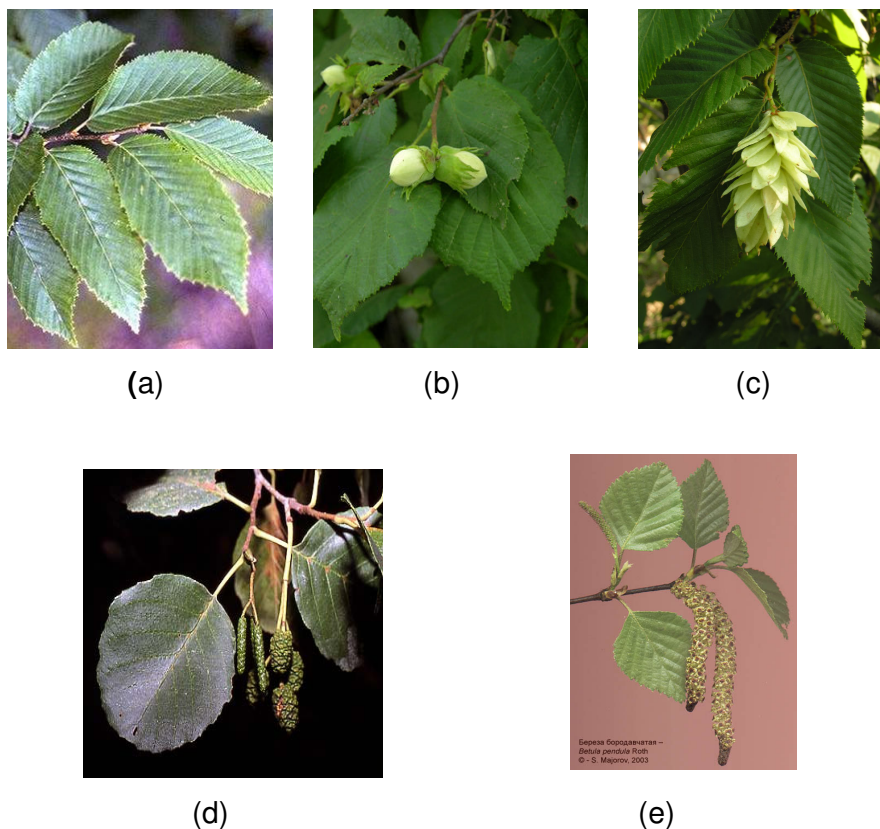


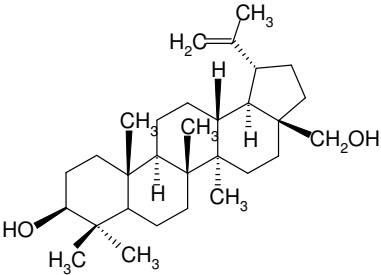
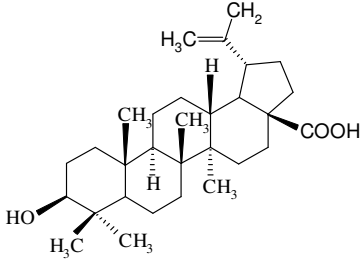
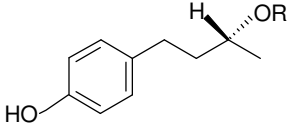
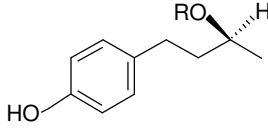
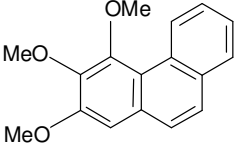
Figura 1. (a) *Alnus betuna*, (b) *Corylus avellana*, (c) *Ostrya carpinifolia*, (d) *Alnus glutinosa*, (e) *Betula pendula*

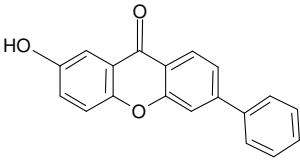
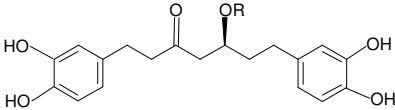
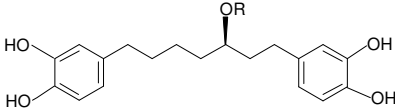
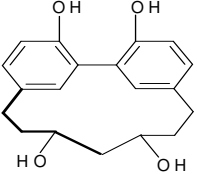
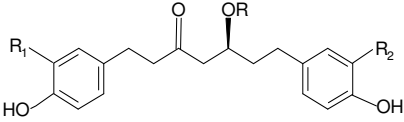
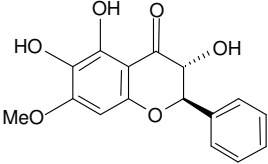
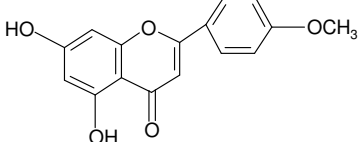
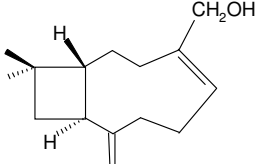
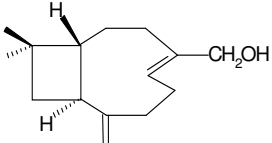
1.2.1. Composición química del género *Alnus*

El género *Alnus* posee compuestos químicos de interés medicinal, (Mañes *et al.*, 1997), por ejemplo: La corteza de algunas de sus especies presenta una cantidad apreciable de alquitrán y de aceites esenciales, los más conocidos son el α -betulenol y el β -betulenol (Dermeci *et al.*, 2000). Además, es fuente de compuestos de estructura fenólica como rododendrina, miricetina, delfinidina y ácido elágico. De las hojas de algunas especies de este género, se ha logrado extraer un flavonoide, la acacetina (Evans, 1985).

Otros compuestos encontrados en *Alnus* son saponinas, ácido betulínico, y betulina (Mañez *et al.*, 1997; Duke, 1992) además de poseer esteroides como β -sitosterol y dammaranos (Tyler, 1979).

A continuación se presentan algunos de los metabolitos secundarios encontrados en género *Alnus*.

Triterpenoides	 <p>Betulina; betulol; betulinol; trochol; 20(29)-lupeno-3β,28-diol. (Evans, 1985, Harbone,1991, Duke,1992, Mañes <i>et al.</i>, 1997).</p>	 <p>Ácido betulínico, ácido, 3β-hidroxi-20(29)-lupen-28-oico. (Galgon <i>et al.</i>,1999, Duke, 1992. Huguet <i>et al.</i>, 2000, Mañes <i>et al.</i>, 1997. Steele <i>et al.</i>, 1999)</p>
Compuestos fenólicos	 <p>(-)-Rododendrol: R = H Rododendrina: R = Glc (Harborne, 1991, Santamour <i>et al.</i>,1997. Klischies <i>et al.</i>,1978.)</p>	 <p>(+)-Rododendrol: R = H Rododendrina: R = Glc (Harborne, 1991, Santamour <i>et al.</i>,1997. Klischies <i>et al.</i>,1978.)</p>
Fenantrenos	 <p>2,3,4-Trimetoxifenatreno (Tori <i>et al.</i>,1995)</p>	

Fenilxantonas	 <p style="text-align: center;">Glutanxona (Peres <i>et al.</i>,2000)</p>	
Diarilheptanoides	 <p style="text-align: center;">Hanoquina R = Xil R= H (Min-Won <i>et al.</i>, 2000)</p>	 <p style="text-align: center;">Oregonina R = Xil R = Glc (Min-Won <i>et al.</i>, 2000)</p>
	 <p style="text-align: center;">Alnusdiol (Hanawa <i>et al.</i>,1997)</p>	 <p style="text-align: center;">Platipilósida R₁ = GlcPir, R₂ = H R₁ = GlcPir, R₂ = OH R₁ = Xil, R₂ = H R₁ = H, R₂ = H (Chen <i>et al.</i>,2000, Matsuda <i>et al.</i>, 1998)</p>
Flavonoides	 <p style="text-align: center;">Alnustinol (Duke, 1992)</p>  <p style="text-align: center;">Acacetina; linarigenina, 4-metil éter apigenina (Harborne, 1991, Evans, 1985. Keinänen <i>et al.</i>,1998)</p>	
Sesquiterpenos	 <p style="text-align: center;">α-betulenol (Demirci <i>et al.</i>,2000, Evans, 1985)</p>  <p style="text-align: center;">β-betulenol (Demirci <i>et al.</i>,2000, Evans, 1985)</p>	

1.2.2. Propiedades medicinales dentro del género *alnus*

- *Alnus rubra*:

Originaria de Canadá, se ha utilizado contra infecciones fúngicas. A partir de la corteza y las hojas se han podido aislar sustancias con actividad antibiótica contra distintos tipos de bacterias. En años recientes ha demostrado ser eficaz contra el cáncer de piel (McCutcheon *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 2000).

- *Alnus incana*:

Especie de Canadá utilizada por los nativos para tratamientos de infecciones, ha demostrado actividad anticancerígena *in vitro* (Ritch-Krc *et al.*, 1996).

- *Alnus hirsuta var. sibirica*:

Especie asiática que se distribuye por China y Corea del Sur, ha sido utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de cáncer de mama, se ha descubierto que los compuestos aislados de la corteza son potentes inhibidores de la inflamación vía inhibición de la ciclooxigenasa-2 (Min-Won *et al.*, 2000).

- *Alnus oregona*:

De esta especie se ha aislado un compuesto llamado oregonina, sustancia responsable de la actividad anticancerígena en estudios de laboratorio (Bianchi *et al.*, 1973).

- *Alnus hirsuta*:

Esta especie se encuentra desde Rusia hasta Japón en donde es altamente utilizada por la medicina tradicional sobre todo para tratamientos contra hemorragias y diarrea. En recientes estudios fitoquímicos se ha encontrado que tiene triterpenos, taninos y diarilheptanoides como metabolitos secundarios, con una notoria actividad citotóxica y antioxidante, además se han aislado de la corteza varios diarilheptanoides que han demostrado tener actividad inhibitoria en la síntesis de óxido nítrico y en la producción del factor de necrosis tumoral- α (KiHwan *et al.*, 2007).

- *Alnus glutinosa*:

Especie que predomina en Canadá. Posee propiedades antiinflamatorias, antisépticas, inmunosupresoras y antitumorales (Duke, 1992).

- *Alnus maximowiczii*:

Especie que predomina en China y norte de India, utilizada por la medicina tradicional para combatir infecciones por parásitos intestinales e infecciones dérmicas por hongos (Tori *et al.*, 1995).

- *Alnus acuminata* sbsp. *arguta*

Esta especie es utilizada en la medicina tradicional mexicana del sureste del país, se le atribuyen propiedades como antiescrofulosa, astringente y antiinflamatoria en afecciones cutáneas. También se le considera útil para el tratamiento de sífilis e infecciones bacterianas (Martínez, 1984).

1.2.3. *Alnus acuminata* sbsp. *arguta*

1.2.3.1. Clasificación botánica

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fagales
Familia	Betulaceae
Genero	<i>Alnus</i>
Especie	<i>A. acuminata</i>
Subespecie	<i>arguta</i>



Figura 2. *Alnus acuminata*

1.2.3.2. Nombres comunes

Los nombres comunes que recibe *Alnus acuminata* en México son: ilite (Chiapas), aile (Jalisco, Morelos, Oaxaca, Hidalgo), abedul (Veracruz y Oaxaca), olmo del País (Veracruz e Hidalgo), aliso (Nuevo México y algunas partes de México) y palo de águila (Oaxaca).

Algunos nombres comunes en centro y sud América son: labrán (Perú), cerezo (Colombia), jaúl (Costa Rica) y palo de lama (Guatemala). (<http://www.conafor.gob.mx>).

1.2.3.3. Sinónimos

Alnus acuminata Kunth, 1817

Alnus acuminata var. *genuina* Regel, 1861

Alnus acuminata var. *ferruginea* (Kunth) Regel, 1861

Alnus acuminata var. *zorullensis* (Kunth) Regel, 1861

Alnus acuminata var. *mirbelii* (Spach) Regel, 1861

Alnus acuminata var. *spachii* Regel 1865

Alnus acuminata var. *glabrata* (Fernald) Furlow, 1976 [1977]

Alnus acuminata var. *cuprea* Barlett, 1909

Alnus acuminata var. *subsericea* Barlett 1909

Alnus acuminata sbsp. *arguta*

Alnus acuminata sbsp. *arguta* (Schltdl) Furlow, 1976 [1977]

(<http://mobot.mobot.org/W3T/search/vast.html>).

1.2.3.4. Descripción de la planta

Forma: Árbol o arbusto perennifolio (cuando crece en quebradas húmedas) y caducifolio (en laderas semisecas) de 10 hasta 30 m de altura.

Copa: Es angosta y de forma piramidal.

Hojas: Poseen lámina ovalada, de 6 a 15 cm de largo y 3 a 8 cm de ancho, alternas, simples, ovoideas, algo resinosas, con el ápice acuminado.

Flores: Son unisexuales, masculinas y femeninas sobre un mismo árbol, pero en inflorescencias diferentes, las flores masculinas se encuentran agrupadas en péndulos y las flores femeninas tienen brácteas formando un cono estrobiliforme.

Frutos: Se muestran como nueces pequeñas y aladas, son liberadas a la madurez y diseminadas por el viento y el agua.

Tronco: De forma cilíndrica y ligeramente ovalada

Corteza: Se observa lisa o ligeramente rugosa, es escamosa en individuos viejos y tiene una coloración grisácea.

Raíz: Es un sistema radical poco profundo, amplio y extendido.

(<http://conafor.gob.mx>).

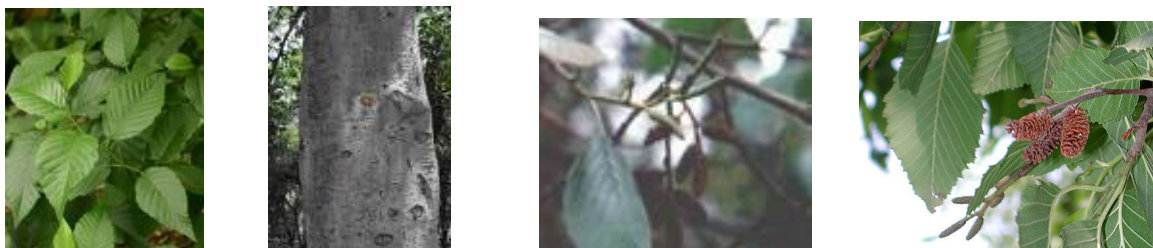


Figura 3. Descripción de *Alnus acuminata*

1.2.3.5. Distribución y ecología

Se localiza en casi toda la República Mexicana, a una altitud entre 1300 y 2800 m. Principalmente se encuentra en los estados de Puebla, Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Sonora, Durango, Sinaloa, Hidalgo, San Luis Potosí, Querétaro, Michoacán, Nayarit, Jalisco y en el Distrito Federal. **Figura 4**

Además se localiza en gran parte de América Latina, desde Guatemala hasta Argentina y se ha introducido con éxito en el sur de Chile y en Nueva Zelanda.

El género *Alnus* se puede encontrar en laderas montañosas muy inclinadas con condiciones secas. Se desarrolla en áreas de nubosidad, con neblina frecuente. Su rango de temperatura es de 4 a 27 °C.

No es exigente en cuanto a calidad de suelos siempre y cuando haya buena humedad, posee la capacidad de fijar nitrógeno en simbiosis con microorganismos actinomicetos (Pretell *et al.*, 1985).



Figura 4. Se observa en oscuro la distribución geográfica de *Alnus acuminata* en México.

1.2.3.6. Usos

Da leña de buena calidad, la madera y los troncos se utilizan para la construcción de casas (vigas) y chozas.

También sirve para construcciones livianas como cajas, utensilios domésticos, cabos de escobas e instrumentos musicales. Por otro lado, esta especie es muy recomendable en reforestaciones para mejorar las condiciones de los suelos, debido a su capacidad de fijar nitrógeno (Nuñez, 1991).

En la medicina tradicional las hojas frescas maceradas en alcohol son utilizadas contra el reumatismo, y su infusión es utilizada por sus propiedades antibacterianas (Martínez, 1984).

1.3. EXTRACCIÓN DE UN MATERIAL VEGETAL

La extracción es el proceso de separación de los principios solubles de las materias primas de origen natural mediante la acción de un disolvente, utilizando un método adecuado. De manera general la selección del método y disolvente de extracción se realiza con base en las propiedades físicas y químicas de los constituyentes activos.

Entre los métodos más utilizados se encuentran los siguientes: maceración, percolación, métodos de extracción continua (Soxhlet, extractores para líquidos menos densos que el agua, extractores para líquidos más densos que el agua, reflujo, etc.), destilación y métodos de extracción mediante fluidos supercríticos. Otros procedimientos de menor uso incluyen: la digestión, la infusión y la decocción. (Mata, 2000)

1.4. AGENTES ANTIMICROBIANOS

Son sustancias químicas que pueden ser de origen natural (biosintetizadas en organismos vivos), sintéticas o semisintéticas, las cuales, son capaces de inhibir el crecimiento bacteriano y/o destruir a los microorganismos. (<http://www.microbiologia.com.ar/antimicrobianos/general.php>).

Desde el punto de vista práctico existen distintos tipos de antimicrobianos:

- Desinfectantes: sólo se aplican a sistemas inanimados y eliminan la carga microbiana total.
- Sanitizantes: sólo se aplican a sistemas inanimados y disminuyen la carga microbiana total.
- Antisépticos: reducen y controlan la presencia de microorganismos potencialmente patógenos, sólo se pueden aplicar externamente en seres vivos (piel y/o mucosas).
- Antimicrobianos de uso sistémico: reducen y controlan la presencia de microorganismos que han invadido los tejidos. Actúan en el organismo, pudiendo ser ingeridos (vía oral), absorbidos por piel (apósitos) y/o inyectados.

Los agentes antimicrobianos de uso sistémico se pueden clasificar (<http://www.microbiologia.com.ar/antimicrobianos/general.php>) según su:

1. Origen:

- Naturales: se obtienen a partir de microorganismos (hongos, bacterias, etc.).
- Sintéticos: se obtienen totalmente por síntesis química.
- Semisintéticos: se obtienen por modificaciones químicas de antimicrobianos naturales, con el fin de mejorarlos.

