

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Aislamiento y caracterización del compuesto responsable de la actividad antibacteriana de la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico de *Rhizophora mangle* L. en contra de *Staphylococcus aureus*



**TESIS**

Que para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

**Luis Alberto Zamora Alvarez**

Hermosillo, Sonora

Febrero de 2014

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado Calificador designado para revisar el Trabajo de Tesis de **Luis Alberto Zamora Alvarez**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias de la Salud.



---

Dr. Edgar Felipe Morán Palacio

Director



---

Dra. Ema Carina Rosas Burgos


Secretario



---

Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda

Vocal



---

Dr. Eduardo Ruiz Bustos

Suplente

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora por todo el conocimiento que me ha heredado a lo largo de estos años.

A la coordinación del Posgrado en Ciencias de la Salud, por haberme encontrado apto para cursar el Programa de Maestría en Ciencias de la Salud.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca otorgada.

A la Vicerrectoría de la Unidad Regional Sur de la Universidad de Sonora. En especial al Laboratorio de Bioquímica y Toxicología.

A la Dirección de Investigación y Posgrado por los apoyos otorgados a proyectos internos, particularmente al proyecto: Aislamiento y caracterización de los compuestos responsables de actividad antibacteriana de la corteza de *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo) con referencia: URS12-PI04

Al Dr. Edgar Felipe Morán Palacio por total apoyo académico y personal para la realización de este trabajo.

A la Dra. Ema Carina Rosas Burgos por su paciencia y asesoría en la realización de esta Tesis.

Al Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda por el apoyo otorgado, por haber aceptado ser uno de los asesores académicos en la realización y revisión de la presente Tesis.

Al Dr. Eduardo Ruiz Bustos por todo el apoyo brindado a través de estos dos años, por su tiempo y atención otorgada para la realización de este y otros trabajos académicos.

Al M.C. Moisés Navarro Navarro por su apoyo con el apartado metodológico al habernos proporcionado la cepa bacteriana utilizada.

A la Q.B. Denia Abril Montes por sus atenciones, y su apoyo en las revisiones finales del formato de este trabajo escrito de Tesis.



## CONTENIDO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
JUSTIFICACIÓN.....	viii
OBJETIVOS.....	ix
RESUMEN.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
<i>Staphylococcus aureus</i> y su Resistencia a los Antibióticos.....	3
Metabolitos Secundarios Como Alternativa Antibiótica.....	10
Alcaloides.....	13
Terpenos.....	14
Flavonoides.....	16
<i>Rhizophora mangle</i> L.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
Material Vegetal.....	21
Obtención del Extracto Metanólico.....	21
Obtención de la Fracción de Acetato de Etilo a Partir del Extracto Metanólico.....	22
Aislamiento Biodirigido.....	22
Cromatografía en columna.....	22
Cromatografía en capa fina.....	23
Cromatografía en placa preparativa.....	23
Reactivación de Cepas Bacterianas y Ajuste del Inóculo de Trabajo.....	24
Evaluación de la Actividad Antibacteriana.....	24

Caracterización Química.....	25
Espectroscopía Infrarroja.....	27
Resonancia Magnética Nuclear <sup>1</sup> H.....	27
Análisis Estadístico.....	37
RESULTADOS.....	28
Fraccionamiento de la Fracción de Acetato de Etilo.....	28
Actividad Antibacteriana de las Fracción Obtenidas a Partir de la Fracción de Acetato de Etilo del Extracto Metanólico de <i>Rhizophora mangle</i> L. en Contra de <i>S. aureus</i> (ATCC 6538P).....	28
Actividad Antibacteriana de las Bandas Colectadas a Partir de la Cromatografía en Capa Fina de la Fracción F2.....	32
Caracterización Química.....	35
Espectroscopía Infrarroja.....	35
Resonancia Magnética Nuclear <sup>1</sup> H.....	40
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIONES.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Factores de virulencia implicados en algunas enfermedades causadas por <i>S. aureus</i> .....	4
II	Mecanismos de resistencia identificados en <i>S. aureus</i> .....	6
III	Valores de rendimiento de las muestras obtenidas.....	29
IV	Principales señales del espectro Infrarrojo de la muestra B7.....	37
V	Comparación de las principales señales de estiramiento del espectro IR de las muestras B7, B6 y B5.....	39
VI	Principales señales de RMN <sup>1</sup> H encontradas para las muestras B1, B4, B5, B6 y B7.....	43

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Principales rutas de síntesis de los metabolitos secundarios.....	12
2	Alcaloides, flavonoides y terpenos con actividad antibacteriana en contra de <i>S. aureus</i> .....	15
3	Ejemplar de <i>Rhizophora mangle</i> L (mangle rojo).....	18
4	Esquema generalizado del proceso metodológico desarrollado.....	26
5	Actividad antibacteriana de: a) fracción 2 (F2) y b) fracción 5 (F5) contra <i>S. aureus</i> (ATCC 6538P).....	30
6	Actividad antibacteriana de: a) fracción 6 (F6) y b) fracción 7 (F7) contra <i>S. aureus</i> (ATCC 6538P).....	31
7	Perfil cromatográfico en TLC de la fracción F2 visto bajo luz UV a 254 nm y a 365 nm .....	33
8	Actividad antibacteriana de las bandas colectadas a partir de la cromatografía en capa fina realizada a la fracción F2.....	34
9	Espectro Infrarrojo de la muestra B7.....	36
10	Espectro Infrarrojo de la muestra B6.....	41
11	Espectro Infrarrojo de la muestra B5.....	42
12	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la muestra B7.....	44



## JUSTIFICACIÓN

Ante la creciente aparición de cepas de *S. aureus* resistentes a los antibióticos convencionales, las plantas de uso medicinal representan una alternativa viable para la búsqueda y obtención de nuevos agentes antimicrobianos. En años recientes se ha demostrado que el extracto vegetal de la corteza de *R. mangle* L. posee propiedades antibacterianas en contra de *S. aureus* y aunque algunos polifenoles conocidos han sido identificados, un gran número de compuestos siguen sin ser caracterizados. La falta de estudios acerca del origen de la naturaleza antibacteriana del extracto vegetal de la corteza de *R. mangle* L. plantea la necesidad de realizar un aislamiento basado en la actividad antibacteriana observada, que de manera sistemática permita separar los componentes del extracto vegetal, con la finalidad de encontrar un compuesto antibacteriano eficaz en contra de *S. aureus*.

## OBJETIVOS

### General

Aislar y caracterizar el compuesto responsable de la actividad antibacteriana de la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico de la corteza de *Rhizophora mangle* L. en contra de *Staphylococcus aureus*.

### Particulares

- Separar mediante cromatografía de adsorción la mezcla de compuestos contenidos en la fracción de acetato de etilo.
- Evaluar la actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas por el proceso cromatográfico de adsorción.
- Caracterizar los compuestos mediante el uso de espectroscopia infrarroja y resonancia magnética nuclear 1 H.

## RESUMEN

Ante la creciente aparición de cepas bacterianas resistentes, a nivel mundial las plantas con propiedades medicinales utilizadas con fines terapéuticos, representan una fuente importante para la obtención de nuevos fármacos antimicrobianos eficaces. En el estado de Sonora, *Rhizophora mangle* L. es un árbol nativo utilizado con tales fines, y recientemente se ha demostrado que el extracto vegetal de su corteza posee propiedades antibacterianas en contra de *S. aureus*. En el presente estudio, se realizó un aislamiento biodirigido de los compuestos responsables de la actividad antibacteriana de la fracción de acetato de etilo, obtenida del extracto metanólico de la corteza de *R. mangle* L. Los compuestos fueron separados por cromatografía de adsorción y agrupados en fracciones. Su actividad antibacteriana se determinó mediante el método de microdilución en caldo. De las fracciones obtenidas, la fracción número dos, eluída con Hexano:Acetato de etilo:Metanol (8:1:1) presentó los más altos valores de inhibición del crecimiento de *S. aureus*. Los resultados sugieren que la actividad antibacteriana de la fracción de acetato de etilo no se debe a un solo compuesto, sino, a la acción de múltiples constituyentes químicos.



## INTRODUCCIÓN

Desde 1940 *Staphylococcus aureus* ha figurado como uno de los patógenos más importantes de la especie humana, principalmente por su persistente resistencia a los antibióticos (Velázquez-Meza, 2005). En la última década, el surgimiento de cepas de *S. aureus* resistentes a vancomicina (VRSA), representa un grave problema de salud pública, y aunque algunos derivados de la vancomicina han demostrado actividad contra cepas resistentes, el uso de gluco péptidos para el tratamiento efectivo no está garantizado (Ge y col., 1999; Gibbons, 2004; Rodríguez y Vesga, 2005; Bustos-Martínez, 2006; Núñez y col., 2006). El estudio de las propiedades terapéuticas de las plantas de uso medicinal representa una alternativa médica, no sólo para el tratamiento de enfermedades sino también para la obtención de nuevos fármacos, incluyendo antibióticos contra cepas resistentes.

La capacidad farmacológica y terapéutica de plantas utilizadas con estos fines está determinada por la presencia de compuestos químicos conocidos como metabolitos secundarios (González, 2009). Fenoles, flavonoides, alcaloides y terpenos son los principales tipos de metabolitos sintetizados, y su producción es inducida por una diversidad de factores ambientales (Sepúlveda y col., 2003). En los últimos años, los metabolitos secundarios han demostrado actividades biológicas y farmacológicas importantes, al grado de ser considerados como fuentes potenciales para el desarrollo de fármacos modernos (Souza-Fagundes y col., 2002).

*Rhizophora mangle* L. es una planta que se puede encontrar en las bahías del estado de Sonora, forma parte del acervo etnobotánico de la región y es utilizada con fines medicinales para el tratamiento de infecciones respiratorias y gastrointestinales (Johnson y col., 1996). En los últimos años, las investigaciones realizadas por Sánchez y col. (2000) y Sánchez y col. (2007) al extracto vegetal de *R. mangle* L. han demostrado que la actividad



antibacteriana presentada en contra de *S. aureus* se debe fundamentalmente a los compuestos polifenólicos que lo conforman. Aun cuando se ha identificado la presencia de algunos polifenoles conocidos, un gran número de ellos sigue sin ser identificado. Hasta hoy las metodologías empleadas para la separación y el aislamiento de estos constituyentes se han realizado en función de su estructura y no de su capacidad antibacteriana. La falta de estudios acerca del origen de la naturaleza antibacteriana del extracto vegetal de la corteza de *R. mangle* L. plantea la necesidad de realizar un aislamiento basado en la actividad antibacteriana observada, que de manera sistemática permita separar los componentes del extracto vegetal, con la finalidad de encontrar un compuesto antibacteriano eficaz en contra de *S. aureus*. Por lo cual, en el presente trabajo, se ha planteado como principal objetivo aislar y caracterizar el compuesto responsable de la actividad antibacteriana de la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico de la corteza de *R. mangle* L. en contra de *S. aureus*.

## ANTECEDENTES

### ***Staphylococcus aureus* y su Resistencia a los Antibióticos**

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia *Micrococcaceae*, contiene más de 30 especies diferentes y muchas de ellas son habitantes naturales de la piel y de las membranas mucosas del ser humano. Fuera de ello, no poseen otros hábitats importantes, excepto cuando se ven involucrados en procesos infecciosos, debido a su patogenicidad oportunista. Generalmente los *Staphylococcus* son bacterias en forma de cocos, caracterizados por su agrupamiento en racimos o en pares, además, son: catalasa positivos, gram positivos, no móviles, aerobios facultativos y fermentadores de glucosa. La especie *Staphylococcus aureus* se distingue por su capacidad de fermentar el manitol, coagular el plasma sanguíneo y por la producción de pigmentos carotenoides de color amarillo característico de algunas cepas cultivadas en medios sólidos. Además, posee una serie de características particulares de virulencia y resistencia a los fármacos antibacterianos que la sitúan como uno de los patógenos más importantes de la especie humana (Joklik y col., 1994; Gil, 2000; Brooks y col., 2002; Rodríguez y Vesga, 2005; Velázquez-Meza, 2005; Bustos-Martínez, 2006; Gonzales y col., 2009).

*Staphylococcus aureus* posee varios factores de virulencia los cuales le confieren una elevada capacidad patogénica, estos componentes proteicos y enzimáticos son los responsables del amplio espectro de enfermedades causadas en huéspedes humanos (Tabla I). Las funciones de cada uno de ellos en la patogenia de las enfermedades están bien definidas, algunos participan en los procesos de adhesión a las células huésped, al fibrinógeno o a la matriz extracelular, otros están involucrados en la evasión del sistema inmunológico, como lo son las enterotoxinas estafilocócicas, los polisacáridos capsulares o la leucocidina VL. Por otra parte, se encuentran los involucrados en la invasión de las células huésped y en la penetración de los tejidos, como lo son

**Tabla I.** Factores de virulencia implicados en algunas enfermedades causadas por *S. aureus*.

Factores de virulencia	Mecanismo de acción	Enfermedad Staphylococcica
Toxina exfoliante B	Unión a la proteína desmogleina-1	Síndrome de la piel escaldada
TSST-1	Actividad superantigenica	Síndrome del shock toxico
SEA-E, SEH-U	Actividad superantigenica	
BBP	Adhesión a la matriz extracelular	Artritis y osteomielitis
CBP	Adhesión a la matriz extracelular	
Factor A y B de aglutinación	Adhesión a la matriz extracelular	
Hemolisina- $\alpha$	Lisis celular	
Proteína A	Adhesión a la matriz extracelular	
Factor A de aglutinación	Adhesión a la matriz extracelular	Endocarditis infectiva
FBP	Adhesión a la matriz extracelular	
CBP	Adhesión a la matriz extracelular	
Leucocidina de Pantón Valentín	Lisis de polimorfonucleares	Neumonía necrotizante
CBP	Adhesión a la matriz extracelular	
Acido lipoteicoico y peptidoglucano	Interacción con TLR-2	Shock séptico
Tipos capsulares 5 y 8	Resistencia a la defensa inmune	
Factor A y B de aglutinación	Adhesión a la matriz extracelular	
Proteína A	Resistencia a las defensa inmune	
EFBP	Adhesión a la matriz extracelular	
Hemolisina- $\alpha$	Perdida del funcionamiento cardiaco, lisis celular endotelial	
SEA	Actividad superantigenica	
TSST-I	Actividad superantigenica	Síndrome del shock tóxico neonatal similar a la enfermedad exantemática
TSST-I, SEB, SEC	Actividad superantigenica	PSF

**SE:** Enterotoxina Staphylococcica; **TLR:** Receptores tipo toll; **TNF:** Factor de necrosis tumoral, **TSST:** Toxina del síndrome del shock tóxico; **BBP:** Proteína de unión a sialoproteína ósea; **EFBP:** Proteína de unión a fibronectina extracelular; **CBP:** Proteína de unión a colágeno; **FBP:** Proteína de unión a fibronectina; **PSF:** Purpura Staphylococcica fulminante.

Fuente: Tomado y modificado de: Ferry y col., 2005.



la hialuronidasa y las hemolisinas. Las patologías causadas por *S. aureus* pueden variar desde infecciones menores de la piel, hasta infecciones invasoras serias como: bacteriemia, infecciones del sistema nervioso central, meningitis, endocarditis, osteomielitis, impétigo, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario y síndrome de choque tóxico (Koneman, 2001; Velázquez-Meza, 2005; Bustos-Martínez, 2006).

