



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Facultad de Ciencias Naturales

Estudio químico biodirigido y evaluación de la actividad antimicrobiana
in vitro de *Jatropha dioica* Sessé ex Cerv

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias - Recursos Bióticos

Presenta:

Biól. AXINI SÁNCHEZ GREGORIO

Dirigido por

Director Dra. Guadalupe Xochitl Malda Barrera

CoDirector Dr. Víctor Manuel Navarro García

Santiago de Querétaro, Qro., Junio 2012



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Facultad de Ciencias Naturales

Estudio químico biodirigido y evaluación antimicrobiana *in vitro* de
Jatropha dioica Sessé ex Cerv

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencias

Presenta:

BIÓL. AXINI SÁNCHEZ GREGORIO

Dirigido por Dra. Guadalupe Xochitl Malda Barrera

CoDirector Dr. Victor Manuel Navarro García

SINODALES

Dra. Guadalupe Xochitl Malda Barrera
Presidente

Dr. Víctor Manuel Navarro García
Secretario

Dr. Oscar Ricardo García Rubio
Vocal

Oscar R. García

Dra. Teresa García Gasca
Suplente

M. en C. Patricia Álvarez Fitz
Suplente

Biol. Teresa García Gasca
Director de la Facultad

Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Agradecimientos

A CONACYT con la beca para el CVU 289303 de la Maestría en Recursos Bióticos.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social y al Dr Jaime Tortoriello García por aceptarme en el Centro de Investigación Biomédicas del Sur, Xochitepec, Morelos, lo cual fue crucial para la realización de este trabajo de investigación.

Al Dr. Víctor Manuel Navarro García por abrir las puertas de su laboratorio a una estudiante totalmente desconocida de quien sólo había recibido un correo solicitando ayuda, la cual fue brindada siempre acompañada con mucho concomimiento, paciencia y sobre todo amistad.

A el Dr. Alejandro Zamilpa Alvarez quien a pesar de estar siempre bien ocupado, aceptó cambiar varias horas de la comida para ayudarme y asesorarme en la cuantificación de los compuestos.

Y sobre todo a la M en C. Patricia Alvarez Fitz quien además de enseñarme con mucha paciencia y apoyarme en todos los sentidos durante mi estancia en el CIBIS, me brindó por sobre todo su amistad, haciendo mi estancia mucho más agradable y significativa en Xochitepec, Morelos.

También agradezco muy ampliamente el apoyo del Dr. Oscar García Rubio, amigo incondicional quien me apoyó en los momentos más difíciles de la maestría incluso cuando pensaba desistir siempre me ayudó a no perder de vista el objetivo y me animó a continuar.

Agradezco a la Dra Guadalupe Malda Barrera y el Dr. Robert Jones quienes me apoyaron administrativamente a pesar de varios obstáculos en todo lo relacionado a la estancia de investigación en el Centro de Investigación Biomédicas del Sur y durante la maestría.

Al Biól. Jaime Ángeles Ángeles quien me apoyó en algunos trámites importantes de la maestría y a la Dra. Tere Gasca por sus importantes aportaciones.

Sin olvidar mencionar a mis colegas y amigos Alfonso Álvarez, Marco Moreno y nuevamente a Oscar García quienes me ayudaron a coleccionar el material con el cual realicé esta investigación.

Agradecimientos muy sinceros a la Dra. María Yolanda Ríos Gómez de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y a su grupo de trabajo quienes elucidaron los compuestos purificados.

Y al final, pero siempre al principio, muchas gracias a mi familia y al Ing. Aldo Téllez, quienes en todo momento estuvieron apoyándome y animándome durante mi estancia en el CIBIS y durante toda la maestría.

Dedicatoria

A mi familia, pero principalmente a mis padres Andrés Sánchez y Teresa Gregorio, que con esfuerzos y cariño me han brindado incondicionalmente su apoyo, cariño, educación, recursos económicos y su amistad a lo largo de mi vida.

Gracias a ellos tuve esta maravillosa oportunidad de aprender sobre la biología y darle este emocionante curso a mi vida.

A Aldo Téllez por ser un excelente compañero y por todo el apoyo que me ha brindado.

A todas las personas que con su ejemplo, apoyo y cariño renovaban mis fuerzas e inquietudes necesarias para terminar esta etapa de mi vida.

i. Resumen

Las enfermedades infecciosas representan un problema importante de salud y son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. *Jatropha dioica* (sangregado) es una especie ampliamente conocida en México y utilizada tradicionalmente para el tratamiento de padecimientos asociados a microorganismos. En este estudio se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos y de diclorometano de rizomas y tallos de plantas colectadas en el municipio de Cadereyta y Querétaro. Se realizó un fraccionamiento sistemático y biodirigido del extracto de diclorometano utilizando técnicas cromatográficas y bioautografía. Se obtuvieron fracciones y compuestos puros los cuales fueron probados utilizando el método de dilución seriada en agar contra microorganismos con importancia médica: *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus albus*, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Aspergillus niger* y se determinó su Concentración Mínima Inhibitoria (MIC). Finalmente se hizo una cuantificación por HPLC de los compuestos activos para comparar las concentraciones por tipo de tejido y lugar de colecta.

Los valores del MIC muestran que los extractos de diclorometano y metanol de *J. dioica* presentan actividad antifúngica importante, que los rizomas son más activos que los tallos y que los extractos de diclorometano son más activos que los metanólicos contra los dermatofitos ensayados. Se lograron purificar los compuestos AxV1, AxV2, Citlaltirione y β -Sitosterol. El compuesto AxV1 presentó actividad antimicrobiana *in vitro* contra el dermatofito *Trichophyton rubrum* (0.050 μ g/ml) y contra *Aspergillus niger* (200 μ g/ml), así como contra las bacterias Gram + *Staphylococcus aureus* (100 μ g/ml) y *Salmonella typhi* (100 μ g/ml). El compuesto AxV2 presentó actividad contra *Trichophyton rubrum* a 200 μ g/ml.

Las pruebas de cuantificación de los compuestos con actividad antimicrobiana AxV1 y AxV2 indican que las plantas provenientes de Cadereyta tienen una mayor concentración del compuesto más activo AxV1 que las plantas de Querétaro.

(Sangregado, actividad antimicrobiana, bioautografía, caracterización fitoquímica, técnicas cromatográficas).

ii. Summary

Infectious diseases represent an important health problem and have been considered cause or morbidity and mortality worldwide. *Jatropha dioica* (sangregado) is a species well known in Mexico and traditionally used for treatment of microorganism-associated illnesses. In this study, antimicrobial activity of methanolic and dichloromethane extracts from rhizome and stems of plants collected in two zones were evaluated. A systematic, biodirected fragmentation of dichloromethane extract was complete using chromatographic and bioautographic techniques. Fractions and isolated compounds obtained which were tested using agar serial-dilution method against important medical microorganisms: *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* and *Aspergillus niger* and Minimum Inhibitory Concentration was determined. Finally, an HPLC quantification of active compounds was carrying out to compare concentrations by tissue and plants collect area.

MIC values show methanol and dichloromethane extracts from *J. dioica* have an important antifungal activity, rhizomes are more active than stems and dichloromethane extracts are more active than methanolic against essayed dermatophytes.

AxV1, AxV2, Citlaltirone and β -Sitosterol compounds were purified. AxV1 compound show in-vitro activity against *Trichophyton rubrum* dermatophyte (0.050 μ g/ml) and against *Aspergillus niger* (200 μ g/ml), also against *Staphylococcus albus* (100 μ g/ml) y *Salmonella typhi* (100 μ g/ml) Gram+ bacterias. AxV2 compound showed activity against *Trichophyton rubrum* at (200 μ g/ml).

Cuantification tests of antimicrobial-activity compounds AxV1 and AxV2 show that plants collected from Cadereyta have a greater concentration of most active compound AxV1 than plants from Queretaro.

(Sangregado, antimicrobial activity, bioautography, phytochemical characterization, chromatographic techniques).

Índice de contenidos

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1. Enfermedades infecciosas.....	2
2.2. Enfermedades de origen microbiano con importancia médica en México.....	2
2.3. Agentes causantes de enfermedades infecciosas	4
2.3.1. <i>Escherichia coli</i>	4
2.3.2. <i>Salmonella typhi</i> (<i>Salmonella</i> entérica serovariente <i>typhi</i>)	5
2.3.3. <i>Streptococcus faecalis</i>	5
2.3.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.3.5. <i>Dermatofitos: Trichophyton mentagrophytes</i> y <i>T. rubrum</i>	8
2.3.6. <i>Candida albicans</i>	9
2.3.7. <i>Aspergillus niger</i>	10
2.4. Procesos infecciosos	10
2.5. Tratamiento.....	13
2.6. Nuevas fuentes de antibióticos	14
2.7. Acumulación de metabolitos secundarios en las plantas.....	14
2.8. El género <i>Jatropha</i>	15
2.9. <i>Jatropha dioica</i> o sangregado.....	16
2.10. Técnicas para el estudio de compuestos con actividad antimicrobiana.....	19
2.10.1. Extracción.....	19
2.10.2. Cromatografía.....	19
2.10.3. Espectroscopía	21
2.11. Técnicas de determinación de actividad antimicrobiana	22
2.11.1. Método de difusión.....	22
2.11.2. Método de dilución.....	22
2.11.2.1. Concentración Mínima Inhibitoria	22
2.11.3. Método bioautográfico	23
2.12. Fraccionamiento biodirigido	23
3. Justificación.....	25
4. Hipótesis	26
5. Objetivos.....	26
5.1. Objetivos particulares	26
6. Materiales y método	27
6.1. Obtención del material biológico	27
6.1.1. Sitios de colecta.....	27
6.1.2. Colecta del material biológico.....	28
6.1.3. Caracterización y deshidratación del material biológico.....	28

6.2. Obtención de extractos metanólico y de diclorometano.....	30
6.3. Fraccionamiento biodirigido del extracto de diclorometano.....	31
6.3.1. Columna <i>Jatropha dioica</i> 1 (CJd1).....	33
6.3.2. Columna <i>Jatropha dioica</i> 2 (CJd2).....	34
6.3.2.1. Compuesto AxV1 de la columna CJd2.....	35
6.3.3. Columna <i>Jatropha dioica</i> 3 (CJd3).....	35
6.3.3.1. Compuesto AxV1 de la columna CJd3.....	36
6.3.3.2. Compuesto AxV2 de la columna CJd3.....	36
6.3.3.1. Compuesto AxV3 de la columna CJd3.....	36
6.3.4. Columna <i>Jatropha dioica</i> 4 (CJd4).....	37
6.3.4.1. Compuesto AxV4 de la columna CJd4.....	38
6.3.5. Columna <i>Jatropha dioica</i> 5 (CJd5).....	38
6.3.6. Columna <i>Jatropha dioica</i> 6 (CJd6).....	39
6.4. Detección de la actividad antimicrobiana. Técnica de Bioautografía.....	40
6.5. Evaluación antibacteriana y anticandidiásica.....	42
6.6. Evaluación antifúngica.....	43
6.7. Cuantificación de Axv1 y AxV2 y comparación en diferentes extractos por HPLC.....	43
7. Resultados.....	46
7.1. Caracterización del material biológico.....	46
7.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana con la técnica de doble dilución en placa a nivel extracto.....	47
7.2.1. Extractos metanólicos.....	47
7.2.2. Extractos de diclorometano.....	48
7.3. Rendimiento columnas.....	49
7.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de diclorometano.....	50
7.5. RMN de los compuestos purificados.....	52
7.5.1. Compuesto AxV1.....	52
7.5.2. Compuesto Axv2.....	52
7.5.3. Compuesto AxV3.....	53
7.5.4. Compuesto Axv4.....	53
7.6. Cuantificación de los compuestos AxV1 y AxV2 purificados.....	54
8. Discusiones.....	56
9. Conclusiones.....	60
10. Perspectivas.....	61
11. Bibliografía.....	62
12. Anexo.....	72

Índice de figuras

2.1. Características de <i>Jatropha dioica</i> o sangregado.	16
2.2. Estados que registran el uso etnobotánico de <i>J. dioica</i>	17
2.3. Fraccionamiento biodirigido	24
6.1. Localización de las dos áreas de colecta de <i>J. dioica</i> , para el estudio químico biodirigido y evaluación antimicrobiana.	28
6.2. Esquema de las mediciones de las plantas colectadas para su caracterización. Total: longitud total de la planta, T: tallo, R: rizoma, D: Distal, C: central.....	29
6.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos metanólico y de diclorometano.	30
6.4. Esquema del fraccionamiento del extracto de diclorometano.	33
7.1. Compuesto AxV1 purificado en la fracción CJd2F25.	52
7.2. Compuesto AxV2 purificado en la fracción CJdF46.	52
7.3. Citlaltirione C ₂₀ H ₂₆ O ₄ : compuesto purificado en la fracción CJd3-F85.	53
7.4. β-Sitosterol	53
7.5. Cromatograma de las 18 fracciones más representativas de las 919 fracciones obtenidas de las 6 columnas utilizadas para el fraccionamiento del extracto de diclorometano de <i>Jatropha dioica</i>	54

Índice de Tablas	
2.1. Infecciones nosocomiales y agentes relacionados.....	4
2.2. Padecimientos micóticos y agentes principales asociados	9
6.1. Categorías de tipos de tejido y clasificación por el color del látex de las colectas de las dos localidades	29
6.2. Características de las columnas y sistema eluyente utilizados.....	32
6.3. Rendimiento columna <i>J. dioica</i> 1 (CJd1)	34
6.4. Rendimiento columna <i>J. dioica</i> 2 (CJd2)	35
6.5. Rendimiento columna <i>J. dioica</i> 3 (CJd3)	37
6.6. Rendimiento columna <i>J. dioica</i> 4 (CJd4).	37
6.7. Rendimiento columna <i>J. dioica</i> 5 (CJd5)	38
6.8. Rendimiento columna <i>J. dioica</i> 5 (CJd5)	39
6.9. Fracciones probadas por bioautografía para detectar al actividad antimicrobiana ..	41
6.10. Cepas de microorganismos ensayadas en la técnica de MIC.	42
6.11. Cepas de microorganismos ensayadas en la técnica de MIC.	43
7.1. Plantas colectadas en Cadereyta, Qro y Querétaro, Qro.....	46
7.2. Longitud y diámetro promedio de las plantas completas, rizomas y tallos.....	47
7.3. MIC de los extractos metanólicos	48
7.4. MIC de los extractos de diclorometano	49
7.5. Rendimiento de las columna del fraccionamiento del extracto de diclorometano ..	50
7.6. Evaluación de la actividad antimicrobiana con el método de doble dilución en agar de las fracciones con actividad detectadas por el método de bioautografía.	51
7.7. Cuantificación de los compuestos purificados AxV1 y AxV2.....	55

Abreviaturas:

°C: Grados centígrados

µg: microgramos

¹³C: carbono 13

¹H: Hidrógeno

An: *A. niger*: *Aspergillus niger*

Ca: *C. albicans*: *Candida albicans*

Ce (NH₄)₄ (SO₄)₄·2H₂O): sulfato sérico amoniacal

CJd1: Columna *J. dioica* número 1

CJd2: Columna *J. dioica* número 2

CJd3: Columna *J. dioica* número 3

CJd4: Columna *J. dioica* número 4

CJd5: Columna *J. dioica* número 5

CJd6: Columna *J. dioica* número 6

cm: centímetros

CONAPO: Consejo Nacional Población

Dicloro: diclorometano

DMSO: Dimetil Sulfóxido

E. coli: *Escherichia coli*

EMB: agar-eosina azul de metileno-lactosa-sacarosa para microbiología

F: fracción

g: Gramos

Hex: Hexano

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

J. dioica: *Jatropha dioica*

MIC: Concentración mínima Inhibitoria por sus siglas en inglés

Met: metanol

ml: mililitros

mm: milímetros

nm: nanómetros

QMEX: Herbario Dr. Jerzy Rzedowski de la Universidad Autónoma de Querétaro, México

R%: Rendimiento porcentual calculado como (g*100)/Materia inicial Total.

R²: Regresión

RD₁: Diámetro distal 1 del rizoma (diámetro en la parte más alejada del tallo)

RD₂: Diámetro distal 2 del rizoma (diámetro de la raíz adyacente al tallo)
RD_c: Diámetro central del rizoma (diámetro en la longitud media: longitud D1 a D2/2)
Rf: Relación de Frentes o factor de referencia
Rlh- Qro : Rizoma látex hialino Querétaro
Rlh-Cad: Rizoma látex hialino Cadereyta
Rlr-Cad: Rizoma látex rojo Cadereyta
Rlr-Qro: Rizoma látex rojo Querétaro
RMN: Resonancia Magnética Nuclear
rpm: revoluciones por minuto
s/c: sin cristales
Sa: S. aureus: Staphylococcus aureus
Sf: S. faecalis: Streptococcus faecalis
SM: Espectrometría De Masas
St: S. typhi: Salmonella typhi (Salmonella entérica serovariante typhi)
TD₁: Diámetro distal 1 del talelo (diámetro de la base del tallo)
TD₂: Diámetro distal 2 del rizoma (diámetro de la punta del tallo)
TD_c: Diámetro central del tallo (diámetro en la longitud media: longitud D1 a D2/2)
TLC Cromatografía de Capa Fina por sus siglas en inglés (Thin Layer Chromatography)
Tlh- Qro: Tallo látex hialino Querétaro
Tlh-Cad: Tallo látex hialino Cadereyta
Tlr- Qro: Tallo látex rojo Querétaro
Tlr-Cad: Tallo látex rojo Cadereyta
Tm: T. mentagrophytes: Trichophyton mentagrophytes
Tr: T. rubrum: Trichophyton rubrum
TR: Tiempos de Retención
TTC: cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio
UV: Ultravioleta
VIH/SIDA: Virus de Inmunodeficiencia Humana/ Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
WHO: World Health Organization

1. Introducción

Las enfermedades infecciosas representan un problema importante de salud y son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo (Coto, 2005). En la era de las vacunas, los antibióticos y los progresos científicos, esas enfermedades deberían estar sometidas a control. Sin embargo, existen factores como la marginación y la falta de cobertura de servicios de salud así como el aumento a la resistencia microbiana ante los agentes antibióticos de las últimas tres décadas, que en suma se traduce en un insuficiente control de las enfermedades que siguen causando muertes en la actualidad a un ritmo alarmante (Chopra et al., 1996; Baquero, 1997; WHO 2002; NCID, 2002; Deive, 1979 en Ososki et al., 2002). Ante esta situación, ha aumentado el interés en encontrar nuevos prototipos de agentes antimicrobianos.

Estudios recientes se han enfocado no sólo en el uso etnobotánico de las plantas sino también están dirigidos hacia su importancia en medicina, por sus efectos farmacológicos o quimioterapéuticos y de su potencialidad para desarrollar nuevos medicamentos a partir de sus estructuras (Phillipson, 1994; Adamu, 2005). Por lo que se han dirigido los esfuerzos al estudio de plantas medicinales como fuentes de potenciales agentes con actividad de antimicrobiana (Kumar et. al., 2006). En México existen cerca de 5000 especies de plantas con uso medicinal (Frei et al., 1998) lo que representa una fuente potencial de compuestos medicinales poco explorada.

Este trabajo de investigación presenta una aportación en los conocimientos de los compuestos químicos con actividad antimicrobiana de la planta medicinal *Jatropha dioica* o “Sangregado” por su nombre común, contra cepas de importancia médica en México, apoyando con bases científicas su uso etnobotánico y su potencialidad para obtener nuevos fitomedicamentos a partir de los extractos y compuestos encontrados.

2. Antecedentes

2.1. Enfermedades infecciosas

Las enfermedades infecciosas son la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), sobre un total de 57 millones de muertes ocurridas en el mundo en el 2002, alrededor de 15 millones (25 %), fueron causadas por microorganismos (WHO report 2002; Coto, 2005). Actualmente, las enfermedades infecciosas amenazan los avances obtenidos en salud y esperanza de vida y son consideradas la primer causa de muerte en niños en el mundo ocasionando más de 13 millones de defunciones al año, es decir, una de cada dos muertes en los países en desarrollo (WHO report 2002; Coto, 2005).

Incluso, actualmente existen numerosos estudios enfocados a enfermedades que antes se consideraban sin relación a infecciones, que ahora se sabe que están directamente relacionadas a infecciones crónicas causadas por microorganismos, en particular algunos tipos de cáncer (Forman, 1991; Perwez et al., 2003).

Por otro lado, además de la morbilidad y mortalidad causada por enfermedades infecciosas existen otros factores que han sido estudiados como parte de las consecuencias colaterales de las enfermedades infecciosas, tales como la magnitud del dolor y del sufrimiento individuales provocados por las enfermedades infecciosas, la disminución de las capacidades que pueden ocasionar principalmente en los países en desarrollo, la prevalencia y repetición de los procesos infecciosos y su relación con la incapacidad de asistir a trabajar, el impacto de enfermedades infecciosas que generan graves deformidades o que son causa de mutilación y los daños psicológicos a causa del dolor, la depresión, la vergüenza y angustia (WHO report, 2002).

2.2. Enfermedades de origen microbiano con importancia médica en México

Reportes emitidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que, a nivel global, son seis las enfermedades que causan el 90% de las defunciones por enfermedades infecciosas, entre ellas se encuentran la neumonía, la tuberculosis, las enfermedades diarreicas, el paludismo, el sarampión y más recientemente el VIH/SIDA, las cuales provocan más de la mitad de todas las defunciones prematuras, causando sobre todo la muerte de niños y adultos jóvenes (WHO report 2002).

Las enfermedades de etiología infecto-contagiosa siguen siendo las principales causantes de las muertes de los infantes en México, de hecho, tres de los cinco principales padecimientos que ocasionan las muertes son transmisibles (tipo infecciosas). Un análisis donde se comparan las muertes en 1985 (21.7%) contra 2007 (7.2%) muestra que las muertes por enfermedades infecciosas y parasitarias han disminuido de manera significativa entre los menores de un año, sin embargo sus cifras siguen siendo alarmantes, siendo las muertes por infecciones intestinales las más destacables. En general las enfermedades infecciosas en los menores de un año ocupa el cuarto lugar (CONAPO, 2010).

En la República Mexicana la situación de la mortalidad en las edades preescolares es parecida a la infantil, en 2007, las muertes por enfermedades infecciosas y parasitarias representaron 16%, ubicándolas como la segunda causa de defunción, destacando las infecciones respiratorias (CONAPO, 2010).

En el grupo de niños en edad escolar (5 a 14 años) las muertes por enfermedades infecciosas y parasitarias ocupan el cuarto lugar en niños y la tercera causa en niñas. Mientras que la mortalidad de adolescentes y jóvenes (15 a 24 años) por esta causa, se ubica en cuarto lugar en varones y quinto en mujeres con 4.7 y 6.5% de defunciones. Por otro lado, la estadística muestra que mientras aumenta la edad en la población mexicana las enfermedades infecciosas son desplazadas a los últimos lugares siendo prevalentes nuevamente en las edades más adultas (CONAPO, 2010).

La muerte por enfermedades infecciosas y parasitarias en adultos jóvenes (25 a 44 años) ocupan el cuarto lugar en hombres con un promedio de defunciones de 9.7%, mientras que no aparece dentro de los cinco causas en muertes en este grupo de edad (CONAPO, 2010).

La mortalidad de adultos maduros (45 a 64 años) indica que las muertes por enfermedades infecciosas y parasitarias cobraron el 3.5% del total de muertes en mujeres de este grupo de edad en 2007, mientras que no aparece dentro de las primeras causas de mortalidad en hombres. Finalmente, la mortalidad de adultos mayores (65 años o más) indica que la cuarta causa de muerte son las enfermedades respiratorias crónicas con 9.5% para hombres y 7.6% para mujeres prevaleciendo las enfermedades infecciosas respiratorias (CONAPO, 2010).

Aunque las tendencias y niveles de la mortalidad son diferentes para cada sexo y grupo de edad, las estadísticas de las defunciones registradas muestran que en las últimas dos y media décadas las enfermedades de tipo infecciosas se encuentran entre las cinco principales causas de muerte en México, siendo las enfermedades infecciosas respiratorias e intestinales las más importantes (CONAPO, 2010).

La Tabla 2.1 muestra los resultados de un estudio en Estados Unidos que relaciona las infecciones nosocomiales y los principales agentes aislados.

Tabla 2.1. Infecciones nosocomiales y agentes relacionados

Infecciones nosocomiales		
#	Patógeno	% cepas*
1	Estafilococos coagulasa-negativos	31.3
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	20.2
3	Género <i>Enterococcus</i>	9.4
4	Género <i>Candida</i>	9
5	<i>Escherichia coli</i>	5.6
6	Género <i>Klebsiella</i>	4.8
7	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	4.3
8	Género <i>Enterobacter</i>	3.9
9	Género <i>Serratia</i>	1.7
10	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1.3

*Porcentaje de un total de 20,978 infecciones. Obtenido de Wisplinghoff, 2000.

A continuación se mencionan algunos de los agentes causantes de enfermedades infecciosas con importancia en México.

2.3. Agentes causantes de enfermedades infecciosas

2.3.1. *Escherichia coli*.

Escherichia coli es un bacilo gramnegativo, aerobio facultativo. Forma parte de la flora nativa intestinal pero también es un enteropatógeno, el cual está asociado a múltiples enfermedades incluyendo a la gastroenteritis e infecciones en heridas, vías respiratorias, vías urinarias, aparato digestivo y meningitis. *E. coli* produce procesos inflamatorios y es la bacteria que produce más infecciones en heridas en los hospitales. Cuando hay una perforación intestinal, es la responsable de peritonitis y es la bacteria responsable del 70 a 90% de las infecciones urinarias (Jawetz et al., 2002; Murray, 2009; Romero, 2010). *E. coli* es la causa más común de diarrea en los países en vías de desarrollo y diarrea de leve a moderada-severa en lactantes. Produce un síndrome similar al cólera en adultos y origina la diarrea del viajero y brotes de diarrea en cuneros (Rodríguez-Ángeles, 2002; Romero, 2010).

Los mecanismos patogénicos de *E. coli* son: enteropatógeno, enterotoxigénico, enteroinvasivo, enterocitotóxico, enteroagregativo y difusamente adherente. (Rodríguez-Ángeles, 2002; Muray, 2009; Romero, 2010).

2.3.2. *Salmonella typhi* (*Salmonella* entérica serovariante *typhi*)

Las infecciones provocadas por *S. typhi* son consideradas un problema de salud pública de gran importancia a nivel mundial (Gutiérrez-Cogco, 1996; Quintaes, 2002; Zaidi et al. 2006; Abrescia et al., 2009). Según datos de la EFSA (European Food Safety Authority), *Salmonella spp.* es el primer causante de brotes de toxiinfección alimentaria en la Unión Europea (UE) en los últimos años (EFSA, 2009).

Se estima que cada año se producen entre 16 y 21 millones de infecciones y entre 200,000 y 600,000 muertes por *S. typhi* cada año a nivel mundial (Murray, 2009; Quintaes, 2002; Zaidi et al., 2006). En México se han reportado alrededor de 15 mil casos al año de fiebre tifoidea (Zaidi et al., 2006). La incidencia de la enfermedad es más elevada en niños menores de 5 años y en adultos mayores de 60 principalmente en niños desfavorecidos de los países en vías de desarrollo y un importante incremento en la incidencia de infecciones en pacientes inmunodeprimidos (Gutiérrez-Cogco, 1996; Zaidi et al., 2006; Murray, 2009).

La salmonelosis es causada por bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos. El género *Salmonella* tiene tres especies principales: *S. typhi*, *S. choleraesuis* y *S. enteritidis* y son responsables de infecciones de las cuatro formas de infección que son: gastroenteritis, septicemia, fiebre entérica y colonización asintomática (Murray, 2009).

La mayoría de las infecciones son resultado de la ingestión de alimentos contaminados y de una transmisión directa por vía feco-oral. Una vez ingerida, *Salmonella* se une a la mucosa del intestino delgado y puede colonizar a casi todos los animales (Murray, 2009; Romero, 2010).

2.3.3. *Streptococcus faecalis*

Pertenecen a la Familia Streptococcaceae, son Grampositivos y se han descrito alrededor de 20 especies, siendo las más importantes patógenas para el hombre *Streptococcus pyogenes* del grupo A, *S. agalactiae* del grupo B, *S. faecalis* del grupo D, *S. pneumoniae* y el grupo viridans. (Romero, 2010).

Actualmente denominado *Enterococcus* o *Streptococcus faecalis* junto con *E. faecium*, *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*, son las especies que se aíslan con una mayor frecuencia y que son clínicamente las más importantes, también constituyen frecuentes colonizadores del aparato digestivo del ser humano y revisten importancia porque estas especies muestran una resistencia inherente frente a la vancomicina. (Morfin et al., 1999; Murray, 2009). *Enterococcus faecalis* es el enterococo más común y causa 85 a 90% de las infecciones enterocócicas (Jawetz et al., 2002).