2. Efecto:

- Bacteriostático: Impide el desarrollo y multiplicación de los microorganismos, sin destruirlos, pudiendo éstos multiplicarse nuevamente al desaparecer el agente antimicrobiano.
- Bactericida: su acción es letal sobre los microorganismos.

3. Espectro de actividad:

- Amplio: actúan sobre un gran número de especies microbianas.
- Intermedio: actúan sobre un número limitado de especies de microorganismos.
- Reducido: actúan sobre un pequeño número de especies microbianas.

4. Mecanismo de acción:

- Inhibición de la síntesis de la pared celular.
- Alteración de la permeabilidad celular.
- Inhibición de la síntesis proteica.
- Inhibición de la síntesis de DNA y RNA.
- Otros.

1.5. BIOENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los agentes antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar la respuesta de un determinado microorganismo a uno o varios agentes antimicrobianos.

El antibiograma define la actividad *in vitro* de un antibiótico y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana. Estas pruebas pueden efectuarse por dilución, por difusión en agar, gradiente de agar y métodos automatizados

(<http://www.qb.fcen.uba.ar/microinmuno/SeminarioAntibioticos.htm>).

1.5.1. Determinación de actividad antimicrobiana por el método de difusión

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos que The National Committé for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. El antibiograma de disco-placa consiste en depositar en la superficie de agar de una caja petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico se difunde radialmente formándose un gradiente de concentración. Transcurridas de 18 a 24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución, sin embargo el método disco-placa no permite una lectura directa del valor de la CMI. Para cuantificarla, basta con haber contrastado previamente el sistema disco-placa con un gran número de cepas de CMI's conocidas (determinadas por otros métodos), entonces se mide el diámetro de la zona de inhibición obtenida y se grafica frente a la CMI,

obteniéndose una línea de regresión que correlaciona las CMI's y los diámetros de inhibición (<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap11.htm>).

1.5.2. Determinación de actividad antimicrobiana por el método de dilución

En los métodos de dilución en caldo, se colocan concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano, generalmente diluciones 1:2, en tubos con un caldo de cultivo que sostendrá el desarrollo del microorganismo. El caldo más usado para estas pruebas es el de Mueller-Hinton suplementado con los cationes magnesio y calcio. Los agentes antimicrobianos se preparan en "soluciones madre" concentradas y luego se diluyen en caldo hasta obtener las concentraciones apropiadas.

Un tubo de caldo se mantiene sin inocular como control negativo de crecimiento. Luego de la incubación adecuada (24 horas) se observa la turbidez de los tubos que indicará desarrollo bacteriano. El microorganismo crecerá en el tubo control y en todos los que no contengan suficiente agente antimicrobiano como para inhibir su desarrollo. La concentración del agente que presente ausencia de crecimiento, detectada por falta de turbidez (igualando al control negativo), se designa como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). **Figura 5.**

1mL de una suspensión del microorganismo (1×10^4 UFC/mL) se agrega a tubos que contienen 1mL de caldo con el antibiótico en las concentraciones indicadas ($\mu\text{g/mL}$).

Los tubos contienen ahora 2mL con 5×10^5 UFC/mL y el antibiótico en las concentraciones indicadas ($\mu\text{g/mL}$)

CMI = 8 $\mu\text{g/mL}$

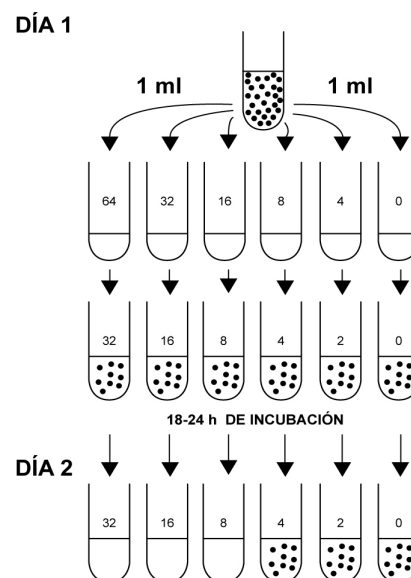


Figura 5. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.
<http://www.qb.fcen.uba.ar/microinmuno/SeminarioAntibioticos.htm>

1.6. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

La cromatografía es un método analítico mediante el cual los componentes de una mezcla se distribuyen entre dos fases, una móvil y la otra estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido o un gas, la fase estacionaria, contenida en un soporte cromatográfico puede ser un sólido o un líquido.

La clasificación de los métodos cromatográficos se indica en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Clasificación de los métodos cromatográficos. (Mata, 2000)

Cromatografía	Fase móvil	Fase estacionaria	Técnica	Principio
Gas- líquido	Gas	Líquido	Gases	Reparto
Líquido- sólido	Líquido	Sólido	Columna* Papel Capa fina	Adsorción Exclusión Intercambio iónico
Líquido-líquido	Líquido	Líquido	Columna Papel Capa fina	Reparto
Gas- sólido	Gas	Sólido	Gases	Adsorción

*Columna abierta, a baja presión, a mediana presión, HPLC, cromatografía rápida y cromatografía en contracorriente

1.7. MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS Y ESPECTROSCÓPICOS

Los métodos más utilizados se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Métodos utilizados para determinar la estructura molecular de componentes orgánicos. (Mata, 2000)

Método	Principio	Información que proporciona
Espectroscopia infrarroja	Excitación en la vibración molecular	Grupos funcionales y conformación
Espectroscopia UV y visible	Transición de los electrones de un lugar a otro	Instauraciones, aromaticidad, estereoquímica y grupos funcionales

Resonancia Magnética Nuclear	Transiciones entre orientaciones del spin nuclear	Grupos funcionales, número de protones y carbonos. Secuencia de protones y carbonos
Espectroscopia de Masas	Fragmentación molecular por electrones	Peso molecular y grupos funcionales
Difracción de Rayos X	Interferencia entre los rayos X dispersados por los electrones de los átomos	Determinación completa de la estructura molecular

1.8. LÍPIDOS Y COMPUESTOS NATURALES RELACIONADOS

Un lípido se define como un compuesto orgánico de origen natural, insoluble en agua y soluble en disolventes orgánicos no polares. Se compone de ácidos grasos de cadena larga y de alcoholes, como el glicerol, y monoalcoholes superiores.

En general, los acil-gliceroles de ácidos grasos saturados son sólidos y los de ácidos no saturados, líquidos.

Las grasas y aceites se nombran frecuentemente como derivados de sus ácidos grasos.

Las ceras son mezclas naturales que contienen cantidades apreciables de ésteres derivados de monoalcoholes superiores de la serie del alcohol metílico combinados con ácidos grasos.

Casi todos los ácidos grasos que se encuentran en la naturaleza tienen un número par de átomos de carbono, porque se biosintetizan a base del grupo acetilo de dos carbonos de la acetil coenzima A.

La cadena de hidrocarburos de un ácido graso puede ser saturada, insaturada o poliinsaturada. (Fessenden y Fessenden, 1982; Trease-Evans, 1987)

La **Tabla 3** muestra algunos ejemplos de ácidos grasos y sus fuentes.

Un ácido graso saturado forma cadenas en zigzag, que se ajustan de forma compacta y producen altas atracciones de van der Waals, por consiguiente las grasas saturadas son sólidas. La configuración alrededor de cualquier doble enlace de un ácido graso natural es cis, configuración que conduce a aceites de bajo punto de fusión, debido a que las moléculas no pueden formar una red compacta.

Tabla 3. Ejemplos de ácidos grasos y sus fuentes. (Fessenden,1982; Trease-Evans,1987)

Nombre del ácido graso	Fórmula	Fuente
Saturados		
butírico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$	Grasa de leche
palmítico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}_2\text{H}$	Grasas animales y de plantas
esteárico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}_2\text{H}$	Grasas animales y de plantas
Insaturados y Poliinsaturados		
palmitoleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$	Grasas animales y de plantas
oleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$	Grasas animales y de plantas
linoleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$	Aceite de plantas
linoléico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$	Aceite de plantas

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana de las hojas de la planta medicinal *Alnus acuminata* sbsp. *arguta* y conocer el perfil metabólico secundario de su extracto clorofórmico para justificar el uso tradicional de la planta en el tratamiento de diversas infecciones y para asentar estos conocimientos dentro de la monografía correspondiente a la planta.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de las hojas de la planta *Alnus acuminata* sbsp. *arguta* por la técnica de percolación.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de cada uno de los extractos.
- Evaluar la actividad tóxica a *Artemia salina* de cada uno de los extractos.
- Fraccionamiento cromatográfico del extracto clorofórmico.
- Aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios contenidos en el extracto clorofórmico por métodos químicos, espectroscópicos, espectrofotométricos y por formación de derivados.
- Integración de los resultados químicos y biológicos del estudio de las hojas de *A. acuminata*.

3. HIPÓTESIS

Si las hojas de la planta *Alnus acuminata* sbsp. *arguta* son empleadas en la medicina tradicional mexicana en el tratamiento de diversas infecciones, entonces, alguno de sus extractos contiene compuestos o metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de microorganismos.

4. JUSTIFICACIÓN

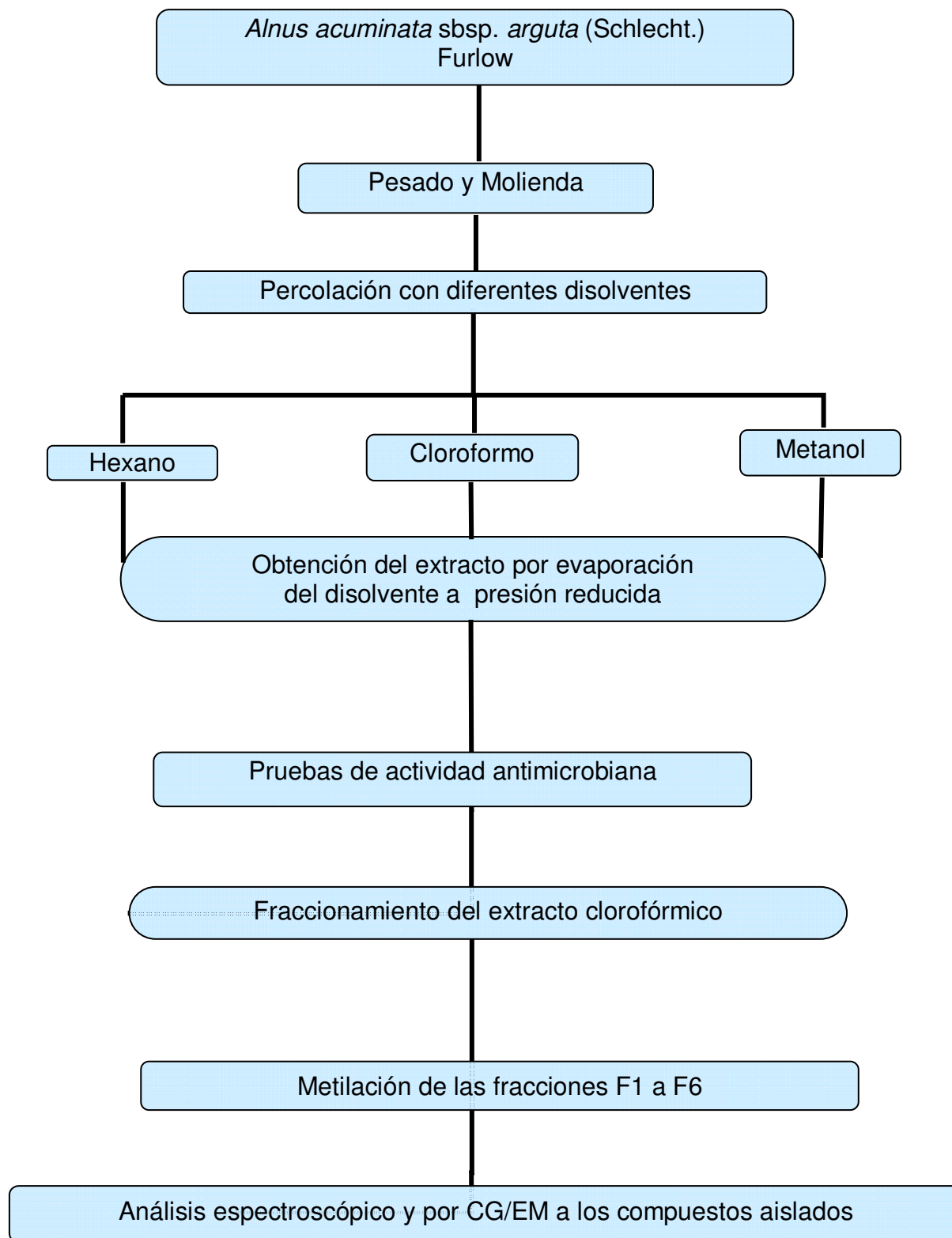
De acuerdo a los informes en la literatura, *Alnus acuminata* es una planta de gran importancia medicinal, la cual es empleada en el sur y centro de la República Mexicana para el tratamiento de diversos padecimientos, como son: dolores musculares y de articulaciones, inflamación de garganta, enfermedades cutáneas y venéreas, entre otros.

Estudios previos realizados a esta planta (Rovelo, 2002; Gómez, 2007; Illescas, 2008) han comprobado la actividad antiinflamatoria y moderadamente antimicrobiana de esta planta, así como aportado información sobre el contenido metabólico de la corteza. Las partes aéreas y específicamente las hojas, también son empleadas con fines terapéuticos tradicionales, sin embargo, a la fecha no existen reportes adicionales a las pruebas antiinflamatorias realizadas con las hojas, por lo que el presente trabajo aportaría información sobre la actividad antimicrobiana, la toxicidad general y el contenido químico involucrado en la materia prima vegetal mencionada. Estos datos se podrían eventualmente utilizar en la integración de la monografía correspondiente de la planta.

Lo anterior justifica un estudio sistemático para conocer y evaluar biológicamente su contenido metabólico.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1. DIAGRAMA GENERAL



5.2. MATERIAL Y EQUIPO UTILIZADO

La fragmentación de las hojas se realizó en un molino de cuchillas modelo Thomas-Willey 4, con una malla número 4. Los disolventes utilizados en todos los casos fueron de grado QP y destilados previamente a su uso.

Para la cromatografía en capa fina se emplearon cromatofolios Alugram Sil G/UV₂₅₄ Macharey-Nagel Duren. Como reveladores cromatográficos se utilizaron una lámpara de luz UV Spectroline modelo ENF-240c de longitud de onda a 254 y 365 nm y una solución de sulfato cérico amoniacal $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ al 1% en ácido sulfúrico 2N como agente cromógeno (Stahl, 1969).

Las cromatografías en columna abierta se realizaron empleando gel de sílice 60 (malla 0.063-0.200 mm) Merck, como fase estacionaria.

Las cromatografías preparativas se realizaron en placas Merck de 20 x 20 cm y 1 mm de espesor.

Los espectros en el UV se determinaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160, los espectros en el IR se obtuvieron en un espectrofotómetro FTIR Perkin-Elmer 1605 y los espectros de RMN se determinaron a 300 ó 400 MHz para el caso de ^1H y a 75.3 ó 100 MHz para el caso de ^{13}C . Para esto se utilizaron espectrómetros de alta resolución Varian (Unity Inova) 300 y Varian (Unity Inova) 400, utilizando CDCl_3 como disolvente.

Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro de masas (acoplado a un cromatógrafo de gases) modelo JEOL SX102A, mediante la técnica de ionización química.

5.3. MATERIAL VEGETAL

Las hojas de la especie *Alnus acuminata* sbsp. *arguta* (Schlecht.) Furlow empleadas en este estudio fueron recolectadas en el municipio de Huistán, Chiapas. La identificación del material vegetal fue realizada por el Dr. Mario Ishiki Ishihara del herbario de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), donde se encuentra depositada una muestra de referencia. El material vegetal se secó a temperatura ambiente y a la sombra, posteriormente se molió en un molino de cuchillas.

5.3.1. Preparación de los extractos orgánicos vegetales

El material vegetal seco y molido de las hojas de *Alnus acuminata* (1.997 Kg) se extrajo mediante la técnica de percolación (Mata, 2000) a temperatura ambiente con 4 L de cada disolvente de diferente polaridad (hexano, cloroformo y metanol).

5.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TÓXICA DE LOS EXTRACTOS EN EL CRUSTÁCEO *Artemia salina*

5.4.1. Preparación de los organismos

Se preparó una solución de sales de mar comercial (38 g de medio salino artificial por litro de agua destilada) en un vaso de precipitados, al cual se le acondicionó una bomba de oxígeno y se burbujeó durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se adicionaron los huevecillos de *Artemia salina*. Posteriormente la solución con las *Artemias* se incubó durante 48 horas en un baño de agua con temperatura controlada de 28-30 °C. (McLaughlin *et al.*, 1991; Meyer *et al.*, 1982)

5.4.2. Preparación de las muestras

20 mg de cada extracto se colocaron en un tubo de ensayo por separado y se disolvieron en 2 mL de un disolvente adecuado, posteriormente se transfirieron de cada tubo de ensayo, alícuotas por triplicado de 500, 50 y 5 μ L. Una vez evaporado el disolvente, se aforaron los tubos a 5 mL con la solución de medio salino, para obtener las concentraciones de 10, 100 y 1000 μ g/mL.

5.4.3. Bioensayo

Pasado el tiempo de incubación descrito en el punto 5.4.1 se depositaron 10 larvas de *A. salina* en cada uno de los tubos con la muestra por evaluar sin alterar el volumen de 5 mL de la solución de agua de mar y se dejaron 24 horas a 28 °C en contacto con la muestra en estudio. Posteriormente se contaron los crustáceos sobrevivientes y el resultado se expresó por medio de la CL₅₀ (el cálculo se realizó

utilizando gráficas en excel, de organismos vivos y muertos acumulados contra el logaritmo de la concentración).