Desde la década de 1940 *S. aureus* ha figurado como uno de los patógenos más importantes para la especie humana, debido a su persistente resistencia a los antibióticos (Velázquez-Meza, 2005). Aunque la introducción de la penicilina en los años 40's disminuyó notablemente los casos de infecciones por *S. aureus*, alrededor de 1946 aparecieron las primeras cepas capaces de hidrolizarla mediante enzimas  $\beta$ -lactamasas. Para 1960 casi el 100% de las cepas aisladas presentaban resistencia no sólo a penicilina, sino a otros antibióticos recién introducidos como la eritromicina, cloranfenicol, estreptomina y tetraciclina (Jessen y col., 1999; Rodríguez y Vesga, 2005; Miranda, 2011). La introducción de cefalosporinas estables ante  $\beta$ -lactamasas y penicilinas sintéticas como oxacilina, nafcilina y meticilina a inicio de la década de los 60's, permitieron el tratamiento y control de infecciones causadas por cepas resistentes. Sin embargo, en un corto periodo de tiempo hacia 1961 se aislaron las primeras cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA), y desde entonces se han reportado la aparición de cepas multiresistentes en todo el mundo (Velázquez-Meza, 2005; Rodríguez y Vesga, 2005; Bustos-Martínez, 2006; Miranda, 2011). La creciente aparición de esta multiresistencia es el resultado de una consecutiva respuesta a la presión selectiva impuesta por la terapia antimicrobiana en contra de *S. aureus*, además de ello, el intercambio genético de determinados componentes móviles como plásmidos y transposones ha jugado un papel importante en tales mecanismos de resistencia (Tabla II) (Velázquez-Meza, 2005; Bustos-Martínez, 2006).



**Tabla II.** Mecanismos de resistencia identificados en *S. aureus*.

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Blanco celular</b>	<b>Genes</b>	<b>Mecanismo de resistencia</b>
Amino glucósido	RNAr 30S	<i>aacA-aphD</i> , <i>aadA</i> , <i>aadD</i> , <i>aadD</i> , <i>aphA</i> , <i>aphC</i> , <i>spc</i> , <i>strA</i>	Modificación por acetiltransferasas, adeniltransferasas o alteración ribosomal de las fosfotransferasas
Cloranfenicol	rRNA50s	<i>cat</i>	Modificación por acetiltransferasa
Fluoroquinolonas	DNA girasa	<i>gyrA / gyrB</i> <i>norA</i> <i>grlA</i>	Mutaciones en los genes de la DNA girasa, bombas de expulsión, mutaciones en el gen de la DNA topoisomerasa IV
Fosfomicina	Síntesis del ácido N-acetil murámico	<i>fosB</i>	Modificación por una glutatone-S-transferasa
Ácido fusídico	Factor de elongación G	<i>fusA/fusB</i>	Alteración en el factor de elongación G/disminución de la permeabilidad
Glicopéptidos	Complejos D-Ala-D-Ala		Secuestro por la pared celular
Macrólidos, lincosamidas	RNAr 50s	<i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> , <i>msrA</i>	Mutilación del RNAr, bombas de expulsión
Mupirocina	Isoleucil-RNAt-sintetasa	<i>mupA</i>	Producción de una isoleucil-RNAt-sintetasa modificada
Rifampicina	Subunidad $\beta$ de la RNA polimerasa	<i>rif</i>	Alteraciones en la RNA polimerasa
Sulfunamidas	Síntesis de ácido tetrahidrofólico	<i>sulA</i>	Sobreproducción de ácido p-aminobenzoico
Tetraciclinas	RNAr 30s	<i>tetA(K)/</i> <i>tetA(L)</i> <i>tetA(M)</i>	Bombas de expulsión Protección ribosomal
Trimetoprim	Síntesis del ácido tetrahidrofólico	<i>dhfrA</i>	Bypass por una dehidrofolato reductasa

Fuente: Tomado y modificado de: Velázquez-Meza, 2005.

La resistencia a meticilina tiene su origen en la adquisición del gen *mecA*, el cual codifica la expresión de tres proteínas fundamentales. Este gen (al igual que otros genes que le confieren resistencia a *S. aureus* ante otros antibióticos) se localiza dentro en un componente genético móvil de gran tamaño no propio de *S. aureus* denominado *SCCmec* (*Staphylococcal cassette chromosome mec*), integrado en su cromosoma bacteriano. La resistencia a este fármaco está mediada por una proteína de unión a penicilina (PBP) no convencional denominada PBP2a, capaz de mantener la síntesis ininterrumpida de la pared celular por su baja afinidad a los fármacos  $\beta$ -lactámicos, aun y cuando la función de las otras PBP existentes se vea inhibida por la presencia de tales compuestos. Las proteínas MecI y MecR1 regulan la transcripción inducible de *mecA*, y por lo tanto la expresión de PBP2a. MecR1 al registrar la presencia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos mediante su dominio extracelular induce la proteólisis de MecI, la cual se encuentra como una proteína represora unida al sitio operador de dicho gen (Gil, 2000; Velázquez-Meza, 2005; Bustos-Martínez, 2006; Miranda, 2011).

Hasta hace pocos años las infecciones por *S. aureus* meticilina resistentes generalmente se adquirían dentro de hospitales, sin embargo, a finales de los años 90's emergieron cepas MRSA en adultos y niños sanos en las comunidades (Bustos-Martínez, 2006). En México existe un número limitado de estudios sobre la prevalencia de estas cepas, sin embargo, la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) con datos provenientes de hospitales generales, pediátricos, universitarios y de especialidades, reportó que para el periodo 1998-2003 *S. aureus* ocupó el tercer lugar en morbilidad y cuarto lugar en mortalidad en el país (Velázquez-Meza, 2005; Miranda, 2011).

A pesar de la resistencia a un amplio espectro de antibióticos, el tratamiento de cepas MRSA inició desde 1958 con la introducción de glicopeptidos como la vancomicina, considerada como el más importante y efectivo antibiótico alternativo. Sin embargo, para 1997 se reportó en Japón el aislamiento de la



primera cepa con resistencia intermedia a la vancomicina (VISA), y en el 2002 se detectaron en los Estados Unidos las primeras cepas resistentes a ella (VRSA) (Ge y col., 1999; Rodríguez y Vesga, 2005; Bustos-Martínez, 2006; Núñez y col., 2006).

La vancomicina ejerce su acción bactericida por la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana, al unirse a los residuos D-Alanina-D-Alanina de los monómeros precursores del péptidoglucano a través de la formación de puentes de hidrógeno. El involucramiento de estos residuos libres impide la actividad transpeptidasa de las PBP que entrecruzan a los monómeros e impide que los nuevos monómeros sintetizados sean unidos a la estructura ya existente (Ge y col., 1999; Rodríguez y Vesga, 2005). La vancomicina cumple su propósito cuando su unión es con los residuos libres D-Alanina-D-Alanina de los precursores nacientes a nivel de la membrana bacteriana, su unión a los residuos libres del peptidoglucano ya sintetizado no detiene la síntesis de la pared celular y sólo entorpece el entrelazamiento de los monómeros en las capas superiores. Esta desventaja es la responsable de la inefectividad de la vancomicina ante las cepas con resistencia intermedia, para las cuales se ha descrito que el engrosamiento de la pared celular y la disminución del entrecruzamiento son los principales mecanismo implicados. El aumento en el número de residuos D-Alanina-D-Alanina por la disminución del entrecruzamiento permite que las moléculas de vancomicina sean atrapadas y retenidas en las capas de peptidoglucano más alejadas de la membrana, saturando la periferia e impidiendo el ingreso de nuevas moléculas. Este mecanismo es maximizado por el engrosamiento de la pared celular mediado por la sobreexpresión de PBP2, PBP2a, y el incremento en la síntesis de los monómeros de peptidoglucano (Ge y col., 1999; Rodríguez y Vesga, 2005).

La resistencia a vancomicina está asociada a tres fenotipos presentes en el género *Enterococcus*, VanA, el cual confiere una elevada resistencia a vancomicina y a teicoplanina (MIC >128 µg/mL), y cuya transferencia mediante

plásmidos hacia *S. aureus* ha sido comprobada *in vitro*. El fenotipo VanB, confiere moderada resistencia a vancomicina pero no a teicoplanina (MIC 32-64 µg/mL), la resistencia es inducible y mediada por cromosomas, mientras que el fenotipo VanC, es cromosómico, constitutivo y no transferible y sólo presenta bajos niveles resistencia a vancomicina (MIC 8-32 µg/mL) (Núñez y col., 2006). Los tres primeros aislamientos de cepas MRSA resistentes a vancomicina registrados en los Estados Unidos entre los años 2002 y 2004, comparten la característica de poseer el fenotipo VanA. El análisis molecular del primer aislamiento clínico de VRSA en Junio del 2002, señaló la presencia de un plásmido con el gen *vanA* integrado el cual compartía un 100% de homología con el transposón *Tn1546* (una secuencia prototipo aislada de *Enterococcus* resistente a vancomicina), lo cual demostró que la transferencia interespecies era la responsable de la resistencia de esta cepa. La resistencia a vancomicina está mediada por un complejo de genes contenidos en *VanA*, los genes *vanS*, *vanR*, reguladores de la transcripción y los genes efectores *vanA*, *vanH* y *vanX*. La proteína VanS se autofosforila en presencia de vancomicina y activa a la proteína VanR que actúa como factor de transcripción de los demás genes. VanX hidroliza los residuos D-Alanina-D-Alanina de los monómeros de peptidoglucano recién sintetizados para que no sean incorporados a la pared celular, mientras que VanA cataliza la formación del dipéptido D-Alanina-D-Lactato el cual sustituirá a los extremos libres D-Alanina-D-Alanina susceptibles de unión a vancomicina. Este mecanismo bioquímico evita que la vancomicina inhiba la síntesis de la pared celular, la modificación de D-Alanina por D-Lactato impide la unión entre los residuos libres y la porción peptídica de la vancomicina al haber reducido 1000 veces esta afinidad (Rodríguez y Vesga, 2005).

Las cepas MRSA resistentes a vancomicina representan un grave problema de salud pública, a pesar de que en los últimos años algunos derivados de la vancomicina han demostrado actividad antibacteriana en su contra, el uso de glucopéptidos para el tratamiento efectivo no está garantizado



(Ge y col., 1999; Gibbons, 2004). La introducción de Linezolido (Zyvox®), un nuevo miembro del grupo de los oxazolidinonas y de la mezcla streptogramina quinupristina-dalfopristina (Synercid®) fue considerada como la solución a las infecciones por VRSA. Sin embargo, el reporte de 11 cepas MRSA resistentes a Linezolido demuestra la continua necesidad de encontrar nuevas fuentes de agentes farmacéuticos para combatir su multirresistencia (Gibbons, 2004).

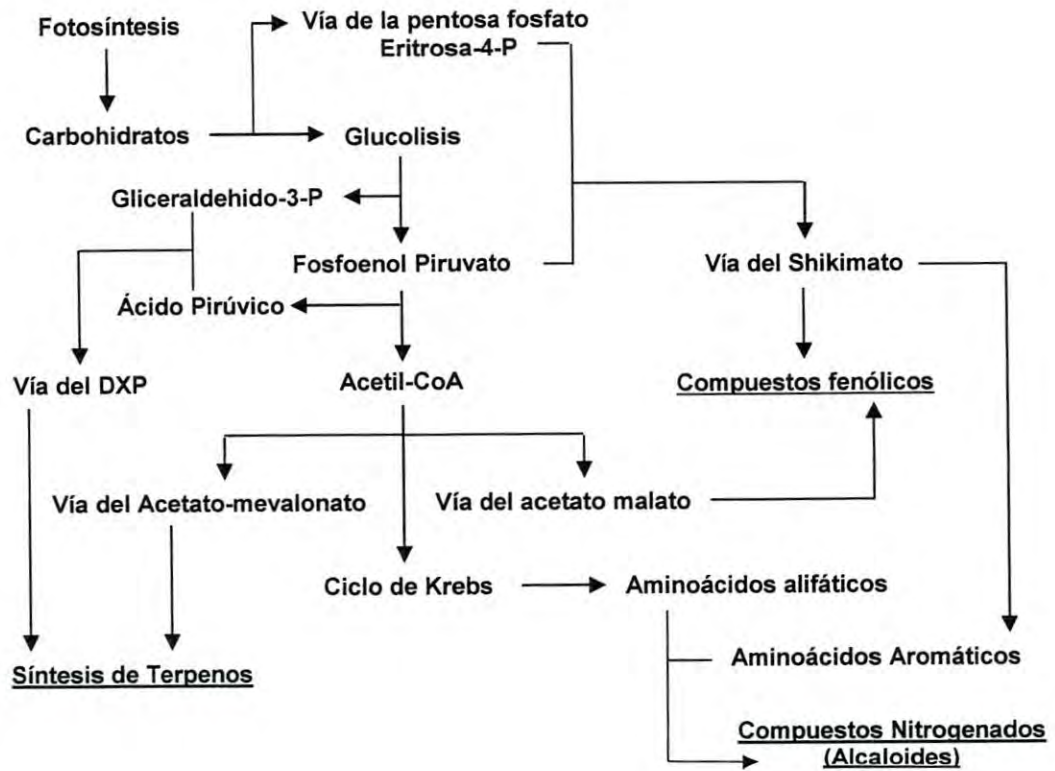
### **Metabolitos Secundarios Como Alternativa Antibiótica**

En los últimos años, las plantas con propiedades medicinales se han convertido en el objeto de estudio de numerosas investigaciones, cuya finalidad se ha centrado en la búsqueda y en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de las enfermedades más importantes de la actualidad (Joy y col., 1998; Souza-Fagundes y col., 2002). Varias de estas investigaciones, se han enfocado en el análisis de las propiedades antimicrobianas de algunas especies vegetales, con la finalidad de encontrar nuevos agentes antibióticos efectivos ante la inminente problemática que representan las especies multirresistentes (Nasicimiento y col., 2000; Gibbons, 2004; Gutiérrez, 2007; Sher, 2009). La capacidad farmacológica y terapéutica de las plantas está determinada por la presencia de compuestos químicos conocidos como metabolitos secundarios, los cuales han demostrado actividades biológicas y farmacológicas importantes (Souza-Fagundes y col., 2002; González, 2009). Su síntesis es inducida por factores ambientales, como un mecanismo de defensa en respuesta a condiciones adversas, como el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), el ataque por microorganismos (virus, hongos y bacterias), la competencia por el suelo, luz y nutrientes contra otras especies de plantas, ante la radiación solar excesiva, y otros factores abióticos como temperatura, humedad, o la constitución química del suelo.

Estos compuestos, no son de importancia nutricional para las plantas (Domingo y López-Brea, 2003), sin embargo, son necesarios para mantener el metabolismo básico y por consiguiente el buen desarrollo y estado de salud de la misma (Sepúlveda y col., 2003; García y col., 2006). La amplia variedad estructural y funcional de los metabolitos secundarios, se debe a los procesos de metilación, hidroxilación, esterificación, malonilación, glicosilación o intercalación con iones metálicos, por la modificación de las estructuras básicas características de cada grupo. Aunque existen varias maneras en la que algunos autores han clasificado a estos compuestos orgánicos, en general, se pueden diferenciar varios grupos atendiendo a su estructura química y a su origen biosintético, en: glucósidos, alcaloides, terpenos, flavonoides, fenoles y taninos (Sánchez y col., 2000; Verpoorte, 2000; Domingo y López-Brea, 2003; García, 2004; Sepúlveda y col., 2003).