Son cocos gram positivos que no generan ninguna toxina potente, por lo que en general se considera que poseen una limitada capacidad patógena, su virulencia viene mediada por la capacidad de adherirse a las superficies del hospedero tapizando los tejidos intestinales y vaginales y por tener la facultad de secretar enzimas extracelulares con actividad hemolítica y proteolítica (citolisinas y proteasas), que producen una lesión localizada del tejido. Además, en general los estreptococos presentan una resistencia inherente a muchos de los antibióticos empleados normalmente (Murray, 2009).

Los estreptococos producen infecciones caracterizadas por procesos inflamatorios supurativos y no supurativos, incluyendo infecciones urinarias, infecciones de las heridas (sobre todo intraabdominales y en general polimicrobianas), bacterinemia y endocarditis, principalmente en pacientes hospitalizados durante periodos prolongados y que ha recibido antibióticos de amplio espectro (Morfin et al., 1999; Alonso et al., 2009; Murray, 2009; Romero, 2010).

2.3.4. *Staphylococcus aureus*

Pertenecen a la Familia Micrococcacea, son grampositivos, no forman esporas con pilis o flagelos son aerobios y anaerobios facultativos. El género *Staphylococcus* comprende actualmente 32 especies y quince subespecies; las especies de importancia médica son *S. aureus*, *S. epidermis* y *S. saprophyticus* (Romero, 2010). Estos estafilococos conforman un importante grupo de patógenos en el ser humano y originan un amplio espectro de enfermedades sistémicas, que provocan infecciones graves en las heridas, en los tejidos blandos, los huesos y el aparato genitourinario, así como infecciones oportunistas (Rodríguez y Morfín, 1999; Murray, 2009). Además, los estafilococos han desarrollado una rápida resistencia a los antibióticos después de la introducción de la penicilina, en la actualidad una proporción inferior al 10% de las cepas es sensible a ese antibiótico (Murray, 2009).

Staphylococcus aureus es desde el punto de vista de la medicina, la bacteria más importante de este género, que a diferencia de las otras especies, produce coagulasa. La coagulasa es la proteína capaz de coagular al plasma citratado u oxalatado y actúa transformando el fibrógeno en fibrina, formando una capa sobre la bacteria que la protege de la fagocitosis. *S. epidermis* puede infectar la piel, las mucosas y las heridas, y *S. saprophyticus* infecta las vías urinarias (Romero, 2010).

S. aureus es la especie que se asocia con mayor frecuencia a enfermedades en el ser humano. *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) es importante porque produce graves infecciones en pacientes hospitalizados, heridas de intervención quirúrgica y más recientemente en de forma extra-hospitalaria en niños y adultos previamente sanos (Schwalbe et al., 1987; Rodríguez y Morfín, 1999; Murray, 2009; Alonso et al., 2009).

Las principales infecciones ocasionadas por *S aureus* son las lesiones en la piel acompañados de procesos inflamatorios tales como: Impétigos, forúnculos, abscesos; ántrax estafilocócico que es una lesión en la región de la nuca y pénfigo del recién nacido. En el aparato respiratorio: sinusitis, otitis, faringitis, neumonitis y abscesos pulmonares o pleurales. En el aparato digestivo: enterocolitis, abscesos del hígado, peritonitis, intoxicación por alimentos por enterotoxina estafilocócica. En sistema nervioso central: meningoencefalitis, en vías urinarias: cistitis, prostatitis, nefritis, en músculo esquelético: osteomielitis, artritis, miositis; en corazón: endocarditis, miocardis, pericarditis; en tejidos blandos: celulitis, fascitis, abscesos, miosistis; en los ojos conjuntivitis, foliculitis de párpados; y además puede producir septicemias o choque endotóxico (Romero, 2010). Entre los factores de virulencia están: adhesina, coagulasa, lipasa, hialuronidasa, estafiloquinasa, nucleasa, toxina alfa o hemolisina alfa, toxina beta o esfingomilinas, toxina delta o hemolisina delta, toxina gamma o hemolisina gamma, leucocidina, enterotoxinas, exfoliatina y exotoxinas pirógenas. (Murray, 2009; Romero, 2010).

Además es considerado como un importante patógeno alimentario, y la intoxicación estafilocócica es una de las causas más prevalentes de gastroenteritis en el mundo. Según datos de la Autoridad Europea de Sanidad Alimentaria (European Food Safety Authority, EFSA por sus siglas en inglés), *S. aureus* fue el causante del 4,1% de los brotes de infecciones alimentarias acaecidos en 2006 en la Unión Europea (EFSA, 2007).

2.3.5. Dermatofitos: *Trichophyton mentagrophytes* y *T. rubrum*

La dermatofitosis: se refiere a un complejo de enfermedades causadas por algunos hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Trichophyton*, *Epidermophyton* y *Micosporum*. En conjunto a estos hongos se les conocen como dermatofitos los cuales son queratinofílicos, es decir que tienen la capacidad de parasitar los tejidos del huésped humano que contienen queratina, ocasionando patologías crónicas relativamente poco inflamatorias y de difícil curación tanto en el humano como a animales (Murray, 2009; Adejumo y Bamidele, 2009; Romero, 2010).

Los dermatofitos son los microorganismos más importantes que causan micosis superficiales en el hombre, las lesiones son caracterizadas por tener una forma circular, escamación, alopecia y eritema en los bordes (Murray, 2009; Adejumo y Bamidele, 2009; Romero, 2010). De manera global *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* son los causantes de un 90% de las dermatofitosis. (Murray, 2009). Siendo *Trichophyton rubrum* uno de los agentes más importantes y prevalecientes en todas las edades (Arenas, 2002; Rinaldi, 2000 en Hernández et al., 2007). Actualmente en México, constituyen del 70 al 80% de todas las micosis y tienen una frecuencia del 5% en la consulta dermatológica (Arenas et al., 1999; Arenas et al., 2001). Estudios demuestran que *Trichophyton rubrum* es el agente causal hasta en el 80% de los casos (Hernández, 2007).

Trichopyton rubrum genera microconidias piriformes en ambos lados de las hifas. Representa el agente etiológico más frecuente en casi todos los países. Por su parte *Trichopyton mentagrophytes* genera microconidias solitarias en forma de puros o racimos de microconidias esféricas (Murray, 2009).

Las dermatofitosis se conocen con el nombre común de tiñas y pertenecen al grupo de las micosis superficiales. Estas micosis se clasifican en función de su localización y de esta forma reciben el nombre de tinea capitis, tinea cruris, tinea unguis, tinea pedis, tinea corporis, tinea barbae y tinea manum (Romero, 2010), los principales agentes aislados en cada padecimiento se resumen en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Padecimientos micóticos y agentes principales asociados.

Padecimiento micótico	Agente aislado con mayor frecuencia				
	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>E. floccosum</i>	<i>M. canis</i>
Tinea pedis	+	+		+	
Tinea manum		+			
Tinea corporis	+	+	+		
Tinea cruris	+	+	+		
Tinea unguis	+		+	+	
Tinea capitis			+		+

Obtenido de Romero, 2010.

Granuloma tricofítico o dermatofítico: Es una infección por *Trichophyton* que afecta la piel a nivel subepidérmico o más profundo y se presenta en personas con factores de inmunocompromiso e infección crónica por dermatofitos (Romero, 2010).

2.3.6. *Candida albicans*

Se ha determinado que las especies del género *Candida* conforman el grupo más importante de hongos patógenos oportunistas junto con *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*. *Candida albicans* constituye la cuarta causa más frecuente de infecciones nosocomiales septicémicas (adquiridas en el hospital-IS-) y superan a cualquier patógeno gramnegativo individual. Se han descrito más de 100 especies en el género, de las cuales *C. albicans* es la especie aislada con una mayor frecuencia a partir de muestras clínicas (Murray, 2009).

La incidencia anual estimada de micosis invasivas por *Candida* comprende entre 72 y 290 infecciones por millón de personas y se estima que entre un 25 y un 50% de las personas sanas porta microorganismos de *Candida* en la microflora de la cavidad bucal y se reconoce que *C. albicans* predomina en casi todos los tipos de infección (Foxman, 1990; García et al., 2006; Murray, 2009), tanto en personas sanas como en personas con sistema inmunológico disminuido (Sánchez-Vargas 2005).

Candida es el patógeno fúngico más común que causa infecciones endovasculares, tales como sepsis, infecciones en prótesis vasculares e infecciones endocardíticas (Hernández-Cañaverl, 2009). Además es reconocido como el principal agente colonizador del tracto genital femenino y se sabe que aproximadamente el 20% en mujeres sanas son portadoras y este valor es aún mayor en las embarazadas (Foxman, 1990; García et al., 2006). Según estudios de etiología de las infecciones cérvico-

vaginales se han identificado hasta un 86% de aislamiento de *C. albicans*, lo que demuestra su importancia en la salud del aparato (Arechavala et al., 2007).

La candidiasis vaginal aguda afecta a una elevada proporción de mujeres en edad fértil; cerca del 75% cursa al menos un episodio de candidiasis aguda. Es la segunda causa de vulvovaginitis aguda después de la vaginosis bacteriana inespecífica por complejo GAM (*Gardnerella vaginalis*-Anaerobios-Mycoplasma) (Eckert et al., 1998; Buscemi et al 2004).

2.3.7. *Aspergillus niger*

El género *aspergillus* es causante de una micosis oportunista a partir de una infección adquirida mediante penetración del hongo por vía respiratoria, inoculación percutánea o por contacto directo con las esporas (Murray, 2009).

También existen formas de aspergilosis muy localizadas en piel, oídos y ojos, otitis y la aspergilosis pulmonar alérgica que se debe a la inhalación de conidios y genera una alveolitis alérgica, que se traduce en un cuadro tipo asmático y si este cuadro es más severo, se produce fibrosis pulmonar, edema intersticial y vasculitis (Murray, 2009).

La frecuencia de micosis invasivas debido a hongos patógenos oportunistas ha aumentado considerablemente a lo largo de las últimas décadas. Los agentes mejor conocidos causantes de micosis oportunistas son *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*. La incidencia anual estimada de micosis invasivas por *Aspergillus* es de 12 a 34 por millón, en especial se reconoce la capacidad de producir micosis invasivas en pacientes inmunodeprimidos (Blanco, 2002; Murray, 2009).

2.4. Procesos infecciosos

El concepto de infección en términos epidemiológicos significa la penetración, multiplicación e invasión de un agente infeccioso en el cuerpo del hombre o de los animales (Jawetz , 2002; Pardo, 2006).

La Cadena Epidemiológica, es el conjunto de factores (eslabones) e interacción directa que se precisan para que ocurra una enfermedad infecciosa, estos eslabones son: 1) Reservorio del agente causal (agente etiológico infeccioso), 2) Mecanismo de transmisión y 3) Huésped susceptible, bajo la influencia del ambiente exterior. Para que

el proceso infeccioso pueda producirse es indispensable la penetración de los agentes etiológicos en el hospedero y con una patogenicidad que sean capaces de producir la enfermedad (Jawetz 2002; Pardo, 2006).

La cantidad de agentes etiológicos indispensable para provocar un proceso infeccioso oscila de acuerdo con diversos factores como son: la especie, patogenicidad, grado de resistencia del macroorganismo (susceptibilidad) y también la puerta de entrada por la cual penetran estos agentes (Jawetz 2002; Pardo, 2006).

Patogenicidad bacteriana es la capacidad de un microorganismo de producir daño. El grado de patogenicidad se llama virulencia. Los mecanismos generales de patogenicidad de los microorganismos son tres: adhesividad, invasividad y toxigeneidad. (Romero, 2010). Respecto a las puertas de entrada, cada especie de agente etiológico se destaca por la selección específica que internamiento a los huésped y estas son: vías digestiva, vías respiratoria, la piel, el ombligo, vías urinaria y genitales, las glándulas mamarias, las conjuntivas y las vías de entrada artificial El proceso infeccioso pasa por los siguientes estadios: incubación, prodrómico, de manifestación y final (Pardo, 2006).

El estadio de incubación es la fase inicial del proceso y abarca desde el momento en que los agentes etiológicos penetran en el macroorganismo hasta la aparición de los primeros síntomas clínicos de la infección. A menudo este estadio oscila ampliamente alrededor de los valores promedios que dependen de la especie, cantidad y virulencia de los agentes etiológicos, la resistencia del macroorganismo y de acuerdo con la puerta de entrada de los propios agentes (Pardo, 2006).

El estadio prodrómico se caracteriza por síntomas no específicos de la enfermedad como son: la hipertermia (fiebre), el aumento de las frecuencias, de las pulsaciones y de la respiración, anorexia etc. Por regla general corresponde a la fase de penetración de los agentes etiológicos en la sangre, la que los distribuye por el organismo. Es la etapa de generalización y eventualmente la de la creación del complejo primario (Pardo, 2006).

El estadio de manifestación se caracteriza por síntomas clínicos específicos típicos de la enfermedad dada. Este estadio corresponde a la fase de localización de los agentes etiológicos o de sus toxinas en determinados órganos o tejidos del huésped o eventualmente a la fase de la septicemia (los gérmenes todavía pueden multiplicarse en

la sangre). También en este estadio es posible encontrar agentes etiológicos o sus toxinas en el torrente circulatorio, aunque es de señalar que en cantidad gradualmente decreciente (en caso de pasar al estadio de convalecencia) (Pardo, 2006).

Posteriormente, el estadio final es el resultado de la interacción entre los agentes etiológicos y el macroorganismo, en condiciones dadas y cuyos resultados pueden ser la convalecencia cuando tiene lugar la curación clínica que puede producirse en forma repentina (convalecencia crítica) o gradual (convalecencia lítica). En este caso el macroorganismo se deshace del resto de los agentes etiológicos (liberación) o no se deshace de ello y de esa forma es que el macroorganismo se convierte de animal enfermo en portador de los agentes etiológicos (Pardo, 2006).

La clasificación más práctica de las enfermedades infecciosas es la basada en su vía de transmisión (Pardo, 2006).

Enfermedades de transmisión digestiva. En estas enfermedades el agente biológico penetra por el orificio superior del sistema digestivo, por ejemplo al consumir alimentos o agua.

Enfermedades de transmisión respiratoria. Los agentes penetran por las fosas nasales o la boca y atraviesan las distintas barreras defensivas del sistema respiratorio hasta alcanzar los tejidos más susceptibles. Esta transmisión puede ocurrir por la inhalación de agentes microbianos que se encuentran en el aire.

Enfermedades que se transmiten por contacto. En este tipo de transmisión es necesaria una relación física entre el reservorio y el organismo susceptible, incluyendo enfermedades de transmisión sexual, micosis, entre otras.

Enfermedades que se transmiten por vectores. Esta transmisión se produce cuando los artrópodos u otros vectores inoculan al agente causal mediante la picadura o el depósito de este sobre la piel o mucosas del organismo susceptible.

Enfermedades de transmisión desconocida. A este grupo pertenecen las enfermedades donde los conocimientos científicos no han determinado los mecanismos de transmisión.

2.5. Tratamiento

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) o sintetizados por métodos de laboratorio, que actúan suprimiendo el crecimiento de otros microorganismos y pueden eventualmente destruirlos. Estos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano (Calderwood, 1988; Jawetz 1989).

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928 por Fleming y hasta la fecha se han descubierto nuevas herramientas terapéuticas de potencia y especificidad notables para el tratamiento de las infecciones bacterianas (Cordiés, 1998; Brown, 2004). La llamada “Era de Oro” de los antibióticos comenzó en 1941 con la producción de la penicilina a gran escala y su utilización con buenos resultados en ensayos clínicos (Goodman, 1982).

Sin embargo, el éxito de la “era de los antibióticos” se ha visto opacada por factores como la marginación y la falta de cobertura de servicios de salud así como el aumento a la resistencia microbiana ante los agentes antibióticos en las últimas tres décadas, lo cual se traduce en un insuficiente control de las enfermedades que siguen causando muertes en la actualidad a un ritmo alarmante (Chopra et al., 1996; Baquero, 1997, WHO 2002; NCID, 2002; Deive, 1979 en Ososki et al. 2002).

El desarrollo de resistencia en los microorganismos incluye mecanismos como alteraciones, permutación de enzimas, sitio ribosomal o algún otro blanco contra el cual se dirige el antimicrobiano. En algunos casos los agentes adquieren nuevas enzimas o bloquean la entrada del agente antimicrobiano a la célula. Muchas bacterias producen enzimas que activan de manera directa los antibióticos, en otros casos los genes que intervienen se diseminan con facilidad por mecanismos genéticos intrincados (Morfin et al., 1999; OMS, 2001; Wang 2006; Capoor, 2007).

Ante el sistema generalizado del uso de antimicrobianos y antibióticos para el control de las enfermedades de origen infeccioso, el aumento de la resistencia de los agentes infecciosos a los medicamentos de primera línea va desde cero hasta casi 100% y en algunos casos, la resistencia a los fármacos de segunda y tercera línea afecta significativamente el resultado del tratamiento, debido a esta resistencia y la falta de

cobertura de servicios, actualmente existe un gran interés incluso expresado directamente por la OMS para el fomento del desarrollo de nuevos medicamentos y vacunas para encontrar nuevas fuentes de antibióticos siendo las plantas una fuente de ellos (OMS, 2001.)

2.6. Nuevas fuentes de antibióticos

Las plantas han sido utilizadas desde tiempos inmemorables como base del tratamiento y cuidado de varias enfermedades y condiciones fisiológicas usando métodos tradicionales (Nickell, 1959; Hodoshima et al., 2004).

Estudios recientes se han enfocado no sólo en el uso etnobotánico de las plantas sino también están dirigidos hacia su importancia en medicina, por sus efectos farmacológicos o quimioterapéuticos y de su potencialidad para desarrollar nuevos medicamentos a partir de sus estructuras (Phillipson, 1994; Adamu, 2005). Por lo anterior, se han dirigido los esfuerzos al estudio de plantas medicinales como fuentes de potenciales agentes con actividad de antimicrobiana (Kumar et. al., 2006). En México existen cerca de 5000 especies de plantas con uso medicinal (Frei et al., 1998) lo que representa una fuente potencial de metabolitos secundarios con actividad antimicrobianos poco explorada.

2.7. Acumulación de metabolitos secundarios en las plantas

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o para degradar las complejas y obtener las simples. Las plantas, organismos autótrofos, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa.

Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios, se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros (Waterman y Mole, 1994; Wink, 1999).

Las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una

función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios (Waterman y Mole, 1994; Wink, 1999).

Es conocido que la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios en las plantas es regulado en el espacio y tiempo (Wink, 1999) y que es afectado por factores medioambientales abióticos, como la intensidad de luz, minerales del suelo, estrés osmótico generado por sequía y salinidad, así como la estacionalidad (Waterman y Mole, 1994). La medicina tradicional y estudios filogenéticos indican que existen familias y géneros con importantes metabolitos secundarios (Nickell, 1959) como lo es el caso de la familia Euphorbiaceae, la cual es reconocida por tener especies con una gran variedad de diterpenos (Seigler, 1994).

2.8. El género *Jatropha*

El género *Jatropha* pertenece a la familia Euphorbiaceae y comprende cerca de 125 especies. La mayoría de sus especies se distribuyen en América y África, y otros en Arabia y en la región Sur de la India. En estas regiones, la medicina tradicional incluye comúnmente extractos de raíces y tallos de varias especies del género *Jatropha* (McVaugh, 1945).

Diversos estudios reconocen que este género es fuente de varias clases estructurales de diterpenoides, algunos de ellos son biológicamente activos y poseen varias actividades biológicas tales como: antitumoral, citotóxica, promotora de tumores y antimicrobiana (Olafeju et al., 2007). Otros tipos de compuestos encontrados en *Jatropha* son: alcaloides, lignanos y triterpenos (Jensen, 1994; Denton et al., 2001).

Estudios recientes se han enfocado a la caracterización estructural y al análisis de los diterpenoides jatrophanos polifuncionales aislados de varias especies de la familia Euphorbiaceae. Entre estos compuestos se encuentran varios esteroides los cuales han sido considerados como moduladores potentes de resistencia a multidroga (Madureira et al. 2004).

Estos diterpenoides han sido extraídos de especies como *Jatropha podagrica* (Olafeju et al., 2007) y *Jatropha multifida* (Aiyelaagbe, 2000). Se ha estudiado su actividad biológica contra algunas bacterias gram-positivas encontrando inhibición de crecimiento importante, así como estudios del efecto de *J. multifida* ante microorganismos

responsables de infecciones de transmisión sexual en África (Aiyelaagbe et al., 2008). Otros estudios revelan la capacidad de resistencia de *Jatropha elliptica* ante la modificación de agentes microbianos (Marquez et al., 2005). Por otro lado, se ha estudiado la actividad de las jatrofonas de *Jatropha isabelli* como agentes gastroprotectores y su citotoxicidad (Pertino et al., 2007). En México, este género está representado por varias especies, una de ellas *Jatropha dioica* (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

2.9. *Jatropha dioica* o sangregado

Jatropha dioica Cerv. (Sinonimia: *Jatropha spathulata* (Ort.) Muell. Arg, Manzanero-Medina, et al., 2009, Rzedowski y Rzedowski, 2001), es un arbusto o subarbusto de 0.3 a 1.5m de alto. Sus tallos son suculentos, flexibles y con látex incoloro; raíz delgada, leñosa y con látex rojizo. Se encuentra principalmente en matorrales xerófilos de zonas desérticas y semidesérticas, desde Texas y Chihuahua hasta Oaxaca, en un amplio rango altitudinal, desde los 5 hasta los 2 800 m (Martínez y Matuda, 1979; Rzedowski y Rzedowski, 2001) (Figura 2.1).

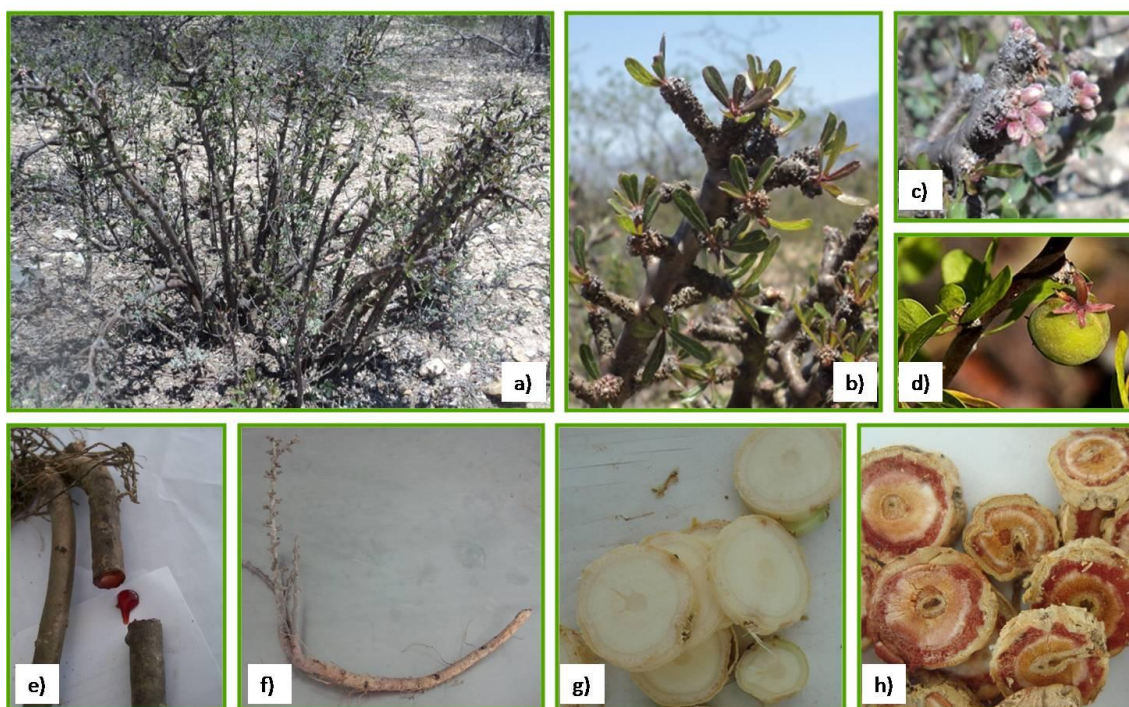


Figura 2.1. Características de *Jatropha dioica* o sangregado. a) Planta completa en su hábitat natural, b) hojas, c) flores, d) fruto, e) corte longitudinal de la base del tallo y goteo de látex, f) rizoma expuesto y tallo, g) corte longitudinal de rizomas con látex hialino y h) rojo. (Fuente propia).

Esta especie tiene una amplia distribución en México y se han registrado usos etnobotánicos en Texas (E.U.A.) y en más de 17 estados de la República Mexicana, distribuyéndose su uso desde el sur de Texas y hasta el Estado de Oaxaca (Figura 2.2).

Algunos de los nombres comunes dados a *J. dioica* en México son: batácora (Baja California), coatli, dextrí, drago, telondilla, gualulo (Hidalgo), piñón de cerro, sangre de drago (Hidalgo, Valle de México), sangre de grado (Durango, Valle de México), sangre gaco, sangregada, sangregado (Coahuilla, Durango, Sinaloa, Sonora), sangregado (Durango, San Luis Potosí, Sonora, Zacatecas), sangregrao, suzi (Oaxaca), tacote prieto (Sinaloa, Sonora), telondilla (ciudad de México, Hidalgo), tlapalezpatli (náhuatl), torote amarillo, torote prieto (Baja California), (Readers's Digest México, 1987; Martínez, 1991 y Manzanero-Medina, et al., 2009). Otro nombre dado a *J. dioica* es maticora (Hoogesteger, 1994).

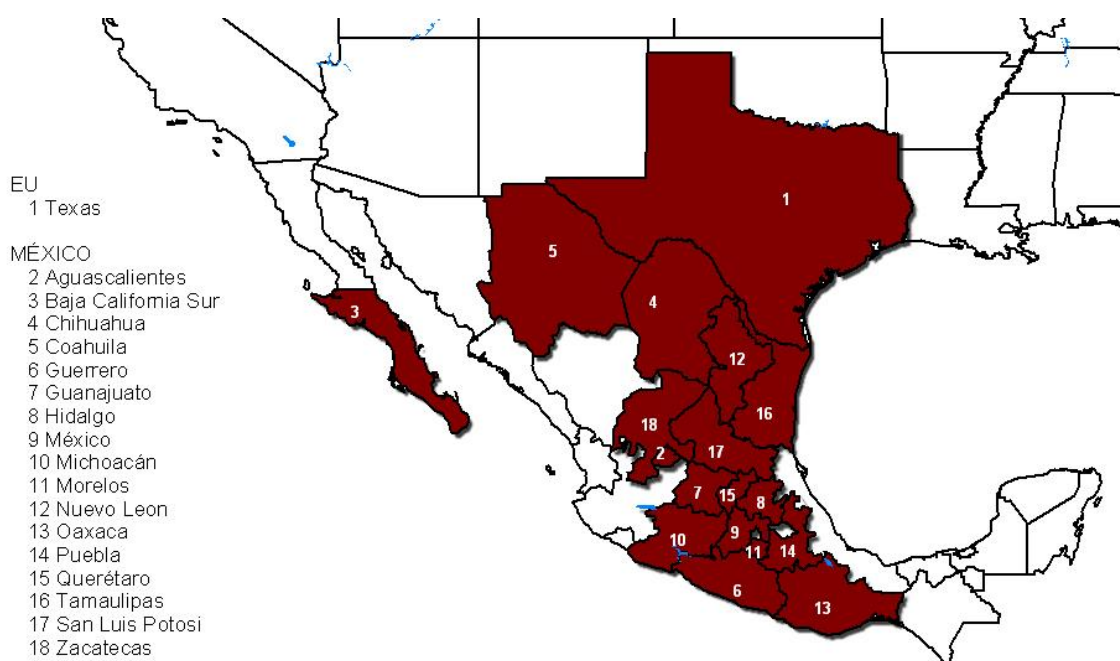


Figura 2.2. Estados que registran el uso etnobotánico de *J. dioica*.

Jatropha dioica o sangregado es una planta que ha sido incluida en varios estudios etnobotánicos debido a su uso medicinal (Bye, 1986; Martínez, 1991; González et al., 2004; Canales et al., 2005; Manzanero-Medina et al., 2009; UNAM, 2009). Los usos medicinales reportados en la literatura son: auxiliar cicatrizante, infecciones en la piel y tejido subcutáneo, ayuda a fortalecer los dientes, es usada para problemas de caspa y

caída del cabello, como antiinflamatorio, para dolor de riñones y problemas con la digestión (Manzanero-Medina, et. al 2009).

El tallo ingerido, sirve para controlar la diarrea; en enemas, para desinflamar las hemorroides; el látex directamente, la raíz cruda o cocida: para afirmar los dientes y aliviar la inflamación de garganta y la raíz masticada para aliviar el dolor de muelas. En lavados para curar heridas y diversas afecciones y erupciones de la piel. Se aplica como cataplasma para tratar las várices y golpes. El látex se toma para curar las úlceras. Y se puede aplicar directamente en los ojos para eliminar “nubes” y curar los ojos irritados (RDM, 1987; Martínez, 1991; González et al., 2004).