5.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN

Se empleó el método de Kirby–Bauer con discos de sensibilidad antibiótica. (Villareal, 1994)

Reactivos y soluciones necesarios:

- Gelosa nutritiva Agar Müller-Hinton
- Solución salina isotónica [agua destilada con NaCl al 9-8%]
- Extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de la planta
- Disolventes mencionados como vehículos
- Dimetil-sulfóxido

Cepas de referencia:

Staphylococcus aureus

Escherichia coli

Pseudomonas aeruginosa

Candida albicans

Trichophyton mentagrophytes

5.5.1. Crecimiento de las cepas

Cada una de las cepas mencionadas en el punto anterior se hizo crecer por triplicado en tubos conteniendo gelosa nutritiva estéril. Las bacterias se incubaron de 24 a 48 horas a 37 °C y la levadura y el hongo a 28 °C.

Se realizó una tinción de Gram para determinar la pureza de las cepas.

5.5.2. Preparación de placas de agar

La metodología utilizada es de doble capa por lo que primero se agregó a cada caja, una capa de 10 mL de agar estéril y una vez solidificada ésta, otra con 8 mL de agar inoculado con el microorganismo de prueba para lograr la difusión del mismo al medio. Se utilizó medio de agar Müller-Hinton estéril para las cepas de bacterias y de agar Sabouraud, para la levadura y el hongo.

5.5.3. Preparación del agar con el inóculo

Se preparó en un tubo estéril una suspensión de cada microorganismo empleando 3 mL de solución salina isotónica y una asada del microorganismo. De la suspensión anterior se tomaron 0.5 mL y se adicionaron a un matraz conteniendo de 20 a 30 mL de medio y se incubó por 24 horas a 35 °C (bacterias) y por 48 horas a 28 °C (la levadura y el hongo). Después de este tiempo, se agregaron 30 mL de solución salina isotónica estéril, frotando la superficie del agar para obtener una suspensión rica en microorganismos. 10 mL de la suspensión anterior se transfirieron a un matraz nefelométrico, en el que se ajustó la concentración de la suspensión de cada microorganismo a 50 UK.

5.5.4. Preparación de discos

Se preparó una solución de 10 mg de cada extracto en 1 mL de DMSO. Se tomaron 100, 50 y 10 µL de cada extracto, para tener respectivamente 1000, 100 y 50 µg en cada disco, se usó DMSO (100 µL) como control de vehículo.

5.5.5. Inoculación de placas

Se colocaron 0.5 mL de la suspensión de microorganismos estandarizada a 50 UK en un matraz con agar estéril y se mezcló dando giros suaves en contra y a favor de las manecillas del reloj. De la preparación anterior se colocaron 8 mL sobre una caja petri estéril conteniendo 10 mL de agar solidificado. Una vez que la segunda capa de agar solidificó se colocaron los discos de la forma indicada en el punto 5.5.4. Las cajas conteniendo bacterias se incubaron a 37 °C por 24 horas y las del

hongo y levadura a 28 °C por 48 horas. Después de este tiempo se midieron los halos de inhibición alrededor de cada disco. (Villareal, 1994).

5.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN

Tabla 4. Microorganismos de referencia utilizados en la determinación de la actividad antimicrobiana por el método de dilución.

Bacterias	
Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Streptococcus faecalis</i>
Gram-	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Salmonella tiphy</i>
Hongos	
Levaduriforme	<i>Candida albicans</i>
Filamentosos	<i>Tricophyton mentagrophytes</i>
	<i>Tricophyton rubrum</i>

5.6.1. Preparación de las muestras

10 mg de cada extracto se disolvieron en 1 mL de disolvente adecuado y se prepararon diluciones para obtener concentraciones finales de 0.75 hasta 6 mg/mL.

5.6.2. Preparación del inóculo

Las bacterias se activaron en un caldo nutritivo y se incubaron por 48 horas a 37°C, mientras que los hongos se activaron en agar Sabouraud, y se incubaron por 7 días a 28°C.

El inóculo de cada muestra bacteriana se preparó con cultivos que contenían 10^8 UFC/mL. El inóculo de la levadura contenía 10^5 células/mL, mientras que el de los hongos filamentosos 10^6 esporas/mL.

Nota: Se establecieron las concentraciones de los inóculos por comparación con los estándares turbidimétricos establecidos por la escala de McFarland.

5.6.3. Bioensayo

Las muestras de cada extracto se mezclaron con el medio apropiado, el cual contenía el inóculo del microorganismo a prueba. Después de la incubación se observó la densidad de crecimiento del microorganismo en el tubo y se comparó mediante los patrones turbidimétricos de McFarland. El procedimiento se realizó por duplicado.

Se utilizó gentamicina como control positivo para las bacterias, nistatina para la levadura y miconazol para los hongos filamentosos.

(Ghisalberti, 1993).

5.7. FRACCIONAMIENTO PRIMARIO

55 g del extracto clorofórmico (activo en las pruebas antimicrobianas) de las hojas de la planta *Alnus acuminata* sbsp. *arguta*, fueron adsorbidos en 55 g de gel de sílice en una columna cromatográfica (1 Kg de gel de sílice) de vidrio abierta, la cual se eluyó con mezclas de hexano-acetato de etilo de polaridad creciente (fracciones de 200 mL) y posteriormente con cloroformo 100% y cloroformo-acetona 1:1, obteniéndose un total de 658 fracciones, las cuales se muestran en la **Tabla 11**. Posteriormente éstas se agruparon de acuerdo a la similitud de sus características cromatográficas en 6 subfracciones (F1-F6). Las cuales se muestran en la **Tabla 12**.

5.8. REACCIÓN GENERAL DE METILACIÓN

Se utilizó una mezcla etérea de diazometano preparada con una solución de KOH (5 g de KOH en 7.5 mL de H₂O destilada), 25 mL de MeOH y 21.9 g de *N*-metil-*N*-nitroso-*p*-toluensulfonamida (Diazald-Aldrich) en 45 mL de éter etílico.

Se disolvieron 4 mg de la fracción en 3 mL de MeOH adicionando 20 mL de solución etérea de diazometano a temperatura ambiente por 24 horas. Al cabo de este tiempo se obtuvieron los compuestos metilados. (Shriner *et al.*, 1997).

5.9. PURIFICACIÓN DE FRACCIONES CON CLOROFILA

Las fracciones 253 a 658 se mezclaron con carbón activado (1% p/p) y posteriormente se percolaron a través de una columna en fase reversa de gel de sílice C18 (20 g), utilizando acetona 100% como disolvente de elución. Los filtrados fueron analizados por cromatografía en capa fina y agrupados de acuerdo a sus semejanzas.

5.10. SEPARACIÓN DE COMPUESTOS

De acuerdo al análisis cromatográfico las fracciones F1-F6 mostraron gran complejidad estructural y sus espectros al IR mostraron un perfil altamente hidrocarbonado, por lo que fueron sometidas a una reacción de metilación con diazometano para tratar de separar sus componentes. A continuación se muestra el análisis por CG/EM de las fracciones mencionadas.

Fracción F1

- 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona

CG. T. Ret. 6.84 min

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro 21**): 250 [M⁺] (2), 268 (1), 210 (1), 165 (3), 137 (4), 109 (22), 71 (51), 58 (100).

- Éster metílico del ácido hexadecanoico (Palmítico)

CG. T. Ret. 7.25 min

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro 13**): 270 [M⁺] (5), 227 (5), 213 (2), 199 (4), 185 (4), 171 (4), 157 (3), 143 (13), 129 (6), 101 (7), 87 (60), 74 (100), 55 (38).

- Ácido hexadecanoico (Palmítico)

CG . T. Ret. 7.52 min

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro 19**): 256 [M⁺] (9), 227 (2), 213 (8), 199 (3), 185 (9), 171 (8), 157 (11), 129 (32), 115 (15), 97 (16), 73 (100), 60 (99).

- 14-taraxeren-3-ona

CG. T. Ret. 12.72 min

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro 3**): 424 [M⁺] (9), 409 (5), 300 (29), 285 (23), 204 (69), 189 (27), 149 (15), 133 (72), 107 (65), 95 (62), 55 (100).

Fracción F2

- 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona

CG. T. Ret. 6.84 min

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro 21**): 250 [M⁺] (4), 268 (1), 210 (3), 165 (6), 137 (6), 109 (31), 71 (56), 58 (100).

- Éster metílico del ácido hexaeicosanoico

CG. T. Ret. 11.29 min

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro 17**): 410 [M⁺] (9), 367 (2), 311 (2), 255 (3), 199 (6), 143 (21), 57 (54), 87 (69), 74 (100).

Fracción F3

- 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona

CG. T. Ret. 7.84 min

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro 21**): 250 [M⁺] (1), 268(1), 210(1), 165(3), 137(4), 109(15), 71(51), 58(100).

- lup-20(29)-en-3-ona

CG . T.Ret. 15.17 min

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro 6**): 424 [M⁺] (7), 409 (4), 313 (9), 245 (7), 218 (25), 205 (42), 189 (20), 149 (8), 121 (51), 109 (72), 95 (85), 67 (100).

Fracción F4

- Éster metílico del ácido octaeicosanoico

CG. T. Ret. 11.93 min

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro 18**): 438 [M⁺] (8), 395 (2), 339 (2), 283 (1), 255 (2), 241 (2), 199 (5), 143 (21), 97 (14), 86 (69), 74 (100), 57 (53).

- 5,7-estigmastadien-3-ona

CG . T. Ret. 13.18 min

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro 12**): 410 [M⁺] (14), 395 (2), 269 (7), 227 (2), 188 (23), 174 (100), 160 (25), 134 (13), 105 (16), 81 (19), 55 (21).

Fracción F5

- 6,10,14 trimetil-2-pentadecanona

CG. T. Ret. 6.83 min

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro 21**): 250 [M⁺] (2), 268 (1), 210 (1), 165 (3), 137 (4), 109 (24), 71 (52), 58 (100).

- Hexaeicoseno

CG . T. Ret. 11.23 min

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro 22**): 410 [M⁺] (14), 395 (2), 269 (7), 227 (2), 188 (23), 174 (100), 160 (25), 134 (13), 105 (16), 81(19), 55 (21).

- Éster metílico del ácido hexadecanoico (palmítico)

CG . T. Ret. 7.29 min

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro 13**): 270 [M⁺] (10), 227 (8), 213 (3), 199 (6), 185 (7), 171 (8), 157 (4), 143 (17), 129 (7), 101 (13), 87 (65), 74 (100), 55 (35).

- Éster metílico del ácido octadecanoico

CG . T. Ret. 8.19 min

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro 14**): 298 [M⁺] (8), 255 (6), 241 (2), 199 (7), 185 (3), 157 (4), 143 (19), 129 (7), 101 (9), 87 (68), 74 (100), 55 (31).

- Éster metílico del ácido eicosanoico

CG . T. Ret. 9.05 min

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro 15**): 326 [M⁺] (6), 296 (1), 283 (3), 227 (3), 199 (3), 171 (3), 143 (14), 129 (6), 101 (8), 87 (57), 74 (100), 55 (43).

- Éster metílico del ácido docoeicosanoico

CG. T. Ret. 9.86 min

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro 16**): 354 [M⁺] (13), 311 (5), 255 (6), 199 (8), 185 (4), 143 (25), 129 (8), 101 (4), 87 (69), 74 (100), 55 (43).

- Éster metílico del ácido hexaeicosanoico

CG. T. Ret. 11.32 min

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro 19**): 410 [M⁺] (10), 367 (3), 311 (3), 255 (3), 199 (6), 143 (17), 101 (17), 87 (67), 74 (100), 55 (97).

Fracción F6

- Éster metílico del ácido hexadecanoico (palmítico)

CG. T. Ret. 7.24 min

EMIE *m/z* (int. rel.) (**Espectro 13**): 270 [M⁺] (4), 227 (4), 213 (1), 199 (3), 185 (4), 171 (4), 157 (3), 143 (11), 129 (6), 101 (7), 87 (57), 74 (100), 55 (36).

- Ácido hexadecanoico (palmítico)

CG. T. Ret. 8.70 min

EMIE *m/z* (int. rel.) (**Espectro 19**): 256 [M⁺] (39), 227 (7), 213 (25), 199 (10), 185 (21), 171 (22), 157 (28), 129 (58), 73 (100), 60 (61).

- Ácido octadecanoico (estéarico)

CG. T. Ret. 9.45 min

EMIE *m/z* (int. rel.) (**Espectro 20**): 284 [M⁺] (17), 256 (1), 241 (10), 227 (6), 213 (5), 199 (6), 185 (18), 171 (8), 157 (6), 143 (10), 129 (38), 73 (89), 55 (100).

- β- Sitosterol

CG. T. Ret. 14.77 min

EMIE *m/z* (int. rel.) (**Espectro 9**): 414 [M⁺] (15), 396 (7), 381 (4), 354 (1), 329 (7), 303 (10), 274 (7), 255 (8), 231 (11), 213 (17), 200 (7), 174 (14), 154 (27), 145 (27), 118 (32), 105 (48), 91 (49), 74 (76), 67 (44), 58 (100), 57 (72).

5.10.1. Aislamiento e identificación de 14-taraxeren-3-ona

30 mg de la fracción F1 se aplicaron a una placa cromatográfica preparativa eluyendo con hexano-acetato de etilo 90:10. La mancha con Rf de 0.5 fue extraída de la gel de sílice e identificada mediante el análisis de sus constantes espectroscópicas (IR, RMN ^1H y EM), las cuales se describen en seguida:

Estado físico: cristales

IR $\nu_{\text{máx}}$ (película) cm^{-1} (**Espectro 1**): 3436, 2939, 2865, 1708, 1632, 1462, 1377, 1245, 1094.

RMN- ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) (**Espectro 2**): 5.56 (dd, $J= 8.1, 3.3$ Hz, H-15.0), 2.70 (ddd, $J=16.0, 12.0, 7.2, 6.9$ Hz, H-2a), 2.41 (ddd, $J=16.0, 6.3, 3.6, 3.3$ Hz, H-2b), 1.14 (s), 1.09 (s), 1.08 (s), 1.06 (s), 0.96 (s), 0.92 (s), 0.91 (s), 0.83 (s).

CG. T. Ret. 12.72 min

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro 3**): 424 [M^+] (9), 409 (5), 300 (29), 285 (23), 204 (69), 189 (27), 149 (15), 133 (72), 107 (65), 95 (62), 55 (100).

5.10.2. Aislamiento e identificación del 3-oxo-lup-20(29)-eno

20 mg de la fracción F3 se aplicaron a una placa cromatográfica preparativa eluyendo con hexano-acetato de etilo 90:10. La mancha con Rf de 0.5 fue extraída de la gel de sílice e identificada mediante el análisis de sus constantes espectroscópicas (IR, RMN ^1H y EM), las cuales se describen en seguida:

Estado físico: cristales

IR $\nu_{\text{máx}}$ (película) cm^{-1} (**Espectro 4**): 3433, 2925, 2854, 1729, 1706, 1640, 1458, 1380.

RMN- H^{-1} ($CDCl_3$, 300 MHz) (**Espectro 5**): 5.5 (m, H-12), 4.68 (d, $J=2.4$ Hz, H-29a), 4.67 (d, $J=2.4$ Hz, H-29b), 3.18 (dd, $J= 11.1, 5.3$, H-3), 2.36 (m, H-19), 1.67 (s), 1.25 (s), 1.02 (s), 0.96 (s), 0.94 (s), 0.82 (s), 0.78 (s), 0.76 (s).

CG. T.Ret. 15.17 min

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro 6**): 424 [M^+] (7), 409 (4), 313 (9), 245 (7), 218 (25), 205 (42), 189 (20), 149 (8), 121 (51), 109 (72), 95 (85), 67 (100).

5.10.3. Aislamiento e identificación de β -sitosterol

De la fracción F6 de consistencia cerosa precipitó por adición de una mezcla de disolventes (hexano, acetato de etilo y acetona), un sólido amorfo de color blanco opaco que se identificó como β -sitosterol de acuerdo al análisis de sus constantes espectroscópicas (IR, RMN 1H y EM), las cuales se describen a continuación:

RMN- H^{-1} ($CDCl_3$, 300 MHz) (**Espectro 8**): 0.68 (s, H-18), 0.81 (d, H-27), 0.83 (t, $J= 6.7$ Hz, H-26), 0.84 (d, $J=7.4$ Hz, H-29), 0.97 (d, $J=6.4$ Hz, H-21), 1.02 (s, H-19), 3.5 (m, H-3), 5.36 (t, H-6).

CG. T. Ret. 14.77 min

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro 9**): 414 [M^+] (15), 396 (7), 381 (4), 354 (1), 329 (7), 303 (10), 274 (7), 255 (8), 231 (11), 213 (17), 200 (7), 174 (14), 154 (27), 145 (27), 118 (32), 105 (48), 91 (49), 74 (76), 67 (44), 58 (100), 57 (72).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Alnus acuminata fue seleccionada para ser estudiada de acuerdo a la importancia de su uso en la medicina tradicional mexicana, ya que en algunas regiones del sureste de la República Mexicana es altamente apreciada por su eficacia contra inflamaciones y diversas infecciones. La forma tradicional de uso incluye infusiones y emplastos de la corteza o de las hojas. Debido a que en estudios previos se demostró actividad antiinflamatoria de la corteza en ratas Wistar y actividad antimicrobiana *in vitro*, en este trabajo se estudiaron las hojas con la finalidad de evaluar su actividad antimicrobiana y comparar el contenido metabólico de ambas (corteza y hojas).

6.1. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS VEGETALES

Se realizó mediante la percolación del material vegetal seco a temperatura ambiente y fragmentado. Este método probó ser eficiente, y de esta manera se obtuvieron en orden de menor a mayor polaridad, en primer lugar el extracto hexánico, posteriormente el clorofórmico y finalmente el metanólico, cuyos rendimientos se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Rendimiento de los extractos derivados del material vegetal empleado.

Extracto	Peso (g)	Rendimiento
Hexánico	70.2	(3.5%)
Clorofórmico	68.4	(3.4%)
Metanólico	276.0	(13.8%)

En la **Figura 6** se observan las características físicas de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico.



Figura 6. De izquierda a derecha: extracto hexánico, clorofórmico y metanólico.

El extracto hexánico presentó consistencia viscosa y color verde oscuro, el extracto clorofórmico es totalmente sólido y cristalino de color café y el extracto metanólico fue muy viscoso de color café oscuro con un ligero olor a caramelo.