Los procesos de síntesis de estos compuestos, involucran mecanismos bioquímicos que tienen lugar en rutas metabólicas alternas a las vías del metabolismo primario (fotosíntesis, glucólisis, ciclo de krebs y la vía del shikimato) a partir de precursores formados en estas últimas (Figura 1). Los compuestos de tipo terpenoide (terpenos) son sintetizados a partir del isopreno, su unidad estructural básica, la cual se origina mediante dos procesos. En el primero, el acetil-CoA es condensado a ácido mevalónico al pasar a través de la ruta acetato-mevalonato, y en el segundo se ve implicada la formación de 1-Deoxi-D-xylulosa-5-fosfato (DXP) en los cloroplastos a partir de ácido pirúvico y gliceraldehido-3-fosfato (Dewick, 2002). Por otra parte, el  $\alpha$ -cetoglutarato y el oxaloacetato generados en el ciclo de krebs, dan lugar a la síntesis de aminoácidos alifáticos (Mathews y van Holde, 1996), los cuales son utilizados posteriormente como precursores para la síntesis de alcaloides. De igual manera, la vía del shikimato proporciona moléculas precursoras para este proceso, pues da lugar a la síntesis de los aminoácidos aromáticos esenciales, el triptófano, la tirosina y la fenilalanina. Los compuestos fenólicos como los





**Figura 1.** Principales rutas de síntesis de los metabolitos secundarios.  
Fuente: Tomado y modificado de García 2004.



flavonoides y los taninos, provienen del mismo precursor que los aminoácidos aromáticos, un compuesto generado por la ruta del Shikimato denominado corismato (Herrmann, 1995). Finalmente, la vía del acetato malato también da paso a la generación de compuestos fenólicos conocidos como policétidos, generados mediante un mecanismo continuo de elongación por la unión de unidades de acetil-CoA o propionil-CoA, a unidades de malonil-CoA o metilmalonil-CoA (Hranueli y col., 2003). Las moléculas formadas poseen una gran diversidad de estructuras, y se caracterizan por la presencia de heterociclos poliinsaturados, altamente oxigenados por grupos ceto y sustituyentes hidroxilo (Staunton y Weissman, 2001; Hranueli y col., 2003).

### **Alcaloides**

La característica más destacable de los alcaloides es la presencia de átomos de nitrógeno en la estructura base del compuesto, pero no precisamente como un sustituyente, sino como un componente del esqueleto mismo. Esta familia de metabolitos secundarios posee una gran variabilidad de arreglos estructurales posibles, pero siempre caracterizados por ser heterocíclicos, insaturados y de bajo peso molecular, sólidos, cristalinos, incoloros y de naturaleza básica (Valencia, 1995; Ziegler y Facchini, 2008). Se ha observado que en la defensa de las plantas, algunos alcaloides ofrecen propiedades tóxicas en contra de patógenos microbianos, nematodos, insectos y vertebrados, además se han encontrado alcaloides con propiedades vasodilatadoras, anti-inflamatorias, anti-trombóticas y antioxidantes.

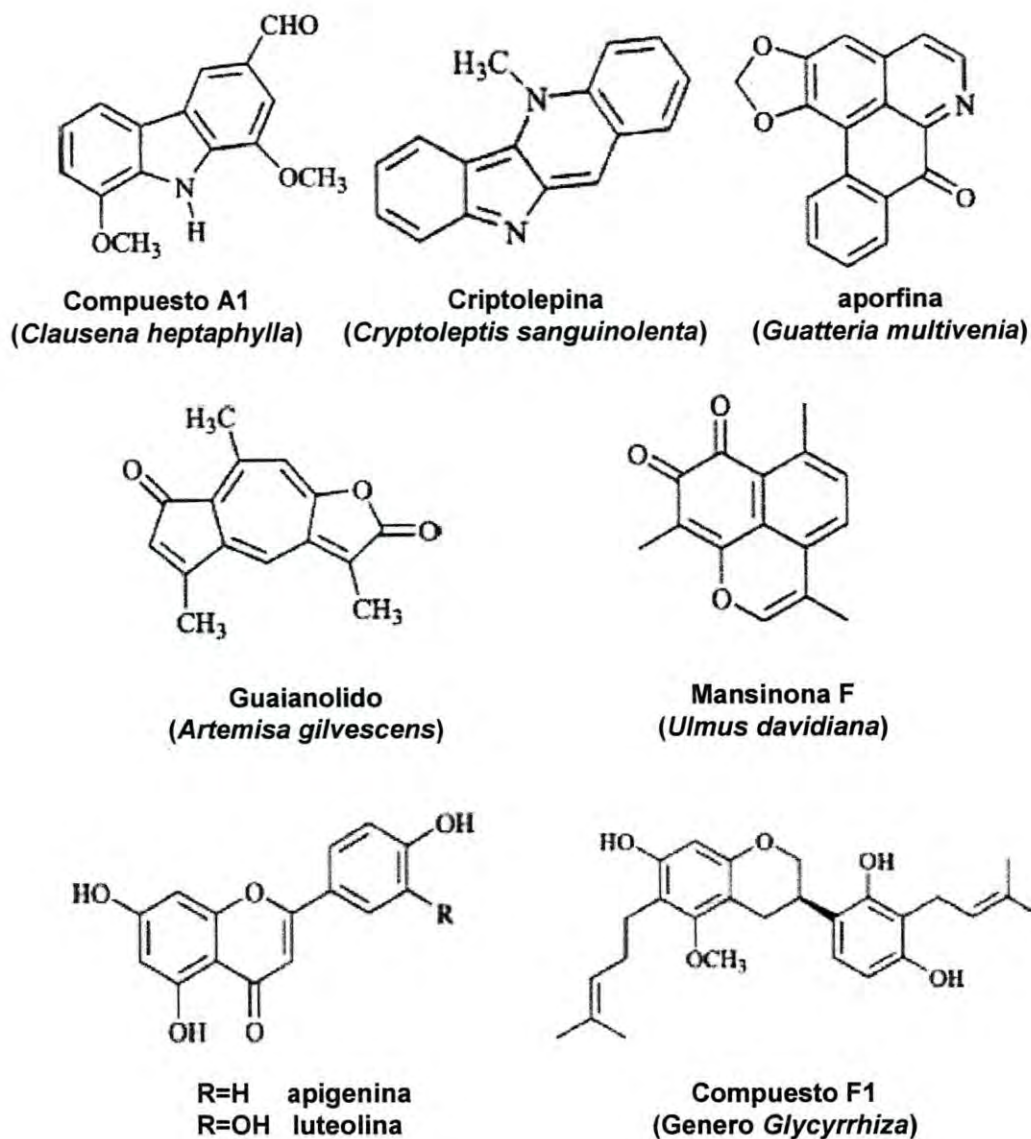
Según Wink y Shimmer (1999), las propiedades antimicrobianas de los alcaloides se deben a que algunos poseen capacidad de unirse a los componentes de la pared celular, mientras que otros se unen al material genético, entorpeciendo los mecanismos de expresión genética, daño a las vías metabólicas e inducción de apoptosis. En la literatura, existen antecedentes de alcaloides con propiedades antimicrobianas aislados de extractos vegetales

como la berberina y la sanguinarina, que poseen la capacidad de inhibir el crecimiento fúngico, bacteriano e impedir la replicación viral (Figura 2) (Sepúlveda y col., 2003). Los trabajos orientados a buscar compuestos antibacterianos en contra de *S. aureus* han dado lugar al aislamiento de alcaloides efectivos (Figura 2), como el compuesto A1, aislado de la especie vegetal *Clausena heptaphylla*, el cual demostró inhibir el crecimiento de *S. aureus* a una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 3 µg/mL. El estudio de las propiedades medicinales de la planta *Cryptoleptis sanguinolenta* dio como resultado el aislamiento de criptolepina, la cual presentó una MIC de 7.8 µg/mL, mientras que el aislamiento del compuesto aporfina a partir de la planta *Guatteria multivenia*, demostró capacidad de inhibir el crecimiento de cepas MRSA a una concentración de 2 µg/mL (Gibbons, 2004).

### **Terpenos**

Los terpenos se sintetizan a partir de la incorporación de unidades del isopreno (2-metil-butadieno) en su forma activa, como dimetilalil-difosfato o isopentenil-difosfato, siguiendo un patrón de unión cola-cabeza (Valencia, 1995; Dewick, 2002; Sepúlveda y col., 2003). Se clasifican en: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos, triterpenos, tetraterpenos y politerpenos, en base al número de unidades de isopreno de la cual están compuestos sus esqueletos de carbono según la expresión  $(C_5)_n$  (Dewick, 2002; Arias, 2008). Al igual que los alcaloides, los terpenos en general presentan estructuras homo y heterocíclicas insaturadas con diferentes grados de oxidación. Su diversidad está determinada por la presencia de enlaces pi, los que permiten que las unidades de isopreno adopten una gran cantidad de arreglos posibles, y por su unión a otros metabolitos secundarios (Sepúlveda y col., 2003; Dewick, 2002).





**Figura 2.** Alcaloides, terpenos y flavonoides con actividad antibacteriana en contra de *Staphylococcus aureus*.

Fuente: Tomado de Gibbons, 2004.



En general, son compuestos muy numerosos presentes en la mayoría de las plantas donde poseen varias funciones, actúan como reguladores del crecimiento, son pigmentos accesorios de la fotosíntesis vegetal y poseen propiedades antioxidantes (Valencia, 1995; Sepúlveda y col., 2003; Arias, 2008). En cuanto a las propiedades antimicrobianas, los terpenos han mostrado poseer importantes efectos en contra de cepas de MRSA (Figura 2). Dos sesquiterpenos, el guaianólido y la mansinona F, el primero aislado de *Artemisa gilvescens* mostró actividad a una MIC de 1.95 µg/mL, mientras que la mansinona F aislada de *Ulmus davidiana* var. *Japonica* demostró poseer actividad en contra de 19 cepas MRSA con concentraciones mínimas inhibitorias entre 0.39 a 1.56 µg/mL (Gibbons, 2004).

### **Flavonoides**

Son un amplio grupo de compuestos polifenólicos de bajo peso molecular cuyo esqueleto carbonado presenta el arreglo estructural C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, denominado anillo flavano (2-fenilbenzopirano) (Valencia, 1995; López, 2002; Martínez, 2005). Se clasifican de acuerdo al grado de oxidación de sus anillos en: flavanos, flavonas, flavanonas, flavonoles, antocianidinas, o leucoantocianidinas (Martínez y col., 2002; Lock y col., 2006). La variación estructural del núcleo 2-fenilbenzopirano da origen a otros grupos, como las chalconas, las dihidrochalconas, auronas e isoflavonas (Valencia, 1995; López, 2002).

Por lo común se presentan formando glucósidos, unidos con una o tres unidades de carbohidratos (glucosa principalmente, galactosa, arabinosa, ramnosa, y xilosa), mediante los sitios de los carbonos 3 y/o 7 (López, 2002; Martínez, 2005; Ballester y col., 2006, Lock y col., 2006), en esta forma, son más solubles en agua y menos reactivos ante radicales libres, sin embargo, los aglicones por su carácter fenólico son tóxicos para las células y normalmente se aíslan de tejidos muertos como las cortezas (Valencia, 1995; López, 2002). Los flavonoides son los pigmentos presentes en las plantas, abundan en las partes

aéreas y jóvenes, y las protegen contra el exceso de radiación, el ataque por insectos, hongos, virus y bacterias, también se ha observado que son los responsables de la regulación hormonal vegetal y ser atrayentes de polinizadores (Lock y col., 2006).

Algunos flavonoides simples aislados de plantas como apigenina y luteolina han mostrado actividad moderada contra MRSA con MIC entre 3.9 a 62.5  $\mu\text{g/mL}$ , asimismo, algunas isoflavonas como el compuesto F1 presente en algunas especies del genero *Glycyrrhiza* con una MIC de 3.13 a 6.25  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 2). A pesar de que un gran número de flavonoides presentan actividad en contra de *S. aureus*, se ha observado en varios trabajos que su utilización en conjunto con otros antibióticos aumenta el potencial inhibitorio del fármaco, o del mismo flavonoide (Gibbons, 2004).

### ***Rhizophora mangle* L.**

*Rhizophora mangle* L. (Mangle rojo) es una planta perteneciente a la familia *Rhizophoraceae* (Figura 3). Es un arbusto o árbol nativo que puede llegar a medir hasta 25 metros de altura, de corteza grisácea, delgada o cafésosa, someramente surcada o casi lisa en los tallos, hojas opuestas, láminas elípticas a obovadas de 5 a 15 cm de largo, color verde oscuro. La flor posee cuatro pétalos blanco amarillentos, lineares, más o menos igualando los lóbulos del cáliz, pubescentes con pelos crispados blancos; ocho estambres, de 5-6 mm de largo, anteras igualando o ligeramente excediendo los filamentos carnosos; fruto vacado, cónico, de 2-2.5 cm de largo, color café. Esta planta crece en esteros del golfo de California, aunque se le puede hallar en las playas de Sonora, y lugares lodosos de bahías, florece de marzo a noviembre. Las hojas, el fruto seco y la raíz se colectan en las playas para elaborar un té; se utiliza para infecciones de garganta y gastrointestinales (Johnson y col., 1996).





**Figura 3.** Ejemplar de *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo).



El género *Rhizophora* ha sido sujeto de varias investigaciones, entre las más destacables se encuentra la realizada por Sánchez y colaboradores (2000), los cuales analizaron la actividad antimicrobiana de los principales grupos químicos presentes en el extracto acuoso de la corteza. En este estudio, se encontró la presencia de ácidos grasos, fitoesteroles, aceites esenciales, taninos y polifenoles de bajo peso molecular, y se observó que cada uno de estos constituyentes poseen en menor o mayor grado propiedades antibacterianas en contra de *S. aureus*. Se determinó que los compuestos polifenólicos constituyen la fracción mayoritaria del extracto total, y son los principales responsables de la actividad antibacteriana observada. Por otra parte, Sánchez y colaboradores (2007) enfocándose a determinar los polifenoles de los cuales se constituía el extracto acuso de *R. mangle* L., lograron aislar e identificar la presencia de taninos como el ácido gálico, epicatequina, catequina, ácido clorogénico y ácido elágico cuya actividad antibacteriana en contra de *S. aureus* ha sido demostrada (Akiyama y col., 2001). Sin embargo, no lograron determinar si la actividad antibacteriana del extracto se debe a un compuesto específico; por el contrario, se concluyó que la actividad de dicho extracto se debe a polifenoles, muchos de los cuales no fueron identificados. El objetivo de los trabajos realizados por Sánchez y col. (2007) en ningún momento fue el de determinar la actividad antimicrobiana de estos polifenoles. Sin embargo, en base a sus antecedentes citados y al objetivo planteado, se esperaría que los resultados mostrados aclararan dicho aspecto. El principal factor limitante fue la metodología empleada, pues aunque ésta se desarrolló con el objetivo de describir los compuestos polifenólicos constituyentes del extracto acuoso, solo se determinó la presencia de compuestos polifenólicos conocidos, mediante la comparación entre los patrones de estándares de compuestos específicos contra los obtenidos de la muestra de mangle, mediante el análisis con HPLC. Además, la separación de los constituyentes polifenólicos se realizó solo en función de sus propiedades

estructurales, y no de sus propiedades antimicrobianas. Por lo tanto, los constituyentes mayoritariamente aquí encontrados, no son necesariamente los responsables de la actividad antibacteriana del extracto acuoso de la corteza de *R. mangle* L.