La parte de la planta más utilizada es la raíz, y respecto al modo de empleo existen varios métodos. Para la cicatrización se aplican unas gotas del látex de la raíz. Para fortalecer los dientes se corta un trozo de la raíz y se da un masaje en los dientes y encías con la raíz. Para el cabello y piel, se hierva un manojo de raíces en aproximadamente cuatro litros de agua y se usa como agua de baño o enjuague del cabello, o bien la raíz macerada en alcohol. Para los riñones y mala digestión se hierven tres raíces en un litro de agua y se toma como agua de uso. (RDM, 1987; Martínez, 1991; Manzanero-Medina, et. al 2009).

A pesar de su importante uso etnobotánico en todo México, hasta la fecha existen escasos estudios de caracterización fitoquímica de los compuestos con actividad antimicrobiana, antiinflamatorios ni sobre sus otras propiedades medicinales a las cuales ha sido relacionada. Por ejemplo, uno de los trabajos que incluyeron a *J. dioica* en un estudio de actividad antimicrobiano fue el realizado por Alanís-Garza et al. (2007) quienes analizaron la actividad antifúngica de *J. dioica* y otras 14 especies de plantas de uso medicinal ante hongos relacionados a enfermedades pulmonares. Sin embargo su estudio no incluyó la caracterización fitoquímica ni completaron las pruebas para analizar la actividad inhibitoria de *J. dioica* sobre los hongos causantes de micosis pulmonar.

Por lo anterior se puede considerar como una planta con potencialidad para encontrar compuestos con actividad antimicrobiana.

2.10. Técnicas para el estudio de compuestos con actividad antimicrobiana

En la investigación fitoquímica para la obtención y estudio de los metabolitos secundarios de plantas con actividad biológica incluyen ensayos de extracción con solventes de diferente polaridad, métodos de separación fundamentalmente cromatográficos, métodos de elucidación estructural principalmente espectroscópicos, y determinación de la actividad biológica a través de numerosas técnicas (Domínguez et al., 1960; Frei et al., 1998; Ososki et al., 2002; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Kumar et al., 2006; Ferreira et al., 2006; Magwua et al., 2006; Aiyelaagbe et al., 2007; Das et al., 2010).

2.10.1. Extracción

La extracción es la técnica más utilizada para el aislamiento de un compuesto orgánico de una mezcla de reacción o de sus fuentes naturales, se aplica a todo tipo de mezclas ya sean sólidas, líquidas o gaseosas. Esta se fundamenta en la diferencia de solubilidades de los compuestos. Los solventes más utilizados son metanol, etanol, acetona, agua, acetato de etilo, propanol, hexano, diclorometano y la combinación de estos (Skoog, 1990; Cazes y Scott, 2002; Stock y Rice, 2006).

2.10.2. Cromatografía

La cromatografía es el conjunto de técnicas analíticas más utilizadas por la química y las ciencias biológicas para la separación, identificación y determinación de los componentes químicos de mezclas (Abbott y Andrews, 1974; Skoog, 1990; Cazes y Scott, 2002; Stock y Rice, 2006).

La cromatografía es un método físico de separación de los componentes de una muestra en los cuales tienen en común dos factores: una fase estacionaria y una fase móvil. Donde la separación de los compuestos ocurre debido a las propiedades particulares de los compuestos, la capacidad para ser retenidos por la fase estacionaria y en la velocidad de migración entre los componentes de la fase móvil (Skoog, 1990; Rubinson y Rubinson 1999; Rouessac y Rouessac, 2001).

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar según como se coloque en contacto la fase móvil y estacionaria en cromatografía en columna y cromatografía plana, donde:
Cromatografía en columna: La característica fundamental de la cromatografía clásica en columna es que el gradiente de presión necesario para el desplazamiento de la fase

móvil a través de la fase estacionaria, está originado por gravedad (Skoog, 1990; Rouessac y Rouessac, 2001; Cazes y Scott, 2002; Stock y Rice, 2006).

Cromatografía plana: En la cromatografía plana la fase estacionaria está sujeta por una placa plana o en los poros de un papel. En este caso la fase móvil se mueve a través de la fase estacionaria por acción capilar o por la influencia de la gravedad. Las fases estacionarias utilizadas normalmente para cromatografía en capa fina son, alúmina o gel de sílice para cromatografía de adsorción y, celulosa para cromatografía de adsorción o de reparto (Skoog, 1990; Rouessac y Rouessac, 2001; Cazes y Scott, 2002; Stock y Rice, 2006).

También se puede clasificar según el tipo de fase móvil utilizada: Cromatografía de gases, cromatografía líquida y cromatografía de fluidos súper críticos (Abbott y Andrews, 1974; Skoog, 1990; Rubinson y Rubinson 1999; Rouessac y Rouessac, 2001; Cazes y Scott, 2002; Stock y Rice, 2006).

Cromatografía de Gases (GC): Técnica de separación en la que la fase móvil es un gas. Se lleva siempre a cabo en columna.

Cromatografía Líquida (LC): Técnica de separación en la que la fase móvil es un líquido. Puede desarrollarse en una columna o sobre un plano. La cromatografía líquida en la actualidad emplea generalmente partículas muy pequeñas y una presión de entrada relativamente alta, denominándose entonces cromatografía líquida de alta eficacia o de alta presión, cuyas siglas provenientes del inglés son HPLC.

Cromatografía con fluido supercrítico (SFC): Técnica de separación en la que la fase móvil es un fluido por encima y relativamente cerca de sus temperatura y presión críticas. En general, los términos y definiciones usados en la cromatografía de gases y líquida son aplicables igualmente a la de fluido supercrítico. Otra clasificación comúnmente utilizada es por la polaridad de las fases en cromatografía con fase normal y fase reversa o invertida, donde la Cromatografía con Fase Normal: es un procedimiento de elución en el que la fase estacionaria es más polar que la fase móvil. Este término se usa en cromatografía líquida para resaltar el contraste con la cromatografía con Fase Invertida, que consiste en un procedimiento de elución empleado en cromatografía líquida en el cual la fase móvil es significativamente más polar que la estacionaria; por ejemplo, un material microporoso de base silíceo con

cadena alquilo unidas químicamente (Rubinson y Rubinson 1999; Rouessac y Rouessac, 2001; Cazes y Scott, 2002; Stock y Rice, 2006).

2.10.3. Espectroscopía

La espectroscopía comprende un conjunto de técnicas que miden la respuesta de una molécula a la aportación de energía. El espectro resultante es una serie de bandas que muestran la magnitud de la respuesta en función de la longitud de la onda de energía incidente. La fuente de energía puede ser de fotones ópticos (espectroscopía ultravioleta, visible e infrarroja) o de energía de radiofrecuencia (espectroscopía de resonancia magnética nuclear) (Abbott y Andrews, 1974; Rubinson y Rubinson 1999; Rouessac y Rouessac, 2001; Cazes y Scott, 2002; Stock y Rice, 2006).

Resonancia Magnética Nuclear: Un núcleo que contiene un número impar de protones o de neutrones tiene un espín nuclear y es magnéticamente activo. Estos núcleos se comportan como si giraran en torno a un eje y se comporta como si fueran un imán diminuto. Cuando su núcleo con un espín neto se coloca en un campo magnético grande, su orientación con respecto al campo magnético externo define estados de energía cuantizados para el núcleo, en el caso de ^1H la alineación puede ser a favor o en contra del campo externo. Los núcleos pueden inducir a saltar de un estado de espín de baja energía a uno de mayor energía por medio de energía electromagnética de frecuencia tal que coincida con la diferencia de energía entre los dos estados. A la inversa, cuando un núcleo en el estado de mayor energía cae al estado de más baja energía se emita energía electromagnética de esa frecuencia. El espín que da origen a ambos estados es una propiedad del núcleo del átomo y la técnica se conoce como RMN (Rubinson y Rubinson 1999; Rouessac y Rouessac, 2001).

Espectroscopía de RMN de ^1H : Las señales de los protones en los espectros de RMN de ^1H , así como las de los carbonos en RMN ^{13}C , se registran como máximos de absorción individuales correspondientes a los núcleos no equivalentes. Este tipo de espectro proporciona cuatro elementos de información importantes: el número de señales distintas, el desplazamiento químico, el patrón de desdoblamiento y la integración de la intensidad de las señales (Rouessac y Rouessac, 2001).

Espectroscopía de RMN de ^{13}C desacoplado: Este espectro proporciona dos elementos básicos de información: el número de señales distintas, que corresponde al número de

tipos diferentes de átomos de carbono, y el desplazamiento químico de cada señal que está determinado por el entorno molecular de cada carbono (Rouessac y Rouessac, 2001).

2.11. Técnicas de determinación de actividad antimicrobiana

Los métodos de difusión, dilución y bioautografía, son métodos usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos. Las técnicas de difusión han sido ampliamente usadas para evaluar extractos y compuestos de plantas con actividad antimicrobiana. En general se propone usar los métodos de difusión (en papel o en pozo) para estudiar compuestos polares, y los métodos de dilución para sustancias polares y no polares (Ramírez y Castaño, 2009; Masoko et al. 2005).

2.11.1. Método de difusión

El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia (Ramírez y Castaño, 2009).

2.11.2. Método de dilución

El método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración mínima bactericida (MBC) y la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés). En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la MIC es determinada después de la incubación (Ramírez y Castaño, 2009).

2.11.2.1. Concentración Mínima Inhibitoria

La MIC se define como la concentración más baja a la que un antibiótico inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de ser incubado, es una herramienta de investigación para la determinación *in vitro* de la actividad de nuevos compuestos antimicrobianos (Andrews, 2001).

La Concentración Mínima Inhibitoria es considerada como prueba estándar de oro para la determinación de la susceptibilidad de los microorganismos ante los antibióticos, donde el rango de las concentraciones de antibiótico utilizado para determinar MIC universalmente aceptado en pruebas de doble dilución es arriba y debajo de 1mg/l, (Andrews, 2001; Farzana et al., 2011).

2.11.3. Método bioautográfico

La bioautografía es una técnica sencilla y rápida que combina las ventajas de la cromatografía en capa fina y la detección de actividad antimicrobiana, logrando visualizar directamente la(s) fracción(es) o extractos con actividad antimicrobiana, facilitando el aislamiento de sustancias antimicrobianas presentes en mezclas complejas (Colorado, 2007).

La bioautografía directa determina con exactitud y precisión la sustancia o sustancias responsables de la actividad antimicrobiana en una mezcla compleja, previamente optimizado su perfil cromatográfico por cromatografía en capa fina (Botz et al., 2001). Esta técnica ha sido aplicada exitosamente para la detección de las sustancias antimicrobianas de extractos de plantas (Navarro et al, 1998; Colorado, 2007; Horváth et al., 2002; Nostro et al., 2000).

2.12. Fraccionamiento biodirigido

La biodirección es una combinación de las técnicas de cromatografía y la técnica de bioautografía, donde el fraccionamiento está enfocado a la obtención de fracciones y compuestos puros con actividad antimicrobiana, por lo que, cada fraccionamiento está monitoreado con la técnicas de bioautografía para seleccionar las fracciones activas, las cuales son posteriormente evaluadas por el método de doble dilución en placa y se obtiene su Concentración mínima Inhibitoria (MIC). En cada fraccionamiento, se hace una selección de fracciones activas cada vez menos complejas, eligiendo siempre la(s) fracción(es) con el menor MIC, de polaridad media a poco polar y que se encuentre la cantidad suficiente para continuar su fraccionamiento (Navarro, 1998, Figura 2.3).

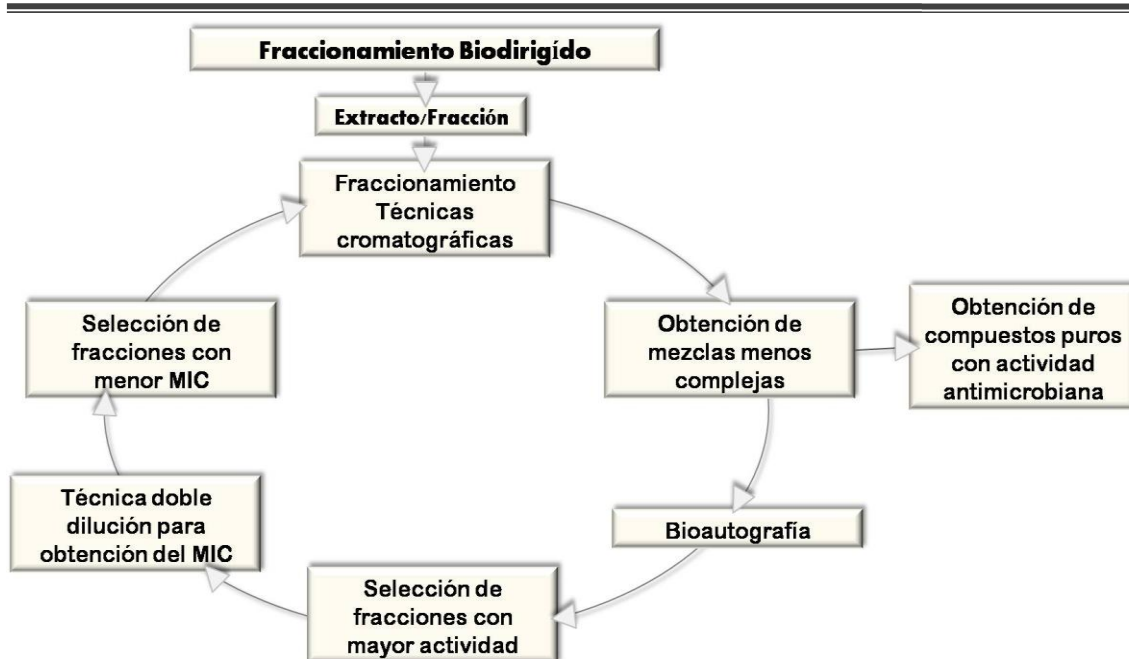


Figura 2.3. Fraccionamiento biodirigido

Dado lo anterior, el presente estudio constituye a una primera aproximación de los conocimientos relacionados a la identificación y caracterización fitoquímica de los extractos de *Jatropha dioica* con actividad antimicrobiana con la utilización novedosa del fraccionamiento biodirigido.

3. Justificación.

Las enfermedades infecciosas representan un problema importante de salud y son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo debido a factores como la marginación y la falta de cobertura de servicios de salud así como el aumento a la resistencia microbiana ante los agentes antibióticos (Chopra et al., 1996; Baquero, 1997; WHO 2002; NCID, 2002; Deive, 1979 en Ososki et al., 2002). Ante esta situación, es importante estudiar nuevas fuentes de potenciales agentes con actividad antimicrobiana (Kumar et. al., 2006).

Estudios en países latinoamericanos incluyendo México, muestran que el alto costo de los farmacos, la disponibilidad limitada de doctores, y la dificultad de llegar a las clínicas y hospitales, principalmente en áreas rurales, contribuye al uso continuo y extendido de plantas medicinales (Deive, 1979 en Ososki et al. 2002). En México existen cerca de 5000 especies de plantas con uso medicinal y que se siguen empleando actualmente (Frei et al., 1998), sin embargo hay una importante pérdida del conocimiento etnobotánico de las plantas mexicanas ya que existen pocos estudios fitoquímicos que demuestren los principios activos responsables de los supuestos beneficios a la salud y que sustenten con bases científicas el uso etnobotánico de las plantas medicinales (González et al., 2004; Frei et al., 1998), lo que representa una fuente potencial de compuestos medicinales poco explorada.

Por otro lado, en México *Jatropha dioica* es una planta característica de matorral xerófilo (Sánchez et al., 2006), sin importancia económica y es un recurso poco explotado, aunque es utilizado en la medicina tradicional (Manzanero-Medina et al., 2009; Bye, 1986; Canales et al., 2005), al realizar este estudio fitoquímico y la evaluación de su actividad antimicrobiana de *Jatropha dioica* o sangregado, se revelarán conocimientos importantes respecto a los compuestos químicos activos de esta planta, apoyando con bases científicas su uso etnobotánico, aportándole cierta importancia económica como un recurso de zonas áridas.

4. Hipótesis

Jatropha dioica es utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de varios tipos padecimientos que involucran microorganismos, por lo que se asume que *J. dioica* contiene compuestos con actividad antimicrobiana responsables de estos beneficios a la salud.

5. Objetivos

Purificar y caracterizar al menos un compuesto con actividad antimicrobiana y determinar su Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) contra al menos un microorganismo con importancia médica.

5.1. Objetivos particulares

- Obtener y comparar plantas provenientes de dos áreas con condiciones ambientales contrastantes.
- Obtener extractos de *J. dioica* con diferente polaridad y detectar los productos activos y fracciones utilizando el método bioautográfico.
- Por medio de técnicas cromatográficas obtener compuestos y mezclas menos complejas del extracto y fracciones activas.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos, fracciones y compuestos de *J. dioica* contra cepas de bacterias y hongos con importancia médica y obtener su MIC.
- Por medio de la técnica de Resonancia magnética nuclear ^1H y ^{13}C elucidar el o los compuestos activos.
- Comparar las concentraciones de los compuestos activos purificados provenientes de plantas de dos poblaciones de zonas con condiciones ambientales contrastantes.

6. Materiales y método

6.1. Obtención del material biológico

6.1.1. Sitios de colecta

Con la finalidad de asegurar la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana y para contrastar las posibles variaciones en su acumulación, el material biológico fue colectado en dos áreas que difieren en sus características ambientales.

Ambas zonas se encuentran en el Estado de Querétaro. El primer sitio de colecta representa una zona con condiciones climáticas extremas, está ubicada en el sureste del semidesierto Queretano, en la localidad de Vista Hermosa, Municipio de Cadereyta, Querétaro, a 20.68745° latitud Norte y a 99.58919° latitud Oeste (Figura 6.1). El tipo de vegetación del área corresponde a Matorral Xerófilo Micrófilo (Sánchez et al., 2006).

La segunda área representa un área con condiciones climáticas menos extremas, cuyo tipo de vegetación corresponde a Selva Baja Caducifolia (Sánchez et al., 2006). Este sitio está localizado en la zona llamada “Los Cajones”, en el km 15 de la carretera Querétaro-San Luis, Delegación Santa Rosa Jáuregui, Querétaro. Localizado a 20.68745° latitud Norte y a 99.58919° latitud Oeste (Figura 6.1).

De cada zona se hizo la determinación y autenticación de la especie, los ejemplares colectados fueron herborizados según las técnicas de Lot y Chiang (1986) y fueron incluidos en el Herbario Dr. Jerzy Rzedowski de la Universidad Autónoma de Querétaro (QMEX).

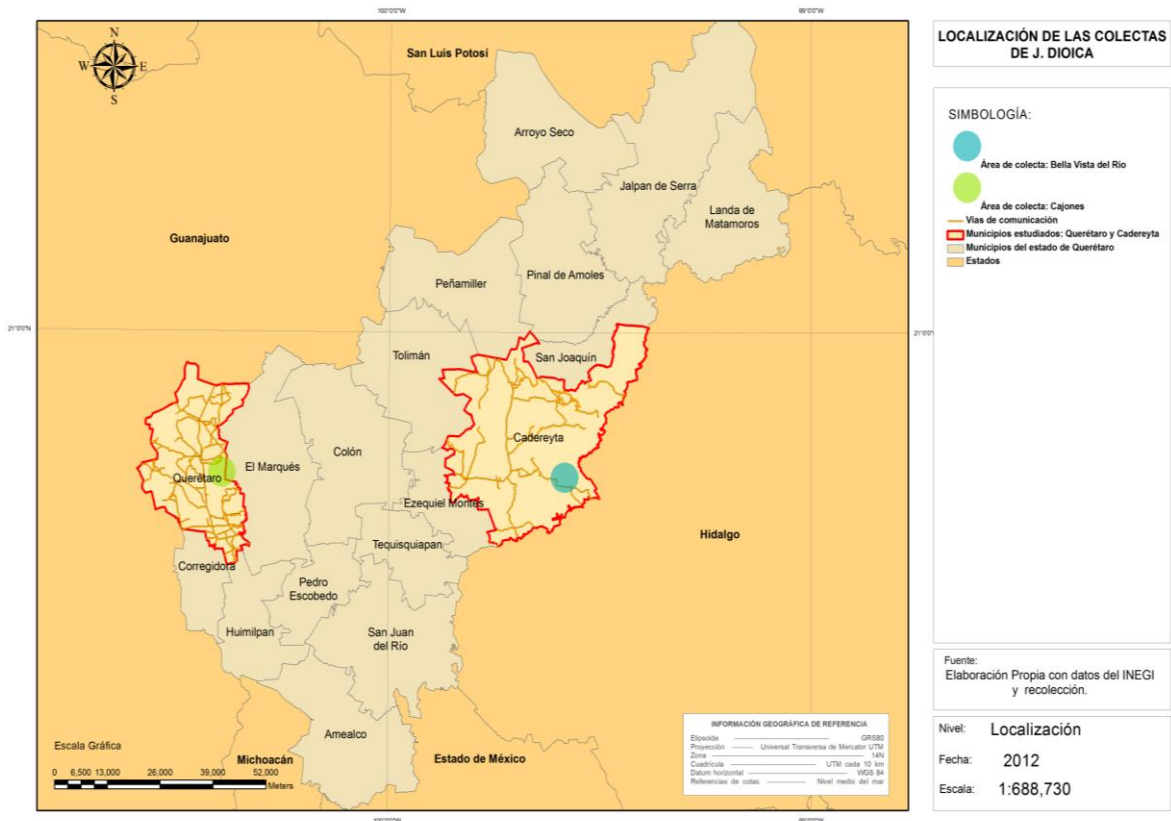


Figura 6.1. Localización de las dos áreas de colecta de *J. dioica*, para el estudio químico biodirigido y evaluación antimicrobiana.

6.1.2. Colecta del material biológico

Las plantas fueron colectadas entre el 3 de mayo y 8 de junio de 2010, colectando los tallos más alejados de la planta principal con la mayor longitud de rizoma posible. El material fue lavado el mismo día de su colecta, usando sólo agua.

6.1.3. Caracterización y deshidratación del material biológico

Con la finalidad de describir y clasificar el material colectado, una vez limpio se tomaron las siguientes medidas:

- Longitud total de la planta
- Longitud total del rizoma
- Diámetro distal 1 del rizoma (RD_1): diámetro en la parte más alejada del tallo.
- Diámetro central del rizoma (RD_c): diámetro en la longitud media (longitud D_1 a $D_2/2$)
- Diámetro distal 2 del rizoma (RD_2): diámetro de la raíz adyacente al tallo
- Longitud total del tallo
- Diámetro distal 1 del tallo (TD_1): diámetro de la base del tallo.
- Diámetro central del tallo (TD_c): diámetro en la longitud media (longitud D_1 a $D_2/2$)

- Diámetro distal 2 del rizoma (TD_2): diámetro de la punta del tallo como lo muestra la figura 6.2.

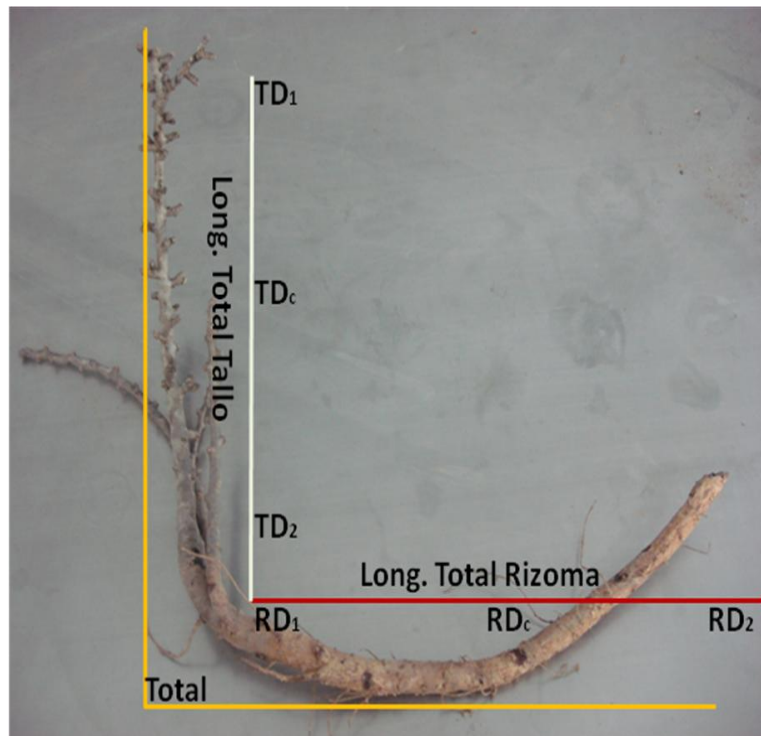


Figura 6.2. Esquema de las mediciones de las plantas colectadas para su caracterización. Total: longitud total de la planta, T: tallo, R: rizoma, D: Distal, C: central.

Posteriormente las plantas fueron clasificadas según el color de látex observado al hacer un corte longitudinal entre la base del tallo y el rizoma, con lo que se obtuvieron la categorías mostradas en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Categorías de tipos de tejido y clasificación por el color del látex de las colectas de las dos localidades.

Cadereyta		Querétaro	
1. Rizoma látex rojo	Rlr-Cad	5. Rizoma látex rojo	Rlr-Qro
2. Tallo látex rojo	Tlr-Cad	6. Tallo látex rojo	Tlr- Qro
3. Rizoma látex hialino	Rlh-Cad	7. Rizoma látex hialino	Rlh- Qro
4. Tallo látex hialino	Tlh-Cad	8. Tallo látex hialino	Tlh- Qro

Una vez clasificados, los tallos y rizomas fueron cortados en trozos de aproximadamente 3cm, fueron pesados en su totalidad por tipo de tejido y fueron deshidratados en una secadora a 40°C hasta sequedad. Una vez seco, el material fue pulverizado en un molino eléctrico tipo Thomas-Wiley obteniendo partículas de 1mm de espesor. El material fue almacenado en bolsas tipo ziploc hasta su utilización.

6.2. Obtención de extractos metanólico y de diclorometano

Con la finalidad de seleccionar el extracto con mayor actividad antimicrobiana se probaron los extractos metanólicos y de diclorometano de los siguientes tejidos de *Jatropha dioica*: 1) Rizoma látex rojo, 2) Tallo látex rojo, 3) Rizoma látex hialino y 4) Tallo látex hialino, de ambos sitios de colecta (Querétaro, Qro. y Cadereyta, Qro.) (Figura 6.3).

Se tomaron 10g de cada tejido seco y pulverizado, se colocaron en matraces y fueron extraídos con metanol y diclorometano respectivamente agregando el doble de su volumen total y manteniéndolos en agitación durante 24 hrs, obteniendo un total de 16 extractos. Los extractos fueron filtrados y concentrados a presión reducida usando un rotaevaporador (Laborota 4000, Heidolph WE), a 70°C y 30 rpm para los extractos metanólicos y a 55°C y 30 rpm para los de diclorometano.

Se detectó la actividad antimicrobiana de cada extracto con la técnica de bioautografía y se evaluó la actividad con la técnica de doble dilución para obtener la Concentración Mínima Inhibitoria de los 16 extractos contra microorganismos de importancia médica (Figura 6.3).

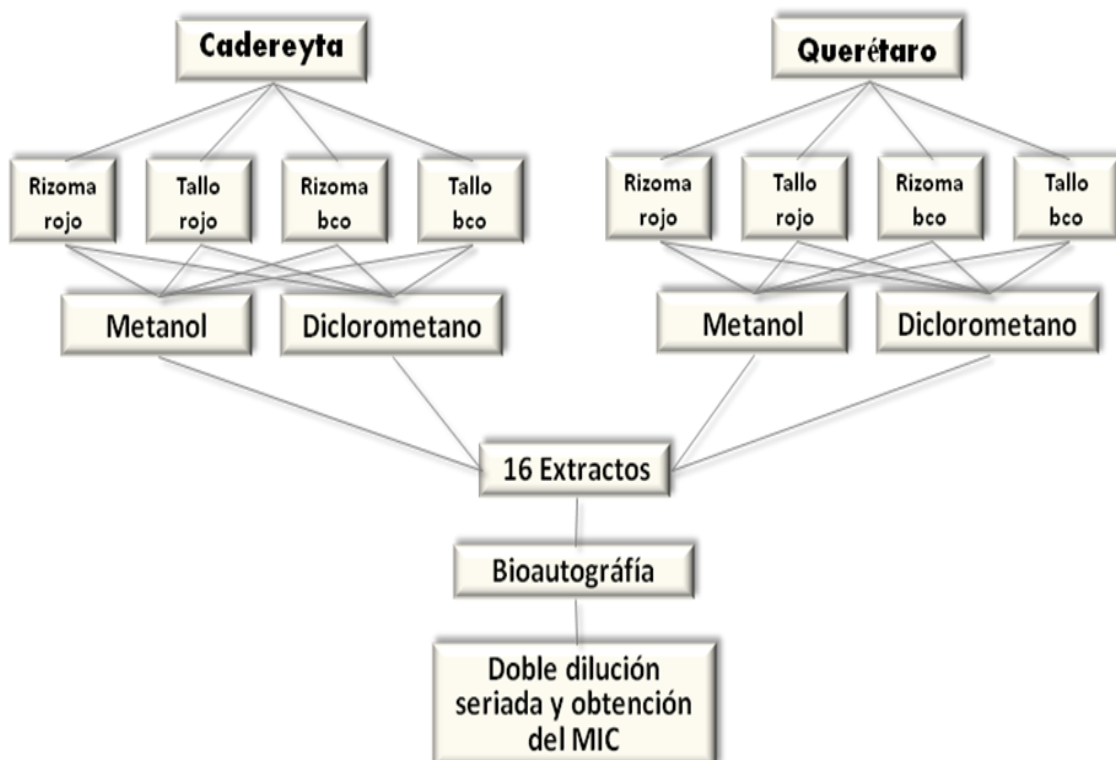


Figura 6.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos metanólico y de diclorometano.