6.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TÓXICA DE LOS EXTRACTOS EN EL CRUSTÁCEO *Artemia salina*

Con el fin de conocer la toxicidad de los extractos se realizó la prueba con *Artemia salina*, la cual constituye, de acuerdo a la literatura (Ghisalberti,1993) un bioensayo general que permite detectar un amplio espectro de bioactividad presente en extractos crudos y provee un panorama general que puede ser utilizado para realizar bioensayos más específicos una vez que los compuestos activos sean aislados. Al parecer esta prueba es predictiva de actividades citotóxica y pesticida. Se considera que un extracto es activo al presentar un valor de CL_{50} menor a 1000 ppm.

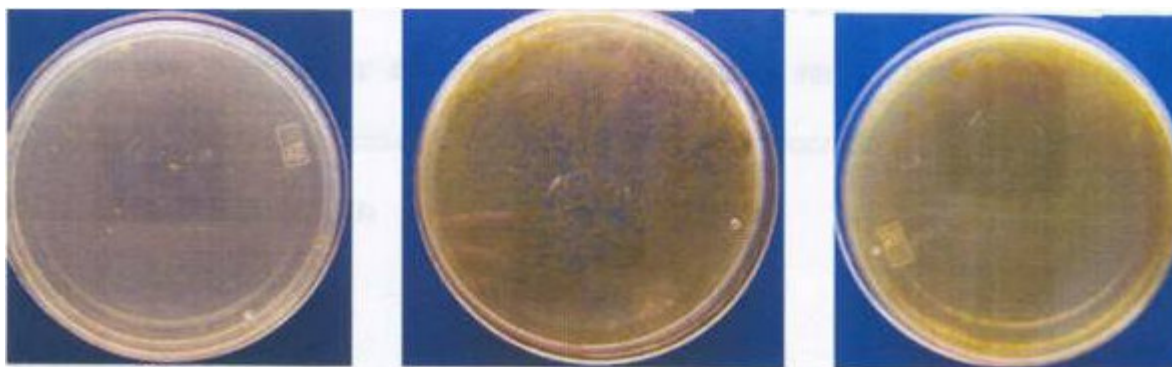
En la **Tabla 6** se muestran los resultados de este bioensayo y se puede observar que la prueba es negativa para los tres extractos.

Tabla 6. CL₅₀ de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico

Extractos	Conc. [µg/mL]	Número de sobrevivientes	CL ₅₀ [µg/mL]
Hexánico	1000	10/10 10/10 10/10	> 1000
	100	09/10 10/10 10/10	> 1000
	10	10/10 10/10 10/10	> 1000
CHCl ₃	1000	10/10 10/10 10/10	> 1000
	100	10/10 10/10 09/10	> 1000
	10	10/10 10/10 10/10	> 1000
MeOH	1000	09/10 09/10 10/10	> 1000
	100	10/10 09/10 10/10	> 1000
	10	10/10 10/10 10/10	> 1000

6.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN

La inocuidad de los extractos crudos se evaluó en cajas petri con agar Mueller Hinton para comprobar la ausencia de microorganismos que pudieran ocasionar falsos positivos en las pruebas antimicrobianas. Como se observa en la **Figura 7** no se detectó crecimiento de microorganismos en los extractos. La coloración que se observa en las diferentes cajas se debe a la presencia de compuestos insolubles en el medio.

**Figura 7.** De izquierda a derecha: extractos hexánico, clorofórmico y metanólico

Una vez conocida la inocuidad de los extractos se realizaron las pruebas para determinar actividad antibiótica contra microorganismos representativos responsables de infecciones humanas importantes. El género *Staphylococcus* causa frecuentemente infecciones en la piel por contener especies patógenas.

En las **Tablas 7, 8 y 9** se muestran los resultados del ensayo microbiológico por la técnica de difusión en agar.

Tabla 7. Halos de inhibición en el extracto hexánico.

Microorganismo	Halos de inhibición de acuerdo a la concentración		
	1000µg	500µg	250µg
<i>S. aureus</i> G(+)	9 mm	8.3 mm	
<i>E. coli</i> G(-)	3.0 cm	3.6mm	3.3 mm
<i>P. aeruginosa</i> G(-)	----	----	----
<i>T. mentagrophytes</i>	5.0 mm	3.0 mm	----
<i>C. albicans</i>	----	----	----

Tabla 8. Halos de inhibición en el extracto clorofórmico.

Microorganismo	Halos de inhibición de acuerdo a la concentración		
	1000µg	500µg	250µg
<i>S. aureus</i> G(+)	9.6 mm	8.3 mm	8.3 mm
<i>E. coli</i> G(-)	3.6 mm	2.6 mm	6.0 mm
<i>P. aeruginosa</i> G(-)	----	----	----
<i>T. mentagrophytes</i>	----	----	----
<i>C. albicans</i>	----	----	----

Tabla 9. Halos de inhibición en el extracto metanólico.

Microorganismo	Halos de inhibición de acuerdo a la concentración		
	1000µg	500µg	250µg
<i>S. aureus</i> G(+)	10 mm	9.3 mm	----
<i>E. coli</i> G(-)	3.6 mm	3.6 mm	2.6 mm
<i>P. aeruginosa</i> G(-)	----	----	----
<i>T. mentagrophytes</i>	6.0 mm	3.6 mm	3.3 mm
<i>C. albicans</i>	----	----	----

En los tres extractos se aprecia una moderada respuesta inhibitoria de crecimiento contra *S. aureus* y *E. coli*. El primero está presente en infecciones comunes en la garganta lo que podría correlacionarse con el uso terapéutico de *Alnus* para el tratamiento de escrófulas: mientras que el uso de infusiones contra padecimientos gastrointestinales se relacionaría con *E. coli*, bacteria Gram (-) causante de infecciones intestinales.

Tanto el extracto hexánico como el metanólico presentaron actividad contra el hongo dermatofito, mientras que el hongo levaduriforme y *P. aeruginosa* no fueron sensibles a ninguno de los extractos.

Para conocer el potencial de los extractos activos como antimicrobianos, es necesario utilizar antibióticos de referencia (control); en este ensayo no se emplearon porque sólo se quería conocer cualitativamente su actividad.

En la **Figura 8** se muestran los halos de inhibición obtenidos para *Escherichia coli*, mientras que en la **Figura 9** se muestran los obtenidos para *Staphylococcus aureus*.

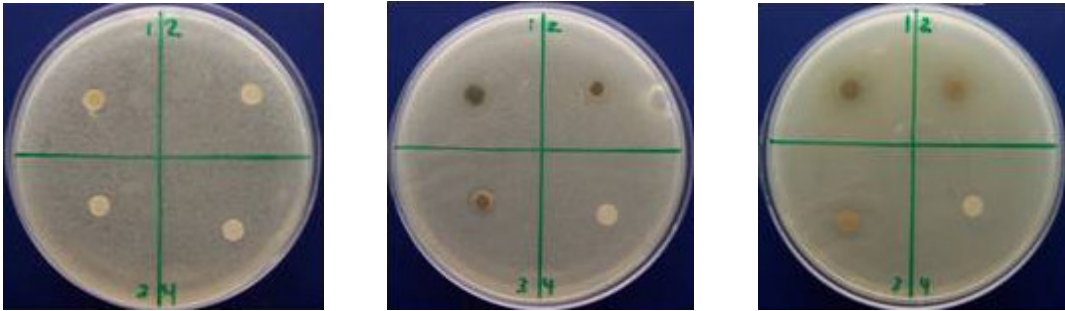


Figura 8. Halos de inhibición obtenidos para *E. coli*. De izquierda a derecha extracto hexánico, clorofórmico y metanólico.

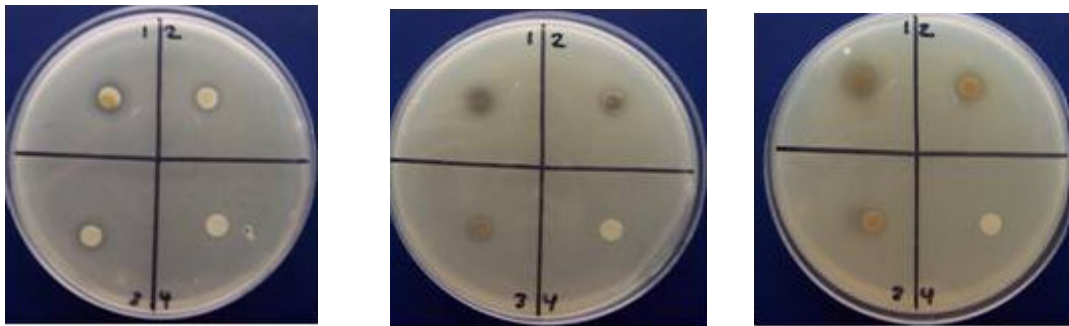


Figura 9. Halos de inhibición obtenidos para *S. aureus*. De izquierda a derecha extracto hexánico, clorofórmico y metanólico.

6.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN

La técnica por dilución fue útil ya que se lograron conocer las CMI's de los extractos ensayados. Además en este caso se contó con una batería mayor de microorganismos que los empleados en la prueba de difusión, incluyendo dos especies más de enterobacterias y un dermatofito.

Los resultados muestran nuevamente una actividad de inhibición de crecimiento marginal sobre *Staphylococcus aureus*, mientras que los resultados para *E. coli*, *P. aeruginosa*, *T. mentagrophytes* y *Candida albicans* no concordaron con lo observado en las pruebas de difusión, lo cual se podría deber a la falta de viabilidad de las cepas utilizadas en el ensayo por difusión en agar en capa fina.

En la **Tabla 10** se presentan los resultados de las CMI's para los extractos.

Tabla 10. CMI (mg/mL) de los extractos con respecto a diferentes microorganismos

Extracto	Sa	Sf	Ec	St	Pa	Ca	Tm	Tr
Clorofórmico	1.5	3.0	6.0	3.0	3.0	3.0	1.5	1.5
Metanólico	1.5	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	1.5	1.5
Hexánico	3.0	> 6.0	> 6.0	6.0	6.0	> 6.0	3.0	3.0
Gentamicina	0.002	0.002	0.004	0.004	0.004	NP	NP	NP
Miconazol	NP	NP	NP	NP	NP	NP	0.004	0.004
Nistatina	NP	NP	NP	NP	NP	0.008	NP	NP

Rango de concentración probado: 0.75- 6.0 mg/ml

Sa: *Staphylococcus aureus*, *Sf*: *Streptococcus faecalis*, *Ec*: *Escherichia coli*, *Pa*: *Pseudomonas aeruginosa*, *St*: *Salmonella tify*, *Ca*: *Candida albicans*, *Tm*: *Trichophyton mentagrophytes*, *Tr*: *Trichophyton rubrum*, NP: No probado

Nuestros resultados se pueden considerar de muy baja actividad, comparados con los de los antibióticos de referencia, por lo que será necesario hacer las mismas pruebas a los compuestos puros.

6.5. FRACCIONAMIENTO PRIMARIO

Tomando en consideración que los extractos más activos resultaron ser el clorofórmico y el metanólico, el contenido metabólico de éstos se analizó por ccf, encontrándose al clorofórmico constituido por varias sustancias de posible interés. Por otra parte la característica física de éste extracto era la de un sólido, de aspecto cristalino y de coloración oscura a diferencia del metanólico, el cual tenía consistencia de extracto blando. Por lo anterior se decidió realizar el estudio químico del extracto clorofórmico para lo cual se fraccionó en una columna cromatográfica de gel de sílice, resultando 658 fracciones que fueron agrupadas de acuerdo a su contenido visualizado por ccf. Tanto las fracciones como el sistema empleado para la elución se muestran en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Fracciones obtenidas a partir del extracto clorofórmico

Eluyente	Proporción	Fracciones reunidas
Hexano	100%	1-50
Hex - AcOEt	95 : 5	51 – 122
Hex - AcOEt	90 : 10	123 – 217
Hex - AcOEt	85 : 15	218 – 269
Hex - AcOEt	80 : 20	270 – 341
Hex - AcOEt	75 : 25	342 – 408
Hex - AcOEt	65 : 35	409 – 477
Hex - AcOEt	55 : 45	478 – 510
Hex - AcOEt	40: 60	511 – 535
Hex - AcOEt	30 : 70	536 – 560
Hex - AcOEt	20 : 80	561 – 616
Hex - AcOEt	10 : 90	617 – 629
AcOEt	100%	630 – 648
Cloroformo	100%	649 – 655
Cloroformo - Acetona	50 : 50	656 – 658

Las fracciones 1 a 252 estaban compuestas por sustancias que en el análisis en el espectro infrarrojo y de ^1H -RMN indicaron ser ceras y ácidos grasos. (**Espectros 10 y 11**).

A partir de la fracción 253 se obtuvieron mezclas de clorofilas, las cuales se trataron de separar de compuestos diferentes que estuvieran presentes en la mezcla, utilizando una columna abierta en fase reversa de gel de sílice, sin embargo, el contenido de clorofilas fue tan abundante que no permitió la separación de otros compuestos. El porcentaje en peso de clorofilas por el peso del extracto fue aproximadamente del 70%.

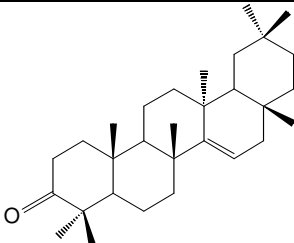
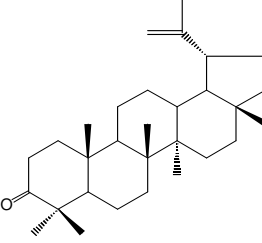
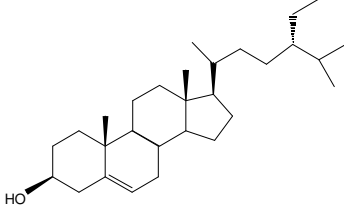
Las fracciones 1-223 se agruparon en seis fracciones secundarias (F1-F6), que por su contenido de mezclas de ácidos grasos y probables esteroides fueron metiladas con diazometano con el fin de separar a los mismos. **Tabla 12**

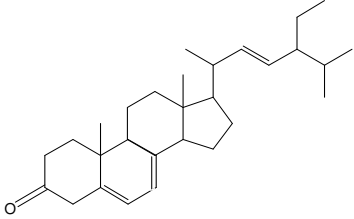
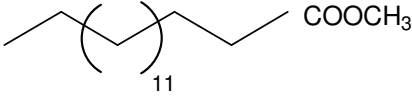
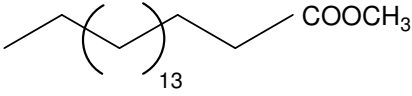
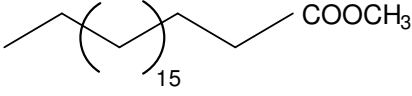
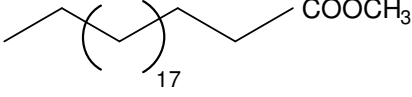
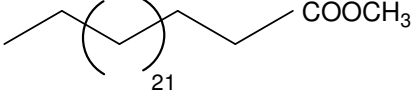
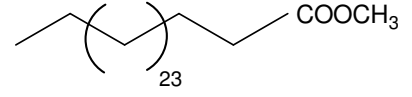
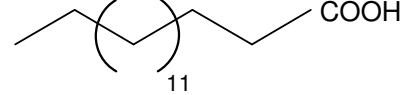
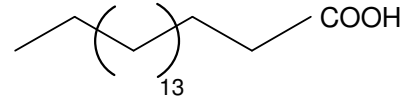
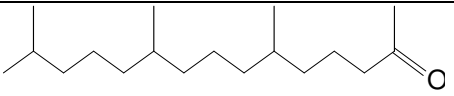
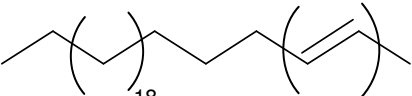
Tabla 12. Fracciones secundarias del extracto clorofórmico

Clave	Fracción
F1	67-109
F2	80-91 soluble en acetona fría
F3	80-91 soluble en acetona caliente
F4	110-130
F5	131-186
F6	187-223

Cada una de estas fracciones se analizó por CG/EM y sus contenidos son los siguientes:

Tabla 13. Compuestos encontrados en el extracto clorofórmico de las hojas de la planta *Alnus acuminata* sbsp. *arguta*

Nombre	Estructura	Espectro	F1	F2	F3	F4	F5	F6
14-taraxeren-3-ona		3	X					
lup-20(29)-en-3-ona		6			X			
β -sitosterol		9						X

Nombre	Estructura	Espectro	F1	F2	F3	F4	F5	F6
5,7-estigmastadien-3-ona		12				X		
Éster metílico del ácido hexadecanoico		13	X				X	X
Éster metílico del ácido octadecanoico		14					X	
Éster metílico del ácido eicosanoico		15					X	
Éster metílico del ácido docoeicosanoico		16					X	
Éster metílico del ácido hexaeicosanoico		17		X			X	
Éster metílico del ácido octaeicosanoico		18				X		
Ácido hexadecanoico		19	X					X
Ácido octadecanoico		20						X
6,10,14-trimetil-2-pentadecanona		21	X	X	X		X	
Hexaeicoseno		22					X	

Como se puede observar en la **Tabla 13** los productos más abundantes y característicos fueron ácidos grasos y sólo dos terpenoides y dos esteroides. Las mezclas de ácidos grasos de alto peso molecular y algunas clorofilas sobrantes en las fracciones impidieron el aislamiento de una cantidad mayor de metabolitos de interés (terpenoides), aunque de acuerdo a la bibliografía (Benkendorff *et al.*, 2005, Zheng *et al.*, 2005), existen ácidos grasos capaces de funcionar como agentes antimicrobianos.

En nuestro trabajo los métodos de separación y aislamiento de metabolitos secundarios no fueron lo suficientemente eficaces para la obtención cuantitativa de estos compuestos y su posterior evaluación como agentes antibióticos.

Un compuesto de naturaleza terpenoide encontrado en la mayoría de las fracciones analizadas fue la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (**Tabla 13**), cuya presencia ha sido reportada en otras especies de plantas, por ejemplo en la *Esenbeckia yaxhoob*, *Terminalia catappa* y *Trifolium pratense* L. entre otras. (Rojas, 1996; Jeng-Leun *et al.*, 2003; Figueiredo *et al.*, 2007)

6.6. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS

La fracción F1 fue sometida a separación mediante cromatografía en placa fina preparativa, obteniéndose en un 5% un compuesto cristalino de coloración blanca que por sus características espectroscópicas y espectrométricas se identificó como el triterpenoide 14-taraxeren-3-ona (**Espectros 1, 2 y 3**). Cabe mencionar que este compuesto ya había sido aislado con anterioridad de la corteza de la planta (García, 2006; Illescas, 2008).