El análisis de los datos presentados por Sánchez y col. (2007) y de su metodología empleada, muestran la posibilidad de abordar el punto de la actividad antibacteriana del extracto acuoso de la corteza de *R. mangle* L., y de resolver aspectos no aclarados sobre los compuestos responsables, mediante la implementación de un análisis biodirigido. Es decir, un proceso que de manera continua separe los compuestos en fracciones más pequeñas con base en la actividad antibacteriana observada. Los resultados mostrados por Rosas-Burgos y col. (2009) muestran que el empleo de este tipo de metodología es una herramienta útil en el aislamiento de compuestos con propiedades antimicrobianas a partir de extractos vegetales de plantas de uso medicinal. Finalmente, existen antecedentes sobre la implementación de aislamiento biodirigido sobre el extracto vegetal de *R. mangle* L. Puntualmente, Zamora-Alvarez (2011), evaluó la actividad antibacteriana de cuatro fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico de la corteza en contra de *S. aureus*, y encontró que la fracción de acetato de etilo fue la que presentó el más alto porcentaje de inhibición del crecimiento a una concentración de 400 µg/mL.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material Vegetal**

Se colectaron especímenes vegetales con las características descritas por Johnson y col., 1996 para la especie *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo), en la Bahía de Yavaros, Sonora, municipio de Huatabampo. La especie fue validada en el herbario de la Universidad de Sonora por el Ing. Jesús Sánchez Escalante, y cuenta con el número de registro 20392.

La corteza fue separada del tronco y sometida a un periodo de secado de 3 semanas a la sombra a una temperatura  $\approx 25$  °C. Posteriormente, la corteza fue triturada en un molino marca Thomas Scientific modelo 3383-L10 lo más finamente posible, obteniéndose un Kilogramo de muestra seca.

### **Obtención del Extracto Metanólico**

La obtención del extracto a partir de la muestra pulverizada se realizó en base a lo reportado por Ramírez y Díaz (2007). La muestra de corteza de mangle rojo se suspendió en metanol en relación 1:10 (peso/volumen), y se mantuvo la solución en agitación constante por 96 horas a temperatura  $\approx 25$  °C, en recipientes cerrados. Al final del periodo de agitación, la muestra se filtró, primero con papel filtro por decantación y luego al vacío con papel Whatman No.1, para eliminar la mayor cantidad posible de impurezas. La solución obtenida fue sometida a un proceso de concentración en un evaporador rotatorio marca Yamato RE 300; el concentrado resultante fue denominado extracto metanólico o extracto "crudo".



## **Obtención de la Fracción de Acetato de Etilo a Partir del Extracto Metanólico**

La obtención de fracciones a partir del extracto metanólico se realizó en base a la metodología propuesta por Rondina y col. (1985), Jones y Kinghorn (2006); Ramírez y Díaz (2007) y Zamora-Alvarez (2011), mediante un proceso por partición sólido-líquido utilizando hexano y acetato de etilo. El procedimiento se basa en la solubilización de los compuestos que conforman al extracto metanólico en base a su afinidad con el solvente utilizado. En el presente trabajo se realizaron lavados exhaustivos al extracto metanólico obtenido de *R. mangle* L., iniciando con el hexano, y se mantuvo en agitación por 24 horas. Posteriormente el sobrenadante rescatado de cada uno de los lavados, fue decantado, filtrado y concentrado en un evaporador rotatorio marca Yamato RE 300, el concentrado fue denominado como fracción de hexano. Lo mismo se realizó para acetato de etilo. Al final fueron obtenidas la fracción de hexano y la fracción de acetato de etilo.

## **Aislamiento Biodirigido**

### **Cromatografía en Columna**

El procedimiento se realizó de acuerdo a lo establecido por Rosas-Burgos y col. (2009). Los compuestos contenidos en la fracción de acetato de etilo obtenida a partir del extracto metanólico de la corteza de *R. mangle* L. fueron separados en fracciones mediante cromatografía de adsorción. Se utilizó una columna de vidrio de 3.5 cm x 42 cm empacada con Silica gel 60 de 70-230 mesh (Sigma-Aldrich) con una relación 1:30 muestra/adsorbente. Para su empaquetamiento se utilizaron 180 g de Silica gel 60 de 70-230 mesh (Sigma-Aldrich) previamente activada (calentada a 100 °C por 60 minutos) la cual se dejó enfriar y le fueron agregados 500 mL de una mezcla de hexano/acetato de etilo/metanol (80:10:10). Se disolvieron 6 gramos de muestra en la mínima cantidad de

metanol necesaria para ello, y posteriormente se añadió a la columna. Se utilizaron 400 mL de las siguientes mezclas de solventes como eluyentes de la columna: Hexano/acetato de etilo/metanol (80:10:10), (20:40:40) y alcohol ter-butílico/acetato de etilo/metanol/agua/ácido fórmico en proporción (20:20:40:10:10), respectivamente. Se tomaron volúmenes de elución de 5 mL a los cuales se les realizó un análisis cromatográfico en capa fina para determinar los patrones de semejanza bajo luz UV y agrupar las eluciones en fracciones. Tales fracciones fueron concentradas a presión reducida para su evaluación.

### **Cromatografía en Capa Fina**

Se utilizaron láminas de aluminio con Silica gel para TLC de 0.2 mm de espesor con un indicador fluorescente a 254 nm (Sigma-Aldrich), los cromatogramas obtenidos fueron observados bajo radiación UV a 254 nm y a 365 nm. La cromatografía en capa fina se utilizó para tres fines: **(i)** establecer las mejores condiciones de separación de los componentes de la fracción de acetato de etilo mediante cromatografía en columna, **(ii)** para el análisis de las eluciones obtenidas por cromatografía en columna, y **(iii)** para el análisis de la actividad antibacteriana de los componentes de la fracción más activa obtenida por cromatografía en columna. Estos componentes químicos fueron extraídos utilizando DMSO y centrifugaciones repetidas de las muestras a 12,800 g por 5 minutos a 25 °C.

### **Cromatografía en Placa Preparativa**

Los componentes químicos de la fracción con mayor actividad antibacteriana en contra de *S. aureus* fueron aislados y colectados mediante placas con sílica gel 60 (soporte de vidrio de 20 cm x 20 cm con 2 mm de grosor, marca Merck Co. Darmstadt, Germany). La cromatografía fue desarrollada utilizando una fase móvil de hexano/acetato de etilo/metanol en relación (80:10:10), las bandas



fueron colectadas en tubos de vidrio mediante el raspado de la sílica. Posteriormente, los componentes químicos fueron extraídos utilizando una mezcla de solventes (hexano/acetato de etilo en relación 8:2), filtración con lana de vidrio y centrifugaciones repetidas a 1400 g por 5 minutos a 25 °C. Las muestras fueron evaporadas en un horno eléctrico a presión reducida a 35 °C para su posterior análisis espectral.

### **Reactivación de Cepa Bacteriana y Ajuste del Inóculo de Trabajo**

Para este proceso, se tomó la metodología descrita por Ruiz-Bustos y col. (2009) modificada por Zamora-Alvarez (2011). Se preparó un cultivo de *S. aureus* (ATCC 6538P) a partir de una cepa preservada a -80 °C. Para ello, la cepa preservada se dejó descongelar a temperatura ambiente, posteriormente se tomaron 150 µL y se inocularon en 2.850 mL de caldo Mueller Hinton (dilución 1:30); para luego incubarse a 37 °C por 12 horas. Después del periodo de incubación, se realizó un subcultivo (dilución 1:20), para ello se inocularon 750 µL del primer cultivo en 14.250 mL de caldo Mueller Hinton, y se incubó a 37 °C durante 6 horas. A partir este subcultivo se preparó el inóculo de trabajo utilizando el patrón 0.5 de la escala de McFarland, ajustándose a una absorbancia entre 0.8 a 1.0 a 620 nm.

### **Evaluación de la Actividad Antibacteriana**

La evaluación de la actividad antibacteriana de la fracción de acetato de etilo obtenida a partir del extracto metanólico de *R. mangle* L., y de las fracciones obtenidas por el proceso cromatográfico de adsorción se realizó mediante el método de microdilución en caldo en una microplaca de 96 pozos (Becton Dickinson, Falcon®), en base a lo reportado por Andrews (2001) y Ruiz-Bustos y col. (2009). Para cada una de las fracciones obtenidas se realizaron cuatro diluciones seriadas de trabajo, a concentraciones finales de 800, 400, 200 y 100

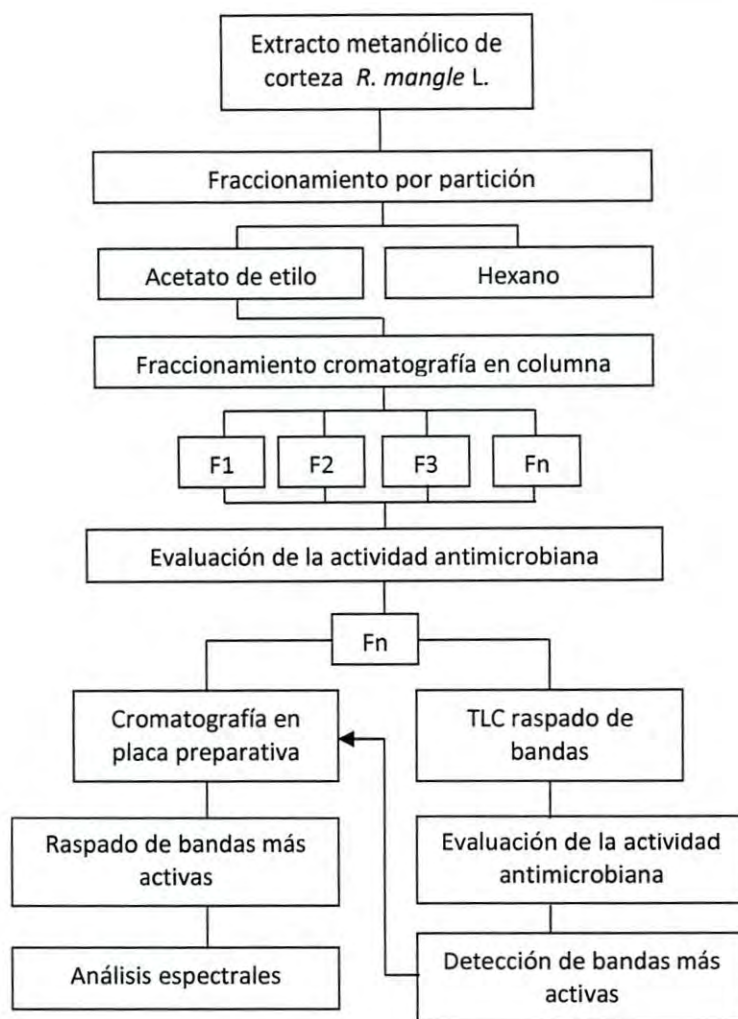


$\mu\text{g/mL}$ . La solución madre se preparó disolviendo del extracto en dimetilsulfóxido (DMSO) y en caldo Mueller Hinton (CMH), a una concentración de DMSO inherente al sistema.

Para el llenado de la microplaca, se agregaron por triplicado 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las diluciones seriadas de trabajo preparadas para cada una de las fracciones, con 100  $\mu\text{L}$  del inóculo de trabajo ajustado para *S. aureus*. De manera tal manera que en la microplaca, las concentraciones de una misma fracción varían horizontalmente de izquierda a derecha, de mayor a menor; y de arriba hacia abajo (verticalmente) varía la fracción utilizada. La microplaca se incubó a 37 °C por 24 horas; se midió la densidad óptica (D.O.) a 620 nm en un lector para placas de 96 pozos (Multiskan<sup>®</sup> EX, Thermo Electron Corp. Vantaa, Finland) cada 6 horas por 24 horas. Los controles que se utilizaron fueron: 100  $\mu\text{L}$  cada una de las diluciones de trabajo a sus diferentes concentraciones con 100  $\mu\text{L}$  caldo Mueller Hinton, como control de la prueba; 100  $\mu\text{L}$  de una solución de dicloxacilina con una concentración final de 25  $\mu\text{g/mL}$  y 100  $\mu\text{L}$  del inóculo de trabajo ajustado, como control negativo para *S. aureus*; 100  $\mu\text{L}$  del inóculo de trabajo ajustado con 100  $\mu\text{L}$  de DMSO a la concentración más alta utilizada como control positivo. Y por último, 200  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller Hinton, como control de esterilidad. Para valorar la actividad antibacteriana de todas las fracciones obtenidas, se determinó el porcentaje de inhibición (Andrews, 2001; Ruiz-Bustos y col., 2009).

### **Caracterización Química**

Las muestras aisladas por la cromatografía en placa preparativa fueron analizadas mediante varias técnicas espectrométricas con el fin de describir la naturaleza química de los componentes de la fracción más activa. En la figura 4 se presenta un esquema generalizado del proceso metodológico desarrollado para su obtención.



**Figura 4.** Esquema generalizado del proceso metodológico desarrollado.

### **Espectroscopia Infrarroja**

El análisis de los grupos funcionales presentes en las muestras se realizó mediante un espectrómetro FT-IR marca Perkin Elmer modelo GX en placas de KBr. Los espectros obtenidos fueron editados mediante el programa gráfico Prisma 2000 versión 3.02.

### **Resonancia Magnética Nuclear <sup>1</sup>H**

Se utilizó un espectrómetro marca Bruker modelo Avance 400 que opera a 400 MHz. Las muestras fueron disueltas en CDCl<sub>3</sub> y se usó tetrametilsilano como referencia. Para el análisis de los espectros obtenidos se utilizó el programa MestReNova 2009 versión 6.02.

### **Análisis Estadístico**

Se estableció un diseño experimental completamente al azar de un solo factor, con siete tratamientos, y se realizaron cuatro repeticiones con tres réplicas cada una. Por cada experimento individual, se realizaron tres réplicas. Se realizó un ANOVA de una vía y la prueba de Tukey para la comparación de medias utilizando el paquete estadístico PASW Statistics versión 18.0.0; valores de  $P \leq 0.05$  se consideraron significativos.



## RESULTADOS

### Fraccionamiento de la Fracción de Acetato de Etilo

A partir de 1 kg de la muestra vegetal (corteza pulverizada de *R. mangle* L.) se obtuvieron 409 g de extracto metanólico y 14.7 g de la fracción de acetato de etilo. La separación de los constituyentes químicos de la fracción de acetato de etilo mediante cromatografía de adsorción se realizó a partir de 5 g y dio como resultado la obtención de ocho fracciones (Tabla III).