Posteriormente, se hizo una comparación entre los resultados del MIC y la bioautografía de los extractos de metanol y diclorometano, el cual indicó que el extracto de diclorometano es más activo y contiene mayor número de posibles compuestos con actividad antimicrobiana y en mayor concentración. A nivel tejido, los extractos de rizomas rojos y transparentes de *Cadereyta* mostraron mayor actividad, y en base a la similitud cromatográfica de sus compuestos, se decidió reunir estos tejidos para contar con el material suficiente para llevar a cabo el fraccionamiento biodirigido donde se alternan las técnicas de cromatografía y bioautografía para purificar los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana.

Por otro lado debido a que el MIC de ambos extractos mostró una importante tendencia de inhibición contra dermatofitos, se decidió que la dirección del fraccionamiento del extracto de diclorometano estaría enfocado hacia la purificación de compuestos con actividad contra los hongos *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* y *A. niger* y la levadura *Candida albicans*.

6.3. Fraccionamiento biodirigido del extracto de diclorometano

Según las características cromatográficas y la actividad antimicrobiana obtenida a nivel extracto, se decidió reunir un total de 1,547.59g de partículas deshidratadas de 1mm de los rizomas con látex rojo y rizomas con látex hialino de *Cadereyta*. Se hizo una extracción con 4.5 litros de diclorometano grado reactivo (Merck), durante 24 horas en dos ocasiones. El extracto fue filtrado y concentrado a presión reducida usando un rotaevaporador (Laborota 4000, Heidolph WE), a 55°C y 30rpm. Además, se obtuvo el rendimiento porcentual con la siguiente fórmula:

Rendimiento porcentual	
$R\% = (g \cdot 100) / gMT$	
Donde:	
g=	gramos de extracto obtenidos
gMT=	g de Material Inicial Total

El extracto de diclorometano obtenido fue fraccionado y subfraccionado en seis diferentes columnas con la finalidad de obtener mezclas menos complejas utilizando el método de fraccionamiento biodirigido donde se combinan técnicas de cromatografía y bioautografía.

Todos los fraccionamientos fueron monitoreados por cromatografía de capa fina y las fracciones obtenidas de cada columna fueron reunidas según su similitud en

cromatografía de capa fina y por sus características observadas en lecturas a los 365 y 254nm y al revelar las placas con sulfato sérico amoniacal $(\text{Ce}(\text{NH}_4)_4(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$.

La nomenclatura de las fracciones obtenidas es una combinación del número de columna del cual fue obtenida y el número consecutivo de fracción al que corresponde. Por ejemplo: CjD2F5-19, donde CjD2 significa Columna *Jatropha dioica* número 2 y la Fracción es la reunión de las fracciones 5 hasta la 19. La Figura 6.4 presenta el esquema del fraccionamiento total del extracto de diclorometano con la obtención de 919 fracciones y cuatro compuestos puros, la Tabla 6.2 presenta un resumen del tipo y características de las columnas utilizadas.

Tabla 6.2. Características de las columnas y sistema eluyente utilizados en el fraccionamiento del extracto de diclorometano de los rizomas de *J. dioica*.

Columna	(Cm)		Sistema eluyente	g
	D	Long		
CjD1	8.7	75	Hex: acetona	55.40
CjD2	3.6	60	Hex: acetona: met	16.123
CjD3	4	60	Hex: acetona	5.217
CjD4	2	10	Hex:acetato de etilo	0.378
CjD5	3.5	35	Dicloro: metanol	2.4
CjD6	2.2	25	Hex:acetato de etilo	0.886

Sílica fase Normal, @Kieselgel60 Merck.

A continuación se describe de forma detallada cada uno de los fraccionamientos cromatográficos de manera particular.

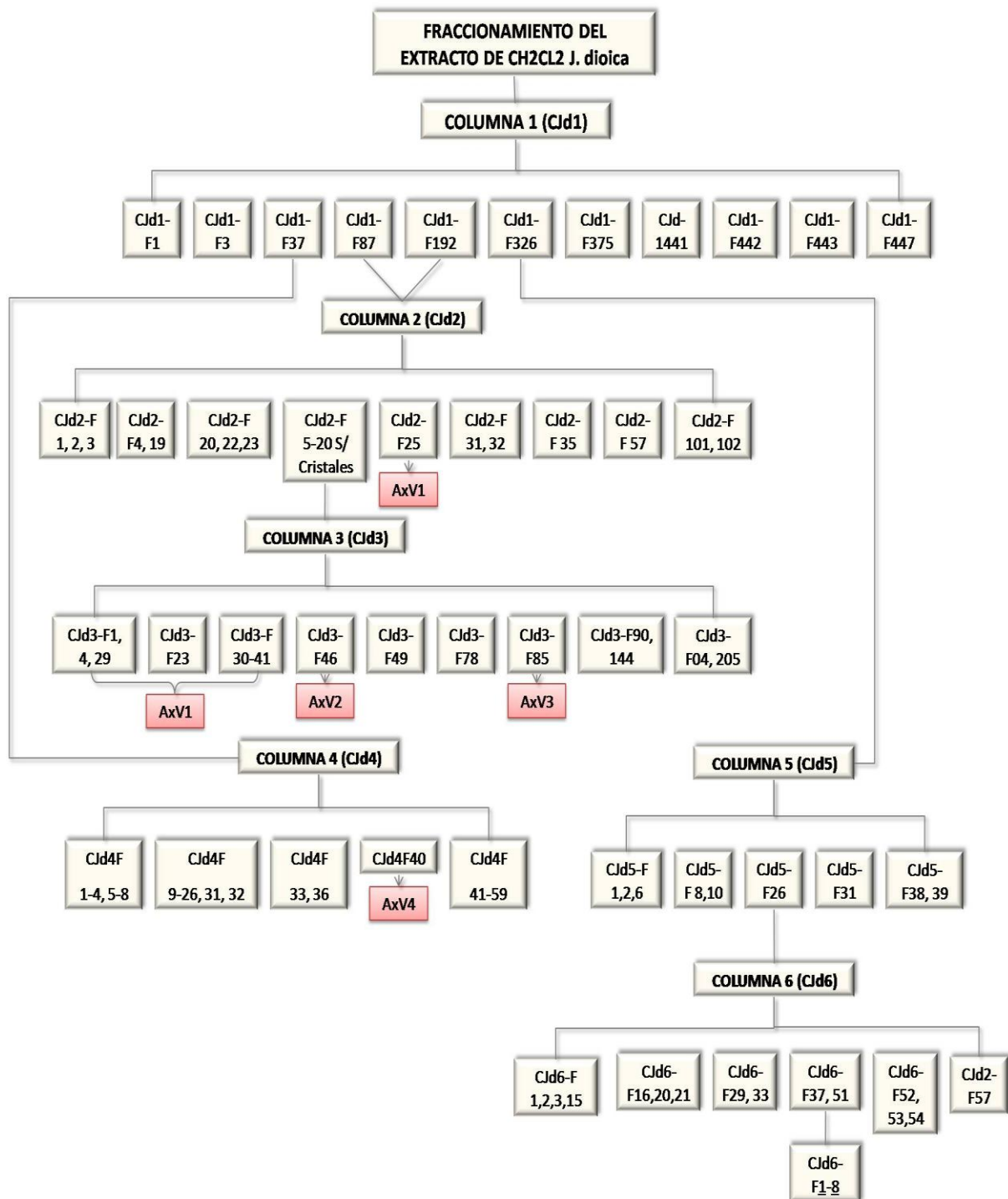


Figura 6.4. Esquema del fraccionamiento del extracto de diclorometano.

6.3.1. Columna *Jatropha dioica* 1 (Cjd1)

Se empacó un total de 55.4g del extracto de diclorometano obtenido de los rizomas con látex rojo y rizomas con látex hialino de Cadereyta en una columna abierta de vidrio de 8.7cm de diámetro y 75cm de longitud, empacada con una mezcla gel de sílice fase normal (95.7% de partículas de 0.063-0.200mm y el 4.3% de partículas de 0.2-0.5mm).

Se utilizó un sistema eluyente de polaridad ascendente de Hexano: Acetona. El fraccionamiento fue monitoreado por cromatografía de capa fina y las fracciones obtenidas fueron reunidas según su similitud cromatográfica (Tabla 6.1).

En la columna 1 se obtuvieron 447 fracciones las cuales fueron reunidas en 11 subfracciones según la similitud de sus características observadas en cromatografía de capa fina reveladas con sulfato sérico y al ser observadas a 365 y 254nm (Tabla 6.3). Con el fraccionamiento de la columna CJd1 no se obtuvo ningún compuesto puro.

Tabla 6.3. Rendimiento columna *J. dioica* 1 (CJd1) *Sistema eluyente de polaridad ascendente Hexano: Acetona, g= gramos obtenidos, R%= Rendimiento porcentual calculado como $(g \cdot 100) / \text{Materia inicial Total}$.

Columna <i>Jatropha dioica</i> 1 (CJd1)				
Reunión	Fracción	Sistema*	g	R %
1	CJd1-F1	95:5	0.1	0.3
2-3	CJd1-F3	95:5	6.0	10.9
4-37	CJd1-F37	85:15	5.6	10.1
38-87	CJd1-F87	85:15	10.3	18.6
88-192	CJd1-F192	80:20	5.8	10.5
193-326	CJd1-F326	7:3	3.3	5.9
327-375	CJd1-F375	6:4	2.3	4.2
376-441	CJd1-F441	6:4	1.3	2.4
442	CJd1-F442	Acetona	2.0	3.7
443	CJd1-F443	Acetona	9.0	16.2
444-447	CJd1-F447	Acetona	0.6	1.1
Total			45.9	83.9

6.3.2. Columna *Jatropha dioica* 2 (CJd2)

La fracción CJd1-F87 fue enriquecida con la fracción CJd1F-192 debido a su similitud cromatográfica para ser fraccionadas en la columna CJd2 sumando un total de 16.12g de extracto los cuales fueron eluidos con un sistema utilizado hexano: acetona: metanol (1:0.2:0.05) en una columna de cromatografía abierta de vidrio de 3.6cm de diámetro y una longitud de 60cm empacada con sílice de fase normal de partículas entre 0.063-0.200mm. Se obtuvieron un total de 103 fracciones reunidas en 16 fracciones según sus características mostradas en cromatografía de capa fina y al ser observadas a 365 y 254nm. Con el fraccionamiento de esta columna (CJd2) se logró purificar un compuesto en la fracción CJd2-F25 (Tabla 6.4).

Tabla 6.4. Rendimiento columna *J. dioica* 2 (CJd2) *Sistema eluyente Hexano:Acetona: metanol (1:0.2:0.05). g= gramos obtenidos, R%= Rendimiento porcentual calculado como (g*100)/Materia inicial Total.

Columna <i>Jatropha dioica</i> 2 (CJd2)				
Reunión	Fracción*	g	R %	Producto
1	CJd2-F1	0.0158	0.10	
2	CJd2-F2	0.0724	0.47	
3	CJd2-F3	0.1686	1.09	
4	CJd2-F4	0.0728	0.47	
5 – 20	CJd2-F19	2.7787	17.88	
20b	CJd2-F20c	0.4094	2.63	
21 - 22	CJd2-F22	0.4224	2.72	
23	CJd2-F23	2.3598	15.19	
24 – 25	CJd2-F25^p	0.2489	1.60	AxV1
26 - 31	CJd2-F31	0.1629	1.05	
32	CJd2-F32	0.5827	3.75	
33	CJd2-F33	-	-	
34 - 35	CJd2-F35	0.1197	0.77	
36 - 57	CJd2-F57	1.5052	9.69	
58 - 101	CJd2-F101	0.4561	2.94	
102	CJd2-F102	0.9458	6.09	
S/crist 5-20	CJd2-F5-20s/c	5.2173	33.58	
Total		15.5	96.4%	

6.3.2.1. Compuesto AxV1 de la columna CJd2

Con el fraccionamiento de esta columna (CJd2) se logró purificar un compuesto en la fracción CJd2-F25 y fue denominado AxV1, el cual fue purificado en forma de agujas de cristal precipitadas con hexano y que al ser revelado con sulfato sérico se torna de color amarillo mismo que aparece predominante de la fracción CJd2-F5 a la CJd2-F32.

La similitud cromatográfica permitió la reunión de la fracción CJd2-F5-20, en la cual hubo una formación de cristales del compuesto AxV1 los cuales fueron precipitados con hexano en la fracción CJd2-F5-20 con un peso de 2.77g. Las aguas madre o fracción CJd2-F5-20sin/cristales (s/c) (5.517 g) fue fraccionada en la columna CJd3.

6.3.3. Columna *Jatropha dioica* 3 (CJd3)

El total de la fracción CJd2F5-20s/c (5.21g) fue fraccionada en una columna de cromatografía abierta de vidrio de 4cm de diámetro y 60cm de longitud con la finalidad de obtener de forma pura los dos compuestos predominantes con actividad observados en la bioautografía (CJd3). La columna se empacó con una mezcla de 90:10% de gel de sílice de fase normal. Para la elusión de las fracciones, se utilizó un sistema polaridad

ascendente de Hexano: acetona, iniciando con un 100% de hexano y un lavado final con 100% acetona (Tabla 6.5).

Se obtuvieron tres compuestos puros y un total de 205 fracciones reunidas en 13 subfracciones según sus características cromatográficas mostradas en capa fina y al ser observadas a 365 y 254nm (Tabla 6.5).

6.3.3.1. Compuesto AxV1 de la columna CJd3

El primer compuesto se obtuvo en tres fracciones: CJd3-F29, CJd3-F23 y CJd3-F41 con un peso de 3.0107g pero no fueron reunidas debido a que mostraron diferentes grados de pureza, este compuesto corresponde al AxV1, mismo que se obtuvo en la fracción F-25 de la Columna 2.

6.3.3.2. Compuesto AxV2 de la columna CJd3

El segundo compuesto se obtuvo en la fracción CJd3-F46 con un peso de 0.6748g, el compuesto puro cristalizó en hexano formando agujas delgadas, revela en color verde seco con sulfato sérico y es el mismo compuesto que se observaba de forma predominante en las fracciones F17 a F35 de la columna 2, este compuesto fue denominado AxV2 (Tabla 6.5).

6.3.3.1. Compuesto AxV3 de la columna CJd3

El tercer compuesto puro fue aislado en la fracción CJd3-F85 con un peso de 0.0112g, el cual revela de color amarillo claro y es más polar que el de la fracción F46, este compuesto fue denominado AxV3.

De las 205 fracciones obtenidas en la columna CJd3, se eligieron las fracciones que representaban mejor al total de los compuestos de la mezcla inicial incluyendo a los dos nuevos compuestos obtenidos, para determinar la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana por el método de bioautografía.

Tabla 6.5. Rendimiento columna *J. dioica* 3 (CJd3) *Sistema eluyente Hexano:Acetona, g= gramos obtenidos, R%= Rendimiento porcentual calculado como (g*100)/Materia inicial Total, P= compuesto puro.

Columna <i>Jatropha dioica</i> 3 (CJd3)					
Reunión	Fracción	Sistema*	g	R %	Producto
1	CJd3-F1	9 :1	0.0445	0.89	
2 - 4	CJd3-F4	9 :1	0.0882	1.77	
5-11	CJd3-F11	9:1	-	-	
12- 29*	CJd3-F29	9 :1	1.7967	36.05	AxV1
23	CJd3-F23	9 :1	0.5890	11.82	AxV1
30 - 41	CJd3-F41	9 :1	0.6250	12.54	AxV1
42- 46	CJd3-F46^P	9 :1	0.6748	13.54	AxV2
47 - 49	CJd3-F49	9 :1	0.1129	2.27	
50- 78	CJd3-F78	85: 15	0.3324	6.67	
79 -85	CJd3-F85^P	85: 15	0.0112	0.22	AxV3
86 -90	CJd3-F90	85: 15	0.2531	5.08	
91 - 144	CJd3-F144	80: 20	0.0124	0.25	
145- 204	CJd3-F204	7 :3	0.4434	8.90	
lavado	CJd3-F205	100	-		
Total			4.9836	90.4	

*Fracción 12 a 29 excepto fracción 23.

6.3.4. Columna *Jatropha dioica* 4 (CJd4)

La fracción CJd1F37 fue fraccionada en la Columna *Jatropha dioica* 4 (CJd4). El total de la fracción (0.378g) fue cargada en una columna de cromatografía abierta preempacada de 2cm de diámetro y 7cm de longitud (Whataman). La fase móvil utilizada fue una combinación de Hexano:acetato de etilo.

Se obtuvo un compuesto y un total de 60 fracciones reunidas en 10 subfracciones reunidas según sus características cromatográficas mostradas en capa fina y al ser observadas a 365 y 254nm (Tabla 6.6).

Tabla 6.6. Rendimiento columna *J. dioica* 4 (CJd4) *Sistema eluyente Hexano:acetato de etilo, g= gramos obtenidos, R%= Rendimiento porcentual calculado como (g*100)/Materia inicial Total, P= compuesto puro.

Columna <i>Jatropha dioica</i> 4 (CJd4)				
Reunión	Fracción*	g	R %	Producto
1-4	CJd4-F4	0.007	1.9	
5-8	CJd4-F8	0.0172	4.5	
9-26	CJd4-F26	0.0134	3.5	
27-31	CJd4-F31^P	0.267	70.6	AxV4
32	CJd4-F32	0.0191	5.1	
33	CJd4-F33	0.0027	0.7	
34-36	CJd4-F36	0.0013	0.3	
37-40	CJd4-F40	0.0415	11.0	

Columna <i>Jatropha dioica</i> 4 (CJd4)				
Reunión	Fracción*	g	R %	Producto
41-59	CJd4-F59	0.0075	2.0	
Lavado	CJd4-F60	0.0015	0.4	
Total		0.3782	100	

6.3.4.1. Compuesto AxV4 de la columna CJd4

El compuesto se obtuvo en tres fracciones: CJd4-F26, CJd4-F31 y CJd4-F32, encontrándose más puro en la fracción 31 con un peso de 0.267g pero no fueron reunidas debido a que mostraron diferentes grados de pureza.

6.3.5. Columna *Jatropha dioica* 5 (CJd5)

El total de la fracción CJd1F326 con un total de 2.4g fue fraccionada en la Columna *Jatropha dioica* 5. La columna fue empacada con una mezcla de 95% de sílice de fase normal de 0.063-0.3mm y un 5% de 0.015-0.040mm. Las dimensiones de la columna son: 3.5cm de diámetro por 35cm de longitud. La fase móvil utilizada para el fraccionamiento de esta columna fue un sistema de Dicloro: metanol (Tabla 6.5).

Se obtuvieron 39 fracciones reunidas en 9 subfracciones según las características observadas en cromatografía y a 365 y 254nm. Se reunieron en tres fracciones predominantes CJd5-F26, CJd5-F31 y CJd5-F38. No se obtuvo ningún compuesto puro (Tabla 6.7).

Tabla 6.7. Rendimiento columna *J. dioica* 5 (CJd5) *Sistema eluyente Diclorometano: Metanol 97:3. g= gramos obtenidos, R%= Rendimiento porcentual calculado como (g*100)/Materia inicial Total.

Columna <i>Jatropha dioica</i> 5 (CJd5)				
Reunión	Fracción*	g	R %	
1	CJd5-F1	0.006	0.35	
2	CJd5-F2	0.0248	1.46	
3-6	CJd5-F6	0.0803	4.74	
7-8	CJd5-F8	0.0385	2.27	
10	CJd5-F10	0.1251	7.39	
11,13-26	CJd5-F26	0.9111	53.82	
12-31	CJd5-F31	0.272	16.07	
32-38	CJd5-F38	0.1856	10.96	
39	CJd5-F39	0.0491	2.90	
		1.7	70.5	

6.3.6. Columna *Jatropha dioica* 6 (CJd6)

Un total de 0.911g de material correspondiente a la fracción CJd5-F26 fue fraccionado en la Columna *Jatropha dioica* 6 obteniendo 57 que fueron reunidas en 15 subfracciones según su similitud mostrada en los cromatogramas y en lecturas a 365 y 264nm. El sistema eluyente utilizado fue una mezcla de polaridad ascendente de Hexano: Acetato de Etilo, iniciando con un 100% de hexano y dos lavados finales con acetona al 100% (Tabla 6.8).

Tabla 6.8. Rendimiento columna *J. dioica* 5 (CJd5) *Sistema eluyente Hexano: Acetato de etilo. g= gramos obtenidos, R%= Rendimiento porcentual calculado como (g*100)/Materia inicial Total.

Columna <i>Jatropha dioica</i> 6 (CJd6)				
Reunión	Fracción	Sistema	g	R %
1	CJd6-F1	Hex:100	0.0017	0.28
2	CJd6-F2	Hex:100	0.0007	0.12
3-4	CJd6-F3	97:3	0.0067	1.10
5-15	CJd6-F15	97:3	0.0664	10.95
16	CJd6-F16	97:3	0.0039	0.64
17- 20	CJd6-F20	97:3	0.0230	3.79
21	CJd6-F21	97:3	0.0033	0.54
22-23	CJd6-F23	97:3	-	-
24-29	CJd6-F29	97:3	0.054	8.90
30	CJd6-F30	97:3	-	-
31-33	CJd6-F33	97:3	0.0154	2.54
34-37	CJd6-F37	97:3	0.0434	7.16
38-51	CJd6-F51	97:3	0.3456	56.98
52	CJd6-F52	97:3	0.0031	0.51
53	CJd6-F53	97:3	0.0101	1.67
54	CJd6-F54	97:3	0.0123	2.03
55-57	CJd6-F57	Ace:100	0.0169	2.79
total			0.60653	68%

Finalmente para el aislamiento de otros compuestos, la fracción más grande de la columna CJd6 fue cargada en una placa tipo semipreparativa en una placa sílica gel No. 60 (Merck, de tamaño de partícula de 0.015-0.040mm), se corrió en un sistema 7:3 Hexano: acetato de etilo, posteriormente, la placa fue observada bajo luz ultravioleta marcando los compuestos que presentaran fluorescencia a 254nm y 366nm y una vez identificados, los compuestos fueron raspados de forma individual para su separación y fueron extraídos con diclorometano.

6.4. Detección de la actividad antimicrobiana. Técnica de Bioautografía

Se hizo una detección de la actividad antimicrobiana con la técnica de bioautografía de los extractos, fracciones más representativas de cada fraccionamiento y de los compuestos puros obtenidos (Tabla 6.9). Las bioautografías se prepararon en placas de sílica gel No. 60 (Merck) para cromatografía en capa fina de 5 cm de longitud, el ancho estuvo determinado por el número de fracciones o compuestos ensayados, dejando una separación de 1 cm entre cada uno. Los sistemas de elusión utilizados para correr los cromatogramas fueron elegidos según la polaridad y la Relación de Frentes o factor de referencia (Rf) de los extractos, fracciones y compuestos, eligiendo siempre el sistema que permitiera la mejor separación entre los compuestos de una fracción compleja o un RF entre 35 y 70 en el caso de compuestos puros.

Los extractos, fracciones y compuestos fueron disueltos con diclorometano y se cargaron en dos cromatogramas gemelos bajo las mismas condiciones de manejo, los cuales fueron eluidos al mismo tiempo con el sistema apropiado para cada caso. Una vez eluidas, las placas secas fueron separadas en dos grupos: 1) control y 2) cromatograma.

El control sirve para referenciar la localización de los compuestos una vez separados, siendo analizados bajo luz ultravioleta marcando los compuestos que presentaran fluorescencia a 254nm y 366nm y fueron revelados con sulfato sérico ferroso.

El otro cromatograma fue utilizado para el ensayo bioautográfico, para lo cual fueron inoculados con una solución de *Staphylococcus aureus* en caldo Müller-Hilton ajustado al estándar 1 de McFarland (aproximadamente 300 millones de bacterias/ml). Las placas fueron sumergidas por completo durante unos 30 segundos hasta estar completamente embebidas y fueron colocadas sobre un porta objetos dentro de una caja petri con papel filtro humedecido en el fondo, formando una cámara húmeda y fueron encubados en una cámara de cultivo por 18hrs a 37°C. Finalmente, los cromatogramas bioautográficos fueron revelados utilizando una solución acuosa de cloruro de 2,3,5-trifenil de tetrazolio (TTC) como colorante vital (a una concentración de 5mg/ml de agua destilada), rociando una capa ligera y homogénea sobre las placas e incubándolas durante 30 minutos a 37°C.

Una vez revelados, éstos fueron comparados contra su control identificando los compuestos con y sin actividad antimicrobiana. La actividad antimicrobiana se presenta en los bioautogramas como manchas blancas o zonas de inhibición del crecimiento bacteriano asociados a compuestos, mientras que sobre los compuestos que no tienen actividad y en las zonas sin extracto se observa una coloración rosa indicando la metabolización del TTC por las bacterias vivas por lo que se considera que no hay inhibición y por lo tanto se dice que no tiene actividad antibacteriana (Navarro et al., 1998).

Tabla 6.9. Fracciones probadas por bioautografía para detectar la actividad antimicrobiana, + positiva, - negativa.

Detección de actividad antimicrobiana por bioautografía					
Columna	Fracción	Actividad	Columna	Fracción	Actividad
Cjd1	Cjd1-F3	+	Cjd3	Cjd3-F46	++
	Cjd1-F37	+++		Cjd3-F49	++
	Cjd1-F87	+++		Cjd3-F78	-
	Cjd1-F192	+++		Cjd3-F85	-
	Cjd1-F326	++		Cjd3-F144	-
	Cjd1-F375	++		Cjd3-F204	+
	Cjd1-F441	+		Cjd5	Cjd5-F6
	Cjd1-F442	-	Cjd5-F26		++
Cjd2	Cjd2-F1	-	Cjd5-F31		+
	Cjd2-F2	-	Cjd5-F38		+++
	Cjd2-F4	-	Cjd5-F39	+	
	Cjd2-F19	+++	Cjd6	Cjd6-F1	-
	Cjd2-F25	++		Cjd6-F3	-
	Cjd2-F57	+		Cjd6-F15	+
	Cjd2-F101	++		Cjd6-F16	+
	Cjd2-F102	++		Cjd6-F29	++
Cjd3	Cjd3-F1	-		Cjd6-F33	+
	Cjd3-F4	-		Cjd6-F37	-
	Cjd3-F29	+++		Cjd6-F51	++
	Cjd3-F41	+++			

Una vez identificados los extractos, fracciones y compuestos con actividad antimicrobiana con la técnica de bioautografía, se hizo la evaluación antibacteriana y antifúngica de los compuestos contra cepas de importancia médica por el método de doble dilución en placa, de las fracciones de la columna 1 a 3 ya que los pesos de las fracciones de la columna 4 a 6 eran tan pequeños que no se pudieron probar.

6.5. Evaluación antibacteriana y anticandidiásica

Las cepas de bacterias ensayadas se presentan en la Tabla 6.10. Las cepas de *E. coli* y *S. typhi* se mantuvieron en agar EMB (agar-eosina azul de metileno-lactosa-sacarosa para microbiología), *S. faecalis*, *S. aureus* y *C. albicans* fueron cultivadas en agar para antibióticos No. 1.

Tabla 6.10. Cepas de microorganismos ensayadas en la técnica de MIC.

Bacterias y levadura ensayadas				
Microorganismo	Clave	Cepa	Infecciones asociadas	Tipo
<i>Escherichia coli</i>	(Ec)	ATCC 25922	Gastrointestinal	Gram -
<i>Salmonella typhi</i>	(St)	ATCC 13311	Gastrointestinal	Gram -
<i>Streptococcus faecalis</i>	(Sf)	ATCC 29212	Gastrointestinal	Gram +
<i>Staphylococcus aureus</i>	(Sa)	ATCC 29213	Respiratoria	Gram +
<i>Candida albicans</i>	(Ca)	ATCC 10231	Vaginal, bucofaringeo	Levadura

*ATCC. American Type Culture Collection.