De la fracción F3 se aisló por medio de cromatografía en capa fina preparativa el triterpenoide 3-oxo-lup-20(29)-eno (3.23% de la fracción), el cual también se había aislado con anterioridad de la de corteza de *A. acuminata*. Sus características espectroscópicas se muestran en los **Espectros 4, 5 y 6**. De la fracción F6 por precipitación se separó el esteroide β -sitosterol (en un 42.6% de la fracción) y sus características espectroscópicas se muestran en los **Espectros 7, 8, 9**.

La estructura de los dos terpenoides y del esteroide fue confirmada por comparación de sus espectros (IR, $^1\text{H-RMN}$ y EM) con los reportados para estos compuestos.

7. CONCLUSIONES

- De las hojas de la planta medicinal *Alnus acuminata* sbsp. *arguta* (Schlecht.) Furlow se obtuvieron los extractos hexánico (3.5%), metanólico (13.8%) y clorofórmico (3.4%), los cuales presentaron actividad inhibitoria de crecimiento microbiano contra microorganismos representativos Gram (+) y Gram (-) y contra dos cepas de hongos dermatofitos.
- Ninguno de los extractos ensayados presentaron toxicidad contra el crustáceo *Artemia salina* Leach.
- Del extracto clorofórmico por medio de un fraccionamiento primario se separó una mezcla de ácidos grasos y otras sustancias lipídicas.
- Por medio de la reacción de metilación de las fracciones primarias se identificaron los ácidos: hexadecanoico, octadecanoico, eicosanoico, docoeicosanoico, hexaeicosanoico y octaeicosanoico en forma de sus ésteres metílicos.
- El análisis químico de las hojas de *A. acuminata* resultó también en el aislamiento e identificación estructural de los triterpenoides: 14-taraxeren-3-ona y lup-20(29)-en-3-ona y del esteroide β -sitosterol, cuya identificación estructural se realizó a través del análisis de sus características espectroscópicas y espectrométricas.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alanis, A. D., Calzada, F., Cervantes, J. A, Torres, J., Cevallos, G. M. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* **100**, 153-157.
- Benkendorff K, Davis A. R, Rogers C. N. , Bremner J. B. (2005). Free fatty acids and sterols in the benthic spawn of aquatic molluscs, and their associated antimicrobial properties, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **316**, 29–44.
- Bianchi K.S., Wiedhopf R., Cole J.R. (1973). Antitumor Agents From *Alnus oregona*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **62** (1), 139-140.
- Chen J., Gonzalez-Loredo R., Karchesy J.J. (2000). Minor Diarylheptanoid Glycosides of *Alnus rubra* Bark, *Phytochemistry*, **53**, 971-973.
- Dermeci B., Can-Baser H. (2000). Betulenols from *Betula* Species, *Planta Medica*, **66**, 490-493.
- Duke A.J. (1992). *HandBook of Phytochemical Constituents of GRAS Herbs and Other Economic Plants*. Boca raton, Florida USA, CRC Press, 123-456.
- Evans T. (1985). *Farmacognosia*, Editorial Interamericana - Mc Graw-Hill, España, 179-180.
- Fessenden R. J. & Fessenden J. S. (1982). *Química Orgánica*. Editorial Iberoamericana, México, 634-636, 895-919.
- Font Quer. (1962). *Plantas Medicinales*, Editorial Labor. Barcelona, España, 1997.

-
- Galgon T., Höke D. and Dräger B. (1999). Identification and Quantification of Betulinic Acid, *Phytochemical Analysis*, **10**, 187-190.
 - García P. N., Rodríguez R. E. (2006). Pruebas de identidad y pureza para el control de calidad a la droga cruda de *Alnus acuminata* (Schlecht) Furlow sbsp. *arguta*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
 - Figueiredo R, Rodrigues A. I., Costa M. do Céu. (2007). Volatile composition of red clover (*Trifolium pratense* L.) forages in Portugal: The influence of ripening stage and ensilage, *Food Chemistry* **104**, 1445–1453.
 - Ghisalberti, E.L. Bioactive Natural Products, Editores. S.M. Collegate y R.J. Molyneux. CRC Press. Londres, 1993.
 - Gómez V. J. C. (2007). Ensayos de actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones de diferentes polaridades *Alnus acuminata* sbsp. *arguta* (Schlecht) Furlow. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
 - Hanawa f., Shiro M., Yoshioki H. (1997). Heartwood Constituents of *Betula maximowicziana*. *Phytochemistry*, **45** (3), 589-595.
 - Harbone B. (1991). Dictionary of Organic Compounds. 5th edition, Marcel Dekker, New York, 276-320.
 - Huguet A., Recio M., Máñes S., Giner R., Ríos J. (2000). Effect of Triterpenoids on the inflammation induced by protein Kinase C activators, Neuronally Acting Irritants and Other agents, *European Journal of Pharmacology*, **410**, 69-81.

-
- Illescas P. O. (2008). Análisis fitoquímico de la corteza de *Alnus acuminata* sbsp. *arguta* (Schlecht.) Furlow. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

 - Jeng-Leun M, Pei-Tzu K y Charng-Cherng C. (2003). Aroma characterization and antioxidant activity of supercritical carbon dioxide extracts from *Terminalia catappa* leaves, *Food Research International* **36** (1), 97-104.

 - Keinänen M., Julkunen-Tiitto R. (1998). High-Performance Liquid Chromatographic determination of Flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves, *Journal of Chromatography A*, **793**, 370-377.

 - KiHwan B., Wen Y. J., Xing F. C., Minkyun N., Jung J.L. (2007). Diarylheptanoids from *Alnus hirsuta* inhibit the NF-kB activation and NO and TNF- α -Production. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 810-813.

 - Klischies M., Zenk M. (1978). Stereochemistry of C-Methylation in the Biosynthesis of Rhododendrin in *Alnus* and *Betula*, *Phytochemistry*, **17**, 1281-1284.

 - Mañes S., Recio C., Ríos J. L. (1997). Effect of Selected Triterpenoids on Chronic Dermal Inflammation, *European Journal of Pharmacology*, **334**, 103-105.

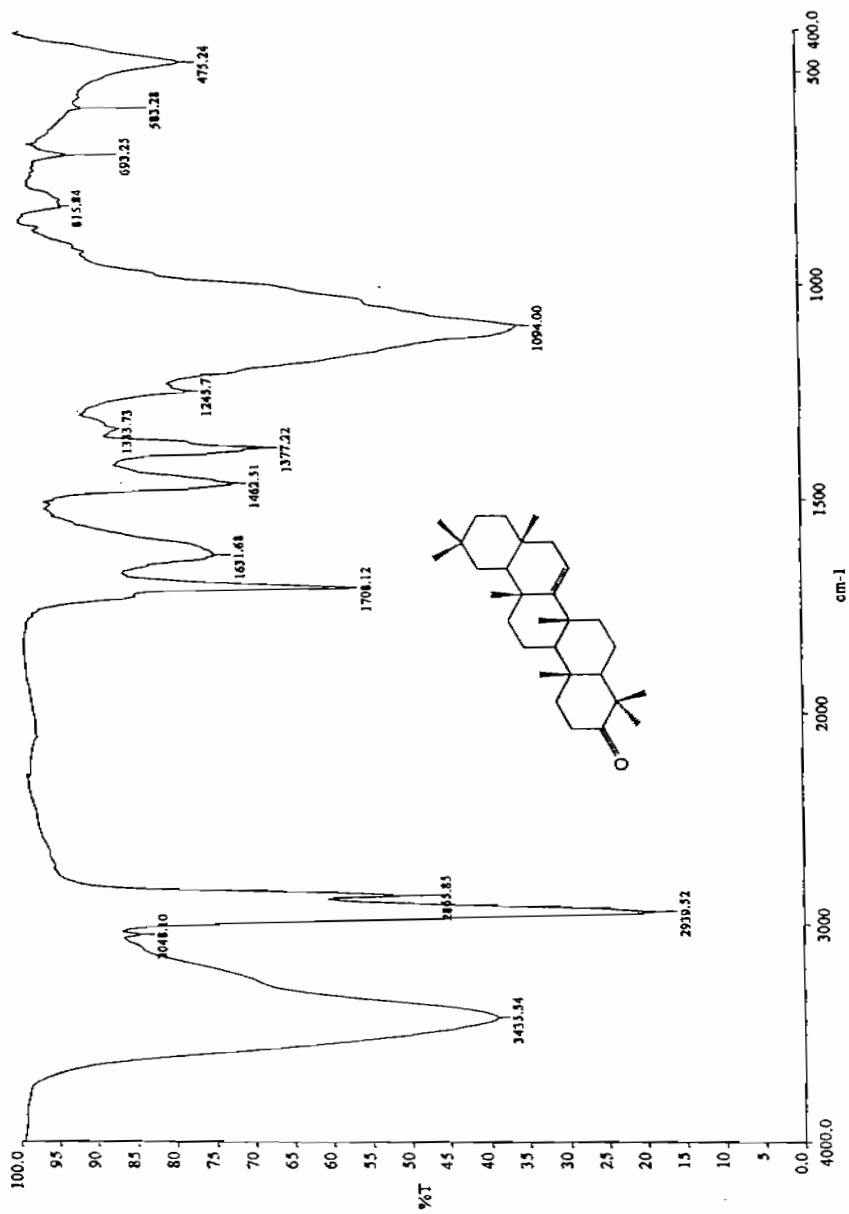
 - Martínez J. (1984). La Flora de Veracruz, Editorial Librería El Ateneo, Fascículo No.20, Xalapa, Veracruz México, 128-136.

 - Mata R. (2000). Curso Teórico de Farmacognosia. Universidad Nacional Autónoma de México.

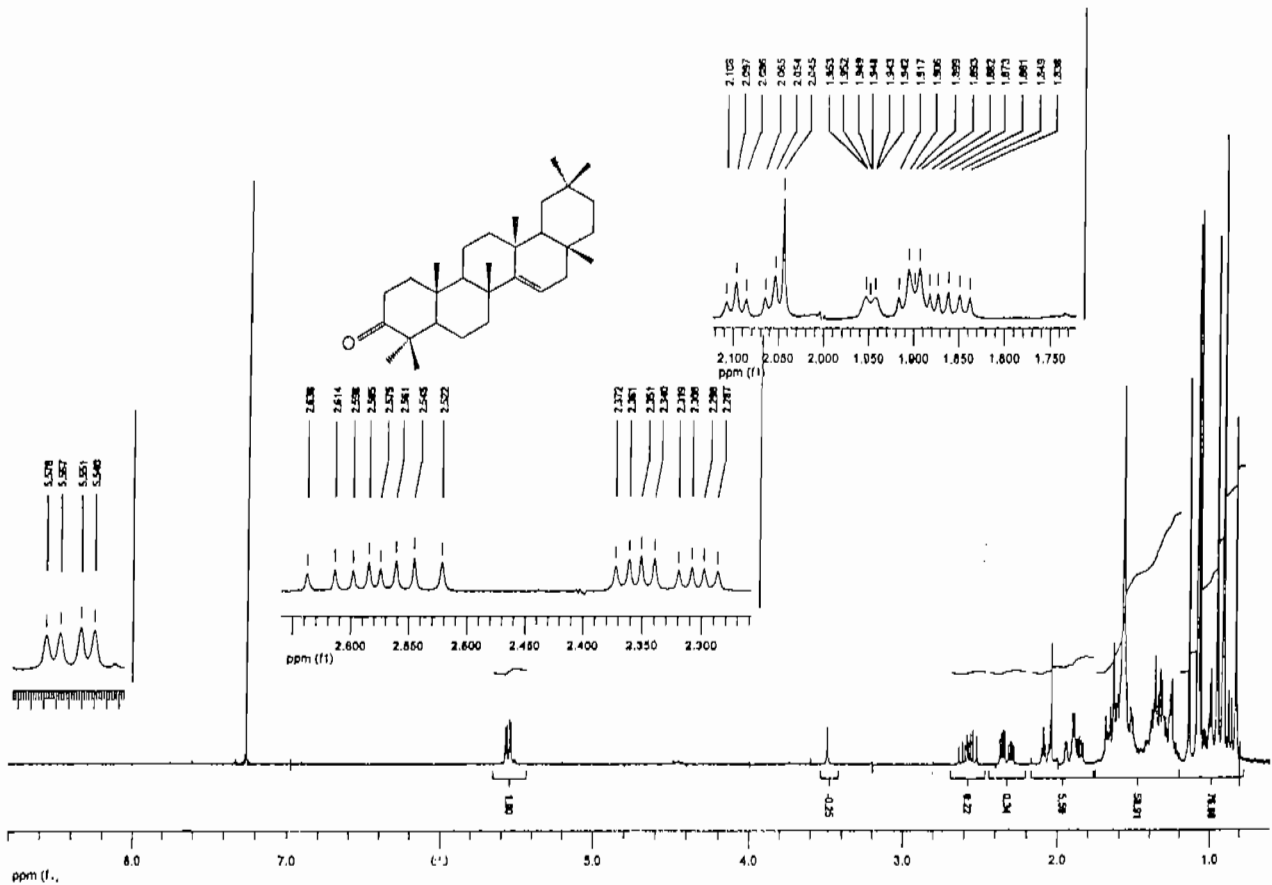
 - Matsuda H., Ishikado A., Nishida N., Ninomiya K., Fijiwara H., Kobayashi Y., and Masayuki Y. (1998). Hepatoprotective, Superoxide Scavenging, and Antioxidative Activities of Aromatic Constituents from the Bark of

- Betula platyphylla* var. *japonica*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **8**, 2939-2944.
- McCutcheon A. R., Ellis S.M., Hancock R.E.W., Towers G.H.N. (1992). Antibiotic Screening of Medicinal Plants of the British Columbian Native Peoples, Journal of Ethnopharmacology, **37**, 619-624.
 - Min-Won L., Jung-Hwan K., Dong-Wook J., Kyoung-Hwan A., Sang-Hak T., Young-Jonn S. (2000). Inhibition of Cyclooxygenase-2 Expression by Diarylheptanoid from the Bark of *Alnus hirsuta* var. *sibirica*, Biological & Pharmaceutical Bulletin, **23** (4), 517-518.
 - Peres V., Tanus J., Faustino de Oliveira F. (2000). Tetraoxygenated Naturally Occurring Xanthenes, Phytochemistry, **55**, 638-710.
 - Ríos J. L. and Recio M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity, Journal of Ethnopharmacology, **100**, 80-84.
 - Ritch-Krc E.M., Turner N.J., Towers G.H.N. (1996). Carrier Herbal Medicine: An evaluation of The Antimicrobial and Anticancer activity in some Frequently used Remedies, Journal of Ethnopharmacology, **52**, 151-156.
 - Ritch-Krc E.M., Turner N.J., Towers G.H.N. (1996). Carrier Herbal Medicine: Traditional and Contemporary Plant Use, Journal of Ethnopharmacology, **52**, 85-94.
 - Rovelo M. A. R. (2002). Estudio de la interacción sinérgica de *Phytolacca americana* L. y *Alnus acuminata* sbsp. *arguta* (Schlecht.) Furlow como agentes antiinflamatorios en rata Wistar. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México.
 - Rzedowski J. (1979). Flora Fanerógamica del Valle de México, Editorial CECSA, México D.F, 80-161.

-
- Santamour F., Lundgren L. (1997). Rhododendrin in *Betula*: a Reappraisal, *Biochemical Systematics and Ecology*, **25** (4), 335-341.
 - Shriner R.L., Fuson R.C. y Curtin D.Y. (1997). *Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos*, Editorial Limusa, México, 269.
 - Steele C.P., Warhurts D.C., Kirby G and Simmonds M. (1999). In vitro and in vivo, Evaluation of Betulinic Acid as an Antimalarial, *Phytotherapy Research*, **13**, 115-119.
 - Tori M., Kasushi H., Yoshinori A. (1995). Diarylheptanoids, Flavonoids, Stilbenoids, Sesquiterpenoids and Phenanthrene from *Alnus maximowiczii*, *Phytochemistry*, **40** (4), 1263-1264.
 - Tyler E.V. (1979). *Farmacognosia*, Editorial Librería el Ateneo, Buenos Aires, Argentina, 406-415.
 - Villareal M. L., Álvarez L., Alonso D., Navarro V., García P., Delgado G. (1994). Cytotoxic and antimicrobial creening of selected triterpenoids from Asteraceae species. *Journal of Ethnopharmacology*, **42**, 25-29.
 - Zheng C. J., Yooa J., Leeb T., Choc H., Kimd Y., Kima W. (2005). Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids, *FEBS Letters* **579**, 5157–5162.

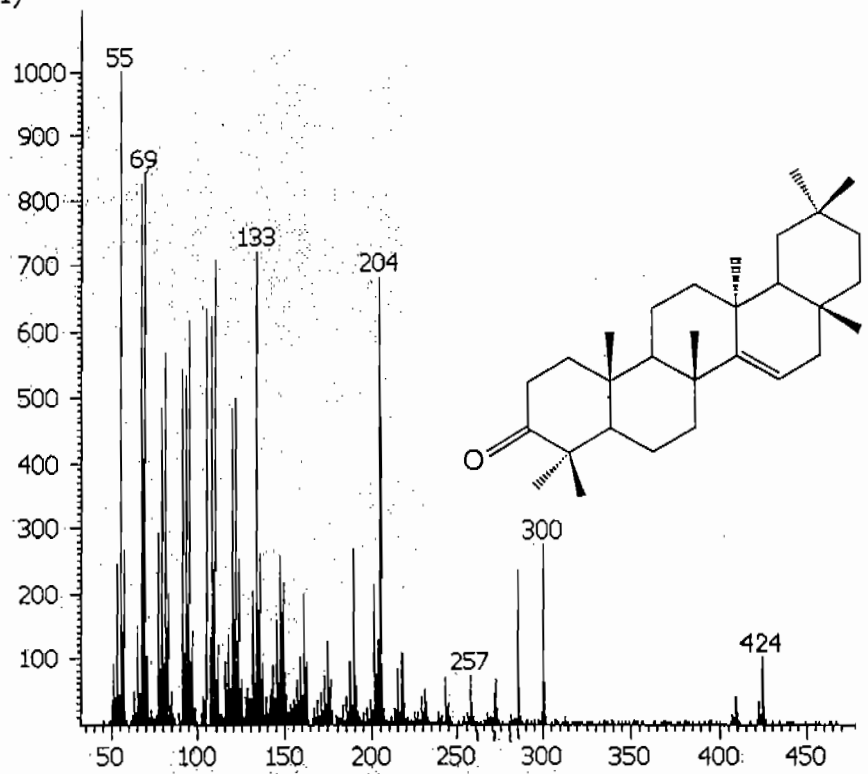


Espectro 1. Espectro en el IR (película) de la 14-taraxeren-3-ona (F1).