### Actividad Antibacteriana de las Fracciones Obtenidas a Partir de la Fracción de Acetato de Etilo del Extracto Metanólico de *Rhizophora mangle* L. en Contra *S. aureus* (ATCC 6538P)

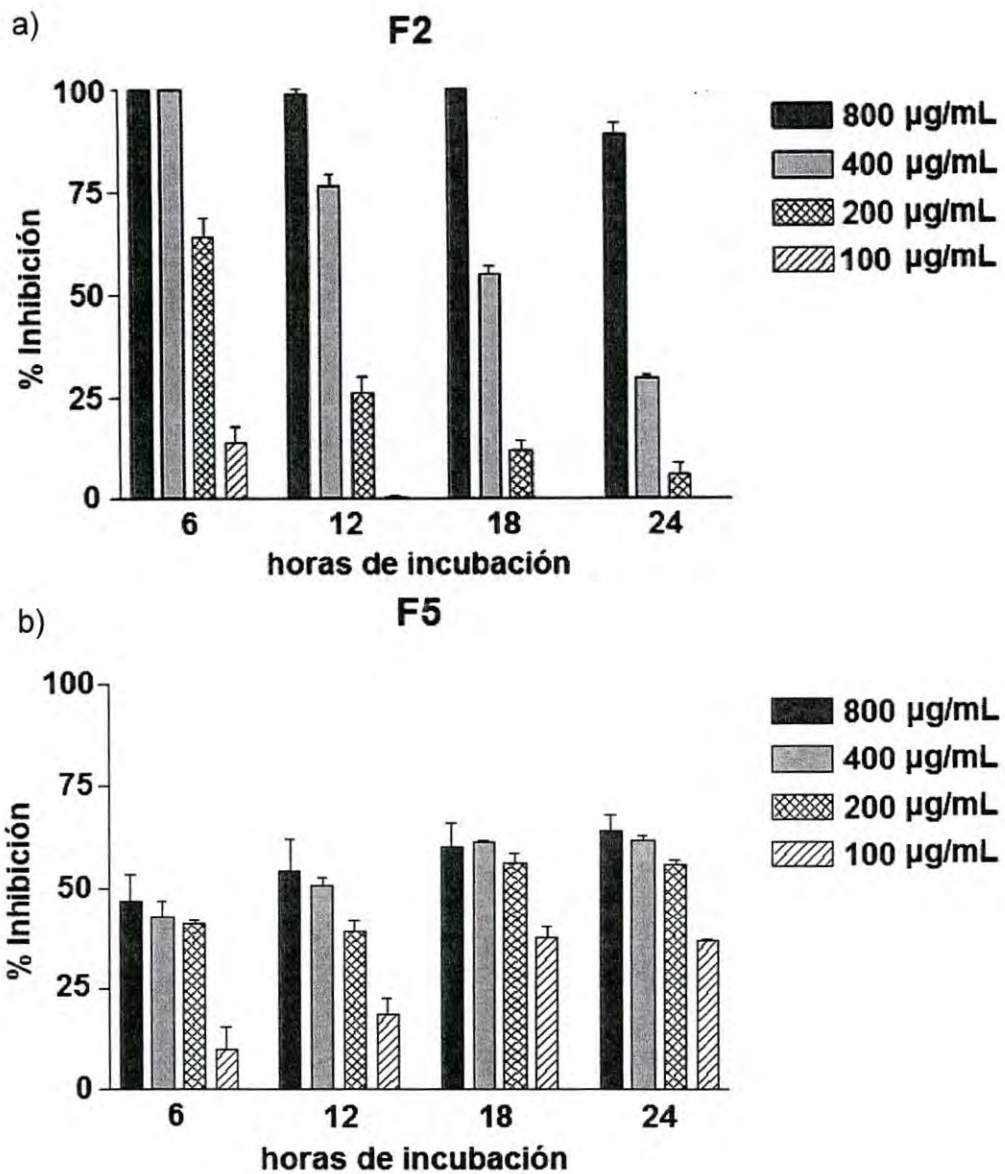
De las siete fracciones evaluadas, tres de ellas, F1, F3, y F4 no mostraron actividad antibacteriana significativa en contra de *S. aureus* (ATCC 6538P), mientras que F2, F5, F6 y F7 si lo hicieron. En las figuras 5 y 6 se muestran los porcentajes de inhibición del crecimiento de *S. aureus* a las 6, 12, 18, y 24 horas de incubación, obtenidos por la evaluación de la actividad antibacteriana de las fracciones F2, F5, F6 y F7. De las cuatro fracciones activas, F2 presentó los más altos porcentajes de inhibición a una concentración de 800 µg/mL con valores del 100%, 98%, 100% y 88% respectivamente (Figura 5a). Mientras que a concentración de 400 µg/mL inhibió más del 50% del crecimiento durante las primeras 18 horas con porcentajes de inhibición del 100%, 76%, 55% y 29%. A 200 µg/mL, F2 presentó actividad solo a las 6 horas y a 100 µg/mL no se presentó ningún efecto inhibitorio durante las 24 horas de evaluación. La figura 5b, muestra los resultados obtenidos por la evaluación de la fracción F5, la cual, a una concentración de 800 µg/mL presenta porcentajes de inhibición por debajo y cercanos al 50%, y solo a las 18 y 24 horas mostró valores por encima con un 62% y 65% de inhibición respectivamente.

**Tabla III.** Valores de rendimiento de las muestras obtenidas.

<b>Muestra</b>	<b>Cantidad (gramos)</b>	<b>Porcentaje</b>
Extracto metanólico	409.000	40.9
Fracción de acetato de etilo	14.7000	3.60
<b><i>Fase móvil: (80:10:10) Hex : AcetEtil : MeOH</i></b>		
<b>Fracción 1</b>		
Elución: 1-31	0.4102	8.20
<b>Fracción 2</b>		
Elución: 32-48	0.0886	1.77
<b>Fracción 3</b>		
Elución: 49-60	0.0256	0.51
<b>Fracción 4</b>		
Elución: un volumen de columna	0.0501	1.002
<b><i>Fase móvil: (20:40:40) Hex :AcetEtil :MeOH</i></b>		
<b>Fracción 5</b>		
Elución: 61-103	0.9826	19.65
<b>Fracción 6</b>		
Elución: 104-118	2.0790	41.58
<b>Fracción 7</b>		
Elución: 119-183	0.4979	9.95
<b><i>Fase móvil: (20:20:40:10:10) t-butil: AcetEtil : MeOH :H2O: AcFor</i></b>		
<b>Fracción 8</b>		
Elución: volumen restante de columna	0.8665	17.33

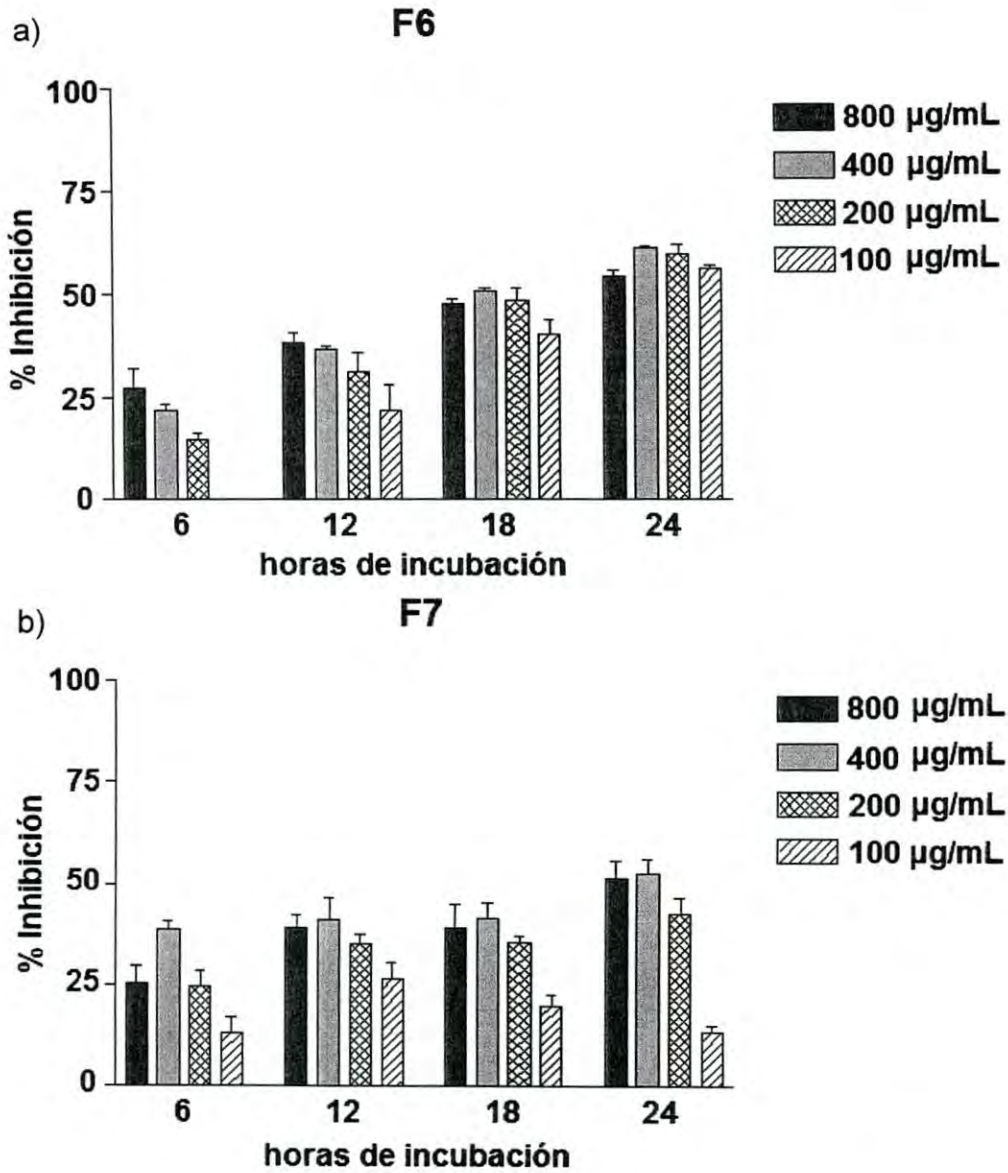
Hex: Hexano; AcetEtil: Acetato de etilo; MeOH: Metanol; H2O: Agua; AcFor: ácido fórmico.





**Figura 5.** Actividad antibacteriana de: a) fracción 2 (F2) y b) fracción 5 (F5) contra *S. aureus* (ATCC 6538P).



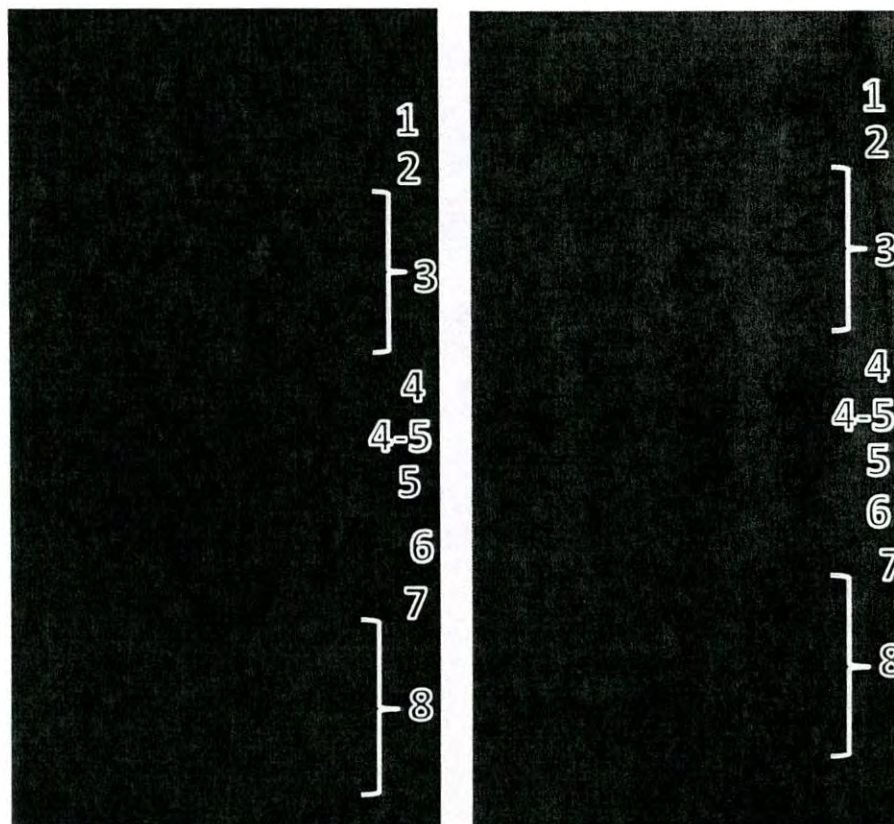


**Figura 6.** Actividad antibacteriana de: a) fracción 6 (F6) y b) fracción 7 (F7) contra *S. aureus* (ATCC 6538P).

La actividad antibacteriana de todas las concentraciones evaluadas posee una tendencia creciente. A 400  $\mu\text{g/mL}$  F5 presentó porcentajes de inhibición del 47%, 51%, 61%, y 62%, y 200  $\mu\text{g/mL}$  valores del 41%, 39%, 56% y 56% respectivamente. Para ambas concentraciones, se logró inhibir más del 50% del crecimiento a las 18 y 24 horas de evaluación. El máximo porcentaje alcanzado con la concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  fue del 37% a las 18 horas. Las fracciones F6 y F7 mostraron un comportamiento similar al presentado por F5, con una actividad antibacteriana creciente y cercana al 50% de inhibición del crecimiento de *S. aureus* (Figura 6). A las 24 horas de evaluación todas las concentraciones evaluadas de F6 inhibieron más del 50% del crecimiento, con valores del 54%, 61%, 57%, 55% respectivamente (Figura 6a). Para F7 los valores más altos de inhibición se presentaron a las 24 horas de incubación, con porcentajes del 51% para 800  $\mu\text{g/mL}$ , 52% para 400  $\mu\text{g/mL}$  y 42% para 200  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **Actividad Antibacteriana de las Bandas Colectadas a Partir de la Cromatografía en Capa Fina de la Fracción F2**

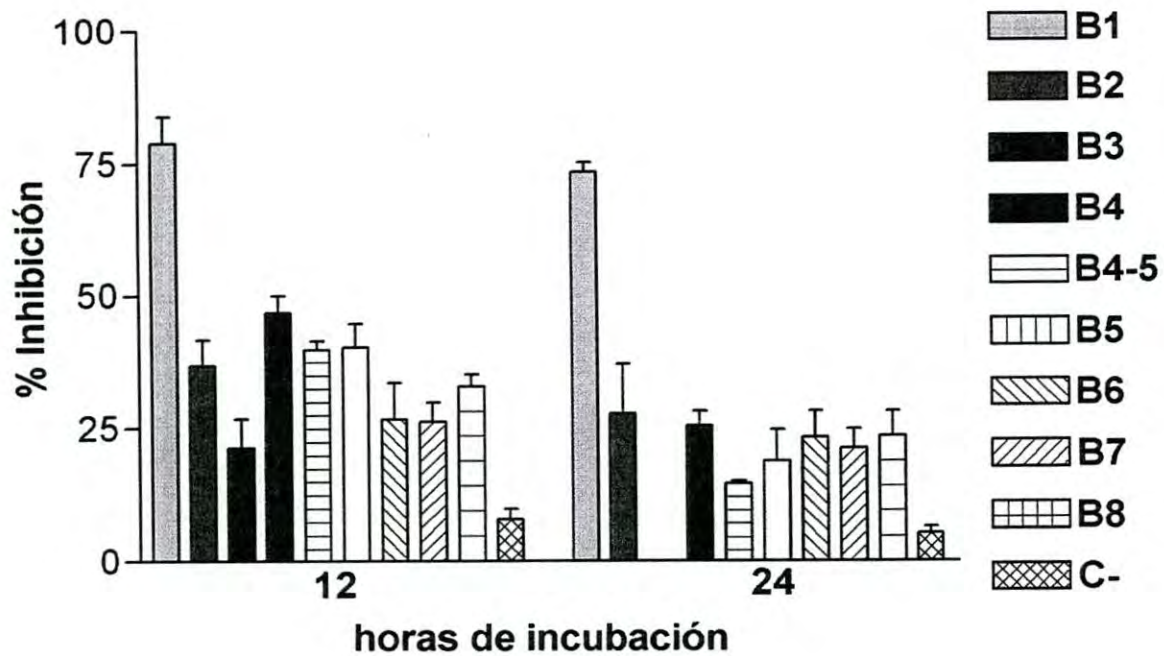
En la figura 7, se muestra el perfil cromatográfico de la fracción más activa (denominada F2) obtenido mediante TLC, y visto bajo luz UV. De todas las bandas colectadas y evaluadas, solo la banda "B1" presentó porcentajes de inhibición alrededor del 75% a las 12 y 24 horas de evaluación (figura 8). Las bandas restantes presentaron inhibición en grados variables. En base a estos resultados, y a la cantidad de muestra depositada en cada banda, se eligieron las bandas B1, B4, B5, B6 y B7 para su colección mediante cromatografía en placa preparativa y para su análisis espectral.