Para la evaluación antimicrobiana y anticandidiásica por el método de doble dilución en agar se hizo lo siguiente. Las bacterias *E. coli*, *S. typhi*, *S. faecalis* y *S. aureus* y la levadura *C. albicans* fueron inoculadas en placas de agar para antibióticos no. 1 (Merck) durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, se tomaron de 5 a 6 colonias de las bacterias y se inocularon por separado en caldo Müller-Hilton y fueron incubadas a 37°C hasta alcanzar la turbidez del estándar No. 1 de McFarland que contiene aproximadamente 300 millones de bacterias/ml, después se tomaron 50 microlitros que equivalen a 15 millones de bacterias/ml y se diluyeron en una solución salina (1:20). *C. albicans* fue inoculada en caldo Müller-Hilton y se ajustó por comparación al estándar No. 1 de McFarland.

Cada extracto, fracción y compuesto fue disuelto en 20% de DMSO (Dimetil Sulfoxido) y 80% de agua destilada y se prepararon diluciones dobles seriadas que se adicionaron al medio de cultivo en concentraciones finales entre 3, 1.5 y 0.75g/ml de agar para los extractos de diclorometano y metanol, 0.75, 0.375, 0.182mg/ml para las fracciones de primer grado (Columna 1) y 400, 200, 100 y 0.050µg/ml de agar para las fracciones de segundo y tercer grado (Columnas 2 y 3). Además se utilizaron controles negativos de crecimiento de DMSO y del medio de cultivo.

Se aplicaron 2µl del inóculo diluido (que contenían aproximadamente 7 500 unidades formadoras de colonias/mililitro) en cada placa de agar con los extractos y se incubaron 24 horas a 37°C. Los resultados se expresan como la mínima concentración en la que el

extracto, fracción o compuesto mostró inhibición total de los microorganismos a simple vista (MIC).

6.6. Evaluación antifúngica

Los hongos de importancia médica utilizados aparecen en la Tabla 6.11, los cuales se mantuvieron en agar en sabouroad al 4% de glucosa.

Tabla 6.11. Cepas de microorganismos ensayadas en la técnica de MIC.

Hongos ensayados				
Microorganismo	Clave	Cepa	Infecciones asociadas	Tipo
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	(Tm)	ATCC 9533	Dermatofito	Ascomiceto
<i>Trichophyton rubrum</i>	(Tr)	ATCC 28188	Dermatofito	Ascomiceto
<i>Aspergillus niger</i>	(An)	ATCC 10535	Pulmonar	

*ATCC. American Type Culture Collection

Para la evaluación antifúngica por el método de doble dilución en agar se inocularon las esporas de los hongos de la cepa madre en agar sabouroad al 4% de glucosa. Posteriormente se obtuvieron 5×10^6 esporas/ml de agua destilada las cuales se obtuvieron raspando cultivos maduros de los hongos.

Cada extracto, fracción y compuesto fue disuelto en 20% de DMSO (Dimetil Sulfóxido) y 80% de agua destilada y se prepararon diluciones dobles seriadas que se adicionaron al medio de cultivo en concentraciones finales entre 8mg y $0.350 \mu\text{g/ml}$ de agar. Además se utilizaron controles negativos de crecimiento de DMSO y del medio de cultivo.

Se aplicaron 2 μl de la solución de esporas (que contenían aproximadamente 6250 esporas) en cada placa de agar con los extractos y se incubaron a 37°C por 24 h para *A. niger* y 72 h para los dermatofitos utilizando una cámara húmeda. Los resultados fueron expresados como la mínima concentración en la que el extracto, fracción o compuesto mostró inhibición total de los hongos a simple vista (MIC).

6.7. Cuantificación de Axv1 y AxV2 y comparación en diferentes extractos por HPLC

Con la finalidad de comparar las posibles diferencias en la acumulación de los compuestos mayoritarios purificados AxV1 y AxV2 en las plantas colectadas, se hizo una cuantificación por HPLC. Los extractos de diclorometano se obtuvieron utilizando 2g de cada tejido, se colocaron en matraces con 23ml de diclorometano y se

mantuvieron en agitación durante 3 hrs, se filtraron, se concentraron y se obtuvo el rendimiento porcentual.

Las muestras fueron analizadas utilizando el método de Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés High Performance Liquid Chromatography). El sistema cromatográfico consistió de un módulo de separación (Waters 2695) conectado a un detector de Fotodiodos (Waters 2996). Los cromatogramas se analizaron con el software Empower Chromatography Manager versión 1 (Empower Pro 1.0 Waters). El análisis fue hecho utilizando una columna fase reversa 1.16855.0001 LiChroCART® 125-4 Superspher®100 Merck. La fase móvil consistió en un gradiente lineal de Agua/Acetonitrilo con una concentración inicial de 100% agua disminuyéndose en 90,70, 60, 30 y 15% respecto a acetonitrilo en ciclos de 21 minutos y con un flujo de 1ml/min. Los solventes utilizados fueron grado HPLC Merck.

La identificación cromatográfica de los picos de los compuestos purificados fue estimado utilizando un detector de matriz de fotodiodos 230-600nm (PDA 2996 Waters), además se determinaron los Tiempos de Retención (TR).

Para la cuantificación de los compuestos purificados AxV1 y AxV2 se elaboró una curva de calibración construida por cinco puntos generados por cinco diluciones de cada compuesto en 12.5, 25, 50, 100 y 200µg/ml metanol. Se inyectaron volúmenes 20µg/ml y fueron leídos a 284 y 245nm respectivamente. Posteriormente se midió el área bajo la curva de cada concentración por triplicado, se obtuvieron los promedios, se generó la ecuación correspondiente y se calculo el coeficiente de determinación (R^2).

Finalmente, para la cuantificación de los compuestos en los 8 diferentes extractos, se inyectaron 20µl de cada uno a una concentración de 15mg/ml de Metanol previamente filtrados en un filtro Acrodisc PSF Nylon PALL® de 4.5µm de apertura y una jeringa de 25mm de longitud. Para cada muestra se hicieron lecturas a 284 y 245nm y se midieron las áreas bajo la curva por triplicado. Posteriormente se substituyeron los valores en la ecuación respectiva y se calcularon los µg de cada compuesto por gramo de extracto de diclorometano en cada uno de los tejidos.

Para la elucidación estructural, los compuestos aislados fueron sujetos a un análisis instrumental en la unidad de resonancia magnética nuclear de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Morelos. Las estructuras fueron determinadas a través de

resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C , que se obtuvieron en CDCl_3 (deuterocloroformo) en un equipo Varian Unity 400, a 400 MHz para ^1H y a 100 MHz para ^{13}C utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

7. Resultados

7.1. Caracterización del material biológico

Se colectaron un total de 531 plantas completas, con un tallo principal o grupo tallos asociados a un rizoma. En el matorral Xerófilo de las inmediaciones de la Localidad de Vista Hermosa en el Municipio de Cadereyta, Qro., se colectaron un total de 289 plantas completas mientras que en la zona de “Cajones” en el municipio de Querétaro cuyo tipo de vegetación es Selva Baja Caducifolia, se colectaron 242 plantas. El corte longitudinal en la base del tallo muestra que en la colecta de Cadereyta se encontró una proporción similar entre las plantas con látex rojo (44.6%) y látex hialino (55.4%), mientras que en la colecta de Querétaro se observa una mayor proporción de plantas con látex rojo (74.4%) y una menor proporción de plantas con látex hialino (25.6%) (Tabla 7.1).

La mayoría de las plantas colectadas en ambas zonas no presentaron inflorescencias (82.4% y 71.1%) y sólo una minoría contaba con tallos contiguos y/o ramificaciones en el tallo principal. La Tabla 7.1 muestra para cada área de colecta el número de plantas con la presencia o ausencia de flores, tallos contiguos y ramificaciones en la parte superior del tallo principal de la planta así como el porcentaje que representa respecto al total de plantas colectadas por zona.

Tabla 7.1. Plantas colectadas en Cadereyta, Qro y Querétaro, Qro.

Plantas	Cadereyta		Querétaro	
Látex hialino	160	55.4%	62	25.6%
Látex rojo	129	44.6%	180	74.4%
Con ramas	57	19.7%	63	26.0%
Sin ramas	211	73.0%	159	65.7%
Con tallos contiguos	37	12.8%	82	33.9%
Sin tallos contiguos	170	58.8%	111	45.9%
Con flores	51	17.6%	70	28.9%
Sin flores	238	82.4%	172	71.1%
Total de plantas	289	100%	242	100%

Las plantas completas de Cadereyta tuvieron una longitud promedio de 59.7 ± 17.7 , con un rizoma de una longitud promedio de 16.6 ± 12.5 cm y 12.8 ± 3.2 mm de diámetro promedio. Los tallos midieron en promedio 43.1 ± 13.7 cm de longitud y 11 ± 2.3 mm de diámetro (Tabla 7.2).

El promedio de la longitud de las plantas completas colectadas en Querétaro fue de 72.3 ± 23.4 cm, con un rizoma de 17.5 ± 13.8 cm de longitud por 13.6 ± 3.8 mm de diámetro y un tallo de 54.8 ± 17.3 cm de longitud por 7 ± 3.8 mm de diámetro.

Tabla 7.2. Longitud y diámetro promedio de las plantas completas, rizomas y tallos y su desviación estándar

Longitud y diámetro promedio			
Características		Cadereyta	Querétaro
Long total Planta (cm)		59.7 ± 17.7	72.3 ± 23.4
RIZOMA	Long total (cm)	16.6 ± 12.5	17.5 ± 13.8
	Diámetro prom (mm)	12.8 ± 3.43	13.6 ± 3.8
	• Diámetro distal 1 (mm)	12.8 ± 3.2	13.8 ± 4.0
	• Diámetro central (mm)	13.0 ± 3.4	14.4 ± 4.0
	• Diámetro distal 2 (mm)	12.8 ± 3.6	13.9 ± 3.9
TALLO	Long total (cm)	43.1 ± 13.7	54.8 ± 17.3
	Diámetro prom (mm)	7.2 ± 3.5	7.0 ± 3.8
	• Diámetro distal 1 (mm)	11.0 ± 2.3	11.3 ± 2.3
	• Diámetro central 2 (mm)	6.8 ± 1.7	6.5 ± 1.6
	• Diámetro distal 3 (mm)	3.8 ± 1.2	3.1 ± 1.0

7.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana con la técnica de doble dilución en placa a nivel extracto:

7.2.1. Extractos metanólicos

Los MIC del extracto metanólico muestran que los extractos presentan diferente tipo de actividad antimicrobiana ante los microorganismos probados. Todos los extractos presentaron actividad inhibitoria total contra *S aureus* entre 0.75 y 3gr/ml de agar. Sólo los rizomas rojos presentaron actividad contra *S. typhi* y sólo el rizoma transparente de Querétaro presentó actividad contra *S. faecalis*. Ninguno de los extractos probados mostro actividad contra *E. coli*. Por otro lado, todos los rizomas mostraron actividad contra *A. niger* a 1.5mg/ml y sólo los rizomas provenientes de Cadereyta mostraron inhibición contra *C. albicans*. Contra los dermatofitos *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*, todos los extractos mostraron actividad entre 1.5 y < a 0.75, excepto los tallos rojos de Querétaro que no mostraron actividad a las concentraciones probadas. En general, los rizomas de ambas zonas presentaron mayor actividad que los tallos; los rizomas de Cadereyta presentaron mejor actividad que los colectados en Querétaro y finalmente todos los extractos presentaron mayor actividad contra hongos que contra bacterias (Tabla 7.3).

Tabla 7.3. Resultados de MIC de 8 extractos metanólicos de *J. dioica* provenientes de Cadereyta y Querétaro.

		MIC Extracto Metanólico (g/ml)								
		Extracto	Sa	St	Sf	Ec	Ca	Tm	Tr	An
Cad	Tallo hialino	1	0.75	>3	>3	>3	>3	1.5	1.5	>1.5
	Rizoma hialino	2	3	>3	>3	>3	3	<0.75	<0.75	1.5
	Tallo rojo	3	3	>3	>3	>3	>3	1.5	1.5	>1.5
	Rizoma rojo	4	3	3	>3	>3	3	<0.75	0.75	1.5
Qro	Rizoma rojo	5	3	3	>3	>3	>3	1.5	1.5	1.5
	Tallo rojo	6	3	>3	>3	>3	>3	>1.5	>1.5	>1.5
	Rizoma hialino	7	3	>3	3	>3	>3	1.5	1.5	1.5
	Tallo hialino	8	3	>3	>3	>3	>3	1.5	1.5	>1.5
DMSO*		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Medio de cultivo*		+	+	+	+	+	+	+	+	+

Las concentraciones probadas fueron 3, 1.5 y 0.75g/ml de agar, *Controles de crecimiento, + positivo. Sa= *Staphylococcus aureus*, St=*Salmonella typhi*, Sf= *Streptococcus faecalis*, Ec= *Escherichia coli*, Ca=*Candida albicans*, Tm=*Trichophyton mentagrophytes*, Tr=*Trichophyton rubrum* y An=*Aspergillus niger*.

7.2.2. Extractos de diclorometano

Los resultados del MIC revelan que los extractos de diclorometano presentan actividad heterogénea ante los diversos microorganismos probados. Ninguno de los extractos mostró actividad contra *S. typhi*, *E. coli* y *C. albicans* a las concentraciones evaluadas.

Algunos tejidos mostraron actividad contra *S. aureus* y *S. faecalis* a una concentración de 1.5g/ml de agar. Por otro lado, todos los extractos mostraron actividad contra los dermatofitos *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* y los rizomas de ambas zonas presentaron actividad parcial (entre 40-60% de área total) contra *A. niger* a 1.5g/ml de agar. En general, se detectó una mayor actividad contra hongos que contra bacterias a las concentraciones probadas, los tejidos de Cadereyta presentaron mejor actividad que los de Querétaro ya que inhiben el crecimiento de diferentes microorganismos en una menor concentración. Por otro lado, los rizomas de Cadereyta mostraron mejor actividad antimicrobiana *in vitro* que los tallos de ambas zonas a las concentraciones probadas (Tabla 7.4).

Tabla 7.4. Resultados de MIC de 8 extractos de diclorometano de *J. dioica* provenientes de Cadereyta y Querétaro.

		MIC Extracto Diclorometano (g/ml)								
		Extracto	Sa	St	Sf	Ec	Ca	Tm	Tr	An
Cad	Tallo hialino	1	1.5	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	1.5	1.5	>1.5
	Rizoma hialino	2	1.5	>1.5	1.5	>1.5	>1.5	0.375	0.375	>1.5
	Tallo rojo	3	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	1.5	1.5	>1.5
	Rizoma rojo	4	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	0.375	0.375	>1.5
Qro	Rizoma rojo	5	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	1.5	1.5	>1.5
	Tallo rojo	6	1.5	>1.5	1.5	>1.5	>1.5	1.5	1.5	>1.5
	Rizoma hialino	7	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	1.5	1.5	>1.5
	Tallo hialino	8	1.5	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	1.5	1.5	>1.5
DMSO*		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Medio de cultivo*		+	+	+	+	+	+	+	+	+

Las concentraciones probadas fueron 1.5, 0.75 y 0.375 g/ml de agar, *Controles de crecimiento, + positivo. Sa= *Staphylococcus aureus*, St= *Salmonella typhi*, Sf= *Streptococcus faecalis*, Ec= *Escherichia coli*, Ca= *Candida albicans*, Tm= *Trichophyton mentagrophytes*, Tr= *Trichophyton rubrum* y An= *Aspergillus niger*.

Comparando los resultados del MIC y la bioautografía de los extractos de metanol y diclorometano muestran que el extracto de diclorometano es más activo y contiene mayor número de posibles compuestos con actividad antimicrobiana y en mayor concentración. A nivel tejido, los extractos de rizomas rojos y transparentes de Cadereyta mostraron mayor actividad, y basándonos en la similitud cromatográfica de sus compuestos, se decidió se decidió reunir estos tejidos para contar con el material suficiente para llevar a cabo el fraccionamiento biodirigido para purificar los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana.

Por otro lado debido a que el MIC de ambos extractos mostró una importante tendencia de inhibición contra dermatofitos, se decidió que la dirección del fraccionamiento del extracto de diclorometano estaría enfocado hacia la purificación de compuestos con actividad contra los hongos *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* y *A. niger* y la levadura *Candida albicans*.

7.3. Rendimiento columnas

Los rendimientos de las columnas permitieron obtener de un 60 a un 96% de recuperación una vez que fueron eluidas con los solventes elegidos, estos resultados se muestran en la Tabla 7.5.

Tabla 7.5. Rendimiento de las columna del fraccionamiento del extracto de diclorometano

Fraccionamiento extracto diclorometano <i>Jatropha dioica</i>				
Columna	Fracciones obtenidas	g0	gf	R %
CJd1	447	55.4	45.9	82.8
CJd2	103	16.1	15.5	96.4
CJd3	205	5.2	5.0	90.4
CJd4	60	0.4	0.4	90.0
CJd5	39	2.4	1.7	70.5
CJd6	65	0.89	0.6	68.5
Total	919			

7.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana por doble dilución en agar de las fracciones y compuestos puros del fraccionamiento biodirigido del extracto de diclorometano

Los resultados de la evaluación de actividad contra dermatofitos de ocho de las once fracciones obtenidas de la columna CJd1 (fraccionamiento primario), evaluadas con el método de doble dilución en placa, mostró que las fracciones de media y baja polaridad presentan actividad contra *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* con una Concentración Mínima Inhibitoria entre los 0.375 y 0.75mg/ml, siendo la fracción CJd1F-87 la más activa ya que inhibe el crecimiento total de los dos dermatofitos a una concentración de 0.375mg/ml, mientras que las fracciones más polares no presentaron actividad antimicrobiana a las concentraciones probadas (Tabla 7.6).

La evaluación de la MIC muestra que el compuesto puro contenido en la fracción CJd2-F25 (compuesto puro AxV1) es la más activa al inhibir el crecimiento de cinco de los ocho microorganismos probados con las concentraciones de extracto/ml de agar más bajas. *S. aureus* y *S. faecalis*, son inhibidos únicamente por la fracción CJd2-F25; *S. typhi*, *E. coli* y *C. albicans* no fueron inhibidos por ninguno de los compuestos de la columna 2 a las concentraciones probadas; a excepción de la fracción CJd2-F4 para *T. mentagrophytes*, todas las fracciones inhibieron el crecimiento de *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* entre los 0.050 y los 200µg/ml. Finalmente, de las fracciones probadas sólo la fracción CJd2-F25 y CJd2-F35 inhibieron el 100% del crecimiento de *A. niger* a 200 y 400 µg/ml de agar respectivamente (Tabla 7.6).

Debido a que las fracciones obtenidas tuvieron un peso muy reducido, no se pudo continuar con su fraccionamiento y sólo se obtuvo el MIC de la fracción CJd3-F171 y del compuesto puro de la fracción CJd3-F46 (Tabla 7.6).

Los resultados de la prueba de doble dilución seriada para la obtención de las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) mostraron que la fracción CJD3-F171 presentó inhibición en tres de los ocho microorganismos probados a una concentración entre 200 y 100µg/ml de agar, mientras que el compuesto puro de la fracción CJD3-F46 sólo inhibió el crecimiento de *T. rubrum* a una concentración de 200µg/ml de agar (Tabla 7.6).

Tabla 7.6. Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana con el método de doble dilución en agar de las fracciones con actividad detectadas por el método de bioautografía.

Fracción	MIC Fracciones (mg/ml, ug/ml)							
	Sa	St	Sf	Ec	Ca	Tm	Tr	An
CJd1-F3*	Np	Np	Np	Np	Np	0.75	0.75	Np
CJd1-F3*	Np	Np	Np	Np	Np	0.75	0.375	Np
CJd1-F87*	Np	Np	Np	Np	Np	0.375	0.375	Np
CJd1-F192*	Np	Np	Np	Np	Np	0.75	0.75	Np
CJd1-F326*	Np	Np	Np	Np	Np	>0.75	>0.75	Np
CJd1-F379*	Np	Np	Np	Np	Np	>0.75	>0.75	Np
CJd1-F441*	Np	Np	Np	Np	Np	>0.75	>0.75	Np
CJd1-F442*	Np	Np	Np	Np	Np	>0.75	>0.75	Np
CJd2-F4**	>200	>200	>200	>200	>400	>400	100	>400
CJd2-F25 (AxV1)**	100	>200	100	>200	>400	<100	0.05	200
CJd2-F35**	>200	>200	>200	>200	>400	100	100	400
CJd2-F57**	>200	>200	>200	>200	>200	200	200	>200
CJd2-F101**	>200	>200	>200	>200	>200	200	200	>200
CJd3-F46 (AxV2)**	>200	>200	>200	>200	>200	>200	200	>200
CJd3-F171**	200	>200	100	>200	>200	>200	100	>200
DMSO [#]	+	+	+	+	+	+	+	+
M. cultivo [#]	+	+	+	+	+	+	+	+

Las concentraciones probadas fueron 0.75, 0.375, 0.182mg/ml* y 400, 200, 100 y 0.050µg/ml** de agar. #Controles de crecimiento + positivo. Np= No probadas.

7.5. RMN de los compuestos purificados

7.5.1. Compuesto AxV1

Compuesto AxV1, correspondió al compuesto purificado en la fracción F25 de la columna CJd2. Fue purificado en forma de agujas cristalinas con hexano, es soluble en diclorometano y presenta un color amarillo al ser revelado con sulfato sérico.

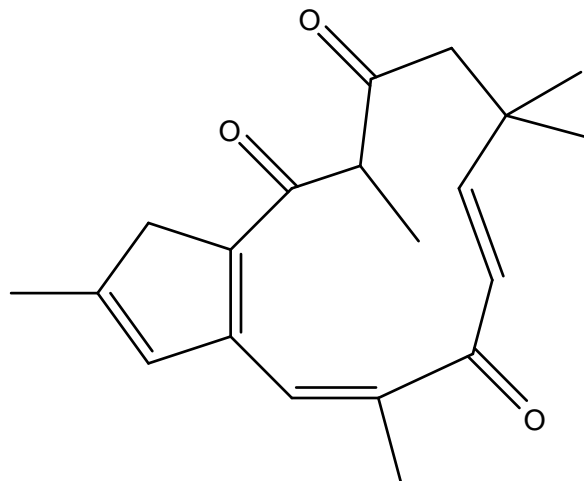


Figura 7.1. Compuesto AxV1 purificado en la fracción CJd2F25.

7.5.2. Compuesto Axv2

Compuesto AxV2, correspondió al compuesto purificado en la fracción F46 de la columna CJd3. Fue purificado con hexano y forma agujas cristalinas, es soluble en diclorometano y presenta un color verde seco al ser revelado con sulfato sérico.

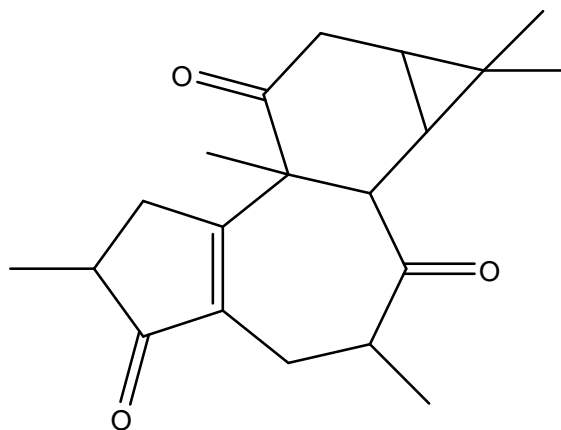


Figura 7.2. Compuesto AxV2 purificado en la fracción CJdF46.

7.5.3. Compuesto AxV3

Compuesto AxV3 corresponde a Citlaltirione $C_{20}H_{26}O_4$. Fue purificado en la fracción CJD3-F85 recristalizado en hexano forma agujas cristalinas, este compuesto revela en color rojo al ser revelado con sulfato sérico.

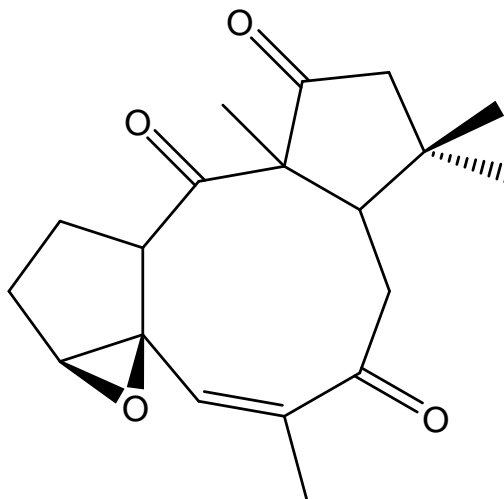


Figura 7.3. Citlaltirione $C_{20}H_{26}O_4$: compuesto purificado en la fracción CJD3-F85.

7.5.4. Compuesto Axv4

Este compuesto corresponde a β -Sitosterol fue obtenido en la fracción CJD4F40, fue determinado por comparación en cromatografía de capa fina utilizando un estándar. Este compuesto revela de color rojo al ser revelado con sulfato sérico. Su formula molecular es $C_{28}H_{51}O$, (3 beta)-stigmast-5-en-3ol; 22:23-dihydrostigmasterol; 24 beta-ethyl-delta-5-cholesten-3beta-ol.

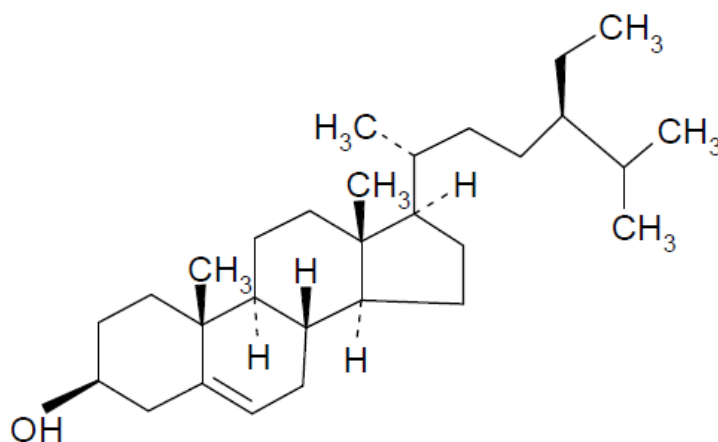


Figura 7.4. β -Sitosterol

La Figura 7.5 muestra las fracciones más representativas de las 919 fracciones obtenidas de las 6 columnas utilizadas para el fraccionamiento del extracto de diclorometano de *Jatropha dioica*.

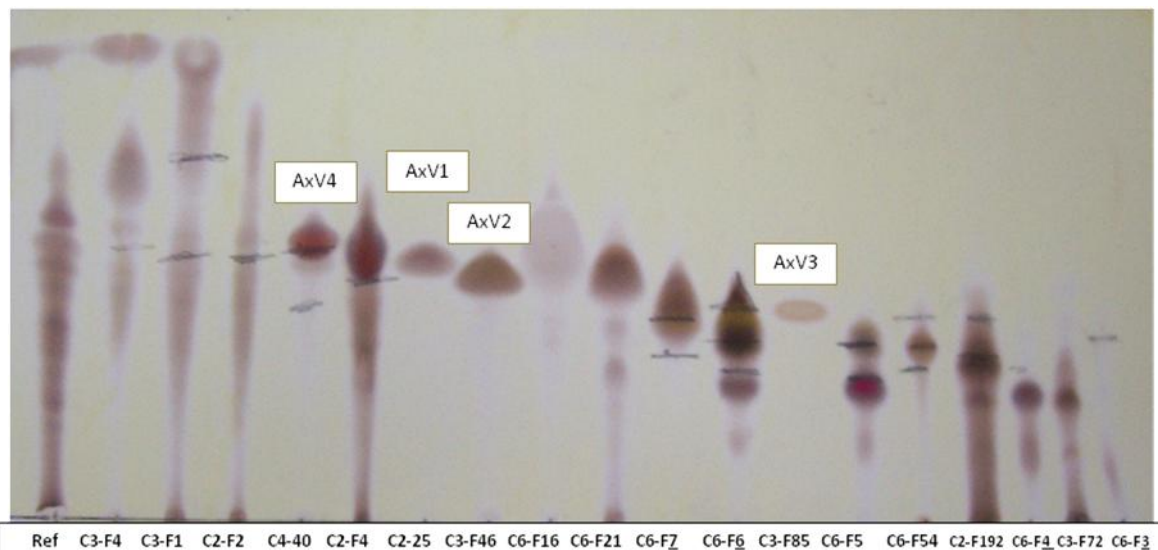


Figura 7.5. Cromatograma de las 18 fracciones más representativas de las 919 fracciones obtenidas de las 6 columnas utilizadas para el fraccionamiento del extracto de diclorometano de *Jatropha dioica*.