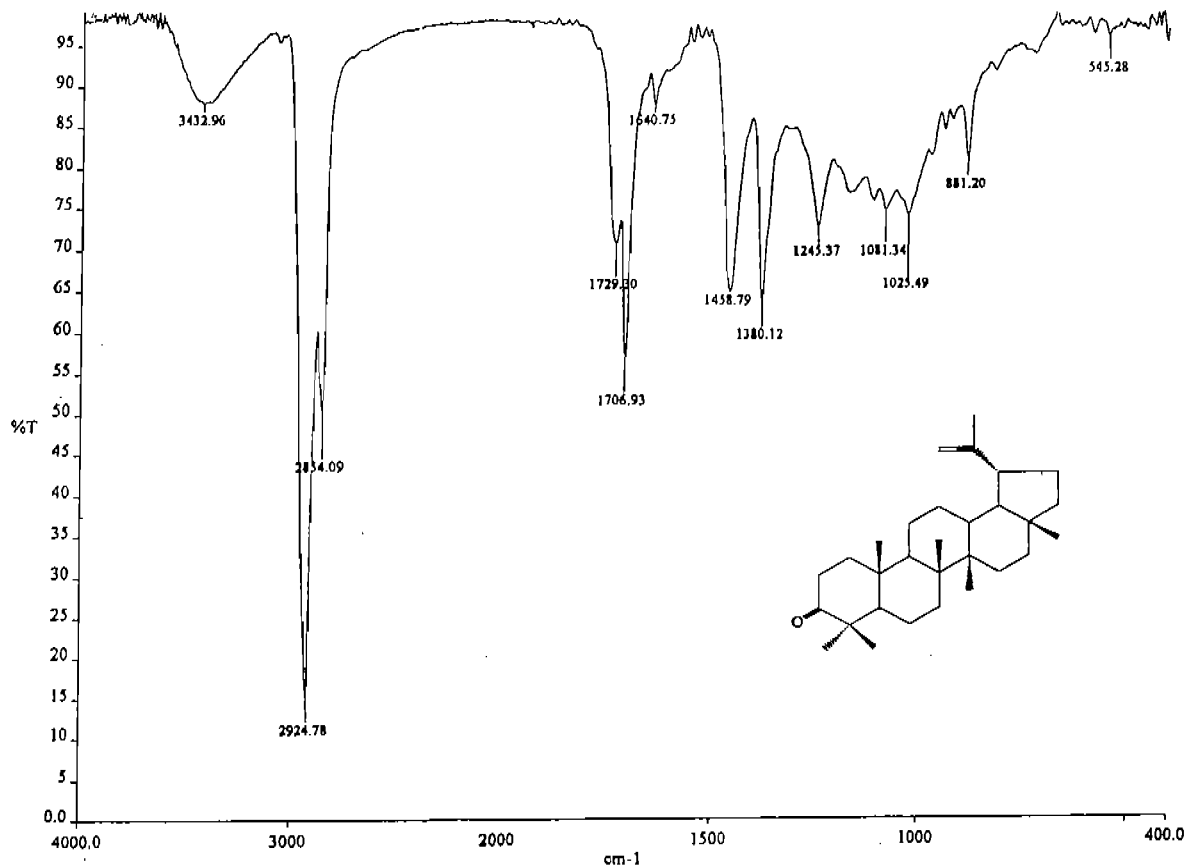


Espectro 2. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de la 14-taraxeren-3-ona (F1).

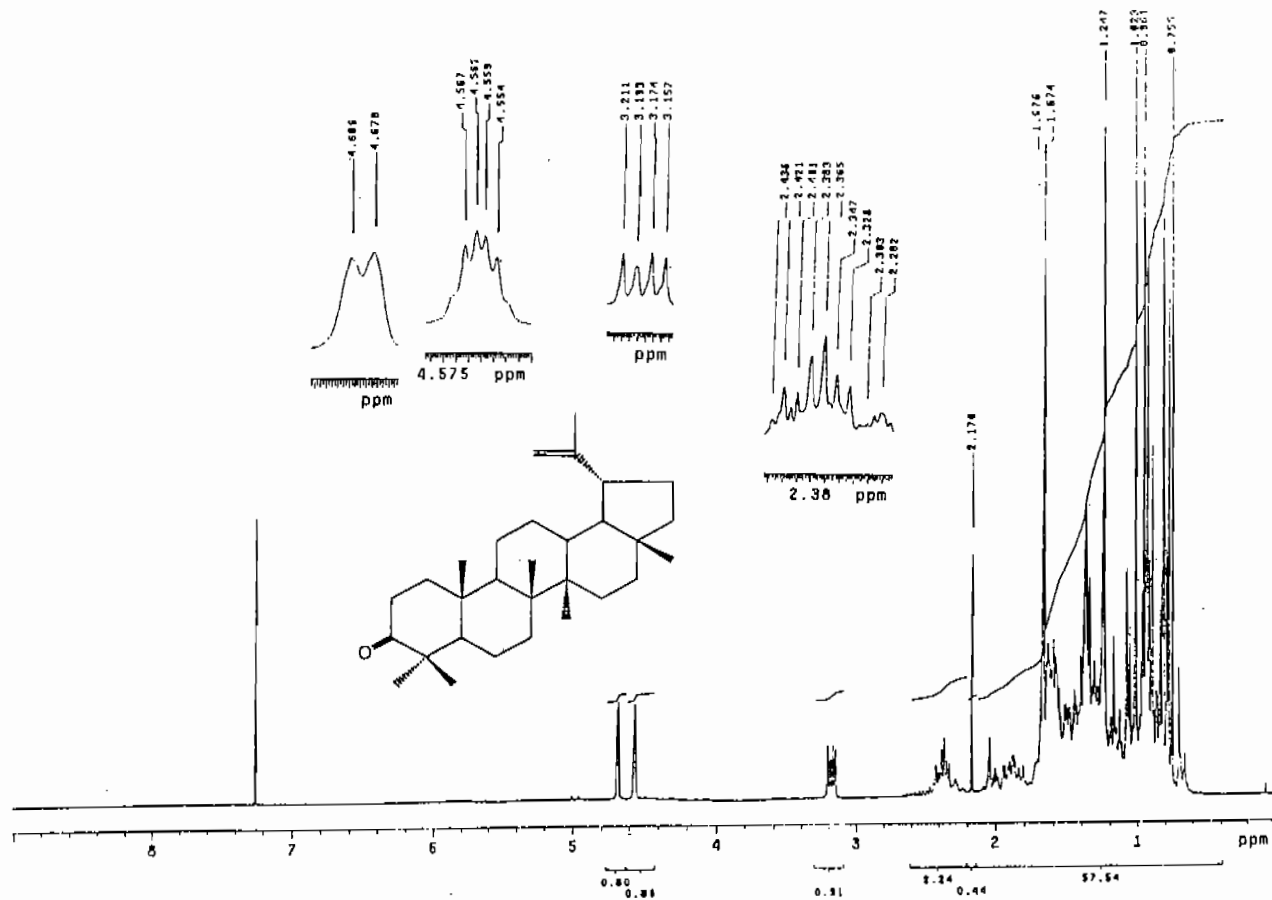
Peak True - sample "OT705_AAR-67-109:1", peak 6, at 763.24 s (Spec # 663 1)



Espectro 3. Espectro de masas de la 14-taraxeren-3-ona (F1).

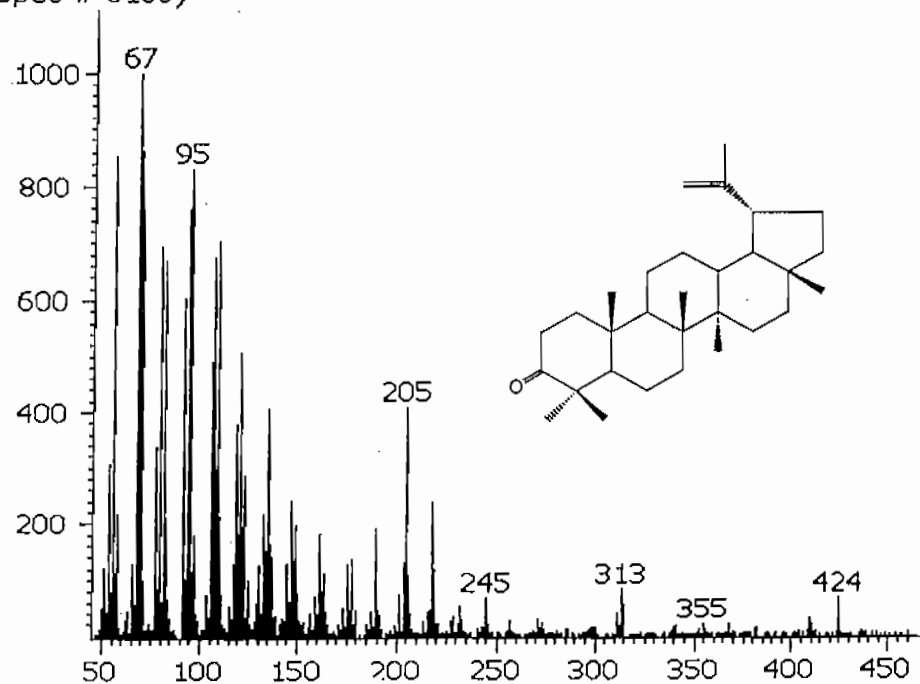


Espectro 4. Espectro en el IR (película) de la lup-20(29)-en-3-ona (F3).

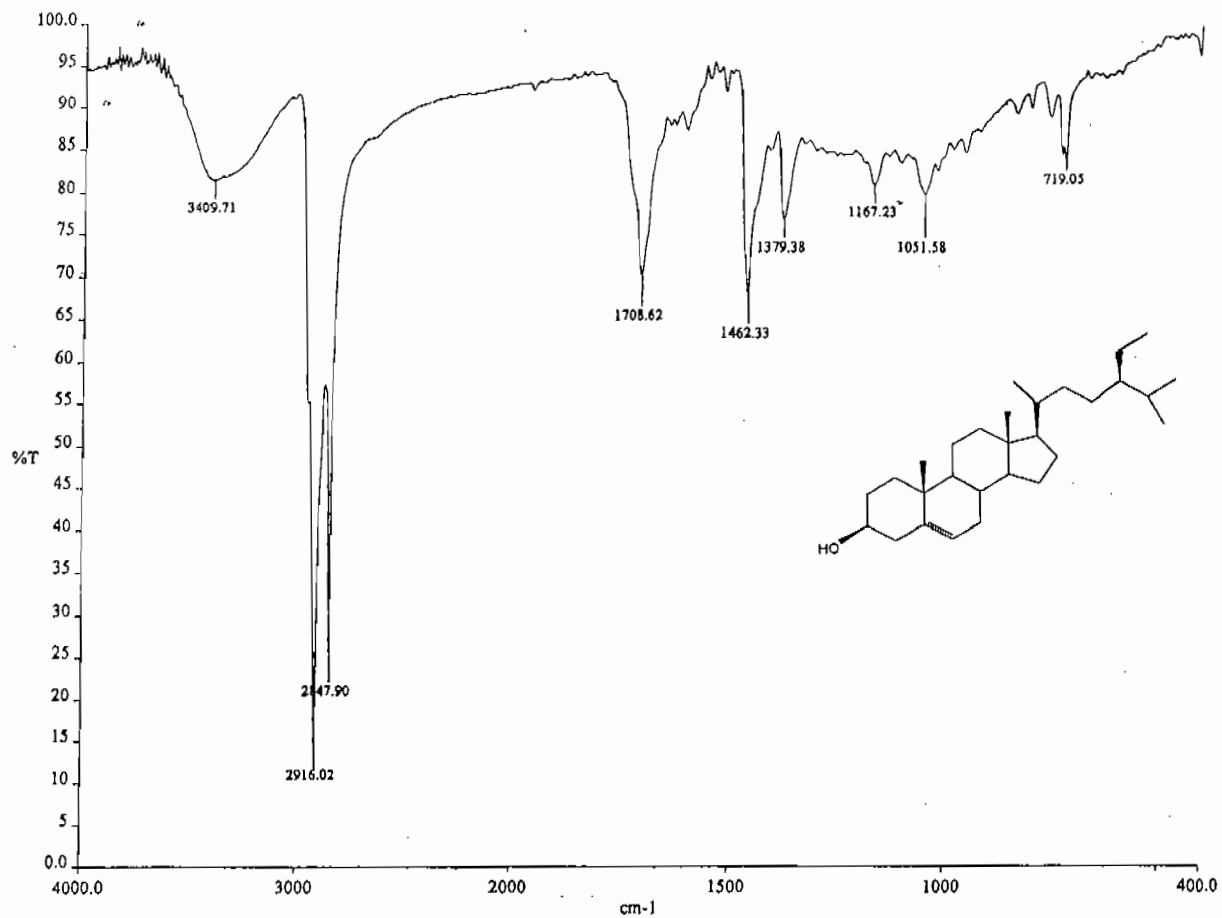


Espectro 5. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de la lup-20(29)-en-3-ona (F3).

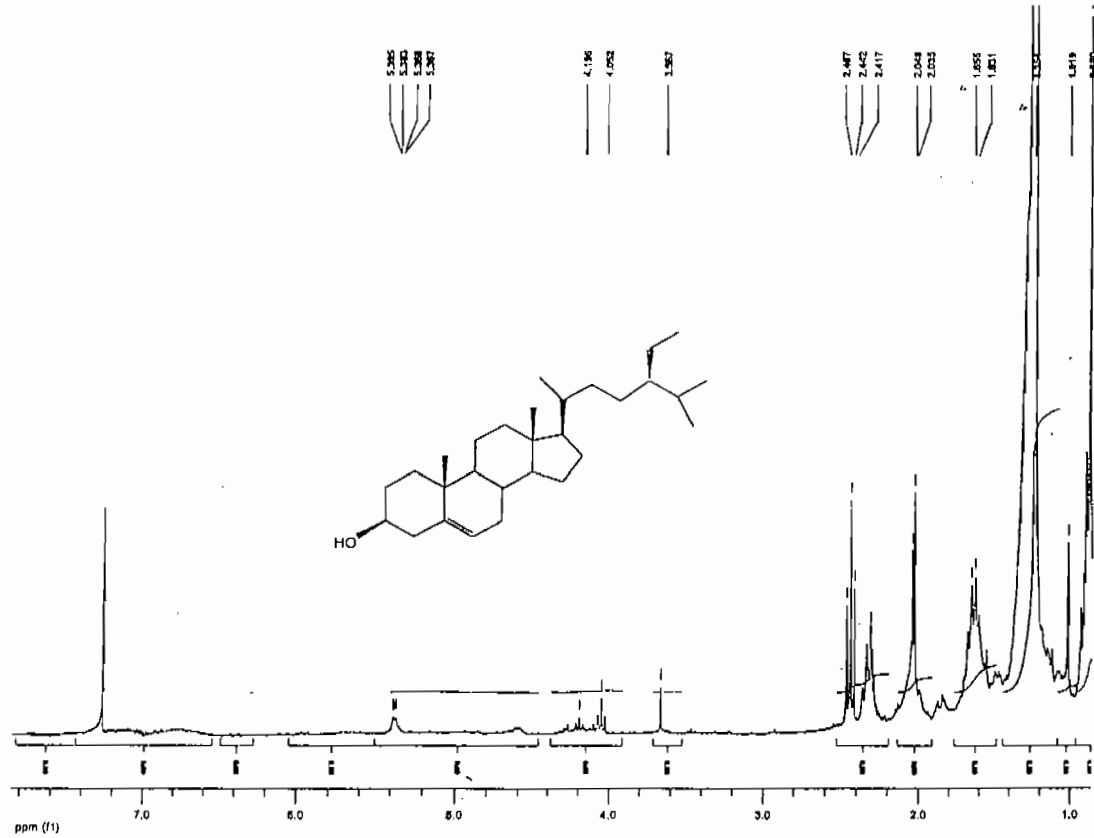
Peak True - sample "OT727_AAR-80-91A:1", peak 12, at 910.141 s (Spec # 8100)



Espectro 6. Espectro de masas de la lup-20(29)-en-3-ona (F3).