**Figura 7.** Perfil cromatográfico en TLC de la fracción F2 visto bajo luz UV a 254 nm (izquierda), y a 365 nm (derecha).

Las bandas que fueron colectadas y evaluadas están enumeradas. La imagen fue modificada digitalmente para resaltar las bandas.





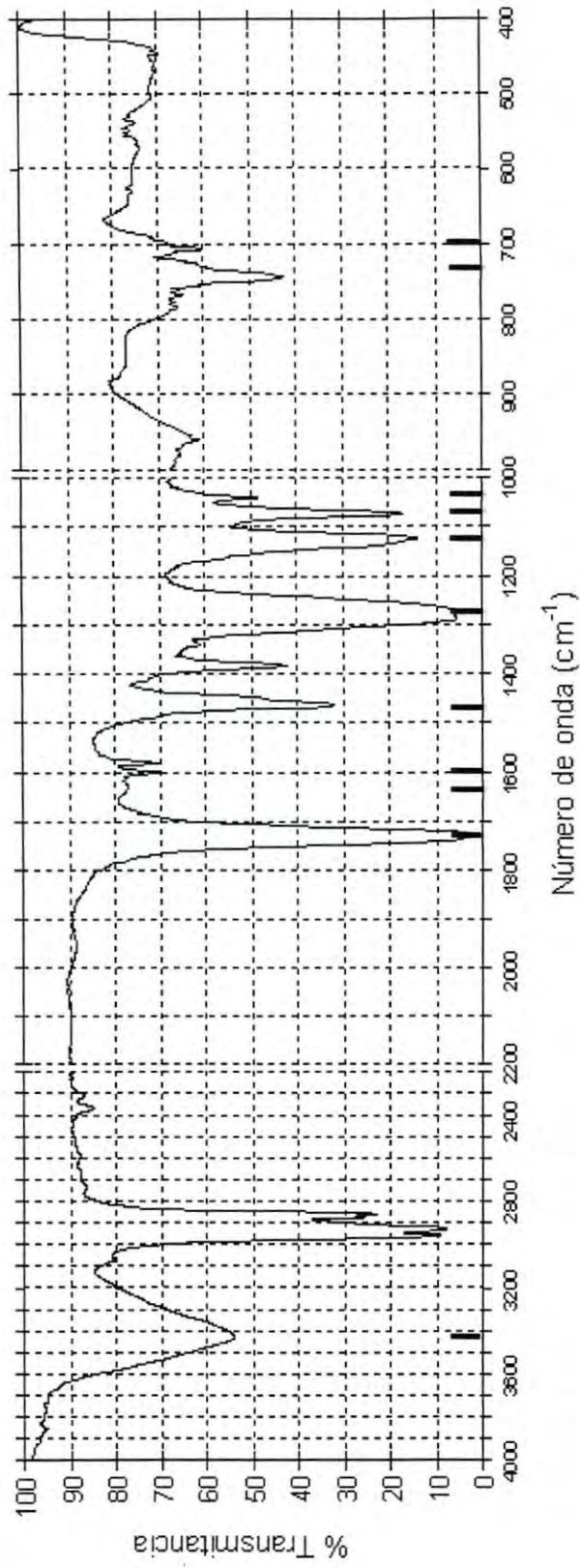
**Figura 8.** Actividad antibacteriana de las bandas colectadas a partir de la cromatografía en capa fina realizada a la fracción F2.

## Caracterización Química

### Espectroscopía Infrarroja

El espectro de absorción infrarroja de la muestra B7 se presenta en la figura 9, y las principales señales analizadas en la tabla IV. B7 presenta un señal débil a una frecuencia de  $3073\text{ cm}^{-1}$  con un 80.25% de transmitancia, en la región para señales de estiramiento entre protones y carbonos con hibridación  $sp^2$  de alquenos y/o anillos aromáticos. La determinación de la frecuencia del estiramiento C=C es definitiva para poder resolver tal naturaleza. Debido a la deslocalización de los enlaces Pi la energía de estiramiento entre los dobles enlaces de los anillos aromáticos es menor que la presentada por alquenos. La presencia de una señal débil a una frecuencia de  $1600\text{ cm}^{-1}$  y de una señal de mediana intensidad a  $1464\text{ cm}^{-1}$  corresponde a señales de estiramiento estiramiento C=C de anillos aromáticos, para los cuales teóricamente se espera un par de señales entre  $1600\text{ cm}^{-1}$  y  $1450\text{ cm}^{-1}$ . Las frecuencias para el enlace C=C de compuestos alifáticos usualmente se presentan entre un rango de  $1670\text{ cm}^{-1}$  y  $1640\text{ cm}^{-1}$ . El espectro IR de B7 muestra una frecuencia de estiramiento a  $1630\text{ cm}^{-1}$ , la cual puede deberse a la conjugación del doble enlace C=C con otro doble enlace alifático o aromático, el cual hace disminuir la energía de vibración del primero hasta  $1600\text{ cm}^{-1}$  por efecto de la resonancia de los electrones  $\pi$ , quitándole carácter  $sp^2$  al enlace C=C original.

Con respecto a las señales entre un número de  $400\text{ cm}^{-1}$  y  $1000\text{ cm}^{-1}$ , para el caso de esta muestra en particular, poca información molecular puede ser extraída. Las señales de mayor interés serían aquellas de frecuencias de vibración por plegamiento o doblamiento de los protones unidos a los carbonos aromáticos que predicen el tipo de sustitución del anillo. En esta región las dos señales más relevantes son la de  $706\text{ cm}^{-1}$  y la de  $743\text{ cm}^{-1}$ , las cuales sugieren que el anillo aromático este disustituido en posición orto.



**Figura 9.** Espectro infrarrojo de la muestra B7. La posición de las señales más importantes se indican por las barras inferiores.



**Tabla IV.** Principales señales del espectro infrarrojo de la muestra B7.

Tipo de vibración			Frecuencia esperada (número de onda $\text{cm}^{-1}$ )	Frecuencia encontrada B7
<b>C-H</b>	Alcanos	(S)	3000 – 2850 (s)	2929; 2959; 2873; 2859
	Alquenos	(S)	3100 – 3000 (s)	3073
	Aromáticos	(S)	3150 – 3050 (s)	3073
<b>C=C</b>	Alquenos	(S)	1680 – 1600 (m-w)	1630
	Aromático	(S)	1600 y 1475 (m-w)	1600 y 1464
<b>C=O</b>	Ester	(S)	1750 – 1735 (s)	1729
<b>C-O</b>	Ester	(S)	1300 – 1000 (s)	1274 y 1123
<b>O-H</b>	Alcoholes, fenoles		3400 – 3200 (m)	3430
<b>C-O</b>	Alcoholes	(S)	1260 – 1000 (s)	1073 y 1040

S: Estiramiento; s: Fuerte; m: mediana; w: débil

La presencia de dos señales ( $1729\text{ cm}^{-1}$  y  $1274\text{ cm}^{-1}$ ) y la ausencia de una tercera en la región entre  $3400\text{ cm}^{-1}$  y  $2400\text{ cm}^{-1}$  sugieren que el compuesto contenido en la muestra se encuentra esterificado. La primera señal ( $1729\text{ cm}^{-1}$ ), es una señal de estiramiento entre el oxígeno y el carbono  $sp^2$  del grupo carbonilo (C=O). Sin embargo, esta señal posee un valor menor que el esperado para los ésteres (entre  $1750\text{ cm}^{-1}$  y  $1735\text{ cm}^{-1}$ ) debido a una conjugación del grupo carbonilo. La segunda señal ( $1274\text{ cm}^{-1}$ ) corresponde a una señal de estiramiento entre el oxígeno esterificado y el carbono, la falta de la tercera señal indica la inexistencia del grupo carboxilo.

Finalmente, B7 posee un grupo hidroxilo, el espectro IR muestra una señal ancha que se extiende desde los  $3100\text{ cm}^{-1}$  a los  $3700\text{ cm}^{-1}$ , centrada en  $3430\text{ cm}^{-1}$ . El discernimiento de la naturaleza alifática o fenólica del hidroxilo recae en las señales de estiramiento del enlace C-O. Para fenoles, el efecto de resonancia tiende a aumentar el carácter  $sp^2$  del enlace C-O al disminuir la longitud de enlace por lo que se espera la presencia de una banda alrededor de  $1220\text{ cm}^{-1}$ . En su lugar, se presentaron señales de estiramiento C-O con frecuencias de  $1073\text{ cm}^{-1}$  y  $1040\text{ cm}^{-1}$ , las cuales están asociadas a un alcohol alifático. La señal de menor frecuencia ( $1040\text{ cm}^{-1}$ ) seguramente se debe al estiramiento del enlace C-O de un hidroxilo terminal (alcohol primario), pues su valor se encuentra en el rango esperado, entre  $1050\text{ cm}^{-1}$  y  $1000\text{ cm}^{-1}$ . Por otro lado, existe una alta probabilidad de que la señal de mayor frecuencia ( $1073\text{ cm}^{-1}$ ) se deba a un alcohol secundario alifático o cíclico (no aromático) conjugado, pues dicha señal se encuentra cerca del rango esperado  $1100\text{ cm}^{-1}$  y  $1050\text{ cm}^{-1}$ . El efecto de resonancia induce la disminución de la energía de vibración y por lo tanto la frecuencia.

Los espectros infra rojo de las muestras B6 y B5 presentan señales concordantes con B7 (Tabla V). En el caso de B6, su espectro presenta las mismas señales de estiramiento que B7 para el grupo éster,  $1729\text{ cm}^{-1}$  para el carbonilo y  $1274\text{ cm}^{-1}$ ;  $1123\text{ cm}^{-1}$  para el enlace carbono oxígeno. También presenta un par de señales para el estiramiento carbono-carbono  $sp^2$

**Tabla V.** Comparación de las principales señales de estiramiento del espectro IR de la muestra B7, B6 y B5.

Tipo de vibración (Estiramiento)	Frecuencia esperada (número de onda $\text{cm}^{-1}$ )	Frecuencia encontrada ( $\text{cm}^{-1}$ )		
		B7	B6	B5
C-H	3000 – 2850 (s)	2929; 2959; 2873; 2859	2930; 2960; 2860	2958; 2928; 2872; 2858
Alquenos	3100 – 3000 (s)	3073	*3072	*3060
	3150 – 3050 (s)	3073	*3072	*3060
C=C	1680 – 1600 (m-w)	1630	*	*
	1600 y 1475 (m-w)	1600 y 1464	1597 y 1466	1600 y 1465
C=O	1750 – 1735 (s)	1729		1729
	1730 – 1700 (s)		*1729	
C-O	1300 – 1000 (s)	1274 y 1123		1274; 1123
	1320 – 1210 (m)		*1274	
O-H	3400 – 3200 (m)	3430		*3282
			3430-2400	
C-O	1260 – 1000 (s)	1073 y 1040	1073; 1042	1073; 1042

(\*): señales discrepantes; S: Estiramiento; s: Fuerte; m: mediana; w: débil.



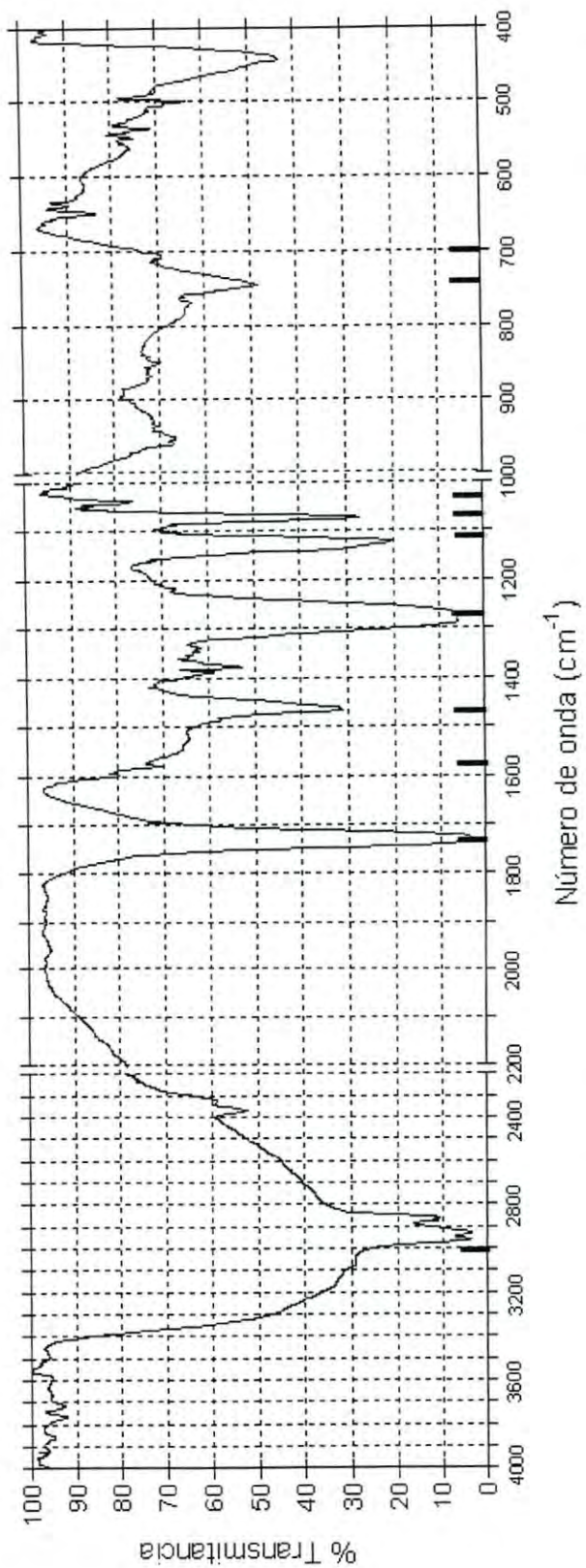
aromático, y la señal de balanceo de los protones unidos a carbonos aromáticos que sugieren una disustitución del anillo en posición orto a  $745\text{ cm}^{-1}$ . Sin embargo, la principal diferencia entre ambos espectros es la presencia de una señal de estiramiento OH de  $3430\text{ cm}^{-1}$  a  $2400\text{ cm}^{-1}$  debida al grupo carboxilo (figura 10).

Para el caso de la muestra B5, su espectro infra rojo muestra señales de estiramiento para el grupo éster con valores de número de onda casi iguales que los presentados por los espectros de las muestras B6 y B7 ( $1729\text{ cm}^{-1}$  para el carbonilo y  $1274\text{ cm}^{-1}$ ;  $1123\text{ cm}^{-1}$  para el enlace carbono oxígeno). Asimismo, muestra señales de estiramiento para carbonos  $\text{sp}^2$  aromáticos disustituidos en posición orto (figura 11). Por otro lado, no presenta señales de estiramiento para el grupo carboxilo, o para el grupo hidroxilo de alcoholes. Los espectros adquiridos para las muestras B1 y B4 presentan un patrón de señales de baja resolución, lo cual indica que estas fracciones poseen baja pureza y que tal resultado se debe a la presencia de más de un compuesto químico.