7.6. Cuantificación de los compuestos AxV1 y AxV2 purificados

Los rendimientos de los extractos de diclorometano de los diferentes tejidos están entre 1.36 y 2.38% como se muestra en la Tabla 7.7. Los tejidos con mayor cantidad fueron los rizomas de ambas zonas y en menor cantidad en los tallos.

Tabla 7.7. Rendimiento de los extractos de diclorometano para la cuantificación de AxV1 y AxV2.

Rendimiento extractos diclorometano				
Colecta	Tejido	Extracto	Extracto (g)	R(%)
Cad	Rizoma Rojo	1	0.0421	2.11
	Rizoma bco	2	0.0466	2.33
	Tallo rojo	3	0.0290	1.45
	Tallo bco	4	0.0272	1.36
Qro	Rizoma rojo	5	0.0476	2.38
	Rizoma bco	6	0.0465	2.33
	Tallo rojo	7	0.0346	1.73
	Tallo bco	8	0.0349	1.75

Gramos de extracto obtenidos a partir de 2g de los tejidos deshidratados y pulverizados. El rendimiento porcentual R (%) corresponde a :%=(g de extracto obtenido X 100)/g de material inicial total.

El compuesto F25 presenta un espectro de absorción de UV con una longitud de onda máxima de $\lambda_{max}=284nm$ y un tiempo de retención de 10.145. Para el compuesto F46 su

espectro se presentó una $\lambda_{\text{max}}=246\text{nm}$ y un tiempo de retención de 9.97 con la columna y el sistema utilizado (Anexo).

La ecuación obtenida para la cuantificación a partir de las cinco diluciones de F25 es $Y=32702x + 90268$ con una R^2 de 0.999 y para el compuesto F46 es $Y=33739x + 10631$ con una R^2 de 0.999.

Por otro lado, la cuantificación de los compuestos indica que el compuesto con mayor actividad antibacteriana AxV1 (CJd2F25) resultó ser el más abundante en los rizomas rojo y hialino colectados en Cadereyta 96.4 y 86.4mg/g extracto de diclorometano respectivamente, mientras que este compuesto no fue detectado en los rizomas y tallos hialinos colectados en Querétaro. Respecto al compuesto AxV2 (CJd3F46) también resulta ser el más abundante en rizomas rojos y hialinos de Cadereyta, por otro lado no fueron detectados en los rizomas rojos de Querétaro (Tabla 7.8).

Tabla 7.8. Cuantificación de los compuestos purificados AxV1 y AxV2.

Colecta	Tejido	Muestra	F25 a 284 nm		F46 245nm	
			mgF25/g Ext	TR	mgF25/g Ext	TR
Cad	Rizoma Rojo	CH ₂ Cl ₂ -1	96.47	9.022	44.94	8.78
	Rizoma hialino	CH ₂ Cl ₂ -2	86.46	10.16	64.38	9.9
	Tallo rojo	CH ₂ Cl ₂ -3	2.59	7.77	1.71	7.5
	Tallo hialino	CH ₂ Cl ₂ -4	0.42	7.72	0.97	7.43
	Rizoma rojo	CH ₂ Cl ₂ -5	3.61	8.7	ND	ND
Otro	Rizoma hialino	CH ₂ Cl ₂ -6	ND	ND	2.63	7.78
	Tallo rojo	CH ₂ Cl ₂ -7	2.48	10.38	2.48	1021
	Tallo hialino	CH ₂ Cl ₂ -8	ND	ND	2.26	7.8

Promedio de 3 inyecciones de 20 μ l. ND no detectado.

8. Discusiones

Los extractos de los tallos y rizomas de metanol y diclorometano así como las fracciones y compuestos puros obtenidos mostraron actividad antimicrobiana preferentemente hacia los dermatofitos especialmente *hacia T. rubrum* y bacterias gram positivas y prácticamente ninguno mostro actividad contra las gran negativas *E. coli* y *Salmonella typhi* (a excepción de los rizomas del extracto metanólico). Este resultado concuerda con algunas investigaciones que muestran que en general, las sustancias antibióticas de las plantas resultan ser mas inhibitorias de organismos Gram positivas que de Gram negativas. Por ejemplo, Kumar et al. (2006) estudiaron 61 plantas medicinales usadas por la medicina tradicional India incluyendo *Jatropha gossypifolia*. Ellos concluyeron que *J. gossypifolia*, junto con otras nueve plantas fueron las especies que mostraron una actividad antimicrobiana siendo significativa hacia los micorganismos Gram positivos.

Respecto a la actividad antifúngica, el resultado obtenido coincide con los hallazgos encontrados por Adejumo et al. (2009), quienes probaron la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos y acuosos de seis plantas incluyendo a *Jatropha curcas* y *J. gossypifolia*, los cuales mostraron importante actividad coontra *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* y en su conclusión mencionan que *J. gossypifolia* mostró una actividad similar a la de mycoten, (clotrimazol 1%) y que por lo tanto, puede ser utilizada de manera alternativa para el tratamiento de padecimientos causados por las especies de *Trichophyton*.

En cuanto a los compuestos purificados, tres de los cuatro compuestos correspondieron a terpenos. Los terpenos son el mayor grupo de fitoquímicos que presentan diversas funciones en la mediación de las interacciones antagónicas y benéficas en y entre, los organismos. El género *Jatropha* perteneciente a la familia Euphorbiaceae ha sido identificado como un género rico en terpenos (Devappa, 2010), en la actualidad han sido aislado cerca de 68 diterpenos, cuya actividad biológica varía desde actividad antitumoral y antimicrobiana *in vitro* y en su mayoría muestran actividad citotóxica, algunos otros compuestos muestran actividad antitumoral (Seigler, 1994; Devappa et al., 2010). Estos hallazgos sostienen la hipótesis planteada en este trabajo.

Citlaltirione es un diterpeno epoxitrión ($C_{20}H_{26}O_4$) aislado por primera vez de las raíces y tallos de *Jatropha dioica* Var. *Sessiflora* (Villarreal y Domínguez, 1988), este compuesto también ha sido aislado de *J. interregima* y *J. gossypifolia* y no se ha determinado si presenta alguna actividad biológica, sin embargo esta estructura está estrechamente relacionada a jatrofatrion/jatrofon, y debido a que jatrofone tiene actividad antitumoral *in vitro*, citlaltirione se ha convertido en un compuesto interesante para el desarrollo de nuevos agentes anticarcinógenos (Davappa et al., 2010).

β -Sitosterol es un compuesto químico que pertenece al grupo de los fitosteroles, que son los esteroides que se encuentran de forma natural en las plantas. Su estructura química es muy similar a la del colesterol. Es extremadamente insoluble en agua y pobremente soluble en lípidos. Químicamente β -sitosterol es muy parecido al colesterol, difiere por la presencia de un grupo etílico en el carbono 24. El β -sitosterol es probablemente el esteroide de plantas más abundante y ampliamente distribuido por lo que es común su aislamiento en extractos de origen vegetal (Awada et al., 2007).

La cuantificación de los compuestos con actividad antimicrobiana AxV1 y AxV2 por HPLC, indicó una mayor concentración de estos metabolitos en los rizomas que en los tallos y que los rizomas de Cadereyta presentan la mayor cantidad de estos. Este resultado era esperado ya que la concentración de los metabolitos secundarios en las plantas varía entre órganos, tejidos y estadios de desarrollo, y están directamente influenciados por los factores ambientales tales como temperatura, nutrientes, humedad del suelo y concentración atmosférica de CO_2 (Sharafzadeh y Ordookhan, 2011)

Respecto a la mayor concentración en los rizomas que en los tallos, otros estudios fitoquímicos de las especies de *Jatropha* han resultado en el aislamiento de varios tipos de diterpenoides principalmente de las raíces de estas plantas (Kupchan et al., 1970; Torrance et al., 1976; Naengchomnong et al., 1986; Villarreal et al., 1988) incluso el uso etnobotánico recomendado de *J. dioica* indica que la raíz (rizoma) es preferentemente utilizado (Martínez, 1991; González, 2004; Readers's Digest México, 1987).

Respecto a las diferencias en la concentración en las dos poblaciones estudiadas, la mayor concentración del compuesto AxV1 en la población de Cadereyta, puede estar

directamente relacionado a las condiciones ambientales contrastantes y al diferente grado de estrés hídrico de ambas zonas.

Las plantas están sujetas constantemente a condiciones adversas tales como: sequía, inundación, temperaturas extremas, sales excesivas, metales pesados, irradiación de alta intensidad e infecciones por agentes patógenos. Dada su inmovilidad, deben ajustarse en forma necesaria, tanto estructural como metabólicamente, para poder responder a las condiciones de estrés. El estrés es considerado una desviación significativa de las condiciones óptimas de vida, que induce cambios. En primera instancia son reversibles, pero también pueden ser permanentes (Rodríguez y García, 2003).

Ahora bien, el estrés hídrico se define como el potencial hídrico celular y/o la turgencia de la célula son reducidos por debajo de sus valores óptimos, o también se define como la condición en la que la falta de agua ocurre por periodos suficientes para producir un déficit hídrico, dando lugar a alteraciones en procesos fisiológicos.

Por ejemplo Goran et al. (2010), hicieron un estudio comparativo de la planta medicinal “palo de San Juan” (*Hypericum perforatum*), comparando plantas provenientes de dos localidades con diferentes condiciones ambientales colectadas durante varios periodos. Los resultados presentados en su estudio sugieren que la acumulación de los metabolitos secundarios de esta planta dependen de la localidad y el periodo de muestreo. Sus resultados sugieren que temperatura y la luz son factores ambientales importantes que optimizan la producción de los metabolitos secundarios, a mayor temperatura (25- 40°C e intensidades de luz de 923 a 1780 μmol m⁻²s⁻¹) existen cambios significantes en la concentración de los compuestos estudiados (Vandana y Pawan, 2007; Goran et al., 2010; Li et al., 2011).

El déficit de agua usualmente inhibe el crecimiento y la productividad debido a la limitación del intercambio de gases y la inhibición de la fotosíntesis (Cai et al., 2007; Li et al., 2009 en Li et al., 2011). Ante esto, las condiciones contrastantes de Cadereyta donde el clima es del tipo semiseco templado (BS1k). La temperatura promedio del municipio es 15.9°C y un rango de precipitación de 302-535mm. (CNA, 2004. Registro Mensual de Temperatura Media en °C, INEGI, 2010). Registrándose temperaturas extremas de varios grados bajo cero por las mañanas y hasta 55°C a medio día, en el área de estudio (Sánchez y Suzán, 2008).

En contraste con la el municipio de Querétaro, Qro., donde el clima Semiseco templado (BS1kw) con un rango de temperatura de 18°C y un rango de precipitación de 500-700 mm. Por lo que si bien la acumulación abundante del compuesto AxV1 en los rizomas de Cadereyta pueden estar directamente asociados al el estrés hídrico, también existe la posibilidad de estar asociado al tipo de suelo y otros factores que no fueron analizados en este estudio.

9. Conclusiones

Se encontró que los extractos, fracciones y compuestos obtenidos de *J. dioica* poseen actividad antimicrobiana ante las cepas de importancia médica ensayadas.

Los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) muestran que los extractos de diclorometano y metanol de *J. dioica* presentaron actividad antifúngica importante, mientras que contra bacterias su actividad no fue tan notoria y que los rizomas presentaron mayor actividad que los tallos contra las cepas seleccionadas.

Con el estudio químico biodirigido del extracto de diclorometano se lograron purificar los compuestos AxV1, AxV2, Citlaltirione y β -Sitosterol. El compuesto AxV1 presentó actividad antimicrobiana *in vitro* contra el dermatofito *Trichophyton rubrum* (0.050 μ g/ml) y contra *Aspergillus niger* (200 μ g/ml), así como contra las bacterias Gram + *Staphylococcus aureus* (100 μ g/ml) y *Salmonella typhi* (100 μ g/ml). El compuesto AxV2 presentó actividad contra *Trichophyton rubrum* a (200 μ g/ml). El compuesto Citlaltirione, no presentó actividad antimicrobiana contra las cepas probadas.

Las pruebas de cuantificación de los compuestos con actividad antimicrobiana AxV1 y AxV2 indican que el compuesto AxV1 fue más abundante en los rizomas que en los tallos y que existen diferencias en la concentración en las dos poblaciones estudiadas, teniendo una mayor concentración del compuesto AxV1 en la población de Cadereyta, Qro.

Nuestros resultados permiten concluir que los extractos de diclorometano de *J. dioica* exhibieron actividad antimicrobiana importante particularmente obtenida de los rizomas de esta planta, lo cual apoya el uso tradicional del tratamiento de algunas enfermedades como agente antimicrobiano. Esto explica el uso de esta plantas por personas de alrededor de 18 Estados de la República Mexicana contra varios tipos de padecimientos que involucran microorganismos.

10. Perspectivas

Este trabajo ha indicado que los extractos tienen la aplicación potencial (principalmente el compuesto Ax-V1) y que hay justificación para el uso de estas plantas como antimicrobiano contra varios tipos de padecimientos que involucran microorganismos, principalmente en el tratamiento de dermatofitos causados por *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*, sin embargo es conveniente mencionar que es necesario ampliar esta investigación para analizar su potencial como fitofármaco.

11. Bibliografía

Abbott, D., Andrews R.S. 1983. Introducción a La Cromatografía.-- 3a Reimp. Madrid, Esp. : Alhambra.

Abrescia F.F., Falda A., Caramaschi G., Scalzini A., Gobbi F., Angheben A., Gobbo M, Schiavon R., Rovere P., Bisoffi Z. 2009. *Salmonella enterica* Serovar Typhi with CTX-M β -Lactamase, Germany. Emerging Infectious Diseases 15(9):1533-1535.

Adamu H.M, Abayeh O.J., Agho M.O., Abdullahi, A.L., Uba A., Dukku H.U. Wufem B.M. 2005. An ethnobotanical survey of Bauchi State herbal plants and their antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology 99:1-4.

Adejumo T.O, Bamidele B.S. 2009. Control of dermatophyte-causing agents (*Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*) using six medicinal plants. Journal of Medicinal Plants Research 3(11):906-913.

Aiyelaagbe O.O. 2000. Antibacterial activity of *Jatropha multifida* Roots. Fitoterapia 72:544-546.

Aiyelaagbe O.O., Adesogan K., Ekundayo O., Gloer J.B. 2007. Antibacterial diterpenoids from *Jatropha podagrica* Hook. Phytochemistry 68:2420-2425.

Aiyelaagbe O.O., Oguntuase B.J. Arimah B.D. y Adeniyi B.A. 2008. The antimicrobial activity of *Jatropha multifida* extracts and chromatographic fractions against sexually transmitted infections. J. Med. Sci 8(2):143-147.

Alanís-Garza B.A., González-González G.M., Salazar-Aranda R., Waksman de Torres N y Rivas-Galindo V.M. 2007. Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico. Journal of Ethnopharmacology 114:468-471.

Alonso I.M.R., Silva L.M.C., Zacapala G.A.E., Barrios C.A., Muñoz C.M.S. 2009. Frecuencia de Infecciones Bacterianas de Heridas Quirúrgicas en dos Hospitales de Chilpancingo, Guerrero. Medigrafic 34:99.

Andrade-Cetto A., Heinrich M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. Journal of Ethnopharmacology 99:325-348.

Andrews M.J. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 48:S1.

Arechavala A.I., Bianchi M.H., Robles A.M., Santiso G., Negroni R. 2007. Identificación y sensibilidad frente a fluconazol y albiconazol de 100 cepas de levaduras aisladas de flujo vaginal. Revista Iberoamericana de Micología 24: 305-308.

Arenas R. 2002. Dermatofitosis en México. Revista Iberoamericana de Micología 19: 63-67.

Arenas R., Bonifaz A., López M. 1999. 1er Consenso Micosis Superficiales. Dermatología Rev Mex 43: 80-88. En Arenas R. 2002. Dermatofitosis en México. Revista Iberoamericana de Micología 19: 63-67.

Arenas R., Bonifaz A., López Martínez R., Estrada R. 2001. Revisión del 1er Consenso Nacional de Prevención, diagnóstico y tratamiento de micosis superficiales. Facultad de Medicina UNAM 2001:1-64.

Awada A.B., Chinnama M., Finka C.S., Bradford P.G. 2007. β -Sitosterol activates Fas signaling in human breast cancer cells. *Phytomedicine* 14:747-754.

Baquero, F., 1997. Gram-positive resistance: Challenges for the development of new antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 39, 1-6.

Blanco B.S., Manuel M.E., Sierra P.M., Giménez C.E., Pascual E.M. 2002. Aspergilosis cutánea secundaria en paciente inmunodeprimido. *Actas Dermosifiliogr* 93(8):511-3.

Botz L, Nagy S, Kocsis B. 2001. Detection of Microbiologically Active Compounds. En: Colorado R.J., Galeano J.E., Martinez M.A. 2007. Desarrollo de la bioautografía directa como Método de referencia para evaluar la actividad Antimicrobiana de la gentamicina contra *Escherichia coli*. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 14(1):67-71.

Brown K. 2004. Penicillin Man: Alexander Fleming and the Antibiotic. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Book reviews. 444-445.

Buscemi L., Arechavala A., Negroni R. 2004. Estudio de las vulvovaginitis agudas en pacientes adultas, sexualmente activas, con especial referencia a la candidiasis, en pacientes del Hospital de Infecciosas F.J. Muñiz. *Revista Iberoamericana de Micología* 21: 177-181. En Arechavala A.I., Bianchi M.H., Robles A.M, Santiso G. Negroni R. 2007. Identificación y sensibilidad frente a fluconazol y albaconazol de 100 cepas de levaduras aisladas de flujo vaginal. *Revista Iberoamericana de Micología* 24:305-308.

Bye Jr. R.A. 1986. Medicinal Plants of the Sierra Madre: Comparative Study of Tarahumara and Mexican Market Economic Botany. 40(1):103-124.

Cai, H., Biswas, D.K., Shang, A.Q., Zhao, L.J., Li, W.D. 2007. Photosynthetic Response to Water Stress and Changes in Metabolites in *Jasminum samba*. *Photosynthetica* 45: 503-509. En Li W. D., Hou J. L., Wang W. Q., Tang X. M., Liu C. L., Xing D. 2011. Effect of Water Deficit on Biomass Production and Accumulation of Secondary Metabolites in Roots of *Glycyrrhiza uralensis*. *Russian Journal of Plant Physiology* 58(3):538-542.

Calderwood S, Moellering D Jr.1988. Principios de tratamiento antiinfeccioso. En: Stein LH. *Medicina interna*. 2 ed. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1469-86. En Cordiés L.J., Machado R.L.A., Hamilton C.M.L. 1998. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Medica* 8(1):13-27.

Canales M., Hernández T., Caballero J., Romo de Vivar A., Avila G., Duran A. y Lira R. 2005. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology* 97:429-439.

Capoor, M.R., Nair D., Aggarwal P., Mathys V. Dehem M., Bifani P.J. 2007. Salmonella enterica Serovar Typhi: Molecular Analysis of Strains with Decreased Susceptibility and Resistant to Ciprofloxacin in India from 2001-2003. The Brazilian Journal of Infectious Diseases 11(4):423-425.

Cazes J., Scott R.P.W. 2002. Chromatography Theory. New York, Marcel Dekker.

CNA. 2004. Registro Mensual de Temperatura Media en °C. Inédito en INEGI fuente c22004_01.xls INEG. Temperaturas medias registradas de 1963 a 2000.

Chopra I., Hodgson J., Metcalf B., Poste G., 1996. New approaches to the control of infections caused by antibiotic resistant bacteria. An industry perspective. Journal of the American Medical Association 275, 401-403.

Colorado R.J., Galeano J.E., Martinez M.A. 2007. Desarrollo de la bioautografía directa como método de referencia para evaluar la actividad Antimicrobiana de la gentamicina contra *Escherichia coli*. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica 14(1):67-71.

CONAPO. 2010. Secretaría General del Consejo Nacional de Población. Principales causas de mortalidad en México 1980 – 2007. Documento de Trabajo para el XLIII Periodo de Sesiones de la Comisión de Población y Desarrollo “Salud, morbilidad, mortalidad y desarrollo”. Nueva York. Pp 1-59.

Cordiés L.J., Machado R.L.A., Hamilton C.M.L. 1998. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. Acta Medica 8(1):13-27.

Coto C. 2005. La globalización y el renacimiento de las enfermedades infecciosas. Revista química viva. Núm. 1. Vol 4. PP. 36. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

Das K., Tiwari R. K. S., Shrivastava D. K. 2010. Review Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. Journal of Medicinal Plants Research 4(2):104-111.

Deive, C.E., 1979. Vodú y Magia en Santo Domingo. Museo del Hombre Dominicano, Santo Domingo, Dominican Republic, pp. 427 pp. En Ososki A.L, Lohr P, Reiff M, Balick M.J., Kronenberg F., Fugh-Berman A., O'Connor B. 2002. Ethnobotanical literature survey of medicinal plants in the Dominican Republic used for women's health conditions. Journal of Ethnopharmacology 79:285–298.

Denton W.R., Wayne W.H., Chadwick I.A., McLean H.J., William F.R. 2001. New diterpens from *Jatropha divaricata*. Journal Natural Products. (64): 829-931.

Devappa K.R., Makkar P.S.H., Becker K. 2010. *Jatropha* Diterpenes: a Review. Journal of Am Oil Chemical Society.

Domínguez X.A., Rojas P., Collins V., Morales M.d.R. 1960. A Phytochemical Study of Eight Mexican Plants. Economic Botany 14(2):157-159.

Eckert L.O., Hawes S.E., Stevens C.E., Koutsky L.A., Eschenbach D.A., Colmes K.K. 1998. Vulvovaginal candidiasis: clinical manifestations, risk factors, management algorithm. *Obstetric Gynecology* 92: 757-765. En Arechavala A.I., Bianchi M.H., Robles A.M, Santiso G. Negróni R. 2007. Identificación y sensibilidad frente a fluconazol y albaconazol de 100 cepas de levaduras aisladas de flujo vaginal. *Revista Iberoamericana de Micología* 24: 305-308.

EFSA (2007). European Food Safety Authority. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2006. Disponible en: http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/DocumentSet/Zoon_report_2006_en,0.pdf?ssbinary=true [acceso: 10-11-2009].

EFSA (2009). European Food Safety Authority. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union.

Farzana k., Noreen S., Nasir B., Azhar S., Mumtaz A., Sethi A., Asad, M.H.B, Khan B. A., Khan S. A., Murtaza G. 2011. Comparative analysis of minimum inhibitory concentration of various brands of cephalosporin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Scientific Research and Essays* Vol. 6:31.

Ferreira L. M.R., Souza L.J., Feitosa dos Santos A, Caño de Andrade M.A., Goulart Sant'Ana A.E., Genet J-P., Marquez B., Neuville L., Moreau N. 2006. Antibacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 105:137-147.

Forman D. 1991. *Helicobacter pylori* Infection: A Novel Risk Factor in the Etiology of Gastric Cancer *Journal of the National Cancer Institute* 83:23-26.

Foxman B. 1990. The epidemiology of vulvovaginal candidiasis: Risk factors. *American Journal Public Health* 80: 329-331. En Arechavala A.I., Bianchi M.H., Robles A.M, Santiso G. Negróni R. 2007. Identificación y sensibilidad frente a fluconazol y albaconazol de 100 cepas de levaduras aisladas de flujo vaginal. *Revista Iberoamericana de Micología* 24: 305-308.

Frei B., Baltisberger M., Sticher O., Heinrich M. 1998. Medical ethnobotany of the Zapotecs of the Isthmus-Sierra (Oaxaca, Mexico): Documentation and assessment of indigenous Uses. *Journal of Ethnopharmacology* 62:149-165.

García H.M, García S.D., Copolillo E.F., Cora E.M., Barata A.D., Vay C.A., Torres R.A., Tiraboschi N., Famiglietti A.M.R. 2006. Prevalencia de candidiasis vaginal en embarazadas. Identificación de levaduras y sensibilidad a los antifúngicos. *Revista Argentina de Microbiología* 38: 9-12. En Arechavala A.I., Bianchi M.H., Robles A.M, Santiso G. Negróni R. 2007. Identificación y sensibilidad frente a fluconazol y albaconazol de 100 cepas de levaduras aisladas de flujo vaginal. *Revista Iberoamericana de Micología* 24: 305-308.

González E. M., López E.I.L., González E.S.M., Tena F.J.A. 2004. Plantas Medicinales del Estado de Durango y zonas aledañas. CIDIR Durango. Instituto Politécnico Nacional. México. Dirección de Publicaciones del Instituto Politécnico Nacional.

Goodman G. A., Goodman LS. 1982. Las bases farmacológicas de la terapéutica. La Habana: Editorial Científico- Técnica 2:1062-1165. En Cordiés L.J., Machado R.L.A., Hamilton C.M.L. 1998. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. Acta Medica 8(1):13-27.

Goran S., Nikolic G.S., Zlatkovic S.Z. 2010. Assaying the variation in secondary metabolites of St. John's wort for its better use as an antibiotic. Journal of Medicinal Plants Research 4(3):211-224.

Gutiérrez-Cogco L., Montiel-Vázquez E., Aguilera-Pérez P., González-Andrade M.C. 1996. Serotipos de identificados en los servicios de salud de México. J. Med. Microbiol 44: 317-319.

Hernández H.F, Manzano G.P., Córdova M.E., Mendez T.L.J. López M.R., García de Acevedo B., Orozco T.R., Cerbón M.A. 2007. Morphological varieties of *Trichophyton rubrum* clinical isolations. Revista Mexicana de micología. 25:9-14.

Hernández-Cañaveral I., Becerra G., Jiménez-Cordero A., Jean-Baptiste M., Plascencia A., Domínguez-Hernández M. 2009. *Candida albicans* isolated from human fungaemia induces apoptosis in an experimental endocarditis model. Memorias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 104(6): 858-861.

Hodoshima N. Y., Nakano Y., Izumi M., Mitomi N., Nakamura Y., Auki M., Gyobu A., Shibasaki S., Kurosawa T. 2004. Protective effect of inactive ingredients against nephrototoxicity of vancomycin hydrochloride in rats. Drug Metab Pharmacokinet 19 (1): 68-75.

Hoogesteger C. 1994. Uso de plantas medicinales. Árbol Editorial, S.A. de C.V. México, DF 5ta reimpresión.

Horváth G. B KocsisB., Botz L., Németh J. Szabó, L. 2002. Acta Biologica Szegediensis. Antibacterial activity of Thymus phenols by direct bioautography 46(3-4):145-146.

IPNI, 2012. International Plant Names Index. <http://data.gbif.org/species/142554>
65. Global Biodiversity Information Facility.

Jawetz E. 1989. Manual de microbiología médica. 9ed. México, DF: Editorial El Manual Moderno, SA. de CV. 110-53. En Cordiés L.J., Machado R.L.A., Hamilton C.M.L. 1998. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. Acta Medica 8(1):13-27.

Jawetz E., Melnick J., Adelberg E. Editores Brooks G.F., Butel S., Morse S.A. 2002. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 17ª. Edición traducida de la decimoséptima edición en Inglés. Editorial el Manuel Moderno, México.

Jensen U., Vogel-Bauer I., Nitschke M. 1994. Leguminlike Proteins and the Systematics of the Euphorbiaceae. Annals of the Missouri Botanical Garden 81(2):160-179.

Kumar V.P., Chauhan N.S., Padh H, Rajani M. 2006. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 107:182–188.

Li W. D., Hou J. L., Wang W. Q., Tang X. M., Liu C. L., Xing D. 2011. Effect of Water Deficit on Biomass Production and Accumulation of Secondary Metabolites in Roots of *Glycyrrhiza uralensis*. *Russian Journal of Plant Physiology* 58(3):538-542.

Li, W.D., Biswas, D.K., Xu, H., Xu, C.Q., Wang, X.Z., Liu, J.K., Jiang, G.M. 2009. Photosynthetic Responses to Chromosome Doubling in Relation to Leaf Anatomy in *Lonicera japonica* Subjected to Water Stress, *Function Plant Biology* 36: 783-792. En Li W. D., Hou J. L., Wang W. Q., Tang X. M., Liu C. L., Xing D. 2011. Effect of Water Deficit on Biomass Production and Accumulation of Secondary Metabolites in Roots of *Glycyrrhiza uralensis*. *Russian Journal of Plant Physiology* 58(3):538-542.

Lot A., Chiang F. (compiladores). 1986. Manual de herbario. Administración y manejo de colecciones, técnicas de recolección y preparación de ejemplares botánicos. Consejo Nacional de Flora de México. A.C. México. 142 pp.

Madureira A.M., Maria-José F., Nora G., Katalin U., José R. A., Pedro M. A., Judith H. Joseph M. 2004. Rearranged Jatrophone type diterpenes from Euphorbia species: evaluation of their effects on the reversal of multidrug resistance. *Planta Médica* (70): 45-49.