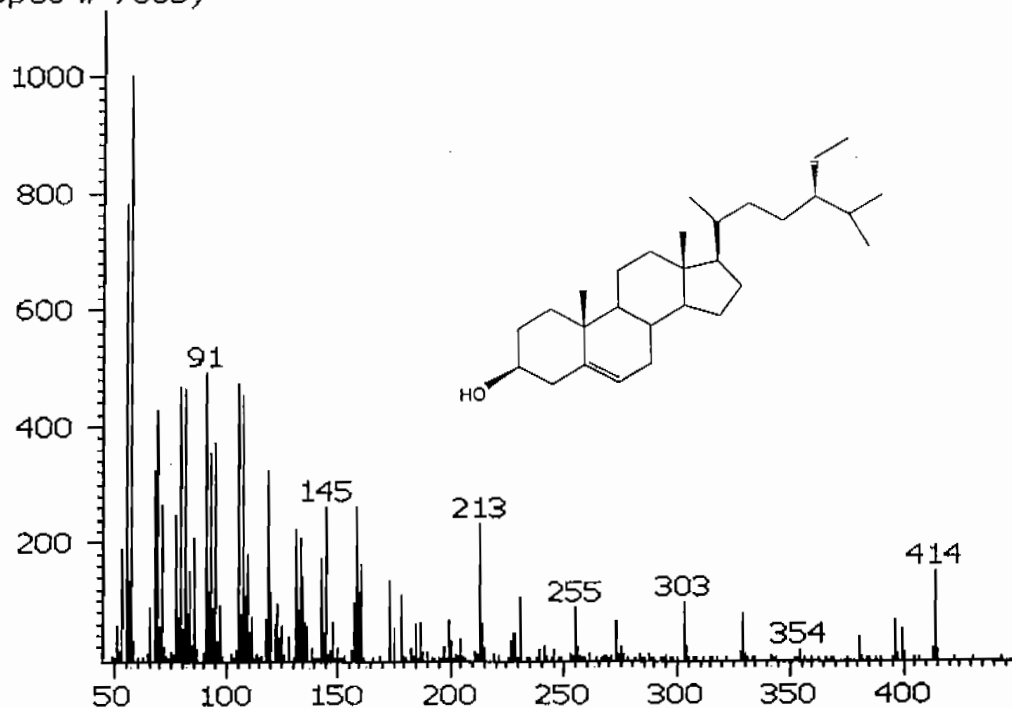


Espectro 7. Espectro en el IR (película) del β -sitosterol en mezcla con ácidos grasos. (F6)

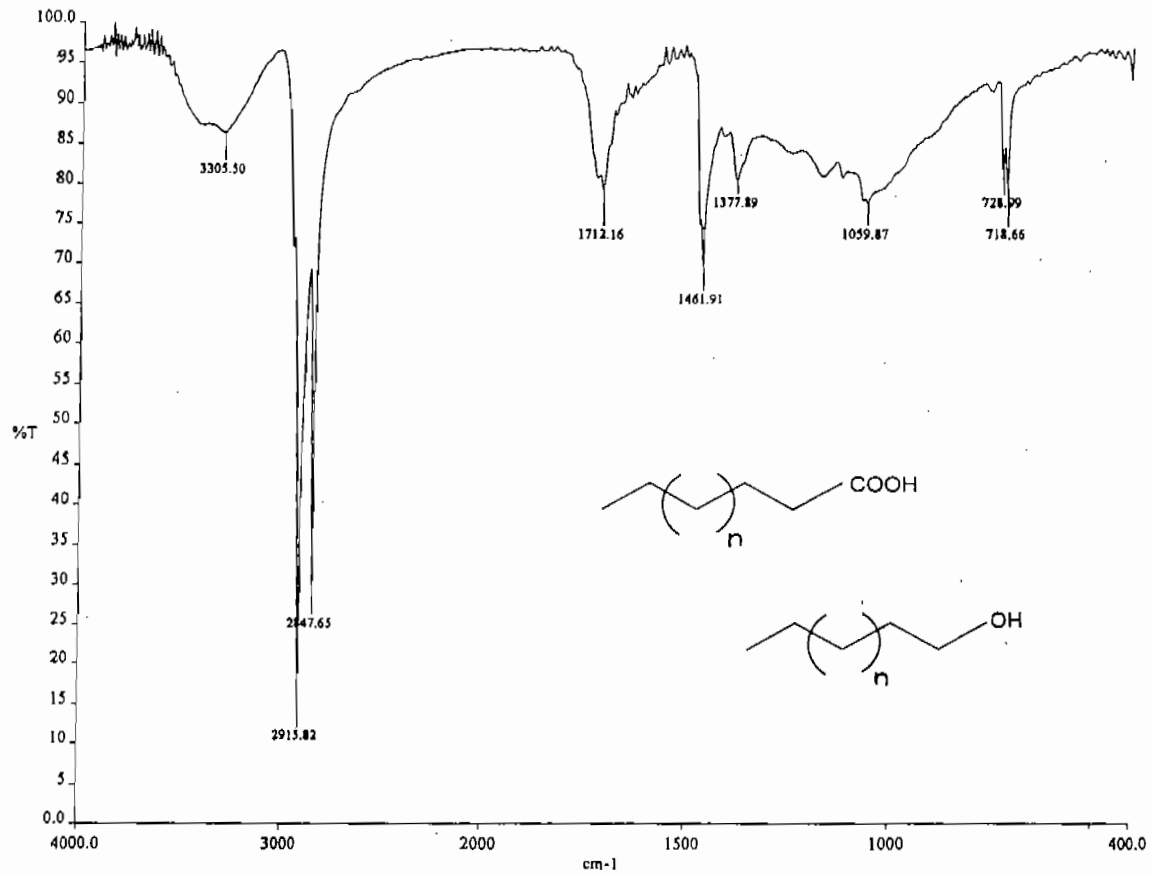


Espectro 8. Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) del β -sitosterol en mezcla con ácidos grasos. (F8)

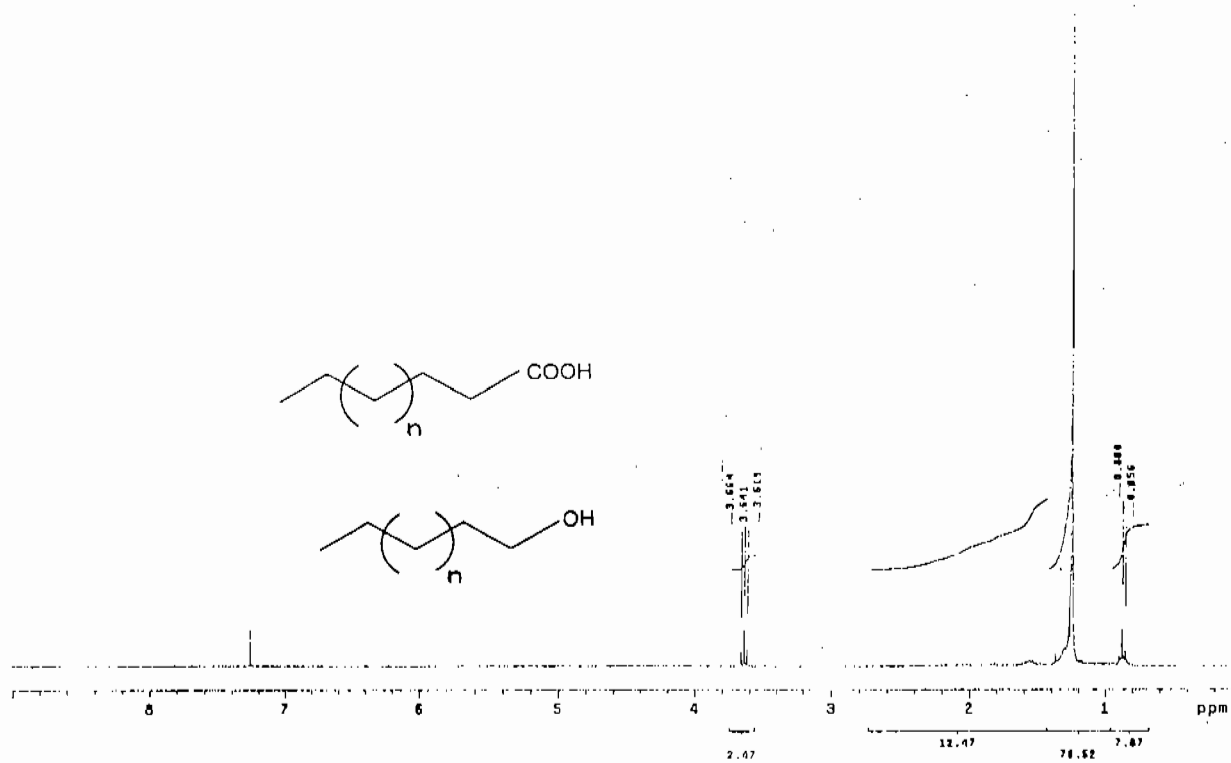
Peak True - sample "OT731_AAR-187-223:1", peak 17, at 886.44 s (Spec # 7863)



Espectro 9. Espectro de masas del β -sitosterol. (F6)

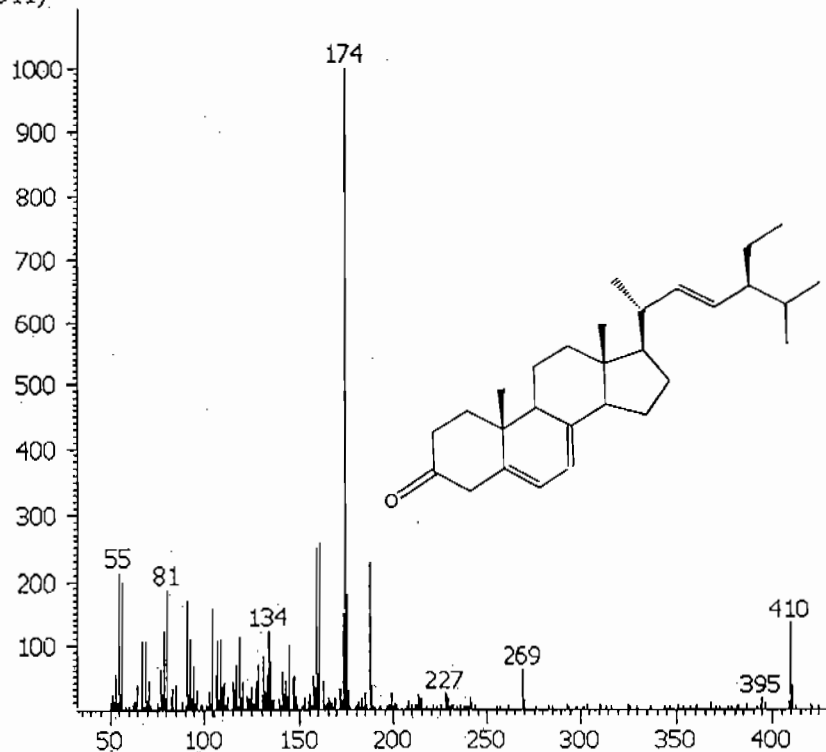


Espectro 10. Espectro en el IR (película) de una mezcla de ceras y ácidos grasos sin molhar (F5).



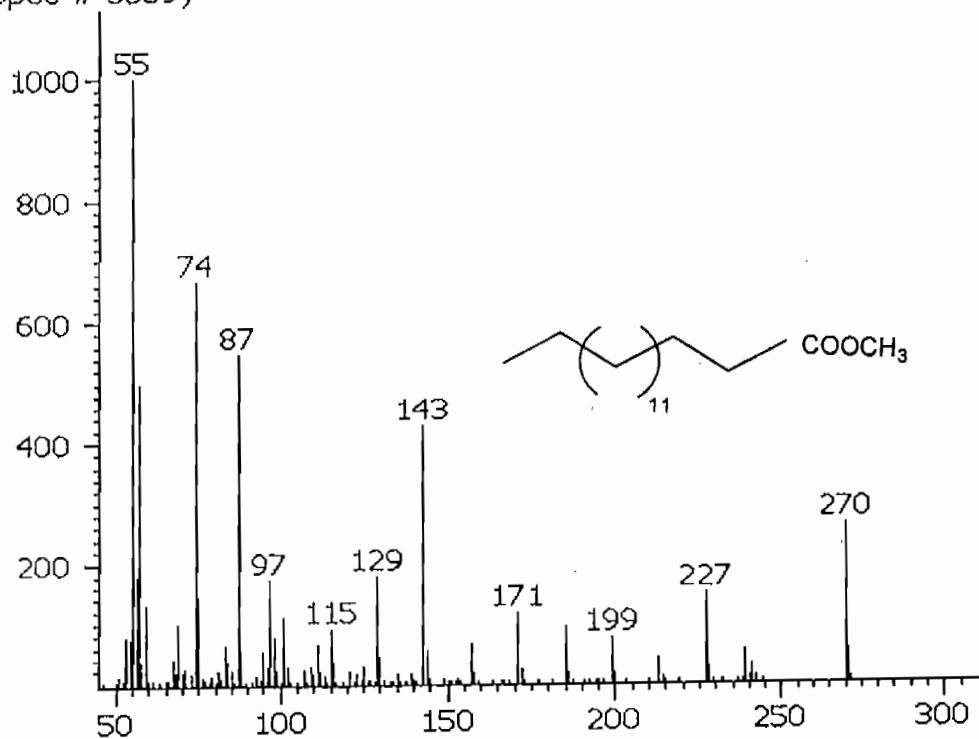
Espectro 11. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de mezcla de ceras y ácidos grasos sin metilar (F5).

Peak True - sample "OT703_AAR-110-130:1", peak 7, at 791.256 s (Spec # 6 911)



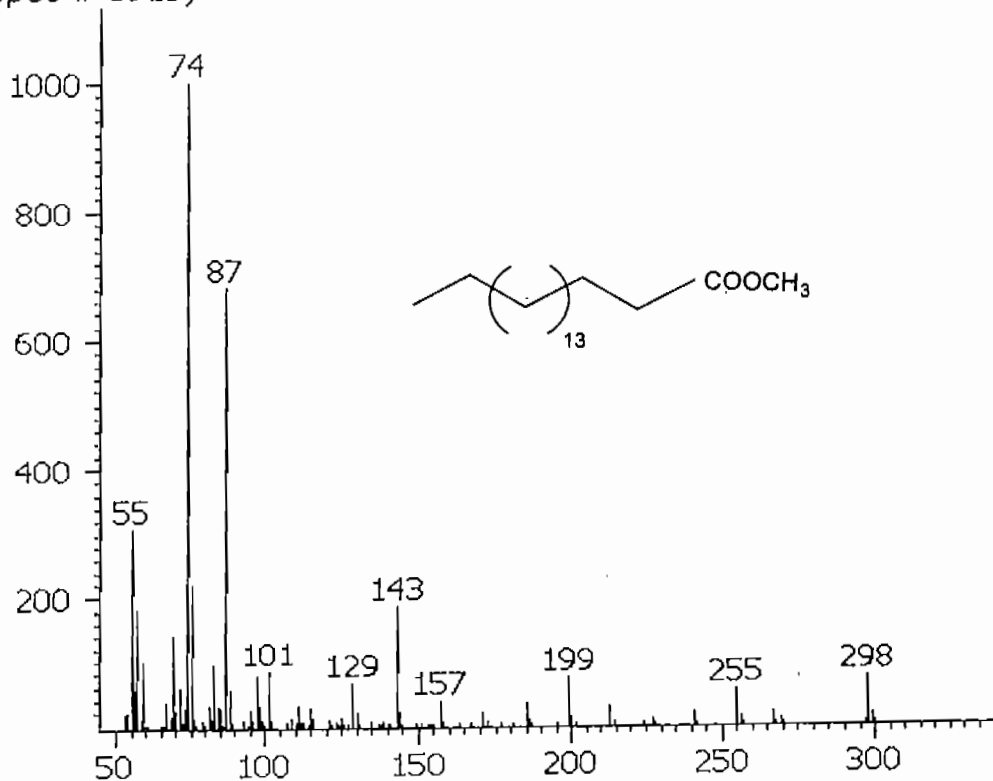
Espectro 12. Espectro de masas de la 5,7-estigmastadien-3-ona. (F4)

Peak True - sample "OT704_AAR-131-223:1", peak 4, at 436.056 s (Spec # 3359)



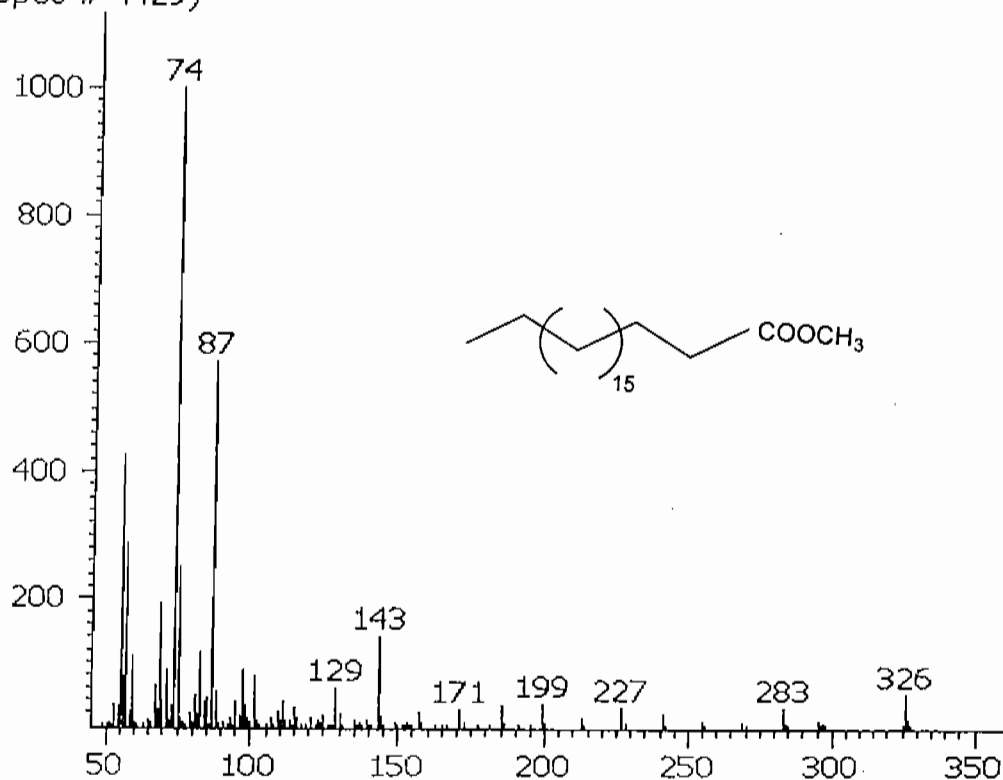
Espectro 13. Espectro de masas del éster metílico del ácido hexadecanoico. (F1, F5, F6)

Peak True - sample "01/04_AAR-131-223:1", peak 6, at 491.456 s (Spec # 3913)