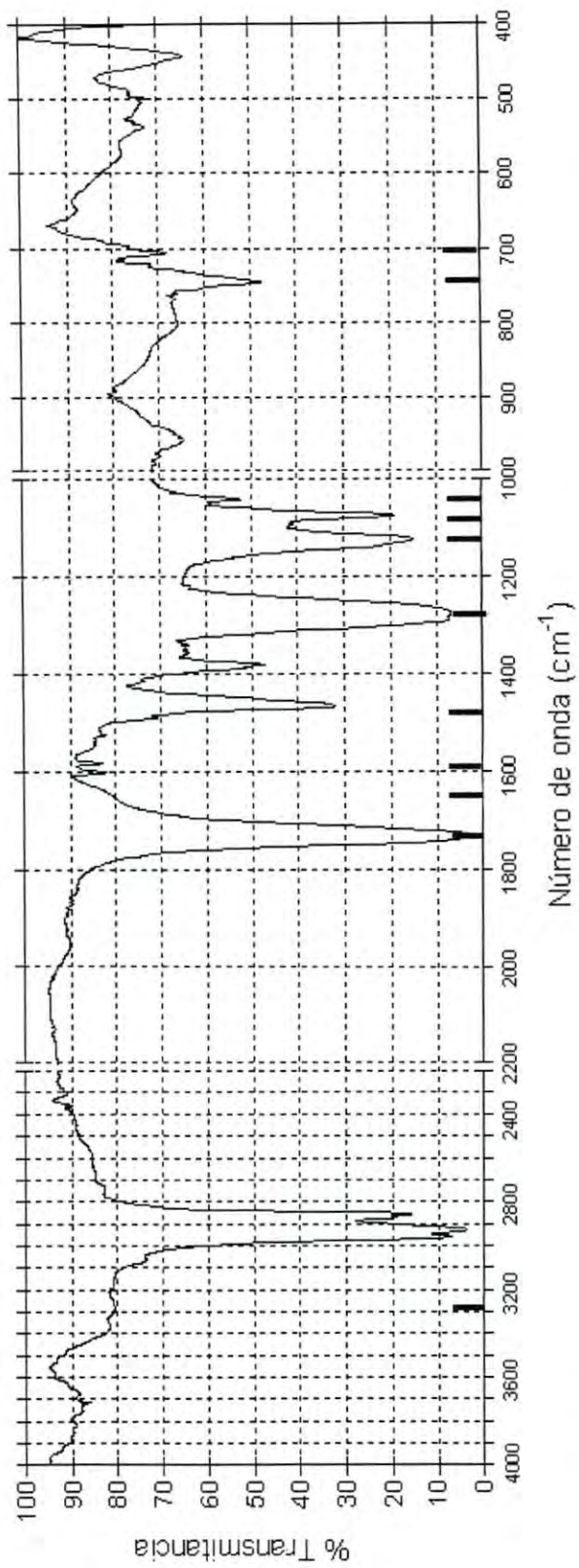
### **Resonancia Magnética Nuclear $^1\text{H}$**

Los resultados obtenidos por el análisis de resonancia de las diferentes muestras, se resumen en la tabla VI. El espectro de resonancia de la muestra B7 presenta un par de señales dadas por protones aromáticos, con un desplazamiento químico ( $\delta$ ) de  $7.71\text{ ppm}$  y  $7.53\text{ ppm}$ , respectivamente (figura 12). La comparación de las integrales relativas y el análisis de sus constantes de acoplamiento, indican la resonancia de dos protones por cada señal.

A  $4.22\text{ ppm}$  se presenta una señal con un patrón de desdoblamiento múltiple dado por cuatro protones metilenos desprotegidos, químicamente equivalentes pero magnéticamente diferentes. A  $1.685\text{ ppm}$  se centra un multiplete resultado de la resonancia de dos protones metinos, con constantes de acoplamiento vecinal  $J^3$ . A un desplazamiento químico entre  $1.5\text{ ppm}$  y  $1.270$



**Figura 10.** Espectro infrarrojo de la muestra B6. La posición de las señales más importantes se indican por las barras inferiores.



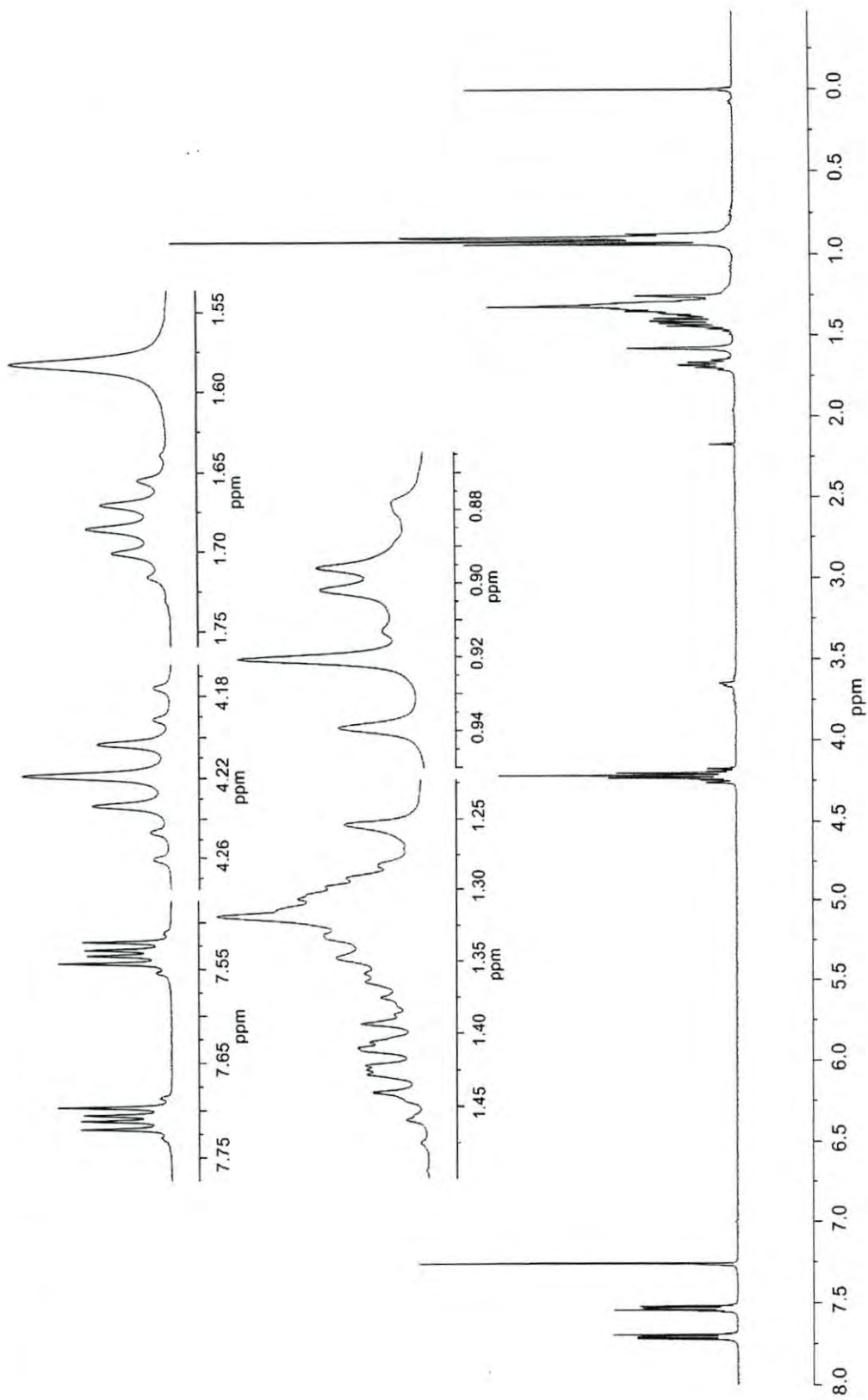
**Figura 11.** Espectro infrarrojo de la muestra B5. La posición de las señales más importantes se indican por las barras inferiores.



**Tabla VI.** Principales señales de RMN <sup>1</sup>H encontradas para las muestras B1, B4, B5, B6 y B7.

Tipo de protón	B7 δ (ppm)	B6 δ (ppm)	B5 δ (ppm)	B4 δ (ppm)	B1 δ (ppm)
H <sub>a</sub> aromático	7.71; 2H, dt J = 9.0 Hz; 3.66 Hz	7.70; 2H, dt J = 9.0 Hz; 3.8 Hz	7.71; 2H, dt J = 9.0 Hz; 3.3 Hz	7.710; 2H, dt J = 9.0 Hz; 3.3 Hz	7.750; 2H, dt J = 8.9 Hz; 3.3 Hz
H <sub>b</sub> aromático	7.53; 2H, dt J = 9.0 Hz; 3.66 Hz	7.53; 2H, dt J = 9.0 Hz; 3.8 Hz	7.530; 2H, dt J = 9.0 Hz; 3.3 Hz	7.530; 2H, dt J = 9.0 Hz; 3.3 Hz	7.540; 2H, dt J = 9.0 Hz; 3.3 Hz
H <sub>c</sub> metileno	4.220; 4H, m J = 6.2 Hz; 11*	4.220; 4H, m J = 6.2 Hz; 11*	4.220; 4H, m J = 6.25 Hz; 11*	4.220; 4H, m J = 6.25 Hz; 11*	4.220; 4H, m J = 6.3 Hz; 11*
-	2.175; ND, s	2.175; ND, s	2.176; ND, s	2.175; ND, s	2.179; ND, s
H <sub>d</sub> metino	1.685; 2H, m J = 6 Hz	1.685; 2H*, m J = 6 Hz	1.685; 2H, m J = 6 Hz	1.685; 2H, m J = 6 Hz	1.686; 2H, m J = 6 Hz
H <sub>e</sub> metilenos	1.500 a 1.270 17H*	1.500 a 1.270 ND	1.500 a 1.270 ND	1.500 a 1.270 18H*	1.500 a 1.270 18H*
-	1.254; ND, s	1.253; ND, s	1.254; ND, s	1.253; ND, s	1.260; ND, s
H <sub>f</sub> metilo	0.921; 3H, t J = 7 Hz	0.920; 3H, t J = 7 Hz	0.921; 3H, t J = 7 Hz	0.920; 3H, t J = 7 Hz	0.920; 3H, t J = 7 Hz
H <sub>g</sub> metilo	0.896; 3H, t J = 7 Hz	0.896; 3H, t J = 6 Hz	0.895; 3H, t J = 6 Hz	0.895; 3H, t J = 6 Hz	0.896; 3H, t J = 6 Hz

(\*): valores aproximados; ND: no determinado; δ: desplazamiento químico; ppm: partes por millón; dt: doble de triples; m: multiplete; s: singlete; J: constante de acoplamiento



**Figura 12.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la muestra B7. Las principales señales han sido expandidas.

ppm, se presenta un cantidad variable de señales sobrepuestas cuyas integrales relativas sugieren la resonancia de dieciséis protones metilenos. A un desplazamiento químico entre 0.976 ppm y 0.845 ppm se presentan dos señales sobrepuestas cada una de las cuales se debe a la resonancia de protones metilo, la comparación relativa de las integrales indican la existencia de doce protones metilos. Otras señales presentes corresponden a un patrón irregular entre 3.801 ppm y 3.589 ppm, un débil singulete a 2.175 ppm, un singulete a 1.582 ppm, y un singulete a 1.254 ppm.



## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran aspectos importantes sobre la naturaleza de las propiedades antibacterianas del extracto de la corteza de *R. mangle* L. Con respecto a los trabajos de Sánchez y col. (2000) y Sánchez y col. (2007), nosotros hemos probado que verdaderamente la actividad antibacteriana del extracto metanólico de la corteza se debe a distintos compuestos. En comparación con otros trabajos centrados en el aislamiento biodirigido de compuestos vegetales con actividad antibacteriana en contra de *S. aureus* (Manubolu y col., 2013; Dhayanithi y col., 2012), las extracciones exhaustivas y consecutivas que realizamos al extracto metanólico, redujeron la posibilidad de que las diferentes fracciones obtenidas presentaran compuestos en común. De esta manera, la forma en la que realizamos la extracción representó un punto crucial para determinar si la actividad se debe a un compuesto específico o no. Si bien, la fracción de acetato debe su capacidad antibacteriana a distintos compuestos, la fracción F2 posee los principales compuestos antibacterianos en contra *S. aureus*, los cuales probablemente actúan bajo un mecanismo de sinergia.

Uno de las principales implicaciones del aislamiento biodirigido es que el fraccionamiento continuo reduce la cantidad de muestra disponible para los análisis de caracterización química. En nuestro caso, la fracción F2 presentó un bajo porcentaje de rendimiento, sólo representa el 0.02% del peso total del extracto metanólico. A pesar de que se logró medir el porcentaje de inhibición de las bandas colectadas a partir del cromatograma en capa fina de la fracción F2, los análisis espectrales mostraron que en la banda que presentó los porcentajes más altos (B1) existe la presencia de más de un compuesto, los cuales no se lograron identificar. Aunque se ha reportado la presencia de algunos polifenoles con propiedades antibacteriana tales como el ácido gálico, elálgico, clorogénico, epicatequina, catequina en el extracto vegetal de *R.*

*mangle* L. (Sánchez y col., 2007; Sánchez y col., 2000; Akiyama y col., 2001), es poco probable que estén presentes en la fracción F2, debido a la baja polaridad de la fase móvil con la que ésta fue obtenida. Más aun, la actividad presentada por F2 no corresponde a las MIC reportadas para alguno de ellos en contra de *S. aureus*.

A partir de los análisis espectrales y la consulta de las bases de datos en línea se identificó al bis (2-etilhexil) ftalato (DEHP) como uno de los compuestos presentes en la fracción F2. Desde hace años se conoce que el DEHP forma parte de una familia de compuestos orgánicos denominados “ftalatos” utilizados como plastificadores en todo tipo de productos plásticos (Heudorf y col., 2007). Aunque en la literatura actual no existen trabajos que sugieran que el DEHP sea un metabolito secundario de origen vegetal, hay investigaciones que sustentan orígenes naturales de este ftalato (Qi y col., 2009a; Sultan y col., 2010; Habib y Karim, 2012). En los últimos años, los estudios enfocados en la búsqueda de compuestos farmacológicos a partir de especies fúngicas y bacterianas aisladas de distintas poblaciones de manglares, han demostrado que algunas especies endofíticas sintetizan ftalatos entre sus compuestos bioactivos (Roy y col., 2006; Qi y col., 2009b; Hoang y col., 2008; Bhimba y col., 2012). A pesar de que no existen antecedentes acerca de la microbiota presente en la zona costera de donde obtuvimos la muestra vegetal, los resultados presentados por estos autores sugieren que una fuente probable del DEHP es alguna especie endofítica presente en la corteza del espécimen utilizado.

## CONCLUSIONES

La actividad antibacteriana de la fracción de acetato de etilo no se debe a un solo compuesto, sino, a la acción de múltiples constituyentes químicos.

Los principales compuestos responsables de la naturaleza antibacteriana de la fracción de acetato de etilo fueron aislados en la fracción F2.

Es poco probable que el compuesto identificado sea un compuesto bioactivo producido por *R. mangle* L.