Manzanero-Medina G.I., Flores-Martínez A., Sandoval-Zapotitla E. y Bye-Boettler R. 2009. Etnobotánica de siete raíces medicinales en el mercado de Sonora de la ciudad de México. *Polibotánica* 27: 191-228.

Marquez B., Neuville L., Moreau N.J., Genet J.P., Feitosa dos Santos A., Caño de Andrade M.C. y Goulart Sant-Ana A.E. 2005. Multidrug resistance reversal agent from *Jatropha elliptica* *Phytochemistry* 66 (2005) 1804-1811.

Martínez M. 1991. Las plantas Medicinales de México. 6ta Edición. Librería y Ediciones Botas, S.A. México, DF. Pp. 285-286.

Martínez, M.; Matuda E. 1979. Flora del Estado de México. Biblioteca del Gobierno del Estado (tres tomos). Gobierno del Estado de México. Toluca. México. En Manzanero-Medina G.I., Flores-Martínez A., Sandoval-Zapotitla E. y Bye-Boettler R. 2009. Etnobotánica de siete raíces medicinales en el mercado de Sonora de la ciudad de México. *Polibotánica* 27: 191-228.

Masoko P., Eloff J.N. 2005. The diversity of antifungal compounds of six South African Terminalia species (Combretaceae) determined by bioautography. *African Journal of Biotechnology* 4(12):1425-1431.

McVaugh R. 1945. The Genus *Jatropha* in America: Principal Intrageneric Groups. *Bulletin of the Torrey Botanical Club. Torrey Botanical Society.* 72(3) 271-294.

Moglia, J.C., Castiglione M.C. 2008. Microdosis de plantas medicinales: Una alternativa para la utilización sustentable de los recursos vegetales del Bosque Chaqueño *Revista de Ciencias Forestales Quebracho.*15:64-67.

Morfín O.R., Esparza A.S., Atilano D.G., Pinto T.P., Heredia C.J., Rodríguez C.J.J., Rodríguez N.E. 1999. Tendencias de Resistencia en Enterococos: 1991-1999. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 19(5):222-225.

Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. 2009. *Microbiología médica*. Sexta edición. Elsevier.

Naengchomnong W., Thetaranonth Y., Wiriyachitra P., Okamoto K.T., Clardy, J. 1986. Isolation and structure determination of two novel lathyrane from *Jatropha curcas*. *Tett. Lett.* 27, 5676– 5678. En Olapeju O. Aiyelaagbe O.O., Kayode Adesogan K., Ekundayo O. Gloer J.B. 2007. Antibacterial diterpenoids from *Jatropha podagrica* Hook. *Phytochemistry* 68:2420-2425.

Navarro V., Rojas G., Delgado G., Lozoya X. 1998. Antimicrobial compounds detected in *Bocconia arborea* extracts by a direct bioautographic method. *Archives of Medical Research* 29(2):191-194.

NCID. 2002. National Center for Infectious Diseases. Campaign to prevent antimicrobial resistance in healthcare settings. Centre for Disease Control and Prevention. En Kumar V.P., Chauhan N.S., Padh H, Rajani M. 2006. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 107:182-188.

Nickell L.G. 1959. Antimicrobial Activity of Vascular Plants. *Economic Botany* 13(4):281-318.

Nostro A, Germano MP, D'Angelo V, Marino A, Cannatelli, MA. 2000. Extraction Methods and Bioautography for Evaluation of Medicinal Plant Antimicrobial Activity. *Lett Appl Microbiol* 30: 379-384. En Colorado R.J., Galeano J.E., Martinez M.A. 2007. Desarrollo de la bioautografía directa como Metodo de referencia para evaluar la actividad Antimicrobiana de la gentamicina contra *Escherichia coli*. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 14(1):67-71.

Olapeju O. Aiyelaagbe O.O., Kayode Adesogan K., Ekundayo O. Gloer J.B. 2007. Antibacterial diterpenoids from *Jatropha podagrica* Hook. *Phytochemistry* 68:2420-2425.

OMS, 2001. Organización Mundial de la Salud. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2

Ososki A.L, Lohr P., Reiff M., Balick M.J., Kronenberg F., Fugh-Berman A., O'Connor B. 2002. Ethnobotanical literature survey of medicinal plants in the Dominican Republic used for women's health conditions. *Journal of Ethnopharmacology* 79:285–298.

Pardo C. E. 2006. *Compendio de Epidemiología*. Universidad Nacional agraria. Nicaragua.

Pertino M., Schmeda-Hirschmann G., Rodríguez J.A., Theoduloz C. 2007. Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from the Paraguayan crude drug "yagua rova" *Jatropha isabelli*. *Journal of Ethnopharmacology* 111:553-559.

Perwez S.H., Lorne J.H., Curtis C.H. 2003. Review Radical Causes of Cancer. Nature 3:1. Pp 276.

Phillipson J.D. 1994. Natural Products as drugs. Transaction of the royal society of tropical medicine and hygiene. 88, supplement 1:17-19.

Quer F. 1982. Diccionario de Botánica. Editorial Labor, S. A. España.

Quintaes R.B., Nilma C., Leal C.N, Eliane M. F., Reis M.F.E., Érica L., Fonseca L.E., Hofer E. 2002. Conventional and Molecular Typing of *Salmonella typhi* Strains From Brazil. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo 44(6):315-319.

Ramírez L.E. Castaño D.M. 2009. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia et Technica XV(42):263-268.

RDM. 1987. Reader's Digest México. Plantas Medicinales. Virtudes insospechadas de plantas conocidas. Selecciones Reader's Digest México, S.A. de C.V., México. Pp. 299.

Rinaldi M.G. 2000. Dermatophytosis: Epidemiological and microbiological update. J Am Acad Dermatol 43(5):120-124. En Hernández H.F, Manzano G.P., Córdova M.E., Mendez T.L.J. López M.R., García de Acevedo B., Orozco T.R., Cerbón M.A. 2007. Morphological varieties of *Trichophyton rubrum* clinical isolations. Revista Mexicana de micología. 25:9-14.

Rodríguez N. E., Morfín O.R. 1999. Resistencia de *Staphylococcus aureus* a la vancomicina. El manejo de las infecciones producidas por esta bacteria se dificulta. Enfermedades Infecciosas Y Microbiología 19(5):219-21.

Rodríguez-Ángeles G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública Mexico. 44:464-475.

Romero C.R. 2010. Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana.

Rouessac F., Rouessac A. 2000. Análisis Químico: Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas. España. McGraw-Hill.

Rubinson J.F., Rubinson; K.A. 2000. Química Analítica Contemporánea. México. Pearson Educacion.

Rzedowski, G.C. de Rzedowski. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. Segunda edición. Instituto de Ecología A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

Sánchez G.A., Suzán A.H. 2008. Análisis de las condiciones bióticas y abióticas relacionadas a la distribución espacial de *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum (Cactaceae). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro.

Sánchez M.E., Cháves M.R.J., Hernández O.J.G. y Hernández M.M.M. 2006. Especies de Cactaceae prioritarias para la conservación en la zona árida Querétaro Hidalguense. Manual de Proyecto. Jardín Botánico Regional de Cadereyta "Ing. Manuel González de Cosío". Pp. 214-216.

Sánchez-Vargas L.O., Ortiz-López N.G., Villar M., Moragues M.D., Aguirre J.M., Cashat-Cruz M., López-Ribot J.L., Gaitán-Cepeda L.A., Quindós G. 2005. Oral Candida Isolates Colonizing or Infecting Human Immunodeficiency Virus-Infected and Healthy Persons in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology* 43(8): 4159-4162.

Schwalbe R.S, Stapleton J.T., Gilligan P.H. 1987. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *New England Journal of Medicine* 316:927-31.

Seigler D.S. 1994. Phytochemistry and Systematics of the Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 81(2):380-401.

Sharafzadeh S., Ordookhan K. 2011. Influence of Carbon Dioxide Enrichment on Accumulation of Secondary Metabolites in Plants. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(11): 681-1686.

Skoog, D. A. 1990. *Química Analítica*. Madrid, Esp. Mcgraw-Hill.

Stock R., Rice C.B.F. 1974. *Chromatographic Methods*. New York, USA: Chapman and Hall.

Torrance, S.T., Wiedhopf, R.M., Cole, JR., Arora, S.K., Bates, R.B., Beavers, W.A., Cutler, R.S., 1976. Antitumor agents from *Jatropha macrorhiza* (Euphorbiaceae). II. Isolation and characterization of Jatrophatrione. *J. Org. Chem.* 41, 1855–1857. En Olapeju O. Aiyelaagbe O.O., Kayode Adesogan K., Ekundayo O. Gloer J.B. 2007. Antibacterial diterpenoids from *Jatropha podagrica* Hook. *Phytochemistry* 68:2420-2425.

UNAM, 2009. D.R. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Hecho en México. http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/indice_alfa.php?letra=J&dato=a.

Vandana V., Pawan K.K. 2007. Variations in secondary metabolites in some arid zone medicinal plants in relation to season and plant growth. *Indian Journal of Plant Physiology* 12(2):203-206.

Villarreal A.N., Domínguez X.A. 1988. Citlalitrione, a new diterpene from *Jatropha dioica* Var. Sessiflora. *Journal of Natural Products* 51(4):749-753.

Wang Y.C., Lipsitch M. 2006. Upgrading Antibiotic Use within a Class: Tradeoff between Resistance and Treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(25): 9655-9660.

Waterman P.G., Mole S. 1994. *Analysis of phenolic metabolites*. London, U K: Blackwell Scientific. En Izhaki I. 2002. Emodin: A Secondary Metabolite with Multiple Ecological Functions in Higher Plants. *New Phytologist*, 155(2):205-217.

WHO report 2002. <http://www.who.int/infectious-disease-report/idr99-spanish/pages/textonly.html#ch2>

Wink M, S. 1999. Modes of action of defensive secondary metabolites. In: Wink M, ed. Functions of plants secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. Sheffield, UK: Sheffield Academic Press, 17-133. En Izhaki I. 2002. Emodin: A Secondary Metabolite with Multiple Ecological Functions in Higher Plants. *New Phytologist*, 155(2):205-217.

Wisplinghoff H. 2000. Nosocomial bloodstream infections in us hospitals. En Murray P.R., Rosenthal K.S., Tenover F.C., Tenover P.C. 2003. *Microbiología médica*. Sexta edición. Elsevier.

Zaidi, M.B; López, M.C.; Calva, E. 2006. Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Revista latinoamericana de microbiología* 48(2):121-125.

12. Anexo

1. Deshidratación del material biológico

Las 289 plantas completas colectadas en Cadereyta sumaron un total de 14.164 kg que al ser deshidratado se obtuvieron 3.486kg, con un rendimiento total de 24.6% (Tabla 6). Para la colecta de Querétaro, se obtuvo un total de 12,819kg de material fresco proveniente de las 242 plantas completas que al deshidratarse sumaron un total de 3.849kg con un rendimiento del 30.03% (Tabla 7). La diferencia de rendimiento total deshidratado y el material total colectado indica que en promedio, el material colectado en Cadereyta contenía mayor humedad que el colectado en Querétaro con un 75.4% y 69.9% respectivamente.

Colecta Cadereyta (289 plantas)			
	Hidratado (g)	Deshidratado (g)	Rendimiento %
Rizoma rojo	4,279.63	895.91	20.93
Tallo rojo	3,362.06	948.25	28.20
Hojas	-	32.41	0.96
Rizoma bco	3,254.59	881.68	27.09
Tallo bco	3,267.75	694.01	21.24
Hojas	-	34.19	1.05
Totales	14,164.03	3,486.45	24.61

Tabla 1. Deshidratación de las 289 plantas completas colectadas en el municipio de Cadereyta, Qro.

Colecta Querétaro (242 plantas)			
	Hidratado (g)	Deshidratado (g)	Rendimiento %
Rizoma rojo	5,778.8	1,842.51	31.88
Tallo rojo	4,186.6	1,159.2	27.69
Hojas rojo	-	42.6	1.02
Rizoma bco	1,555.1	452.2	29.08
Tallo bco	1,299.3	336	25.86
Hojas bco	-	17.1	1.32
Totales	12,819.8	3,849.61	30.03

Tabla 2. Deshidratación de las 242 plantas completas colectadas en Querétaro, Qro.

2. Bioautografías

Los cromatogramas de los extractos metanólicos muestran que los rizomas y tallos de ambas zonas de colecta comparten compuestos y son similares entre sí. La bioautografía de los 8 extractos obtenidos muestra la presencia de dos zonas de inhibición, a) una polar que está presente en todos los compuestos localizado en la parte medianamente polar y b) una con más actividad, localizada en la parte menos polar del cromatograma y que aparece únicamente en los extractos 2 y 4 (rizoma rojo y transparente respectivamente) provenientes de Cadereyta Figura 1.

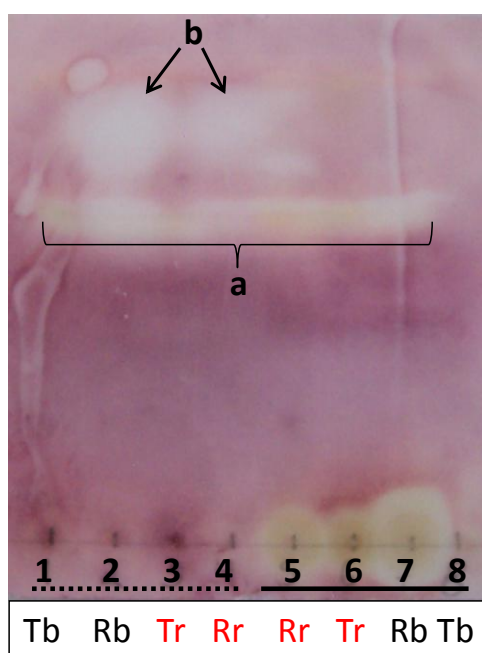


Figura 1. Bioautografía del extracto metanólico de 8 diferentes tejidos donde: T= Tallo, R= Rizoma; b=látex hialino y r=látex rojo. La línea punteada representa a las plantas de Cadereyta y la línea consecutiva a las plantas de Querétaro. Las manchas blancas señaladas como a y b, representan zonas de inhibición del crecimiento microbiano y por lo tanto actividad antimicrobiana de los compuestos.

Las manchas de los compuestos de los extractos de diclorometano observados en el cromatograma muestran que los rizomas de ambas zonas comparten compuestos entre sí y por el tamaño de las manchas probablemente se encuentran en diferentes concentraciones comparando los rizomas de Cadereyta y Querétaro. Los cromatogramas de los tallos muestran por su parte, que son más homogéneos entre sí.

La bioautografía de los 8 extractos muestra la presencia de una mayor número de zonas de inhibición que en los extractos metanólicos, localizándose desde lo poco polar (zona superior de la placa) hasta lo más polar del cromatograma (zona inferior). Hay dos zonas de inhibición predominantes: la primera zona (zona a) se encuentra en la parte

menos polar principalmente en los Rizomas hialinos y rojos de la colecta de Cadereyta. La segunda zona de inhibición (zona b), corresponde a compuestos medianamente polares y está presente en diferente intensidad en todos los extractos figura 2.

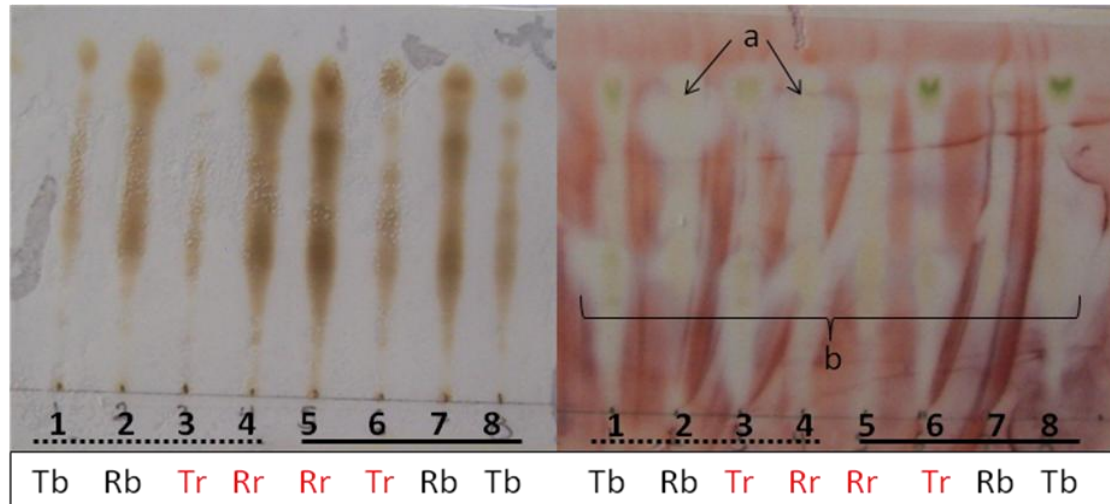


Figura 2. Bioautografía del extracto de diclorometano de 8 diferentes tejidos donde: T= Tallo, R= Rizoma; b= látex hialino y r= látex rojo. La línea punteada representa a las plantas de Cadereyta y la línea consecutiva a las plantas de Querétaro. Las zonas bancas señaladas como a y b indican inhibición del crecimiento de las bacterias.

Columna *Jatropha dioica* 1 (CJd1)

La bioautografía muestra que hay un total de cuatro zonas de inhibición del crecimiento bacteriano: a) en la parte más polar de la fracción CJd1-F3, b) en la zona de polaridad media de las fracciones CJd1-F37, CJd1-F87 y CJd1-F192 donde se concentra la mayor cantidad de los compuestos de estas fracciones c) en la parte más polar de las fracciones CJd1-F37, CJd1-F87, CJd1-F192 y CJd1-F326 y d) una zona de inhibición en la parte más polar de las fracciones CJd1-F735 y CJd1-F441 (Figura 3).

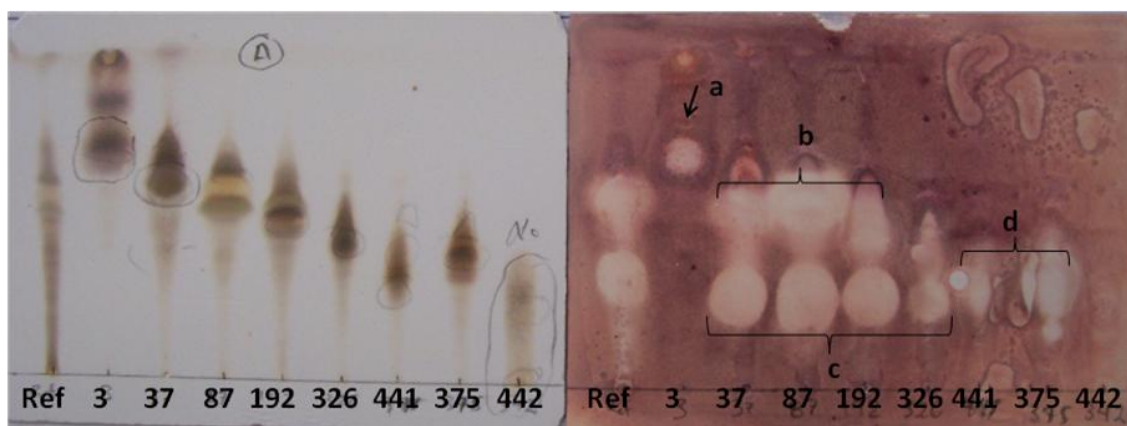


Figura 3. Bioautografía del fraccionamiento del extracto de diclorometano de la columna CJd1. Se presentan 8 de las 11 fracciones obtenidas; a, b, c y d representan zonas de inhibición del crecimiento bacteriano.

Columna *Jatropha dioica* 2 (CJd2)

De las 103 fracciones obtenidas en la columna CJd2, se eligieron las 15 más representativas y fueron probadas para determinar la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana por el método de bioautografía. Los resultados muestran que doce de las quince fracciones muestran actividad, incluyendo el compuesto puro (Tabla 12).

La bioautografía muestra que hay un total de cuatro zonas de actividad antimicrobiana presentando un color blanco que indica la inhibición del crecimiento bacteriano: a) en la parte más polar de la fracción CJd2-F17 y la fracción CJd2-F102, b) los compuestos más polares de las fracciones CJd2-F17 a CJd2-F35 donde predominan dos compuestos (que revelan en amarillo y verde con sulfato sérico), uno de ellos aparece puro en la fracción CJd2-F25, c) el compuesto más polar de la fracción CJd2-F57 y d) los compuestos menos polares de la fracción CJd2-F72 y CJd2-F101 (Figura 7).

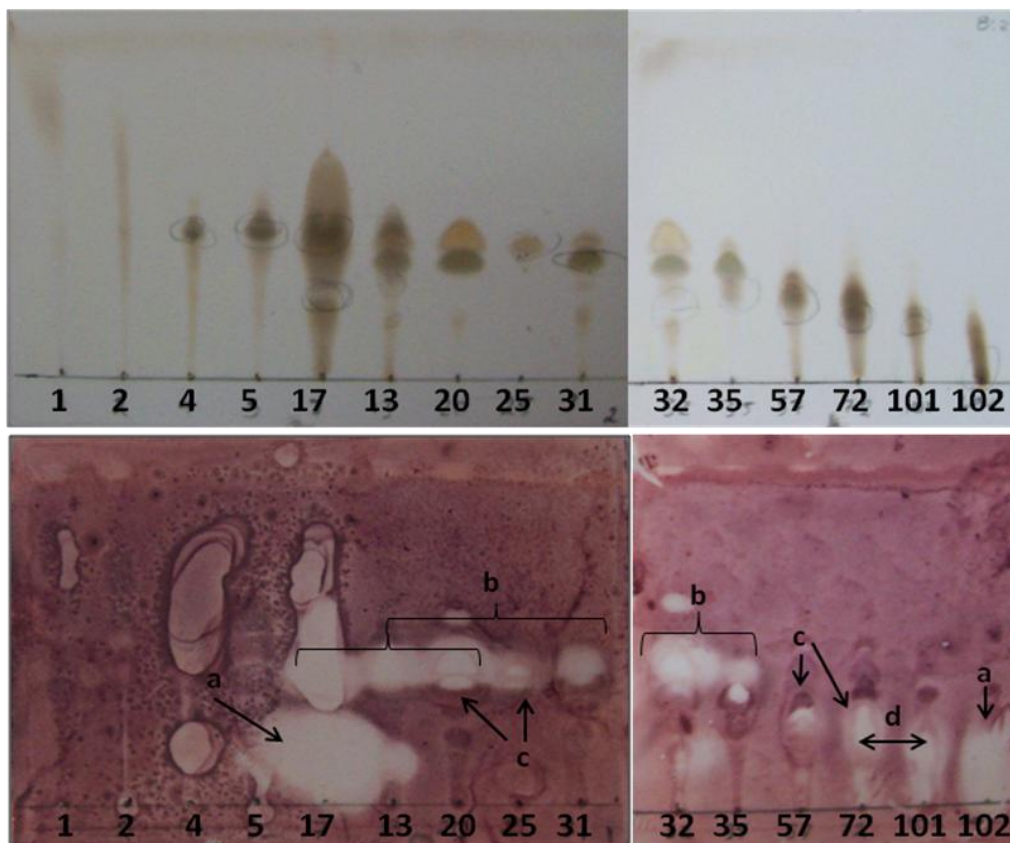


Figura 4. Bioautografía del fraccionamiento del extracto de la columna CJd2. Se presentan las 15 fracciones más representativas de las 103 obtenidas. a, b, c y d representan zonas de inhibición del crecimiento bacteriano.

Columna *Jatropha dioica* 3 (CJd3)

Las fracciones menos polares obtenidas (CJd3-F12 y CJd3-F41) contienen el mismo compuesto que CJd2-F25 por lo que se esperaba la actividad. El compuesto puro de la fracción CJd3-F46 mostro poca actividad antimicrobiana (+) mientras que el compuesto puro de la fracción CJd3-F85 no mostró actividad (Figura 5). Por otro lado, la bioautografía muestra que los compuestos más activos de las fracciones CJd3-F144 a F-187 no se concentran formando una mancha definiendo su polaridad sino que se elongan a lo largo de todo el carril dejando un halo de actividad sobre toda la muestra (Figura 5).

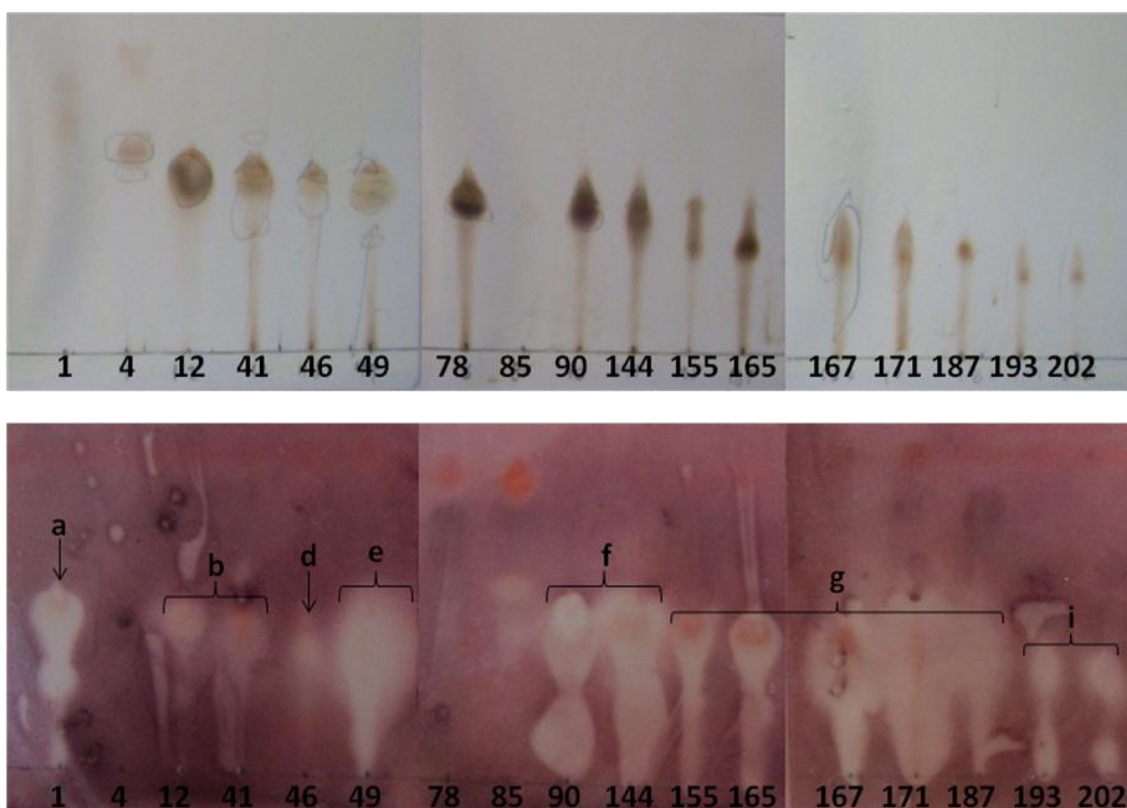


Figura 5. Bioautografía de las fracciones más representativas de la columna CJd3. Se presentan las 15 fracciones más representativas de las 103 obtenidas. a, b, c y d representan zonas de inhibición del crecimiento bacteriano.

Columna *Jatropha dioica* 5 (CJd5)

De las 39 fracciones obtenidas en la columna CJd5, se eligieron las ocho fracciones más representativas para evaluar la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana por el método de bioautografía. Los resultados muestran que siete de las ocho fracciones evaluadas muestran actividad antimicrobiana con diferente intensidad, manifestándose principalmente en las fracciones más polares a partir de la fracción CJd5-F21 a CJd5-

F39 (+++) (Figura 6). Se identifican dos zonas principales de inhibición, a) en las fracciones menos polares CJd5-F11 a F-15 y en la fracción CJd5-F31 que resultó de lavados con hexano de las fracciones CJd5-F28 a F31 y la zona b) cuya actividad al igual que las fracciones F144 a F-187 de la columna 3 se presenta como una línea de inhibición superpuesta sobre todos los compuestos a lo largo de la separación de fracción (Figura 7).

Las fracciones que presentaron la mejor separación de compuestos y que mostraron actividad antimicrobiana (CJd5-F26) fueron reunidas y se incluyeron en una nueva columna de separación cromatográfica (CJd6).