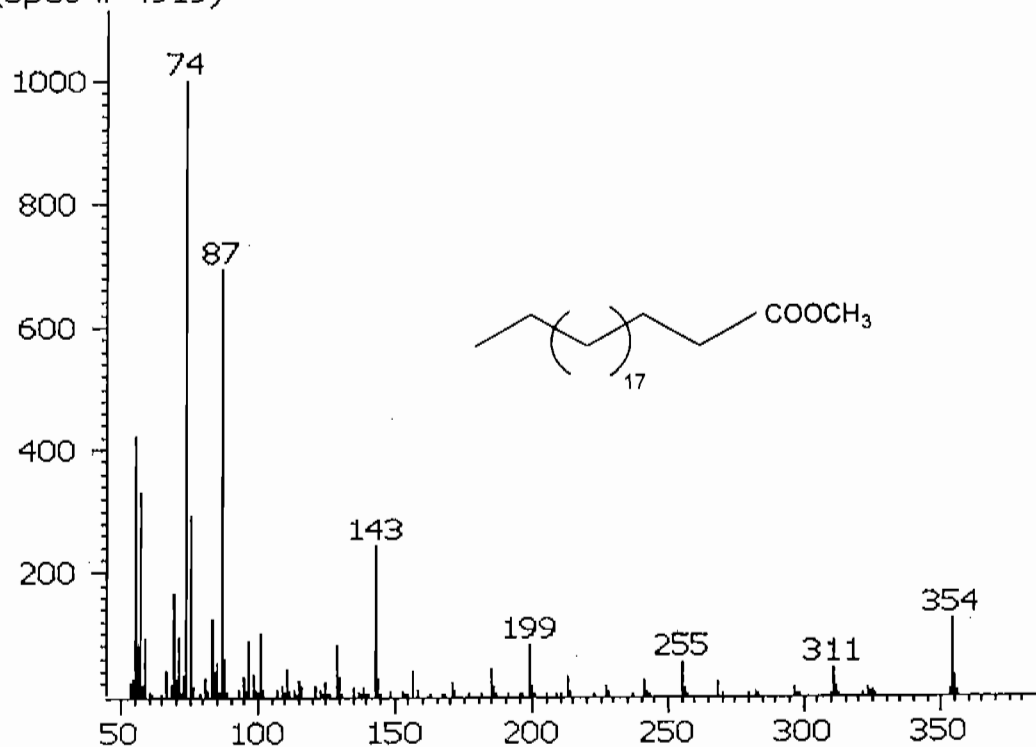
Espectro 14. Espectro de masas del éster metílico del ácido octadecanoico. (F5)

Peak True - sample "OT704_AAR-131-223:1", peak 8, at 543.056 s (Spec # 4429)



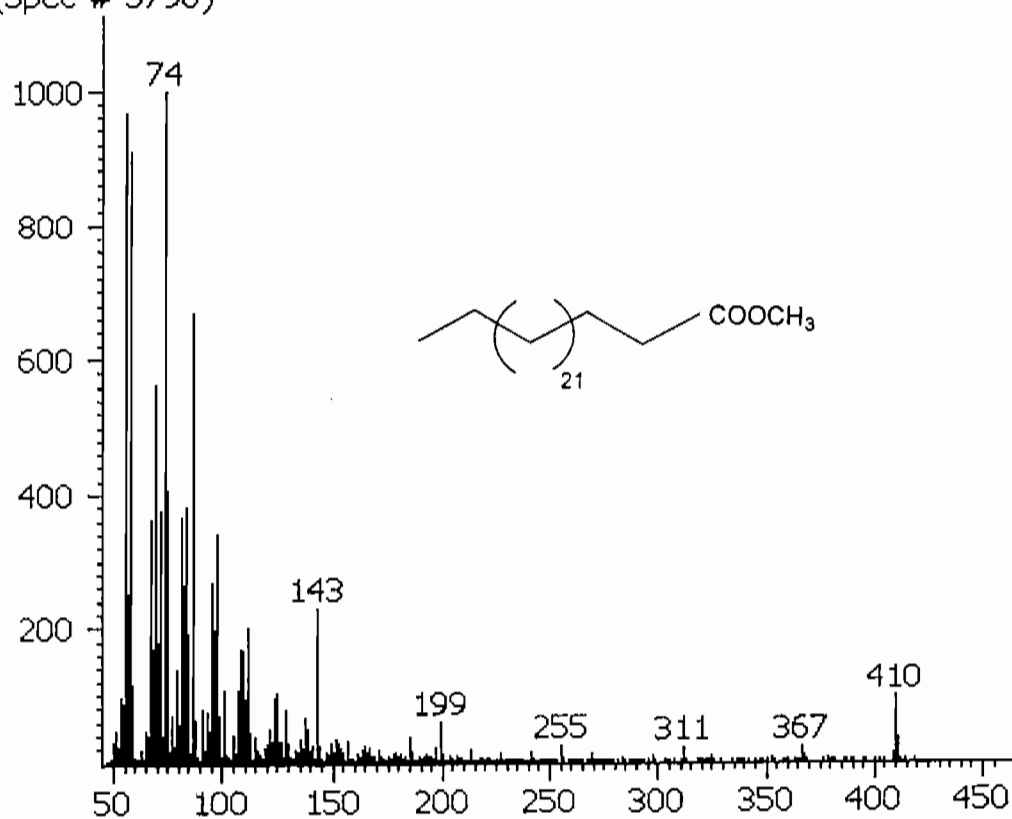
Espectro 15. Espectro de masas del éster metílico del ácido eicosárico. (F5)

Peak True - sample "OT704_AAR-131-223:1", peak 10, at 592.056 s
(Spec # 4919)



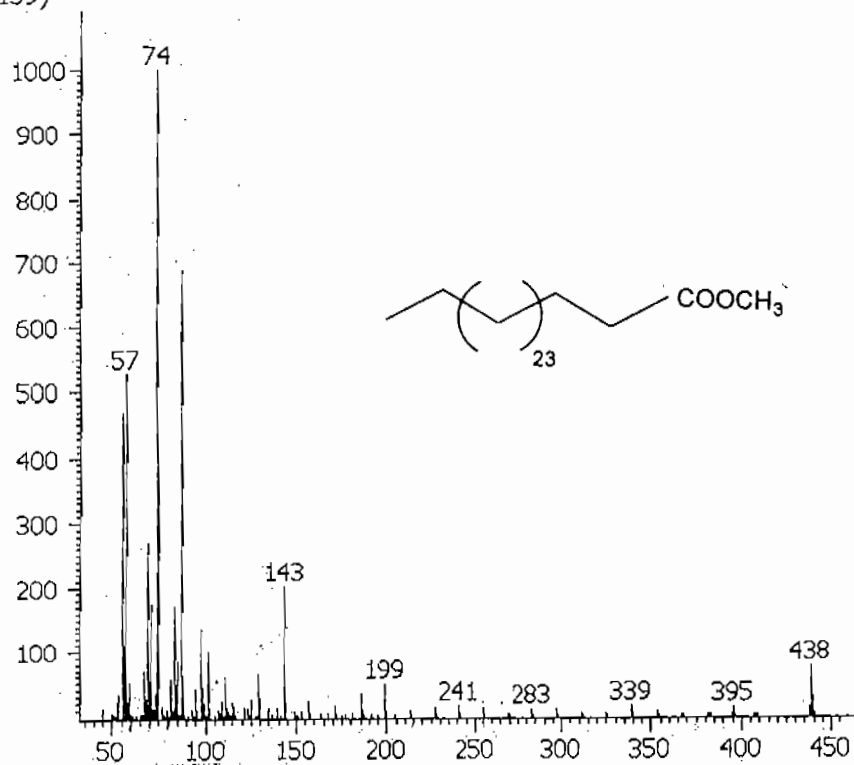
Espectro 16. Espectro de masas del éster metílico del ácido docoecosanoico. (F5)

Peak True - sample "OT704_AAR-131-223:1", peak 14, at 679.156 s
(Spec # 5790)



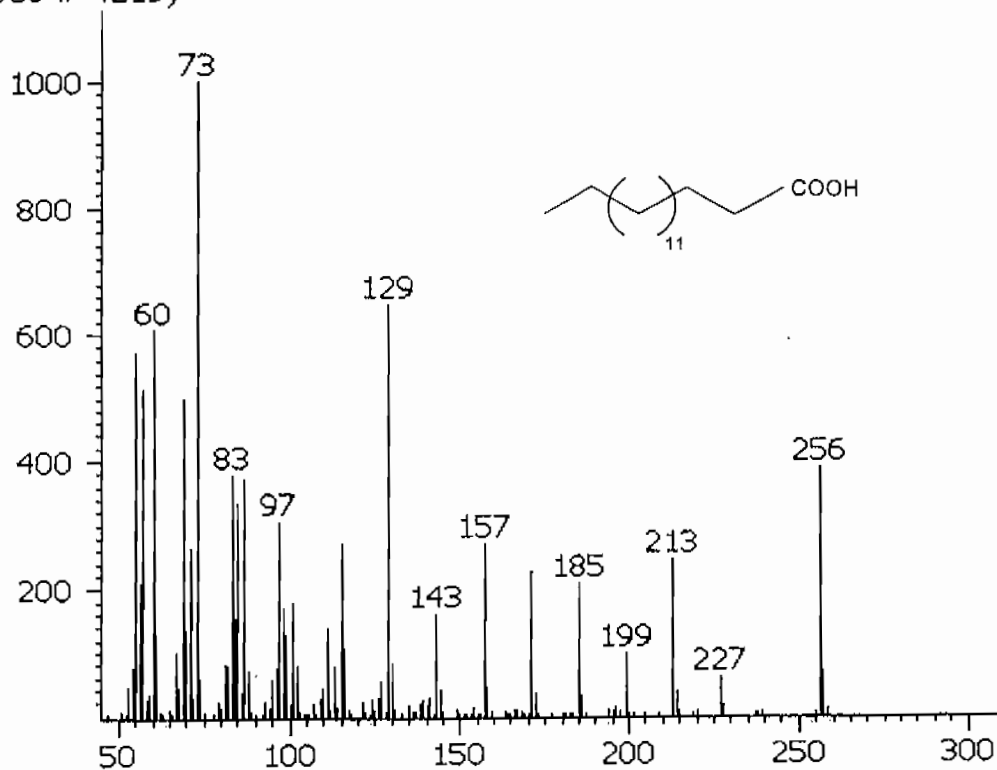
Espectro 17. Espectro de masas del éster metílico del ácido hexacosanoico. (F2, F5)

Peak True - sample "OT703_AAR-110-130:1", peak 6, at 716.056 s (Spec # 6
159)



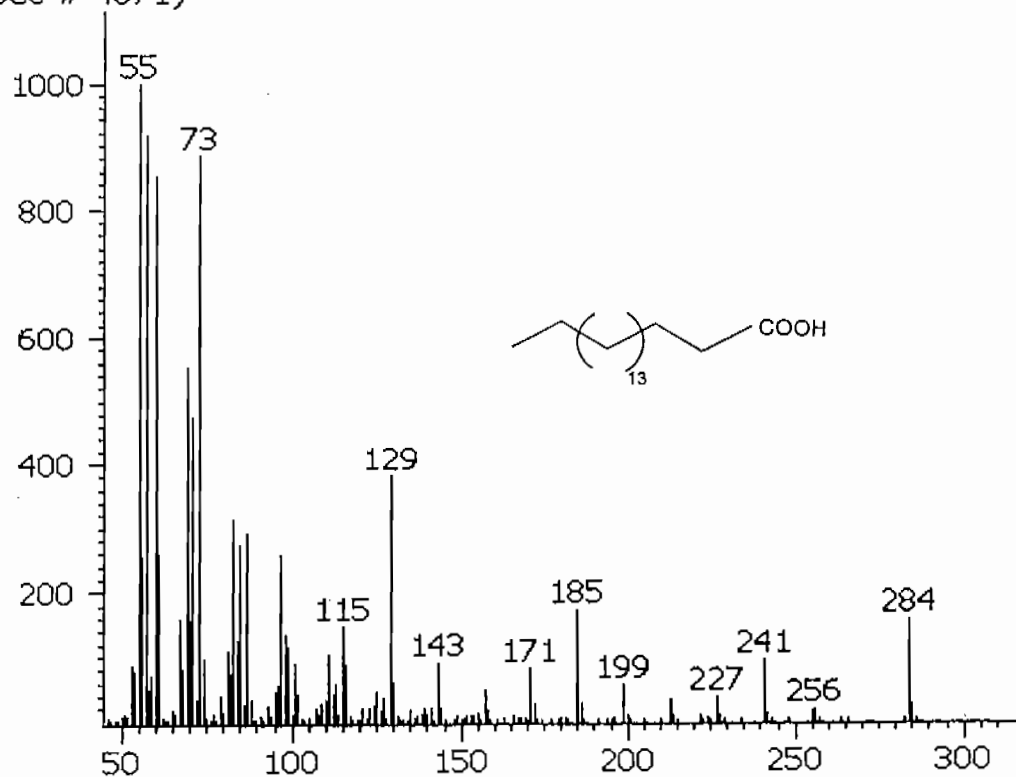
Espectro 18. Espectro de masas del éster metílico del ácido octaelcosanolico. (F4)

Peak true - sample "01/31_AAK-18/-223:1", peak 5, at 522.04 s (S pec # 4219)



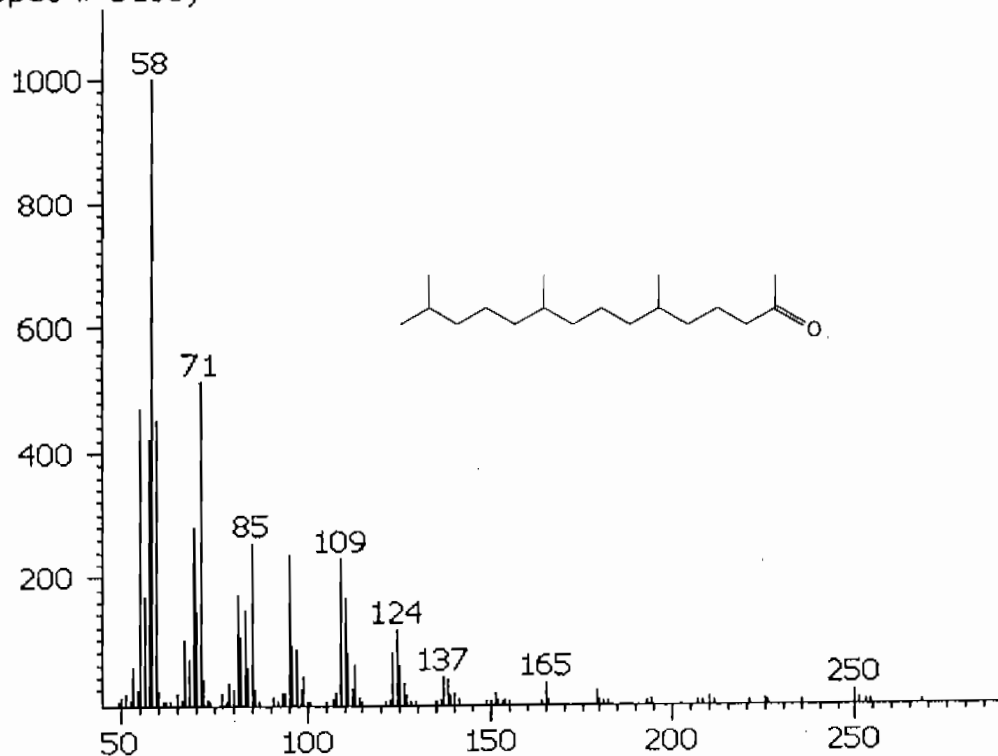
Espectro 19. Espectro de masas del ácido hexadecanoico. (F1, F6)

Peak True - sample "OT731_AAR-187-223:1", peak 6, at 567.24 s (S pec # 4671)



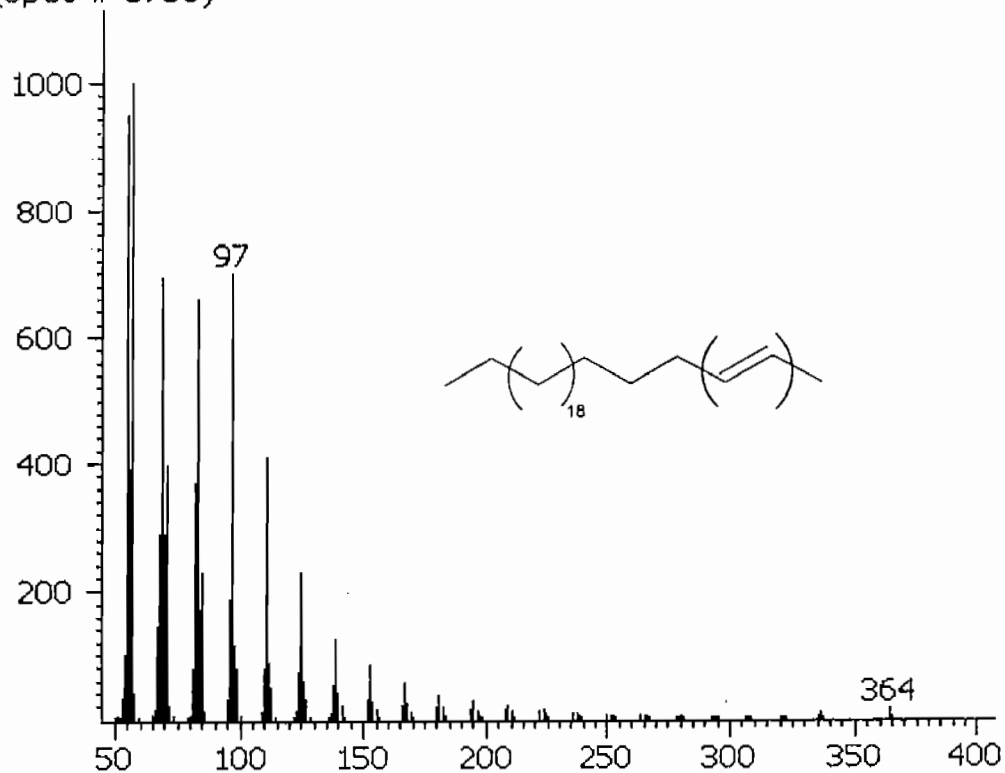
Espectro 20. Espectro de masas del ácido octadecanoico. (F6)

Peak True - sample "OT704_AAR-131-223:1", peak 2, at 410.156 s (Spec # 3100)



Espectro 21. Espectro de masas del 6,10,14- trimetil-2-pentadecanona. (F1, F2, F3, F5)

Peak True - sample "OT704_AAR-131-223:1", peak 13, at 673.756 s
(Spec # 5736)



Espectro 22. Espectro de masas del hexaelcoseno (F5)