## BIBLIOGRAFÍA

- Arias, M.G.P. 2008. Biotransformación del limoneno por medio de la enzima, Cloroperoxidasa del Hongo *Caidariomyces fumago*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander.  
<http://cromatografia.uis.edu.co/cromatografia/investigacion/cibimol/tesis%20cibimol/Ginna%Arias.pdf>
- Avello, M., Valdivia R., Mondaca M.A., Ordoñez J.L., Bittner M., Becerra J. 2009. Actividad de *Ugni molinae* Turcz. Frente a microorganismos de importancia clínica. *Bol Latinoame Cari Plan Med Arom.* 8(2): 141-144.
- Ávila, L., Baquero E., Viña A., Murillo E. 2006. Actividad antibacteriana de *Diplostephium tolimense* Cuatrec. (*Asteraceae*) frente a *Staphylococcus aureus*. *Rev Fac Quim Farma.* 13(1): 55-60.
- Banso, A. 2009. Phytochemical and antibacterial investigation of bark extracts of *Acacia nilotica*. *J Med Plan Res.* 3(2): 82-85.
- Ballester, I., Camuesco D., Galvez J., Sanchez de Medina F., Zarzuelo A. 2006. Flavonoides y enfermedad inflamatoria intestinal. *Ars Pharm* 47(1):5-21.
- Becerra, J. 2009. Evaluación de la actividad antimicrobiana de fracciones Obtenidas del extracto metanólico de *Ambrosia confertiflora* contra *Vibrio Cholerae*. Tesis Profesional. Universidad de Sonora, Depto. de Ciencias Químico Biológicas y de la Salud, Biblioteca de Q.B.
- Bhimba, B.V., Pushpam A.C., Arumungam P., Prakash S. 2012. Phthalate derivatives from the marine fungi *Phoma herbarum* VB7. *Int J Biolog Pharm Res* 3(4): 507-512.
- Brooks, G.F., Butel J.S. Morse S.A. 2002. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 17ª ed. Ed. El manual moderno.
- Buitimea, G.V. 2010. Estudio de la composición Química de un Extracto con actividad antifúngica de *Jacquinia macrocarpa* (San Juanico) Tesis

- Profesional. Universidad de Sonora, Depto. de Ciencias Químico Biológicas y de la Salud, Biblioteca de Q.B.
- Bustos-Martínez, J. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed*. 17(4): 287-305.
- Camacho, R.P., Nuñez A.N.B. 2008. Evaluación antibacteriana y antioxidante de fracciones obtenidas del extracto metanólico de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*). Tesis de licenciatura. Departamento de ciencias químico biológicas y la salud. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora.
- Cortez-Gallardo, V., Macedo-Ceja J.P., Hernández-Arroyo M., Arteaga-Aureoles G., Espinosa-Galván D., Rodríguez-Landa J.F. 2004. Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias medicas. *Rev Biomed*. 15:123-136.
- De Paula, S.J., Martins de S.A. 2000. Acción antibacteriana de extractos hidroalcoholicos de *Rubus urticaefolius*. *Rev Cubana plant med*. 5(1): 26-29.
- Dewick, P.M. 2002. The Mevalonate and Deoxyxylulose Phosphate Pathways: Terpenoids and Steroids. Ch 5 in *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, Second Edition. John Wiley and Sons (Ed).p 167-289.
- Dhayanithi, N.B., Kumar R., Murthy G., Kathiresan K. 2012. Isolation of antibacterials from the mangrove, *Avicennia marina* and their activity against multi drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacif J Trop Biomed* in press: S1892-S1895.
- Dider, H.B. 1995. La colección de plantas medicinales más importante de América Latina. No. 039 Ciencias (México D.F.) Universidad Autónoma Metropolitana.
- Domingo, D., López-Brea M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Esp Quimioterap*. 16(4): 385-393.

Reg T14 0057

- Duarte, K., Rocha-Santos T., Fretas, A., Duarte A. 2012. Analytical techniques for discovery of bioactive compounds from marine fungi. *Trends in analytical chemistry*. 34:97-110.
- Egwaikhide, P.A., Gimba C.E. 2007. Analysis of the phytochemical content and anti-microbial activity of *Plectranthus glandulosus* whole plant. *Middle-East J Scien Res*. 2 (2-3): 135-138.
- Fimbres-Sierras. 2009. Evaluación de la actividad antioxidante, contenido de fenoles totales y flavonoides de nueve extractos metanólicos de plantas medicinales sonorenses. Tesis Profesional. Universidad de Sonora, Depto. de Ciencias Químico Biológicas y de la Salud, Biblioteca de Q.B.
- Ferry, T., Perpoint T., Vandenesch F., Etienne J. 2005. Virulence determinants in *Staphylococcus aureus* and their involvement in clinical syndromes. *Current Infectious Disease Report*. 7: 420-428.
- García, D.E. 2004. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y Forrajes*. 27(1):1-12.
- García, D.E., Medina M.G. 2006. Composición química, metabolitos secundarios, valor nutritivo y aceptabilidad relativa de diez arboles forrajeros. *Zootecnia Trop*. 24(3): 233-250.
- Ge, M., Chen Z., Russell H., Kohler J., Silver L., Kerns R., Fukuzawa S., Thompson C., Kahne D. 1999. Vancomycin derivatives that inhibit peptidoglycan biosynthesis without binding D-Ala-D-Ala. *Science* 284: 507-511
- Gibbons S. 2004. Anti-staphylococcal plant natural products. *Nat Prod Rep* 21: 263-277
- Gibbons, S. 2004. Anti-staphylococcal plant natural products. *Nat Prod Rep* 21: 263-277
- Gil, D.M.M. 2000. *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la Resistencia a meticilina. *Rev Chil Infect*. 17(2): 145-152.
- Gonzalez, A. 2009. Evaluación de la actividad de fracciones obtenidas de *Krameria erecta* (Cosahui) contra *Helicobacter pylori*. Tesis Profesional.



- Universidad de Sonora, Depto. de Ciencias Químico Biológicas y de la Salud, Biblioteca de Q.B.
- Gonzales, E., Antiparra R., Villareal F. 2009. Aislamiento e identificación de un cepa de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y catalasa negativo. *An Fac med.* 70(1): 45-46
- Gutierrez, M.R. 2007. Actividad antimicrobiana de *Oedogonium capillare*. *Rev Mex Cienc Farm.* 38(3): 26-29.
- Hernandez, J., Goycoolea F.M., Quintero J., Acosta A., Castañeda M., Dominguez Z., Robles R., Vazquez-Moreno L., Velazquez E.F., Astiazaran H., Lugo E., Velazquez C. 2007. Sonoran propolis: chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Med.* 73:1469-74
- Herrmann, M.K. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant cell.* 7:907-919.
- Heudorf, U., Mersch-Sundermann V., Angerer J. 2007. Phthalates: Toxicology and exposure. *Int Hyg Environ Health.* 210:623-634.
- Hranueli, D., Peric N., Branko B., Bogdan S., Cullum J., Waterman P.G., Hunter I.S. 2001. Molecular biology of polyketide biosynthesis. *Food technol biotechnol.* 39(3) 203-213.
- Hoang, V., Li Y., Kim S.K. 2008. Cathepsin B inhibitory activities of phthalates isolates from a marine *Pseudomonas* strain. *Bioorganic and Medical Chemistry Letters.* 8:2083-2088.
- Huang, Z., Cai X., Shao C., She Z., Xia X., Chen Y., Yang J., Zhou S., Lin Y. 2008. Chemistry and weak antimicrobial activities of Phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomoosis sp.* ZSU-H76. *Phytochemistry* 69: 1604-1608.
- Johnson, G.D., Moreno S.S.F., López E.R. 1996. Compendio fotoquímico de la medicina tradicional herbolaria de Sonora. Editorial Unison. pp.361.
- Joklik, W.K., Willet H.P., Amos D.B., Wilfert C.M. 1994. Zinsser Microbiología. 20 ed. Ed. Medica panamericana.

- Jones, P.W., Kinghorn D.A. 2006. Extraction of plant secondary metabolites. Ch. 13 methods in biotechnology, vol. 20. Natural Products Isolation, 2<sup>nd</sup> ed. P. 323-351 Totowa, NJ
- Jessen, O., Rosendal K., Buloww P. 1999. Changing *Staphylococci* and *Staphylococcal* infections: A ten year study of bacteria and cases of bacteremia. *N Engl J Med.* 281:627-635.
- Koneman, E.N., Allen S., Janda W., Schreckenperger P., y Winn W. 2001. Diagnóstico microbiológico. 5<sup>ta</sup> ed. Ed. Panamericana.
- Lock, O., Cabello I., Doroteo V.H. 2006. Análisis de Flavonoides en Plantas. Pontificia Universidad Católica del Perú; Departamento de Ciencias-Sección Química, [http://www.iupac.org/publication /cd/medical\\_chemistry/](http://www.iupac.org/publication/cd/medical_chemistry/)
- López, L.M.T. 2002. Flavonoides. *OFFARM.* 21(4):108-114.
- Manubolu, M., Goodla L., Ravilla S., Obulum V.R. 2013. Activity-guided isolation and identification of anti-Staphylococcal components from *Senecio tenuifolium* Burm. F.leaf extracts. *Asian Pac J Trop Biomed.* 3 (3): 191-195.
- Mathews, C., Van Holde K.E. 1996. Biochemistry. 2<sup>nd</sup> ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, CA.
- Martínez, F.S., González G.J., Culebras J.M., Tuñón M.J. 2002. Los Flavonoides: Propiedades y Acciones antioxidantes. (Revisión). *Nutr. Hosp.* XVII. (6): 271-278.
- Martínez, M.A. 2005. Flavonoides. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Medellín.
- Miranda, M.G. 2011. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* in Mexico. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 68(4): 242-249
- Nascimento, G.G.F., Locatelli J., Freitas P.C., Silava G.L. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian J Microb.* 31:247-256

- Nonin-Lecomte, S., Felden B., Dardel F. 2006. NMR structure of the *Aquifex aeolicus* tmRNA pseudoknot PK1: new insights into the recoding event of the ribosomal trans-translation. *Nucleic Acids Res.*, 34:1847-53.
- Nuñez, A., Morales C.M., Rivera M.E., González A.L. 2006. Vancomicina. Un vencedor vencido. *Medicrit.* 3(6): 136-138.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. 2002. Estrategia de la OMS sobre la medicina tradicional 2002-2005.
- Organización Mundial de la Salud. 2010. Temas de salud, ¿Que es la medicina tradicional? Consultado Noviembre del 2010 [http://www.who.int/topics/traditional\\_medicine/es/](http://www.who.int/topics/traditional_medicine/es/)
- Qi, S.H., Xu Y., Gao J., Qian P.Y., Zhang, S. 2009a. Antibacterial and antilarval compounds from marine bacterium *Pseudomonas rhizosphaerae*. *Annals of microbiology.* 59(2): 229-233.
- Qi, S.H., Xu Y., Xiong H.R., Qian P.Y., Zhang S. 2009. Antifouling and antibacterial compounds from a marine fungus *Cladosporium* sp F14. *World J Microbio Biotechnol.* 25: 399-406.
- Ramírez, L.S., Díaz H.E. 2007. Actividad Antibacteriana de Extractos y Fracciones del Riubarbo (*Rumex Conglomeratus*). *Scientia Et Technica.* 8 (33): 397-400.
- Rodríguez, C.A., Vesga O. 2005. *Staphylococcus* resistente a vancomicina. *Biomédica.* 25(4): 575-587.
- Rondina, R., Palacios P., Vaccaro M., Filip R., Coussio J. 1985. Metodología Para la Preparación y Fraccionamiento sistemático de Extractos Vegetales con miras a su ensayo Farmacológico y eventual Estudio Químico. *Acta Farmacéutica Bonaerense.* Volumen 4 (1): 3-14.
- Rosas-Burgos, E.C., Cortez-Rocha M.O., Cinco-Moroyoqui F.J., Robles-Zepeda R.E., López-Cervantes J., Sánchez-Machado D.I., Lares-Villa F. 2009. Antifungal activity in vitro of *Baccharis glutinosa* and *Ambrosia confertiflora*



- extracts on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium verticillioides*. *World J Microbiol Biotechnol* 25: 2257-2261.
- Roy, R.N., Laskar S., Sen S.K. 2006. Dibutyl phthalates, the bioactive compound produce by *Streptomyces albidoflavus* 321.2. *Microbiol Res.* 161:121-126.
- Ruiz-Bustos, E., Velázquez C., Garibay-Escobar A., García Z., Plascencia-Jatomea M., Cortez-Rocha M.O., Hernandez-Martínez J., Robles-Zepeda R.E. 2009. Antibacterial and Antifungal Activities of Some Mexican Medicinal Plants. *J Med Food.* 12 (6): 1398–1402.
- Sánchez, L.M., Armenteros M., Varcárcel L. 2000. Actividad Antimicrobiana de los Principales Grupos Químicos Presentes en *Rhizophora mangle* L. *Rev. Salud Anim.* 22 (3): 174-179.
- Sánchez, L.M., Varcárcel L., Escobar A., Noa M. 2007. Polyphenol and phytosterol composition in an antibacterial extract from *Rhizophora mangle* L. bark. *J Herb Pharm.* 7 (3-4):107-128.
- Sepúlveda, J.G., Porta D.H., Rocha S.M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 21: 353-363.
- Shan, Y., Xu L., Lu Y., Wang X., Zheng Q., Kong L., Niwa M. 2008. Diterpenes from *Coleus forskohlii* (WIIL) BRIQ (Labiatae). *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 56:52-56.
- Sher, A. 2009. Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. *Gomal Journal of Medical Sciences.* 7(1): 72-78.
- Staunton, J., Weissman K.J. 2001. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep* 18: 380- 416.
- Sultan, M.Z., Moon S.S., Park K. 2010. Natural phthalate derivatives from the bacterium *Burkholderia cepacia* K87. *J Sci Res.* 2(1): 191-195.
- Souza-Fagundes, E.M., Queiroz A., Martins O.A., Gazzinelli G., Corrêa-Oliveira R., Alves T., Zani C. 2002. Screening and fractionation of plant extracts with

- antiproliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz, Rio de Janeiro*, 97(8): 1207-1212.
- Valencia Ortiz, C. 1995. Fundamentos de Fitoquímica. Ed. Trillas. México. pp. 235.
- Velázquez-Meza, M.E. 2005. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. *Salud pub Mex.* 47(5): 381-387.
- Villarreal, J. 1987. La farmacología mexicana: historia y futuro. *Avance y perspectiva.* 31:3-17.
- Wink, M., Shimmer O. 1999. Modes of action of defensive secondary metabolites. In *Function of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology.* Sheffield, England. p304
- Yamada, P., Isoda H., Han J.K., Talorete T.P., Abe Y. 2007. Inhibitory effect of fulvic acid extracted from *Canadian aphanthum* peat on chemical mediator release by RBL-2H3 and KU812 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71:1294-305.
- Xiang, Y., Zhang C., Zheng Y. 2004. Studies on the Chemical Constituents of the Roots of *Rhododendron molle* G. Don. *Journal of Huazhong University of Science and Technology.* 24 (2): 202-204.
- Zamora-Alvarez, L.A. 2011. Actividad Antibacteriana de la Fracción de Hexano, Acetato de Etilo, Etanol y Residual del Extracto Metanólico de *Rhizophora mangle* L. (Mangle Rojo) Contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) y *Escherichia coli* (ATCC 25922). Trabajo individual escrito. Especialidad en inmunohematología diagnóstica. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora.
- Ziegler, J., Facchini P.J. 2008. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annu Rev Plant Biol.* 59: 735-769.