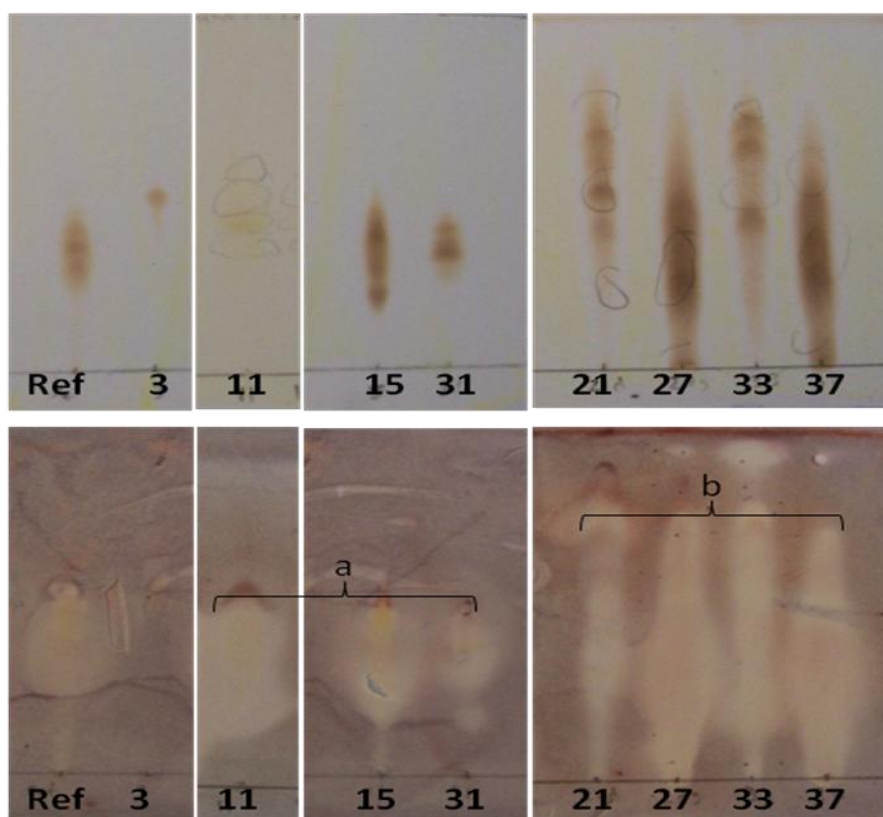


Figura 6. Bioautografía de las ocho fracciones más representativas de las 39 fracciones obtenidas en la columna CJd5. Las manchas blancas en el fondo rosa etiquetadas como a y b representan zonas de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

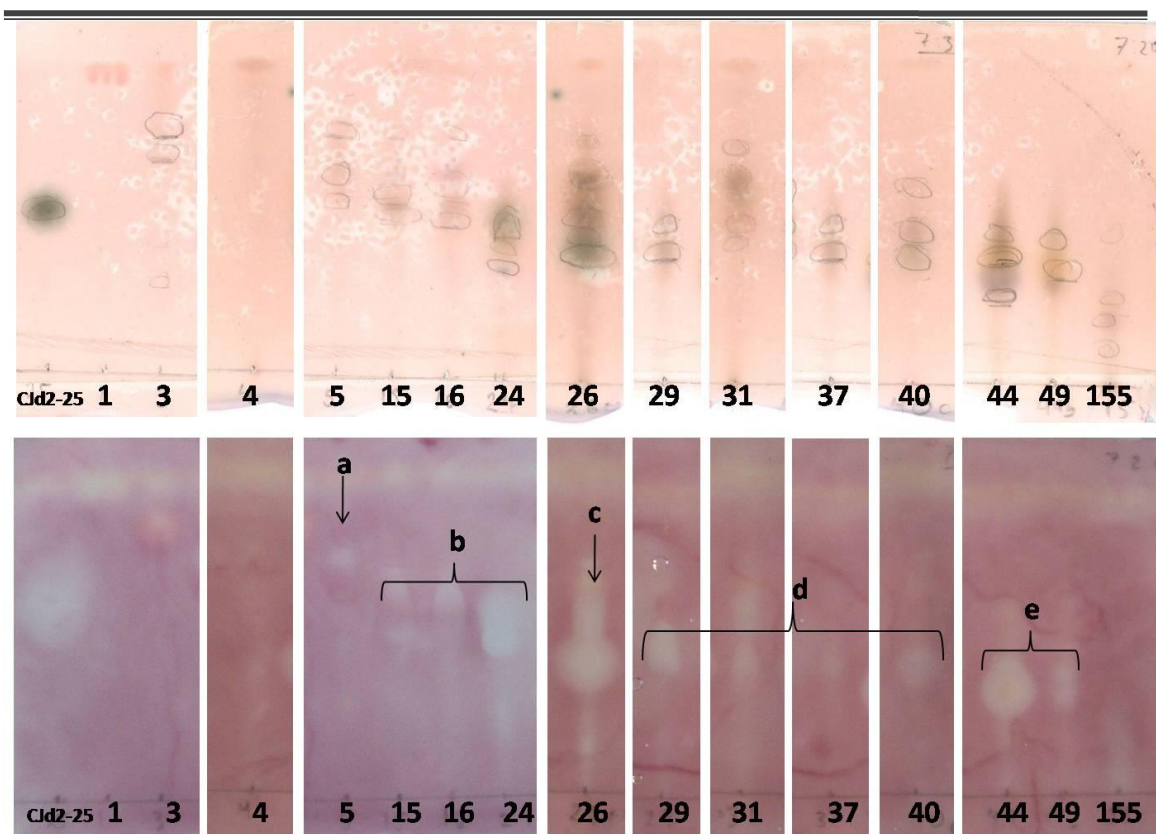


Figura 7. Bioautografía de las 14 fracciones más representativas de las 57 fracciones obtenidas en la columna CJd5. Las manchas blancas en el fondo rosa etiquetadas como a y b representan zonas de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

Columna *Jatropha dioica* 6 (CJd6).

La bioautografía de las 14 fracciones más representativas de las 57 fracciones obtenidas de la columna 6 (CJd6), muestra cinco zonas de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* (zona a-e, Figura 10). Se observan tres zonas con mayor capacidad de inhibición (++) de diferente polaridad; la zona marcada como “b” en la fracción CJd6-F24, la zona marcada como “c” de la fracción CJd6-F26 y la “e” en la fracción CJd6-F44, siendo estos los compuestos mayoritarios de la columna fraccionada (Figura 10).

Debido a que las fracciones obtenidas en el fraccionamiento de la columna 5 tuvieron un peso muy reducido, no se pudo evaluar la concentración mínima inhibitoria (MIC). Para continuar con su fraccionamiento, la fracción CJd6-F51 fue cargada en una placa tipo semipreparativa y los compuestos fueron raspados de forma individual obteniendo 8 subfracciones etiquetadas como CJd6-F1-8, de las cuales no se logró probar su actividad antimicrobiana.

3. Espectros de absorción de UV de AxV1 y AxV2

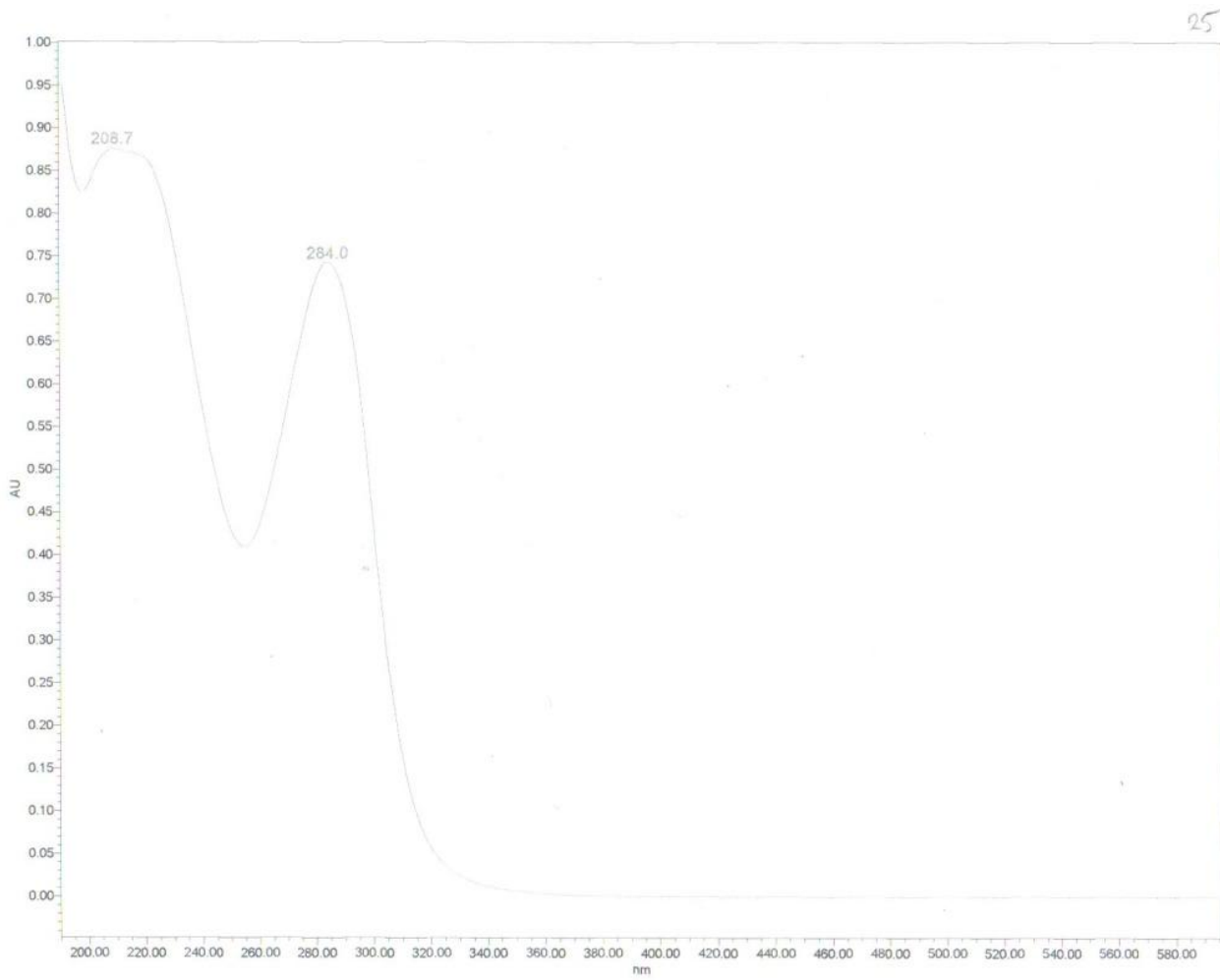


Figura 8. Espectro de absorción de UV de AxV1 purificado en CJD2-F25 $\lambda_{max}=284$ nm

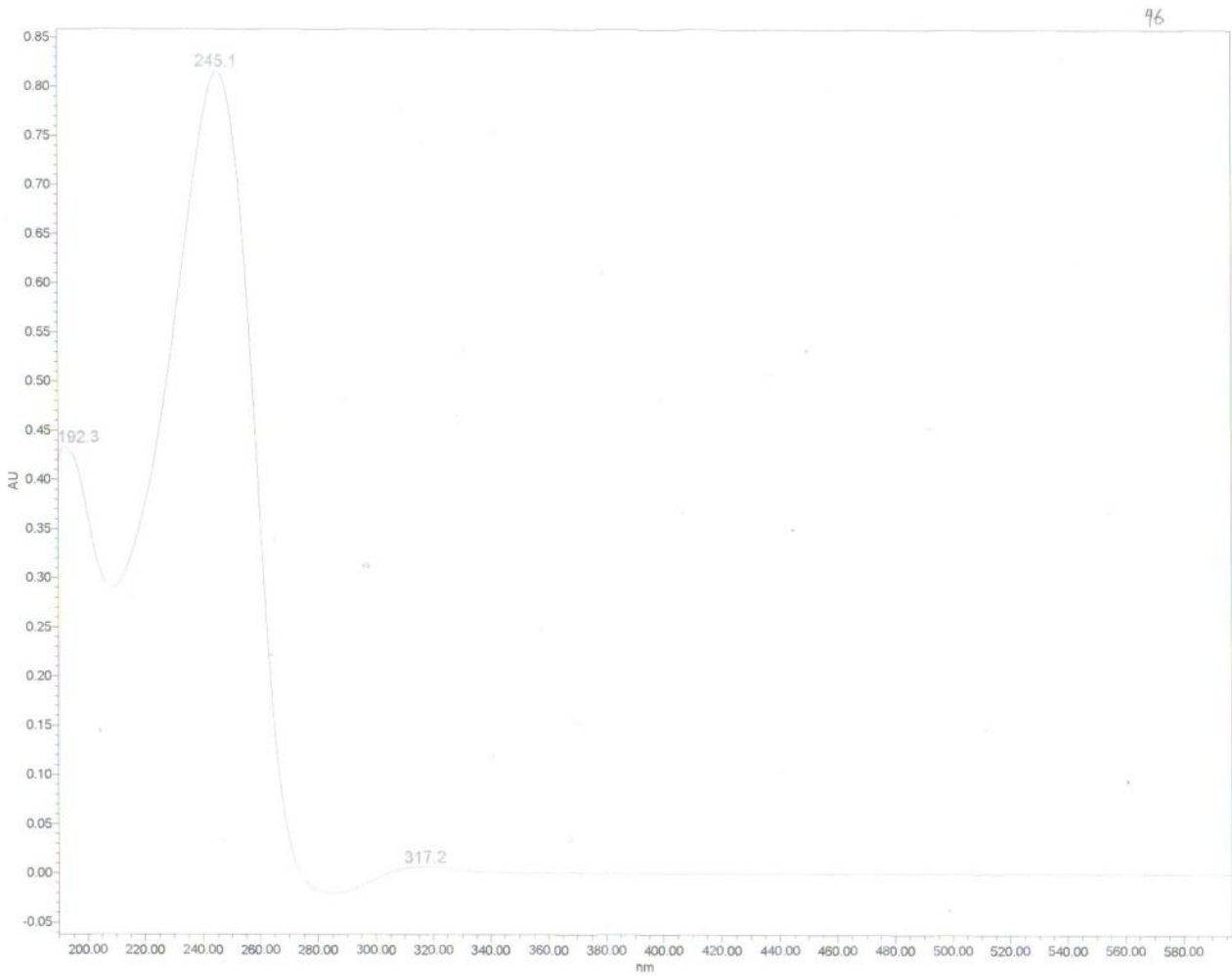


Figura 9. Espectro de absorción de UV de AxV2 purificado en CJD3-F46 $\lambda_{max}=245$ nm

4. Resonancia Magnética Nuclear de los compuestos

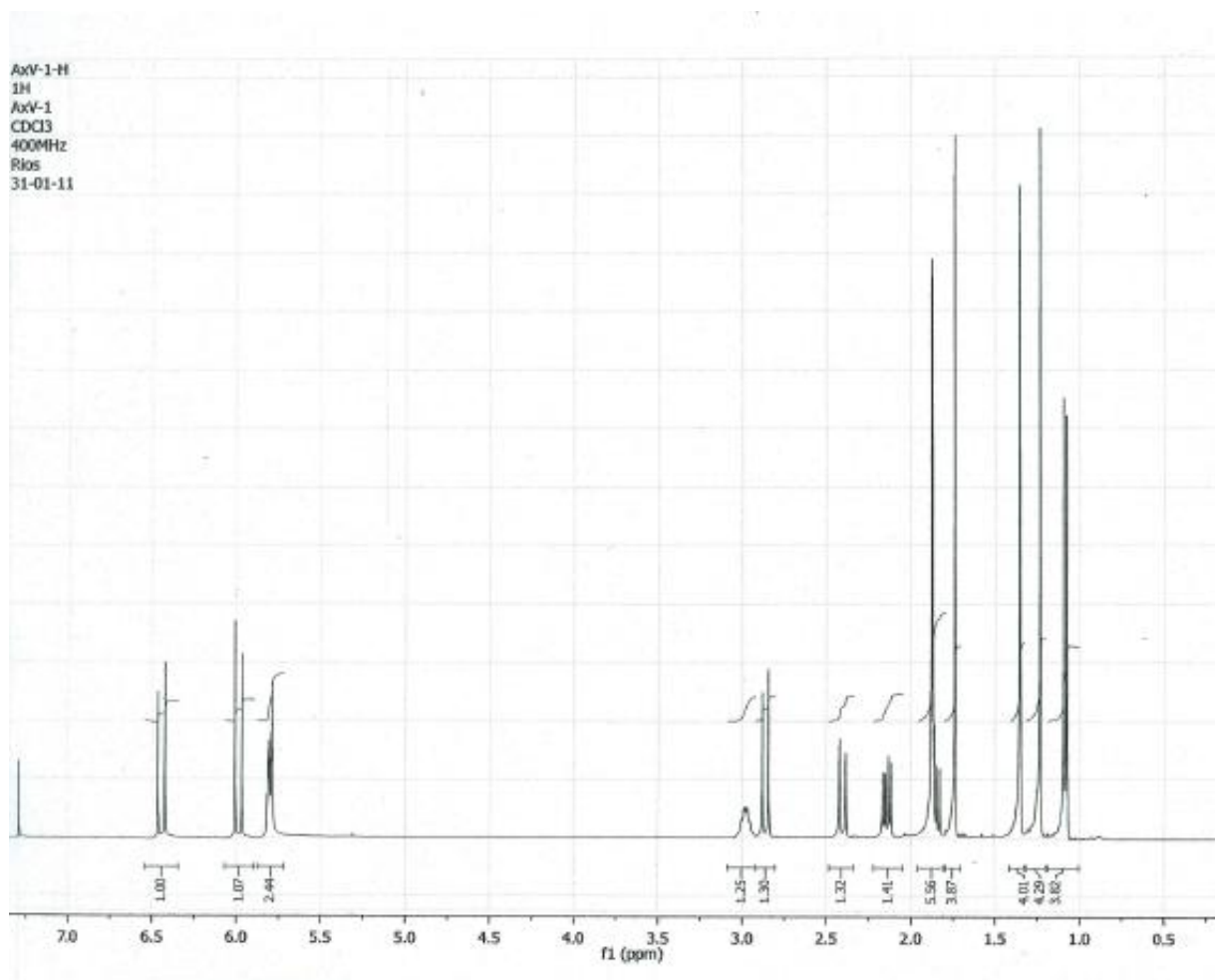


Figura 10. Resonancia magnética nuclear del compuesto AxV1

Anexo I

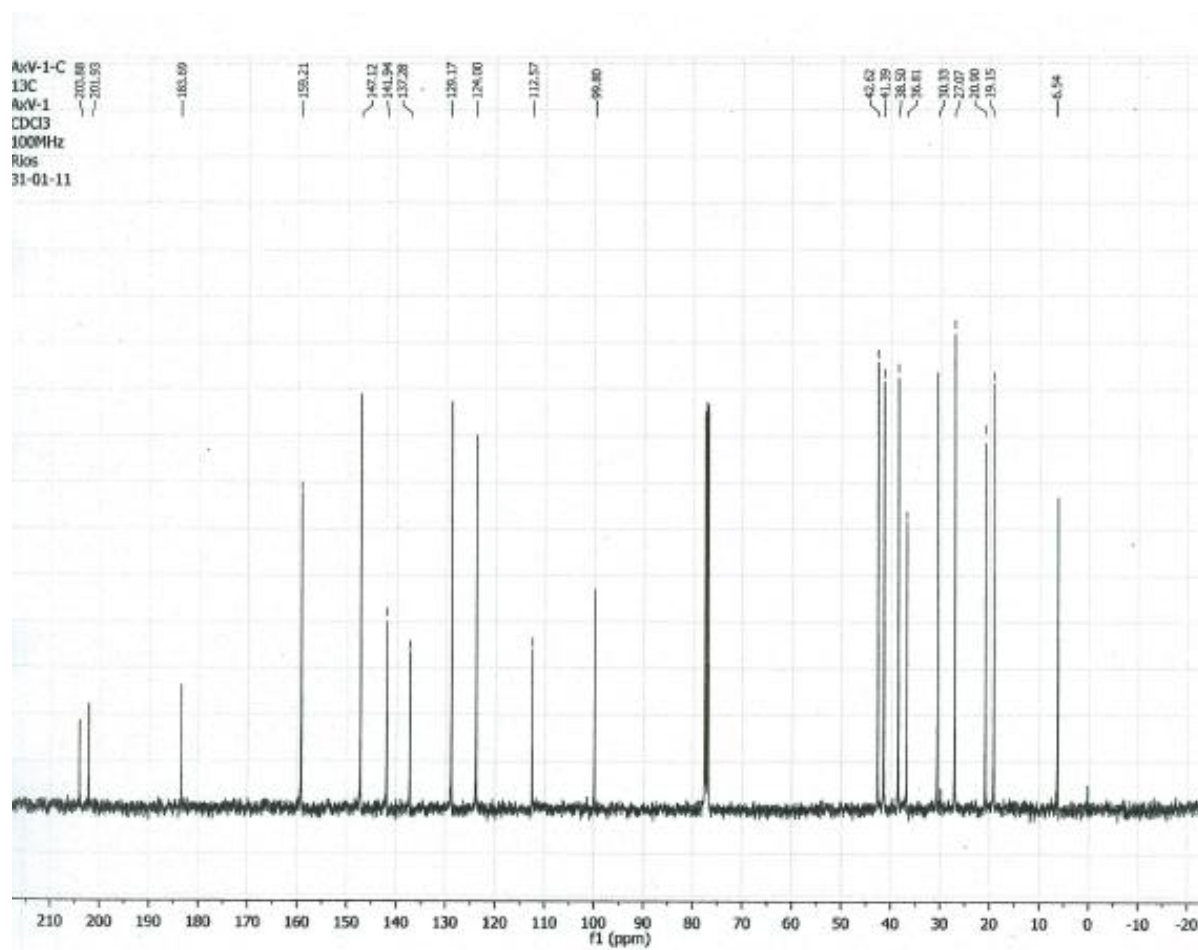


Figura 11. Resonancia magnética nuclear del compuesto AxV1. Continuación

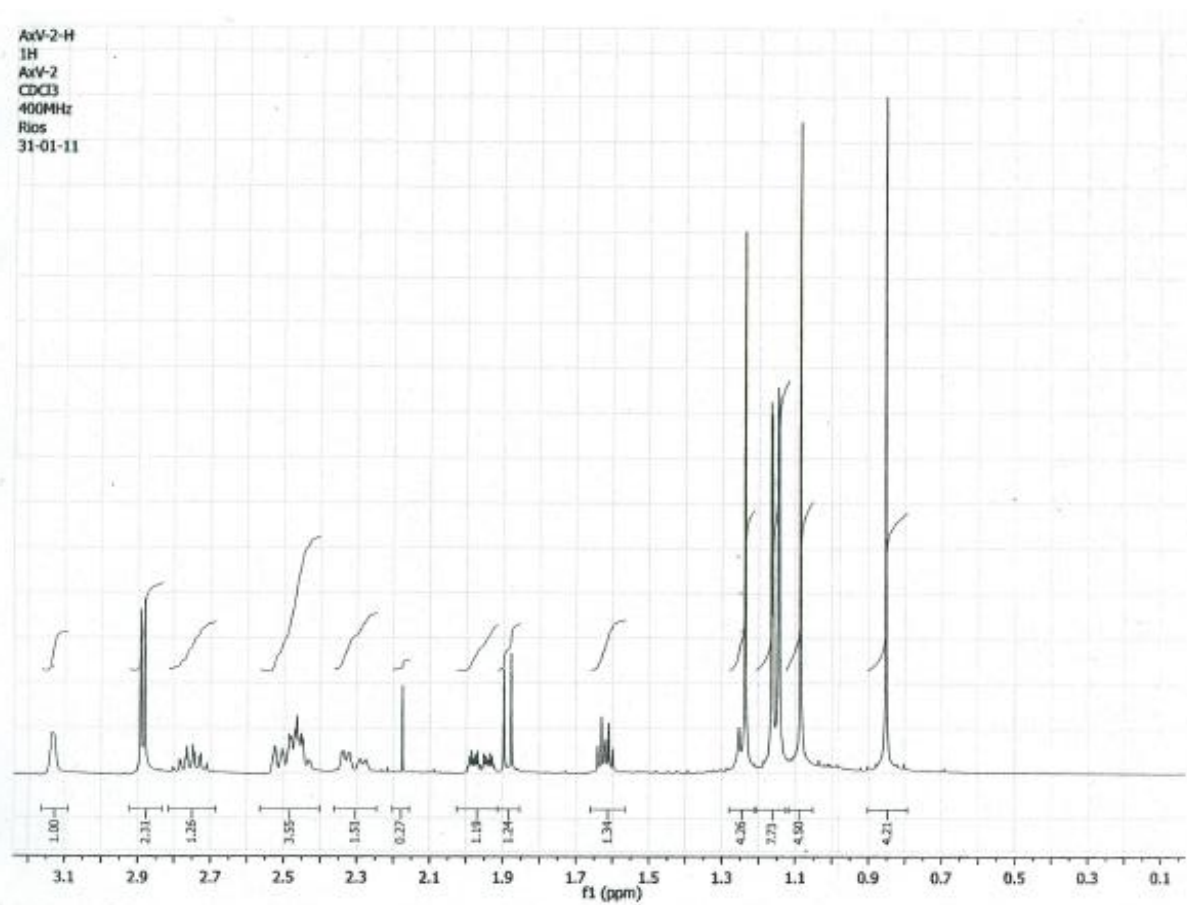


Figura 12. Resonancia magnética nuclear del compuesto AxV2.

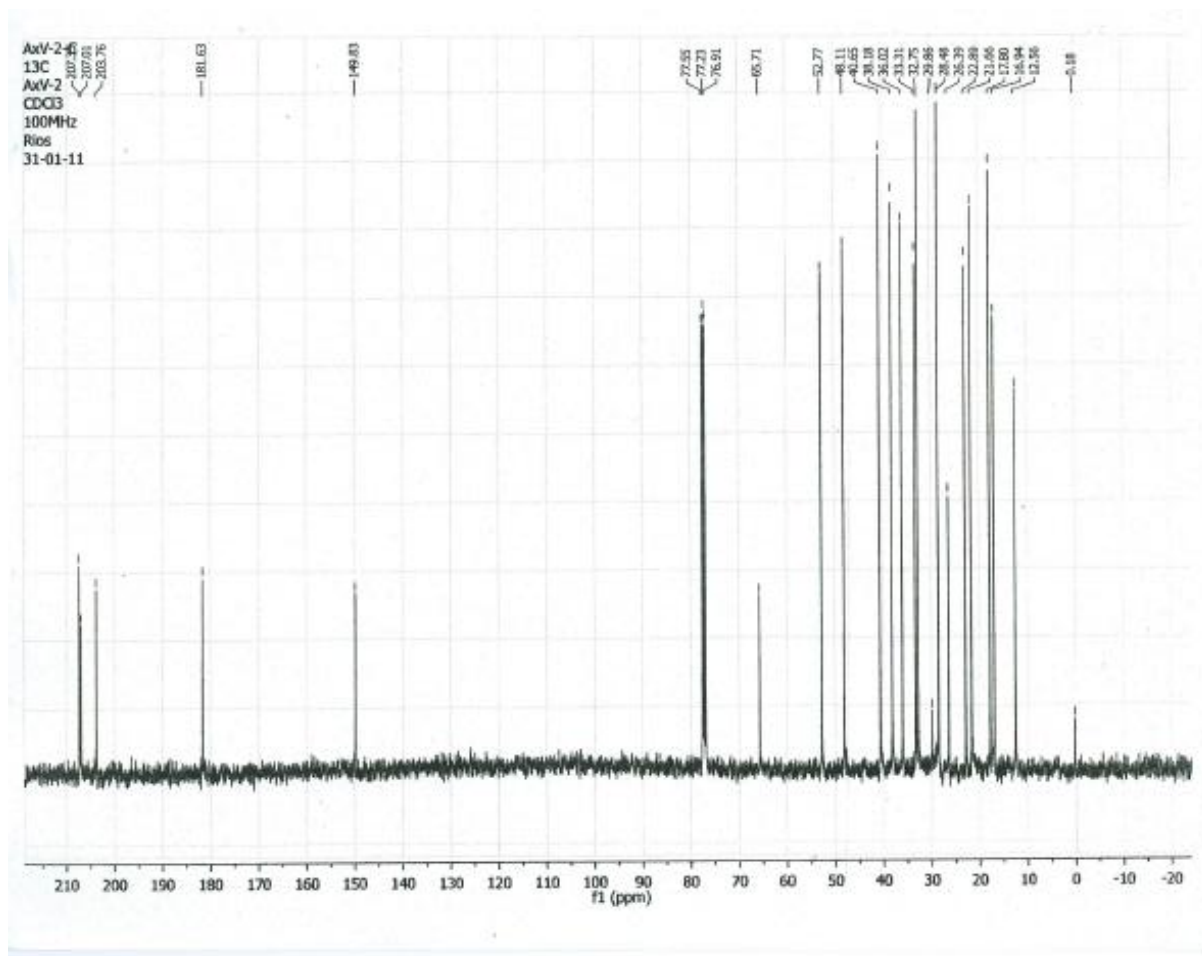


Figura 13. Resonancia magnética nuclear del compuesto AxV2. Continuación.